

## Índice de contenido

3 Resultados.....	3
3.1 Caracterización genética y análisis de la inestabilidad cariotípica de la cepa DC5.....	3
3.1.1 Origen y caracterización de la cepa DC5.....	3
Análisis de derivados monosporídicos de DC5 y de sus productos meióticos.....	4
3.1.2.1 Obtención de derivados meióticos de DC5.....	4
3.1.2.2 Contenido de DNA de la cepa DC5 y de sus derivados monoesporídicos.....	4
3.1.2.3 Esporulación de derivados F1 diploides. Obtención de derivados F2.....	5
3.1.3 Análisis de las propiedades metabólicas de DC5 y derivados F1 y F2.....	6
Análisis de la inestabilidad cariotípica de la cepa DC5.....	6
3.1.4.1 Inestabilidad mitótica.....	6
3.1.4.2 Inestabilidad meiótica.....	8
3.1.5 Análisis de la inestabilidad cariotípica de los derivados F1.....	8
3.1.5.1 Inestabilidad mitótica.....	8
3.1.6 Análisis de la inestabilidad cariotípica de los derivados F2.....	11
3.1.7 Repetibilidad del ensayo.....	13
3.1.8 Análisis de la inestabilidad del cromosoma XII.....	15
3.1.9 Caracterización estructural del cromosoma XII.....	16
3.2. Inestabilidad cariotípica en mutantes rad52.....	17
3.2.1 Obtención del mutante $\Delta$ rad52.....	18
3.2.2 Estabilidad cariotípica de mutantes DC5 $\Delta$ rad52.....	20
3.2.3 Recombinación subtelomérica en $\Delta$ rad52.....	21
3.2.4 Capacidad fermentativa de mutantes RAD52.....	22
3.3. Caracterización estructural de los polimorfismos de tamaño del cromosoma I.....	24
3.3.1 Identificación de variantes polimórficas de tamaño del cromosoma I en DC5.....	24
Caracterización estructural de variantes polimórficas del cromosoma I de DC5.....	24
3.3.2.1 Análisis del brazo derecho.....	27
3.3.2.2 Análisis del brazo izquierdo.....	27
3.3.3 Análisis de los ORFs presentes en el cromosoma I de la cepa DC5.....	27
3.3.4 Caracterización de los brazos cromosómicos de DC5.....	30
3.3.4.1 Análisis de secuencia del brazo derecho del cromosoma I.....	30
3.3.4.1.1 Análisis de las secuencias entre YAR023C y YAR031W.....	30
3.3.4.1.2 Análisis de las secuencias entre YAR031W y YAR053W.....	30
3.3.4.2 Análisis de secuencia del brazo izquierdo del cromosoma I.....	31
3.4 Genotipado molecular de cepas silvestres y enológicas de <i>S. cerevisiae</i> . ....	33
3.4.1 Análisis de variabilidad de familias multigénicas .....	35
3.4.2 Análisis de las secuencias de transposones.....	38
3.4.3 Análisis de la variabilidad del cromosoma I.....	39



### 3 Resultados

#### 3.1 Caracterización genética y análisis de la inestabilidad cariotípica de la cepa DC5.

##### 3.1.1 Origen y caracterización de la cepa DC5

La cepa DC5 pertenece a una colección de cepas aisladas de mostos en fermentación espontánea en una bodega del Penedès (Nadal *et al.*, 1996 y 1999; Tesis Doctoral). Una vez catalogadas y caracterizadas, se escogió un subconjunto de estas cepas en vistas a su utilización para fines enológicos (Nadal, Tesis Doctoral). Para ello, se seleccionaron aquellas cepas con una mayor capacidad fermentativa, mejor crecimiento y supervivencia en las estrictas condiciones de la segunda fermentación del cava.

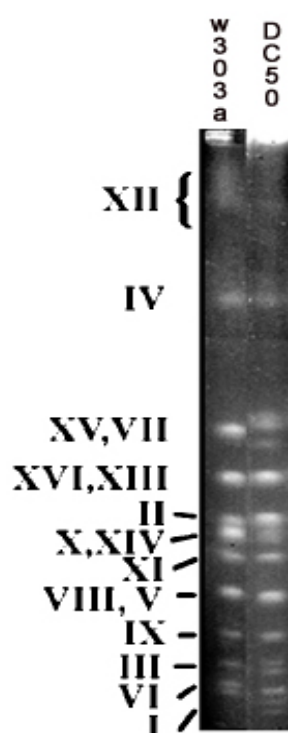


Figura 3-1. Cariotipo electroforético de las cepas w303a (laboratorio) y de la cepa DC5. La figura muestra la correspondencia entre los cromosomas de la cepa w303a (números romanos) y los cromosomas de la cepa DC5 cuya adscripción es meramente orientativa. Puede observarse como existe una importante diferencia de tamaño en las bandas de mayor movilidad electroforética entre la cepa de laboratorio y la cepa DC5 (cromosomas I).

---

Durante el proceso de caracterización de las cepas enológicas, se detectó que algunas de ellas presentaban el fenómeno de la inestabilidad cariotípica, es decir, cambios clonales en su cariotipo, posiblemente como consecuencia de reordenaciones cromosómicas durante el crecimiento vegetativo (Nadal *et al.*, 1999). Dentro de estas cepas de cariotipo variable se seleccionó DC5 por su relativa eficiencia en esporulación, lo que permitió el subsiguiente análisis genético del fenómeno de inestabilidad cariotípica.

El perfil cariotípico de DC5 se muestra en la figura 3-1. Se trata de un perfil considerablemente más complejo que el de la cepa de laboratorio W303a (Figura 3-1), aunque en general sigue un patrón típico de la especie *Saccharomyces cerevisiae*. La presencia de hasta 16 bandas cromosomales en el cariotipo de DC5, en comparación con las 12 bandas canónicas de la cepa de laboratorio, se interpreta como presencia de polimorfismos cromosómicos, es decir, cromosomas homólogos de distinto tamaño. Este fenómeno está muy extendido en cepas vínicas e industriales (Bakalinsky y Snow, 1990; Adams *et al.*, 1992; Longo y Venzinhet, 1993; Benítez y Codón, 1995; Miklos *et al.*, 1997; Gasent-Ramírez *et al.*, 1999; Nadal *et al.*, 1999; Pérez Ortín *et al.*, 2002b).

### 3.1.2 Análisis de derivados monoesporídicos de DC5 y de sus productos meióticos.

#### 3.1.2.1 Obtención de derivados meióticos de DC5.

A pesar de seleccionarse por su relativamente alta tasa de esporulación, la cepa DC5 presenta una tasa de esporulación por debajo del 5%, muy inferior a la de las cepas diploides de laboratorio, aunque suficiente para el análisis genético. En total, se aislaron y diseccionaron 12 ascas, cuyas esporas mostraron niveles de viabilidad relativamente bajos. En 5 ascas se obtuvieron 2 esporas viables por asca, en 4 ascas solamente una espora viable por asca y en las 3 ascas restantes ninguna espora fue viable. Los derivados meióticos viables se designaron como derivados F1, y su nombre se determinó por la asca de la que se aislaron (de 1 a 12) y por el orden de disección dentro una misma asca (de “a” a “d”). Los derivados monoesporídicos obtenidos fueron en total 14 y aparecen listados en la tabla 3-2 (apartado “derivados F1”).

#### 3.1.2.2 Contenido de DNA de la cepa DC5 y de sus derivados monoesporídicos.

El análisis del contenido de DNA de la cepa DC5 se realizó por citometría de flujo y resultó ser muy cercano al de la cepa de laboratorio w303d, es decir, presentaba un valor muy cercano a la diploidía.

---

A pesar de provenir de esporas haploides y de cultivarse sin posibilidad de cruzamiento con otras cepas, la mayoría de los derivados meióticos (11 de 14 derivados F1) presentaron un contenido en DNA parecido al de su cepa parental DC5, y, por tanto, cercano, si no idéntico a una cepa diploide (Tabla 3-1). Esta circunstancia se relaciona con la capacidad de autodiploidización de muchas cepas de *S. cerevisiae*, fenómeno conocido como homotalismo y que depende de un número muy reducido de genes (Strathern *et al.*, 1994). Los tres derivados F1 restantes presentaron contenidos de DNA cercanos a la haploidía (Tabla 3-1), demostrando su incapacidad de autodiploidización, propiedad denominada heterotalismo. La coexistencia de derivados monoesporídicos homotáticos y heterotáticos se interpretó como consecuencia de heterozigosis para uno o varios de los genes implicados en el homotalismo en la cepa parental DC5.

Cepa	Contenido de DNA (valor C)		
DC5	2,16	±	0,38
DC5-1B	1,93	±	0,05
DC5-1D	2,05	±	0,28
DC5-2B	1,64	±	0,15
DC5-2D	0,97	±	0,05
DC5-4A	1,73	±	0,05
DC5-4B	1,72	±	0,19
DC5-5A	1,78	±	0,01
DC5-5C	0,97	±	0,14
DC5-6C	1,91	±	0,10
DC5-7C	1,79	±	0,05
DC5-8B	1,65	±	0,02
DC5-8C	1,91	±	0,09
DC5-9D	1,68	±	0,06
DC5-10A	0,91	±	0,06

Tabla 3-1. Contenido de DNA de la cepa DC5 y de sus derivados esporídicos F1, determinado por citometría de flujo (ver materiales y métodos). Los valores 1C y 2 C corresponden al contenido de DNA en la fase G1 de las cepas w303a y w303d respectivamente. Los datos mostrados corresponden a la media de tres mediciones independientemente.

### 3.1.2.3 Esporulación de derivados F1 diploides. Obtención de derivados F2.

Los 11 derivados F1 diploides fueron nuevamente sometidos a esporulación en las mismas condiciones usadas para la cepa parental DC5.

---

Se obtuvieron esporas viables de cuatro tétradas completas para los derivados DC5-1B (designados como DC51) y de dos tétradas completas para los derivados DC5-2B y DC5-7C respectivamente (designados como DC52 y DC57). En total, se obtuvieron 24 derivados monoesporídicos, designados como se muestra en la tabla 3-2, (apartado “derivados F2”). El resto de derivados F1 diploides no esporularon en las condiciones en las que se obtuvieron los anteriores derivados (materiales y métodos), ni mediante variaciones de éstas.

### 3.1.3 Análisis de las propiedades metabólicas de DC5 y derivados F1 y F2

Se realizó un análisis de crecimiento de la cepa DC5 y de sus derivados monoesporídicos en los siguientes medios: medio mínimo (MM), medio completo (SC) y medio Biggy (de *Bismuth Glucose Glycine Yeast Agar*, que contiene extracto de levadura, glicina, dextrosa y bismuto). El medio Biggy sirve para monitorizar la producción de sulfhídrico ( $H_2S$ ), ya que éste reacciona con el bismuto presente en el medio formando un precipitado marrón. La producción de sulfhídrico ( $H_2S$ ) es un factor no deseado en las levaduras vínicas. La cepa DC5 creció en todos los medios ensayados y produjo sulfhídrico (Tabla 3-2), mientras que el análisis de las propiedades metabólicas de los derivados monoesporídicos reveló la segregación de fenotipos presuntamente recesivos, tal como falta de crecimiento en medios selectivos o de no producción de  $H_2S$ . Un total de 6 de las 14 esporas analizadas presentaban el mismo fenotipo que su cepa parental DC5, mientras que las 8 restantes mostraron alguna deficiencia de crecimiento o de producción de  $H_2S$  (tabla 3-2). En el caso de los derivados F2, todos los derivados de las cepas DC51B y DC57C presentaron el mismo fenotipo que las cepas parentales respectivas, mientras que todos los de la cepa DC52B resultaron incapaces de crecer en medio SC, al contrario de su cepa parental. Estos resultados indican un cierto grado de homocigosis en los derivados F1, así como una cierta inestabilidad genética (es decir, la aparición de fenotipos nuevos) durante la meiosis. Todos los derivados analizados, tanto F1 como F2, fueron capaces de fermentar sacarosa y de utilizar etanol como fuente de carbono (no mostrado).

### 3.1.4 Análisis de la inestabilidad cariotípica de la cepa DC5.

#### 3.1.4.1 Inestabilidad mitótica

El análisis de la inestabilidad cariotípica de la cepa DC5 fue realizado por crecimiento de esta cepa en medio rico con sacarosa (YPS), mediante un método de resiembras consecutivas, hasta completar 100 doblajes (detallado en materiales y métodos).

---

El cariotipado de clones aislados tras 100 generaciones y su posterior comparación con el cariotipo del clon original (P, a generación 0, Figura 3-2A), reveló la aparición de nuevos polimorfismos cromosómicos en un amplio número de cromosomas (flechas blancas y barras verticales, Figura 3-2A), fenómeno que es entendido como un proceso de inestabilidad cariotípica.

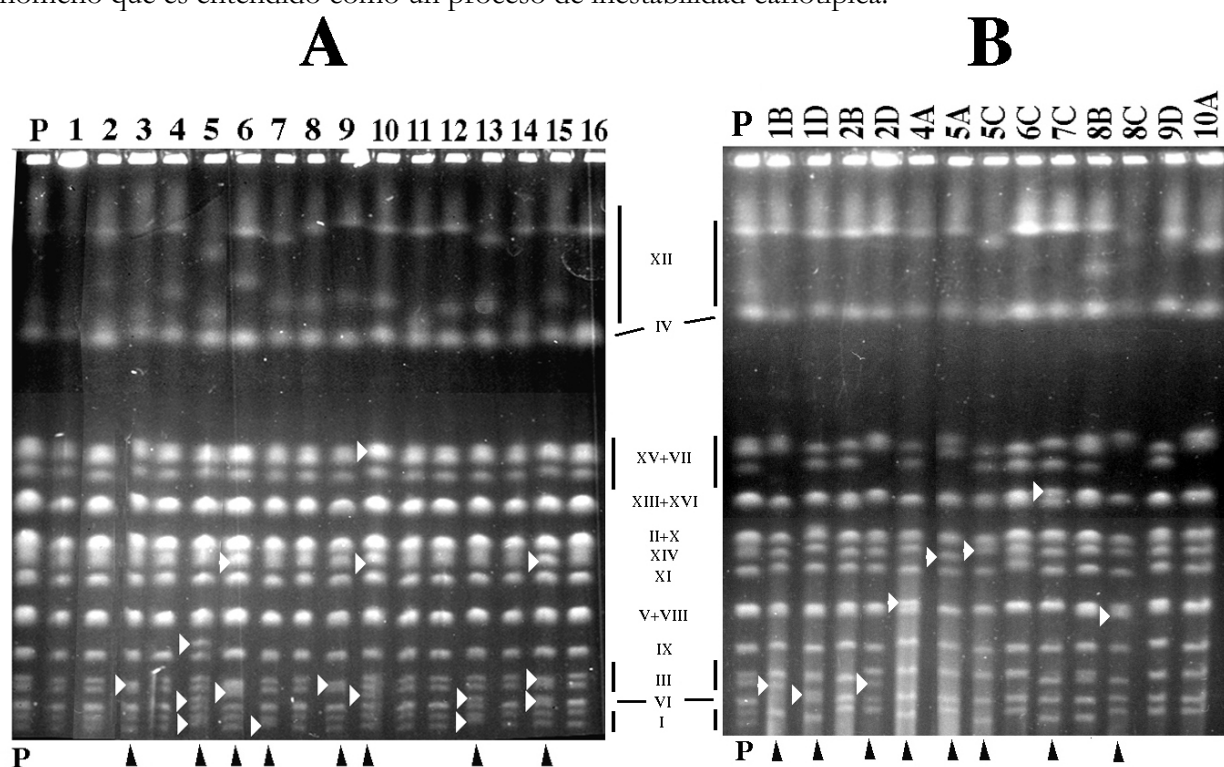


Figura 3-2. Análisis de la inestabilidad cariotípica. (A) Análisis de la inestabilidad cariotípica de la cepa DC5 en crecimiento mitótico. El cariotipo designado como P corresponde a un clon de DC5 en generación 0, mientras que el resto de cariotipos (1-16) corresponden a clones derivados del P tras 100 generaciones. La aparición de nuevos polimorfismos cromosómicos se indica por flechas blancas, y las variaciones clonales del cromosoma XII por barras verticales. Puede observarse como los clones que han cambiado con respecto al original aparecen marcados por una flecha negra en la base del gel. La adscripción de las diferentes bandas con el número de cromosoma correspondiente es meramente orientativa y en muchos de los casos se basa en la movilidad electroforética similar con la presentada por la cepa w303a (no mostrado). (B) Análisis de la inestabilidad cariotípica de derivados meióticos de la cepa DC5. Aparecen los cariotipos de los derivados monoespóridicos de la cepa DC5, designados por un número y una letra (Ej 1B), en referencia al asca de la cual provienen (número) y la posición en el asca (letra). La aparición de nuevos polimorfismos, los clones que los presentan y las variaciones clonales del cromosoma XII, se indican como en la figura A.

Durante el crecimiento vegetativo de la cepa DC5 se observaron variaciones en la mayoría de bandas cromosomales (Figura 3-2A).

La banda con mayor variabilidad correspondió precisamente al cromosoma de mayor tamaño, posteriormente identificado como cromosoma XII, y presenta variaciones de tamaño en prácticamente todos los derivados mitóticos de DC5 analizados (Figura 3-2A, barras verticales). Esta variabilidad resultó ser genéticamente independiente a la del resto de cromosomas y se discutirá en un apartado propio.

Se cariotiparon un total de 25 derivados mitóticos de la cepa DC5 tras 100 generaciones, en dos experimentos independientes, 16 de los cuales se muestran en la figura 3-2A. Un total de 14 cariotipos de los 25 analizados (un 56%) presentaron como mínimo algún nuevo polimorfismo cromosómico con respecto al clon original (marcados con una flecha negra, figura 3-2A, se excluyen variaciones en el cromosoma XII). Estos nuevos polimorfismos aparecieron distribuidos por todo el cariotipo, aunque fueron más frecuentes y evidentes en los cromosomas de mayor movilidad electroforética (parte baja del gel, figura 3-2A). A partir de la evaluación cualitativa de los resultados, se calculó la frecuencia de reorganización de la cepa DC5 en  $8.2 \times 10^{-3}$  cambios/clon/generación (ver material y métodos).

#### 3.1.4.2 Inestabilidad meiótica

El análisis de los cariotipos de los derivados meióticos F1 (figura 3-2B), mostró la segregación de los cromosomas de la cepa DC5, aunque aparecieron un conjunto de nuevas bandas no explicables meramente por un proceso puro de segregación, y que constituyeron nuevos polimorfismos cromosómicos (marcados con flechas blancas, Figura 3-2B). Estas variaciones se consideraron independientes de los cambios observados durante el crecimiento vegetativo, ya que todo el proceso necesario para el cariotipado de los derivados meióticos de DC5 requiere unas 15 divisiones mitóticas; si las reordenaciones observadas en los derivados F1 fuesen debidos a reorganizaciones mitóticas, la frecuencia de reorganización en DC5 debería de ser diez veces superior a la detectada.

### 3.1.5 Análisis de la inestabilidad cariotípica de los derivados F1

#### 3.1.5.1 Inestabilidad mitótica

El análisis de la inestabilidad cariotípica de los derivados F1 se realizó por el mismo ensayo que el descrito para la cepa parental DC5. El ensayo fue realizado con un total de 160 clones, estableciéndose para cada uno de los derivados F1 el correspondiente valor  $P_i$  (ver materiales y métodos).

El análisis de inestabilidad mostró derivados muy inestables y derivados muy estables (figura 3-

---



3). De los 14 derivados monoesporídicos F1 analizados, cuatro presentaron un alto grado de inestabilidad cariotípica, presentando nuevos polimorfismos cromosómicos en 46 clones de los 62 clones mitóticos analizados. La frecuencia de reordenación cromosómica de estos clones se estimó en  $1.3 \times 10^{-2}$  cambios/clon/generación, similar a la de la cepa parental DC5 ( $8.2 \times 10^{-3}$  cambios/clon/generación). Por el contrario, 9 de los 14 F1 analizados presentaron una baja tasa de inestabilidad cariotípica, con casi el 95 % (84 de 89) clones idénticos al parental, y una frecuencia de reordenación cromosómica de  $5.8 \times 10^{-4}$  cambios/clon /generación, unas catorce veces inferior a la de la cepa parental DC5.

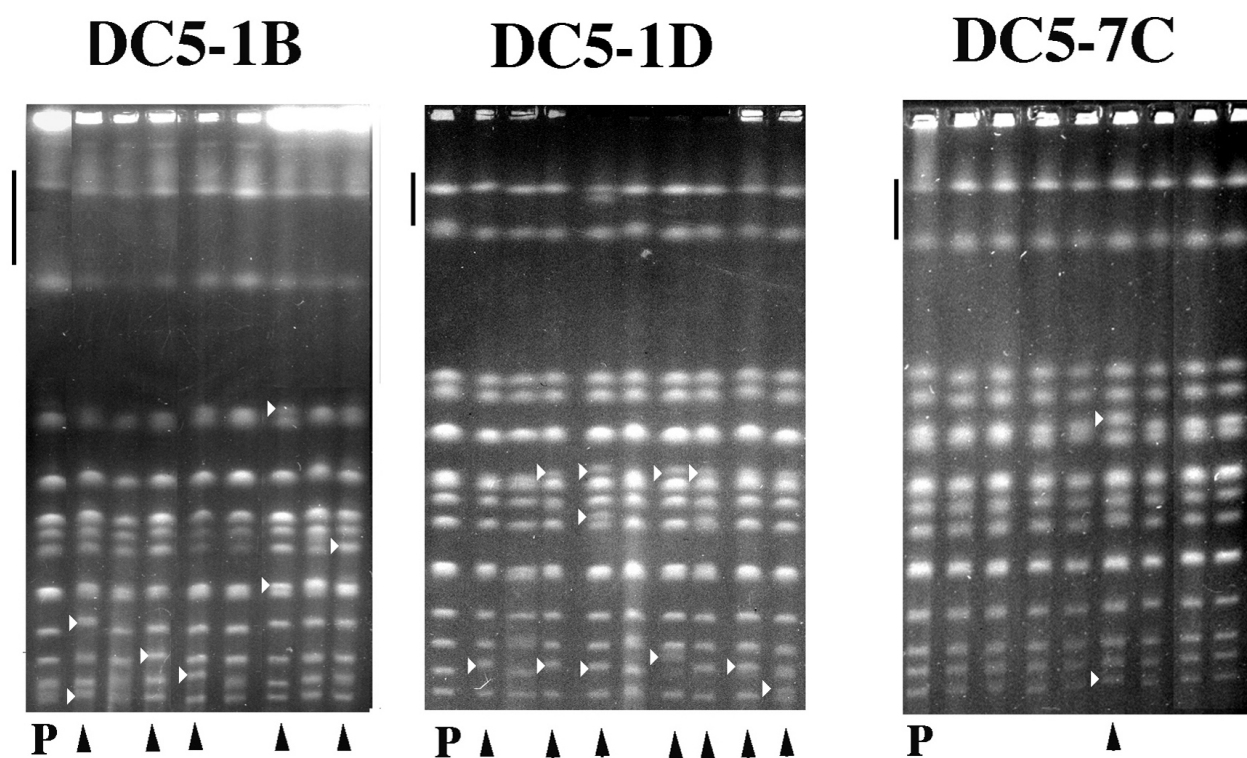


Figura 3-3. Inestabilidad mitótica de los derivados F1. Las indicaciones son las mismas que para la figura 3-1. En este caso corresponde a tres derivados F1, dos de los cuales presentan un alto número de polimorfismos en sus derivados mitóticos (DC5-1B y DC5-1D, indicados por flechas blancas), mientras que el otro presenta un único polimorfismo en uno de sus derivados mitóticos (DC5-7C), con respecto a sus cariotipos originales (P).

En otro de los derivados F1, el clon DC5-6C, ocurrió un desplazamiento del clon original por parte de un clon reordenado, el cual se impuso en el cultivo final (figura 3-3B). Se consideró que este tipo de evento era diferente al del resto del análisis y por lo tanto no fue incluido en el cálculo de frecuencias de reordenaciones anteriores (figura 3-3B).

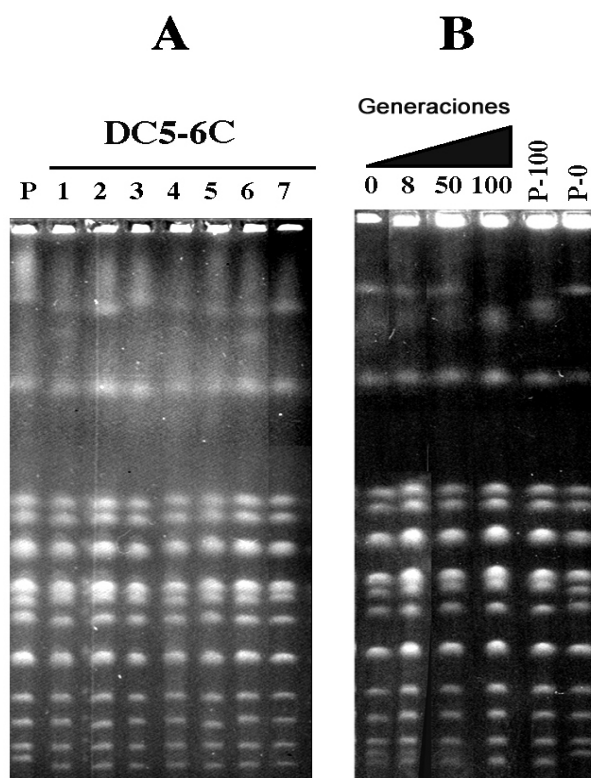


Figura 3-3B. Inestabilidad mitótica del derivado meiótico DC5-6C. A) Gel de PFGE correspondiente al cariotipo del derivado DC5-6C (P) y a siete derivados mitóticos de éste tras 100 generaciones. Puede observarse como todos los derivados mitóticos presentan el mismo cariotipo, pero diferente del clon P en el tamaño correspondiente al cromosoma I (banda de mayor movilidad electroforética, parte baja del gel) lo que se interpreta como un desplazamiento del cariotipo original por parte del cariotipo reordenado. B) Ensayo de desplazamiento del cariotipo original (cariotipo P-0) por parte del cariotipo reordenado (P-100). Se mezclaron dos clones con ambos tipos de cariotipos (P-0 y P-100) en las mismas concentraciones celulares (cariotipo O; puede apreciarse los dos cariotipos) y se hicieron crecer durante 100 generaciones. Puede apreciarse como a las 8 generaciones coexisten ambos cariotipos y como en la generación 50 el cariotipo P-0 prácticamente ha sido desplazado. A las 100 generaciones tan solo se aprecia el cariotipo P-100.

### 3.1.5.2 Inestabilidad meiótica.

Para el análisis de la inestabilidad meiótica de los derivados F1, se analizaron derivados meióticos completos (cuatro esporas de cada tétrada) para las cepas DC5-1B, DC5-2B y DC5-7C. De estas tres cepas, la primera era inestable en crecimiento mitótico ( $P_i$  de 0.38), mientras que las otras dos resultaron estables ( $P_s$  de 1 y 0.88 respectivamente).

La figura 3-4 muestra el cariotipo de 16 esporas procedentes de cuatro tétradas provenientes de la cepa DC5-1B, de las cuales 13 presentaron nuevos polimorfismos cromosómicos con respecto al clon parental.

Esta situación contrasta con la observada para los derivados meióticos de las cepas DC5-2B y DC5-7C (figura 3-4), que presentaron sin excepción cariotipos idénticos a los clones parentales.

Todos los derivados estables en mitosis eran a su vez estables en meiosis, mientras que los mitóticamente inestables también lo eran en meiosis. Podemos por lo tanto concluir que la inestabilidad mitótica y la meiótica cosegregan en estas cepas.

### 3.1.6 Análisis de la inestabilidad cariotípica de los derivados F2.

Los derivados F2 fueron sometidos a crecimiento mitótico hasta completar 100 generaciones en medio rico con sacarosa (YPS), de manera similar a los derivados F1.

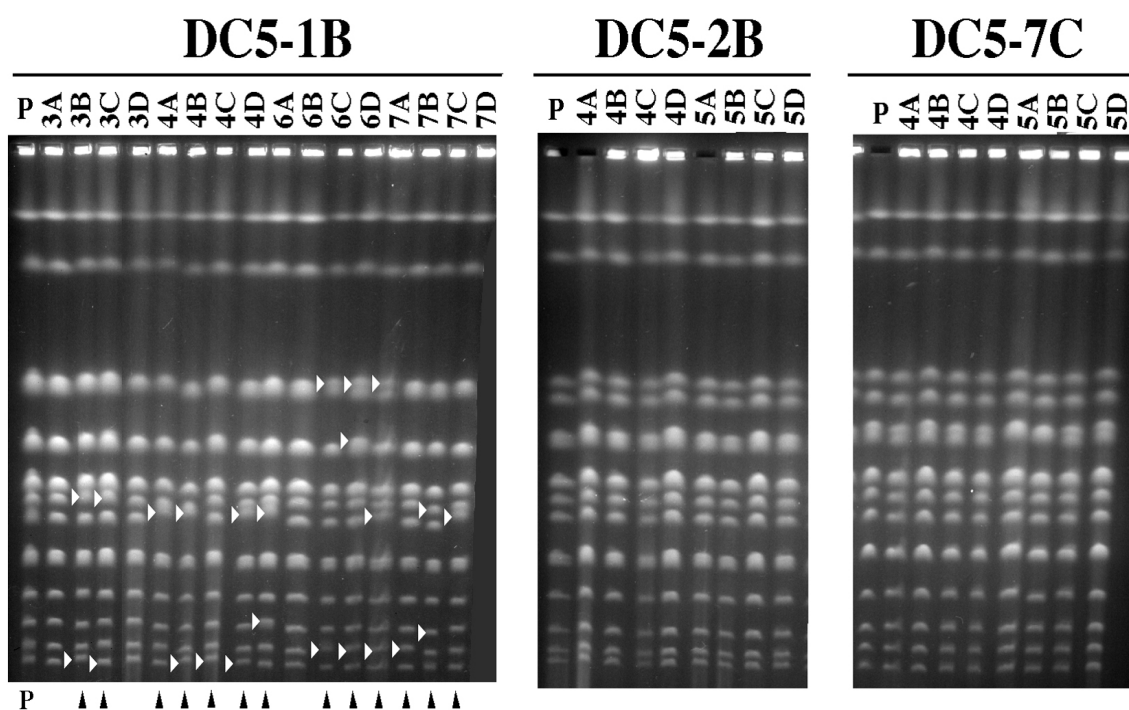


Figura 3-4. Análisis de la inestabilidad cariotípica meiótica en los derivados F1. La figura muestra los polimorfismos cromosómicos en los cariotipos meióticos de cuatro tétradas completas (tétradas 3, 4, 6 y 7) de la cepa mitóticamente inestable (DC5-1B) y la no aparición de polimorfismos en los cariotipos meióticos de dos tétradas completas de dos cepas estables mitóticamente (cepas DC5-2B y DC5-7C respectivamente).

Todos los derivados F2 (tabla 3-2, apartado *derivados de DC5-2B y DC5-7C*) provenientes de las cepas estables DC5-2B y DC5-7C fueron estables, es decir, todos sus derivados mitóticos presentaron cariotipos idénticos a sus parentales (figura 3-5). De 139 clones analizados, un total de 132 eran idénticos al clon original, lo que representaba un 95% de similitud y una frecuencia de reordenación cromosómica de  $5.2 \times 10^{-4}$  cambios/clon/generación.

Cepas	Test metabólicos				Inestabilidad cariotípica		
	Crecimiento				Clones analizados	P <sub>i</sub>	Variantes Cromosoma XII
	MM	SC	BIGGY	H <sub>2</sub> S			
<b>Parental</b>							
DC5	+	+	+	+	25	0,44	++
<b>Derivados F1</b>							
DC5-1B	+	+	+	+	21	0,38	-
DC5-1D	-	-	-	-	24	0,25	+
DC5-2B	-	+	-	-	9	1,00	+
DC5-2D	-	+	+	-	9	0,00	-
DC5-4A	-	+	+	+	9	1,00	-
DC5-4B	-	-	-	-	9	1,00	-
DC5-5A	-	-	-	-	9	0,89	-
DC5-5C	+	+	+	+	9	1,00	-
DC5-6C	+	+	+	+	9	0,00	+
DC5-7C	-	+	+	-	8	0,88	-
DC5-8B	+	+	+	+	9	1,00	-
DC5-8C	-	-	-	-	8	0,25	++
DC5-9D	+	+	+	+	18	0,83	++
DC5-10A	+	+	+	+	9	1,00	-
<b>Derivados F2</b>							
<i>Derivados de DC5-1B</i>							
DC51-3A	+	+	+	+	9	0,89	-
DC51-3B	+	+	+	+	9	0,00	-
DC51-3C	+	+	+	+	7	0,00	-
DC51-3D	+	+	+	+	9	0,33	+
DC51-4A	+	+	+	+	9	0,00	-
DC51-4B	+	+	+	+	9	1,00	-
DC51-4C	+	+	+	+	7	0,29	-
DC51-4D	+	+	+	+	9	0,44	-
DC51-6A	+	+	+	+	9	0,33	+
DC51-6B	+	+	+	+	8	0,25	+
DC51-6C	+	+	+	+	9	0,33	-
DC51-6D	+	+	+	+	9	0,78	-
DC51-7A	+	+	+	+	9	0,22	-
DC51-7B	+	+	+	+	9	0,33	-
DC51-7C	+	+	+	+	9	0,56	-
DC51-7D	+	+	+	+	9	0,67	-
<i>Derivados de DC5-2B</i>							
DC52-4A	-	-	-	-	9	1,00	-
DC52-4B	-	-	-	-	8	1,00	-
DC52-4C	-	-	-	-	8	1,00	-
DC52-4D	-	-	-	-	7	0,86	+
DC52-5A	-	-	-	-	9	1,00	+
DC52-5B	-	-	-	-	9	1,00	-
DC52-5C	-	-	-	-	9	1,00	+
DC52-5D	-	-	-	-	9	1,00	+
<i>Derivados de DC5-7C</i>							
DC57-4A	-	+	+	-	9	0,89	-
DC57-4B	-	+	+	-	9	0,89	-
DC57-4C	-	+	+	-	9	1,00	-
DC57-4D	-	+	+	-	8	0,88	-
DC57-5A	-	+	+	-	9	0,78	+
DC57-5B	-	+	+	-	9	0,89	+
DC57-5C	-	+	+	-	9	1,00	+
DC57-5D	-	+	+	-	9	1,00	-

Tabla 3-2. Propiedades metabólicas y moleculares de la cepa DC5 y de los derivados F1 y F2. En dicha tabla aparecen los test metabólicos de crecimiento en medio mínimo (MM), medio completo (SC), biggy agar (BIGGY) y producción de compuestos sulfurados ( $\text{SH}_2$ ). Se muestran los datos de inestabilidad cariotípica correspondientes al número de clones analizados, fracción de clones iguales al parental (Pi) y presencia de variantes del cromosoma XII [ muy frecuentes (++) , frecuentes (+) o ausentes (-)].

El análisis de los derivados F2 de la cepa inestable DC5-1B (tabla 3-2, listado de *derivados de DC5-1B*) reveló la aparición de derivados estables e inestables en crecimiento mitótico. Así las cepas DC51-3A, DC51-4B y DC51-6D, presentaron muy pocos clones reorganizados tras 100 generaciones y  $P_i$  de 0.89, 1 y 0.78 respectivamente (tabla 3-2). Contrariamente, el resto de cepas mostraron un alto porcentaje de clones reorganizados tras 100 generaciones (82 clones de 139 analizados), con una tasa global de reordenación de  $8.9 \times 10^{-3}$ , similar a la de la cepa parental DC5 (Figura 3-5, tabla 3-2).

### 3.1.7 Repetibilidad del ensayo

Por razones prácticas, el estudio se limitó al análisis de 9 clones en cada ensayo de inestabilidad. Con el objeto de descartar factores estocásticos, se realizó un conjunto de repeticiones y un análisis estadístico de éstas. Se realizaron repeticiones de los ensayos de inestabilidad con clones diferentes de las mismas cepas; de la cepa original DC5, de dos derivados inestables F1 (DC5-1B y DC5-1D) y de uno estable (DC5-9D). Los resultados obtenidos de la repetición (tabla 3-3) y los resultados del primer ensayo fueron sometidos a un test de contingencia 2 x 2. No se obtuvieron diferencias significativas entre el primer ensayo y su repetición para ninguna de las cepas dentro de un nivel de confianza del 95%, lo que indicaba que el proceso no era estocástico. Complementariamente la media de los dos datos (primer ensayo y repetición) de cada una de las cepas inestables (DC5-1B y DC5-1D) no presentaron diferencias significativas con respecto a los datos de la cepa DC5, mientras que estos últimos presentaron diferencias significativas con los datos de la cepa DC5-9D (estable), con un nivel de confianza del 95%.

Cepa	DC5		DC5-1B		DC5-1D		DC5-9D	
	r	n	r	n	r	n	r	n
Experimento 1	10	9	7	5	7	2	1	8
Experimento 2	4	2	6	3	11	4	2	7
Exp. 1 vs Exp. 2	p> 0.1		p> 0.1		p> 0.1		p> 0.1	
Total vs DC5	N/A		p> 0.1		p> 0.1		P<0.01	

Tabla 3-3. Repetibilidad del ensayo de inestabilidad cariotípica. Para cada una de las cepas (DC5, DC5-1B, DC5-1D y DC5-9D) se realizó dos experimentos (1 y 2) de inestabilidad cariotípica, con dos clones independientes. El valor r corresponde al número de cariotipos con nuevos polimorfismos cromosómicos con respecto al original (parental), mientras que el valor n corresponde al número de cariotipos iguales al parental. La suma de ambos valores corresponde al número total de clones analizados para cada experimento y para cada cepa.

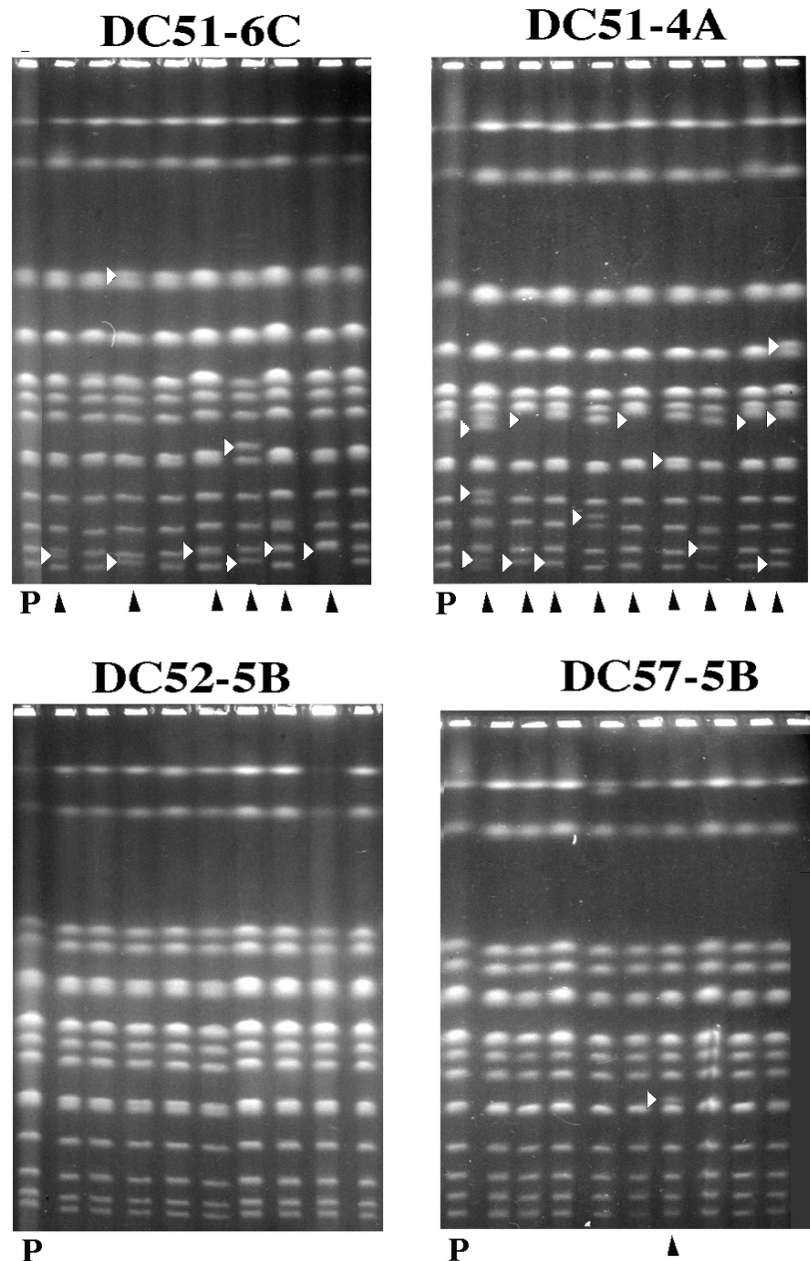


Figura 3-5. Análisis de la inestabilidad cariotípica mitótica de los derivados F2. La figura muestra la inestabilidad cariotípica mitótica de dos cepas F2 (DC51-6C y DC51-4A) derivadas de una cepa F1 inestable DC5-1B y la estabilidad cariotípica mitótica de dos cepas F2 derivadas de sendas cepas F1 estables (DC5-2B y DC5-7C respectivamente).