

R.838



TD
679

TD
679

CARTOGRAFIA GENETICA POR COMUTACION CON
NITROSOGUANIDINA

Trabajo realizado en el Departamento de Genética
Facultad de Ciencias, Universidad de Sevilla, para
optar al grado de Doctor en Ciencias, Sección de
Biológicas, por la licenciada

Cristina Pérez Lloveres

Sevilla, Junio de 1974

Director y Padrino

Profesor Dr. D. Enrique Cerdá Olmedo
Director del Departamento de Genética

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi agradecimiento a todas aquellas personas que han contribuido en la realización de este trabajo.

Al profesor E. Cerdá Olmedo, que lo ha dirigido y orientado, por sus enseñanzas y sus soluciones a muchos de los problemas planteados.

A mis compañeros de laboratorio, que con su desinteresada colaboración, han creado un ambiente de trabajo agradable y cooperativo, sin el cual hubiera sido muy penosa la consecución de este trabajo. La excelente ayuda técnica de Pepi Yebra, así como el trabajo de mecanografía de Bonnie Walters, han supuesto contribuciones muy especiales.

A los Departamentos de Bioquímica, Microbiología y Citología, cuya cooperación ha facilitado enormemente la resolución de múltiples problemas técnicos.

A los profesores R. Curtiss y N. Zinder,

por el envío de varias estirpes de bacterias y virus utilizadas en este trabajo.

Al profesor J. L. Ingraham, por su interés, sus consejos, sus sugerencias y su constante estímulo.

RESUMEN Y CONCLUSIONES

Desde la publicación del trabajo de Guerola et al. (1971) se sabe que en Escherichia coli el agente mutagénico N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina induce comutación entre genes o grupos de genes que se replican simultáneamente. En consecuencia los genes que se encuentran muy próximos (menos de dos minutos del mapa genético) tienen tendencia a mutar simultáneamente.

En este trabajo la comutación se ha utilizado como un método de cartografía genética y se ha estudiado en genes muy próximos entre sí de tres regiones diferentes del cromosoma de E. coli: el sistema genético F-lac, el sistema genético leucina-arabinosa y el operón de la arginina. De los resultados obtenidos hemos llegado a las siguientes conclusiones:

En el sistema F-lac

1 - La estirpe χ 493 es un Hfr que transfiere su cromosoma en el orden O-thr-leu.....lac y cuyo factor F está integrado en el cromosoma, puesto que no desaparece después de un tratamiento con

naranja de acridina.

2 - La estirpe χ_{15} es un F^+ cuyo factor F está en forma de episoma y desaparece después de un tratamiento con naranja de acridina.

3 - Las estirpes $Hfr\ Lac^-$ y $F^+\ Lac^-$ obtenidas por mutagénesis con nitrosoguanidina a partir de las estirpes χ_{493} y χ_{15} respectivamente, conservan las características donantes de sus progenitores.

4 - En las estirpes $Hfr\ Lac^-$, la nitrosoguanidina induce comutación entre el factor F y el gen lac.

5 - En las estirpes $F^+\ Lac^-$, la nitrosoguanidina no induce comutación entre F y lac.

6 - En las estirpes $Hfr\ Lac^-$ deficientes en conjugación, la nitrosoguanidina no induce comutación entre F y lac, de lo que se deduce que se han convertido en estirpes F^+ .

En el sistema leucina-arabinosa

7 - En una estirpe de E. coli Leu^- , la nitrosoguanidina induce comutación entre los genes leu y ara.

8 - En una estirpe de E. coli Ara⁻, la nitrosoguanidina induce comutación entre los genes ara y leu.

9 - Los genes leu y ara se encuentran muy cerca uno de otro en el mapa genético y la comutación inducida por la nitrosoguanidina es un proceso recíproco.

En la ruta de la arginina

10 - En una estirpe de E. coli ArgH⁻, la nitrosoguanidina induce comutación entre el gen argH y los genes argE, argC y argB.

11 - En una estirpe de E. coli ArgE⁻, la nitrosoguanidina induce comutación entre el gen argE y los genes argB y argC.

12 - Los genes argE, argC, argB y argH están agrupados en una pequeña región del cromosoma, mientras que los genes argA, argF y argG se encuentran lejos de la región ECBH.

En cuanto al método

13 - La comutación inducida por la nitrosoguanidina es un nuevo método de cartografía genética cuyos resultados concuerdan perfectamente con los obtenidos por los métodos clásicos.

INDICE DE MATERIAS

PRELIMINARES

AGRADECIMIENTOS	2
RESUMEN Y CONCLUSIONES	4
INDICE DE MATERIAS	8
INDICE DE FIGURAS	15
INDICE DE TABLAS	17

INTRODUCCION

1. CARACTERISTICAS Y EFECTOS BIOLOGICOS DE LA NITROSOGUANIDINA: COMUTACION	20
2. METODOS DE CARTOGRAFIA GENETICA	25
A. Conjugación	25
B. Transducción	31
C. Técnicas físicas	34
D. Replicación	36
3. SISTEMAS GENETICOS EMPLEADOS EN ESTE ESTUDIO	38
A. Sistema F- <u>lac</u>	41
B. Sistema leucina-arabinosa	46
C. Operón de la arginina	47

MATERIALES Y METODOS

MATERIALES

I.	ESTIRPES BACTERIANAS	56
II.	BACTERIOFAGOS	59
III.	PRODUCTOS QUIMICOS	59
IV.	TAMPONES	59
	A. Tampón tris-sales	59
	B. Tampón tris-maleato	60
V.	MEDIOS LIQUIDOS	61
	A. Medio mínimo	61
	B. Medio nutritivo	61
VI.	MEDIOS SOLIDOS	62
	A. Medio mínimo	62
	B. Medio nutritivo	62
	C. Medio de conservación	62

METODOS

I.	CRECIMIENTO	64
II.	RECuento DE BACTERIAS VIVAS	64
III.	TRATAMIENTO CON NITROSOGUANIDINA	65
IV.	AISLAMIENTO DE NUEVAS ESTIRPES	65
	A. Aislamiento de auxótrofos	65
	B. Aislamiento de mutantes resistentes a la estreptomicina	67

C.	Aislamiento de revertientes	67
V.	COMPROBACION DE LAS CARACTERISTICAS	
	DONANTES	68
A.	Conjugación en medio líquido	68
B.	Conjugación interrumpida	69
C.	Conjugación en medio sólido	70
D.	Pruebas de resistencia a fagos ...	71
E.	Tratamiento con naranja de acridina	71

RESULTADOS

PARTE I	COMUTACION EN EL SISTEMA F- <u>lac</u>	
I.	EXPERIMENTOS CON EL Hfr χ 493: COMPROBACION DE LA CAPACIDAD DONANTE	76
	1. Conjugación en medio líquido	76
	2. Conjugación en medio sólido	77
	3. Mutagénesis y selección de estirpes Hfr Lac ⁻	78
	4. Reproducción y recuento de fagos ...	80
II.	EXPERIMENTOS CON LOS Hfr Lac ⁻	84
	1. Efecto de la nitrosoguanidina sobre el crecimiento	84
	2. Expresión de la mutación Lac ⁺	88

3.	Comprobación de las características donantes	93
A.	Tratamiento con naranja de acridina	93
B.	Tratamiento con bromuro de etidio	93
C.	Conjugación interrumpida	94
4.	Coincidencia de la reversión Lac^+ y la pérdida de la capacidad donante Hfr	98
5.	Coincidencia de la reversión Lac^+ y la adquisición de resistencia a los fagos Q β y f2	104
6.	Coincidencia de la reversión Lac^+ y la adquisición de resistencia al fago f1	112
III.	EXPERIMENTOS CON EL F^+ χ 15 : SELECCION DE ESTIRPES Lac^-	116
IV.	EXPERIMENTOS CON LOS F^+ Lac^-	117
1.	Comprobación de las características donantes: Tratamiento con naranja de acridina	117
2.	Coincidencia de la reversión Lac^+ y la adquisición de resistencia a los fagos Q β y f2	117

3.	Coincidencia de la reversión Lac^+ y la adquisición de resistencia al fago f1	121
V.	SELECCION DE ESTIRPES DEFICIENTES EN CONJUGACION A PARTIR DE ESTIRPES $Hfr Lac^-$.	123
VI.	EXPERIMENTOS CON ESTIRPES DERIVADAS DE $Hfr Lac^-$ DEFICIENTES EN CONJUGACION ...	124
1.	Coincidencia de la reversión Lac^+ y la adquisición de resistencia a los fagos Q β y f2	124
2.	Coincidencia de la reversión Lac^+ y la adquisición de resistencia al fago f1	133
PARTE II COMUTACION EN EL SISTEMA LEUCINA-ARABINOSA		
		136
I.	MUTAGENESIS Y SELECCION DE ESTIRPES Ara^- Y DE ESTIRPES Leu^-	136
II.	SELECCION DE MUTANTES Ara^- Y DE MUTANTES Leu^- QUE REVIERTEN BIEN CON NITROSOGUANIDINA	137
III.	COINCIDENCIA DE LA REVERSION Leu^+ Y LA MUTACION Ara^-	138
IV.	COINCIDENCIA DE LA REVERSION Ara^+ Y LA MUTACION Leu^-	140

PARTE III	COMUTACION EN EL OPERON DE LA	
	ARGININA	141
I.	OBTENCION DE MUTANTES Arg^-	141
II.	SELECCION DE MUTANTES Arg^- AFECTADOS EN EL GEN H	142
III.	SELECCION DE MUTANTES ArgH^- QUE REVIER- TEN BIEN CON NITROSOGUANIDINA	143
IV.	EXPERIMENTOS CON SE30	145
	1. Obtención de revertientes ArgH^+	145
	2. Selección de mutantes Arg^- entre los revertientes ArgH^+	145
	3. Selección de 100 mutantes Arg^- entre los revertientes ArgH^+	146
	4. Coincidencia de la reversión ArgH^+ y la mutación ArgE^- , C^- y B^-	150
V.	EXPERIMENTOS CON SE33	152
	1. Reversión ArgE^+	152
	2. Obtención de revertientes ArgE^+ pero Arg^-	152
	3. Caracterización de estos mutantes .	152

DISCUSION

I.	RESULTADOS CON EL SISTEMA F- <u>lac</u>	155
II.	RESULTADOS CON EL SISTEMA LEUCINA- ARABINOSA	157
III.	RESULTADOS CON LA RUTA DE LA ARGININA .	159
IV.	GENERALIDAD DEL METODO CARTOGRAFICO ...	161
	REFERENCIAS	165

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Representación esquemática del cromosoma de <u>E. coli</u> con los marcadores utilizados en este trabajo.....	40
Figura 2.	Compuestos intermedios de la ruta biosintética de la arginina	49
Figura 3.	Ensayo de sensibilidad o resistencia a los fagos Q β y f2	74
Figura 4.	Acción lítica de los fagos Q β y f2 sobre la estirpe χ 493	83
Figura 5.	Evolución de la densidad óptica de la estirpe SE12 antes y después del tratamiento con nitrosoguanidina	86
Figura 6.	Expresión de la mutación Lac ⁺ y Str ^r de la estirpe SE12 después del tratamiento con nitrosoguanidina	90

Figura 7. Evolución del número de recombinantes $\text{Pro}^+ \text{Str}^r$, $\text{Thr}^+ \text{Str}^r$ y $\text{His}^+ \text{Str}^r$ entre las estirpes SE12 y DF73 97

Figura 8. Clasificación de 94 mutantes ArgH^+ pero Arg^- 149

INDICE DE TABLAS

Tabla I. Clasificación de los diferentes
mutantes arg52

Tablas II, III, IV y V. Coincidencia de la re-
versión Lac^+ y la pérdida de la ca-
pacidad donante Hfr en las estirpes
SE10, SE11, SE12 y SE13107

Tablas VI y VII Coincidencia de la rever-
sion Lac^+ y la adquisición de resis-
tencia a los fagos $Q\beta$ y f2 en las
estirpes SE12 y SE13 107

Tablas VIII y IX Coincidencia de la rever-
sión Lac^+ y la adquisición de
resistencia al fago f1 en las
estirpes SE12 y SE13 114

Tablas X y XI Coincidencia de la reversión
 Lac^+ y la adquisición de resis-
tencia a los fagos $Q\beta$ y f2 en las
estirpes SE20 y SE21 119

Tabla XII Coincidencia de la reversión
Lac⁺ y la adquisición de resis-
tencia al fago f1 en la estirpe
SE21 122

Tablas XIII, XIV, XV, XVI, XVII, XVIII, y XIX
Coincidencia de la reversión Lac⁺
y la adquisición de resistencia a los
fagos Q β y f2 en las estirpes SE15,
SE16, SE17, SE18, SE19, SE22 y
SE23 126

Tablas XX y XXI Coincidencia de la reversión
Lac⁺ y la adquisición de resistencia
al fago f1 en las estirpes SE17 y
SE18 134

Tabla XXII Selección de un mutante ArgH⁻ que
revierta bien con nitrosoguanidina . 144

Tabla XXIII Selección de mutantes Arg⁻ en-
tre los revertientes ArgH⁺ 147

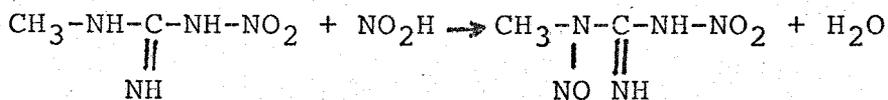
Tabla XXIV Coincidencia de la reversión
ArgH⁺ y la mutación ArgE⁻, C⁻
o B⁻ 151

INTRODUCCION

1. CARACTERISTICAS Y EFECTOS BIOLOGICOS DE
LA NITROSOGUANIDINA: COMUTACION

CARACTERISTICAS

El poderoso agente mutagénico N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (A) se sintetizó y caracterizó químicamente en 1947, por McKay y Wright, por nitrosación de la N-metil-N'-nitroguanidina (B) en medio ácido.



(B)

(A)

La N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (cuyo nombre abreviaremos en adelante a nitrosoguanidina) es estable en forma cristalizada pero inestable en solución. Su mayor estabilidad es a pH 5 (Mandell y Greenberg, 1960; Cerdá-Olmedo y Hanawalt, 1967), decreciendo en ambas direcciones de la escala. Es inestable si se expone a la luz, por lo que las soluciones deben prepararse en pequeñas alícuotas (1 ml) de solución que se conservan congeladas hasta su uso y nunca se vuelven a congelar.

EFFECTOS BIOLOGICOS

El interés biológico de la nitrosoguanidina comenzó con las observaciones de su efecto inhibitor del crecimiento de tumores en ratones (Golding et al., 1959) y posteriormente se le han atribuido una gran variedad de efectos en distintos sistemas biológicos.

Desde que Mandell y Greenberg en 1960 descubrieron la acción mutagénica de la nitrosoguanidina en bacterias, su aplicación y el estudio de sus propiedades se extendió rápidamente.

Ha sido estudiada la acción mutagénica de la nitrosoguanidina en gran variedad de organismos. Los estudios más completos se hicieron en Escherichia coli (Adelberg et al., 1965), Salmonella thyphimurium (Eisenstark et al., 1965), Bacillus subtilis (Yoshida y Yuki, 1968), Streptomyces (Délic et al., 1970; Kasahara et al., 1971), Schizosaccaromyces pombe (Loprieno y Clarke, 1965), Arabidopsis thaliana (Muller y Gichner, 1964; Velemýnský y Gichner, 1968), Paramecium aurelia

(Kimball, 1970), Taphrina maculans (Singh, 1973), células de hamster (Orkin y Littlefield, 1971).

También se han encontrado otros efectos biológicos de la nitrosoguanidina, tales como la inducción de profagos (Allan y McCalla, 1966), la eliminación de cloroplastos en Euglena (McCalla, 1965); la producción de aberraciones cromosómicas en plantas (Gichner et al., 1963), acción carcinogénica (Druckrey et al., 1966), inducción de recombinación mitótica (Zimmermann et al., 1966), inactivación parcial del factor F (Takahashi y Barnard, 1967).

La nitrosoguanidina reacciona con los ácidos nucleicos (Singer y Fraenkel-Conrat, 1967; Lawley, 1968), (Olson y Bard, 1969; Craddock, 1969; Lawley y Thatcher, 1970; Kolb y Kaudewitz, 1970; Lingens et al., 1971) y con las proteínas (Cerdá-Olmedo y Hanawalt, 1967; McCalla y Reuvers, 1969; Lawley y Thatcher, 1970). En Escherichia coli actúa inhibiendo la síntesis normal de ADN (Terawaki y Greenberg, 1965; Cerdá-Olmedo et al., 1968) y hay indicios de que su actividad mutagénica va asociada a una detención de la maquinaria de replicación (Jiménez Sánchez, 1974).

También se ha observado que estimula la replicación reparadora (Cerdá-Olmedo y Hanawalt, 1967). A altas concentraciones tiene un gran efecto inhibitor sobre la síntesis de proteínas pero no sobre la síntesis de ARN, y ésta es probablemente la causa principal de la muerte en ciertas condiciones particulares de estirpes que pueden reparar los daños producidos en su ADN (Cerdá-Olmedo y Hanawalt, 1967; Lingens et al., 1967). Aunque produce letalidad, la proporción de mutantes entre los supervivientes es alta y se han investigado diversas condiciones de tratamiento para conseguir un máximo de mutantes con un máximo de supervivientes (Mandell y Greenberg, 1969; Adelberg et al., 1965; Cerdá-Olmedo y Hanawalt, 1967, 1968).

COMUTACION

En los trabajos de Cerdá-Olmedo et al. (1968) se demostró que la nitrosoguanidina induce mayor frecuencia de mutaciones en las regiones en replicación que en otras partes del cromosoma. Estas mutaciones no consisten en grandes deleciones, ya que la mayoría de las mutaciones inducidas

por la nitrosoguanidina son reversibles (Eisenstark et al., 1965). Tomando muestras sucesivas de un cultivo sincronizado y tratándolas con nitrosoguanidina, Cerdá-Olmedo et al. encontraron un máximo de un mutante determinado en el momento en que se estaba replicando el gen correspondiente, y esto permitió construir por primera vez un mapa de replicación de los genes.

La mutagénesis selectiva de las regiones en replicación implica que si dos genes están próximos en el cromosoma, y se replican por tanto simultáneamente, tendrán una alta probabilidad de ser mutados simultáneamente en un tratamiento con nitrosoguanidina. En los trabajos de Guerola et al., (1971), al seleccionar mutantes azi (resistentes a azida de sodio), se observó que una proporción relativamente muy alta de ellos habían sufrido también mutaciones que afectaban a la síntesis de leucina (genes leu) o la utilización de arabinosa (genes ara), pero pocos que afectaran la síntesis de histidina (genes his) o isoleucina y valina (genes ilv). Este resultado es comprensible sabiendo que los genes ara y leu están muy cerca de azi en el cromosoma de E. coli, mientras que his

e ilv están muy lejos. Definieron el índice de comutación entre dos genes o grupos de genes como la frecuencia de mutantes que afectan a ambos en relación con el producto de las frecuencias de los mutantes que afectan sólo a uno u otro, y encontraron que si la distancia entre dos genes era de un minuto en el mapa genético, el índice de comutación era 15, que el índice disminuía rápidamente al aumentar la distancia y que no había comutación apreciable cuando la distancia entre los genes era mayor de dos minutos.

2. METODOS DE CARTOGRAFIA GENETICA

Como sería imposible hacer en esta Introducción una descripción completa de las numerosas técnicas utilizadas para la construcción de mapas genéticos, hemos seleccionado únicamente aquellas técnicas genéticas que se refieren a estirpes bacterianas y que se han venido utilizando con éxito a lo largo de varios años.

A) - CONJUGACION

Hay tres maneras, en general, de carto-

grafiar el orden relativo de los genes en el cromosoma de E. coli y estimar las distancias relativas entre ellos, estudiando la conjugación y analizando los recombinantes. Dos de estos métodos, relacionados directamente con la transferencia del cromosoma, permiten construir mapas genéticos por el tiempo de entrada de los marcadores en el cigoto y por el gradiente de transmisión de estos marcadores al cigoto. Ambas técnicas permiten colocar los genes en un orden relativo, incluso cuando se encuentran a grandes distancias, pero no son resolutivos para distancias muy pequeñas. El tercer método, complementario de los dos anteriores, permite construir un mapa genético por frecuencia de recombinación entre dos ó más genes y es muy sensible cuando se aplica a regiones pequeñas del cromosoma.

Después del hallazgo de estirpes donantes con alta frecuencia de recombinación (denominadas Hfr), Jacob y Wollman, en 1956, estudiaron la cinética de la formación de recombinantes por el procedimiento de poner en conjugación una estirpe Hfr (tipo silvestre y sensible a la estreptomycin) con una estirpe F⁻ (auxotrófica para treonina y

leucina, incapaz de vivir con galactosa como única fuente de C y resistente a la estreptomina). Tomaron muestras cada 10 minutos, las agitaron violentamente y las sembraron en cajas de medio mínimo con glucosa conteniendo estreptomina para seleccionar recombinantes Thr^+ Leu^+ Str^r y en cajas de medio mínimo con galactosa conteniendo treonina, leucina y estreptomina para seleccionar recombinantes Gal^+ Str^r . Los resultados obtenidos mostraron que no aparecía ningún recombinante Thr^+ Leu^+ Str^r si una muestra de la mezcla del cruzamiento se agitaba durante los 8 primeros minutos de contacto celular y no aparecía ningún recombinante Gal^+ Str^r si se agitaba durante los 25 primeros minutos. A los 60 minutos de conjugación se obtuvieron 18 recombinantes Thr^+ Leu^+ Str^r y 5 recombinantes Gal^+ Str^r por cada 100 Hfr. Era evidente que el Hfr transfería su cromosoma desde un origen O definido y continuaba en el orden O-thr-leu-gal. Por consiguiente, el tiempo de entrada de cada uno de estos genes en la célula receptora F^- proporciona una medida de su distancia genética, que es proporcional a la distancia física si se supone que la velocidad de migración cromosómica es constante por unidad de longitud.

Estudiando una gran variedad de estirpes F^- auxotróficas, Jacob y Wollman fueron capaces de construir un mapa genético de la estirpe Hfr en términos de tiempo, parámetro que no se había empleado en la elaboración de mapas genéticos. Posteriormente, estudiaron el orden génico con que varias estirpes Hfr transfieren su cromosoma, encontrando que cualquier par de genes vecinos en una estirpe, lo era en todas las demás, y por lo único que se diferenciaba una línea de otra era por la posición del origen y la dirección en que se transferían los genes. Propusieron entonces que el cromosoma de la bacteria F^+ debía ser circular y se rompería por el lugar de origen de cada estirpe para hacerse lineal en las bacterias Hfr.

Esta hipótesis fue confirmada más tarde por Cairns con la visualización autorradiográfica de la molécula de ADN bacteriano.

Los aspectos generales del mapa genético de E. coli han sido obtenidos por este método. El mapa genético de E. coli aparece, por consiguiente, dividido en minutos, y su longitud total es de 90 minutos.

La interrupción espontánea de la conjugación fue confirmada por experimentos de "inducción zigótica" en que el Hfr era lisógeno para el fago λ y el F^- no era lisógeno (Jacob y Wollman, 1956). La interrupción espontánea es responsable del gradiente de transmisión observado si se permite indefinidamente la conjugación; los genes se transfieren entonces con mayor frecuencia cuanto más cerca estén del origen. Las frecuencias así observadas sirven para formar mapas genéticos que coinciden con los formados por conjugación interrumpida.

Si existe una probabilidad constante K por minuto (y por consiguiente por unidad de longitud del cromosoma donante) de que la transferencia se interrumpa, entonces la probabilidad p de transferencia de un gen localizado a una distancia del origen tal que su transferencia requiere x minutos sería

$$p = e^{-Kx}$$

Puesto que la razón de p entre leu y gal es $0.18/0,05 = 3,6$ y que los valores correspondientes de x son 8 y 25 minutos respectivamente, se puede calcular que:

$$K = \frac{\ln 3.6}{25 \cdot 60} = 0.075/\text{minuto}$$

El primer intento de construir un mapa genético por frecuencia de recombinación (Lederberg y Tatum, 1946) había fracasado porque es una condición necesaria para la aparición conjunta de alguno de los dos genes donantes en un recombinante que ambos sean transferidos a la célula F⁻ antes de que se interrumpa la conjugación y además que realicen la integración conjunta en el consiguiente proceso de recombinación. Cuanto más próximos estén los genes en el ADN donante, es decir, cuanto mayor sea su ligamiento genético, más probabilidad tendrán de ser integrados juntos.

Si sabemos que la frecuencia de recombinación entre dos genes separados por un minuto de tiempo de transferencia es del 22%, puesto que la transferencia de todo el cromosoma (3x10⁶ pares de bases) requiere aproximadamente 90 minutos, la probabilidad de entrecruzamiento por par de bases es:

$$\frac{22}{100} \times \frac{90}{3 \cdot 10^6} = 0,06\%$$

La determinación de frecuencias de recombinación permite, por tanto, hacer el mapa de genes próximos, pero es inútil para genes separados por varios minutos, porque la frecuencia de recombinación alcanza el máximo del 50%.

Combinando este método cartográfico basado en las frecuencias de recombinación con los anteriores se fue contruyendo gradualmente el mapa de todo el genomio de E. coli, que en la actualidad cuenta con casi 500 genes (Taylor, 1972).

B) TRANSDUCCIÓN

Zinder y Lederberg (1952) descubrieron la transducción como un nuevo mecanismo de intercambio genético que difiere radicalmente de la conjugación. Gracias a este mecanismo, una bacteria puede recibir un fragmento de ADN utilizando como vehículo la cápsida de un fago.

Numerosos experimentos de transducción con el fago P1 empleando mutaciones previamente localizadas por medio de la conjugación demostraron que el ligamiento de dos genes en el cromosoma

bacteriano puede deducirse de la frecuencia relativa con la que son cotransducidos. Puesto que el fragmento de ADN que lleva el fago corresponde a un 3% del ADN bacteriano total (Ikeda y Tomizawa, 1965) cuanto más cerca se encuentren dos genes entre sí, mayor será la probabilidad de que residan en el mismo segmento. De este modo se puede deducir la distancia de mapa entre dos lugares genéticos muy estrechamente ligados de la frecuencia de su cotransducción y obtener así un mapa de la estructura fina de un pequeño segmento del cromosoma.

Sobre estas bases, Yanofsky y Lennox en 1959 construyeron un mapa genético de la región trp del cromosoma de E. coli. Aislaron un gran número de mutantes Trp^- y los clasificaron en cinco grupos distintos, según la reacción de la biosíntesis del triptófano deficiente en cada uno. Seleccionaron varios mutantes trpA (afectados en la proteína A de la triptófanosintetasa) y realizaron transducciones en las que los diferentes mutantes figuraban como donantes y como receptores. De esta forma determinaron la posición exacta de cada uno en el mapa genético. Mientras tanto, se

dedicaron a la extracción, purificación y análisis estructural de la proteína A de la triptófanosintetasa, codificada por el gen trpA, y encontraron que esta proteína está formada por 267 aminoácidos con una secuencia fija.

Para determinar la naturaleza de la alteración química responsable de la pérdida de la función enzimática de las diferentes mutaciones en la región trpA, analizaron las secuencias de aminoácidos de la proteína A de la triptófanosintetasa en ocho mutantes distintos, y comprobaron que en cada mutante, esta proteína A no funcional, llevaba un aminoácido anormal en un lugar definido y demostraron que el orden relativo de los lugares mutantes en el mapa genético del gen trpA es exactamente el mismo que el orden relativo de los residuos de aminoácidos en el polipéptido que estas mutaciones han afectado, es decir, que la secuencia de nucleótidos del gen es colinear con la secuencia de aminoácidos que determina específicamente (Yanofsky et al., 1964).

C) TECNICAS FISICAS

Algunas de las técnicas biofísicas, empleadas preferentemente en la cartografía de fagos, se han usado sobre estirpes bacterianas, observándose que los mapas obtenidos por estos métodos coincidían perfectamente con los obtenidos por técnicas genéticas.

Una técnica aplicada con éxito en la cartografía genética de E. coli fue empleada por Stent y Fuerst, 1955, basada en estudios de desintegración de p^{32} en el ADN de bacteriófagos (Hershey et al., 1951).

Cuando se introduce fósforo radiactivo con una actividad específica alta (100 mCi/mg) en el ADN de E. coli, un átomo de fósforo de cada 3000 queda marcado con p^{32} . Al desintegrarse, los átomos de p^{32} son sustituidos por átomos de azufre (S)³² que provocan rupturas no letales en una de las cadenas de ADN, pero que al ir acompañadas de la emisión de radiación β , originan rupturas en la cadena complementaria en un 10% de los casos. La ruptura de ambas cadenas se cree que

es letal. Este proceso se conoce con el nombre de "suicidio radioactivo".

Stent et al. marcaron células de una estirpe Hfr con P^{32} y la mantuvieron en un congelador durante varios días. Cada día tomaban una muestra y hacían experimentos de conjugación empleando una estirpe F^- no radioactiva. Midieron el número de recombinantes obtenido en cada experimento y observaron que desciende exponencialmente al aumentar el tiempo de almacenamiento en el congelador, durante el cual se producían las desintegraciones del P^{32} y las consiguientes roturas cromosómicas. Los resultados indicaron que la longitud del fragmento cromosómico transferido por el Hfr durante la conjugación dependía del número de rupturas que hubiera sufrido. Suponiendo que el P^{32} se distribuye por igual en todo el cromosoma, las pendientes de la fracción de recombinantes en función del tiempo de almacenamiento deben ser proporcionales a las distancias al origen de los genes correspondientes. Efectivamente, se observó una inactivación relativa de los marcadores thr, leu, azi, ton, lac y gal de 0.35: 0.39: 0.43: 0.87 y

1.0 respectivamente, que corresponde satisfactoriamente con las distancias 0.34: 0.36: 0.44: 0.72 y 1.0 obtenidas por conjugación secuencial, lo que permite aplicar este método como una técnica más de cartografía genética.

La relación entre las distancias genéticas medidas por recombinación y las distancias físicas del cromosoma varía mucho de un organismo a otro. En E. coli una unidad de recombinación corresponde a 2×10^3 pares de bases, en el fago T4 a 250 pares de bases, en Drosophila a 3×10^5 pares de bases y en ratones a $1,2 \times 10^6$ pares de bases (C.P. Swanson, 1967).

D) MAPAS OBTENIDOS POR REPLICACION

En 1968 Cerdá-Olmedo, Hanawalt y Guerola demostraron que la nitrosoguanidina mutageniza específicamente la región del punto de replicación con una probabilidad mucho más alta que el resto de la molécula de ADN. Pensaron entonces en la posibilidad de tratar con nitrosoguanidina muestras sucesivas de un cultivo sincronizado y

analizar los mutantes obtenidos en cada una. De un cultivo sincronizado de un derivado de E. coli 15 tomaron muestras cada 5 minutos, las trataron con nitrosoguanidina y las ensayaron para diferentes tipos de mutantes. Encontraron un gran aumento en la frecuencia de mutación en ciertos tiempos del ciclo de replicación, y estos tiempos diferían de un marcador a otro, permaneciendo constantes para un mismo marcador en varios experimentos. Después de obtener un máximo de mutantes en un marcador determinado, al cabo de un cierto tiempo se obtenía un segundo máximo, y a este intervalo se le llamó tiempo de replicación. Este tiempo de replicación se corresponde con el tiempo de generación del cultivo en fase exponencial en el mismo medio y a la misma temperatura.

Hicieron varios experimentos ensayando varias mutaciones en cada uno, y definieron el tiempo de replicación como la media de la diferencia de tiempos entre los máximos del mismo marcador. A cada marcador le asignaron un valor, llamado posición del marcador, que era el cociente entre el tiempo de su primer máximo y el tiempo de replicación.

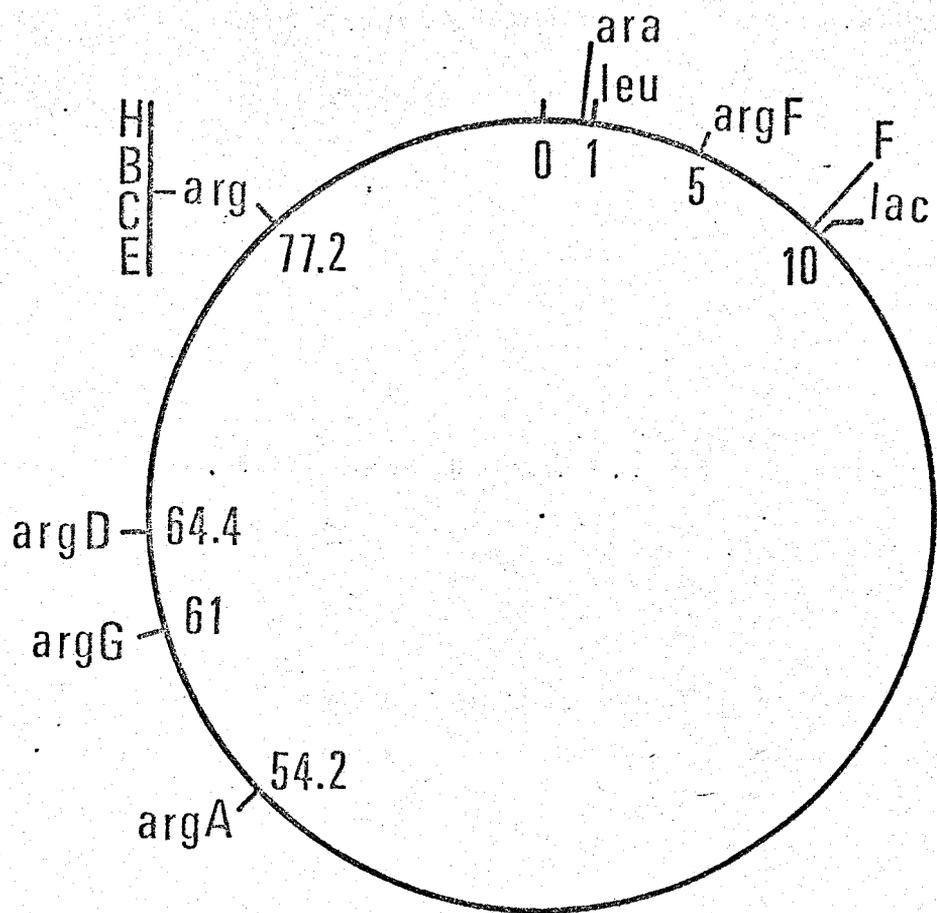
Estudiaron siete marcadores diferentes y comprobaron que sus posiciones respectivas coincidían bastante bien con los lugares que ocupan estos marcadores en el mapa basado en los métodos clásicos de recombinación. Estos mismos experimentos los repitieron con E. coli K-12, y obtuvieron idénticos resultados.

Empleando esta misma técnica y utilizando el mismo agente mutagénico Jyssum (1969) estudió el origen y la secuencia de la replicación del cromosoma de Neisseria meningitidis, Yabe y Mitsuhashi (1971) averiguaron el momento en que tenía lugar la replicación y la transferencia de un factor R en E. coli y Hohlfeld y Vielmetter (1973) demostraron la replicación bidireccional del cromosoma de E. coli.

3. SISTEMAS GENETICOS EMPLEADOS EN ESTE ESTUDIO

Hemos aplicado el método de la comutación a varios grupos de genes localizados en diferentes partes del cromosoma de E. coli. La Figura 1 indica la situación de tales genes en el mapa genético de E. coli, según los resultados reunidos por Taylor (1972).

FIGURA 1. Representación esquemática del cromosoma de Escherichia coli con los marcadores utilizados en este trabajo. Las distancias corresponden a las obtenidas por Taylor y Trotter (1972).



A) - SISTEMA F-Lac

La conjugación en E. coli exige el contacto entre una célula donante y una célula receptora. El carácter de donante se debe a la presencia en la célula del factor sexual F, una partícula infectiva, que se autorreproduce y que confiere a las estirpes portadoras ciertas propiedades: 1) Las células donantes (F^+) pueden cambiar espontáneamente y convertirse en células receptoras (F^-). 2) Si se añade una sola célula F^+ a un cultivo de células F^- , al cabo de un cierto tiempo todas las células son F^+ , y sus descendientes conservan el factor F. 3) Las células F^+ tienen una actividad sexual baja, ya que sólo una de cada 10^4 células transfiere ADN bacteriano a una célula F^- .

Posteriormente se comprobó que el factor F de E. coli era un pequeño fragmento de ADN (Falkow et al., 1964) que tenía una longitud aproximada de 10^5 pares de bases, equivalente a un 2% del total del cromosoma bacteriano.

En 1950 Cavalli encontró un mutante F^+ de E. coli que, en experimentos de conjugación con una

estirpe F^- , producía una frecuencia de recombinación muy elevada, y que designó con el nombre de Hfr. En los cruzamientos entre estirpes Hfr y F^- , llevados a cabo por Hayes y más tarde por Jacob y Wollman, se encontró que la mayor parte de los descendientes eran F^- , con la excepción de algunos individuos Hfr. En algunas ocasiones, estas estirpes Hfr revertían a la forma original, y se comportaban como verdaderas estirpes F^+ que contenían partículas F infectivas. Este hecho, que indicaba que las estirpes Hfr retenían el factor F de alguna manera, hizo pensar a Jacob y Wollman que en estas estirpes el factor F podría estar integrado en el cromosoma bacteriano. Para probar esta hipótesis, efectuaron cruzamientos Hfr x F^- , interrumpiendo la conjugación cada cierto tiempo, y observaron que, en cada estirpe Hfr la transferencia del cromosoma donante se hacía de una forma secuencial, a partir de un origen fijo para cada estirpe y las células receptoras se convertían en Hfr sóloamente en los casos en que era transferido el último marcador (el más alejado del origen). Parecía por tanto que el factor sexual es un elemento autorreproductor que puede existir en

dos estados, autónomo e integrado. En el estado autónomo se obtiene una célula F^+ en la que el factor F no forma parte del cromosoma bacteriano y se replica independientemente de él. Los genes propios del factor F daban a la bacteria F^+ la capacidad de transmitir el factor F a una célula F^- . En el estado integrado, el factor F forma parte del cromosoma bacteriano y se replica como parte de él, lo que explicaría por qué el contacto de las células Hfr con células F^- no convierte a éstas en donantes, a menos que transfieran todo el cromosoma. Tanto en el estado autónomo como en el integrado los caracteres fenotípicos adquiridos por la célula por medio del factor sexual, tales como la presencia de pelos sexuales o la sensibilidad a ciertos fagos, son generalmente accesorios, ya que este factor no es un constituyente celular necesario. Cuando una bacteria ha sido "curada" del factor sexual (o sea, el cambio $F^+ \rightarrow F^-$) los caracteres fenotípicos se pierden irremisiblemente.

Otro dato que apoya la hipótesis de Jacob y Wollman fue el descubrimiento de una nueva estirpe (Adelberg, 1959) con un gran aumento en la frecuencia de los procesos de integración y desinte-

gración ($F^+ \rightarrow Hfr$ y $Hfr \rightarrow F^+$). Esta estirpe, rever-
tiente de un Hfr, poseía un factor sexual modi-
ficado, al que Adelberg asignó el símbolo F' , que
se integraba invariablemente en el mismo lugar del
cromosoma bacteriano, diferenciándose del factor F
normal, cuya integración se realiza en muchos si-
tios distintos del cromosoma y, por consiguien-
te, da lugar a una diversidad de estirpes Hfr. Adel-
berg propuso que el factor sexual F' adquiriría parte
del cromosoma bacteriano y retenía una "memoria"
del lugar genético en el que se había integrado
por primera vez en forma de Hfr. A partir de un
Hfr cuyo origen de transferencia estaba muy pró-
ximo a los genes lac, Jacob y Adelberg seleccio-
naron una estirpe de baja frecuencia de recombi-
ción para todos los caracteres excepto para lac.
El estudio de estos recombinantes indicó que sólo
recibían F y Lac^+ de la bacteria donante y que
eran inestables y podían revertir a $F^- Lac^-$. La
explicación de estos fenómenos es que la estirpe
aislada llevaba un factor sexual F' , designado co-
mo $F-lac$, formado al separarse F del genomio lle-
vándose los genes lac bacterianos.

En este trabajo decidimos emplear la nitro-

soguanidina como un instrumento para diferenciar el estado autónomo o integrado del factor sexual F de E. coli. Hemos empleado una estirpe Hfr de E. coli K-12 denominada x493, cuyo orden de transferencia es O-thr-leu ... lac y que, según la hipótesis de Jacob, debe tener el factor F integrado en el cromosoma bacteriano en un lugar muy próximo al gen lac. Este Hfr se trató con nitrosoguanidina y se seleccionó un mutante Lac⁻. Si F está muy cerca de lac, al tratar este mutante Lac⁻ con nitrosoguanidina y seleccionar revertientes Lac⁺, esperábamos encontrar un porcentaje más alto de células deficientes en las funciones correspondientes al factor F entre estos revertientes que entre células tratadas de la población sin seleccionar para Lac⁺.

Si, por el contrario, estos experimentos se llevaban a cabo con una estirpe original F⁺, cuyo factor F no está integrado en el cromosoma bacteriano, al seleccionar revertientes Lac⁺, no deberíamos encontrar este aumento en el porcentaje de células afectadas en las funciones de F, ya que al no encontrarse próximos entre sí ambos marcadores, no deberían exhibir comutación. Para estos experi-

mentos hemos definido el factor F como un episoma que proporciona a la bacteria sensibilidad a fagos específicos de bacterias donantes, tales como los fagos de ARN Q β y f2, y el fago de ADN f1. Se conocía ya que la nitrosoguanidina es capaz de inactivar el factor F (Takahashi y Barnard, 1967) y también se han usado muchas mutaciones inducidas por este agente mutagénico en el análisis genético de las funciones de F (Achtman, 1973). Los estudios de comutación con nitrosoguanidina permitirán conocer el estado de integración o autonomía de los episomas independientemente de que éstos confieran a la bacteria capacidad de conjuar.

B) - SISTEMA LEUCINA - ARABINOSA

Hemos seleccionado el sistema genético leucina-arabinosa porque ambos genes se encuentran a una distancia menor de medio minuto en el mapa de recombinación (Taylor y Trotter, 1972) y queríamos probar si la comutación era recíproca, ya que podría ocurrir que al seleccionar mutaciones en un gen encontraríamos una alta frecuencia de mutaciones no seleccionadas en genes situados a la derecha del gen original en el mapa genético, pero no en genes situados a la izquierda o viceversa. Es decir,

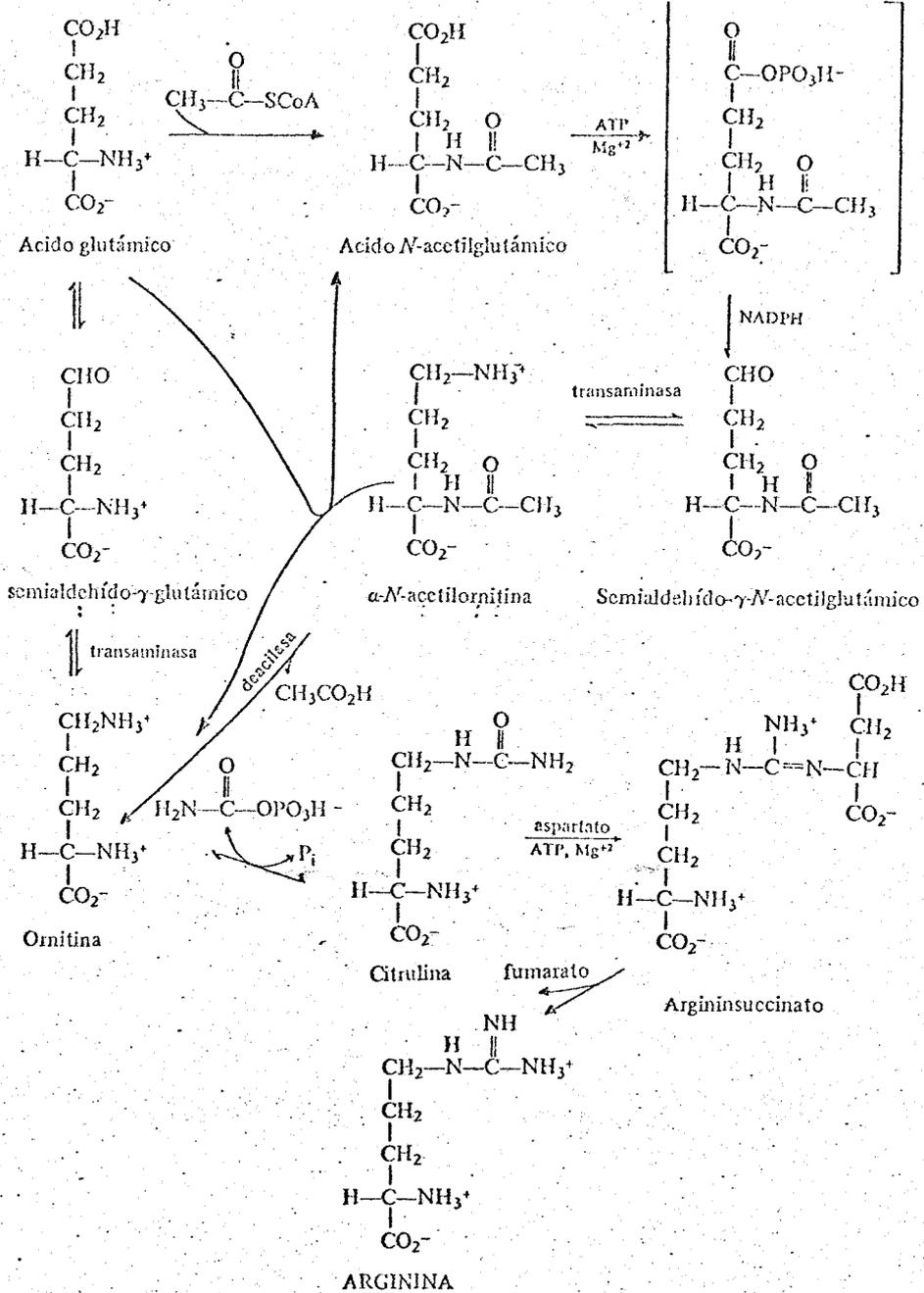
si seleccionando revertientes para la leucina encontrábamos con bastante frecuencia mutantes en el operón de la arabinosa, si la comutación es recíproca, al seleccionar revertientes para la arabinosa, esperamos encontrar también con bastante frecuencia mutantes en el gen de la leucina. Después del tratamiento con nitrosoguanidina de una estirpe silvestre de E. coli B seleccionamos mutantes Leu^- y Ara^- . Un mutante Leu^- lo tratamos de nuevo con nitrosoguanidina y seleccionamos revertientes Leu^+ , para determinar después cuántos de entre ellos son mutantes Ara^- . Estos experimentos se han repetido partiendo de un mutante Ara^- , obteniendo revertientes Ara^+ y determinando cuántos de entre ellos son mutantes Leu^- .

C) - OPERON DE LA ARGININA

En Escherichia coli la ruta biosintética de la arginina consta de ocho pasos intermedios controlados por ocho genes estructurales diferentes, llamados argA, B, C, D, E, F, G y H (Figura 2)

En el mapa genético (Taylor y Trotter, 1972) cuatro de estos genes (argE, argC, argB y argH) se

FIGURA 2. Compuestos intermedios de la ruta biosintética de la arginina.



encuentran contiguos en un sólo grupo y están controlados por un sólo operador (Jacoby, 1972), mientras que los otros cuatro aparecen distribuidos por el cromosoma a diferentes distancias. La regulación del sistema depende de un sólo gen regulador (argR) que se encuentra relativamente lejos de la región ECBH (Figura 1).

En Salmonella thyphimurium también se encuentra el operón formado por los mismos cuatro genes, aunque designados por letras distintas, mientras que en Proteus mirabilis lo integran cinco genes (argE, argC, argB, argG y argH) (Cunin, 1969).

Para diferenciar las distintas mutaciones que afectan a la síntesis de arginina (genes arg) se comprueba el crecimiento de los diferentes mutantes con los compuestos intermedios en la ruta biosintética: ácido glutámico, ácido acetil-glutámico, acetilornitina, ornitina y citrulina (Tabla 1) El argininosuccinato, que permitiría distinguir los mutantes argG de los argH, no se ha empleado en este estudio, ya que tiene escasa permeabilidad.

Puesto que la distribución de todos los

TABLA 1. Clasificación de los diferentes mutantes arg por su crecimiento en los distintos compuestos intermedios en la biosíntesis de la arginina. Los signos + y - indican crecimiento y ausencia del mismo respectivamente.

CLASIFICACION DE LOS MUTANTES arg⁻

RUTA	CRECIMIENTO					
	Acido Glutámico	Ac. acetil- -glutámico	Acetil- -ornitina	Ornitina	Citrulina	Arginina
Ac. glutámico ↓ A	-	+	+	+	+	+
Ac. acetil- -glutámico ↓ B						
↓ C	-	-	+	+	+	+
↓ D						
Acetil- -ornitina ↓ E	-	-	-	+	+	+
Ornitina ↓ F	-	-	-	-	+	+
Citrulina ↓ G	-	-	-	-	-	+
Argino- -succinato ↓ H	-	-	-	-	-	+
Arginina						

genes arg en el mapa genético de E. coli es conocida, podemos comprobar si el método de cartografía genética por comutación con nitrosoguanidina es válido en este sistema y si la distribución de los genes según esta nueva técnica se ajusta a la obtenida en los mapas de recombinación.

Para comprobarlo, después de un tratamiento con nitrosoguanidina, seleccionamos un mutante arg que estaba afectado en el gen H, gen que controla el último paso de la síntesis de arginina y que está situado muy cerca de los genes argE, argC y argB en el mapa genético. A partir de este mutante ArgH^- , después de un nuevo tratamiento con nitrosoguanidina, se obtuvieron dos tipos de revertientes ArgH^+ : una inmensa mayoría que se comportaba como la estirpe silvestre y podía crecer en medio mínimo simple y unos pocos que eran auxótrofos para la arginina, y que, por tanto, habían sufrido simultáneamente la reversión en el gen argH y una mutación que afectaba a alguno de los genes que controlan los pasos anteriores.

Puesto que la nitrosoguanidina induce comutación en genes muy próximos entre sí, al clasi-

ficar estos revertientes ArgH^+ arg se esperaba encontrar un mayor número de mutantes afectados en los genes argE, argC y argB que en los restantes genes.

Como los resultados obtenidos aplicando la comutación concuerdan perfectamente con los obtenidos por recombinación, esta técnica puede aplicarse para establecer la distribución de los genes correspondientes en organismos sin procesos recombinatorios conocidos, y estudiar así el operón desde un punto de vista evolutivo.

MATERIALES Y METODOS

MATERIALES

1. - ESTIRPES BACTERIANAS

Escherichia coli χ 493 es una estirpe Hfr K-12 tipo silvestre. Para su crecimiento sólo necesita una fuente de carbono y las sales inorgánicas adecuadas y es sensible a la estreptomomicina. Deriva de la estirpe χ 15, estudiada por Curtiss y Renshaw (1969) y transfiere su cromosoma en el orden O-proB-proA-leu-thr-lac-F. Nos fue enviada por R. Curtiss.

Escherichia coli SE10, SE11, SE12 y SE13 son estirpes mutantes Hfr lac incapaces de utilizar lactosa que fueron obtenidas en este trabajo a partir de χ 493 por mutagénesis con nitrosoguanidina.

Escherichia coli SE15, SE16 y SE17 son estirpes derivadas del Hfr SE13, lac obtenidas en este trabajo por selección de colonias deficientes en conjugación en medio sólido.

Escherichia coli SE18, SE19, SE22 y SE23 son estirpes derivadas del Hfr SE12, lac obtenidas en este trabajo seleccionandocolonias deficientes en conjugación en medio sólido.

Escherichia coli χ 15 es una estirpe F⁺ K-12 y tipo silvestre. Deriva de la estirpe W1485 estudiada por Lederberg y Lederberg (1953). y nos fue enviada por R. Curtiss.

Escherichia coli SE20 y SE21 son estirpes F⁺ mutantes lac que fueron obtenidas en este trabajo a partir de χ 15 por mutagénesis con nitrosoguanidina.

Escherichia coli DF73 es una estirpe F⁻ strA, thyA, thr, leu, thi, pro, arg, lac, gal, ara, xyl, mtl, que deriva de la estirpe AB1157 y que fue recibida de K. Brooks.

Escherichia coli B/5 es una estirpe B de E. coli, tipo silvestre que fue recibida de I. Lielausis.

Escherichia coli SE25 es una estirpe mutante leu derivada de B/5 que requiere leucina para vivir (20 µg/ml) y ha sido obtenida en este trabajo por mutagénesis con nitrosoguanidina y selección con penicilina.

Escherichia coli SE26 es un mutante ara derivado de la estirpe B/5 que no puede vivir con arabinosa como único fuente de carbono y ha sido obtenida en este trabajo por mutagénesis con nitrosoguanidina y selección con penicilina.

Escherichia coli SE30, SE31 y SE32 son estirpes mutantes argH derivadas de B/5 que requieren arginina (20 µg/ml) y han sido obtenidas en este trabajo por mutagénesis con nitrosoguanidina y selección con penicilina.

Escherichia coli SE33 es un mutante argE que requiere arginina y fue obtenido en este trabajo a partir de un mutante SE30 argH por mutagénesis con nitrosoguanidina.

La denominación de las estirpes se ha hecho según el método propuesto por Demerec et. al. (1966).

2. - BACTERIOFAGOS

Los fagos de ARN, tipo silvestre, Q β y f2 fueron obtenidos de A.J. Clark. Los fagos de ADN tipo silvestre, f1 fueron enviados por N.D. Zinder.

3. - PRODUCTOS QUIMICOS

Nitrosoguanidina (N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina), Serva, Heidelberg, Alemania.

Estreptomycin, Sulfato de estreptomycin, Wassermann.

Penicilina, G sódica. Compañía Española de Penicilina, S.A., Madrid.

Naranja de acridina, Cloruro de 3,6-bis-dimetilaminoacridinio, Sigma, St. Louis, Missouri, USA.

Bromuro de etidio, Bromuro de 2,7-diamino-10-etil-9-fenil-fenantridinio, Sigma.

4. - TAMPONES

a) Tampón Tris-Sales: Está formado por 9% de solución A, 90% de agua destilada y 1% de

solución B, mezcladas en este orden. Se ajustó el pH a 7,4 con hidróxido sódico ó ácido clorhídrico y se esterilizó en el autoclave.

Solución A: Tris (hidroximetil) aminometano, 120 g; agua destilada, 500 ml; disolver; ClH concentrado, 75 ml; ClK, 20 g; ClNH₄, 20 g; PO₄HNa₂, 6,6 g; SO₄Na₂, 3,5 g; agua destilada, 400 ml.

Solución B: Cl₂Mg. 6H₂O, 5 g; agua destilada 100 ml.

b) Tampón Tris-Maleato:

Solución A: 0,2 M de tris y ácido maleico (24,2 g/l de tris hidroximetil aminometano y 23,2 g/l de ácido maleico).

Solución B: 0,2 M de hidróxido sódico.

Los tampones se preparon mezclando 50 ml de solución A con solución B en cantidad de 13,1 ml para pH = 5,5 y de 56 ml para pH = 7,5, añadiendo agua destilada hasta un total de 200 ml.

Se ajustó el pH, en caso necesario, y se esterilizó por filtración (Gomori, 1955).

5. - MEDIOS LIQUIDOS

A - MEDIO MINIMO: Para todos los cultivos líquidos se usó medio mínimo, salvo que se diga lo contrario. Se preparó con tampón tris-sales, 2g/l de azúcar (D-glucosa) y los suplementos requeridos por cada estirpe. Los aminoácidos y la timina se añadieron a concentraciones de 20 µg/ml, la timina a 1 µg/ml, y la estreptomicina a 100 µg/ml.

B - MEDIO NUTRITIVO: Se empleó el medio de Luria, que contiene 10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura y 10 g de cloruro sódico en 1 litro de agua destilada. Después de ajustar el pH a 7,2, se esterilizó en el autoclave.

En ciertos casos, este medio fué suplementado con 50 µg/ml de naranja de acridina ó de bromuro de etidio.

6. - MEDIOS SOLIDOS

A - MEDIO MINIMO: Se preparó añadiendo 20 g/l de agar Difco al medio mínimo líquido (ver 5A). Después de autoclavar, cuando la temperatura era de 45°C, se vertieron aproximadamente 25 ml en cada caja de Petri.

Las pruebas de supervivencia, reversión y resistencia a fagos, se hicieron en este medio. Para seleccionar recombinantes, a este medio se añadieron distintos suplementos, según se describe en Resultados.

B - MEDIO NUTRITIVO: Se preparó añadiendo 20 g/l de agar Difco al medio líquido de Luria. En ciertos casos, se añadió a la superficie de estas cajas una capa de agar blando, conteniendo 6 g/l de agar y 2 g/l de glucosa en tampón tris-sales. Los recuentos de fagos Q β , f2 y f1 se hicieron en estas cajas.

C - MEDIO DE CONSERVACION: Se preparó con 10 g de triptona, 5 g de glucosa y 20 g de agar en un litro de tampón tris-sales.

Se pusieron 5 ml en pequeños frascos, se hicieron picaduras con las estirpes de la colección, y se conservaron bien cerrados a temperatura ambiente.

METODOS

I. - CRECIMIENTO

Los cultivos en medio líquido se incubaron a 37°C durante toda la noche. Para airearlos se hizo burbujear en ellos aire estéril (filtrado a través de algodón) y saturado de humedad (pasado por un frasco con agua) procedente de una bomba portátil de las empleadas en acuarios. Al día siguiente se diluyeron 1:10 en medio nuevo y se dejaron crecer hasta una concentración aproximada de 10^8 bacterias/ml, tomando medidas de la densidad óptica a 450 nm en un espectrofotómetro "Spectronic 20" Bausch and Lomb.

II. - RECUENTO DE BACTERIAS VIVAS

Después de efectuar las diluciones adecuadas en tubos con 5 ml de tampón tris-sales, se tomaron muestras que se esperaba contuvieran 100-200 bacterias vivas y se extendieron con un esparcidor estéril sobre cajas de medio mínimo. Se incubaron durante 24 horas en una estufa a

37°C y se contaron las colonias obtenidas.

Para cada determinación se sembraron dos cajas y se hizo el promedio de ambas.

III. - TRATAMIENTO CON NITROSOGUANIDINA

La nitrosoguanidina se disolvió en agua destilada (1,0 mg/ml) y se preparon pequeños tubitos con alícuotas de 1 ml. Se guardaron en la oscuridad en un congelador hasta el momento de ser usados y en ningún caso se volvieron a congelar.

El cultivo de bacterias en fase exponencial se lavó y centrifugó dos veces con tampón tris-sales y se resuspendió en tampón tris-maleato pH 7,5 (salvo en el caso que se indique otra cosa). Se añadieron 100 µg/ml de nitrosoguanidina a un tubo con 10^9 bacterias por ml, dejándolo a 37°C sin aireación durante 30 minutos. Después del tratamiento, las células se centrifugaron y lavaron dos veces con tampón tris-sales.

IV. - AISLAMIENTO DE NUEVAS ESTIRPES

A) - AISLAMIENTO DE AUXOTROFOS: Para seleccionar una estirpe incapaz de vivir en ausencia de un nu-

triente determinado, se trataron las células con nitrosoguanidina y se cultivaron durante 5-6 generaciones en medio mínimo suplementado con un exceso del nutriente. Se diluyó y se siguió cultivando en medio mínimo con exceso del nutriente durante otras 5-6 generaciones. Después de centrifugar y lavar dos veces con tampón tris-sales, las bacterias se resuspendieron en medio mínimo sin el nutriente con una concentración nunca superior a 10^7 células por ml, y se incubaron durante una hora con aireación en presencia de 1.000 unidades por ml de bencil-penicilinato potásico. El cultivo se lavó dos veces con tampón tris-sales, se resuspendió en medio mínimo sin el nutriente en presencia de 1.000 unidades por ml de bencil-penicilinato potásico y se incubó otras tres horas. Después de centrifugado y lavado se sembró en cajas en medio mínimo con el nutriente, obteniéndose una supervivencia aproximada de 10^{-3} . Las colonias obtenidas fueron transplantadas con palillos de dientes estériles a cajas de medio mínimo sin y con el nutriente. Las colonias que requerían el nutriente se aislaron y purificaron tres veces consecutivas.

Para seleccionar mutantes incapaces de utilizar la lactosa o la arabinosa, las bacterias tratadas con nitrosoguanidina se cultivaron durante tres horas en medio mínimo con

glucosa y se sembraron en cajas de medio mínimo. Las colonias obtenidas se transplantaron a cajas de medio mínimo y a cajas de medio mínimo en las que la glucosa había sido sustituida por lactosa o arabinosa.

B) - AISLAMIENTO DE MUTANTES RESISTENTES A LA ESTREPTOMICINA: Para seleccionar mutantes resistentes a la estreptomicina, las células tratadas con nitrosoguanidina se resuspendieron en medio mínimo y se incubaron a 37°C con aireación durante 8 horas. La selección de mutantes se hizo en cajas de medio mínimo suplementado con 100 µg de estreptomicina.

C) - AISLAMIENTO DE REVERTIENTES: Para seleccionar revertientes, que ya no requieren un nutriente determinado, se sembraron células tratadas con nitrosoguanidina en cajas de medio mínimo carentes del nutriente y se incubaron durante dos días. Para obtener revertientes capaces de utilizar lactosa o

arabinosa las siembras se hicieron en cajas de medio mínimo con lactosa o arabinosa como única fuente de carbono.

V. - COMPROBACION DE LAS CARACTERISTICAS
DONANTES

A) - CONJUGACION EN MEDIO LIQUIDO

Para comprobar las características donantes y receptoras de las estirpes $\chi 493$ (Hfr, tipo silvestre, sensible a la estreptomycin) y DF73 (F^- , strA, thyA, thr, leu, thi, pro, arg, lac, gal, ara, xyl, mtl) respectivamente, se hizo un experimento de conjugación en medio líquido. Se cultivaron ambas estirpes en medio mínimo con aireación durante toda la noche. Al día siguiente se diluyeron 1:10 en medio nuevo y se dejaron crecer hasta una concentración aproximada de 10^8 bacterias por ml. Se centrifugaron y lavaron ambos cultivos, se mezclaron sus células en la proporción 1:10 y se mantuvieron a 37°C sin aireación durante 3 horas, tratando de mantenerlas en la máxima quietud, y al cabo de este tiempo se sembraron en diferentes cajas de medio mínimo con estreptomycin (donde no

podía crecer la estirpe Hfr) que carecían de alguno de los requerimientos de la estirpe F⁻, de modo que en él sólo pueden vivir recombinantes de ambas estirpes. Como se verá la estirpe χ 493 es un Hfr.

B) - CONJUGACION INTERRUMPIDA

Para comprobar el orden de transferencia de la estirpe Hfr SE12 (que lleva una mutación lac), se preparó una mezcla de células de SE12 y de DF73 como se describe en el apartado anterior. Esta mezcla se mantuvo a 37°C sin aireación durante 2 horas, y con el máximo cuidado posible para no agitarla, se tomaron muestras cada 20 minutos. Después de una agitación violenta, las muestras se sembraron en diferentes cajas de medio con estreptomicina suplementado con los requerimientos de la estirpe F⁻, excepto aquel o aquellos para los que se querían seleccionar recombinantes. Para obtener una agitación suficiente, capaz de separar a las parejas en conjugación, se utilizó el aparato descrito por Low y Wood (1965). Esencialmente se trata de una sierra eléctrica de

vaivén (Black y Decker modelo Jig Saw D350A) en la que se había instalado un dispositivo capaz de sostener un tubo herméticamente cerrado.

C) - CONJUGACION EN MEDIO SOLIDO

Para comprobar la capacidad de transferencia del Hfr χ 493 y también seleccionar colonias que hubieran perdido esta capacidad se hicieron pruebas de conjugación en medio sólido.

Se sembró un cultivo de χ 493 en fase exponencial en cajas de medio mínimo para obtener colonias aisladas. Un cultivo de DF73 en fase estacionaria, después de centrifugado y lavado, se sembró en cajas de medio mínimo con estreptomycin suplementadas con los requerimientos de dicha estirpe excepto treonina y leucina, con una concentración aproximada de 10^9 bacterias por caja. Se transplantaron con palillos de dientes estériles las colonias aisladas del Hfr a cajas de medio mínimo y a las cajas en las que se había extendido la estirpe DF73 y se incubaron hasta el día siguiente para observar la aparición de recombinantes en las zonas donde coincidían ambas estirpes.

D) - PRUEBAS DE RESISTENCIA A FAGOS

Para comprobar la adquisición de resistencia de las estirpes donantes a los fagos Q β , f2 y f1 se preparon cajas de medio mínimo en las que se había extendido con un asa estéril en una banda central una gota (aproximadamente 10⁹ fagos por ml) de la suspensión de fagos. Las colonias cuya resistencia se quería comprobar se extendieron en estas cajas con un palillo estéril atravesando la banda de fagos, y se incubaron toda la noche a 37°C. Se consideraron colonias resistentes las que presentaban el mismo crecimiento a ambos lados de la banda de fagos (Figura 3).

E) - TRATAMIENTO CON NARANJA DE ACRIDINA

Para distinguir las bacterias donantes que tienen el factor F integrado en el cromosoma (Hfr) de las que lo tienen en forma de episoma (F⁺), las bacterias se incubaron en medio nutritivo al que se había añadido 50 μ g/ml de naranja de acridina durante 24 horas. Se sembraron alícuotas en cajas de medio mínimo y se estudió la resistencia a fagos de las colonias resultantes. Las estirpes

Hfr conservan en estas condiciones su sensibilidad a estos fagos pero las estirpes F⁺ se vuelven resistentes (Hirota, 1960).

El mismo experimento se puede hacer sustituyendo el naranja de acridina por bromuro de etidio.

FIGURA 3. Ensayo para medir la sensibilidad o resistencia a una suspensión de fagos Q β y f2 de varias colonias de una estirpe donante de E. coli

RESULTADOS

PARTE I COMUTACION EN EL SISTEMA F-lac

I. - EXPERIMENTOS CON EL Hfr χ 493:
COMPROBACION DE LA CAPACIDAD DONANTE

1. - CONJUGACION EN MEDIO LIQUIDO

Para comprobar que la estirpe χ 493 (tipo silvestre, Str^S) era Hfr, se hizo un experimento de conjugación en medio líquido empleando la estirpe F⁻ DF73 (Thr⁻, Leu⁻, Lac⁻, Str^r, entre otras mutaciones) como receptora.

Cuando ambos cultivos estaban en fase exponencial se hicieron recuentos del número de bacterias vivas por ml en cada uno y se pusieron en contacto durante 3 horas.

Al cabo de este tiempo se sembraron en cajas con medio sin treonina ni leucina, pero con estreptomicina, para buscar recombinantes Thr⁺, Leu⁺, Str^r y en cajas con medio con lactosa y estreptomicina para buscar recombinantes Lac⁺, Str^r.

Después de dos días de incubación los resultados fueron:

Bacterias donantes	$3,7 \times 10^8$ /ml
Bacterias receptoras	$1,2 \times 10^8$ /ml
Recombinantes Thr ⁺ Leu ⁺ Str ^r	$1,2 \times 10^6$ /ml
Recombinantes Lac ⁺ Str ^r	$1,3 \times 10^3$ /ml

Los genes thr y leu fueron transferidos con una frecuencia mucho más alta que el gen lac, lo cual es una prueba de que la estirpe 493 es un Hfr que transfiere thr y leu al principio y lac al final.

2. - CONJUGACION EN MEDIO SOLIDO

Para comprobar cómo se comportaba el Hfr χ 493 sobre el F⁻ DF73 en medio sólido, se aislaron colonias del Hfr y se probaron en cajas con medio sin treonina ni leucina pero con estreptomomicina en las que se habían extendido previamente unas 10^9 bacterias F⁻.

Se hicieron controles probando las colonias del Hfr en el mismo medio sin el F⁻ y dejando

una caja del mismo medio con el F⁻ pero sin añadirle el Hfr.

Después de dos días de incubación, en las cajas de control no había crecimiento alguno, mientras que las 400 colonias Hfr sembradas sobre las F⁻ habían crecido perfectamente.

Esta es una segunda prueba de la capacidad donante de la estirpe χ 493, y nos permitirá usar este ensayo simplificado para comprobar la pérdida de la capacidad donante.

3. - MUTAGENESIS Y SELECCION DE ESTIRPES Hfr Lac⁻

Un cultivo de χ 493 en fase exponencial fue tratado con nitrosoguanidina, con una supervivencia del 7,3%, se siguió cultivando durante 3 horas y se sembró en cajas con medio mínimo con glucosa haciendo las diluciones adecuadas. En este medio son capaces de formar colonias casi todas las células del cultivo, incluso las que hayan sufrido mutaciones lac. Para aislar mutantes lac se comprobó la capacidad de las colonias obtenidas de vivir en medio mínimo con lac-

tosa. De 2.100 colonias ensayadas, 15 fueron incapaces de vivir con lactosa, por lo que se presume que llevaban mutaciones en el sistema lac.

Se ensayó la capacidad donante de las colonias obtenidas antes y después del tratamiento con nitrosoguanidina, haciendo conjugación en medio sólido con 100 colonias de cada tipo. Las 200 colonias ensayadas se comportaron como Hfr, lo que indica que la nitrosoguanidina no destruye masivamente la capacidad de transferencia genética.

Nos interesan mutantes lac que reviertan bien con nitrosoguanidina. Para detectarlos, se prepararon cajas de medio mínimo con lactosa y 0,02 g/l de glucosa. Esta pequeña cantidad de glucosa es suficiente para que las células Lac⁻ crezcan inicialmente pero no para que formen colonias visibles. Se tomaron 5 estirpes Lac⁻, de las 15 obtenidas anteriormente y se extendieron 10⁷ células de cada una sobre una de estas cajas. Se colocó un pequeño cristal de nitrosoguanidina en el centro de la caja y se incubó hasta el día siguiente.

En 4 casos se observó un halo de colonias revertientes a unos 2 cm del cristal de nitrosoguanidina, mientras que en el otro caso no apareció ningún halo. Estas 4 estirpes Hfr Lac⁻ que revertían bien con nitrosoguanidina se denominaron SE10, SE11, SE12, y SE13.

4. - REPRODUCCION Y RECUESTO DE FAGOS

Los fagos Q β o f2 se diluyeron hasta una concentración final aproximada de 10⁸ por ml, se añadió 0,1 ml de esta suspensión a un cultivo exponencial de bacterias χ 493 en 10 ml de medio nutritivo y se incubó con aireación forzada.

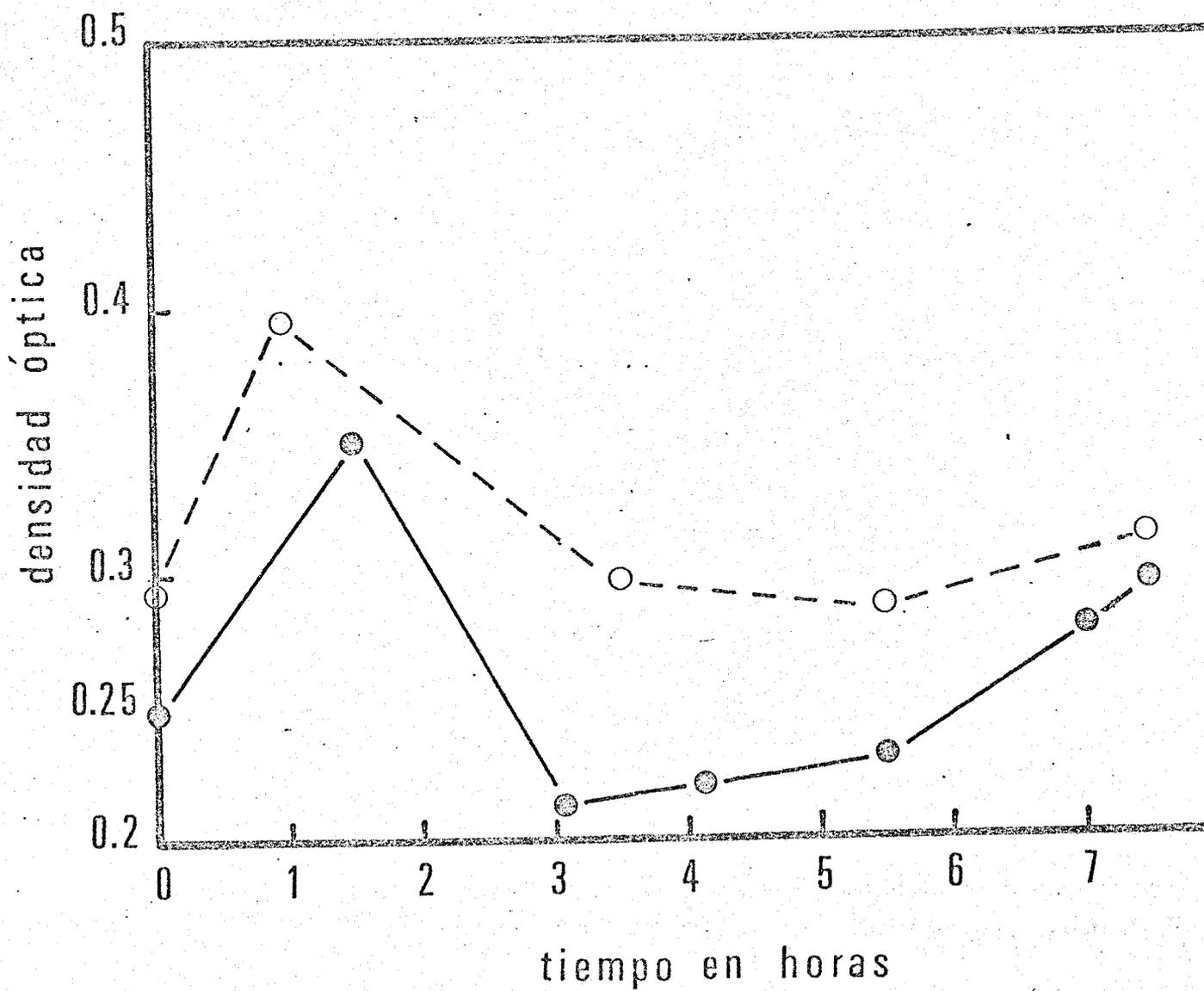
La Fig. 4 representa la evolución de la densidad óptica de tales cultivos.

Tras 7 horas de incubación se centrifugó cada cultivo a 3.000 r.p.m. durante 15 minutos, se recogió el sobrenadante, se le añadió una gota de cloroformo para esterilizarlo y se guardó a 5°C.

Para estimar el número de fagos de la suspensión se hicieron diluciones apropiadas, se

mezclaron con agar blando y unas 10^8 células $\chi 493$ y se sembraron en cajas de medio nutritivo. Al día siguiente se contaron los halos de lisis producidos por cada fago sobre los cultivos de $\chi 493$ y se concluyó que la suspensión de Q β tenía $3,7 \times 10^{11}$ fagos por ml y la de f2, $3,0 \times 10^{11}$ fagos/ml.

FIGURA 4. Evolución de la densidad óptica con respecto al tiempo de dos cultivos del Hfr $\chi 493$ a los que se había añadido 10^6 fagos Q β /ml (—●—) y 10^6 fagos f2/ml (—○—).



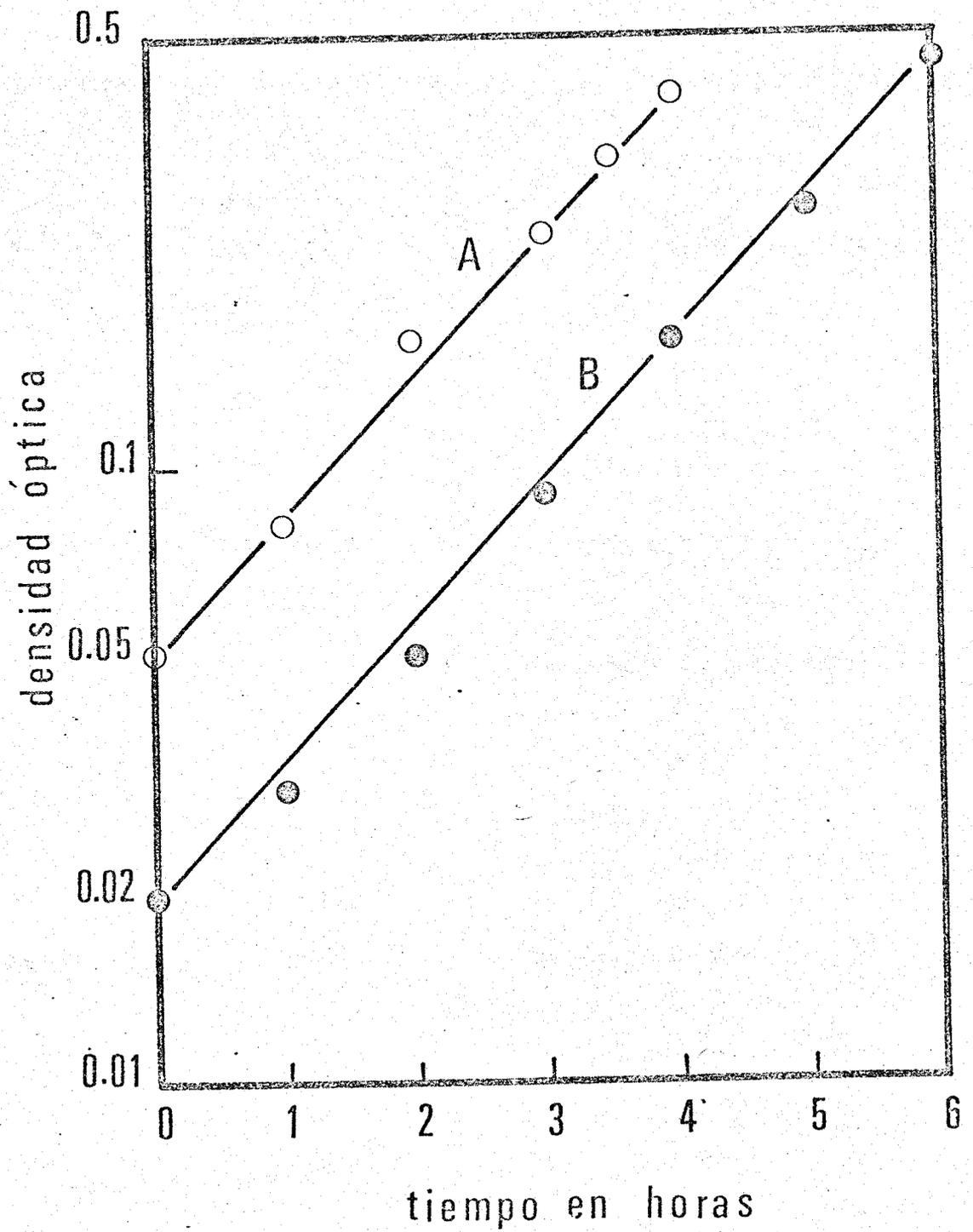
II. - EXPERIMENTOS CON LOS Hfr Lac⁻

1. - EFECTO DE LA NITROSOGUANIDINA SOBRE
EL CRECIMIENTO

La Fig. 5 (línea A) representa la evolución de la densidad óptica de un cultivo de SE12. Al llegar el cultivo a una densidad óptica de 0,40 se tomó una muestra para averiguar el número de bacterias vivas por ml antes del tratamiento. El resultado fué de $3,0 \times 10^8$ bacterias vivas por ml. Se lavó el resto del cultivo y se trató con nitrosoguanidina. Tras los lavados se hizo otro recuento para saber el número de bacterias que habían sobrevivido. El resultado fue de $7,1 \times 10^7$ bacterias por ml. De la comparación de estos dos recuentos se deduce que la supervivencia al tratamiento con nitrosoguanidina fue del 23%.

Se diluyó el cultivo tratado y se cultivó en medio mínimo durante 6 horas. La Fig. 5 (línea B) indica la evolución de la densidad óptica en este cultivo.

FIGURA 5. Evolución de la densidad óptica con respecto al tiempo de un cultivo de la estirpe SE12. La línea A representa el cultivo antes del tratamiento con nitrosoguanidina y la línea B el cultivo después del tratamiento



Tanto antes como después del tratamiento, el cultivo creció en forma exponencial, con un tiempo de duplicación de la densidad óptica de 75 minutos. La toxicidad de la nitrosoguanidina no afecta sensiblemente a los parámetros de crecimiento de las células supervivientes.

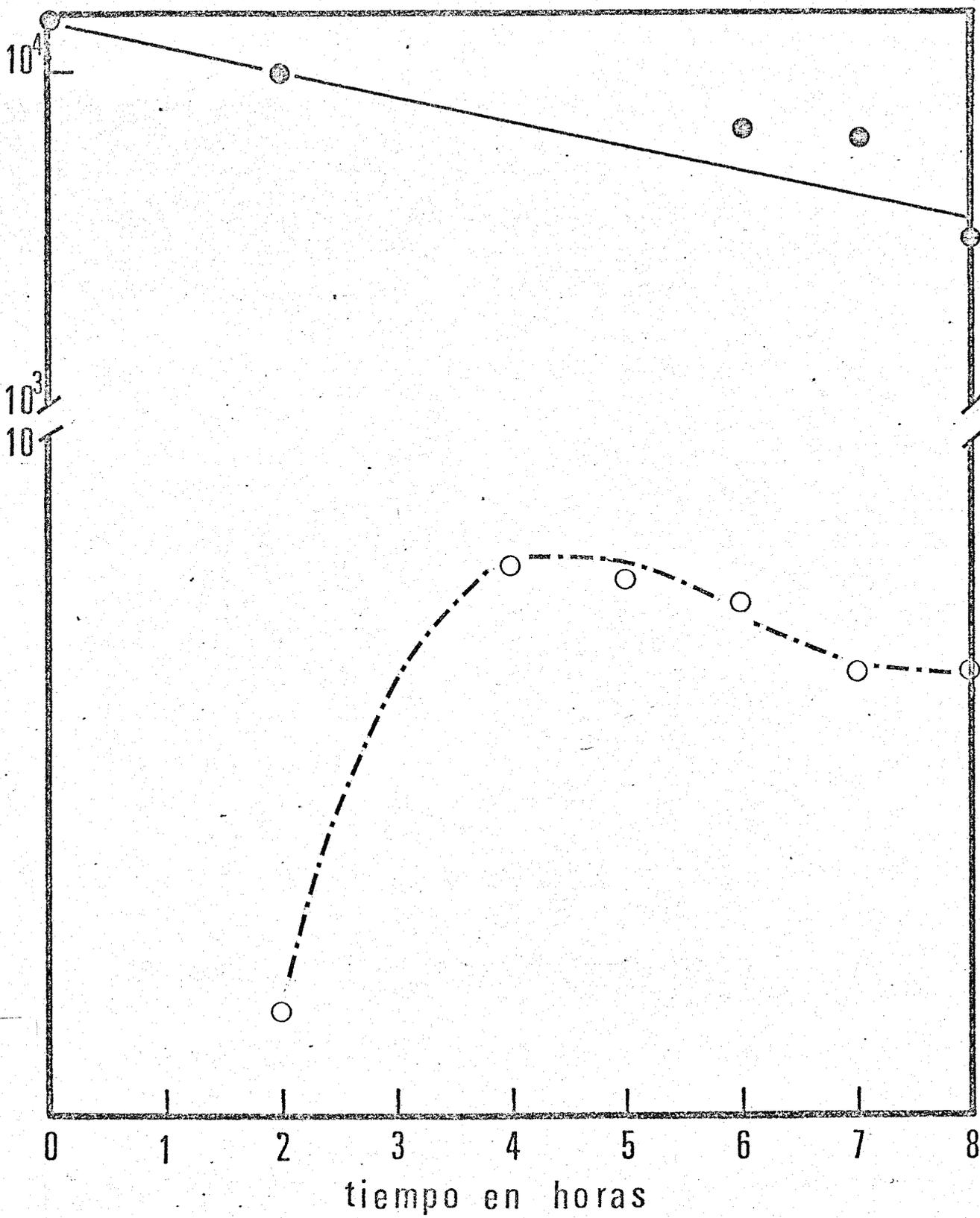
2. - EXPRESION DE LA MUTACION Lac^+

Se sembró un cultivo de SE12 que había crecido exponencialmente hasta contener $1,4 \times 10^8$ bacterias vivas por ml, en cajas de medio nutritivo, medio mínimo con lactosa y medio mínimo con estreptomizina, para determinar la frecuencia de mutantes espontáneos Lac^+ y Str^r en este cultivo. Se obtuvieron 16,4 revertientes Lac^+ por millón de bacterias vivas y 0,02 mutantes Str^r por millón de bacterias vivas.

Se trató el cultivo con nitrosoguanidina en la forma usual, excepto que se usó tampón a pH 5,5, y después de los lavados correspondientes se hizo otro recuento. El recuento fue de $1,0 \times 10^8$ por ml con lo que la supervivencia al tratamiento fue del 71%. Ya era sabido que la nitrosoguanidina produce menos letalidad a pH 5,5 que a pH 7,5. Se diluyó el cultivo tratado y se siguió cultivando durante 8 horas. La Fig. 6 representa la evolución del n° de mutantes Lac^+ y mutantes Str^r en este cultivo.

FIGURA 6. Expresión de la mutación Lac^+ y Str^r de la estirpe SE12 durante las ocho horas siguientes al tratamiento con nitrosoguanidina. La línea —●— corresponde a la aparición de mutantes Lac^+ por millón de supervivientes y la línea --○-- a la de mutantes Str^r por millón de supervivientes.

mutantes por 10^8



Se observa claramente que la frecuencia de revertientes Lac^+ es máxima inmediatamente después del tratamiento con nitrosoguanidina, decreciendo paulatinamente durante las 8 horas de crecimiento, mientras que la frecuencia de mutantes Str^r es máxima a las 4 horas de recrecimiento, decreciendo ligeramente en las 4 horas siguientes.

El decrecimiento de la frecuencia de mutantes Lac^+ puede ser debido a una menor velocidad de crecimiento de tales mutantes, o, más probablemente a segregación de cromosomas: si una célula tiene dos cromosomas de los cuales sólo uno es revertiente Lac^+ , al dividirse la célula sólo una de las dos hijas es Lac^+ y la proporción de éstas en el cultivo disminuirá.

La cinética de aparición de mutantes Str^r se explica por la necesidad de fabricar ribosomas capaces de sintetizar proteínas en presencia de antibiótico (Ozaki et al., 1969) si los mutantes, con la información genética apropiada para fabricar tales ribosomas, son colocados en presencia de estreptomycin prematuramente, no

sobreviven. El lento decrecimiento final se debe a que los mutantes Str^r tienen una velocidad de crecimiento inferior a la del silvestre (Lederberg, 1951).

3. - COMPROBACION DE LAS CARACTERISTICAS
DONANTES

A - Tratamiento con naranja de acridina

Este tratamiento permite distinguir las bacterias que tienen el factor F integrado en el cromosoma (Hfr) y las que lo tienen en forma de episoma (F⁺), ya que el naranja de acridina interfiere con la replicación de episomas libres (Hirota, 1960).

Para comprobar si estas estirpes habían perdido o el factor F tras el tratamiento con naranja de acridina se estudió si las colonias obtenidas después del tratamiento eran resistentes a fagos f1, que se adsorben a los pelos sexuales determinados genéticamente por el factor F. De 100 colonias de SE12 ensayadas de esta forma todas eran sensibles al fago f1, lo que demuestra que el SE12 es un verdadero Hfr, cuyo factor F está integrado en el cromosoma y no se pierde por tratamiento con naranja de acridina.

B - Tratamiento con bromuro de etidio

Este tratamiento tiene el mismo objeto que el anterior. La presencia de factor F en las célu-

las supervivientes al tratamiento se estudió comprobando su sensibilidad a una mezcla de fagos Q β y f2, que, como f1 requieren pelos sexuales, determinados genéticamente por el factor F, para su adsorción. De 200 colonias de SE13 ensayadas, todas eran sensibles a la mezcla de fagos Q β y f2, lo que demostró que SE13 era también un Hfr, con su factor F integrado en el cromosoma bacteriano.

C - Conjugación interrumpida

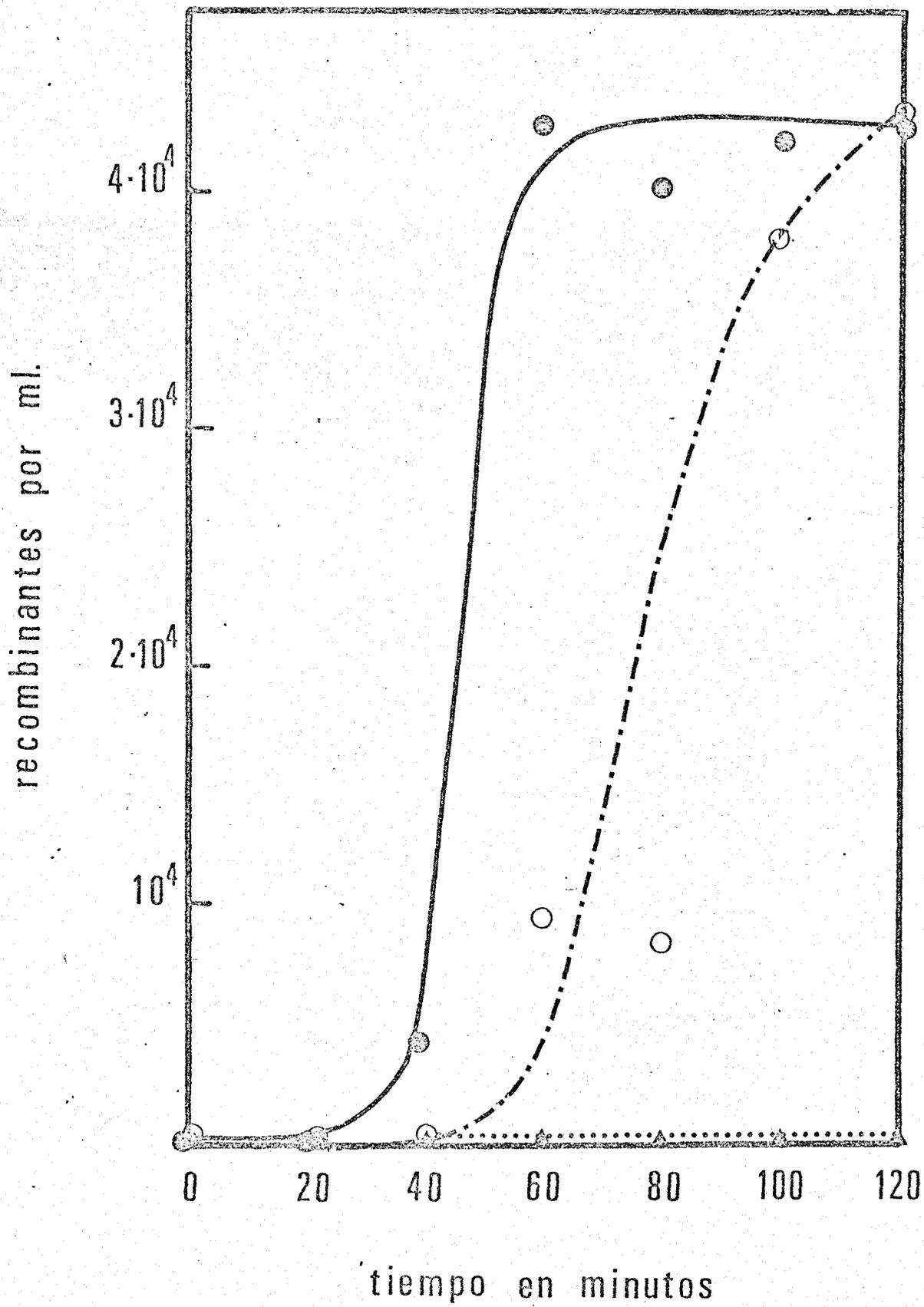
Para comprobar si una de estas estirpes, la SE12 (Lac⁻, Str^S) era Hfr se hizo un experimento de conjugación en medio líquido empleando la estirpe F⁻DF73 (Thr⁻, Leu⁻, Pro⁻, His⁻, Str^F entre otras mutaciones) como receptora.

Cuando ambos cultivos estaban en fase exponencial se contaron las bacterias vivas presentes en cada uno, se mezclaron y se mantuvieron en contacto durante 2 horas. La mezcla tenía inicialmente $2,3 \times 10^8$ bacterias donantes, y $2,9 \times 10^9$ bacterias receptoras en 10 ml de medio mínimo con los suplementos indispensables a ambos.

Periódicamente se obtuvieron muestras en las que se separaron las bacterias conjugantes y se averiguó el número de recombinantes Str^rPro^+ , Thr^+Str^r y Str^rHis^+ (Figura 7). El primer marcador transferido fue Pro^+ , seguido de Thr^+ ; His^+ no fue transferido apreciablemente durante este período de conjugación.

Se concluye que la estirpe SE12 es un Hfr que, como su antecesor $\chi 493$, transfiere su cromosoma secuencialmente en el orden O-pro-leu-thr-his-lac.

FIGURA 7. Evolución del número de recombinantes por ml con respecto al tiempo de conjugación entre las estirpes SE12 y DF73. La línea —●— representa el número de recombinantes $\text{Pro}^+ \text{Str}^r$, la línea —○— el número de recombinantes $\text{Thr}^+ \text{Str}^r$ y la línea —▲— indica que no se obtuvo ningún recombinante $\text{His}^+ \text{Str}^r$.



4. - COINCIDENCIA DE LA REVERSION Lac^+
Y LA PERDIDA DE LA CAPACIDAD DONANTE Hfr

Para comprobar si existe ó no una coincidencia significativa entre la reversión Lac^+ inducida por la nitrosoguanidina y la pérdida de la capacidad donante de estos Hfr, se hicieron los siguientes experimentos.

Un cultivo en fase exponencial de uno de estos mutantes (Hfr, Lac^-) fue tratado con nitrosoguanidina. De este cultivo nos interesaba obtener colonias de la población general antes y después del tratamiento con nitrosoguanidina y colonias revertientes Lac^+ espontáneas e inducidas por nitrosoguanidina. Para ello se sembraron alícuotas del cultivo, obtenidas inmediatamente antes e inmediatamente después del tratamiento, sobre medio mínimo con glucosa (población general) y medio mínimo con lactosa (revertientes). Probando la capacidad donante de colonias de los 4 tipos puede decidirse si la reversión Lac^+ y la pérdida de la capacidad donante tienden a presentarse simultáneamente. Los experimentos realizados para probar la capacidad

donante se hicieron con la estirpe F^- DF73 ($Thr^- Leu^- Str^R$, entre otros caracteres fenotípicos) y con cada uno de los Hfr Lac^- ($Thr^+ Leu^+ Str^S$).

Los resultados de las Tablas 2 a 5 muestran que entre las colonias revertientes Lac^+ inducidas por la nitrosoguanidina han perdido su capacidad donante en una proporción 2-3 veces mayor que entre las colonias tratadas de la población general, de lo que se deduce que ambas mutaciones tienden a ocurrir simultáneamente en las mismas células.

Como la pérdida espontánea de la capacidad donante, tanto en las colonias no tratadas de la población general como en las revertientes Lac^+ espontaneas fue muy alta (lo cual se puede atribuir a la inestabilidad del factor F) se decidió ensayar otro procedimiento de determinación de mutaciones en el factor F, con la esperanza de que su frecuencia espontánea fuera menor y condujera a resultados más claros.

TABLA 2. COINCIDENCIA DE LA REVERSION Lac^+
Y LA PERDIDA DE LA CAPACIDAD DONANTE Hfr
EN LA ESTIRPE SE10

	Antes del tratamiento		Después del tratamiento	
	Población general	Mutantes Lac^+	Población general	Mutantes Lac^+
Células/ml	$2,7 \times 10^8$	98	$7,1 \times 10^6$	$4,2 \times 10^4$
Colonias ensayadas	400	400	300	400
Colonias deficientes en transferencia genética	3	4	8	17
Id %	0,7	1	2,7	4,2

TABLA 3. COINCIDENCIA DE LA REVERSION Lac^+
Y LA PERDIDA DE LA CAPACIDAD DONANTE Hfr
EN LA ESTIRPE SE11

	Antes del tratamiento		Después del tratamiento	
	Población general	Mutantes Lac^+	Población general	Mutantes Lac^+
Células/ml	$1,8 \times 10^8$	113	$3,3 \times 10^6$	$2,2 \times 10^4$
Colonias ensayadas	500	300	124	400
Colonias deficientes en transferencia genética	6	0	4	26
Id %	1,2	0	3,2	6,5

TABLA 4. COINCIDENCIA DE LA REVERSION Lac^+
Y LA PERDIDA DE LA CAPACIDAD DONANTE Hfr
EN LA ESTIRPE SE12

	Antes del tratamiento		Después del tratamiento	
	Población general	Mutantes Lac^+	Población general	Mutantes Lac^+
Células/ml	$6,6 \times 10^7$	168	$6,2 \times 10^6$	$1,5 \times 10^4$
Colonias ensayadas	200	400	200	500
Colonias deficientes en transferencia genética	2	10	4	30
Id %	1	2,5	2	6

TABLA 5. COINCIDENCIA DE LA REVERSION Lac^+
Y LA PERDIDA DE LA CAPACIDAD DONANTE Hfr
EN LA ESTIRPE SE13

	Antes del tratamiento		Después del tratamiento	
	Población general	Mutantes Lac^+	Población general	Mutantes Lac^+
Células/ml	2×10^8	228	$2,8 \times 10^7$	$3,5 \times 10^4$
Colonias ensayadas	300	600	300	400
Colonias deficientes en transferencia genética	1	9	8	16
Id %	0,3	1,5	2,6	4

5. - COINCIDENCIA DE LA REVERSION Lac^+
Y LA ADQUISICION DE RESISTENCIA A
LOS FAGOS $Q\beta$ Y $f2$

Los fagos $Q\beta$ y $f2$ tienen como material genético ARN lineal de una cadena y una estructura vírica globular. Necesitan, para su infección, la presencia de pelos sexuales en la estirpe donante y esta presencia está determinada genéticamente por el factor F.

Como la pérdida espontánea de la capacidad donante había sido muy alta, se ensayó el procedimiento de buscar mutaciones en F que confirieran resistencia a los fagos $Q\beta$ y $f2$, específicos de bacterias donantes.

Un cultivo en fase exponencial de uno de estos mutantes ($Hfr Lac^-$) fue tratado con nitrosoguanidina. De este cultivo se obtuvieron colonias de la población general antes y después del tratamiento con nitrosoguanidina y colonias revertientes Lac^+ espontáneas e inducidas por dicho agente muta-

génico. Probando la proporción de colonias de estos cuatro tipos que son resistentes a $Q\beta$ y f2 se puede decidir si la reversión Lac^+ inducida por la nitrosoguanidina va asociada estadísticamente a la adquisición de resistencia a los fagos $Q\beta$ y f2. Se consideraron colonias resistentes aquellas cuyas bacterias crecían exactamente igual en presencia y en ausencia de fagos sobre medio sólido (Figura 3).

Los resultados de las Tablas 6a, 6b y 7a, 7b, 7c (las letras corresponden a distintos ensayos con cada estirpe) muestran que, en las dos estirpes utilizadas, la proporción de colonias resistentes a los fagos $Q\beta$ y f2 es aproximadamente el doble entre los revertientes Lac^+ inducidos por nitrosoguanidina que entre las colonias tratadas de la población general, de lo que se deduce que ambas mutaciones tienden a ocurrir simultáneamente en las mismas células. Si la proporción fuera la misma, la probabilidad de obtener una diferencia igual o mayor que la observada por simple fluctuación aleatoria es, en ambos casos, menor de 1/1000 según el método de comparación de porcentajes (transformación arco seno y test estadístico t) descrito en Sokal y Rohlf (1969).

De la observación de estas Tablas se concluye también que no hay resistencia a fagos Q β y f2 en células que no han sido tratadas con nitrosoguanidina, o sea, que la frecuencia de mutación espontánea es inferior a la detectable.

TABLA 6a. COINCIDENCIA DE LA REVERSION Lac^+
Y LA ADQUISICION DE RESISTENCIA A LOS FAGOS
Q β Y f2 EN LA ESTIRPE SE12

	Antes del tratamiento		Después del tratamiento	
	Población general	Mutantes Lac^+	Población general	Mutantes Lac^+
Células/ml	10^8	224	$1,5 \times 10^7$	4×10^4
Colonias ensayadas	400	400	400	400
Colonias resistentes a fagos Q β y f2	0	0	19	35
Id %	0	0	4,7	8,7

TABLA 6b. COINCIDENCIA DE LA REVERSION Lac^+
Y LA ADQUISICION DE RESISTENCIA A LOS FAGOS
Q β Y f2 EN LA ESTIRPE SE12

	Antes del tratamiento		Después del tratamiento	
	Población general	Mutantes Lac^+	Población general	Mutantes Lac^+
Células/ml	10^8	31	$6,6 \times 10^7$	$3,9 \times 10^4$
Colonias ensayadas	200	200	400	400
Colonias resistentes a fagos Q β y f2	0	0	18	39
Id %	0	0	4,5	9,7

TABLA 7a. COINCIDENCIA DE LA REVERSION Lac^+
Y LA ADQUISICION DE RESISTENCIA A LOS FAGOS
 $Q\beta$ Y $f2$ EN LA ESTIRPE SE13

	Antes del tratamiento		Después del tratamiento	
	Población general	Mutantes Lac^+	Población general	Mutantes Lac^+
Células/ml	$1,8 \times 10^8$	198	$6,1 \times 10^7$	$4,7 \times 10^4$
Colonias ensayadas	400	400	400	400
Colonias re- sistentes a fagos $Q\beta$ y $f2$	0	0	19	26
Id %	0	0	4,7	6,5

TABLA 7b. COINCIDENCIA DE LA REVERSION Lac^+
Y LA ADQUISICION DE RESISTENCIA A LOS FAGOS
Q β Y f2 EN LA ESTIRPE SE13

	Antes del tratamiento		Después del tratamiento	
	Población general	Mutantes Lac^+	Población general	Mutantes Lac^+
Células/ml	$9,9 \times 10^7$	159	$1,4 \times 10^7$	$6,6 \times 10^4$
Colonias ensayadas	300	300	400	400
Colonias resistentes a fagos Q β y f2	0	0	20	31
Id %	0	0	5	7,7

TABLA 7c. COINCIDENCIA DE LA REVERSION Lac^+
Y LA ADQUISICION DE RESISTENCIA A LOS FAGOS
Q β Y f2 EN LA ESTIRPE SE13

	Antes del tratamiento		Después del tratamiento	
	Población general	Mutantes Lac^+	Población general	Mutantes Lac^+
Células/ml	2×10^8	150	10^7	$9,4 \times 10^3$
Colonias ensayadas	-	-	650	650
Colonias resistentes a fagos Q β y f2	-	-	30	58
Id %	-	-	4,6	8,9

6. - COINCIDENCIA DE LA REVERSION Lac^+
Y LA ADQUISICION DE RESISTENCIA AL
FAGO f1

Se repitieron exactamente los mismos experimentos anteriores usando fagos f1. Los fagos f1 tienen como material genético ADN circular de una sola cadena, y una estructura vírica filamentosa, pero, lo mismo que $Q\beta$ y f2, necesitan para la adsorción la presencia de pelos sexuales en la estirpe donante. La presencia de estos pelos sexuales está controlada genéticamente por el factor F.

Un cultivo en fase exponencial de uno de estos mutantes ($Hfr Lac^-$) fue tratado con nitrosoguanidina. De este cultivo se obtuvieron colonias de la población general después del tratamiento con nitrosoguanidina y colonias revertientes Lac^+ inducidas por dicho agente mutagénico. Probando la proporción de colonias de estos dos tipos que son resistentes a f1, se puede decidir si la reversión Lac^+ inducida por la nitrosoguanidina va asociada estadísticamente a la adquisición de resistencia a fagos f1.

Los resultados de las Tablas 8 y 9 muestran que la proporción de colonias resistentes al fago f1 es tres veces superior entre los revertientes Lac^+ inducidos por nitrosoguanidina que entre las colonias tratadas de la población general, de lo que se deduce que ambas mutaciones tienden a ocurrir simultáneamente en las mismas células. Si la proporción fuera la misma la probabilidad de obtener una diferencia igual o mayor que la observada por simple fluctuación aleatoria es en ambos casos menor de 1/1000, según el mismo test estadístico anterior. En una de las estirpes (SE13) se estudió la resistencia a $Q\beta$ y f2 en las mismas colonias. Todas las colonias resistentes a f1 lo fueron a $Q\beta$ y f2, pero no viceversa. Entre la población general se encontraron 19 colonias resistentes a $Q\beta$ y f2, de las cuales solamente 8 fueron resistentes a f1, y de los revertientes Lac^+ , 29 fueron resistentes a $Q\beta$ y f2 y 27 a f1.

Con el empleo del fago f1 queda más patente la tendencia a la aparición simultánea de ambas mutaciones en estas estirpes.

TABLA 8. COINCIDENCIA DE LA REVERSION Lac^+
Y LA ADQUISICION DE RESISTENCIA AL FAGO f1
EN LA ESTIRPE SE12

	Población general	Mutantes Lac^+
Colonias ensayadas	500	500
Colonias resistentes al fago f1	16	43
Id %	3,2	8,6

TABLA 9. COINCIDENCIA DE LA REVERSION Lac⁺
Y LA ADQUISICION DE RESISTENCIA AL FAGO f1
EN LA ESTIRPE SE13

	Población general	Mutantes Lac ⁺
Colonias ensayadas	375	375
Colonias resistentes al fago f1	8	27
Id %	2,1	7,2

III. - EXPERIMENTOS CON EL F⁺ χ 15:
SELECCION DE ESTIRPES Lac⁻

Un cultivo de χ 15 en fase exponencial se trató con nitrosoguanidina, obteniéndose una supervivencia del 20%. Se siguió cultivando durante 3 horas y se sembró en cajas con medio mínimo con glucosa haciendo las diluciones adecuadas. En este medio son capaces de formar colonias casi todas las células del cultivo, incluso las que hayan sufrido mutaciones lac. Para aislar mutantes lac se comprobó la capacidad de las colonias obtenidas de vivir en medio mínimo con lactosa. De 300 colonias ensayadas, 2 fueron incapaces de vivir con lactosa, por lo que se presume que llevaban mutaciones en el sistema lac. Estas dos estirpes se denominaron SE20 y SE21.

IV. - EXPERIMENTOS CON LOS F⁺ Lac⁻

1. - COMPROBACION DE LAS CARACTERISTICAS DONANTES

Tratamiento con naranja de acridina

Para comprobar si estas estirpes habían perdido o no el factor F tras incubación prolongada con naranja de acridina se estudió si las colonias obtenidas despues del tratamiento eran resistentes a fagos f1, que se adsorben a los pelos sexuales determinados genéticamente por el factor F. De 200 colonias de SE21 ensayadas de esta forma sólo 5 seguían siendo sensibles al fago f1 lo que demuestra que la estirpe SE21 es un verdadero F⁺, cuyo factor F se encuentra en forma de episoma y se pierde por tratamiento con naranja de acridina.

2. - COINCIDENCIA DE LA REVERSION Lac⁺ Y LA ADQUISICION DE RESISTENCIA A LOS FAGOS Q_β Y f2

Un cultivo en fase exponencial de uno de estos mutantes fue tratado con nitrosoguanidina. De este cultivo se obtuvieron colonias de la población

general antes y después del tratamiento con nitrosoguanidina y colonias revertientes Lac^+ inducidas por dicho agente mutagénico. Probando la proporción de colonias de estos tipos que son resistentes a $\text{Q}\beta$ y f2 se puede decidir si la reversión Lac^+ inducida por nitrosoguanidina va asociada estadísticamente a la adquisición de resistencia a los fagos $\text{Q}\beta$ y f2 .

Los resultados de las Tablas 10 y 11 muestran que en las dos estirpes utilizadas la proporción de colonias resistentes a los fagos $\text{Q}\beta$ y f2 es aproximadamente igual entre los revertientes Lac^+ inducidos por nitrosoguanidina que entre las colonias tratadas de la población general. El análisis estadístico reveló que ambas mutaciones son independientes y que las diferencias observadas se deben a simple fluctuación aleatoria.

TABLA 10. COINCIDENCIA DE LA REVERSION Lac^+
Y LA ADQUISICION DE RESISTENCIA A LOS FAGOS
 $Q\beta$ Y $f2$ EN LA ESTIRPE SE20

	Antes del tratamiento		Después del tratamiento	
	Población general	Mutantes Lac^+	Población general	Mutantes Lac^+
Células/ml	$2,3 \times 10^8$	0	$2,2 \times 10^7$	9×10^3
Colonias ensayadas	500	-	700	800
Colonias resistentes a fagos $Q\beta$ y $f2$	0	-	35	41
Id %	0	-	5	5,1

TABLA 11. COINCIDENCIA DE LA REVERSION Lac^+
Y LA ADQUISICION DE RESISTENCIA A LOS FAGOS
 $Q\beta$ Y $f2$ EN LA ESTIRPE SE21

	Antes del tratamiento		Después del tratamiento	
	Población general	Mutantes Lac^+	Población general	Mutantes Lac^+
Células/ml	$3,2 \times 10^8$	0	$2,3 \times 10^7$	48
Colonias ensayadas	200	-	400	300
Colonias resistentes a fagos $Q\beta$ y $f2$	0	-	19	16
Id %	0	-	4,7	5,3

3. - COINCIDENCIA DE LA REVERSION Lac^+ Y LA
ADQUISICION DE RESISTENCIA AL FAGO f1

Se hicieron los mismos experimentos anteriores usando fagos f1. Un cultivo en fase exponencial de uno de estos mutantes fue tratado con nitrosoguanidina. De este cultivo se obtuvieron colonias de la población general despues del tratamiento con nitrosoguanidina y revertientes Lac^+ inducidos por dicho agente mutagénico. Probando la proporción de colonias de ambos tipos que son resistentes a f1, se puede decidir si la reversión Lac^+ inducida por la nitrosoguanidina va asociada estadísticamente a la adquisición de resistencia a fagos f1.

Los resultados de la Tabla 12 muestran que la proporción de colonias resistentes al fago f1 es prácticamente igual entre los revertientes Lac^+ inducidos por nitrosoguanidina que entre las colonias tratadas de la población general y se concluye que ambas mutaciones son independientes.

TABLA 12. COINCIDENCIA DE LA REVERSION Lac^+
Y LA ADQUISICION DE RESISTENCIA AL FAGO f1
EN LA ESTIRPE SE21

	Población general	Mutantes Lac^+
Colonias ensayadas	500	400
Colonias resistentes al fago f1	13	12
Id %	2,6	3,0

V. - SELECCION DE ESTIRPES DEFICIENTES EN CONJUGACION A PARTIR DE ESTIRPES Hfr Lac⁻

Para aislar estirpes que hayan perdido espontáneamente su capacidad de transferencia genética, se ensayó la conjugación en medio sólido de colonias de SE12 y SE13 (ver Materiales y Métodos).

Aproximadamente un 1% de las colonias ensayadas no dieron recombinantes. De entre ellas se aislaron SE18, SE19, SE22 y SE23 (derivadas de SE12) y SE15, SE16 y SE17 (derivadas de SE13).

VI. - EXPERIMENTOS CON ESTIRPES DERIVADAS DE
Hfr Lac⁻ DEFICIENTES EN CONJUGACION

1. - COINCIDENCIA DE LA REVERSION Lac⁺ Y LA
ADQUISICION DE RESISTENCIA A LOS FAGOS
Q β Y f2

Un cultivo en fase exponencial de uno de estos mutantes fue tratado con nitrosoguanidina. De este cultivo se obtuvieron colonias de la población general antes y después del tratamiento con nitrosoguanidina y revertientes Lac⁺ espontáneas e inducidas por dicho agente mutagénico. Probando la proporción de colonias de estos cuatro tipos que son resistentes a Q β y f2 se puede decidir si la reversión Lac⁺ inducida por la nitrosoguanidina va asociada estadísticamente a la adquisición de resistencia a los fagos Q β y f2.

Los resultados de las Tablas 13 a 19 muestran que de las 7 estirpes utilizadas en 6 de ellas la proporción de colonias resistentes a los fagos Q β y f2 es aproximadamente igual entre los revertientes Lac⁺ inducidos por nitrosoguanidina que entre

las colonias tratadas de la población general. El análisis estadístico reveló en estos seis casos que ambas mutaciones son independientes y que las diferencias observadas se deben a simple fluctuación aleatoria. En el caso de la estirpes SE15 ambas mutaciones tienen una clara tendencia a ocurrir simultáneamente; la probabilidad de obtener una desigualdad igual o mayor que la observada si las mutaciones fueran independientes es menor de 1/1000.

De la observación de las Tablas también se concluye que no hay resistencia a fagos Q β y f2 en células que no han sido tratadas con nitrosoguanidina, o sea, que la frecuencia de mutación espontánea es inferior a la detectable.

TABLA 13. COINCIDENCIA DE LA REVERSION Lac^+
Y LA ADQUISICION DE RESISTENCIA A LOS FAGOS
Q β Y f2 EN LA ESTIRPE SE15

	Antes del tratamiento		Después del tratamiento	
	Población general	Mutantes Lac^+	Población general	Mutantes Lac^+
Células/ml	$2,7 \times 10^8$	98	$7,1 \times 10^6$	$4,2 \times 10^4$
Colonias ensayadas	300	400	400	400
Colonias re- sistentes a fagos Q β y f2	0	0	14	50
Id %	0	0	3,5	12,5

TABLA 14. COINCIDENCIA DE LA REVERSION Lac^+
Y LA ADQUISICION DE RESISTENCIA A LOS FAGOS
Q β Y f2 EN LA ESTIRPE SE16

	Antes del tratamiento		Después del tratamiento	
	Población general	Mutantes Lac^+	Población general	Mutantes Lac^+
Células/ml	$9,7 \times 10^7$	41	$2,4 \times 10^7$	5×10^4
Colonias ensayadas	200	200	400	400
Colonias re- sistentes a fagos Q β y f2	0	0	19	20
Id %	0	0	4,7	5

TABLA 15. COINCIDENCIA DE LA REVERSION Lac^+
Y LA ADQUISICION DE RESISTENCIA A LOS FAGOS
Q β Y f2 EN LA ESTIRPE SE17

	Antes del tratamiento		Después del tratamiento	
	Población general	Mutantes Lac^+	Población general	Mutantes Lac^+
Células/ml	$1,5 \times 10^8$	286	2×10^7	$5,4 \times 10^4$
Colonias ensayadas	300	300	400	400
Colonias resistentes a fagos Q β y f2	0	0	21	27
Id %	0	0	5,2	6,7

TABLA 16. COINCIDENCIA DE LA REVERSION Lac^+
Y LA ADQUISICION DE RESISTENCIA A LOS FAGOS
Q β Y f2 EN LA ESTIRPE SE18

	Antes del tratamiento		Después del tratamiento	
	Población general	Mutantes Lac^+	Población general	Mutantes Lac^+
Células/ml	$1,9 \times 10^8$	184	$4,5 \times 10^7$	$4,9 \times 10^4$
Colonias ensayadas	300	300	400	400
Colonias re- sistentes a fagos Q β y f2	0	0	16	16
Id %	0	0	4	4

TABLA 17. COINCIDENCIA DE LA REVERSION Lac^+
Y LA ADQUISICION DE RESISTENCIA A LOS FAGOS
 $Q\beta$ Y $f2$ EN LA ESTIRPE SE19

	Antes del tratamiento		Después del tratamiento	
	Población general	Mutantes Lac^+	Población general	Mutantes Lac^+
Células/ml	$1,6 \times 10^8$	129	4×10^7	$5,6 \times 10^4$
Colonias ensayadas	300	300	400	400
Colonias resistentes a fagos $Q\beta$ y $f2$	0	0	20	28
Id %	0	0	5	7

TABLA 18. COINCIDENCIA DE LA REVERSION Lac^+
Y LA ADQUISICION DE RESISTENCIA A LOS FAGOS
 $Q\beta$ Y $f2$ EN LA ESTIRPE SE22

	Antes del tratamiento		Después del tratamiento	
	Población general	Mutantes Lac^+	Población general	Mutantes Lac^+
Células/ml	$6,9 \times 10^7$	63	$1,8 \times 10^7$	4×10^4
Colonias ensayadas	300	300	500	500
Colonias re- sistentes a fagos $Q\beta$ y $f2$	0	0	25	28
Id %	0	0	5	5,6

TABLA 19. COINCIDENCIA DE LA REVERSION Lac^+
Y LA ADQUISICION DE RESISTENCIA A LOS FAGOS
Q β Y f2 EN LA ESTIRPE SE23

	Antes del tratamiento		Después del tratamiento	
	Población Mutantes general	Lac^+	Población Mutantes general	Lac^+
Células/ml	$6,9 \times 10^7$	36	$1,5 \times 10^7$	$4,1 \times 10^4$
Colonias ensayadas	100	100	400	400
Colonias re- sistentes a fagos Q β y f2	0	0	20	22
Id %	0	0	5	5,4

2. - COINCIDENCIA DE LA REVERSION Lac^+ Y LA
ADQUISICION DE RESISTENCIA AL FAGO f1

Se hicieron exactamente los mismos experimentos anteriores usando fagos f1. Un cultivo en fase exponencial de uno de estos mutantes fue tratado con nitrosoguanidina. De este cultivo se obtuvieron colonias de la población general después del tratamiento con nitrosoguanidina y colonias revertientes Lac^+ inducidas por dicho agente mutagénico. Probando la proporción de colonias de estos dos tipos que son resistentes a f1, se puede decidir si la reversión Lac^+ inducida por la nitrosoguanidina va asociada estadísticamente a la adquisición de resistencia a fagos f1.

Los resultados de las Tablas 20 y 21 muestran que la proporción de colonias resistentes al fago f1 es prácticamente igual entre los revertientes Lac^+ inducidos por nitrosoguanidina que entre las colonias tratadas de la población general. El análisis estadístico reveló que ambas mutaciones son independientes y que las diferencias observadas se deben a simple fluctuación aleatoria.

TABLA 20. COINCIDENCIA DE LA REVERSION Lac⁺
Y LA ADQUISICION DE RESISTENCIA AL FAGO f1
EN LA ESTIRPE SE17

	Población general	Mutantes Lac ⁺
Colonias ensayadas	500	500
Colonias re- sistentes al fago f1	12	10
Id %	2,4	2

TABLA 21. COINCIDENCIA DE LA REVERSION Lac^+
Y LA ADQUISICION DE RESISTENCIA AL FAGO f1
EN LA ESTIRPE SE18

	Población general	Mutantes Lac^+
Colonias ensayadas	500	500
Colonias resistentes al fago f1	7	7
Id %	1,4	1,4

PARTE II COMUTACION EN EL SISTEMA LEUCINA-
ARABINOSA

I. - MUTAGENESIS Y SELECCION DE ESTIRPES
Ara⁻ Y DE ESTIRPES Leu⁻

Un cultivo de E. coli B/5 protótrofo en fase exponencial fue tratado con nitrosoguanidina. El número de bacterias vivas antes del tratamiento fue de 4×10^7 /ml y después del tratamiento 9×10^6 /ml. La supervivencia fue por tanto del 22%.

Después del tratamiento con nitrosoguanidina, el cultivo fue tratado con penicilina siguiendo exactamente el protocolo descrito en Material y Métodos. La supervivencia a este tratamiento fue de 0,09%.

Las colonias obtenidas después de dos días de incubación en cajas de medio mínimo con glucosa y leucina se transplantaron a cajas de medio mínimo con glucosa y a cajas de medio mínimo con arabinosa y leucina, con el fin de buscar mutantes incapaces de vivir sin leucina y mutantes

incapaces de utilizar la arabinosa como única fuente de carbono.

De 500 colonias ensayadas se obtuvieron 2 mutantes Leu^- y 3 mutantes Ara^- , que se cree que llevan mutaciones leu y ara respectivamente. Se aisló y purificó un mutante de cada tipo y se denominó SE25 al mutante Leu^- y SE26 al mutante Ara^- .

II. - SELECCION DE MUTANTES Ara^- Y DE MUTANTES Leu^- QUE REVIERTEN BIEN CON NITROSOGUANIDINA

Se trataron con nitrosoguanidina cultivos en fase exponencial de SE25 (que lleva la mutación leu) y de SE26 (que lleva la mutación ara). Se sembraron muestras de ambos cultivos en medio nutritivo antes y después del tratamiento para calcular la supervivencia. Después del tratamiento y de los lavados correspondientes se sembraron alícuotas de SE25 en cajas de medio mínimo (donde sólo crecen células Leu^+) y alícuotas de SE26 en cajas de medio mínimo con arabinosa como única fuente de carbono (donde solo crecen células Ara^+).

	Estirpes	
	SE25 (leu)	SE26 (ara)
Células/ml antes del tratamiento	$2,2 \times 10^8$	3×10^8
Células/ml después del tratamiento	$4,7 \times 10^7$	6×10^7
Superviven- cia (%)	23	20
Revertientes/ 10^6	2,1	1,6

La supervivencia de ambas estirpes al tratamiento con nitrosoguanidina fue la normal y la frecuencia de reversión suficiente para realizar estudios posteriores.

III. - COINCIDENCIA DE LA REVERSION Leu^+ Y LA MUTACION Ara^-

Para comprobar si existe o no una coincidencia significativa entre la reversión Leu^+ inducida por la nitrosoguanidina y la pérdida de capacidad

de utilizar arabinosa como única fuente de carbono se hizo el siguiente experimento.

Un cultivo de SE25 (que lleva una mutación leu) en fase exponencial fue tratado con nitrosoguanidina. Después del tratamiento se sembraron cajas de medio mínimo con leucina, teniendo en cuenta que el número de revertientes esperado era de 2 por cada millón de bacterias vivas. Las colonias revertientes Leu^+ obtenidas después de dos días de incubación se transplan- taron a cajas de medio mínimo y a cajas de medio mínimo en las que la glucosa había sido sustituida por arabinosa.

Se probaron 1.000 colonias y se obtu- vieron 21 Ara^- (2,1%). Como la frecuencia de mu- tantes Ara^- en las mismas condiciones pero sin seleccionar revertientes Leu^+ es de 0,17% (Guerola et al., 1971), se concluye que ambas mutaciones tienden a ocurrir simultáneamente en las mismas células. El análisis estadístico indicó que la diferencia es muy significativa.

IV. - COINCIDENCIA DE LA REVERSION Ara⁺
Y LA MUTACION Leu⁻

Para comprobar si existe o no una coincidencia significativa entre la reversión Ara⁺ inducida por la nitrosoguanidina y la incapacidad de vivir sin leucina, se hizo el siguiente experimento.

Un cultivo en fase exponencial de SE26 (que lleva una mutación ara) fue tratado con nitrosoguanidina. Después del tratamiento se sembraron cajas de medio mínimo en las que la glucosa había sido sustituida por arabinosa, teniendo en cuenta que el número de revertientes esperado era de 1,6 por cada millón de bacterias vivas. Las colonias revertientes obtenidas después de dos días de incubación se transplantaron a cajas de medio mínimo con arabinosa y a cajas de medio mínimo con arabinosa y leucina. Se probaron 800 colonias Ara⁺ y se obtuvieron 8 Leu⁻ (1%). Como la frecuencia de mutantes Leu⁻ en las mismas condiciones pero sin seleccionar revertientes Ara⁺ es de 0,22%, se concluye que ambas mutaciones tienden a ocurrir simultáneamente en las mismas células. El análisis estadístico indicó que la diferencia es muy significativa.

PARTE III COMUTACION EN EL OPERON DE LA ARGININA

I. - OBTENCION DE MUTANTES Arg⁻

Un cultivo en fase estacionaria de una estirpe silvestre de Escherichia coli B/5 fue diluído y cultivado en medio mínimo con exceso de arginina. Cuando el cultivo estaba en fase exponencial se tomaron muestras para saber el número de bacterias vivas por ml antes del tratamiento con nitrosoguanidina. Se obtuvieron $3,4 \times 10^7$ /ml. Se lavó el cultivo y se trató con nitrosoguanidina, y después de los lavados correspondientes se tomó otra muestra para saber el número de bacterias por ml que habían sobrevivido. Se obtuvieron $2,8 \times 10^6$ /ml, lo que da una supervivencia del 8,2%.

Después del tratamiento con nitrosoguanidina, el cultivo, diluído 10 veces, se trató con penicilina siguiendo exactamente el protocolo descrito en Materiales y Métodos, cuyos detalles son críticos para el aislamiento de auxótrofos. La supervivencia a este último tratamiento fue del 0,07%.

Las colonias obtenidas después de dos días

de incubación en cajas de medio mínimo con arginina, se ensayaron en cajas de medio mínimo con y sin arginina, con el fin de obtener mutantes auxotróficos para este requerimiento.

De 1.200 colonias ensayadas se obtuvieron 12 auxótrofos para la arginina.

II. - SELECCION DE MUTANTES Arg⁻ AFECTADOS
EN EL GEN H

Los mutantes Arg⁻ afectados en el gen H se obtuvieron probando los 12 mutantes Arg⁻ (obtenidos por mutagénesis con nitrosoguanidina y selección con penicilina) en cajas de medio mínimo con 20 µg de citrulina, de medio mínimo con argininosuccinato (1000 µg/ml) y de medio mínimo con arginina (20 µg/ml), y seleccionando aquellas colonias incapaces de crecer en citrulina y argininosuccinato y capaces de crecer en arginina.

De los 12 mutantes probados, 3 de ellos crecieron en las cajas de medio mínimo con arginina pero no en las otras dos, y por tanto se consideraron

mutantes argH^- .

Se aislaron y purificaron convenientemente y se denominaron SE30, SE31 y SE32.

III. - SELECCION DE MUTANTES ArgH^- QUE REVIERTEN BIEN CON NITROSOGUANIDINA

Se trataron con nitrosoguanidina cultivos exponenciales de SE30 y SE32. Se tomaron muestras antes y después del tratamiento para calcular la supervivencia y se sembraron cajas de medio mínimo con citrulina para calcular la frecuencia de reversión.

El número de revertientes de la estirpe SE30 fue superior al de la estirpe SE32, por lo que se seleccionó esta estirpe para emplearla en experimentos posteriores. Los resultados pueden observarse en la Tabla 22.

TABLA 22. SELECCION DE UN MUTANTE ArgH⁻ QUE RE-
VIERTA BIEN CON NITROSOGUANIDINA

	Estirpes	
	SE30	SE32
Células/ml antes del tratamiento	2×10^8	$1,5 \times 10^8$
Células/ml después del tratamiento	$3,5 \times 10^7$	$8,7 \times 10^6$
Supreviven- cia (%)	17,5	5,8
Revertientes ArgH ⁺ /10 ⁶	2,8	0,5

IV. - EXPERIMENTOS CON SE30

1. - OBTENCION DE REVERTIENTES ArgH⁺

Se trató con nitrosoguanidina un cultivo exponencial de SE30. El número de bacterias vivas por ml antes del tratamiento fue de $1,5 \times 10^8$ y después del tratamiento de $2,2 \times 10^7$. La supervivencia fue, por tanto, del 14,6%.

Después del tratamiento, se sembraron cajas de medio mínimo con citrulina (20 µg/ml) teniendo en cuenta que el número de revertientes esperado era de 3 por cada millón de bacterias vivas, según un experimento anterior.

2. - SELECCION DE MUTANTES Arg⁻ ENTRE LOS REVERTIENTES ArgH⁺

Las colonias revertientes obtenidas después de dos días de incubación, se transplantaron a cajas de medio mínimo y a cajas de medio mínimo con arginina para buscar posibles mutantes arg⁻ afectados en pasos anteriores de la ruta biosintética. De 1000 colonias ensayadas, 17 eran Arg⁻,

es decir habían sufrido simultáneamente dos mutaciones, la reversión $\text{ArgH}^- \longrightarrow \text{ArgH}^+$ y una mutación Arg^- en uno de los genes que controlan los pasos anteriores de la ruta biosintética.

3. - SELECCION DE 100 MUTANTES Arg^- ENTRE LOS REVERTIENTES ArgH^+

El experimento anterior fue repetido cinco veces más hasta obtener un total de 9.000 colonias revertientes ArgH^+ , de las que 103 fueron incapaces de crecer en medio mínimo sin arginina. (Tabla 23).

Para asegurarse de que SE30, SE31 y SE32 no eran mutante ArgG^- sino mutantes ArgH^- cuya permeabilidad al argininosuccinato no era muy buena, se preparon cajas con 1000 $\mu\text{g/ml}$ de argininosuccinato y se transplantaron a estas cajas colonias aisladas de SE30, SE31 y SE32 y 20 colonias Arg^- (tomadas al azar de los 100 mutantes obtenidos en cajas con citrulina. A los dos días de incubación, las colonias de SE30, SE31 y SE32 no habían crecido en absoluto, mientras que los 20 mutantes Arg^- habían crecido

TABLA 23. SELECCION DE MUTANTES Arg⁻ ENTRE
LOS REVERTIENTES ArgH⁺

	Células ArgH ⁺ ensayadas	Células Arg ⁻ obtenidas	Porcen- taje
Experimento 1	1000	17	1,7
Experimento 2	1500	12	0,8
Experimento 3	1400	15	1,1
Experimento 4	1600	20	1,2
Experimento 5	1000	13	1,3
Experimento 6	2500	26	1,0
TOTAL	9000	103	1,1

FIGURA 8. Clasificación de los 94 mutantes ArgH^+ pero Arg^- . Observación del crecimiento en cajas de medio mínimo suplementadas con los distintos compuestos intermedios de la ruta biosintética de la arginina. La primera caja de la fotografía contiene ácido glutámico y la última arginina.

todos, lo que confirmó que las estirpes SE30, SE31 y SE32 eran realmente mutantes ArgH^- , y los otros 20, revertientes ArgH^+ con mutaciones secundarias en otros genes arg.

4. - COINCIDENCIA DE LA REVERSION ArgH^+ Y LA MUTACION ArgE^- , C^- , ó B^-

Al purificar los 103 mutantes Arg^- obtenidos en los experimentos anteriores se comprobó que 9 de ellos no requerían arginina para vivir, por lo que se prescindió de ellos. Los 94 restantes se ensayaron en cajas de medio mínimo suplementadas con 20 μg por ml de: ácido glutámico, ácido N-acetilglutámico, acetilornitina, ornitina y citrulina. En la Figura 8 se ve un ejemplo de estos ensayos, y la Tabla 24 muestra los resultados obtenidos.

TABLA 24. COINCIDENCIA DE LA REVERSION ArgH^+ Y
LA MUTACION ArgE^- , C^- , ó B^- .

GENES	Nº DE CASOS
A	1
B + C	42
E	43
F	8
G	0
<hr/>	
TOTAL	94

V. - EXPERIMENTOS CON SE33

1. - REVERSION ArgE⁺

Un cultivo SE33 (ArgE⁻) se cultivó hasta fase exponencial, se trató con nitroso-guanidina y se sembraron cajas de medio mínimo con acetilornitina. La frecuencia de reversión fue de 0,7 revertientes por millón de supervivientes.

2. - OBTENCION DE REVERTIENTES ArgE⁺ PERO Arg⁻

Las colonias obtenidas en medio mínimo con acetilornitina, se transplantaron a cajas de medio mínimo con arginina. De 200 colonias revertientes ArgE⁺ ensayadas, 2 requerían arginina, es decir, habían sufrido una mutación en los genes argA, B, C, ó D.

3. - CARACTERIZACION DE ESTOS MUTANTES

Los dos mutantes obtenidos se transplantaron a cajas de medio mínimo con ácido acetilglutámico y medio con acetilornitina, y se comprobó

que ninguno de los dos podía crecer en acetilglutámico, por lo que no eran mutantes argA sino B, C, ó D.

DISCUSSION

RESULTADOS CON EL SISTEMA F-lac

Los resultados obtenidos en estos experimentos demostraron que en las estirpes Hfr, las mutaciones simultáneas entre F y lac ocurrían con más frecuencia que lo esperado por azar después del tratamiento con nitrosoguanidina, mientras que esto no ocurría en las estirpes F⁺. Esto apoya la hipótesis de Jacob y Wollman de que el factor F de las estirpes Hfr está integrado en el cromosoma y se replica como una parte de él, incluso durante la vida vegetativa del Hfr.

Cuando aislamos siete estirpes Hfr con poca capacidad de transferencia genética, encontramos que seis de ellas no exhibían comutación entre los genes episómicos y cromosómicos. Esto puede ser debido a la separación del factor F del cromosoma bacteriano sin llevarse ningún gen relevante. En la otra estirpe, que sí exhibía comutación, pueden ocurrir dos cosas, bien que se haya formado un factor F'lac autónomo o bien que haya habido una pérdida de la capacidad de transferencia sin adquisición de resistencia a los fagos específicos de

bacterias donantes, es decir, sin alteración de los pelos F sexuales. Esta pérdida podría ser debida a mutaciones en alguno de los cistrones tra del genomio de F, responsables de la transferencia, pero que no están asociados con la síntesis de pelos F (Achtman, 1973).

El hecho de que el índice de comutación fue más alto al emplear los fagos f1 que los fagos Q β y f2 y el hecho de que las bacterias resistentes a f1, lo eran a Q β y f2 pero no a la inversa, se puede explicar suponiendo que algunas mutaciones que confieren resistencia a Q β y f2, pero no a f1, se sitúan en el cromosoma lejos de lac y del factor F. Estas mutaciones no manifestarían comutación con lac, reduciendo el índice de comutación. La existencia de estas mutaciones impone que la participación de los genes bacterianos en el desarrollo de los dos tipos de fagos sea diferente, lo que es de esperar dadas las diferencias extremas entre ellos.

Las causas de las reversiones de los mutantes lac a fenotipo silvestre podrían ser las

supresiones intergénicas y no las mutaciones intragénicas, como nosotros hemos considerado. Ello conduciría a una interpretación errónea de los resultados de comutación. Esta explicación es muy improbable porque distintas mutaciones originales diferentes Lac^- manifiestan comutación.

El método de la comutación permite estudiar la integración de un episoma aunque éste no confiera a la bacteria capacidad de conjugar y también aunque lleve genes indispensables para la vida de la bacteria y podrá aplicarse con éxito a especies cuyos sistemas genéticos son poco conocidos. Los métodos actuales de estudio de episomas exigen que sean transferibles por conjugación o por lo menos que sean eliminables por acridinas, para lo cual no han de portar genes indispensables para la célula.

RESULTADOS CON EL SISTEMA LEUCINA-ARABINOSA

Los resultados de comutación obtenidos al estudiar los genes leu y ara, aunque no bastante extensos para hacer una estimación exacta de la fre-

cuencia de mutantes ara entre los revertientes Leu^+ y la frecuencia de mutantes leu entre los revertientes Ara^+ , sí nos permiten concluir que ambas mutaciones tienden a ocurrir simultáneamente en las mismas células con una frecuencia mayor de la esperada por azar. Se encontró que el porcentaje de comutación era mayor cuando se seleccionaban mutantes ara entre los revertientes Leu^+ (2,1%) que cuando se seleccionaban mutantes leu entre los revertientes Ara^+ (1%). Esta diferencia es significativa estadísticamente cuando se aplica el test de Sokal (el valor de t encontrado fue 1,90), y nos indica que se producen más mutaciones en los genes ara que en los genes leu lo que podría ser debido al mayor tamaño total de los primeros. De cualquier forma, los resultados indican que la comutación por nitrosoguanidina en E. coli es un fenómeno recíproco, sin una orientación determinada e independiente de la conocida polaridad de la replicación.

Randazzo et al., (1972) aplicaron en Streptomyces coelicolor el descubrimiento de la comutación por nitrosoguanidina (Guerola et al., 1971). Sus resultados indicaban que la comuta-

ción era un fenómeno polarizado en un sentido, permitiendo sólo la obtención de mutantes no seleccionados en genes situados a uno de los lados del gen seleccionado. Tal polarización, difícilmente explicable en teoría, no se ha confirmado en nuestros experimentos.

RESULTADOS CON LA RUTA DE LA ARGININA

Los resultados obtenidos en el estudio de los genes estructurales que controlan el proceso de la biosíntesis de arginina en E. coli no deja lugar a dudas sobre la localización de cuatro de estos genes (argE, argC, argB y argH) agrupados en una región muy pequeña del cromosoma bacteriano. Al clasificar los 94 mutantes arg obtenidos de entre los revertientes ArgH^+ hemos encontrado que 42 de ellos estaban afectados en los genes argB-argC y 43 en el gen argE, mientras que sólo 8 lo estaban en el gen F, 1 en el gen A y ninguno en el gen G. No se han considerado los posibles mutantes en el gen D (responsable de la síntesis de acetilornitina transaminasa) porque las mutaciones en este gen no suelen producir auxotrofia, debido, probablemente a

que la conversión de semialdehído acetil-glutámico en acetilornitina sea un proceso inespecífico enzimáticamente que pueda llevarse a cabo por medio de cualquier otra transaminasa.

Estos resultados coinciden, por supuesto, con los de localización de estos genes por transducción (Glansdorff, 1965), que indican la proximidad de los genes argE, C, B y H.

El escaso número de mutantes obtenido en los genes argA, argF y argG sólo nos permite deducir que estos genes están lejos de la región ECBH, sin especificar la distancia a que se encuentran.

En nuestro trabajo, hemos estudiado los revertientes de un mutante en el gen H para poder observar y clasificar las mutaciones producidas en todos los pasos anteriores, ya que este gen es el que controla el último paso de la ruta. Los resultados fueron los mismos cuando seleccionamos dos revertientes de un mutante en el gen E que estaban afectados en un paso anterior de la ruta, ya que encontramos que ambos eran argB-argC y no argA.

GENERALIDAD DEL METODO CARTOGRAFICO

La cartografía genética por comutación con nitrosoguanidina, explorada en este trabajo, tiene la gran ventaja de que no exige que en el organismo estudiado existan los procesos de recombinación genética indispensables para la cartografía clásica.

La aplicación de este método para la construcción de mapas genéticos en organismos diferentes de E. coli presupone, sin embargo, una acción de este agente mutagénico que, en muchos de ellos, no ha sido demostrada. Aunque se ha demostrado que la nitrosoguanidina produce comutación o mutación específica del punto de replicación en ciertos organismos, como Salmonella, Neisseria, Streptomyces, Neurospora etc., los trabajos de Altenbern (1968) sugieren que en Staphylococcus aureus las mutaciones inducidas por la nitrosoguanidina no están asociadas al punto de replicación y, de ser así, no debería encontrarse comutación.

Hemos considerado que la comutación que

exhiben entre sí los marcadores genéticos empleados en este estudio es debida a su proximidad en el cromosoma. Pero como de hecho la comutación sólo significa que dos estructuras genéticas se replican simultáneamente, debería darse cada vez que dos genes se repliquen sincrónicamente, cualquiera que sea la distancia que los separe. Si un episoma en estado autónomo se replicara en el mismo momento que un gen bacteriano determinado encontraríamos comutación entre ellos, y podríamos deducir, erróneamente, que se encontraban ligados físicamente. Después de los trabajos de Yabe y Mitsuhashi (1971) y Zeuthen y Pato (1971) se sabe que los episomas en estado autónomo se replican en un determinado momento del ciclo celular, pero es probable que la sincronización no sea lo suficientemente buena como para mostrar comutación apreciable con genes cromosómicos.

Los resultados topográficos obtenidos por mutagénesis secuencial con nitrosoguanidina (Cerdá-Olmedo et al., 1968) son compatibles con el esquema de replicación bidireccional de Masters y Broda (1971). Considerando la existencia de dos lugares

de replicación que avanzan en sentidos opuestos en el cromosoma bacteriano, Hohlfeld y Vielmetter (1973) han realizado experimentos de mutagénesis secuencial con nitrosoguanidina y han podido establecer con bastante exactitud que el origen de replicación se encuentra en un lugar muy próximo al gen ilv y el final entre los genes trp y his.

La distancia física de dos genes o grupos de genes, en cuanto a probabilidad de ser mutados simultáneamente en un tratamiento con nitrosoguanidina se puede definir cuantitativamente por el índice de comutación (Guerola et al., 1971) y en cuanto a probabilidad de ser transducidos simultáneamente por un mismo fago transductor, por la frecuencia de cotransducción (Yanofsky y Lennox, 1959). La región de comutación se extiende sobre unos dos minutos del mapa genético, o sea 6×10^4 pares de nucleótidos aproximadamente, que corresponde a la de fagos transductores de muy considerable tamaño. Tiene la ventaja de ser aplicable sin necesidad de que se haya descubierto un fago transductor en la especie que nos interese; la búsqueda de tales fagos suele ser laboriosa y frecuentemente infructuosa.

En muchos organismos de interés médico, agrícola o industrial no se han descubierto procesos de recombinación genética, o los descubiertos presentan insuperables dificultades prácticas. Es de prever que la cartografía genética por comutación sea aplicable a tales organismos facilitando el conocimiento de su sistema genético y el aislamiento de mutantes útiles.

REFERENCIAS

- ACHTMAN, M. (1973). "Genetics of the F sex factor in Enterobacteriaceae". Current Topics Microbiol. Immunol., 60:79
- ADELBERG, E. A. y BURNS, S. N. (1959). "A variant sex factor in Escherichia coli". Genetics, 44: 67
- ADELBERG, E. A., MANDEL, M. y CHEIN-CHING-CHEN (1965). "Optimal conditions for mutagenesis by nitrosoguanidine in E. coli K-12". Biochem. Biophys. Res. Commun., 18: 788
- ALLAN, R. K. y McCALLA, D. R. (1966). "Prophage induction by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine". Can. J. Microbiol., 12: 202
- ALTENBERN, R. A. (1966). "Apparent genomic mapping of Staphylococcus aureus by a new method". Biochem. Biophys. Res. Commun., 25:
- CAVALLI, L. L. (1950). "La sessulita nei batteri". Boll. Ist. Sieroter. Milano. 29: 281
- CERDA-OLMEDO, E. y HANAWALT, P. C. (1967). "Macromolecular action of nitrosoguanidine in Escherichia coli". Biochem. Biophys. Acta. 142: 450
- CERDA-OLMEDO, E. y HANAWALT, P. C. (1968). "The replication point of the E. coli chromosome studied by sequential nitrosoguanidi-

dine mutagenesis". Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol., XXXIII: 599

CERDA-OLMEDO, E., HANAWALT, P. C. y GUEROLA (1968).

"Mutagenesis of the replication point by nitrosoguanidine: map and pattern of replication of the E. coli chromosome". J. Mol. Biol., 33: 705.

CRADDOCK, V. M. (1969). "Study of the methylation and lack of deamination of DNA by nitrosoguanidine". Biochem. J., 111: 615.

CUNIN, R., ELSEVIERS, E., SAND, G., FREUNDLICH, G. y GLANSDORFF, N. (1969). "On the functional organization of the arg ECBH cluster of genes in E. coli K-12". Mol. Gen. Genet. 106: 32.

CURTISS, R. y RENSHAW, J. (1969). "F⁺ strains of Escherichia coli K-12 defective in Hfr formation". Genetics, 63: 7.

DELIC, V., HOPWOOD, D. A. y FRIEND, E. J. (1970). "Mutagenesis by nitrosoguanidine in Streptomyces coelicolor". Mut. Res., 9: 167.

DEMEREK, M. ADELBERG, E. A., CLARK, A. J. y HARTMAN, P. E. (1966). "A proposal for a uniform nomenclature in bacterial genetics". Genetics, 54: 61.

- DRUCKREY, H., PREUSSMANN, R., IVANKOVIC, S.,
SO, B. T., SCHMIDT, C. H. y BUCHELER, J.
(1966). "Zur erzeugung subcutaner sarkome
und ratten". Z. Krebsforschg., 68: 87
- EISENSTARK, A., EISENSTARK, K. R. y van SICKLE, R.
(1965). "Mutation of Salmonella thyphi-
murium by nitrosoguanidine". Mut. Res.,
2: 1
- FALKOW, S., WOHLHIETER, J. A., CITARELLA, R. V. y
BARON, L. S. (1964). "Transfer of episomic
elements to Proteus". J. Bact., 88: 1598
- GICHNER, T., MICHAELIS, A. y RIEGER, R. (1963).
"Radiometric effects of 1-methyl-3-nitro-
1-nitrosoguanidine in Vicia faba". Biochem.
Biophys. Res. Commun., 11: 120
- GLANSDORFF, N. (1965). "Topography of cotransducible
arginine mutations in Escherichia coli K-12"
Genetics, 51: 167
- GOLDING, A., VENDITTI, J. M. y KLINE, I. (1959).
"Evaluation of antileukemic agents used in
advanced leukemia L1210 in mice". Cancer
Chemoth. Screening Data, IV., Cancer Res.,
19: 429.
- GOMORI, G. (1955). "Preparation of buffers for use
in enzyme studies". Methods in Enzimology,
N. Y. Acad. Press, vol. I: 138

- GUEROLA, N., INGRAHAM, J. L. y CERDA-OLMEDO, E. (1971). "Induction of closely linked multiple mutations by nitrosoguanidine". *Nature*, 230: 122
- HERSHEY A. D., KAMEN, M. D., KENNEDY. J. W. y GEST, H. (1951). "The mortality of bacteriophage containing assimilated radioactive phosphorus". *J. Gen. Physiol.*, 34: 305
- HIROTA, Y. (1960). "The effect of acridine dyes on mating type factors in Escherichia coli". *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 46: 57
- HOHLFELD, R. y VIELMETTER, W. (1973). "Chromosome replication - Bidirectional with origin close to ilv and terminus between trp and his". *Nature*, 242: 118
- IKEDA, H. y TOMIZAWA, J. (1965). "Transducing fragments in generalized transduction by phage P1. I. Molecular origin of the fragments". *J. Mol. Biol.*, 14: 85
- JACOB, F. y WOLLMAN, E. L. (1956). "Sur les processus de conjugaison et de recombinaison génétique chez E. coli: I. L'induction zygotique". *Ann. Inst. Pasteur*, 91: 486

JACOB, F. y WOLLMAN, E. L. (1961) "Sexuality and the genetics of bacteria". N. Y. Acad. Press

JACOBY, G. A. (1972) "Control of the arg ECBH cluster in E. coli". Mol. Gen. Genet., 117: 337

JACOBY, G. A. (1972) "Control regions within the arg ECBH gene cluster of E. coli K12". Mol. Gen. Genet., 117: 349

JIMENEZ-SANCHEZ, A. (1974) Tesis doctoral. Universidad de Sevilla.

JYSSUM, K. (1969) "Origin and sequence of chromosome replication in Neisseria meningitidis: influence of a genetic factor determining competence". J. Bact., 99: 757

KASAHARA, H. UDAKA, S. y IKEDA, Y. (1971) "Temperature dependency of the mutagenic action of nitrosoguanidine in Streptomyces cacaoi". Agr. Biol. Chem., 35: 226

KIMBALL, R. F. (1970). "Studies on the mutagenic action of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in Paramecium aurelia with emphasis on repair processes". Mut. Res., 9: 261

- KOLB, H. y KAUDEWITZ, F. (1970) "Action of nitrosoguanidine on transforming DNA of Bacillus subtilis". Mut. Res., 10: 85
- LAWLEY, P. D. (1968) "ADN methylation by N-methy-N-nitrosouretane and by N-methyl-N-nitroso-N'-nitroguanidine". Nature, 218: 589
- LAWLEY, P. D. y THATCHER, C. J. (1970) "Methylation of deoxyribonucleic acid in cultured mammalian cells by nitrosoguanidine" Biochem. J., 116: 593
- LEDERBERG, J. y TATUM E. L. (1946) "Novel genotypes in m-xed cultures of biochemical mutants of bacteria". Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol., 11: 113
- LEDERBERG, J. (1951) "Streptomycin resistance: a genetically recessive mutation". J. Bact., 61: 549
- LEDERBERG, E. M. y LEDERBERG, J. (1953) "Genetic studies of lisogenicity in Escherichia coli". Genetics, 38: 51
- LINGENS, F., SUSSMUTH, R., WACKER, A. y CHANDRA, P. (1967) "Wirkungen von 1-nitroso-3-nitro-1-methyl-guanidin auf die selffreie proteinsynthese in E. coli zellen und die Matrizenaktivitat der kalbsthymus-DNS". Naturwissenschaften, 54: 495

- LINGENS, F., HAERLIN, R. y SUSSMUTH, R. (1971). "Mechanism of mutagenesis by MNNG. VI. Methylation of nucleic acids by N-Trideuteriomethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (D₃MNNG) in the presence of cysteine and in cells of E. coli". FEBS Letters, 13: 241.
- LOPRIENO, N. y CLARKE, C. H. (1965). "Investigations on reversions to methionine independence induced by mutagens in Schizosaccharomyces pombe". Mut. Res., 2: 312.
- LOW, B. WOOD, T. H. (1965). "A quick and efficient method for interruption of bacterial conjugation". Genet. Res., 6: 300.
- MANDELL, J. D. y GREENBERG, J. (1960). "A new chemical mutagen for bacteria, 1-Methyl-3-Nitro-a-Nitrosoguanidine". Biochem. Biophys. Res. Commun., 3: 575.
- MASTERS, M. y BRODA, P. (1971). "Evidence for the bidirectional replication of the Escherichia coli chromosome". Nature, 232: 137.
- MC CALLA, D. R. (1965). "Chloroplast mutagenesis: Effect of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine and some other agents on Euglena". Science, 148: 497.

- MC CALLA, D. R., REUVERS, A. y KITAI, . (1968).
"Inactivation of biologically active
N-methyl-N-nitroso compounds in aque-
ous solution: Effect of various condi-
tions of pH and illumination". Can. J.
Biochem. Physiol., 46: 807.
- MC KAY, A. F. y WRIGHT, G. F. (1947). "Prepara-
tion and properties of N-methyl-N'-
nitro - N'-nitrosoguanidine". J. Am.
Chem. Soc., 69: 3028.
- MULLER, A. J. y GICHNER, T. (1964). "Mutagenic
activity of 1-Methyl-3-nitro-1-nitroso-
guanidine on Arabidopsis". Nature, 201:
1149.
- OLSON, A. O. y BAIRD, K. M. (1969). "Single-
strand breaks in E. coli DNA by treat-
ment with nitrosoguanidine". Biochem.
Biophys. Acta, 179: 513.
- ORKIN, S. H. y LITTLEFIELD, J. W. (1971). "Nitroso-
guanidine mutagenesis in synchronized
hamster cells". Exp. Cell Res., 66: 69.
- OZAKI, M., MIZUSHIMA, S. y NOMURA, M. (1969).
"Identification and functional charac-
terization of the protein controlled
by the streptomycin-resistant locus in
Escherichia coli". Nature, 222: 333.

- RANDAZZO, R., SERMONTI, G., CARERE, A. y BIGNAMI, M. (1973). "Comutation in *Streptomyces*". J. Bact., 113: 500.
- SINGER, B. y FRAENKEL-CONRAT, H. (1967). "Chemical modification of viral ribonucleic acid VI. The action of the N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine". Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 58: 234.
- SINGH, U. (1973). "Chemical mutagenesis in *Taphrina maculans*. I. Survival and mutation induction by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine". Z. Allg. Mikrobiol. Physiol. Okol. Mikroorg., 13: 161.
- SOKAL, R. R. y ROHLF, F. J. (1969). Biometry, W. H. Freeman and Co. (San Francisco), p. 607.
- STENT, G. S. y FUERST, C. R. (1955). "Inactivation of bacteriophages by decay of incorporated radioactive phosphorus". J. Gen. Physiol., 38: 441.
- SWANSON, C. P., MERZ, T. y YOUNG, W. J. (1967). Cytogenetics, Prentice-Hall, Inc. (Englewood Cliffs).

- TAKAHASHI, I. y BARNARD, R. A. (1967). "Effect of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine on the F factor of Escherichia coli". Mut. Res., 4: 111.
- TAYLOR, A. L. y TROTTER, C. D. (1972). "Linkage map of Escherichia coli K-12". Bact. Rev., 36: 504.
- TERAWAKI, A. y GREENBERG, J. (1965). "Effect of some radiomimetic agents on deoxyribonucleic acid synthesis in Escherichia coli and transformation in Bacillus subtilis". Biochem. Biophys. Acta, 95: 170.
- VELEMINSKY, J. y GICHNER, T. (1968). "The mutagenic activity of nitrosoamines in Arabidopsis thaliana". Mut. Res., 5: 429.
- YABE, Y. y MITSUHASHI, S. (1971). "Replication and transfer of the R factor in a synchronized culture of Escherichia coli". Japan. J. Microbiol., 15: 21.
- YANOFSKY, C. y LENNOX, E. S. (1959). "Linkage relationship of the genes controlling tryptophan synthesis in Escherichia coli". Virology, 8: 425.

- YANOFSKY, C., CARLTON, B. C., GUEST, J. R.,
HELINSKY, D. R. y HENNING, V. (1964).
"On the colinearity of gene structure
and protein structure". Proc. Nat. Acad.
Sci. USA, 51: 266.
- YANOFSKY, C., DRAPEAU, G. R., GUEST, J. R., y
CARLTON, B. C. (1968). "Complete se-
quence of the aminoacids of the protein
tryptophan sintetasa A (subunity α) and
its colinear relation with the genetic
map of the gen A". Proc. Nat. Acad. Sci.
USA, 57: 296.
- YOSHIDA, Y. y YUKI, S. (1968). "Action of Nitroso-
guanidine in Bacillus subtilis". Japan.
J. Gent., 43: 173.
- ZEUTHEN, J. y PATO, M. L. (1971). "Replication of
the F'lac sex factor in the cell cycle of
Escherichia coli". Mol. Gen. Genet., 111:
242.
- ZIMMERMANN, F. K., SCHWAIER, R. y VON LAER, V.
(1966). "Mitotic recombination induced
in Saccharomyces cerevisiae with nitrous
acid, diethylsulfate and carcinogenic,
alkylating nitrosamides". Z. Verebungsl.,
98: 230.
- ZINDER, N. D. y LEDERBERG, J. (1952). "Genetic ex-
change in Salmonella". J. Bact., 64: 679.