

## Insorgenza dei mutanti *petite* in lievito

a cura di V. Soglio

L'utilizzo di ceppi di lievito mutanti consente agli scienziati di studiare particolari geni e fenomeni che avvengono all'interno della cellula. Tali mutazioni possono essere indotte ad hoc nella regione genomica in studio tramite sofisticate tecniche di biologia molecolare. Il protocollo qui riportato descrive come sia possibile generare dei mutanti ponendo cellule di un ceppo selvatico su un determinato terreno di crescita. Il mutante che si propone di generare è noto come '*petite*' e mostra delle modificazioni nel DNA mitocondriale, più raramente in quello nucleare, che alterano la via metabolica della respirazione.

### Obiettivo

Generare dei mutanti *petite* a partire da lievito con genotipo selvatico.

### Procedimento

#### Preparazione di piastre con terreno di crescita glucosio+glicerolo

- Pesare 10 g di estratto di lievito, 20 g di peptone e 2 g di D-glucosio.
- Mettere l'estratto di lievito in un becker contenente 500 ml di acqua deionizzata e mescolare fino a quando la polvere si è sciolta.
- Aggiungere il peptone e il D-glucosio e mescolare fino a quando le polveri si sono sciolte.
- Aggiungere 20 ml di glicerolo e portare il volume a 1 L con acqua deionizzata.
- Trasferire in una bottiglia, aggiungere 20 g di bacto agar e sterilizzare in autoclave per 10 minuti a 121°C.
- Lasciare raffreddare il terreno e versarne 25 ml circa in ogni piastra.
- Quando il terreno si è solidificato, conservare le piastre in frigorifero.

1. Trasferire 10 ml di terreno liquido YPD in una provetta da 15 ml e stemperarvi le cellule di lievito raccolte toccando con uno stuzzicadente una colonia cresciuta su piastra.
2. Miscelare usando il vortex o invertendo la provetta più volte.
3. Usando un'ansa a L, piastrare 20 µl di coltura di lievito su una piastra con terreno di crescita glucosio+glicerolo.
4. Per ottenere un numero significativo di colonie che mostrano il fenotipo dei mutanti *petite* (piccole dimensioni, vedi figura 1), preparare almeno una decina di piastre.
5. Porre le piastre a temperatura ambiente per due giorni o fino a quando le singole colonie diventano visibili.
6. Individuare le colonie con fenotipo *petite* e procedere con la selezione dei mutanti come descritto nel protocollo '*Selezione dei mutanti petite in lievito*'.



### Tempo previsto

40 minuti per la preparazione del terreno e 1 ora per il raffreddamento delle piastre  
30 minuti per l'esperimento

### Materiali e reagenti

- ✓ Estratto di lievito
- ✓ Peptone
- ✓ D-glucosio (destrosio)
- ✓ Glicerolo
- ✓ Bacto-agar
- ✓ Acqua deionizzata
- ✓ Becker
- ✓ Bottiglia
- ✓ Piastre Petri
- ✓ Piastra con colonie di lievito
- ✓ Terreno liquido YPD
- ✓ Provette da 15 ml
- ✓ Anse a L (sterili)
- ✓ Stuzzicadenti (sterili)
- ✓ Pipette graduate o pasteur

### Strumentazione

- ✓ Bilancia
- ✓ Autoclave
- ✓ Vortex (facoltativo)
- ✓ Micropipette e relativi puntali

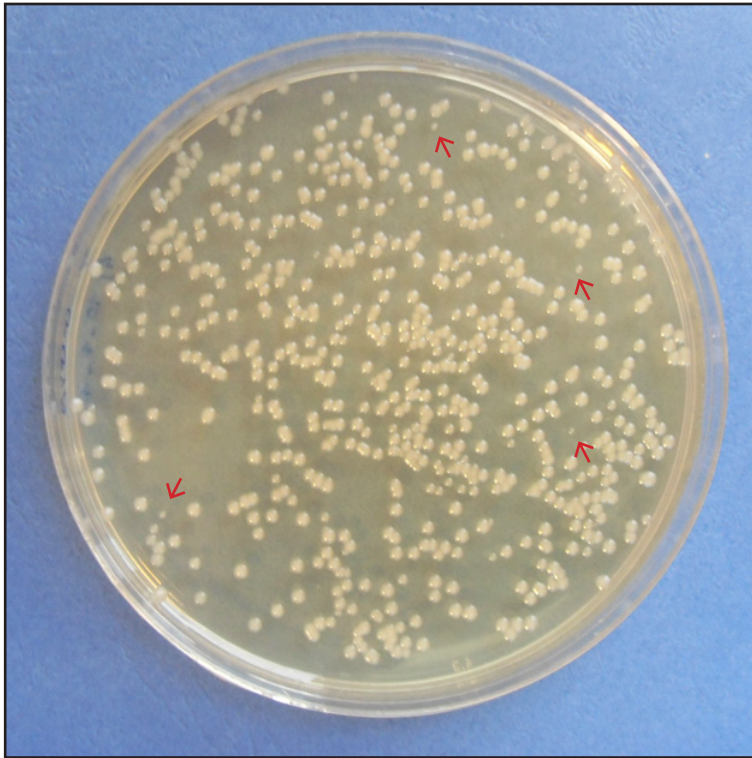


Figura 1  
Piastra con terreno di crescita glucosio+glicerolo:  
le colonie con fenotipo 'petite' sono indicate da  
freccie rosse

## Osservazioni

- I lieviti sono in grado di produrre energia utilizzando diverse fonti di carbonio e attivando di volta in volta l'opportuna via metabolica. Ecco alcuni esempi: il glucosio può essere degradato sia attraverso la respirazione che attraverso la fermentazione, il glicerolo solo attraverso la respirazione, mentre il maltosio solo per via fermentativa. Il fenotipo del mutante *petite*, come evidenziato dal nome, consiste in dimensioni ridotte delle cellule e di conseguenza delle colonie generate su piastra. Questa caratteristica è dovuta al rallentamento della crescita causata dall'incapacità di respirare, infatti essi usano il glucosio per produrre energia solo attraverso la fermentazione e non attraverso la respirazione.
- La mutazione *petite* ha una percentuale di insorgenza spontanea pari allo 0,1% - 1%, tuttavia essa può essere incrementata facendo crescere lieviti selvatici su un terreno contenente due fonti di carbonio: il glucosio allo 0,2% (lo zucchero sia respirabile che fermentabile) e il glicerolo al 2% (composto solo respirabile).
- Oltre alle dimensioni delle colonie, un'ulteriore conferma che si tratti di mutanti *petite* viene dalla loro incapacità di crescere su un terreno contenente una fonte di carbonio solo respirabile come il glicerolo (vedi protocollo 'Selezione dei mutanti *petite* in lievito').

## Referenze

O. Caryl Wallis and P.A. Whittaker - Induction of petite yeast mutation in yeast by starvation in glycerol - Journal of General Microbiology (1974) 84: 11-18