

Experiencias sobre cruzamientos de levaduras (*)

POR EL ING. AGR. NORBERTO J. PALLERONI (**)

A. — INTRODUCCIÓN

A. Antecedentes:

Los trabajos de SATAVA 1918, a y b, 1934 y de WINGE (1935) demostraron que las levaduras del género *Saccharomyces* presentan fases haploides y diploides sucesivas, diferenciables en muchos casos morfológicamente entre sí. El proceso de formación de las esporas va precedido de la meiosis, y las células que derivan de su germinación pueden ser haploides, pueden copular entre sí y producir cultivos diploides, o bien nacer directamente al estado diploide. Con la comprobación de que los cultivos haploides no esporulan, estos autores rebatieron la teoría, sostenida hasta entonces, de que las levaduras del género *Saccharomyces* forman esporas por partenogénesis.

WINGE (1939,a) llegó a realizar la copulación de células haploides provenientes de distintas esporas, con lo cual demostró la posibilidad de la obtención de apareamientos entre cepas diferentes de levaduras, cuyos caracteres podrían ser reunidos a voluntad en un mismo individuo. Con posterioridad, el mismo autor (1939,b) analizó catorce híbridos obtenidos con su procedimiento y estudió la segregación de algunos caracteres en las respectivas descendencias.

Sin embargo, la técnica de WINGE, consistente en poner en contacto

(*) Extractado de la tesis profesional, realizada en los laboratorios del Instituto de Microbiología Agrícola, Facultad de Agronomía y Veterinaria, de la Uaiv. de Buenos Aires; publicada a pedido de la Comisión examinadora formada por los profesores titulares Ings. Agrs. Santos Soriano, Juan B. Marchionatto y José Testa.

(**) Jefe de Trabajos Prácticos de Microbiología Agrícola.

dos esporas en una gota de medio de cultivo líquido por procedimiento de micromanipulación, impedía conocer las características de los haploides a que diera origen cada una de ellas, cuando la copulación se producía y la descendencia diploide superaba a los grupos haploides que podían subsistir aún. LINDEGREN (1934,a) propuso realizar los apareamientos reuniendo en un mismo tubo de medio líquido los cultivos haploides obtenidos previamente por los aislamientos de esporas. De esa manera, el híbrido puede ser producido a voluntad en cualquier momento, sin más trabajo que el de sembrar juntos los haploides que se conservan en cultivos separados. El mismo autor (1943,b) trazó un plan de mejoramiento genético de levaduras basado en el apareamiento de líneas consanguíneas de las que se han eliminado por selección e «inbreeding» los recesivos indeseables.

WINGE (1944) encaró el estudio de las mutaciones frecuentes en las levaduras, y que no pueden ser evitadas en el curso de las experiencias. En esa forma, procediendo por selección de la manera que suele hacerse corrientemente, se consigue aprovechar las propiedades obtenidas por las mutaciones más favorables en las transformaciones que pudieran resultar aplicables en la industria.

Finalmente, con las investigaciones realizadas por los genetistas en este tema, puede decirse que ha variado el criterio para juzgar la pureza de un cultivo pues, aún cuando el mismo provenga de una sola célula, en el caso de ser ella heterocigota, segregaría entonces en formas distintas cuando ocurre la esporulación; por consiguiente, sólo puede ser considerado puro un cultivo desde el punto de vista genético, cuando proviene de una sola espora, cuyo aislamiento exige la utilización de procedimientos de micromanipulación.

B. *Objeto del trabajo:*

El presente trabajo, * ha tenido en primer término como objeto desarrollar la metodología necesaria para poder efectuar esta clase de investigaciones, especialmente respecto de la obtención de los cultivos haploides de levaduras que provienen de esporas individuales, por separación de las células madres, mediante operaciones de micromanipulación.

Con la aplicación de las técnicas desarrolladas, fué luego posible lograr la obtención de cuatro híbridos, por acoplamiento de dos cepas de levaduras diferentes, en la forma que se detalla más adelante.

* Propuesto por el profesor Ing. Agr. Santos Soriano al que agradezco las indicaciones y sugerencias con que ha facilitado su realización.

II. — MÉTODOS

A. *Métodos de cultivo:*

El mosto de malta, preparado de acuerdo a la fórmula de Heeneberg,* ha sido utilizado como medio de pre-esporulación en el método de los bloques de yeso, y para la siembra de los haploides descendientes de una espora y de los pares de haploides cuya copulación se deseaba.

El mismo medio, solidificado mediante el agregado de 2 % de agar, se usó para la conservación de las cepas y para el estudio de las colonias en cajas de Petri.

Para la fermentación de azúcares por las cepas progenitoras, se ha utilizado el agua de levadura según la fórmula de Beijerinck*.

B. *Métodos de esporulación:*

Para obtener la esporulación de las cepas originales y de los híbridos, han sido usados el agua de fécula de papa, según Almeida y Lacaz (1940), y el agar de Gorodkwa*, el agar de fécula de papa, las lonjas de zanahoria y los bloques de yeso de Hansen*. Este último método fué el que dió los mejores resultados cuando se utilizó, para humedecer los bloques, una solución buffer de ácido acético y acetato de sodio de pH4.

C. *Micromanipulación y aislamiento de esporas:*

El aislamiento de las esporas contenidas en los ascos de las levaduras esporuladas, fué realizado por procedimientos de micromanipulación siguiendo, con algunas modificaciones, la técnica que desarrollaran Winge y Laustsen (1937).

Para las prácticas de micromanipulación se utilizó un micromanipulador Zeiss, modelo de Janse y Péterfi, acoplado un microscopio monocular Zeiss, con sistema óptico constituido por los oculares 10 × y Orthoskop (f: 9 mm.), y objetivos acromático (f: 18 mm.) y 40 (f: 4,4 mm.) de fluorita.

La cámara húmeda correspondiente al equipo de micromanipulación, se prepara convenientemente, así como los instrumentos de trabajo, constituidos por una microespátula y una micropipeta, esta última construída de acuerdo al método descrito por Soriano (1935). De una suspensión de levaduras esporuladas, se aparta un asco con ayuda de la microespátula; el mismo instrumento sirve para desgarrar la membrana

* Citado por Soriano. (1938).

celular y liberar las esporas; se toman éstas con la micropipeta y se llevan a gotitas individuales para ser cultivadas, las cuales son depositadas previamente sobre cubreobjetos flameados. El conjunto de las esporas de un asco se cultiva en gotitas separadas sobre un mismo cubre, que se dispone sobre un porta excavado de Kock, de acuerdo al método de Lindner.

La experiencia indica que cuando no se obtiene desarrollo en gotitas al cabo de cuatro días, puede decirse que la espora ya no germinará. En algunas ocasiones la espora germina y las células resultantes no desarrollan, deteniendo en un momento dado su multiplicación. Cuando el conjunto de la descendencia es observable a simple vista por el enturbiamiento de la gota respectiva, el crecimiento ya no se detiene. En la mayoría de los casos, a los 3 ó 4 días, las gotitas cuyas esporas han germinado y producido células viables, presentan el referido enturbiamiento y dan cultivos utilizables.

D. *Curvas de fermentación:*

Los valores que han servido para la confección de los gráficos, han sido obtenidos midiendo la pérdida de peso diaria de matraces Erlenmeyer de 250 cc. con 200 cc. de mosto de malta, provistos de trampa para la retención del agua, y sembrados con un cultivo activo de la cepa a estudiar.

E. *Ilustraciones:*

Las fotomicrografías provienen de preparados efectuados sobre una superficie de agar común de caldo de carne en caja de Petri, coloreados con eritrosina según la fórmula de Winogradsky, citada por Fred y Waxman (1928).

III. — INVESTIGACIONES EFECTUADAS

A. *Elección y esporulación de los cultivos:*

El material empleado consistió en cultivos de levaduras existentes en la Colección Microbiana de la Cátedra de Microbiología Agrícola de la Facultad.

Para las primeras prácticas de la micromanipulación fueron utilizadas algunas cepas que habían esporulado por envejecimiento en cultivos de agar de mosto de malta de algunos meses de edad. Simultáneamente fueron puestos en condiciones de esporular otros cultivos varios, elegi-

dos entre las especies de levaduras utilizadas en las industrias de fermentación.

Entre los procedimientos para obtener la esporulación, el de los bloques de yeso fué el que dió los mejores resultados, y aún cuando no esporularon todas las cepas que fueron someridas a este método, un buen porcentaje lo hizo, de modo que pudo comenzarse el trabajo con abundante material. Por consiguiente, no se creyo necesario recurrir en esta ocasión al método preconizado por Lindegren (1944), y que difiere fundamentalmente del que hemos adoptado, por la utilización de un medio especial de pre-esporulación en el que se siembran las levaduras antes de ser transferidas a los bloques de yeso.

B. *Obtención de los cultivos haploides:*

Las células de levaduras esporuladas fueron sometidas a una disección a objeto de proceder al aislamiento de las esporas, mediante procedimientos de micromanipulación. En la bibliografía no se han encontrado descriptas en detalle todas las operaciones efectuadas, de modo que en la ejecución del trabajo fué necesario ir resolviendo las dificultades que se presentaron en el transcurso del mismo. En esa forma, se consiguió desarrollar una técnica satisfactoria, mediante la cual se logró aislar diariamente un número de esporas superior a setenta, que Winge considera como buen promedio para personas prácticas.

Un total de 15 cepas fué sometido al procedimiento de disección aludido, lo cual permitió obtener 750 esporas en total. Las primeras 13 cepas de levaduras con que se trabajó se caracterizaron en conjunto porque sus esporas daban descendencia diploide, sea directamente al germinar, o bien luego de algunas generaciones de células haploides que terminaban por copular entre sí. Con dos de las cepas de este último tipo se procedió en ensayar la selección de los grupos haploides primitivos que aparecían en las gotas, de dos maneras: 1) estriando en cajas con agar de mosto de malta el material, tomado con un capilar, depositándolo en la superficie del medio y dispersando las células con la ayuda de una espátula corta, y 2) tomando con un capilar muy fino (micropipeta) los grupos haploides con ayuda del micromanipulador y cultivándolos en gotitas separadas. En el primer caso, las colonias que aparecieron fueron de células diploides exclusivamente, y en el segundo, la selección continuada de los grupos haploides impidió obtener grupos que se mantuvieran en tal estado porque todos los seleccionados no tardaron en diploidizarse por autocopulación.

La primera cepa de la que pudieron obtenerse cultivos haploides fué

la N° 208 de la Colección. Es ella una levadura de colonia rugosa, cuyas células son alargadas, permaneciendo unidas en grupos, según muestran las figuras Nos. 2 y 3. Esporula con facilidad en los bloques de yeso y menos rápidamente en lonjas de zanahoria. Es quizá, una de las razas de *Saccharomyces cerevisiae*.

Los primeros aislamientos de esporas de esta cepa fueron practicadas a partir de ascos obtenidos en zanahoria. La micromanipulación es algo dificultosa cuando se trabaja con células de este cultivo que han esporulado en dicho medio por cuanto las mismas permanecen unidas entre sí, y la separación de los ascos, cuando se hallan adheridos por sus dos extremos a otras células, no siempre es una operación que resulta factible, puesto que la ruptura de la unión trae como consecuencia generalmente el desgarramiento de la membrana de la célula esporulada antes de que pueda ser convenientemente alejada del grupo para no perder ninguna espora o confundir una de éstas con levaduras pequeñas o con brotes que se sueltan. Sin embargo, lograron ser aisladas unas 35 esporas en una primera etapa, y de ellas, germinaron 3, dos con descendencia diploide, que no pudo ser mantenida, y una con descendencia de células haploides de aspecto típicamente «toruloide».

De células de esta misma cepa esporuladas en yeso se realizó un segundo conjunto de 35 aislamientos, cuyos resultados fueron la obtención de una sola espora con descendencia, típicamente haploide, ilustrada en las figuras Nos. 7 y 8. Las células de la mencionada cepa 208, esporuladas en el yeso, no ofrecen unión tan tenaz entre sí como las esporuladas en zanahoria, y pueden ser separadas más fácilmente, sin peligro de ruptura. Además, fué mucho mayor el porcentaje de ascos, sobre todo de los de 4 esporas; pero la fertilidad no aumentó. El total de esporas fértiles para el conjunto de aislamientos practicados representó el 5,7 % en esta cepa.

La cepa con que se trabajó a continuación fué la que lleva el N° 206 de la misma colección. Presenta colonia lisa y células ovales, sueltas (Ver Figs. 4 y 5). Esporula con facilidad en los bloques de yeso y en los cultivos en agar de cierta edad. Se trata de *Saccharomyces cerevisiae*.

De un cultivo viejo en agar de mosto de malta en estría se obtuvo buena cantidad de células esporuladas, (aún cuando con un elevado porcentaje de ascos de 3 esporas), con las cuales se realizaron 35 aislamientos. La proporción de esporas germinadas fué de 57,1 %, vale decir 10 veces mayor que para la N° 208.

De las 35 esporas aisladas, 20 germinaron, y de ellas 7 fueron reconocidas como haploides y 13 como diploides. La mayoría de los diploides habían aparecido como tales desde la germinación de la espora respectiva.

Los cultivos haploides se comportaron como muy inestables, ya que de los 7 obtenidos sólo dos pudieron ser conservados en este estado. Uno de éstos sólo pudo ser mantenido por selección mediante pasaje por cajas, luego de haberlo utilizado en el primer ensayo de apareamiento intentado.

El aspecto de las colonias y células de uno de los haploides correspondientes a esta cepa está indicado en las figuras Nos. 8 y 9.

C. *Oblención de los híbridos:*

Una vez obtenidos los cultivos haploides de las dos especies de levaduras citadas, se trató de aparearlos, reuniéndolos en un mismo tubo de medio líquido, de acuerdo con el método de Lindgren (1934, a).

1. — ENSAYO PRELIMINAR

El primer par de haploides reunidos fué el constituido por los que hemos designado como 208-1 y 206-1. En el tubo de la mezcla fueron obtenidas células diploides a los dos días, que al ser sembradas en cajas daban colonias formadas por células diploides, mientras los dos tubos de control, en que se sembraron ambos progenitores separadamente, daban con el mismo tratamiento, colonias de células haploides.

El diploide obtenido en esta forma podía ser el resultado del apareamiento de las células haploides reunidas, o bien uno u otro, o ambos, de los haploides, diploidizados por copulación homotática, que manifestaban su inestabilidad en tal estado.

El haploide 208-1 fué probado repetidas veces en medios líquidos y en medios solidificables y nunca se lo encontró diploidizado parcial o totalmente; por otra parte, ese fenómeno hubiera podido ser descubierto inmediatamente por el aspecto inconfundible de las células diploides de esta cepa, a menos que hubiera resultado heterocigota para ese carácter.

No pudo afirmarse lo mismo para el comportamiento del haploide 206-1; sembrado nuevamente en superficie luego de su intervención en la experiencia, resultó una mezcla de colonias grandes y pequeñas, correspondientes a células haploides y diploides respectivamente. Se picaron las colonias del primer tipo, y hasta el presente, los cultivos que originaron se mantuvieron haploides, con lo cual la selección realizada en esa forma se manifestó eficaz. Pero la naturaleza del diploide obtenido en el tubo de la mezcla era desde entonces muy discutible, porque, aún con el resultado de los testigos, no podía afirmarse su condición de híbrido.

Además, el aspecto de las colonias del supuesto híbrido con respecto al tamaño para una misma edad, forma, borde, superficie, así como la forma de sus células, eran muy parecidas a los de los diploides homoci-

gotas de la cepa 206, que habían sido obtenidos en los cultivos de aislamientos monospóricos.

2. — PLAN DE APAREAMIENTOS

Luego de este primer ensayo, se estableció un plan de apareamientos en que intervinieron los 4 haploides, en todas las combinaciones posibles, en la forma que se indica en la planilla adjunta.

	Haploide 208-1	Haploide 208-2
Haploide 206-1	Híbrido N° 1 (repetición)	Híbrido N° 2
Haploide 206-2	Híbrido N° 3	Híbrido N° 4

Los resultados obtenidos fueron la obtención de cuatro híbridos, resultantes de las combinaciones entre los haploides apareados, descontando los dos apareamientos entre los haploides de una misma cepa, cuyos resultados fueron negativos.

A las 48 horas, se controlaron los resultados por medio de siembras efectuadas en cajas; esta vez, a fin de eliminar la posibilidad de que la diferencia de desarrollo pudiera ser atribuída al medio de cultivo, cada diploide supuesto híbrido fué sembrado conjuntamente con los haploides que le habían dado origen, dividiendo al efecto en tres partes la superficie de cada caja. El aspecto de una de esas cajas se ilustra en la figura N° 1.

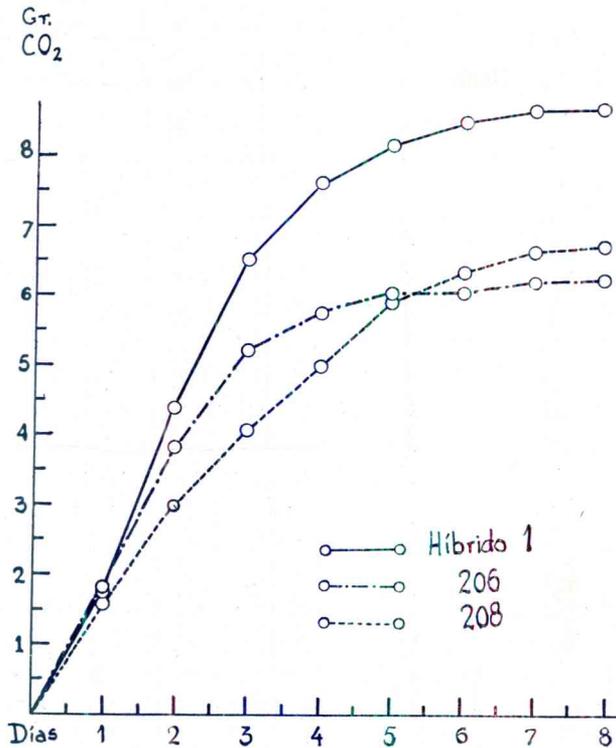
Las experiencias fueron repetidas de la manera siguiente: se volvió a reunir en un tubo de medio líquido cada par de haploides, pero esta vez, tomando, para la siembra, una parte de la colonia de cada haploide de las cajas. El material restante de cada colonia sirvió para la siembra de cada tubo testigo. Los resultados volvieron a repetirse, de modo que se tuvo la certidumbre de la obtención de híbridos verdaderos, que fueron identificados como tales en la forma que se verá a continuación.

D. Reconocimiento y estudio de los híbridos:

1. --- RECONOCIMIENTO DE LOS HÍBRIDOS OBTENIDOS:

La confirmación de la condición de híbridos para los diploides obtenidos en los tubos de las mezclas de haploides, según se acaba de relatar, hubo de ser realizada estudiando la segregación de las caracteres en la descendencia de cada supuesto híbrido. Para ello se los hizo esporular

por el método corriente. El híbrido que consignamos como N° 2 en el cuadro, lo hizo muy difícilmente, ya que hubo que esperar 14 días para obtener algunas células esporuladas. El diploide derivado del primer apareamiento (cuya repetición corresponde al N° 1), y el N° 3 dieron un número satisfactorio de ascos, mientras el N° 4 presentó el número más elevado de células esporuladas.



Curvas de fermentación del híbrido N° 1
y de las cepas progenitoras

De cada uno de los cuatro híbridos obtenidos en esta segunda serie, fueron aisladas alrededor de 30 esporas, con excepción del primero, correspondiente al ensayo preliminar, del que, en total, se obtuvieron 72 esporas.

Como carácter de fácil reconocimiento para el estudio de la segregación, se tomó el de la superficie de las colonias. Con toda facilidad, ese sólo detalle permitió corroborar la opinión del carácter híbrido de todos los

diploides obtenidos. El aspecto de las colonias, correspondientes a cada tipo segregante de dos de los híbridos, puede verse en las ilustraciones Nos. 12, 14, 18 y 20, y el de las células, en las figuras Nos. 13, 15, 19 y 21. Por otra parte, aún cuando no ha sido registrado en forma gráfica, los cultivos en mosto de malta de los descendientes que habían de dar colonia rugosa, presentaban similitud con los cultivos, en el mismo medio, de los haploides provenientes de la cepa 208, vale decir, el desarrollo era grumoso y el líquido en general permanecía límpido; por el contrario, los que dieron colonia lisa presentaban un desarrollo en mosto en un todo semejante con los descendientes de la cepa 206, que forma un sedimento fino y enturbia el líquido fácilmente, aún con una leve agitación.

2. — ESTUDIO SOMERO DE LOS HÍBRIDOS OBTENIDOS:

En el estudio de los híbridos, sólo se han tomado en cuenta los caracteres más salientes de la morfología celular y de composición de las colonias, así como los relativos al poder de fermentación.

El híbrido obtenido en el ensayo preliminar resulta diferente del N° 1 correspondiente al plan de apareamiento en diversos aspectos, aún cuando este último representa la repetición de aquél. Las diferencias no sólo se manifiestan en lo relativo a la morfología celular, sino también en cuanto al poder de fermentación, que es mayor en el híbrido N° 1.

El *híbrido del ensayo preliminar* tiene células ovales a redondeadas, sueltas, de 4 a 6,5 micrones de largo por 3,5 a 6,0 micrones de ancho, mientras el *híbrido N° 1* posee células elíptico-ovales, sueltas, de 5,0 a 7,5 micrones de largo por 4,0 a 5,5 micrones de ancho, (ver Fig. 11).

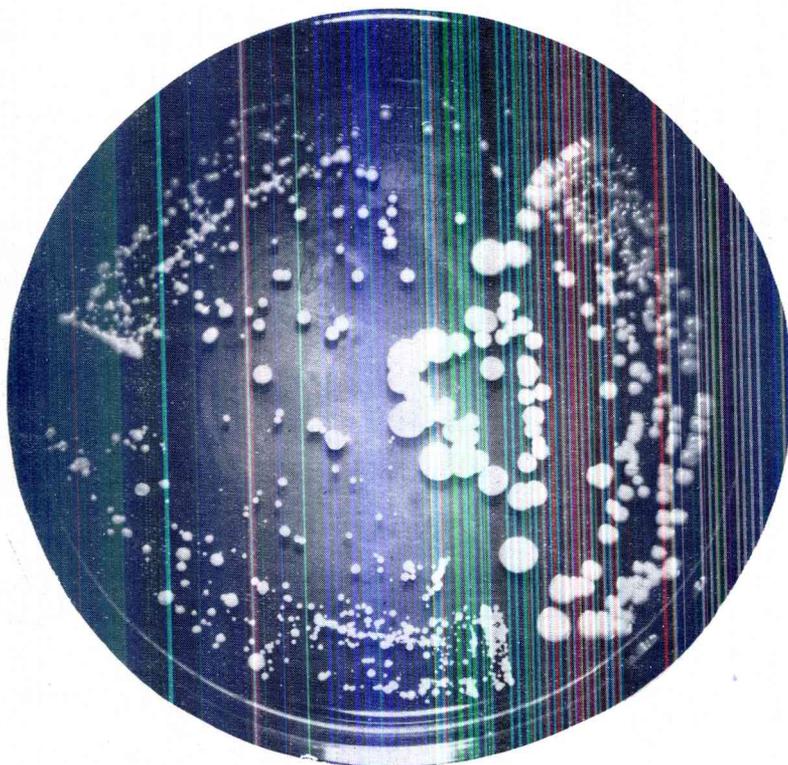
Los caracteres morfológicos de los tres híbridos restantes pueden ser resumidos como sigue:

híbrido N° 2: células elíptico-ovales, sueltas, de 0,4 a 7,5 micrones de longitud, por 3,5 a 5,5 micrones de ancho (Fig. 17).

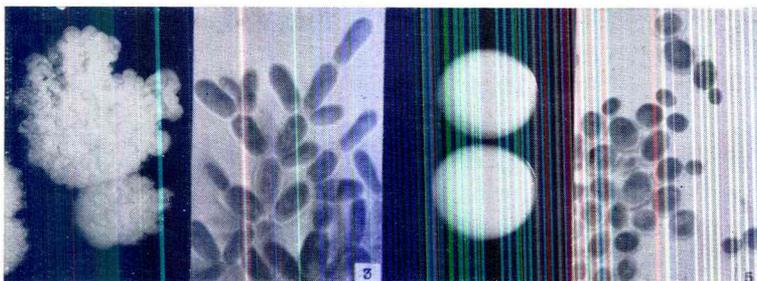
híbrido N° 3: células elíptico-ovales, la mayoría algo alargadas, sueltas, de 5,0 a 9,0 micrones de longitud por 3,5 a 6,0 micrones de ancho.

híbrido N° 4: células elíptico-ovales, sueltas, de 4,5 a 8,0 micrones de longitud, por 4,0 a 6,0 micrones de ancho.

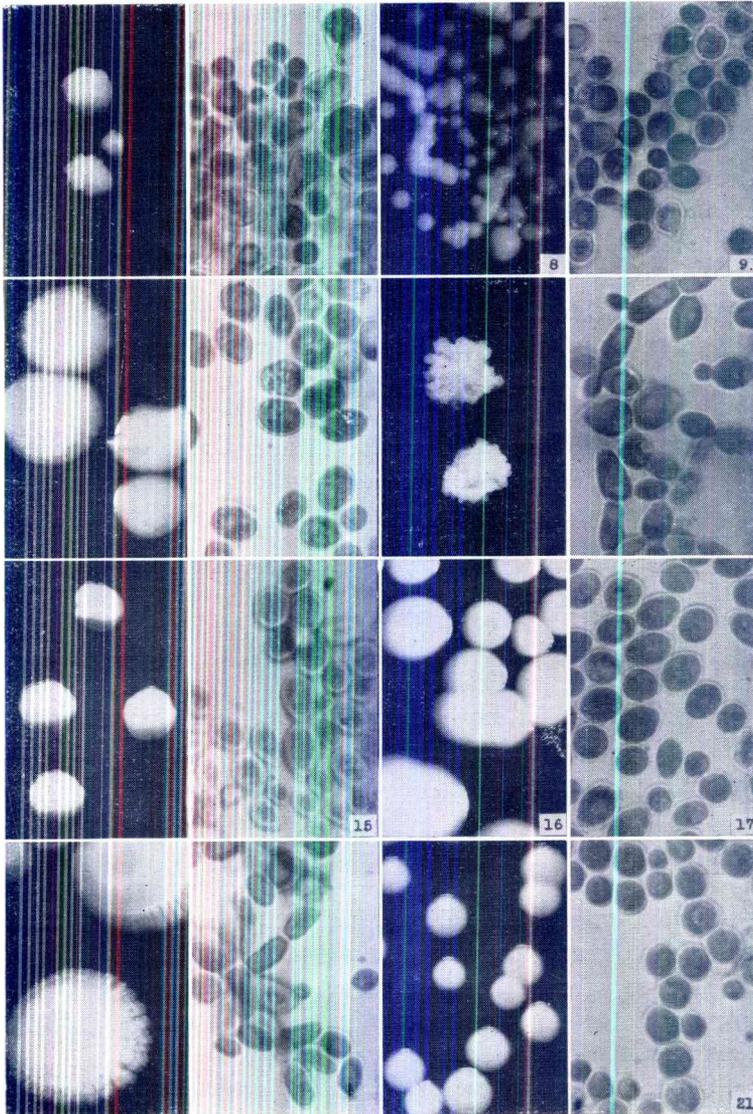
Los híbridos estudiados presentan colonias semajantes entre sí, y muy parecidas a las de la cepa progenitora N° 206, (Ver Figs. 10 y 16) cuyos caracteres de colonias resultan, por consiguiente, dominantes. Todos ellos ofrecen colonias redondas y convexas, con bordes lisos y superficie brillante. Las colonias de 1 $\frac{1}{2}$ a dos semanas de edad presentan prolongaciones periféricas, debidas a la filamentización de las células marginales.



1: Aspecto de una caja en la que se ha sembrado juntos dos haploides (sectores de colonias pequeñas) y el híbrido correspondiente (sector de colonias grandes).



2: Colonias de la cepa progenitora N° 208 (x 3); 3: Células de la cepa progenitora N° 208 (x 1000); 4: Colonias de la cepa progenitora N° 206 (x 3); 5: Células de la cepa progenitora N° 206 (x 1000).



6: Colonias del haploide 208-2 (x 3); 7: Células del haploide 208-2 (x 1000); 8: Colonias del haploide 206-1 (x 3); 9: Células del haploide 206-1 (x 1000); 10: Colonias del híbrido N° 1 (x 3); 11: Células del híbrido N° 1 (x 1000); 12: Colonias lisas de un segregante del híbrido N° 1 (x 3); 13: Células correspondientes a las colonias de fig. 13 (x 1000); 14: Colonias rugosas de un segregante del híbrido N° 1 (x 3); 15: Células correspondientes a las colonias de fig. 14; (x 1000); 16: Colonias del híbrido N° 2 (x 3); 17: Células del híbrido N° 2 (x 1000); 18: Colonias lisas de un segregante del híbrido N° 2 (x 3); 19: Células correspondientes a las colonias de fig. 18 (x 1000); 20: Colonias rugosas de un segregante del híbrido N° 2 (x 3); 21: Células correspondientes a las colonias de fig. 20 (x 1000).

Se ha estudiado, además, el comportamiento fermentativo de cada uno de los híbridos en el mosto de malta, comparándolos con sus progenitores diploides; el resultado ha sido registrado en gráficos, como el que va a continuación. Los híbridos superan a sus progenitores originales, aún cuando no con igual intensidad; los que manifiestan una mayor capacidad fermentativa son los números 1 y 4.

No puede afirmarse que domine, en relación a este carácter, uno de los progenitores sobre el otro, porque ambos presentan curvas bastantes semejantes, de modo tal que debe atribuírse en gran parte a la heterosis la mayor intensidad fermentativa que se observa para los híbridos estudiados.

Algunos otros datos que han surgido de la observación, permiten suponer que los casos descritos no son tan sencillos como lo parecen a simple vista, ya que existen distintas variantes de colonias rugosas y de colonias lisas, además del detalle interesante de la diferencia entre los dos híbridos que provienen del acoplamiento de los mismos haploides; pero el objetivo impuesto desde el principio al presente trabajo, que fué el de experimentar la metodología indispensable para la realización de las operaciones necesarias utilizables en un plan de mejoramiento de levaduras por hibridación, ha impedido, por ahora, ahondar en otros detalles interesantes que permitirían quizás abordar la interpretación genética del problema planteado.

IV. — CONCLUSIONES

1°. — En las experiencias efectuadas sobre cruzamientos, y mediante la utilización del instrumental que se menciona en el texto, ha sido posible llegar a superar el promedio de setenta esporas diarias, considerado como satisfactorio, que pueden ser aisladas por procedimientos de micromanipulación de células de levaduras.

2°. — Se ha observado que las células de los cultivos de levaduras estudiadas, provenientes de una espora, copulan generalmente entre sí, o nacen directamente en estado diploide, y sólo un número reducido de cepas ha dado células haploides que pueden ser mantenidas en ese estado, aunque no todos los haploides presentan igual estabilidad en las mismas condiciones de cultivo.

3°. — La utilización de los métodos ensayados y desarrollados en el trabajo ha permitido la obtención de cuatro híbridos de levaduras por acoplamiento de los cultivos haploides derivados de las esporas aisladas de los cultivos originales.

4°. — La intensidad de fermentación de los híbridos obtenidos en el

curso de las experiencias realizadas, se ha mostrado superior a la de los progenitores correspondientes; a este respecto, dos de los híbridos se han destacado netamente sobre los otros dos, dando curvas de valores manifiestamente más altos.

5°. — Las condiciones indispensables para obtener un resultado satisfactorio en las experiencias de hibridación de levaduras, se ha considerado que son: obtención de cultivos haploides a partir de las esporas aisladas; suficiente estabilidad de los haploides obtenidos; afinidad entre los haploides que se deben aparear y esporulación del híbrido cuya descendencia permita estudiar la segregación de los caracteres.

V. — RESUMEN

El trabajo consistió en la obtención de híbridos de levaduras mediante el apareamiento de cultivos haploides de estabilidad comprobada, derivados de las esporas aisladas por procedimientos de micromanipulación de cepas pertenecientes a la Colección Microbiana de la Cátedra de Microbiología Agrícola.

Los híbridos obtenidos fueron puestos a esporular y el estudio de los cultivos a que dieron origen las esporas separadas, permitió reconocer la legitimidad de aquéllos por la segregación de los caracteres correspondientes a los progenitores originales; en las fotos que acompañan al trabajo se ilustran algunos de los detalles de los resultados que se han obtenido en el curso de las investigaciones realizadas.

El instrumental que se ha utilizado para la disección de las células por procedimientos de micromanipulación, ha permitido aislar diariamente un número de esporas superior a setenta, que se considera como promedio bueno para personas prácticas. Además, la esporulación de las cepas se ha conseguido en forma satisfactoria en bloques de yeso acidificados con una solución de ácido acético y acetato de sodio a pH 4.

El poder fermentativo de los híbridos obtenidos es superior, en todos los casos, al de cada uno de los progenitores; dos de esos híbridos manifiestan una capacidad fermentativa muy superior a la de los otros dos.

S U M M A R Y

The work consisted in the obtention of yeast hybrids by means of mating haploid cultures of tested stability, derived from the isolated spores by procedures of micromanipulation of stocks belonging to the microbiological collection of the chair of Agricultural Microbiology of the Faculty.

The hybrids obtained were put to sporulate, and the study of the cul-

tivations originated by the separated spores, permitted to recognize their legitimacy through segregation of the characters corresponding to the original progenitors. In the photographs which accompany the present work, some details of the results obtained during the course of the investigations made, are illustrated.

The instrumental equipment used for the dissection of the cells by micromanipulation procedure, has permitted to isolate daily a number of spores, superior to seventy, which is considered good average for experienced persons. Moreover, the sporulation of the stocks has been obtained satisfactorily in plaster blocks acidified with a solution of acetic acid and acetate of sodium of pH 4.

The fermentative power of the hybrids obtained is, in all cases superior to that of each of the progenitors; two of these hybrids reveal a fermentative capacity very superior to that of the other two.

VI — BIBLIOGRAFIA

- ALMEIDA, F., e C. S. LACAZ. 1940. — *Nova tecnica para demonstração rapida dos ascosporos*, *Folia Clinica e Biologica*, Vol. XII, N° 4, S. Paulo.
- ENGEL. 1872. — *Les ferments alcooliques*. (Citada por HANSEN: *Ueber die Ascosporenbildung bei der Gattung Saccharomyces*, 1882, *Gesammelte theoretische Abhandlungen der Garungsorganismen*, pp. 125-168; resumido en *Comptes Rendus des trav. du Lab. Carlsberg*, II, 2: 13).
- FRED, E. B., and S. A. WAKSMAN. 1928. — *Laboratory manual of general microbiology*, First Edition, p. 49.
- K. KRUIS a J. SATAVA, 1918. — *O vyoži a klíčení spor jakoz i seksualite kvasinek*. V. Praze, 67 pp. y 24 láminas, (citado por Winge, 1935).
- LINDEGREN, C. C., and G. LINDEGREN. 1943, a. — *A new method of hybridizing yeasts*, *Proc. Natl. Acad. Sci., U. S.*, 29: 306-308.
- 1943, b. — *Selecting, inbreeding, recombining and hybridizing commercial yeasts*, *J. Bact.*, 46: 405-419.
- 1944. — *Sporulation in Saccharomyces cerevisiae*, *Botan. Gaz.*, 105: 304-316.
- SATAVA, J., 1918. — *O redukovaných formách kvasinek*. V. Praze, 48 pp. y 3 láminas, (citado por Winge, 1935).
- SATAVA, J. 1934. — *Les formes sexuelles et asexuelles des levures et leur pouvoir fermentatif*, *III° Congres international technique et chimique des industries agricoles*, 8 pp., París (citado por Winge, 1935); *Chem. Abstr.*, 29, 2296 (citado por Lindegren, 1943, b).
- SORIANO, S. 1935. — *Dispositivo sencillo para micromanipulaciones*, *Folia Biológica*, 46: 205-210.
- SORIANO, S. 1938. — *Estudio microbiológico del proceso de fermentación de la «chicha»*, *Rev. del Inst. Bacteriológico*, Vd. III, N° 3: 231-335.
- WINGE, O. 1935. — *On haplophase and diplophase in some saccharomycetes*, *C. Rend. des Trav. Lab. Carlsb., Sér. Physiologique*, 21: 77-112.

- WINGE, O, 1944. — *On segregation and mutation in yeasts*. C. Rend. des Trav. du Lab. Carlsb., Sér. Physiol., 24: 79-95.
- WINGE, O., and O. LAUSTSEN. 1937. — *On two types of spore germination, and on genetic segregations in Saccharomyces, demonstrated through single-spore cultures*, C. Rend. des Trav. du Lab. Carlsb., Sér. Physiol., 22: 99-116.
- 1939. a. — *Artificial species hybridization in yeast*, C. Rend. des Trav. du Lab. Carlsb., Sér. Physiol., 22: 235-344.
- 1939. b. — *On 14 new yeast types, produced by hybridization*, C. Rend. des Trav. du Lab. Carlsb., Sér. Physiol., 22: 337-352.