

MODIFICACION INDUCIDA CON ALCANFOR EN LEVADURAS

POR ALBERTO LOTTI *

SUMMARY

Some strains of *Saccharomyces* with a tendency of producing a high yielding of ascii containing more than four spores each (5 to 11) obtained by camphor treatments, are described.

At the same time and with the same treatment, strains in *Rhodotorula* were obtained, which in a FOWELL media show stable anomalies like an sporulation, of an uncertain nature (« pseudosporulation »).

In both cases, the anomalies are attributed to a cytoplasmic factor (plasmagen) induced by the treatment itself, though further and more complete researches are necessary.

The effects observed were kept unchangeable for more than nine months of continuous cultivation in common nutritional media, with frequent reseedings.

El interés que tiene para la genética el estudio de caracteres hereditarios en levaduras, así como la conveniencia de ampliar el campo y los objetivos de investigación, repetir experiencias aún no totalmente claras y aportar alguna contribución local a los importantes trabajos que sobre el tema se han publicado, reveló la conveniencia de realizar experiencias sobre posible inducción de mutaciones y poliploidía, en levaduras, mediante tratamientos físicos y químicos y establecer, en caso favorable, las segregaciones resultantes.

Por otra parte, la importancia económica de estos microorganismos, muy particularmente en la región de Cuyo y la probabilidad, siempre presente, de derivaciones prácticas de todo adelanto científico, justifican el empeño en iniciar algún trabajo con dicha finalidad, a pesar de la muy escasa experiencia y antecedentes locales al respecto.

* Ingeniero Agrónomo Profesor Adjuunto de Genética y Fitotecnia. Trabajo de tesis realizado en el Laboratorio de la Cátedra de Microbiología Agrícola e Industrial de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Cuyo en 1954.

Dada la amplitud del tema y las infinitas derivaciones posibles, se decidió comenzar con un simple trabajo de orientación, basado en los únicos antecedentes cuya bibliografía se dispuso entonces.

En el presente trabajo se exponen, por lo tanto, solamente los primeros resultados obtenidos mediante el tratamiento de algunas levaduras con alcanfor.

ANTECEDENTES

R. BAUCH (1), en 1941, establece el efecto del tratamiento con alcanfor en *Saccharomyces*, consistente en aumento del volumen de las células.

THAYSEN y MORRIS (2), publican en 1943, los resultados logrados con la obtención, perseguida como solución práctica de problemas económicos, de una cepa gigante de *Torulopsis utilis*. Comprueban un volumen celular medio duplicado, mayor proporción de fósforo en materia seca y velocidad de reproducción aumentada. Establecen como concentración conveniente 3 ‰ de alcanfor en el medio.

THAYSEN (3), describe obtención de formas gigantes, estables, en *Saccharomyces*, mediante tratamiento durante 24-72 horas en medio con suspensión de alcanfor al 10 %.

LEVAN y SANDWALL (4), en un detallado estudio, describen la influencia de diferentes dosis de varias sustancias, en forma comparativa, sobre *Saccharomyces*. Citan los trabajos de BAUCH (1942) quien encuentra que las sustancias c-mitosigénicas, careinogénicas y fitohomonas, producen una reacción primaria variable, pero todas, como reacción secundaria producen un aumento del tamaño celular, en algunos casos en forma estable. Este último autor considera algunas razas gigantes como poliploides.

El efecto del borneol es descripto como parecido al del alcanfor, aunque más tóxico. La colchicina y acenafteno no demuestran efecto ni toxicidad apreciable. Las demás sustancias probadas (alcanfor, borneol, ácido naftaleno acético, cloronaftaleno alfa y beta) demuestran efecto tóxico, letal en las mayores concentraciones, e impiden o reducen la división celular. El alcanfor y borneol producen un tipo anormal de brotación, característico (que también pueden producir otras sustancias). LEVAN y SANDWALL las denominan "formas de alcanfor"¹. La más alta concentración usada con alcanfor es de 0,164 % (24 y 48 horas) que impide totalmente la división celular y la supervivencia es mínima, aunque comprobada hasta los 6 días en ese medio. El punto crítico —máximo efecto de inducción de "formas de alcanfor"—, se logra en

¹ « camphor forms ».

tre 0,1014 y 0,1174 % (pues para ello debe existir división celular). Estos autores hacen el tratamiento agregando al mosto la cantidad necesaria de alcanfor disuelto en mínima cantidad de alcohol absoluto y luego una porción de suspensión de levadura en plena fermentación. Los mismos concluyen que no hay razón para comparar la acción del alcanfor con las sustancias c-mitosigénicas y no encuentran, en su material, indicios de poliploidía. Según opinión de los nombrados, es importante como fracción activa, la de sobresaturación (saturación en mosto : 0,0850 % alcanfor), pues las células asimilarian alguna cantidad y las sobrevivientes encontrarían cada vez menor concentración (aparte de la posible volatilización de alguna fracción) lo cual explicaría la supervivencia de algunas células después de mucha tiempo, en soluciones altamente letales. Las formas aberrantes no son estables: no son viables en general y cuando se multiplican, generan células normales en medio favorable.

SKOVSTED (5) (1948), basado en estos y otros antecedentes, trata de investigar la inducción de mutaciones en *Saccharomyces* por el alcanfor y su relación con y las formas aberrantes que aparecen. Investiga la aparición de colonias de aspecto mutante, originadas en células de aspecto onormal y en "formas de alcanfor" aisladas de material tratado (0,2 a 0,4 % alcanfor durante 24 horas a 25° C). Concluye que hay aumento de mutabilidad en material tratado y que hay cierta relación entre formas aberrantes y aparición de mutaciones; aunque el tipo aberrante es modificación inestable. Contrariamente a lo esperado, encuentra mayor aparición de mutaciones inducidas en cepa diploide que en haploide; lo cual, concordando con LEVAN, atribuye a irregularidades citológicas provocadas por el tratamiento.

Otra cita de interés, cuyo original no fue consultado, es un trabajo de SUBRAMANIAN (1945) (6), quien encuentra 4 cromosomas en levaduras tratadas con alcanfor y 2 en las no tratadas (estas conclusiones fueron rebatidas por WINCE).

MATERIAL Y METODOS

Persiguiendo la posible comprobación de poliploidía y la más segura detección de mutaciones, se contempló la conveniencia de utilizar híbridos de constitución conocida, al menos para algún gen, que permitiera comprobar la alteración de las segregaciones esperadas; y algunas cepas homocigotas, originadas en aislamientos monospóricos autodiploidizados.

Cepas utilizadas

Nº 1. *Saccharomyces carlsbergensis* nº 19 (nº 62 de Universidad Nacional de Tucumán).

Nº 2. *Saccharomyces cerevisiae* nº 20 (*S. «annulatus»*, Universidad Nacional de Tucumán).

Nº 3. Híbrido B, de *Saccharomyces carlsbergensis*, cepa 19 \times *S. cerevisiae*, cepa 20 «*annulatus*».

Nº 3a. Aislamiento unicelular de nº 3.

Nº 4. *Rhodotorula (glutinis?)* aislada de infección por el aire en el laboratorio (Mendoza).

Nº 5. Híbrido nº 1 de *Saccharomyces chevalieri* (nº 37 \times *S. cerevisiae* (cepa 20)).

Nº 6. Aislamiento monospórico, a-1, de *Saccharomyces chevalieri* 37 (autodiploidizado).

Nº 7. Híbrido nº 4 de *Saccharomices chevalieri* nº 37 \times *S. cerevisiae* (cepa 20).

Nº 8. Híbrido nº 1 de *Saccaromyces globosus* (Ministerio de Agricultura de la Nación) \times *S. cerevisiae* (cepa 20).

Las cepas de *Saccharomyces* pertenecen a la colección del Instituto mencionado. Los híbridos (nºs 3, 5, 7, 8) y aislamientos monospóricos (nºs 6, 5-05-a; 7-01-a) fueron obtenidos por el Profesor NORBERTO PALLERONI; los primeros por apareamiento de esporas individuales y observación de cigota resultante. La cepa de *Rhodotorula* (nº 4) fue aislada de una infección en un cultivo en placa de otras levaduras. Por sus características probablemente se trata de *R. glutinis*, aunque serían necesarias más prolijas determinaciones para su ubicación específica. El alcañor utilizado es el común, que se expende en tabletas en el comercio.

Los aislamientos unicelulares y de esporas se han realizado mediante un micromanipulador "ZEISS" a cremalleras¹.

Salvo excepciones mencionadas, se usó para provocar la esporulación, el medio de FOWELL (7), consistente en agar (1,5 %) con acetato de sodio al 0,3-0,5 %.

Tratamientos primera serie

Como primera prueba, se tratan siembras de levaduras (híbrido nº 3) en cajas de PETRI, colocando éstas sobre un trozo de alcanfor, varios segundos. Entre 6 y 15 segundos de permanencia se nota que las colonias resultantes presentan con frecuencia células gigantes y brotación anormal semejante a "formas de alcanfor" de LEVAN). Las diferencias no son estables, cultivando posteriormente en medio normal. Efectos semejantes, aunque más intensos y considerable retardo en el posterior desarrollo en mosto (25-28° C) se aprecia en tratamientos de 15 segundos a 20 minutos de duración. Se comprueba que después de permanecer las siembras en placa, durante varias horas sobre un trozo de alcan-

¹ El micromanipulador ha sido facilitado gentilmente, para los trabajos del Instituto por el Ministerio de Salud Pública Nacional.

for (recibiendo en ambiente cerrado de la caja de PETRI el alcanfor volatilizado a temperatura ambiente) hay supervivencia abundante, constatada al repicar las colonias en mosto de malta.

Un tratamiento de 22 horas, en la forma indicada, demostró supervivencia, aunque la iniciación del desarrollo de las colonias se vio muy retardado con respecto al testigo y el tamaño de las mismas muy reducido. Un cultivo posterior de este tratamiento fue sembrado en agar mosto de malta con suspensión grosera y abundante de trocitos de alcanfor incluidos en el medio; se tapó con tapón de goma y a los 73 días se observaron algunas colonias de levaduras. Las células, al microscopio, presentaban aspecto anormal, con brotación miceliar muy ramificada. Se repicó a medio normal de agar: a las 95 horas de incubación se había desarrollado una sola colonia, cuyas células, se presentaban heterogéneas, con levaduras normales y muchas gigantes, con brotación miceliar compleja. Al día siguiente, es decir, 74 días de medio alcanforado, se replica el mismo tratamiento a medio líquido (agua de levadura glucosada) y después de 72 horas de incubación se observa abundante desarrollo y fermentación. Las células presentan apariencia normal.

El cultivo originado de la colonia obtenida de este tratamiento de 73 días, lo denominaremos tratamiento (o cepa) "A". Después de 44 días de cultivo, en medio de agar-agua de levadura glucosada, se siembra en medio de esporulación (FOWELL). A las 48 horas (a 25-28° C) se observa buena esporulación normal y cierta frecuencia de ascos de 6 y 7 esporas y algunos de 8 ó 9. Generalmente estos ascos de esporas múltiples tienen un brote bastante desarrollado (fig. 1).

En nuevas siembras posteriores de "A" en medio de esporulación, se comprueba nuevamente alta proporción de ascos con esporas múltiples (5 a 8) en un fila, dos filas, en corona o agrupadas en más de un plano (fig. 1). También se observa mucho pseudomicelio. En el testigo (híbrido 3 sin tratamiento) sembrado simultáneamente en medio de esporulación, se observan células más homogéneas, no hay pseudomicelio y la esporulación es mucho más escasa, siendo generalmente de dos y tres esporas. No se ven ascos de más de 4 esporas.

De los medios de esporulación de "A" se hicieron algunas siembras en película de agar-agua de levadura en el cubreobjetos, para incubar en cámara húmeda sobre porta excavado. Se observaron así algunos ascos de 6-7-8 esporas, durante la germinación, comprobándose desarrollo de la mayoría de las esporas de los mismos, aproximadamente a las 3-4 horas de incubación y formación de cigotas numerosas¹.

¹ En realidad este tiempo se calcula sumando las horas de incubación al ambiente (aproximadamente 24-28°C), pues se sometió intermitentemente a varios períodos adicionales en heladera, a pocos grados sobre cero, con interrupción completa de desarrollo, por necesidades prácticas de la observación.

Tratamientos segunda serie

El alcanfor se disuelve en alcohol 96° y se filtra, separando 3 ‰ de impurezas insolubles. Se preparan tubos de ensayo con agua destilada y 3 % de agar-mosto de malta; se esterilizan y se agrega, agitando, la solución alcohólica de alcanfor. La concentración resultante es aproximadamente de 3 ‰ de alcanfor y 3,5 % de alcohol. A los tubos testigos se agrega sólo el alcohol necesario.

En tubo I: se siembra suspensión del híbrido 3ª.

En tubo II: suspensión de *Rhodotorula* (nº 4).

En tubo testigo: suspensión de la misma cepa del I.

A las 48 horas, se siembran en medio normal de mosto; a las 24 horas de incubación aparece abundante desarrollo y fermentación sólo en el testigo; a las 41 horas hay desarrollo en I y a las 39 horas en II (en adelante denominado "C"). A las 194 horas una prueba de ésta no demostró supervivencia.

En 5 tubos del medio alcanforado citado, se siembra suspensión de cultivo del híbrido 3a: a las 122 horas se siembra en tubos de medio líquido y en placas. A las 24 horas de la siembra se aprecia algún leve desarrollo y unas horas después el comienzo de la fermentación en medio líquido. A las 48 horas el desarrollo y fermentación son abundantes en todos.

Observando al microscopio se ven células heterogéneas en tamaño, algunas gigantes, otras muy alargadas, con grandes vacuolas, puntuaciones, etc. En medio líquido se presentan las células de aspecto más normal.

De los mismos tratamientos, después de 24 horas, es decir a las 146 horas, se replica a medio sólido, obteniéndose desarrollo en todos (en adelante denominado "B").

De uno de éstos ("B"), se replica a medio FOWELL así como el testigo (3a): a las 48 horas se observa en el testigo poca esporulación, especialmente con ascos de 3 esporas y algo de 4 y 2; en "B", mucha esporulación de 4-3-2 esporas, frecuentemente en una hilera y en muchos casos ascos de 5-6-8 esporas, semejantes a los antes descritos ("A").

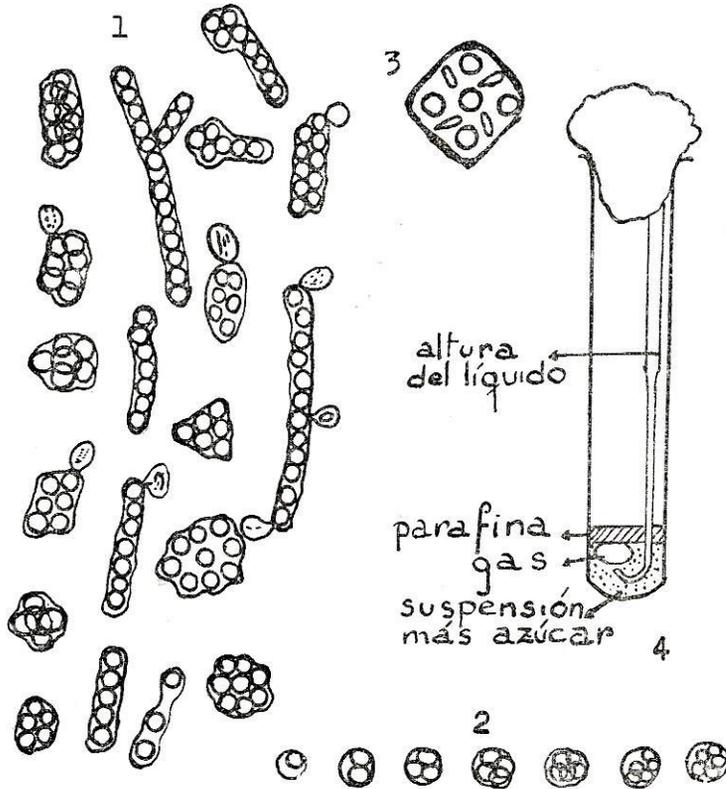
Del tratamiento de *Rhodotorula* (48 horas) antes mencionado ("C") se siembra en FOWELL y a las 48 horas se observa: segmentaciones citoplásmicas esféricas, de una a seis por célula; refringentes, semejante a una esporulación (fig. 2).

En el mismo medio alcanforado, se repite la siembra de *Rhodotorula* nº 4: a las 96 horas y a las 146 horas se siembra en cajas de PETRI, dando ambos tratamientos, a las 48 horas, desarrollo de numerosas pequeñas colonias. De una colonia de este tratamiento, de 96 horas, se obtiene el cultivo "D". El tratamiento de 146 horas se pierde por infección.

Se comprueba en varias oportunidades la facilidad con que se producen infecciones bacterianas en los cultivos en medio alcanforado o alcohólico alcanforado, contrariamente a los medios normales, en las mismas condiciones: puede interpretarse como con-

diciones de selectividad de los medios para uno u otro tipo de organismo.

El tratamiento "D" en FOWELL da el mismo tipo de segmentación citoplasmática que se observó en "C", es decir 1 a 6 y a veces más esferas refringentes, predominando 3 (fig. 2, foto 4). El testigo (*Rhodotorula* n° 4), en FOWELL, presenta en general una



1, Formas observadas de los ascos polisporicos de cepa A en medio de Fowell ;
 2, psudoesporulación en cepa D (*Rhodotorula*) en medio Fowell ; 3, ascos de cinco esporas maduras y cuatro rudimentarias de cepa Ap 23-3a, en medio Fowell ; 4, tubo preparado para prueba de fermentación.

sola esfera refringente, aunque en algunas células puede haber 2 y hasta 3 ; pero con muy poca frecuencia más de 2 y no se observan con más de 3 (foto 5).

Después de 60 días de cultivo, se repiten las observaciones descritas y en varias oportunidades, hasta los 9 meses posteriores, en las cepas "A", "B" de *Saccharomyces* y "C", "D" de *Rhodotorula* y sus respectivos testigos (3 a y 4) sin haber variado apreciablemente los resultados ; aunque en "B" se observa con el tiem-

po una reducción apreciable de la capacidad de esporulación, lo cual no es infrecuente en levaduras⁽⁸⁾.

Se comprueba en todas las observaciones y otras complementarias, que la esporulación, especialmente su proporción y velocidad, es un fenómeno muy variable y sensible a los pequeños cambios del medio. Para el desenvolvimiento ideal de estos trabajos sería necesario tener perfectamente estudiadas las condiciones óptimas de esporulación de capa cepa y usar medios y ambiente completamente fijos y conocidos. Estos requisitos es muy difícil lograrlos y requerirían largas y completas investigaciones previas.

En muchos casos la esporulación fue escasa y lenta, debido a que el medio de FOWELL se hallaba muy seco; se agregó agua estéril, mejorando rápidamente los resultados.

La misma gran variabilidad de la esporulación y su dependencia de las condiciones ambientales, incidí directamente en la aparición y proporción de ascos "polispóricos", así como en el número de esporas de cada uno, por lo cual se ha considerado de poco valor el cálculo estadístico de este fenómeno.

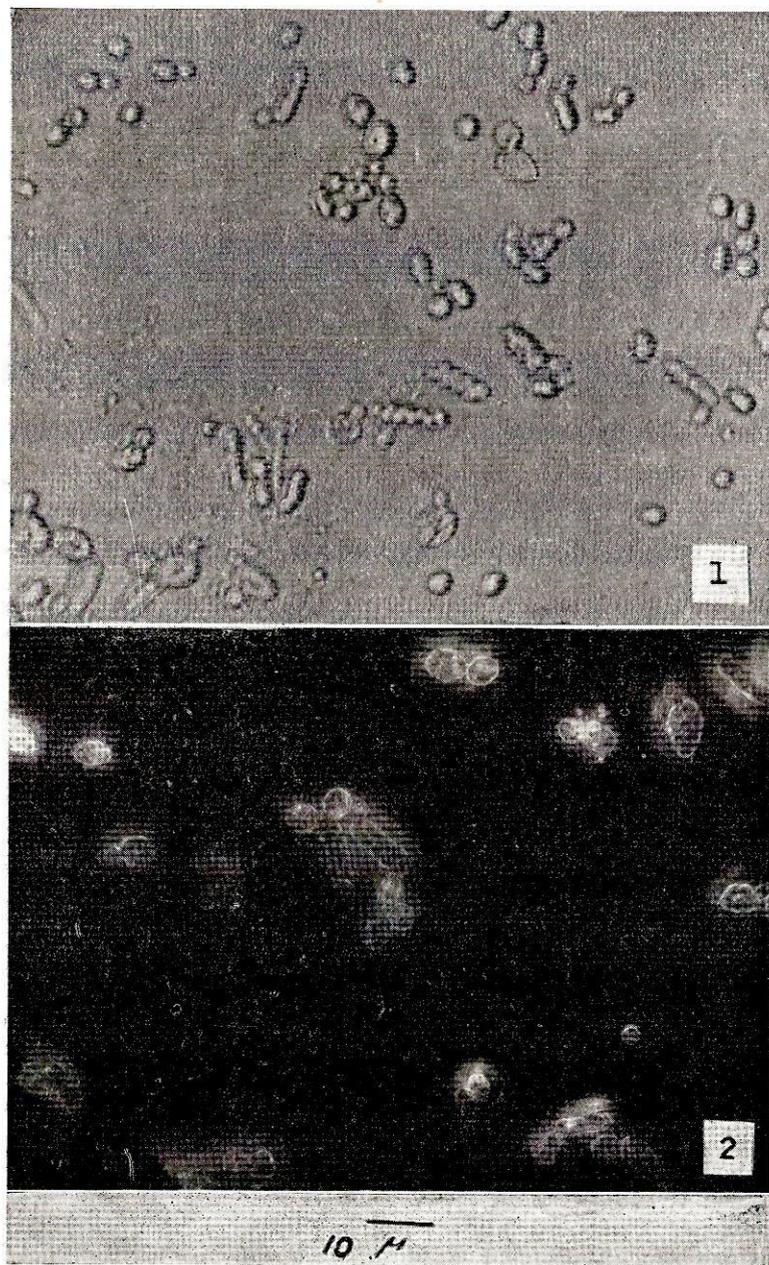
Se comprueba netamente, más fácil y abundante esporulación y más proporción de 4 esporas en cepas tratadas "A" y "B" que en sus testigos 3 y 3a.

De un cultivo en medio FOWELL de 4 meses, del tratamiento "A", se aísla un asco de 7 esporas más 2 brotes y otro de 7 esporas más un brote mediante micromanipulador y se cultivan en gota de medio nutritivo, en cámara húmeda. A las pocas horas de incubación se obtiene desarrollo de ambos y a las 48 horas las colonias resultantes se repican a medio líquido, constituyendo los cultivos "A-p-22", "A-p-23". Se comprueba así la conveniencia del medio de FOWELL para conservar material a utilizar su primera generación sexual; pues no hay, al menos después de un tiempo, sino mínimo desarrollo vegetativo y las esporas no germinan; evitándose la producción de generaciones intermedias, como ocurre, por lo contrario, con los medios nutritivos comunes.

Ambos cultivos, en FOWELL, dan ascos "polispóricos" igual que en "A" y en proporción no muy distinta.

De "A-p-23" se aíslan 2 ascos de más de 5 esporas (cuando están ubicadas las esporas en varios planos es difícil contarlas) y se incuban en gotas de medio nutritivo en cámara húmeda: ambos dan desarrollo fácilmente (A-p-23-1 y A-p-23-2).

Otro asco de 5 esporas y 1 brote, del mismo cultivo (A-p-23) se aísla y rompe con el micromanipulador: 4 de las esporas se logran aislar y colocar en gotas separadas; 3 de las mismas dan desarrollo: la espora 1, aproximadamente a las 24 horas, presentaba dos cigotas gemelas y algunas células derivadas; la espora 3 desarrollo semejante; la 5 poco desarrollo que se detiene. Sólo la espora 3 se puede repicar con éxito, dando el cultivo "A-p-23-3a". Con este aislamiento monospórico, sembrado en FOWELL, se observa también el mismo aspecto, con aparición de ascos de 5 y 6 esporas.



Fotomicrografía de una preparación de la cepa A Ol-d : 1, en medio de Fowell, fijada ligeramente al calor, sin colorear; 2, la misma cepa tomada en campo oscuro. La escala es válida para las dos fotomicrografías.

Se observó un ascó de 5 esporas maduras y 4 semiformadas alternadas, como se ve en la figura 3.

Se hacen también varios aislamientos, por el método de colonias individuales, en placas, de las cepas "A"-3a-"B"-4-"C"-4-"D", originándose las cepas siguientes:

	A-01		B-01		C-01		3a-01
	A-02		B-02	de « C »	C-02	de 3a	3a-02
	A-03	de « B »	B-03		C-03		3a-03 x
de « A »	A-04	}	B-04	de « D »	D-01	de 4	4-01
	A-05		B-05 x		D-02		
	A-06						
	A-07 x						
	A-08 x						

x = Colonias muy pequeñas (el resto normales).

Después de sembrados los aislamientos en medio líquido (agua de levadura glucosada) por 48 horas y luego en FOWELL se observa, a los cuatro días y más, en este medio, los siguientes resultados:

A-01	}	Producen ascos polisporicos como « A »
A-02		
A-03		
A-04		
A-06		
A-08		Aspecto anormal, células gigantes y casi nula esporulación; en GORODKOWA produce pseudomicelios.
3a-01	}	Esporulación normal como 3a
3a-03		
3a-02		
B-01	}	muy poca esporulación de 1-2 y rara de 4 esporas.
B-02		
B-04		
		células grandes : no esporula.

Algunos de los aislamientos y testigos se sembraron también en medio de esporulación de GORODKOWA, con resultados deficientes; pues sólo se obtuvo muy poca esporulación, especialmente de 2 y 3 esporas, al cabo de semanas, apreciándose mucho desarrollo vegetativo.

Con nuevas pruebas en FOWELL, se constató que los resultados de sembrar 48 horas en medio líquido para preesporulación, no son satisfactorios. En cambio, el mejor resultado en rapidez e intensidad de esporulación se obtuvo sembrando por 24 horas en medio nutritivo agar-estría y de a FOWELL por 24-48 horas.

Resultados aún mejores se obtuvieron, especialmente en algunas cepas, utilizando, en la misma forma, una mezcla de $\frac{1}{2}$ FOWELL más $\frac{1}{2}$ agar-agua de levadura (sin glucosa), como medio de es-

porulación. Resultado aceptable, aunque no superior al FOWELL, se obtuvo sembrando, después de preesporulación, en estría agar-agua de levadura (sin glucosa).

De la cepa A-01 se eligió un asco normal, tetraspórico, del que aislaron, por disección, las 4 esporas, cultivándose en gotas separadas, en cámara húmeda. A las 14 horas de incubación desarrollan 3 y a las 21 horas la cuarta, observándose en ésta, presencia de 2 cigotas gemelas. Con éste y otros casos, pudimos establecer que, al menos en estas cepas y probablemente en todas las de igual origen, se diploidizan inmediatamente los cultivos monospóricos. Se obtuvieron así los cuatro cultivos monospóricos diploidizados, de 1 asco normal: A-01-a; A-01-b; A-01-c; A-01-d. Los cuatro se siembran en FOWELL, dando muy buena esporulación de 2-10 y en raros casos 11 esporas por asco (fotos N^{os}. 1, 2 y 3), agrupadas en 1 ó 2 filas o en más de un plano, mostrando todos los aspectos de la fig. 1.

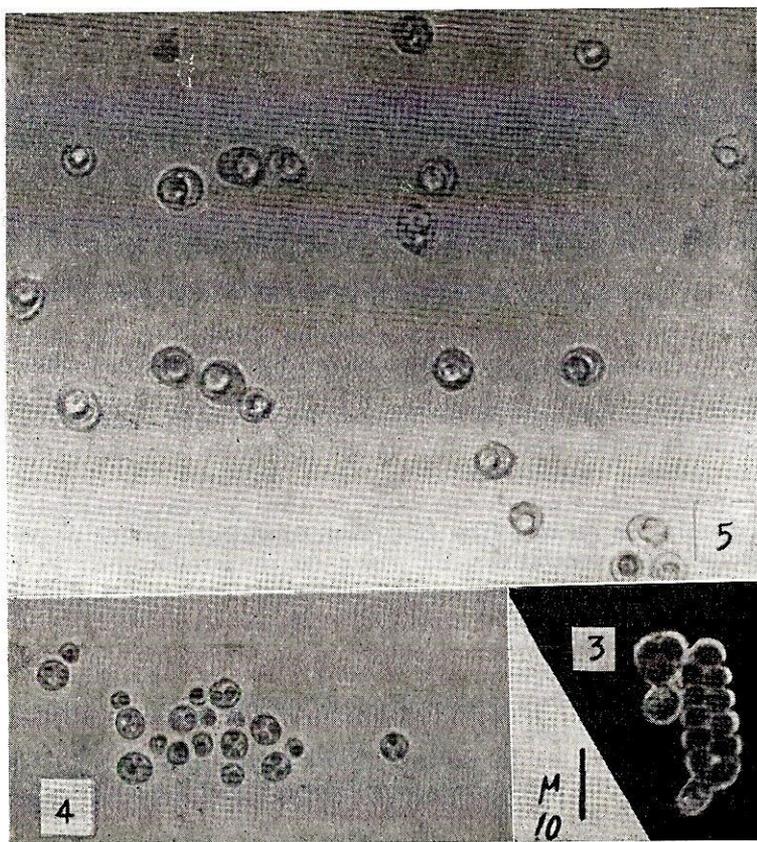
Entre las cuatro líneas hay pequeñas diferencias tanto en su aspecto vegetativo (medio nutritivo normal) como en medio de esporulación; pero no hay diferencias marcadas en cuanto a la esporulación. "c" parece dar menos esporulación múltiple y en general de 5 y 6 esporas. "b" da más ascos de 5 esporas que las otras, aunque también todos los tipos, inclusive de 10 esporas. "d" quizás más esporulación que los otros y más pseudomicelios y esporulación en una fila. Las diferencias parecen ser pequeñas características vegetativas, de vigor de desarrollo, etc., lo cual no es raro en aislamientos, aún de material puro. Estos cultivos monospóricos demuestran que, por lo menos la célula utilizada y sus cuatro esporas llevan el factor que produce facilidad de generar, quizás debido a características propias de cada célula o del ambiente circundante, esporas supernumerarias.

Para aclarar mejor este punto, sería necesario conocer los factores que inciden en la producción de 2-3-4 esporas en los ascos y la inducción de la esporulación misma. En el desarrollo de éste trabajo se ha observado la diferente capacidad de cada medio para inducir mayor proporción de 2, de 3, o de 4 esporas, en una misma cepa y aún con pequeñas variaciones de humedad, oxigenación, temperatura (?), permanencia en el medio, tipo de cultivo de preesporulación, etc.

Volviendo a las cepas de *Rhodotorula*: en observaciones de las cepas tratadas "C" y "D", que han permanecido cierto tiempo en FOWELL, se observa, además de la ya mencionada "seudoesporulación", muchos casos de autólisis con rotura de la pared celular y también largos tubos de brotación, que unen a veces dos o más células.

En muchos casos se agregó, entre porta y cubre, a éstas suspensiones obtenidas del FOWELL, algunas gotas de medio nutritivo y a las 24-48 horas se observó gran cantidad de estas brotaciones alargadas a veces muy granuladas, juntamente con células auto-

lisadas. Posteriormente aparecen gran cantidad de células chicas, normales, uniformes, elípticas. No se ha observado ningún caso claro de germinación de "pseudoesporas" ni fenómenos sexuales, pudiendo tratarse de reacciones de granulación y brotación anor-



Fotomicrografías : 2, asco del 11 esporas en detalle ampliado de la preparación de la fotomicrografía 1 ; 4, cepa D, sin fijar, en medio de Fowell ; 5, cepa 4 en medio de Fowell, sin fijar (*Rhodotorula* testigo).

(La escala sólo es válida para la fotomicrografía 3)

mal, en medio desfavorable, especialmente anaerobio (los preparados se bordearon con parafina). En el testigo (Nº 4) no se observaron estos fenómenos, aunque con el tiempo pueden aparecer células muertas y autolisadas.

En cultivos en medios nutritivos comunes, no se aprecian diferencias, a la simple observación microscópica, entre cepas "C" y "D" (tratadas) y 4 (testigo). En GORODKOWA (48 horas), no

presentan, tampoco, diferencias entre sí, ni granulaciones u otras anomalías.

En algunos aislamientos de células de FOWELL de "C" y "D", que presentaban clara presencia de esferas refringentes (3 a 6) cultivados en cámaras húmedas con medio nutritivo, se verificó disolución o unión de las mismas, quedando una masa difusa, con aspecto de haber muerto la célula. En un caso en que se aislaron tres células de "C" (de FOWELL) con el mismo aspecto de "seudoesporulación", una de ellas con prolongación pseudomiceliar granulada, las tres células dieron abundante desarrollo formando colonias.

Se efectuó también una siembra de FOWELL de "4"; "C"; "D" en mosto líquido y en agar de mosto. A las 8 horas de incubación se observa en el microscopio: en "4" se ven células normales y algunas con vacuola central marcada, más grandes. En "C" y "D" células normales más cierta proporción de células grandes, granuladas, con pseudoesporulación y muchas de éstas con prolongación pseudomiceliar granulada.

Posteriores intentos de aislar y cultivar "seudoesporas" no tuvieron éxito. Serían necesarias más prolijas investigaciones para poder opinar sobre estos fenómenos.

Tratamientos tercera serie

a) Se disuelve alcanfor en alcohol 96° y se agrega, agitando 0.4 cc de solución a cada tubo con agar-agua de levadura (sin glucosa) previamente fundido: la concentración resultante es aproximadamente de 5 ‰ de alcanfor y 4 ‰ de alcohol. El medio queda sólido, para estría. Se tapan con tapón de goma ajustado.

b) La misma solución alcohólica de alcanfor (62 cc) se agrega en agua estéril (15 cc) más agar de agua de levadura (3 cc) más mosto de malta (20 cc). Esta suspensión es agregada al 10 ‰ en tubos con mosto de malta, agitando. La concentración resultante, en medio líquido, es aproximadamente de 5,8 ‰ de alcanfor y 4,5 ‰ de alcohol.

Las cepas sembradas fueron las siguientes:

en a)	1.....	<i>S. carlsbergensis</i>
	2.....	<i>S. cerevisiae</i>
	A-01-b ..	Aislamiento monospórico del híbrido tratado
	A-01....	» de híbrido tratado
	D-01....	» de <i>Rhodotorula</i> tratada
en b)	1.....	<i>S. carlsbergensis</i>
	2.....	<i>S. cerevisiae</i>
	A-01-b ..	Aislamiento monospórico del híbrido tratado
	3.....	Híbrido original sin tratar
	D-01....	Aislamiento de <i>Rhodotorula</i> tratada
	4-01	Aislamiento de <i>Rhodotorula</i> sin tratar

c) Dos tubos de agar-agua de levadura más 5 cc suspensión de alcanfor, equivalente a 2,5 % de alcanfor en el medio, fueron sembrados con "A-01-d" y "3".

d) En un tubo con medio FOWELL, se agregó 3 cc de suspensión de alcanfor, equivalente a 1,5 % de alcanfor en el medio, se sembró cepa "3".

e) En la suspensión original de alcanfor (6,5 %) fue sembrada la cepa "3" y "A-01-c".

Resultados:

En a) y b), a las 95 horas de tratamiento (25° C) se siembran en mosto de malta; a las 24 horas hay desarrollo en todos excepto 4-01 y "D-01". En A-01-b, se observa intensa precipitación y al microscopio largas cadenas de pseudomicelios. A las 72 horas de incubación hay desarrollo en D-01 con aspecto aglomerado, glutinoso. Sembrados en FOWELL, solo en el híbrido "3" (tratamiento b) aparecen algunos ascos de 8 y 9 esporas; los demás no acusan diferencias apreciables. D-01 también se replica después de seis días de tratamiento (a mosto de malta) y todos, nuevamente, a los 28 días de tratamiento en alcanfor (tratamientos a' y b').

A las sesenta y cinco horas de incubación de estos últimos (a' y b') hay desarrollo y fermentación en: A-01-b; A-01; 1; 2 de tratamientos a' y en 3; 2 de tratamiento b'. No se obtiene desarrollo en D-01; 1; A-01-b de tratamiento b'. Después de sembrados en FOWELL se aprecia en 3 (b') buena esporulación de 2-3-4 además de 5 y algo de 6 y 7 esporas. En los demás no hay diferencias con sus testigos. En preesporulación (agar-agua levadura glucosada) "3" da formas gigantes y brotaciones anormales ("formas de alcanfor") que no se ven en el testigo.

Los tratamientos c), d) y e) no dan supervivencia.

Tratamiento cuarta serie

En el mismo medio alcanforado de tercera serie b) (5,8 ‰ alcanfor) se siembran las siguientes levaduras: 2; 5; 6; 8; 5-05-a (aislamiento monospóricico de 5); 7-01-a (aislamiento monospóricico de 7).

A las 196 horas de tratamiento (25 °C) se replica a mosto: a las 45 horas de incubación se aprecia desarrollo en 6 y en 5; a las 289 horas de tratamiento se replica nuevamente la cepa 2, la que después de 72 horas da desarrollo. Las demás no desarrollan. Sembradas en FOWELL:

5	da buena esporulación de	2-3-4	esporas
6	»	»	2-3-4 »
2	»	»	2-3-4 y algo menos de 5 esporas

Los ascos de "2" (tratamientos cuarta serie y tercera de 28 días) dan la esporulación en ascos grandes, con espacio más que suficiente para las 4 esporas, de forma esférica. El testigo "2" (sin tratar) da esporas semejantes, pero ajustadas en el asco, tomando éste la forma característica tetralobulada. Las cepas "5" y "6" dan también esporulación (de 2 y 3 esporas) a las 48 horas en medio de preesporulación (agar-agua levadura glucosada).

Pruebas de fermentación

Siendo el híbrido primeramente tratado, de *S. carlsbergensis* × *S. cerevisiae* y sus padres probados en cuanto a sus características específicas de fermentación (el primero fermenta melibiosa; el segundo no) era de esperar que aquél fuera fermentador de melibiosa (Me me) y segregaran sus esporas 2:2⁹. Además, en caso de poliploidía, era de esperar alteración de éstas proporciones.

Se hicieron pruebas de fermentación, en unos casos, con el método DURHAM y en otros, mediante un sencillo procedimiento ideado al efecto, por carecer en el momento necesario de los tubitos para el primero. Resultó, este segundo método, más sensible aún que el de DURHAM, aunque no lo supera en sencillez. Se tomaron tubos de ensayo comunes y se introdujo en los mismos un tubito de vidrio, con la punta estirada y doblada en el extremo inferior. La porción estirada abarca aproximadamente la mitad del largo y llega la parte superior, hasta el tapón de algodón. Esterilizados al autoclave, se agregó a cada tubo 1 cc de solución de melibiosa al 2 %, esterilizada por filtración y se agregó cierta cantidad de masa del cultivo de levadura a probar (cultivado en estria de agar-agua de levadura glucosada, 48 horas) con ansa común. Se echó dentro del tubo, por fuera del tubito interno, una pequeña, porción de parafina fundida (esterilizada) mediante un cucharoncito metálico, de manera que al flotar sobre la suspensión, formara un tapón de unos 4 mm de espesor. Se tapa con tapón de algodón de manera que éste sujete el extremo superior del tubito, para evitar movimientos. La parafina solidifica rápidamente y la suspensión queda bien cerrada, comunicada con la atmósfera sólo por el tubito interno (fig. 4). La única precaución necesaria es evitar que entre la parafina por el tubito, para lo cual es más seguro hacerlo a éste con el extremo doblado. Se marca, una vez igualadas las temperaturas, las alturas del líquido en los tubos internos, mediante un trazo en el externo. Se procedió con tubos testigos (uno con levadura, sin azúcar; otro con azúcar, sin levadura o con cepa no fermentadora). Se usó azúcar al 1 ó 2 % según los casos. Con galactosa (al 2 %) a las veinte horas (28° C) comienza a apreciarse la fermentación, siendo abundante entre 24 y 48 horas: se acumula el gas debajo del tapón de parafina y el líquido sube por la pipeta, hasta volcarse, muchas veces. Con melibiosa, a las 24 horas habían volcado ya las pipetas en los fermentadores, variando la altura de testigos y no fermentadores, menos de 1 centímetro (altura del lí-

quido en parte capilar del tubito). Las comparaciones con pruebas en tubos DURHAM y con levaduras conocidas, demostró la bondad de los resultados.

En tubos DURHAM, con melibiosa, a las 24 horas los resultados eran claros.

Resultados de fermentación

A-01-a.....	no fermenta melibiosa	sí fermenta galactosa
A-01-b.....	»	»
A-01-c.....	»	»
A-01-d.....	»	»
A-01.....	»	—
A-02.....	»	—
A-03.....	»	—
A-06.....	»	—
A.....	»	—
B-01.....	»	—
B.....	sí fermenta melibiosa		
3a-01.....	»		
3a-02.....	»		
3.....	»		
3 trat. I, 28 d.	»		
3 trat. IIb.....	»		
1.....	»	sí fermenta galactosa
1 trat. II, 28 d.	»	—
1 trat. IIa.....	»	—
2.....	no fermenta melibiosa		

Es de lamentar que el tratamiento A, y por ende, todos los aislamientos derivados, contrariamente a lo esperado, no son fermentadores de melibiosa. Este inconveniente puede explicarse si, antes de la formación de la colonia original, se hubieran producido una o más generaciones sexuales, caso no improbable debido al tiempo transcurrido desde el cruzamiento hasta entonces. Lo mismo puede haber ocurrido con el aislamiento B-01. Los demás casos probados responden a lo esperado, por lo cual no pueden sacarse conclusiones de estas verificaciones.

En este punto del trabajo, se imponía investigar la forma de herencia del factor inductor de esporas múltiples, que según los resultados expuestos, parecería tratarse de un plasmagen (factor citoplásmico estable y autoreproducible).

Se hicieron 11 apareamientos, en 4 oportunidades, de esporas aisladas de la cepa A-01 y sus cultivos monospóricos derivados, con esporas del híbrido original ("3") y de uno de los padres ("2"). Los cruzamientos no dieron resultado, unas veces por falta de germinación de unas u otras; otras veces por germinación indepen-

CUADRO RESUMEN DE TRATAMIENTOS EFECTUADOS

Trat. serie	Cepa usada	Denominación	Tiempo trat.	Medio alcanfor	Resultados	2º tiempo tratam.	3º tiempo tratam.	Resultados
I...	3	A	73 días	susp. abund., medio sólido	muchos ascos polispor.	—	—	—
II...	3a	B	146 hs.	3 ‰ med. liq. (3,5 alcohol)	muchos ascos polispor.	—	—	—
II...	4	C	48 »	»	pseudosporulación	—	—	—
II...	4	D	96 »	»	»	—	—	—
IIIa.	1	—	95 »	5 ‰ alc. med. sól., 4 ‰ alcohol	no hay efecto estable	28 días	—	no hay efecto estable
IIIa.	2	—	95 »	»	»	28 »	—	—
IIIa.	A-01-b	—	95 »	»	»	28 »	50 días	superv. polispor. intensa
IIIa.	A-01	—	95 »	»	»	28 »	—	no hay efecto estable
IIIa.	D-01	—	95 »	»	»	28 »	—	»
IIIb.	1	—	95 »	5,8 ‰ alc. med. liq., 4,5 ‰ alcohol	»	28 »	—	no hay supervivencia
IIIb.	2	—	95 »	»	»	28 »	—	no hay efecto estable
IIIb.	A-01-b	—	95 »	»	»	28 »	—	no hay supervivencia
IIIb.	3	—	95 »	»	hay ascos polisporicos	28 »	—	hay más ascos polispor.
IIIb.	D-01	—	95 »	»	no hay efecto estable	6 »	28 días	no hay supervivencia
IIIb.	4-01	—	95 »	»	no hay supervivencia	—	—	—
III c.	A-01-d	—	72 »	2,5 ‰ alcanfor	»	—	—	—
III c.	3	—	72 »	»	»	—	—	—
III d.	3	—	72 »	1,5 ‰ alcanfor en Fowell	»	—	—	—
III e.	3	—	96 »	6,5 ‰ alcanfor medio líquido	»	—	—	—
III e.	A-01-e	—	96 »	»	»	—	—	—
IV ..	2	—	289 »	5,8 ‰ alc. med. liq., 4,5 ‰ alcohol	hay algo de polisporia	—	—	—
IV ..	5	—	196 »	»	no hay efecto estable	—	—	—
IV ..	6	—	196 »	»	»	—	—	—
IV ..	8	—	196 »	»	no hay supervivencia	—	—	—
IV ..	5-05-a	—	196 »	»	»	—	—	—
IV ..	7-01-a	—	196 »	»	»	—	—	—

diente, sin hibridación comprobada. Serán necesarios nuevos intentos en este sentido.

Recuento de esporulación

Aunque, como se expresó más arriba, el fenómeno de la esporulación es muy variable, y los datos estadísticos en este caso, tienen poco valor, se dan como información ilustrativa los valores obtenidos del recuento en cinco campos de observación (440 X) en una preparación representativa de la cepa A-01-b en FOWELL.

	Células	%	%
Células vegetativas, dudosas, muertas, etc....	377	66,40	66,40
» con 1 espóra	1	0,17	} 25,37
» » 2 »	23	4,05	
» » 3 »	73	12,87	
» » 4 »	47	8,28	
» » 5 »	13	2,29	} 8,09
» » 6 »	15	2,64	
» » 7 »	15	2,64	
» » 8 »	2	0,35	
» » 9 »	1	0,17	
Total.....	566	99,86	

DISCUSION DE LOS RESULTADOS

Ascos en *Saccharomyces* con más de 4 esporas se han citado como ocasionales, en algunas oportunidades. WINGE y ROBERTS (10), en trabajos sobre segregación anormal en ascos tetraspóricos de dos híbridos, encuentran algunos de 5 y uno de 6 esporas. Estos casos aparecen justamente en material que producía segregaciones anormales, que los autores atribuyen a la frecuente producción de extra mitosis, con pérdida de núcleos. En un trabajo posterior, los mismos autores (11) demuestran las suposiciones anteriores sobre el mismo y otros materiales.

FOWELL (12) cita haber observado también algunos casos de ascos con 5 ó 6 esporas en una levadura de cervecería.

LINDEGREEN (13) cita la aparición, en "raras ocasiones" de ascos con más de 4 esporas, y posteriormente, LINDEGREEN y LINDEGREEN (14) se refieren al mismo tema: "En contraste con la alta frecuencia en *Saccharomyces* de ascos con menos de 4 esporas, son extraordinariamente raros los con más de 4 esporas" (pág. 74). Trabajan con una cepa endocriada, seleccionada para ese carácter, y citan varios casos de 7 y 8 esporas, uno de 11 y otro de 18.

Contrariamente a WINGE, opinan, según los resultados de este trabajo, que esos casos no se originan por mitosis supernumerarias, sino por fusión de células adyacentes, antes o después de la esporulación.

Todos los casos cuya bibliografía se ha consultado, se refieren a apariciones espontáneas; y en los trabajos sobre tratamiento con alcanfor u otras sustancias, no se han encontrado citas sobre esporulación múltiple. Aún en este trabajo, el fenómeno sólo se ha verificado en un híbrido en forma clara y con expresión débil en uno de sus padres (Nº 2). Parecería que dicho híbrido tuviera predisposición para ello.

La posibilidad de que se tratara de una selección casual de una célula (en el caso más intenso, de "A") que llevara ese carácter, es muy poco probable, pues no se ha encontrado nunca en todos los testigos observados frecuente y paralelamente en medio de FOWELL, y, por otra parte, la misma respuesta al tratamiento con alcanfor se ha producido repetidas veces, aunque con variable intensidad (tratamiento "A", I Serie; tratamiento "B", II Serie; híbrido "3", original en tratamiento III b y III b' y algo en cepa 2, tratamiento IV). También se ha encontrado cierta relación entre "Polisporia" y caracteres secundarios del tratamiento: células gigantes, brotaciones anormales, pseudomicelios, etc. Estos caracteres secundarios han resultado permanentes en la cepa "A", contrariamente a lo observado por otros autores.

La permanencia de las modificaciones observadas es suficientemente demostrada en los tratamientos I y II (cepas "A", "B", "C" y "D") pues se han mantenido hasta más de 9 meses de cultivo permanente. En cambio en los tratamientos III y IV el tiempo de observación ha sido de 75 y 45 días de cultivo, respectivamente, con numerosos cambios a medio fresco.

La posibilidad de que el medio subletal del alcanfor haya actuado como selectivo específico de formas resistentes "Polispóricas", preexistentes en ínfima proporción, no puede descartarse. Sin embargo, la reacción provocada por los mismos tratamientos sobre *Rhodotorula* "C" y "D", parecería indicar un efecto específico, permanente, del alcanfor sobre la facilidad de fraccionamiento citoplásmico en medio de FOWELL, lo cual sería paralelo al fenómeno observado en el híbrido de *Saccharomyces*, habiéndose reunido en éste, condiciones favorables para tal manifestación. Es de hacer notar que el padre Nº 2 es de muy buena esporulación y de esporas grandes, observándose, además, que en los tratamientos III b' y IV, como se mencionó antes, dan ascos más grandes, con ubicación más libre de las 4 esporas, contrariamente a las cepas no tratadas, en que éstas quedan ajustadas. Nuestro conocimiento sobre los factores intrínsecos y extrínsecos, que inciden en la esporulación, es muy escaso: por lo tanto, no se puede opinar con base segura. Sin embargo, no hay mucha duda de que el citoplasma tiene gran parte en la misma, tanto por su estado

físico y químico, como mediante algunos de sus órganos. Por último, resulta difícil de aceptar la acción de un efecto selectivo del medio, cuando las cepas "polispóricas", especialmente "A", no son de ninguna manera menos vigorosas, en medios nutritivos normales, que los testigos de los cuales derivan, sino que parecen, por lo contrario, más vigorosas aún y son, fuera de duda, más prolíficas por vía sexual. Tampoco se aprecia mayor resistencia al alcanfor, en forma evidente, en las cepas tratadas.

Resulta, por lo tanto, aceptable suponer que se trata de una modificación inducida. La posibilidad, aún, de tratarse de una mutación nuclear, es ínfima debido a la repetición de su aparición con tratamientos semejantes. La existencia de poliploidía no ha podido descartarse, aunque es poco probable y difícil de demostrar; se opondría a las opiniones de LEVAN y SANDWALL¹ y poco probable el haber obtenido, en tal caso, en escasas generaciones posibles, para dar origen a la colonia "A", el genotipo recesivo (me me me me, en caso de tetraploidía).

Con las informaciones poco concluyentes, disponibles, es lícito suponer que estamos ante un caso de modificación citoplásmica estable ("plasmagen" o "diferenciación citoplásmica"), inducida por el alcanfor.

Herencia citoplásmica ha sido demostrada en levaduras. WINGE⁽¹⁵⁾ supone partículas citoplásmicas en número limitado, auto-reproducibles, necesarias para mantener fertilidad de esporas en algunos casos estudiados. S. SPIEGELMAN y otros⁽¹⁶⁾, presentan un interesante trabajo sobre naturaleza citoplásmica de la adaptación encimática. LINDEGREEN⁽¹⁷⁾ expone un caso de modificación regresiva "blanca" en colonias "rojas", de origen citoplásmico, que denomina "depletion mutation". EPHRUSSI⁽¹⁸⁾, demuestra un caso de herencia citoplásmica inducida, en levaduras, por tratamientos con acriflavina, que produce deficiencias respiratorias y otros fenómenos encimáticos paralelos. Prefiere este autor, usar el término "mutación", cualquiera sea el mecanismo de transmisión hereditaria.

RESUMEN

Se presentan algunas cepas de *Saccharomyces* con tendencia a producir alta proporción de ascos con más de 4 esporas (5 a 11), obtenidas mediante tratamiento con alcanfor.

Paralelamente, en *Rhodotorula* se han obtenido cepas, mediante el mismo tratamiento, que presentan en medio de FOWELL, fenómenos anormales, estables, de apariencia algo semejante a una esporulación, de naturaleza incierta ("pseudoesporulación").

Se atribuyen estos fenómenos, en ambos casos, a un factor cito-

¹ *Op. cit.*

plásmico (plasmagen) inducido por el tratamiento, aunque más completas investigaciones son necesarias.

Los efectos observados se han mantenido estables, por más de 9 meses de cultivo continuado, en medio nutritivo común, con frecuentes resiembras.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece al prof. Ing. Agr. NORBERTO J. PALLERONI por la sugerencia del tema, así como por las numerosas indicaciones de técnica microbiológica y por haber cedido el material de sus híbridos para este fin.

Al prof. GERÓNIMO SOSA y al ayudante RAÚL GÓMEZ por las copias y obtención, respectivamente, de las microfotografías.

A todo el personal del Instituto de Microbiología por la colaboración en la preparación de medios de cultivo y elementos diversos.

BIBLIOGRAFIA

1. Citado por THAYSEN (3).
2. THAYSEN, A. C. and M. MORRIS. *Preparation of a giant strain of « Torulopsis utilis »*. Nature, 152; 526, Nov. 1943.
3. THAYSEN, A. C. *The camphor effect*. Fourth Int. Congr. for Microb., Copenhagen, 1947.
4. LEVAN, A. and C. G. SANDWALL. *Quantitative investigations on the reaction of yeasts to certain biologically active substances*. Hereditas, 29; 164-178 (1943).
5. SKOVSTED, A. *Induced « Camphor mutations » in yeast*. Compt. rend. trav. Lab. Caalsb. (sér. fys.), 24; 249-261 (1948).
6. SUBRAMANIAM, M. K. *Induction of polyploidy in « Saccharomyces cerevisiae »*. Current Sci., 14; 234 (Sept. 1945).
7. FOWELL, R. R. *Sodium acetate agar as a sporulation medium for yeast*. Nature, 170; 578 (Oct. 1952).
8. LODDER, J. and N. J. W. KREGER VAN RIJ. *The Yeasts. A taxonomic study*. 1952. North Holland Publ. Comp. Amsterdam. Intersc. Publ. New York (en pág. 15).
9. LINDEGREEN, C. C. *The Yeast Cell; its genetics and cytology*. 1949. Educational Publ. Saint Louis (págs. 11-14).
10. WINGE, O. and C. ROBERTS. *Non Mendelian segregation from heterozygotic yeast asci* Nature, 165; 157 (1950).
11. — *Causes of deviations from 2:2 segregations in the tetrads of monohybrid yeasts*. Compt. Rend. trav. Lab, Carlsb. (sér. fys.), 25; 11 (1954).
12. FOWELL, R. R. *Hybridization of yeasts by Lindegreen's technique*. Journal of the Institute of Brewing, Vol. LVII, N° 3 (May. Jun.), Cambridge (pág. 191).
13. LINDEGREEN, C. C. Bact. Rev. (1945), 9; 111. Citado por Fowell (op. cit.).

14. LINDEGREEN, C. C. and G. LINDEGREEN. *Asci in « Saccharomyces » with more than four spores*. Genetics, 38 ; 73-78 (1953).
15. WINGE, O. and O. LAUSTSEN. *On a cytoplasmic effect of inbreeding in homozygous yeast*. Compt. Rend. trav. Lab. Carls. (sér. fys.), 23 ; 2 (1940).
16. SPIEGELMAN, S., RACQUEL ROTMAN SUSSMAN and E. PINSKA. *On the cytoplasmic nature of « long term adptation » in yeast*. Repr. fr. Proceedings of the Nat. Acad. of Sc.
17. LINDEGREEN, C. C. and G. LINDEGREEN. *Depletion mutation in « Saccharomyces »*. Proc. Nat. Acad. Sc. (1947), 33 ; 314-18.
18. EPHRUSSI, BORIS. *Nucleo.—Cytoplasmic relations in micro-organisms*. Oxford, At the Clarendon press, 1953 (127 pp.).