

UCH-FC
DOC-B
R437
c.l

**"ESTUDIO DEL MECANISMO DE INDUCCIÓN DE LA
FASE SEXUADA DEL CICLO REPRODUCTIVO DE
Xanthophyllomyces dendrorhous"**

Tesis

Entregada a la Universidad de Chile en

Cumplimiento parcial de los requisitos para optar
al grado de Doctor en Ciencias con mención en Microbiología

Facultad de Ciencias

Por

Patricio Edgardo Retamales Molina

Director de tesis: Dr. Victor Cifuentes Guzmán

Diciembre 2004





**FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE**

**INFORME DE APROBACIÓN
TESIS DE DOCTORADO**

Se informa a la Escuela de postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato:

Patricio Edgardo Retamales Molina

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la Tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Microbiología, en el examen de defensa de Tesis rendido el 17 de Noviembre de 2004.

Director de Tesis:
Dr. Víctor Cifuentes Guzmán

Comisión de Evaluación de Tesis:

Dra. Margarita Carú

Dra. Rosalba Lagos

Dr. Claudio Vásquez

A mis padres

María T. Molina y Edgardo Retamales

A mi Mujer Carolina Briones y a mí
Hija Fernanda Carolina

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a todas las personas e instituciones que de una u otra manera han hecho posible el desarrollo de esta Tesis. En especial a mi tutor el Dr. Victor Cifuentes por brindarme la oportunidad de trabajar en su laboratorio, por facilitar los medios materiales para realizar esta tesis y por darme su apoyo, preocupación, confianza y por haberme alentado en los momentos difíciles.

También al Dr. Germán Hermosilla, al Dr. Rubén León y a la Dra. Blanca Urzúa por su constante y desinteresado apoyo, por sus críticas y consejos.

A todos los miembros del Comité de Microbiología, por su preocupación y apoyo en todo el desarrollo de mis estudios de Doctorado. En especial a la Dra. Rosalba Lagos, al Dr. Claudio Vásquez y a la Dra. Margarita Carú por sus valiosos comentarios y correcciones de este trabajo.

A la Dra. Margarita Carú por su constante apoyo, preocupación y estímulo.

A la Dra. Eliana Canelo por su interés en mi formación y su estímulo.

Al Dr. Claudio Martínez por facilitar el equipo de electroforesis de campo pulsado CHEF DRII para análisis de basidiosporas.

Al Dr. Hector Toledo por facilitar los medios para los ensayos de extracción de proteínas y análisis de geles bidimensionales de proteínas.

A mi familia, a mi mujer carolina Briones por alentarme cuando las cosas no resultaban, por enseñarme a ser feliz. Por su comprensión, su generosidad, su fuerza, ternura y belleza. Por brindarme sus consejos y amistad pero por sobre todo por distinguirme con su amor. A nuestra hija Fernanda por darme la felicidad de su compañía, por sonreír... por existir.

A mis amigos del Laboratorio de Genética, Dionisia, Salvador, Rafael, Carla Lozano, Marisela Carmona, Mauricio Niklitschek y Marcelo Baeza, quienes han sido un valioso apoyo, una fuente inagotable de sugerencias, ideas, estímulo y amistad.

A mis amigos, Fabián Flores, Julio Maldonado, Juan Francisco Calderón y Galia Rivera por su amistad.

A mis padres Edgardo y María, a mis hermanas Catalina y Marcela Retamales que siempre me apoyaron e incentivaron a que siguiera estudios superiores.

A mis sobrinas Cony, Vale, Edgar y Vanesa por su cariño.

A mis amigos de la Rama de pesca deportiva "Bata Peñaflo".

A la Universidad de Chile, historia y futuro de nuestra patria por brindarme el honor de egresar de sus aulas. A la Fundación Maria Ghilardi Venegas por distinguirme con la beca de Doctorado. A todos los que me brindaron su amistad y apoyo, muchas gracias.

INDICE

	Página
AGRADECIMIENTOS	ii
ÍNDICE GENERAL	iii
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABLAS	viii
ABREVIATURAS	ix
RESUMEN	x
ABSTRACT	xiv
1. INTRODUCCION	1
2. MATERIALES Y METODOS	15
2.1. Material biológico	15
2.1.1. Levaduras	15
2.1.2. Plásmidos	15
2.2. Enzimas	15
2.3. Reactivos químicos y medios de cultivo	15
2.4. Cultivo de microorganismos	17
2.4.1. Levaduras	17
2.5. Mantenición de cepas	18
2.5.1. Mantenición de cepas de levadura	18
2.6. Mutagénesis	18
2.6.1. Nitrosoguanidina	18
2.6.2. Enriquecimiento de mutantes con nistatina	19
2.6.3. Selección de mutantes auxótrofos	20
2.6.4. Identificación de la auxotrofia	20
2.6.5. Selección e identificación de mutantes afectados en la carotenogénesis	22
2.6.6. Estabilidad de la mutación	22

2.7 Análisis parasexual	23
2.7.1. Obtención de protoplastos	23
2.7.2. Fusión de protoplastos	23
2.8. Análisis de cepas silvestres y mutantes morfológicos de <i>X. dendrorhous</i>	24
2.8.1 Curvas de crecimiento	25
2.8.2 Microscopía electrónica	25
2.8.3 Microscopía óptica	25
2.8.4. Análisis de pigmentos	26
2.8.5. Efecto del recambio de oxígeno sobre la esporulación	26
2.8.6. Análisis de segregación	27
2.8.7. Formación de estructuras sexuales	27
2.9. Determinación de las condiciones que inducen la germinación de basidiosporas	28
2.9.1. Tipo de medio sólido	28
2.9.2. Recurso de nitrógeno	28
2.9.3. Fuente de carbono	29
2.9.4. Temperatura	29
2.10. Micromanipulación	30
2.10.1. Micromanipulación de las basidiosporas	30
2.11. Purificación de ácidos nucleicos	30
2.11.1 DNA plasmidial	30
2.11.2. Extracción de ácidos nucleicos	31
2.12. Análisis de cariotipo electroforético	32
2.12.1. Preparación de DNA cromosómico intacto de <i>X. dendrorhous</i>	32
2.12.2. Electroforesis de campo pulsado (CHEF)	33
2.13. Transformación	33
2.13.1 Electroporación de células de <i>X. dendrorhous</i>	34
3. RESULTADOS	35
3.1. Determinación de las condiciones de germinación de basidiosporas	35
3.2. Obtención de marcadores genéticos en <i>X. dendrorhous</i>	38

3.2.1. Mutantes auxótrofos de la cepa tipo VKMY2786 de <i>X. dendrorhous</i>	38
3.2.2. Determinación de las frecuencias de mutagénesis en <i>X. dendrorhous</i>	41
3.2.3. Propiedades de la cepa S3-88 de <i>X. dendrorhous</i>	44
3.2.3.1. Efecto del recambio de Oxígeno	44
3.2.4. Identificación de los requerimientos nutricionales	46
3.3. Mutantes afectados en la carotenogénesis en las cepas VKM Y2786 y S3-88	48
3.3.1. Análisis de mutantes afectados en la carotenogénesis	48
3.3.2. Estabilidad de los mutantes de carotenogénesis	48
3.4. Relaciones entre niveles de esporulación y germinación en <i>X. dendrorhous</i>	50
3.5. Mutantes afectados en la esporulación en <i>X. dendrorhous</i>	52
3.6. Mutantes afectados en la morfogénesis sexual en <i>X. dendrorhous</i>	52
3.6.1. Análisis de mutantes morfológicos mediante microscopía óptica	54
3.6.2. Análisis de cepas silvestres mediante microscopía electrónica de barrido	54
3.7. Análisis de basidiosporas de <i>X. dendrorhous</i>	57
3.7.1. Análisis de basidiosporas por electroforesis de campo pulsado	59
3.8. Complementación de cepas afectadas en la esporulación en <i>X. dendrorhous</i>	61
3.8.1. Fusión de protoplastos de cepas afectadas en la esporulación	61
3.8.1.1. Análisis de complementación mediante fusión de protoplastos	61
3.8.2. Análisis de complementación mediante transformación genética	65
3.9. Análisis genético de basidiosporas y determinación de relaciones de ligamiento en <i>X. dendrorhous</i> .	67
4. DISCUSION	75
4.1. Condiciones de esporulación y germinación de basidiosporas en <i>X. dendrorhous</i>	75
4.2. Mutantes auxótrofos y afectados en la carotenogénesis en <i>X. dendrorhous</i> .	78
4.3. Efecto del recambio de oxígeno sobre el fenotipo de hiper-esporulación	81
4.4. Mutantes afectados en la esporulación en <i>X. dendrorhous</i>	82
4.5. Microscopía electrónica de Barrido (SEM).	85
4.6. Polimorfismo cromosómico en esporas de <i>X. dendrorhous</i> .	89
4.7. Análisis de complementación en <i>X. dendrorhous</i> mediante fusión de protoplastos.	90

4.8. Recombinación meiótica y determinación de relaciones de ligamiento en <i>X. dendrorhous</i> .	92
4.9. Modelo del ciclo de desarrollo sexual	94
4.10. Disección genética del ciclo reproductivo en <i>X. dendrorhous</i>	95
5. CONCLUSIONES	100
6. PROYECCIONES	102
Apéndice N°1	105
Apéndice N°2	108
BIBLIOGRAFÍA	109

LISTA DE FIGURAS

	Página
Fig. 1 : Características macro y microscópicas de la cepa mutante VKMY2786S3-88 de <i>X. dendrorhous</i> .	37
Fig. 2 : Efecto del recambio de oxígeno sobre la esporulación en la cepa S3-88 de <i>X. dendrorhous</i> .	45
Fig. 3 : Fotografías de mutantes afectados en la morfogénesis de estructuras sexuales en <i>X. dendrorhous</i> .	55
Fig. 4 : Fotografías de holobasidios y basidiosporas terminales obtenidas mediante microscopía electrónica en la cepa silvestre UCD-67 385 de <i>X. dendrorhous</i> .	57
Fig. 5 : Fotografías de holobasidios y basidiosporas terminales obtenidas mediante microscopía electrónica en la cepa tipo VKMY2786 de <i>X. dendrorhous</i> .	58
Fig. 6 : Análisis de campo pulsado (CHEF) de colonias originadas a partir de basidiosporas de la cepa silvestre UCD-67 385 de <i>X. dendrorhous</i> .	60
Fig. 7 : Colonias sectorizadas hol+/hol- a partir de cepas fusantes prototrofas de <i>X. dendrorhous</i> .	64
Fig. 8 : Análisis de mutantes auxótrofos utilizados en experimentos de fusión	68
Fig. 9 : Fusante protótrofo FS1AB obtenido en experimentos de fusión de protoplastos	69
Fig. 10: Análisis de segregación mitótica de marcadores de auxotrofia a partir del fusante FS1AB.	71
Fig. 11: Análisis de basidiosporas de la cepa FS1AB de <i>X. dendrorhous</i> .	72
Fig. 12: Determinación de relaciones de ligamiento en la cepa FS1AB de <i>X. dendrorhous</i> .	74
Fig. 13: Modelo del ciclo reproductivo sexual de <i>X. dendrorhous</i> .	96

LISTA DE TABLAS

	Página
Tabla 1 : Cepas utilizadas en este estudio	16
Tabla 2 : Mezclas de aminoácidos utilizados en la identificación de requerimientos de auxotrofia en mutantes de <i>X. dendrorhous</i> .	21
Tabla 3 : Porcentaje de germinación de basidiosporas sometidas a distintos pulsos de temperatura.	36
Tabla 4 : Lista de mutantes obtenidas a partir de la cepa tipo VKM Y2786 de <i>X. dendrorhous</i> .	39
Tabla 5 : Frecuencia de obtención mutantes auxótrofos y porcentajes de sobrevivencia en cepas silvestres y mutantes de <i>X. dendrorhous</i>	42
Tabla 6 : Número y tipo de mutantes auxótrofos obtenidos en eventos de mutagénesis independientes, en cepas con fondo genético UCD 67-385 y VKM Y2786 de <i>X. dendrorhous</i> .	43
Tabla 7 : Lista de mutantes auxótrofos de la cepa S3-88 (<i>hol</i> ⁺) de <i>X. dendrorhous</i> .	47
Tabla 8 : Número de mutantes afectados en la síntesis de pigmentos carotenoides en cepas con fondo genético VKM Y2786 de <i>X. dendrorhous</i> .	49
Tabla 9 : Análisis del nivel de esporulación y viabilidad de basidiosporas en cepas silvestres y mutantes de <i>X. dendrorhous</i> .	51
Tabla 10 : Niveles de esporulación en cepas silvestres y mutantes en <i>X. dendrorhous</i>	53
Tabla 11 : Fusión de protoplastos de cepas auxótrofas y afectadas en la producción de holobasidios en <i>X. dendrorhous</i>	62
Tabla 12 : Electroporación de la cepa S3-88 A15-40 <i>pro</i> ⁻ <i>hol</i> ⁻ de <i>X. dendrorhous</i> .	66
Tabla 13 : Fenotipo, genotipo y número de basidiosporas originadas a partir del sector naranja del fusante FS1AB de <i>X. dendrorhous</i>	73

ABREVIATURAS

cm	Centímetro
DAPI	4,6-diamino-2-fenilindol
DO	Densidad óptica
EDTA	Ácido etilén diamino tetraacético
h	Horas
kb	Kilobases
min	Minutos
mg	Miligramo
Mb	Megabases
MMv	medio mínimo Vogel
MMv-KCl	medio mínimo Vogel, KCl 0,8M
NTG	N-metil-N'-nitro-nitrosoguanidina
PBS	tampón fosfato salino para tinción DAPI
PEG	polietilenglicol
ppm	microgramo por gramo de levadura seca
RAPD	polimorfismo del DNA por amplificación al azar
RFLP	polimorfismo de largo de los fragmentos de restricción
s	segundos
SDS	dodecil sulfato de sodio
Tris	tris(hidroximetil)aminoetano
um	Unidades mapa de recombinación
UV	Ultravioleta
YM	medio rico para <i>X. dendrorhous</i>
YM-KCl	medio rico, KCl 0,8M

RESUMEN

Xanthophyllomyces dendrorhous es una levadura basidiomicete, carotenogénica, de alto interés biotecnológico que forma cuerpos fructíferos compuestos de largos holobasidios con basidiosporas terminales.

En este trabajo se propone que en *X. dendrorhous* el desarrollo de holobasidios con basidiosporas terminales estaría mediado por un mecanismo de inducción morfológica de estructuras sexuales como respuesta a ciertos estímulos ambientales, y controlado por determinantes genéticos específicos. En virtud de esto, sería posible obtener mutantes que den cuenta de la presencia de genes que controlan etapas específicas de inducción y morfogénesis de estructuras sexuales o de las condiciones de esporulación y germinación. En este sentido, se han examinado las condiciones que inducen la germinación de esporas en *X. dendrorhous*. Un factor importante para la germinación resultó ser un pulso de baja temperatura. Así, al someter las basidiosporas a un pulso de frío de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 20 min y luego incubando a $22\text{ }^{\circ}\text{C}$ se logró obtener hasta un 30 % de germinación en la cepa silvestre UCD67-385. Paralelamente, cultivos obtenidos a partir de basidiosporas individuales de la cepa UCD 67-385 fueron analizados mediante electroforesis de campo pulsado, encontrándose presencia de rearrreglos cromosómicos. En otra cepa silvestre, VKM Y2786 (cepa tipo de *X. dendrorhous*) se ha observado entre el 75 % y 95 % de germinación en las condiciones anteriormente descritas. En esta cepa se obtuvieron mutantes de pigmentación y auxótrofos con una frecuencia de 0.02, equivalente a un orden de magnitud mayor que las frecuencias observadas en la cepa UCD 67-385. Lo anterior sugiere la posibilidad de una condición haploide para la cepa silvestre VKM

Y2786. Paralelamente, el análisis de la estructura de holobasidios con basidiosporas terminales mediante microscopia electrónica de barrido, ha revelado la presencia de alteraciones estructurales en la pared de basidiosporas de la cepa UCD 67-385. Estas poseen una morfología irregular, colapsada y rugosa, lo que podría estar relacionado con los bajos niveles de germinación, y por lo tanto, con su viabilidad.

Por otra parte, ha sido posible generar tres grupos diferentes de mutantes afectados en las condiciones de esporulación, denominados como grupo A, B y C. El grupo A está constituido por mutantes incapaces de producir estructuras sexuales en cualquiera de las condiciones analizadas. A este grupo pertenecen los mutantes S3-33 y S4-63, probablemente bloqueados en determinantes genéticos esenciales para la vía de esporulación y en este estudio se han denominado *hoΓ*. En el grupo B, se ubicó a aquellos mutantes desregulados que producen estructuras sexuales a 9 °C tanto en medio mínimo, MMv como en medio completo, YM. A este grupo pertenecen los mutantes S4-70, H1, H2 y H35, posiblemente afectados en determinantes genéticos que coordinarían un “sistema sensor de nutrientes”. Al Grupo C pertenece el mutante S3-88, el cual presenta un fenotipo de colonia clara y superficie aterciopelada debido a la gran cantidad de holobasidios en la superficie de la colonia. Además, se caracteriza por sobreproducir estructuras sexuales en forma desregulada, en medio mínimo, y medio completo, tanto a 9 como a 22 °C. Estos resultados sugieren que en esta cepa podrían estar afectados determinantes genéticos maestros, que controlarían un sistema “sensor de nutrientes” y otro “sensor de temperatura”, o bien en determinantes genéticos que integrarían ambos sistemas.

Paralelamente, ha sido posible generar diferentes mutantes específicos de ciclo sexual en *X. dendrorhous*, afectados en etapas específicas del programa de diferenciación morfológica de estructuras sexuales. Las más importantes son la cepa *bas2* que produce holobasidios pero no genera basidiosporas terminales, indicando que existen determinantes genéticos específicos, que controlan la producción de holobasidios independientemente de la producción de basidiosporas. Otra cepa es *curl1*, que genera holobasidios curvados y sugiere la presencia de determinantes genéticos que controlarían el desarrollo y morfología del holobasidio. Adicionalmente, la cepa *ger1* produce abundantes microcolonias por una acelerada germinación de basidiosporas. Estas microcolonias pueden generar nuevamente holobasidios, lo cual reafirma la hipótesis de una posible naturaleza homotálica del sistema de apareamiento de *X. dendrorhous*, al menos en lo que respecta a cepas con fondo genético VKM Y2786.

Por otro lado, el análisis genético parasexual mediante fusión de protoplastos, ha permitido realizar estudios de complementación y establecer relaciones de alelismo entre diferentes cepas auxótrofas portadoras del mismo fenotipo hol^- . Así las cepas dobles mutantes, S3-88A15-40 (*pro^- hol2^-*) y S3-88A9-32 (*asp^- hol8^-*) complementan sus respectivas mutaciones *hol1^-*, indicando que ambas mutaciones, *hol2^-* y *hol8^-*, no son alélicas, y sugiriendo la presencia de dos grupos de complementación *hol1^-*; a los que hemos denominado *holA* y *holB*. Paralelamente, experimentos de transformación genética de la cepa S3-88A15-40 (*pro^- hol2^-*), con DNA de la genoteca de la levadura resultaron negativos. Sin embargo, en estos mismos experimentos fue posible rescatar colonias transformantes que crecen en medio mínimo. Lo anterior sugiere que en la genoteca esta presente el gen *PRO+* silvestre de *X. dendrorhous*, que complementa la mutación *pro^-* de

la cepa S3-88A15-40 (*pro⁻ hol2⁻*). Paralelamente se generó un sistema de análisis genético de basidiosporas provenientes de fusantes protótrofos, lo cual permitió determinar relaciones de complementación y definir relaciones de ligamiento entre varios marcadores genéticos.

Finalmente, el análisis fenotípico de los mutantes obtenidos en este trabajo, sugiere la presencia de determinantes genéticos que controlarían específicamente la producción del holobasidio, la formación de la basidiospora, el tiempo de germinación de la espora, la germinación propiamente tal, y las condiciones de esporulación en *X. dendrorhous*. Lo anterior ha permitido proponer un modelo, en el cual, a través de la disección genética de mutantes morfológicos, afectados en las condiciones de esporulación y germinación, se definirían distintas etapas del ciclo reproductivo sexual de *X. dendrorhous*. Este modelo, sugiere un proceso mediado por mecanismos que integran variables ambientales con el ciclo sexual, e involucra a la célula en una secuencia temporal de cambios morfológicos, lo que indudablemente lleva asociado una secuencia de cambios en el programa genético y bioquímico que será necesario estudiar en trabajos futuros.

ABSTRACT

Xanthophyllomyces dendrorhous is a basidiomycetous carotenoid-producing yeast, of high industrial interest that presents formation of fruitful bodies with long and slender holobasidia with terminal basidiospores.

In this work we propose that in *X. dendrorhous* the holobasidia development with terminal basidiospores, would be mediated by a mechanism of morphological induction of sexual structures that answer to certain environmental stimuli, and controlled for specific genetic element. By virtue of this, it would be possible to obtain mutants that give information of the presence of genes that control specific stages of induction and morphogenesis of sexual structures, or of the sporulation conditions and germination. We have examined the conditions that induce the germination of spores in *X. dendrorhous*. An important factor for the germination is a pulse of low temperature. When the basidiospores were subjected to a cold pulse at -20 °C for 25 minutes and then incubated at 22 °C, it was possible to obtain until 30 percent of germination in the wild-type strain UCD67-385. Parallely, cultures obtained from individual basidiospores of strain UCD 67-385 were analyzed by means of pulse field gel electrophoresis, revealing evidences of chromosomal exchange and meiotic recombination. On the other hand, we found that chromosome polymorphism has been generated in spores of *X. dendrorhous*. In another wild-type strain, VKMY2786, which corresponds to the type strain of *X. dendrorhous*, between 75 and 95 percent of germination has been observed under the previously described conditions. In this strain we have obtained mutants of pigmentation and auxotroph with a frequency of 0.02, two orders greater than the frequencies

observed in strain UCD 67-385. In addition, our results provide genetic evidence for a diploid state in *X. dendrorhous* associated to a natural heterozygous state in the wild-type strain UCD 67-385. Similarly, the observations carried out in strain VKMY2786 suggest the possibility of a lower ploidy level compared to strain UCD 67-385, which is haploid. Parallely, analysis of the fine structure by electronic microscopy of holobasidia with terminal basidiospores of *X. dendrorhous*, has revealed the presence of structural alterations in the wall of the basidiospores of strain UCD67-385. These possess an irregular, collapsed and rough morphology, that could be related with the low germination levels, and therefore, with their lower viability.

On the other hand, by means of mutagenic experiments it has been possible to define three different groups of mutants affected in the sporulation conditions, denominated groups A, B and C. The first group (Group A) is constituted by mutants unable to produce sexual structures in any of the analyzed conditions. The mutants belonging to this group are VS3-33 and VS4-63, presumably blocked in a critical genetic element for the sporulation pathway (hol^-). Group B, included mutants that produce sexual structures at 9 °C in minimal medium, MMv, as well as in complete medium, YM. The mutants in this group are S4-70, H1, H2 and H35, possibly affected in genetic elements that would code for a "sensor system of nutrients". Group C is composed by mutant VS3-88, which presents a velvet phenotype of clear colony due to the great quantity of holobasidia on the surface of the colony, it overproduces sexual structures in minimal and complete medium, so much to 9 as to 22 °C. These results suggest that in this strain it may be affected in a master genetic element that controls both "nutrients sensing" and a "temperature sensing" mechanisms, or in genes that

would integrate both systems. Parallely, it has been possible to generate mutants of *X. dendrorhous* affected in different stages of the program of morphological differentiation of sexual structures. The most important mutant is strain *bas2* that produces holobasidia but does not generate terminal basidiospores, indicating that there is specific genetic elements controlling the holobasidia production independently of the basidiospore production. Another strain is *curl* that generates curved holobasidia suggesting the presence of genes that control the development and morphology of holobasidia. Additionally, the strain *ger1* produces abundant micro-colonies for quick basidiospore germination. Interestingly, these micro-colonies generate holobasidia again, which reaffirms the hypothesis of a possible homothallic nature of the mating system of *X. dendrorhous*.

On the other hand, the parasexual genetic analysis by protoplast fusion, has allowed us to carry out complementation studies and to establish allelic relationships among different auxotrophic strains that carry the same *hol⁻* phenotype. The double mutants strains, S3-88A15-40 (*pro⁻ hol2⁻*) and S3-88A9-32 (*asp⁻ hol8⁻*) produced prototroph colonies that complement their respective *hol⁻* mutation, indicating that both *hol2⁻* and *hol8⁻*, are not allelic, and suggesting the presence of two groups of *hol⁻* complementation that we have denominated *holA* and *holB*.

On the other hand, genetic transformation experiments of strain S3-88A15-40 (*pro⁻ hol2⁻*), with DNA from the yeast genetic library were negative. However, in these same experiments it has been possible to rescue colonies that grow in minimal medium. The afore mentioned suggests that the wild type gene *PRO⁺* of *X. dendrorhous* is present in the genetic library and it complement the *pro⁻* mutation of strain S3 88A15-40.

Finally, the phenotypic analysis of the mutants obtained in this work, suggests the presence of genes that control the production of the holobasidia, the formation of the basidiospore, the spore germination time, the germination and sporulation conditions in *X. dendrorhous*. The above-mentioned has allowed us to propose a model, in which, through the genetic dissection of morphological mutants, and other mutants affected in the sporulation conditions and germination, different stages of the sexual reproductive cycle of *X. dendrorhous* can be defined. This model suggests a process mediated by mechanisms that integrate environmental variables with the sexual cycle, and involves to the cell in a temporary sequence of morphological changes, that undoubtedly is associate to a sequence of changes in the genetic and biochemical program that will be necessary to study in the future.

1. INTRODUCCION

Xanthophyllomyces dendrorhous es una levadura basidiomicete con la capacidad de fermentar glucosa y sintetizar pigmentos carotenoides, principalmente astaxantina, lo cual ha orientado los estudios especialmente hacia el conocimiento de aspectos biotecnológicos de la carotenogénesis (Verdoes et al., 1999a; Andrewes et al., 1976; An et al., 1989; Adrio et al., 1992; Calo et al., 1995). Esto, básicamente se debe a que representa una importante fuente natural de pigmento para la industria de la salmicultura (Johnson et al., 1977). En atención a esto, se han realizado esfuerzos tendientes a optimizar diversos parámetros asociados a aspectos industriales y biotecnológicos. Algunos de ellos se han centrado en la optimización de sus condiciones de crecimiento (Okagbue & Lewis, 1984a; Haard, 1988; Fang & Cheng, 1993; Meyer & Du Preez, 1994a; Meyer & Du Preez, 1994b) o en determinar el efecto de diferentes compuestos sobre la producción de carotenoides (Meyer & Du Preez, 1993; Meyer et al., 1994; Fontana et al., 1997). Otros estudios se han orientado al desarrollo de distintos métodos para extraer el pigmento desde las células de *X. dendrorhous* (Johnson et al., 1978; Okagbue & Lewis, 1984b; Okagbue & Lewis, 1985) o conocer las propiedades nutricionales de *X. dendrorhous* poniendo énfasis en la absorción de sus pigmentos en peces como la trucha arcoiris y el salmón (Johnson et al., 1977; Gentles & Haard, 1991; Sanderson & Jolly, 1994).

Esta levadura de color rojo-naranja ha sido aislada de exudados de árboles caducos de regiones montañosas y frías de Alaska, Japón y Rusia (Phaff *et al.*, 1989), tiene las características estructurales y fisiológicas para ser clasificada como Basidiomicete (Miller *et al.*, 1976; Golubev., 1995., Yamada *et al.*, 1989). *X. dendrorhous* se caracteriza por la capacidad de fermentar glucosa, poseer una pared celular estructurada en multicapas y sintetizar pigmentos carotenoides tales como fitoeno, neurosporeno, licopeno, β -caroteno, equinenona, 3-hidroxi equinenona, fenicoxantina y otros, siendo astaxantina su pigmento principal (Johnson and Lewis, 1979; Johnson *et al.*, 1977; Johnson, 1992). Sus células son elipsoidales de 3.8 a 7.5 μm por 5.5 a 10.5 μm , uninucleadas y frecuentemente yeman en el mismo lugar generando una cicatriz propia de basidiomicetes.

En atención a su posible utilización biotecnológica varios laboratorios han intentado aumentar la producción de astaxantina a través de procedimientos genéticos. Así por ejemplo, se han llevado a cabo experimentos de mutagénesis empleando luz ultravioleta, nitrosoguanidina, etilmetanosulfanato, etc. con el fin de aislar mutantes sobreproductores de astaxantina y reunir información para comprender su biosíntesis y función en la levadura (An *et al.*, 1989; An *et al.*, 1991; Calo *et al.*, 1995; Girard *et al.*, 1994; León *et al.*, 1995; Lewis *et al.*, 1990; Meyer *et al.*, 1993; Retamales *et al.*, 1998a). Los mutantes sobreproductores pueden llegar a sintetizar hasta 8 veces la cantidad de astaxantina de una cepa silvestre (la cual no sobrepasa los 400 ppm) aunque también se han obtenido mutantes que acumulan otros pigmentos, como β -caroteno, fitoeno, etc.

(An *et al.*, 1989; Girard *et al.*, 1994; Calo *et al.*, 1995; Martínez 1995; Cifuentes *et al.*, 1997).

Por otro lado, la imposibilidad de realizar ensayos de cruzamientos dirigidos en *X. dendrorhous* ha influenciado el desarrollo de técnicas de genética parasexual. Con respecto a esto, la fusión de protoplastos ha sido utilizada como una herramienta de análisis genético parasexual que permite superar los problemas impuestos por barreras de hibridación intra e inter-específico (Chun *et al.*, 1992; Sarachek, *et al.*, 1981; Retamales *et al.*, 1998a). De esta manera, experimentos de fusión de protoplastos entre cepas mutantes de *X. dendrorhous* han permitido el mejoramiento genético de la producción de astaxantina especialmente en la cepa UCD 67-385 y UCD 67-210 (Miller *et al.*, 1976; Chun *et al.*, 1992). En dichos estudios, se han utilizado dobles mutantes auxótrofos y sobreproductores para generar clones híbridos hiperproductores de astaxantina (Chun *et al.*, 1992). En estos últimos, mediante análisis de tinción de núcleos y por la formación de cepas recombinantes se han confirmado eventos de cariogamia que conducen a la segregación mitótica de los marcadores auxótrofos parentales (Chun *et al.*, 1992). Adicionalmente, a partir de experimentos con cepas sobreproductoras de astaxantina, mutantes albinas, mutantes que acumulan β -caroteno y cepas silvestres se ha llegado a establecer el papel protector de los carotenoides contra el estrés oxidativo impuesto sobre *X. dendrorhous* por sustancias antifúngicas fotogeneradas por el árbol huésped del género *Betula* (Schroeder & Johnson, 1993). Además, otras investigaciones han determinado que el oxígeno (Schroeder & Johnson, 1995) y la luz (An & Johnson, 1990; Meyer & Du Preez, 1994c) tienen un papel importante en la regulación de la biosíntesis de carotenoides. Aspectos moleculares de la vía de biosíntesis de astaxantina

regulando la concentración de proteínas fitoeno desaturasa y fitoeno sintasa-licopeno ciclasa dependiendo de las condiciones fisiológicas y medio-ambientales (Lodato *et al.*, 2003).

El origen filogenético de *P. rhodozyma*, formalmente *X. dendrorhous*, fue definido como basidiomicete por Miller *et al.* (1976), basándose en su habilidad para hidrolizar urea (Lewis *et al.*, 1990), la alta proporción de α -1,3-glucano en su pared celular, la incapacidad de utilizar inositol, la formación de compuestos amiloides y además por producir pigmentos carotenoides los cuales no se observan en levaduras ascomicetes. Las propiedades más importantes que definen su origen basidiomicete son la pared celular estructurada en multicapas y la cicatriz dejada por repetidas yemaciones en el mismo lugar. Finalmente, su origen basidiomicete ha sido confirmado por la presencia de un sistema ubiquinona Q-10, característico de basidiomicetes, por los resultados del análisis filogenético de las secuencias parciales de los RNA ribosomales 18S y 26S (Yamada & Kawasaki, 1989; Yamada *et al.*, 1990) del gen de actina (Wery *et al.*, 1996) y por su ciclo reproductivo sexual (Golubev 1995).

Para obtener información sobre el estado de ploidía de *X. dendrorhous* se han realizado estudios basados en el espectro de mutantes auxótrofos, análisis de complementación genética y recombinación mitótica (Hermosilla *et al.*, 2003). La cepa silvestre UCD 67-385 fue sometida a tratamiento mutagénico utilizando NTG y mutantes auxótrofos afectados en la carotenogénesis fueron forzados a revertir. Revertantes protótrofos y productores de pigmentos se comportaron como diploides, excepto para mutantes afectados en la síntesis de adenina (Hermosilla *et al.*, 2003; Calo

et al., 1996). Estos resultados son congruentes con el espectro restringido de mutantes obtenidos en esta cepa para el locus *ADE1* (Retamales *et al.*, 1998a). Así, los datos presentados por Hermosilla *et al.*, 2003 sugieren que la cepa UCD 67-385 de *X. dendrorhous* es diploide y que el locus *ADE1* presentaría una constitución heterocigótica. Un hecho similar fue observado en *Candida albicans* (Poulter *et al.*, 1982; Scherer *et al.*, 1990). En ambos casos la frecuencia restringida de obtención de mutantes auxótrofos fue interpretada como el resultado de un evento de recombinación mitótica inducido por el tratamiento mutagénico (Whelan *et al.*, 1980, 1982; Hermosilla *et al.*, 2003). En otro trabajo se reportó la presencia de cambios en la distribución topológica de microtúbulos y filamentos de actina y estos cambios se han correlacionado con variaciones en la morfología de células conjugantes y con la formación de la yema durante el ciclo de desarrollo de *X. dendrorhous* (Slaninová *et al.*, 1999).

El género *Xanthophyllomyces* descrito por Golubev en 1995, esta representado por una sola especie *Xanthophyllomyces dendrorhous* que corresponde al estado teleomórfico de *Phaffia rhodozyma* (Golubev, 1995). El género anamorfo *Phaffia* fue descrito por Miller en el año 1976 y está representado por una sola especie, *Phaffia rhodozyma* (Miller *et al.*, 1976). En general la mayoría de las levaduras basidiomicetes son heterotálicas, y el apareamiento de cepas compatibles es un requisito para obtener la fase sexual. Sin embargo, todos los intentos de obtener el estado sexual de *Phaffia rhodozyma* mezclando cepas diferentes han resultado infructuosos. En 1995 Golubev obtuvo un resultado positivo utilizando medios de cultivo conteniendo polioles como inductores de la fase sexual. Los estudios de Golubev, en *X. dendrorhous*, han establecido que los polialcoholes, inducen la conjugación entre una célula madre y su

célula hija con la subsecuente formación de un holobasidio de 70 a 80 μm de largo por 3 a 4 μm de ancho, con basidiosporas terminales ovales o elipsoidales de 4 a 8 μm de diámetro. Debido a que este tipo de estructuras sexuales es desconocida en levaduras basidiomicetes, Golubev ha propuesto un nuevo género y especie *Xanthophyllomyces dendrorhous* (Golubev., 1995).

La información disponible en otros sistemas puede entregar importantes enfoques y metodologías para el estudio de la fase reproductiva sexual de *X. dendrorhous*. Por ejemplo en la levadura ascomicete *S. cerevisiae* la esporulación involucra un programa regulado de morfogénesis celular que incluye un período de replicación pre-meiótico de DNA, dos divisiones meióticas, y la encapsulación de un núcleo haploide en el interior de la ascospora (Esposito, *et al.*, 1981). La esporulación es iniciada cuando células diploides MATa/MATa son desarrolladas en medio sin nitrógeno en presencia de una fuente de carbono no fermentable, tal como acetato, y está bajo el control de genes regulatorios maestros tales como *IME1*, *IME2*, y *RME1* (Mitchell, 1994). La progresión a través del programa de esporulación depende de la expresión secuencial de al menos cuatro grupos distintos de genes específicos de esporulación, clasificados como: genes tempranos, intermedios, intermedio-tardíos y tardíos (Mitchell, 1994). Los genes intermedio-tardíos y tardíos se activan durante el periodo de división meiótica y formación de la espora. La activación se acompaña de una serie de cambios morfológicos que resultan en la formación de la espora. Estos cambios incluyen (i) la formación de un saco membranoso aplanado (la pared de la proespora), (ii) el crecimiento de la pared de la proespora a lo largo de la superficie

externa de la envoltura nuclear, (iii) la separación de la pared de la proespora y la envoltura nuclear desde los cuerpos polares del huso miótico y el movimiento de citoplasma y organelos (iv) el sellado final de los lóbulos nucleares (conteniendo el set de cromosomas haploides y el citoplasma asociado), y (v) la deposición de los componentes de la pared de la espora entre las dos membranas (Mitchell, 1994).

Distintos enfoques han comenzado a aplicarse en el estudio del ciclo de vida de *S. cerevisiae* y muchos de ellos también podrían ser aplicados en *X. dendrorhous*. Uno de estos corresponde al análisis de "Differential Display" de mRNA de cultivos vegetativos y en fase de inducción meiótica (Spellman *et al.*, 1998; Kirsten *et al.*, 2001). Esto ha permitido identificar al menos cinco clases de genes que son expresados diferencialmente durante el programa esporulación. Uno de los mRNA (o su cDNA) corresponde al gen *SSP1* el cual se expresa durante la etapa medio-tardía de la meiosis. En un mutante, *ssp1*, la recombinación meiótica es normal pero la viabilidad de las esporas está fuertemente disminuida. Ambas divisiones meióticas ocurren en los tiempos normales, sin embargo la fracción de células que completa la meiosis es severamente reducida y los núcleos presentan fragmentación hacia el final de la meiosis II. Así, el homocigoto diploide *ssp1* es incapaz de completar la esporulación y por lo tanto no forma ascosporas viables. Adicionalmente, la mutación *ssp1* no afecta la división mitótica ni el desarrollo vegetativo. Su efecto tampoco está relacionado con eventos que alteren al sistema microtúbulo-citoesqueleto y es independiente de las etapas de segregación de cromosomas (Nag *et al.*, 1997). Mediante otras estrategias, se han realizado recientemente análisis dirigidos a identificar genes específicos involucrados en la meiosis y la formación de esporas. Estos estudios se han basado en análisis de la expresión

completa del genoma (Kirsten *et al.*, 2001; Spellman *et al.*, 1998). En uno de estos trabajos se logró identificar 301 marcos de lectura abierto (ORFs) los cuales son preferencialmente expresados en células meióticas. Estos genes han sido identificados mediante el análisis de los perfiles de expresión de mRNA utilizando técnicas de microarray (Kirsten *et al.*, 2001). Para facilitar la detección de mutantes afectados en la segregación de cromosomas, el cromosoma V de la cepa parental fue marcado con GFP. El resultado de estos estudios indicó que 33 ORFs específicos fueron requeridos para la apropiada segregación de cromosomas. Uno de ellos (*MAMI*) es esencial para la mono-orientación de cinetocoros hermanos durante la meiosis I, un proceso específico de la meiosis el cual forma las bases de la segregación de alelos a los diferentes gametos. Dos genes (*MND1* y *MND2*) están implicados en el proceso de recombinación y otros dos (*SMA1* y *SMA2*) son requeridos para la síntesis apropiada de la membrana de la proespora. En total, mediante estos procedimientos se han identificado 28 genes esenciales para la formación del asca en *S. cerevisiae* (Kirsten *et al.*, 2001).

En hongos y levaduras, a diferencia de lo que ocurre en eucariontes superiores, los estudios de recombinación meiótica están limitados a unas pocas especies donde se conoce la fase sexual de su ciclo reproductivo. La razón de ello se debe fundamentalmente a la compleja conducta y a la elaborada sucesión de estados de vida en estos organismos. Además el desarrollo de la fase sexual requiere para su expresión un gran número de genes diferentes y en muchos casos factores ambientales específicos y difíciles de identificar (Pincheira, 1996). El cambio del ciclo celular mitótico, que en hongos y levaduras se asocia al desarrollo vegetativo, a la reproducción sexual, constituye una de las decisiones celulares fundamentales en organismos eucarióticos. En

algunas levaduras donde el conocimiento de la fase sexual es extenso, se ha demostrado la presencia de complejos sistemas de apareamiento (Zickler *et al.*, 1995).

En las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* y *Schizosaccharomyces pombe*, un simple locus define el tipo de apareamiento generando dos tipos de células haploides, α y a que pueden desarrollarse vegetativamente mediante su ciclo celular mitótico. Este locus maestro define tanto la conjugación que conduce a un estado diploide como el inicio de la meiosis y la subsecuente formación de ascosporas. (Zickler *et al.*, 1995). En estas levaduras, sustancias químicas de naturaleza lipopeptídicas llamadas feromonas y receptores de estas feromonas constituyen los determinantes primarios de la especificidad de apareamiento (Caldwell *et al.*, 1995). La reproducción sexual en ascomicetes filamentosos difiere de la que se observa en levaduras, antes y después del apareamiento (Zickler *et al.*, 1995). En levaduras el apareamiento es básicamente un proceso de reconocimiento celular, mientras que en ascomicetes filamentosos generalmente la diferenciación de estructuras sexuales “masculinas” y “femeninas” es prerequisite para la fertilización (Zickler *et al.*, 1995). Los mecanismos que permiten la diferenciación y la morfogénesis de estructuras sexuales son complejos. Esto ha impedido en muchos casos el desarrollo de estudios con metodologías genéticas clásicas.

Los estudios genéticos en *X. dendrorhous* son escasos y la mayoría consisten en experimentos de mutagénesis para aumentar la síntesis de astaxantina. Sin embargo, algunos de ellos han estado orientados a la obtención de marcadores genéticos que permitan el análisis genético-molecular de esta especie, como las mutaciones

auxotróficas (Adrio *et al.*, 1993; Chun *et al.*, 1992; Palagyi *et al.*, 1995; Retamales *et al.*, 1998a).

Existen pocos estudios sobre la constitución y organización genómica en *X. dendrorhous*. Al respecto, los resultados del análisis de RAPD en varias cepas de la levadura revelaron una alta variabilidad genética, en contraste con la baja variabilidad mostrada por los perfiles de isoenzimas (Varga *et al.*, 1995). Además, se ha descrito la presencia de cuatro moléculas de RNA de doble hebra en la cepa silvestre UCD 67-385. Estas moléculas parecen estar asociados a partículas tipo virus y al parecer codificarían un sistema “killer” (Castillo & Cifuentes, 1994). Otro elemento genético extracromosomal presente en *X. dendrorhous* son plásmidos de DNA lineal en la cepa UCD 67-210, de función desconocida hasta ahora. Sin embargo, recientes evidencias también sugieren un fenotipo “killer” (Martínez *et al.*, 1994). Por otro lado, se han realizado algunos experimentos tendientes a definir el cariotipo electroforético de *X. dendrorhous*. En estos, los resultados preliminares sugieren la presencia de un extenso polimorfismo cromosómico (Adrio *et al.*, 1995; Nagy *et al.*, 1994; Hermosilla *et al.*, 1996; Cifuentes *et al.*, 1997).

El escaso conocimiento genético de *X. dendrorhous* representa un enorme obstáculo para responder una serie de preguntas fundamentales sobre la generación y mantención de la alta diversidad genética en la especie, la naturaleza del polimorfismo cariotípico, la presencia de tipos de apareamiento u otros aspectos de su biología, como el control genético de la carotenogénesis. Además, aspectos de su ciclo de vida y nivel de ploidía resultan difíciles de estudiar debido a la imposibilidad de realizar análisis de recombinación meiótica. A la fecha no se conocen las condiciones en las cuales se

produce la germinación de basidiosporas, ni los genes que participan en la inducción de la esporulación. Tampoco se han descrito mutantes morfológicos afectados en la formación de estructuras sexuales o en la esporulación que permitan realizar estudios en la fase sexual de *X. dendrorhous*.

Al analizar cepas híbridas provenientes de experimentos de fusión de protoplastos realizados en nuestro laboratorio, se ha observado la formación de holobasidios con esporas terminales sin necesidad de utilizar alcoholes polihídricos (Retamales *et al.*, 2002). Se desconoce en qué medida la pedogamia o la fusión de células independientes participan en el proceso de inducción del ciclo sexual (Golubev, 1995). Además, se desconocen los mecanismos que participan en la formación de estructuras sexuales en cepas fusionadas que comparten un genoma común. Esto tiene gran relevancia debido al hecho que sistemas de incompatibilidad son ampliamente encontrados en hongos filamentosos, los cuales previenen la coexistencia de núcleos genéticamente diferentes en un citoplasma común tal como ocurre en la formación de heterocariones en *Podospora anserina* (Begueret *et al.*, 1994).

Por otro lado, la obtención de estructuras sexuales en fusantes protótrofos de *X. dendrorhous* sugiere la existencia de determinantes genéticos que controlarían el tipo de apareamiento mediante un sistema de naturaleza homotámica, el cual es necesario estudiar. Esto último permitiría explicar la formación de estructuras sexuales en cepas fusantes originadas a partir de parentales que comparten un genoma común (Retamales *et al.*, 1998b).

En hongos levaduriformes en los cuales no se conoce la fase sexual se han debido implementar sistemas de análisis genético parasexual, los cuales permiten



disponer de un mecanismo de análisis de núcleos portando marcadores genéticos distintos en un citoplasma común. Estos análisis han hecho posible la definición de relaciones de complementación, relaciones de ligamiento y alelismo mediante técnicas de fusión de protoplastos. Tales enfoques están siendo aplicados también en *X. dendrorhous*. Sin embargo, la existencia de la fase perfecta (Golubev, 1995, Retamales *et al.*, 2002), permite vislumbrar una opción de ampliar el conocimiento genético en base al estudio de la fase sexual de su ciclo reproductivo.

En nuestro laboratorio se han determinado las condiciones ambientales que permiten el desarrollo de estructuras sexuales en cepas silvestres y fusantes de *X. dendrorhous*, sin necesidad de utilizar polioles. Los factores más importantes que inducen la esporulación en esta levadura fueron la temperatura de incubación y la composición del medio de cultivo. A una temperatura de 9 °C fue posible obtener la mayor proporción de desarrollo de holobasidios por colonia. Utilizando medio mínimo suplementado con glucosa como única fuente de carbono a concentraciones entre 80 y 120 mM y nitrato de amonio a concentraciones de 28 mM se han obtenido resultados óptimos en la inducción de la esporulación (Retamales *et al.*, 2002). Un periodo de 20 o más días de incubación a 9 °C fue necesario para la formación de estructuras sexuales en la cepa silvestre UCD-67 385 y varias de sus mutantes. Adicionalmente se observó que cepas mutantes de *X. dendrorhous* tienen diferentes niveles de producción de holobasidios, y que cepas obtenidas después de la fusión de protoplastos presentan una capacidad incrementada para desarrollar holobasidios con basidiosporas terminales (Retamales *et al.*, 2002).

PROPOSITO DE LA TESIS

En relación a los antecedentes descritos, esta tesis tuvo como propósito contribuir al conocimiento de la fase sexual del ciclo reproductivo de *X. dendrorhous*, y entender el mecanismo de inducción de la formación de holobasidios con basidiosporas terminales. Para ello se realizó un estudio del mecanismo que permite la formación de estructuras sexuales mediante la obtención de mutantes morfológicos y afectados en las condiciones de esporulación. Paralelamente se desarrolló un sistema de análisis genético utilizando mutantes auxótrofos afectados en la carotenogénesis y morfológicos como marcadores genéticos apropiados. También se caracterizó las condiciones en las cuales ocurre la germinación de basidiosporas y se determinó la estructura de holobasidios y basidiosporas mediante microscopía electrónica. Finalmente, se caracterizaron los productos meióticos provenientes de fusantes protótrofos, originados a partir de experimentos de fusión de protoplastos de cepas auxótrofas portando marcadores de carotenogénesis y morfogénesis sexual. Esto último permitió generar un mapa de ligamiento entre los marcadores genéticos involucrados.

De acuerdo a los antecedentes descritos se plantea la siguiente hipótesis acerca de la fase sexual.

HIPOTESIS: “El desarrollo de holobasidios con basidiosporas terminales en *X. dendrorhous* sería mediado por un programa de inducción morfológica en respuesta a estímulos ambientales”.

ALTERNATIVAMENTE: “la producción de estructuras sexuales podría deberse a la presencia de tipos de apareamiento complementarios”.

2. MATERIALES Y METODOS

2.1. Material biológico

2.1.1 Levaduras: En la Tabla 1 se muestran los nombres, fenotipo y características relevantes de las cepas que se utilizaron en este trabajo. Las cepas silvestres de *X. dendrorhous* UCD 67-385 (ATCC24230) y UCD 67-210 (ATCC24202) fueron adquiridas desde American Type Culture Collection (ATCC) Rockville, MD, U.S.A. Las cepa tipo de *X. dendrorhous*, VKM Y2786, y las cepas VKM Y2266 y VKM Y2059 fueron obtenidas de la Colección Rusa de Microorganismos (VKM). Las cepas se mantuvieron liofilizadas mediante el procedimiento de perla deshidratada en gelatina (PDG) y las perlas fueron mantenidas en sílica a 4 °C. Otro grupo replica de cepas se ha congelado en glicerol 20% y se mantienen a -70 °C.

2.1.2 Plásmidos: El plásmido YIp5 (Sambrook *et al.*, 2001) se utilizó en experimentos de transformación de *X. dendrorhous*.

2.2. Enzimas: Las enzimas Novozyma234T y « Lysing enzymes » se obtuvieron de Sigma Chemical Co. St. Louis, Missouri, U.S.A.

2.3. Reactivos químicos y medios de cultivo. Los siguientes reactivos fueron adquiridos a las compañías que se indican:

De Sigma Chemical Co. St. Louis, Missouri, U.S.A.: L-Triptofano, L- Arginina, 2,4-dihidroxipirimidina(uracilo), Adenina, L-Ornitina, L-Treonina, L-Metionina, L-Histidina, Tiamina (Aneurina, vitamina B₁), L-Citrulina, L-Leucina, Ampicilina,

Tabla 1. Cepas utilizadas en este estudio

Cepa	Cepa parental	Fenotipo/características relevantes	Fuente/referencia
<i>X. dendrorhous</i>			
VKM Y2786		Silvestre cepa tipo	VKM
VKM Y2266		Silvestre	VKM
VKM Y2059		Silvestre	VKM
UCD 67-385		Silvestre (ATCC24230)	Miller <i>et al.</i> , 1976
UCD 67-210		Silvestre (ATCC24202)	ATCC
Atx3	UCD 67-385	Albino, acumula fitoeno	Martinez <i>et al.</i> , 1998.
Atx5	AtxS1	Amarillo, acumula β -caroteno.	Cifuentes <i>et al.</i> , 1997
Atx6 (leaky)	AtxS1	Amarillo, acumula β -caroteno.	Cifuentes <i>et al.</i> , 1997
Atx12	UCD 67-385	Albino	No publicado
AtxS1	UCD 67-385	Rojo, acumula astaxantina.	Cifuentes <i>et al.</i> , 1997
curl	VKM Y2786	holobasidios curvados	Este trabajo
bas2	VKM Y2786	holobasidios sin basidiosporas	Este trabajo
ger1	VKM Y2786	hiper-germinación de basidiosporas	Este trabajo
S4-70	VKM Y2786	Esporula en medio completo YM a 9 °C	Este trabajo
H1	VKM Y2786	Esporula en medio completo YM a 9 °C	Este trabajo
H2	VKM Y2786	Esporula en medio completo YM a 9 °C	Este trabajo
H35	VKM Y2786	Esporula en medio completo YM a 9 °C	Este trabajo
S3-33	VKM Y2786	<i>hol</i> ⁻ , no esporula	Este trabajo
S4-63	VKM Y2786	<i>hol</i> ⁻ , no esporula	Este trabajo
Atx5-holl	Atx5	<i>hol</i> ⁻ , no esporula	Este trabajo
S3-88	VKM Y2786	hiper-esporula en MMv e YM a 9 y 22 °C	Este trabajo
B1, B2	UCD 67-385	Basidiosporas hermanas	Este trabajo
A1	UCD 67-385	Basidiospora obtenida al azar.	Este trabajo
C1	UCD 67-385	Basidiospora obtenida al azar.	Este trabajo
D1	UCD 67-385	Basidiospora obtenida al azar.	Este trabajo
E1	UCD 67-385	Basidiospora obtenida al azar.	Este trabajo
F1	UCD 67-385	Basidiospora obtenida al azar.	Este trabajo
S3-88A15-40	S3-88	<i>Pro</i> ⁻ , <i>hol</i> ⁻	Este trabajo
S3-88A9-32	S3-88	<i>asp</i> ⁻ , <i>hol</i> ⁻	Este trabajo
A4-69	VKM Y2786	Fusante protótrofo <i>orn</i> ⁺ <i>sp</i> ⁺ <i>al</i> ⁺ <i>hol</i> ⁺	Este trabajo
A12-28	VKM Y2786	Fusante protótrofo <i>orn</i> ⁻ <i>sp</i> ⁻ <i>al</i> ⁺ <i>hol</i> ⁺	Este trabajo
Fs15	Atx5:Atx3	Fusante protótrofo rojo naranja	Retamales <i>et al.</i> , 1998
Fs1AB	A4-69:A12-28	Fusante protótrofo rojo naranja	Este trabajo
S12	Fs1AB	Segregante auxótrofo, rojo naranja	Este trabajo
S17	Fs1AB	Segregante auxótrofo, rojo	Este trabajo
S27	Fs1AB	Segregante auxótrofo, rojo naranja	Este trabajo
<i>S. cerevisiae</i>			
YNN295		Cepa control en CHEF	ATCC2046652

sacarosa, tetraciclina, X-gal 4,6-dimamino-2-fenilindol (DAPI), N-metil-N'-nitro-nitrosoguanidina (NTG).

De Merck Química Chilena Soc. Ltda.: acetato de amonio, acetato de potasio, acetona, ácido acético, ácido bórico, alcohol isoamílico, citrato de sodio, cloroformo, cloruro de calcio, cloruro de potasio, DTT, EDTA, etanol absoluto, éter de petróleo, fenol, formamida, glicerol, glucosa, hidróxido de potasio, hidróxido de sodio, nitrato de amonio, polietilenglicol 4000, sulfato de magnesio, tris-HCl. L-asparagina, L-fenilalanina, L-tirosina, L-serina, glicina, DL-valina, L(+)-alanina, sílica gel con indicador de humedad.

De Difco Laboratories, Detroit, Michigan U.S.A.: triptona, peptona, extracto de levadura, extracto de malta, agar-agar.

De Nutritional Biochemical Corporation U.S.A.: DL-isoleucina, L-cisteina.

De Scharlau Chemie S.A. La Jota, 86 08016- Barcelona. España.: Gelatina en polvo.

2.4. Cultivos de Microorganismos.

2.4.1. Levaduras: Las cepas de *X. dendrorhous* se crecieron en medio YM (Apéndice 1). Para los experimentos de fusión de protoplastos, la levadura se creció en medio mínimo Vogel (MMv) decrito para *Neurospora crassa* (Vogel, 1956) y suplementado con los aminoácidos requeridos. Los cultivos se incubaron a 22 °C con agitación constante.

2.5. Mantención de cepas.

2.5.1 Mantención de cepas de levadura. Las cepas de *X. dendrorhous* se crecieron en medio YM durante 7 días hasta una $DO_{550nm} = 1.2$ para luego congelarlas a -70 °C en presencia de glicerol a una concentración final de 20 a 30%. Paralelamente se desarrolló un método de almacenamiento de cepas mediante perlas deshidratadas de gelatina (PDG). En este último caso las cepas se crecieron en medio YM a 22 °C durante 5 días y un pellet de células (0,5 ml) fue mezclado con 0,5 ml de una solución al 20% de gelatina en polvo. La mezcla fue depositada en gotas sobre una placa de parafina sólida y posteriormente las gotas gelificadas fueron deshidratadas en sílica. Finalmente las perlas fueron retiradas con una pinza estéril, depositadas en tubos de plástico conteniendo sílica y una cubierta con algodón estéril. Finalmente los tubos se sellaron con Parafilm™ para evitar la rehidratación y fueron mantenidos 4 °C.

2.6 Mutagénesis.

2.6.1 Nitrosoguanidina: La mutagénesis con NTG se realizó de acuerdo al método descrito por León *et al* (1995) y modificado por Retamales *et al* (1998a). Para ello, se inoculó 20 ml de medio YM con 200 µl de un cultivo de *X. dendrorhous* a una concentración de 10^7 células/ml. El cultivo fue incubado a 22 °C con agitación constante a 250 rpm hasta una densidad óptica de 0.7 a 550 nm. Las células se colectaron por centrifugación a 7.000 rpm por 15 min en una centrífuga Sorvall RC-5B con un rotor SS-34 y se resuspendieron en 10 ml de tampón

citrato de sodio 100 mM, pH 5.5. Las células se lavaron con un volumen del tampón y luego resuspendidas en 4.6 ml, quedando la suspensión a una $DO_{550nm}=1.5$. Luego se agregó una solución fresca de NTG (1 mg/ml) para quedar a una concentración final de 50, 80 y 100 $\mu\text{g/ml}$. Las células se incubaron en presencia del mutágeno a 22 °C durante 30 min y los tubos fueron centrifugados a 7.000 rpm por 10 min. Las células se lavaron 4 veces con 5 ml de tampón fosfato de potasio 100 mM pH 7,0 se resuspendieron en 10 ml de medio YM y posteriormente fueron incubadas toda una noche a 22 °C. Finalmente, las células se traspasaron a un tubo Corex estéril y se sometieron a un protocolo de enriquecimiento de mutantes de auxotrofia con nistatina.

2.6.2. Enriquecimiento de mutantes con nistatina: Las células tratadas con NTG, fueron centrifugadas a 7.000 rpm por 10 min. Se resuspendió en 1 ml de MMv y se transfirió la suspensión a un matraz que contenía 20 ml de medio mínimo MMv. Se incubó a 22 °C por 5 h y después se agregó 0.2 ml de nistatina 1 mg/ml, para quedar a una concentración final de 10 $\mu\text{g/ml}$ final. Luego, se incubó a 22 °C por 1 h con agitación suave. El cultivo se centrifugó a 7000 rpm durante 10 min, se lavó dos veces con 10 ml de YM y se resuspendió en 1 ml de medio YM. Se preparó diluciones de 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3} de las cuales se plaquéan alícuotas de 100 μl en placas YM-agar y finalmente se incubaron a 22 °C durante 5-7 días.

2.6.3. Selección de mutantes auxótrofos: Los mutantes auxótrofos de *X. dendrorhous* fueron seleccionados basándose en su incapacidad para crecer en un medio mínimo MMv sin suplemento. Para ello, las células tratadas con el agente mutagénico fueron replicadas ordenadamente en placas con medios YM-agar y mínimo MMv-agar (Apéndice 1). Las colonias seleccionadas fueron sometidas a análisis para identificar la auxotrofia.

2.6.4. Identificación de la auxotrofia: Para determinar la deficiencia metabólica que portaban los potenciales mutantes auxótrofos, éstos fueron sembrados en placas MMv-agar suplementadas con distintos aminoácidos, bases nitrogenadas, vitaminas y combinaciones de estos. El procedimiento de caracterización del requerimiento, se basó en sembrar 200 µl de una suspensión de células de las cepas mutantes a una concentración de 10^7 cel/ml en MMv-agar. Sobre la placa sembrada se depositaron discos de papel estéril sobre los que se agregaron alícuotas de 10-20 µl de soluciones de los aminoácidos, bases nitrogenadas o vitaminas adecuadas, primero como una mezcla y luego en forma independiente. En la tabla 2 se muestran las mezclas de aminoácidos utilizadas en este trabajo (Rose *et al.*, 1990). A partir del patrón de crecimiento de una cepa en las mezclas de aminoácidos fue posible identificar el requerimiento específico de la cepa mutante.

Tabla 2. Mezclas de aminoácidos utilizados en la identificación de requerimientos de auxotrofia en mutantes de *X. dendrorhous*.

Pools	# 1	# 2	# 3	# 4	# 5
# 6	adenina	guanina	cisterna	metionina	uracilo
# 7	histidina	leucina	isoleucina	valina	lisina
# 8	fenilalanina	tirosina	triptofano	treonina	prolina
# 9	glutamato	serina	alanina	aspartato	arginina

2.6.5. Selección e identificación de mutantes afectados en carotenogénesis: Los mutantes en pigmentación fueron seleccionados sobre la base de sus características de coloración. Para ello se procedió a incubar las colonias por 7- 10 días en placas YM-agar. Posteriormente se realizó una inspección ocular y se seleccionó aquellas colonias que presentaban un fenotipo de color diferente a la cepa parental. Las colonias seleccionadas fueron replicadas en medios YM-agar y aquellas que mantuvieron una pigmentación alterada fueron guardadas según el punto 2.5.1. para su posterior estudio.

La identidad taxonómica de los mutantes seleccionados se realizó por análisis morfológico de las colonias y las células al microscopio. Además, se realizó un análisis de ácidos nucleicos totales en el cual se determinó la presencia de elementos extracromosómicos de RNA de doble hebra descritos en la cepa silvestre UCD 67-385 (Castillo & Cifuentes, 1994).

2.6.6 Estabilidad de la mutación: Los mutantes auxótrofos y morfológicos seleccionados se crecieron en medio YM a 22 °C durante 8 días. Posteriormente, el cultivo fue diluido 10^{-5} veces en tampón fosfato de sodio 100 mM, pH 7,0 y sembrado sobre medio YM-agar o medio mínimo MMv-agar. Luego de 7 días se analizaron las placas y se determinó el número de colonias revertantes sobre la base del cambio a fenotipo de color parental en el caso de los mutantes afectados en carotenogénesis, ó cambio a prototrofia en el caso de los mutantes auxótrofos

y como una reversión a la morfología de la cepa silvestre en el caso de los mutantes morfológicos.

2.7. Análisis parasexual.

2.7.1. Obtención de protoplastos: Para el desarrollo del análisis genético basado en parasexualidad, se realizó experimentos de fusión de protoplastos (Hermosilla, *et al.*, 1995; Hermosilla, *et al.*, 1997) con cepas mutantes afectadas en carotenogénesis y auxotrofia. Los protoplastos fueron obtenidos por degradación de la pared celular con Novozyma 234T en condiciones isosmóticas, utilizando KCl 0,8 M (Hermosilla, *et al.*, 1995). Cada cepa de *X. dendrorhous* fue crecida en 100 ml de medio mínimo MMv o medio completo YM hasta alcanzar una $DO_{550nm}=1.2$. Luego, las células se lavaron dos veces con KCl 0.8 M, se resuspendieron en 4.5 ml de KCl 0.8 M y luego se agregó novozima a una concentración final de 1,5 mg/ml, completando un volumen total de 5 ml. La mezcla fue incubada a 22 °C con agitación suave durante 12 h, tiempo en el cual se obtiene aproximadamente el 100% de protoplastos.

2.7.2. Fusión de protoplastos: Para la fusión de protoplastos se empleó polietilenglicol como ya ha sido descrito (Matsushima *et al.*, 1986; Poulter, *et al.*, 1981; Hermosilla, *et al.*, 1995). Los protoplastos fueron lavados tres veces con KCl 0.8 M, centrifugados a 3.500 rpm por 7 min y resuspendidos en 2 ml del mismo estabilizador osmótico (1×10^8 células/ml). La concentración de

protoplastos fue determinada por conteo directo con una cámara de Neubauer y por plaqueo en medio de regeneración YM-KCl-agar 0.7% (Apéndice 1).

Para la fusión, se mezcló aproximadamente 1×10^7 protoplastos de cada cepa parental y se centrifugó a 3.500 rpm por 7 min. Se resuspendieron en 1 ml de KCl 0.8 M, Tris-CaCl₂ 10 mM, PEG 4.000 26,4% y se incubaron 10 min a 22 °C. Luego la solución fue diluida con 6 ml de KCl 0.8 M, lavada dos veces con KCl 0.8 M y luego se resuspendió en 1 ml de medio YM o MMv (en el caso de cepas parentales auxótrofas) en presencia de KCl 0.8 M. Finalmente la mezcla de protoplastos fue incubada 45 min a 22 °C. Para el caso de mutantes de pigmentación, se depositó alícuotas de 100 µl en tubos que contenían 3 ml de medio de regeneración YM-KCl-agar 0.7% precalentado a 45 °C. Inmediatamente el contenido del tubo fue homogeneizado y depositado sobre placas que contenían medio YM-KCl-agar 2%. Las placas fueron incubadas a 22 °C durante 15 días para la aparición de colonias. En el caso de fusión entre mutantes auxótrofos se depositó alícuotas de 100 µl en tubos con 3 ml de medio MMv-KCl-agar 0,7% (Apéndice 1) precalentado a 45 °C. El contenido del tubo fue depositado inmediatamente sobre placas que contenían medio MM_v-KCl-agar 2%, incubando a 22 °C durante 15 días.

- 2.8. Análisis de cepas silvestres y mutantes morfológicos de *X. dendrorhous*:** Los mutantes originados en los experimentos de mutagénesis fueron sometidos a varios tipos de análisis para su caracterización tales como: curva de crecimiento,

microscopía electrónica de barrido, microscopía óptica, análisis de pigmentos, efecto de oxígeno en la esporulación, etc.

2.8.1. Curvas de crecimiento: Las cepas de *X. dendrorhous* fueron inoculados en matraces de 125 ml que contenían 10 ml de MM_v, a una DO_{550nm} inicial de 0,01. Se incubó a 22 °C con agitación constante y se registró el crecimiento como un aumento de la absorbancia a DO_{550nm} en un espectrofotómetro Shimadzu UV-150.

2.8.2. Microscopía electrónica: Para el análisis de microscopía electrónica de las estructuras sexuales de *X. dendrorhous*, las cepas mutantes y silvestres fueron esporuladas en las condiciones previamente definidas (Retamales *et al.*, 2002). Las colonias fueron tratadas directamente con glutaraldehído 3% en 25 mM de buffer fosfato de sodio pH 7.4 a temperatura ambiente por 2 h. Las preparaciones de holobasidios fueron tratada con soluciones de fijación y finalmente depositadas sobre una grilla de cobre donde fueron cubiertas con 10 µM de oro. Las observaciones se realizaron en un microscopio Phillips 300 con arreglo de scanner (SEM).

2.8.3. Microscopía óptica: Para el análisis de microscopía óptica las colonias esporuladas de diferentes cepas de *X. dendrorhous* fueron analizadas en un microscopio Carl Zeiss de epifluorescencia, modelo Axioscop 2, equipado con

una cámara fotográfica e integrado a un computador Pentium 4, utilizando un aumento de 10 X. Las fotografías fueron analizadas y editadas en Adobe Photoshop 7. Para el análisis de colonias sectorizadas generadas a partir de fusantes protótrofos las fotografías fueron obtenidas mediante una cámara Kodak DS 120.

2.8.4. Análisis de pigmentos: Para extraer y cuantificar los pigmentos en $\mu\text{g/g}$ (ppm) de las distintas cepas de levadura se procedió con una modificación del método descrito por An *et al.* (1989). Se depositó 10 a 15 mg de células en un tubo de vidrio de 20 x 150 mm que contenía 2.5 cm de perlas de vidrio de 0.5 mm de diámetro. El tubo se agitó durante 2 min en un vórtex a máxima velocidad y se agregó 6 ml de acetona. Se agitó nuevamente en vórtex por 1 min y se agregó 2 ml de una solución de NaCl 4% y 6 ml de éter de petróleo. El tubo se volvió a agitar en vórtex por 1 min y se centrifugó durante 6 min a 4.000 rpm en una centrífuga Sorvall a 4 °C. La fase éter se traspasó a un tubo de vidrio y se midió el volumen recuperado. Se midió la absorbancia de la fase éter y se estimó la concentración de pigmentos según el método descrito por An *et al.* (1989).

2.8.5. Efecto del recambio de oxígeno sobre la esporulación: Para evaluar el efecto del recambio de oxígeno sobre la esporulación en la cepa VKM Y2786S3-88, se procedió a sembrar esta cepa sobre placas de medio completo YM-agar. Posteriormente las placas fueron selladas con parafilm para evitar el intercambio

gaseoso con el medio. Paralelamente, se sembró placas control YM-agar, sin sellar, y fueron mantenidas en las mismas condiciones de temperatura para inducir la esporulación. Finalmente, las placas fueron analizadas en el tiempo contabilizando en el microscopio el número de holobasidios por colonia.

2.8.6. Análisis de segregación: Las colonias que aparecieron después de la fusión de protoplastos que presentaban un fenotipo distinto al de los parentales fueron sometidas a un análisis de descendencia. Para esto, cada colonia se resuspendió con 1 ml de medio YM en un tubo Eppendorf. La suspensión se diluyó en el mismo medio plaqueando alícuotas de 100 μ l en medio YM-agar y los distintos fenotipos de color que aparecieron fueron registrados. Las colonias incapaces de crecer en MMv fueron sometidas a análisis de suplementación con mezclas de nutrientes lo que permitió determinar el fenotipo auxótrofo segregante.

2.8.7 Formación de estructuras sexuales: Para determinar el nivel de formación de estructuras sexuales en mutantes morfológicos (afectados en la estructura de holobasidios o basidiosporas), mutantes afectados en las condiciones de esporulación y cepas fusantes originadas a partir de mutantes *hol⁻* de *X. dendrorhous*, se utilizó el método descrito por Retamales *et al* (2002). Las placas MMv-agar sembradas y sus duplicados se hicieron crecer por dos días a 22 °C y luego se transfirieron a un incubador a 9 °C, para inducir la esporulación. En los días sucesivos las placas fueron sometidas a inspección ocular con un

microscopio y se determinó la presencia de holobasidios con basidioesporas terminales, mediante una prospección diaria del número promedio de estructuras sexuales presentes en 10 colonias de cada cepa. La tasa de formación media de estructuras sexuales fue determinada como el número promedio de estructuras sexuales observadas por colonia y por día (Retamales *et al.*, 2002).

2.9. Determinación de las condiciones que inducen la germinación de basidiosporas en *X. dendrorhous*. Para determinar las condiciones en que se verifica la germinación de basidiosporas de *X. dendrorhous*, las basidiosporas fueron obtenidas mediante micromanipulación y sometidas a diferentes condiciones como: tipo de medio sólido, recurso de nitrógeno, recurso de carbono y temperatura.

2.9.1 Tipo de medio sólido: Para evaluar el efecto del tipo de medio sólido en la germinación, basidiosporas de diferentes cepas de *X. dendrorhous* fueron aisladas mediante micromanipulación y sembradas sobre placas con distintos medios sólidos, principalmente placas medio mínimo MMv, MMv-glicerol, medio completo YM e YM -glicerol (Apéndice 1) y placas MMv más otros suplementos como metionina, polivitaminas y bases nitrogenadas.

2.9.2 Fuente de nitrógeno: Para determinar el efecto de la concentración de nitrógeno sobre la capacidad de germinación de basidiosporas de *X. dendrorhous*, se

procedió a preparar placas MMv e YM con un gradiente de concentraciones de nitrato de amonio y cloruro de amonio. Las basidiosporas de las diferentes cepas fueron aisladas con un micromanipulador y sembradas en las placas apropiadas. Las basidiosporas se incubaron por 4 días a 22 °C. Luego de 4 días las placas fueron analizadas mediante inspección ocular y se determinó el número de basidiosporas que formaban colonias.

2.9.3. Fuente de carbono: Para evaluar el efecto de la glucosa como recurso de carbono en la germinación de basidiosporas, se preparó placas MMv e YM con diferentes concentraciones de glucosa. Basidiosporas de diferentes cepas silvestres y mutantes de *X. dendrorhous* fueron obtenidas mediante un micromanipulador, luego fueron sembradas sobre las placas apropiadas e incubadas por 4 días a 22 °C. Luego de 4 días las placas fueron analizadas mediante inspección ocular y se determinó el número de basidiosporas que formaban colonias.

2.9.4. Temperatura: Para determinar el efecto de la temperatura en la germinación, basidiosporas de diferentes cepas silvestres y mutantes de *X. dendrorhous* fueron obtenidas mediante micromanipulación. Las basidiosporas fueron sembradas en placas MMv e YM y se incubaron en diferentes condiciones de temperatura a 22, 9, 4 y -20 °C. Debido a que a -20 °C los medios se congelan y se agrietan se procedió a disminuir el tiempo a un pulso de 20-30 min. Luego del pulso de

temperatura las basidiosporas se incubaron a 22 °C durante 5 días. El porcentaje de viabilidad ha sido obtenido como el cociente entre el número de basidiosporas que forman colonias y el número total de basidiosporas analizadas mediante micromanipulación.

2.10. Micromanipulación

2.10.1. Micromanipulación de basidiosporas: La micromanipulación de basidiosporas y de microcolonias, se realizó utilizando un micromanipulador manual Piezzo, montado sobre un microscopio Carl Zeiss, modelo Axiolab 450907.

Las colonias que presentaban estructuras sexuales en medio selectivo fueron observadas bajo el microscopio. La inspección ocular permitió individualizar las basidioesporas que se desarrollan en el extremo del holobasidio. Posteriormente las esporas fueron aisladas con la punta del microfilamento del micromanipulador y sembradas en medio completo YM-agar, MMv-agar o medio selectivo. Posteriormente se incubaron en condiciones de germinación y se dejaron crecer para determinar la viabilidad.

2.11. Purificación de ácidos nucleicos.

2.11.1. DNA plasmidial: Para la obtención de DNA plasmidial a partir de la genoteca en YIp5 se utilizó cultivos de *E. coli*, en medio LB con ampicilina (100 µg/ml) crecidos toda la noche a 37 °C. La extracción se realizó según el método de extracción alcalina descrito por Sambrook *et al.* (1989).

2.11.2. Extracción de ácidos nucleicos: Para obtener DNA de alto peso molecular (sobre 23 kb) la purificación de ácidos nucleicos se realizó a partir de protoplastos. Estos fueron centrifugados a 4.000 rpm en una centrifuga Sorvall utilizando un rotor SS-34 durante 4 min y se resuspendieron suavemente en 4,5 ml de Tris-HCl 10 mM, EDTA 20 mM, pH 8,0. Luego se adicionaron 0.5 ml de SDS 10% y se incubó la mezcla a temperatura ambiente por 5 min y luego se agregó 50 µl de proteinasa K a 20 mg/ml y se incubó a 55 °C por 1 h. La solución con el DNA se desproteinizó agregando 5 ml de fenol saturado en tampón Tris-HCl pH 7,4 y se agitó suavemente durante 30 min. Las fases fueron separadas por centrifugación a 4.000 rpm por 4 min y la fase acuosa fue transferida a un tubo Corex de 30 ml con una pipeta de vidrio de 10 ml. A la fase fenólica, se agregó 2 ml de solución Tris-HCl 10 mM pH 8,0; EDTA 20 mM y se agitó suavemente por 30 min, separando las fases nuevamente por centrifugación a 4.000 rpm por 4 min. Ambas fases acuosas se unieron y se agregó 4 ml de fenol saturado. Después de agitar la mezcla por 30 min, se recuperó la fase acuosa mediante centrifugación a 4.000 rpm por 4 min. Este último paso se repitió una vez más y posteriormente se agregó 5 ml de una mezcla de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) a la fase acuosa. Se mezcló y ambas fases se separaron por centrifugación a 4.000 rpm por 4 min, recuperando la fase acuosa. Para retirar restos de fenol desde la fase acuosa, se agregó 5 ml de una mezcla de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), agitando suavemente por 30 min y separando las fases por centrifugación. Por último, el DNA fue

precipitado mediante la adición de 2,5 volúmenes de etanol absoluto e incubado en hielo por 10 min. Los ácidos nucleicos fueron retirados de la suspensión por una varilla de vidrio y depositados en un tubo de microcentrifuga estéril. Luego de secar el DNA, este fue lavado con etanol al 70% y posteriormente resuspendido en 500 a 1000 μ l de tampón TE. Finalmente, el DNA fue observado y cuantificado mediante electroforesis en geles de agarosa al 0,5-0,6 %. Paralelamente para determinar la identidad de las cepas mutantes utilizadas en este trabajo como *X. dendrorhous*, se observó la presencia de moléculas de RNA de doble hebra descritos para la cepa silvestre UCD 67-385 (Castillo & Cifuentes, 1994).

2.12. Análisis de Cariotipo electroforético

2.12.1. Preparación de DNA cromosómico intacto de *X. dendrorhous*. Para los análisis de electroforesis de campo pulsado se preparó DNA cromosómico intacto de *X. dendrorhous* mediante la técnica descrita por Cifuentes *et al.* (1997), basada en Schwartz (1984). Para ello se colectó células en fase estacionaria de un cultivo de 100 ml en MMv. Se lavó las células dos veces con EDTA 50 mM pH 8,0 para luego ser resuspendidas en una solución de EDTA 50 mM pH 8,0 con 10 mg/ml de Novozima. Se agregó 3 ml de agarosa de bajo punto de fusión 1%, EDTA 125 mM pH 8,0, precalentada a 42 °C y la mezcla se distribuyó en moldes de 100 μ l, permitiendo la gelificación a 4 °C por 15 min. Los bloques se sumergieron en 5 ml de Buffer LET (500 mM EDTA, 7,5% β -

mercaptoetanol, 10 mM Tris-HCl pH 7,5) conteniendo 0,4 mg/ml de Novozima y se incubó a 37 °C por 16 h. Luego de la incubación los bloques fueron removidos suavemente de los moldes, lavados dos veces con EDTA 50 mM y se incubaron en 5 ml de una solución NDS (500 mM EDTA, 1% N-Lauroylsarcosina, 10 mM Tris-HCl pH 7,5) que contenía 1 mg/ml de proteinasa K, durante 24 h a 55 °C. Finalmente los bloques se lavaron dos veces con EDTA 50 mM pH 7,5 y se dejaron en la misma solución a 4 °C hasta su posterior utilización.

2.12.2. Electroforesis de campo pulsado (CHEF). La electroforesis de campo pulsado se realizó utilizando el sistema CHEF II y CHEF III de BioRad en geles de agarosa 0,85-1% en tampón TBE 0,5 X (45 mM Tris-Borato, 1 mM EDTA pH 8,0) a 14 °C. Las condiciones de separación óptimas de las bandas de DNA cromosómico de cultivos originados a partir de basidiosporas de *X. dendrorhous* fueron generadas por modificaciones del método descrito por Cifuentes *et al.* (1997). Los geles se tiñeron con bromuro de etidio 1 µg/ml por 6 h y luego fueron lavados en agua destilada por 3 a 4 h para finalmente ser visualizados en un trans-iluminador MIGHTY BRIGHT con radiación UV. Finalmente los geles fueron fotografiados con una cámara Kodak DS 120 y las fotografías editadas con Adobe Photoshop 7.0

2.13. Transformación:

La transformación se realizó en un aparato electroporador **BIO-RAD GENEpulserXcell™**.

2.13.1. Electroporación de células de *X. dendrorhous*. Para el análisis de complementación de la cepa S3-88A15-40 *pro⁻, hol⁻* de *X. dendrorhous*, se procedió a utilizar con algunas modificaciones el protocolo descrito por Adrio *et al.* (1995). Como recurso de DNA de la cepa silvestre UCD 67-385 de *X. dendrorhous* se utilizó una genoteca clonada en el sitio *Bam*HI del plasmidio YIp5. Esta genoteca esta compuesta por 65 grupos, y cada grupo poseen alrededor de 100 clones distintos. Para el desarrollo del método de electroporación se inoculó un matraz de 200 ml de medio YM con 1-2 ml de un cultivo de 48 h de la cepa S3-88 A15-40 *pro⁻, hol⁻* de *X. dendrorhous*. Se incubó con agitación constante a 22 °C hasta alcanzar una DO_{550nm} de 1,2. Las células fueron centrifugadas a 5.000 x g durante 5 min, resuspendidas en 25 ml de tampón BD (50 mM fosfato de potasio, pH 7,0 25 mM ditiotreitól [DDT]) e incubadas a 22 °C por 15 min. Las células fueron lavadas dos veces con 25 ml de tampón STM (270 mM sacarosa, 10 mM Tris-HCl, pH 7,5 1 mM MgCl₂) frío y finalmente resuspendidas en 1 ml de tampón STM. Se mezcló 60 µl de células electrocompetentes con 10-20 µg de DNA transformante de diferentes pool de una genoteca en YIp5 de la cepa UCD 67-385 en un volumen no superior a 5 µl. Se depositó la mezcla en una cubeta de electroporación y se aplicó el siguiente protocolo para el pulso: 125 µF, 600 Ω, 0,45 kV y 37 milisegundos. Posteriormente las células fueron resuspendidas en 1 ml de medio YM líquido incubadas a 22 °C por 5 h y luego sembradas en placas con medio completo YM y medio mínimo MMv.

3. RESULTADOS

3.1. Determinación de las condiciones de germinación de basidiosporas en *X. dendrorhous*. Para determinar las condiciones óptimas que permiten la germinación de esporas se estudió el efecto de distintos pulsos de temperatura. Las basidiosporas obtenidas mediante micromanipulación se sometieron a distintos pulsos de temperatura durante 20 min y finalmente se incubaron a 22 °C por 5 días. Todas las cepas con fondo genético UCD 67-385 no germinan a 22 °C y requieren un pulso de frío para germinar. Además, aplicando pulsos de 9 y 4 °C los porcentajes de germinación son menores de 1 y 5 % respectivamente para estas cepas (Tabla 3). Paralelamente los porcentajes de germinación aumentan en todas las cepas analizadas al disminuir la temperatura del pulso, excepto para la cepa Atx5. La Tabla 3 indica que los mayores porcentajes de germinación se presentan en la cepa silvestre VKM Y2786 y una mutante originada a partir de ella, S3-88 (85%). La cepa S3-88 es un mutante sobreproductor de estructuras sexuales, que presenta una superficie aterciopelada debido a un elevado número de holobasidios con basidiosporas (Fig. 1 A). Esta cepa mutante es capaz de esporular en medio mínimo MMv y en medio completo YM a 9 y 22 °C. Los resultados indican que las basidiosporas de la cepa silvestre VKM Y2786 y la mutante S3-88 no requieren como condición para germinar un pulso de baja temperatura. Estas esporas pueden ser micromanipuladas y sembradas directamente a 22 °C. En tales condiciones presentan alrededor de un 50% de germinación. Sin embargo, cuando el pulso de temperatura es de -20 °C la eficiencia de germinación de basidiosporas aumenta a 90% en ambas cepas.

Tabla 3. Porcentaje de germinación de basidiosporas sometidas a distintos pulsos de temperatura

Cepa	Porcentajes de germinación			
	22 °C*	Pulso 9 °C	Pulso 4 °C	Pulso -20 °C
UCD 67-385 wt	0	<1	<5	30±8
Atx5	0	0	0	0
Atx3	0	<1	<5	34±9
Atx12	0	<1	<5	31±7
VKM Y2786 wt	45±15	45±18	62±7	81±13
S3-88	80±8	85±8	89±7	88±11

Todas las cepas fueron incubadas en condiciones de esporulación. Posteriormente las basidiosporas de cada cepa analizada fueron aisladas mediante micromanipulación y sembradas en medio completo YM-agar. Finalmente las basidiosporas fueron expuestas a pulsos de temperatura de 22, 9, 4 y -20 °C durante 20 min. Los porcentajes de sobrevivencia que se indican se han calculado como el cociente entre el número de basidiosporas germinadas (que forman colonias) y el número total de basidiosporas analizadas. Los valores de porcentaje de germinación son el promedio de 5 experimentos independientes.

*: Control sin pulso de temperatura.

wt. Aislado tipo silvestre

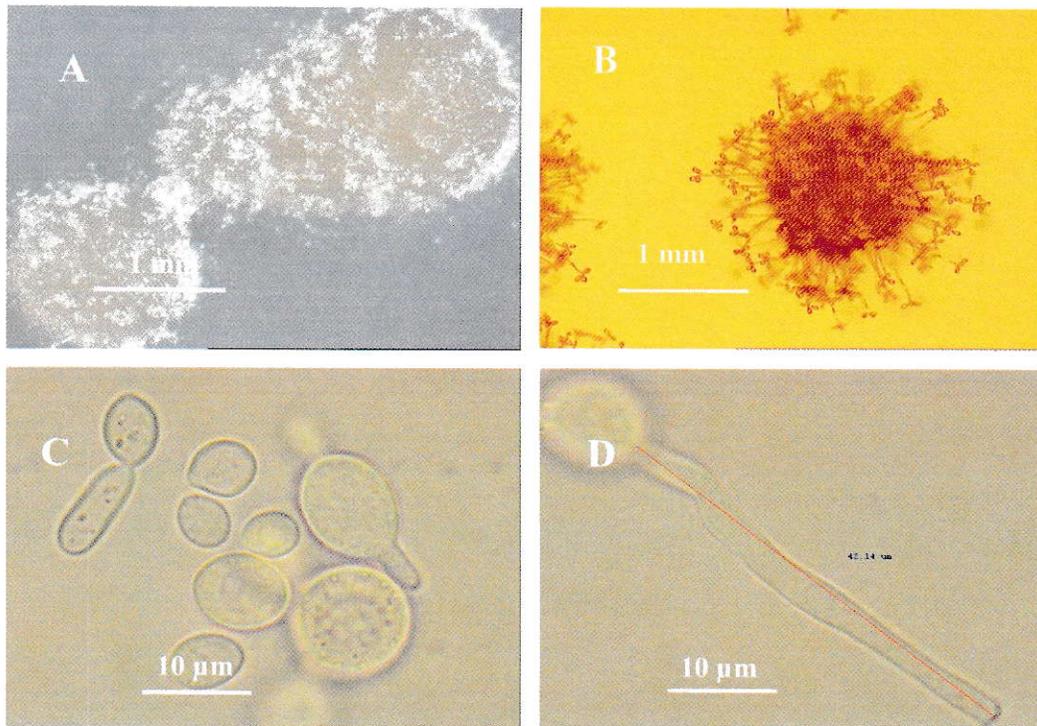


Figura 1: Características macro y microscópicas de la cepa mutante S3-88 de *X. dendrorhous*. **A:** superficie aterciopelada de la colonia observada a la lupa (10 X). **B:** Colonia mostrando abundantes holobasidios con basidiosporas (40 X). **C:** Fotografía obtenida de preparaciones de la cepa S3-88 mostrando una célula con una extensión citoplasmática (40 X). **D:** Fotografía mostrando una célula de la cual emerge un holobasidio (40 X).

Por otro lado, basidiosporas de la cepa silvestre UCD 67-385 y dos de sus mutantes afectados en la carotenogénesis, Atx3 y Atx12, no germinan cuando son micromanipuladas y sembradas directamente a 22 °C. Aplicando pulsos de 9 y 4 °C las frecuencias de germinación subieron a 1 y 5 % respectivamente en ambas cepas. Sin embargo, cuando se aplicó un pulso de -20 °C por 20 min se obtuvo un óptimo de alrededor de 30 % de germinación tanto en la cepa silvestre UCD 67-385 y los mutantes Atx3 y Atx12. En la Tabla 3 se muestra además, que con un pulso de -20 °C por 20 min es posible obtener un aumento en las frecuencias de sobrevivencia de basidiosporas en todas las cepas analizadas, excepto en la cepa Atx5, que no presentó germinación en ninguna de las condiciones estudiadas. Los datos experimentales mostrados en la Tabla 3 sugieren que el proceso de germinación está fuertemente influenciado por las condiciones de temperatura, lo que podría estar asociado a las condiciones del hábitat en que se encuentran naturalmente estas cepas de *X. dendrorhous*.

3.2. Obtención de marcadores genéticos en *X. dendrorhous*. Con el objeto de estudiar los aspectos genéticos del proceso de esporulación y germinación de las basidiosporas de *X. dendrorhous* se realizó una serie de experimentos para obtener mutantes afectados en dichos procesos. De la misma manera, se procedió a la obtención de marcadores de auxotrofia para completar los estudios genéticos y de análisis de complementación.

3.2.1. Obtención de mutantes en la cepa tipo VKM Y2786 de *X. dendrorhous* En la Tabla 4 se muestran los mutantes auxótrofos obtenidos de la cepa silvestre VKM Y2786 a partir de 4 eventos de mutagénesis independiente, indicándose el requerimiento auxotrófico y el fenotipo de color de cada uno. De un total de 42 mutantes auxótrofos aislados de la cepa silvestre VKM Y2786, 16 son *arg*⁻, 5 *leu*⁻, 4 *met*⁻, 3 *lis*⁻, 2 *ade*⁻ y 1 *asp*⁻ (Tabla 4). Algunos de los mutantes auxótrofos (n.d) no han podido ser identificados en su requerimiento nutricional y sólo muestran crecimiento en mezclas de aminoácidos (Tabla 1).

Tabla 4. Lista de mutantes obtenidos desde la cepa tipo VKM Y2786 de *X. dendrorhous*

Nombre Mutante	Requerimiento Auxotrófico	Fenotipo color
A1-55	<i>arg- (cit-, orn-)</i>	silvestre
A2-92	<i>arg- (cit-)</i>	silvestre
A3-2bas-	<i>leu-</i>	silvestre, bas-
A3-11	nd.	silvestre
A3-71	<i>arg- (cit-, orn-)</i>	silvestre
A4-3	nd.	silvestre
A4-17	<i>arg-</i>	silvestre
A4-69	<i>arg-</i>	albino
A4-71	<i>leu-</i>	Silvestre alta rev.
A4-86	n.d	silvestre
A5-29	(pool 4)	silvestre
A5-37	<i>met-</i>	silvestre
A5-38osm1-	-	silvestre
A5-73	<i>leu-</i>	silvestre
A5-98osm2-	-	Amarillo
A6-4	<i>arg-</i>	silvestre
A6-15	<i>leu-</i>	silvestre
A6-64	<i>arg- (cit-, orn-)</i>	silvestre
A7-22	<i>lis-</i>	silvestre
A7-35	<i>arg-</i>	silvestre
A7-37	nd.	silvestre
A7-55	<i>arg-</i>	silvestre
A7-78	nd.	pettit, silvestre
A8-9	<i>ade-</i>	silvestre
A8-47	<i>met-</i>	silvestre
A9-55	<i>arg- (cit-)</i>	silvestre
A10-68	<i>arg- (cit-)</i>	silvestre
A12-20	<i>leu-</i>	silvestre
A12-28	<i>arg- (cit-)</i>	rojo
A12-32	<i>lis-</i>	silvestre
A12-74	<i>ade-</i>	silvestre
A12-82	<i>asp-</i>	silvestre
A12-85	<i>arg-</i>	silvestre
A13-10	<i>arg- (cit-, orn-)</i>	silvestre
A13-84	<i>lis-</i>	silvestre
A13-92	Pool 1	silvestre
A17-57	<i>met-</i>	silvestre
A18-89	<i>arg- (cit-)</i>	silvestre
A18-90	<i>met-</i>	silvestre
A21-100	<i>arg- (cit-, orn-)</i>	silvestre
A23-24	Pool 4	silvestre
A24-88	Pool 7	silvestre

ade: adenina; **arg:** arginina; **asp:** aspartato; **orn:** ornitina; **cyt:** citidina; **lis:** lisina; **pro:** prolina; **met:** metionina; **leu:** leucina. **n.d.:** no determinado. Algunos mutantes fueron caracterizados por crecer en mezclas (pools) de aminoácidos (ver materiales y métodos sección 2.6.4.). **Cit:** Citrulina, **Orn:** Ornitina. **osm⁻:** incapacidad de crecer en medio con KCl 0,8 M. Los mutantes han sido obtenidos por mutagénesis con NTG según protocolos previamente descritos (Retamales *et al.*, 1998).

Paralelamente otros mutantes auxótrofos no crecen en presencia de ninguna de las mezclas de nutrientes, lo cual sugiere que podrían presentar otros requerimientos, distintos de aquellos utilizados en este estudio, tales como polivitaminas. El análisis fenotípico de los mutantes auxótrofos mostrados en la Tabla 4 permitió determinar que algunos presentan otros marcadores adicionales. Un ejemplo es el mutante A3-2 que tiene requerimiento para arginina (arg^-) y paralelamente presenta un defecto en la morfogénesis de basidiosporas (bas2). Esta cepa genera holobasidios normales pero sin basidiosporas terminales, y en caso de que las forme, estas son muy pequeñas y en número no mayor de dos. Por otro lado, la cepa A4-69, presenta un requerimiento para arginina (arg^-) y adicionalmente presenta un fenotipo albino. Por otro lado, la cepa A12-28 tiene requerimiento de arginina (arg^-) y paralelamente presenta un color rojo intenso, especialmente después de dos semanas de crecimiento, indicando una alteración en el control de la producción de pigmentos carotenoides, específicamente hacia la etapa de fase estacionaria.

Estudios con los intermediarios de la vía de síntesis de arginina han permitido caracterizar los 16 mutantes que requieren dicho aminoácido, entre ellos, 5 mutantes auxótrofos que crecen en arginina y citrulina (Cit^-) posiblemente afectados en el gen *arg3*, que codifica por la enzima ornitina carbamoil transferasa en *S. cerevisiae*, 5 que crecen en arginina, citrulina y ornitina (Orn^-), y 6 que sólo crecen en arginina (Arg^-) posiblemente afectados en el gen *arg10* o *arg4*. Para dilucidar esto último será necesario utilizar el intermediario argininosuccinato. Ninguno de los mutantes crece en arginina y ornitina a la vez (Tabla 4). Estos resultados sugieren que el orden de la vía de síntesis del aminoácido arginina sigue el orden: Ornitina → Citrulina → Arginina, como fue descrito para *S. cerevisiae* (Wiame, 1971).

3.2.2. Determinación de las frecuencias de mutagénesis de cepas silvestres y mutantes de *X. dendrorhous*. La comparación entre las frecuencias de mutagénesis fue utilizada como una herramienta en la determinación de los niveles de ploidía de varios organismos. En relación a lo anterior encontramos que mutantes recesivos tales como auxótrofos eran raramente obtenidos en *X. dendrorhous*, característica que fue reportada por otros autores (Nagy *et al.*, 1997; Wery *et al.*, 1997). Con el objeto de resolver este problema fue necesario aumentar las concentraciones del agente mutagénico NTG e introducir un paso de enriquecimiento de mutantes auxótrofos mediante la utilización de nistatina (Retamales *et al.*, 1998a). Lo anterior permitió obtener 33 mutantes auxótrofos y una serie de mutantes afectados en la carotenogénesis en la cepa UCD 67-385, con frecuencias en el rango de 7.2×10^{-5} a 3.5×10^{-4} (Retamales *et al.*, 1998a).

En la Tabla 5 se muestran los resultados de estos experimentos y se comparan con resultados obtenidos en las mismas condiciones con la cepa silvestre VKM Y2786 y el mutante S3-88. Los resultados muestran que la frecuencia de mutagénesis en las cepas VKM Y2786 y S3-88 es 0.02 y 0.016 respectivamente, casi dos ordenes de magnitud mayor que el rango observado en la cepa UCD 67-385 (Tabla 5). Estos datos sugieren que la cepa silvestre VKM Y2786 presentaría un nivel de ploidía posiblemente haploide. Con respecto a esto último, cuando se analizó el número total de mutantes auxótrofos obtenidos con el fondo genético VKM Y2786, no se observan espectros restringidos de mutantes (Tabla 6). Sin embargo, en la cepa UCD 67-385, 14 de los 33 mutantes auxótrofos obtenidos (42%) son *ade⁻* (Tabla 6). Esto último, fue interpretado como evidencia de la presencia de una zona de heterocigosidad natural asociada al locus *ADE1* en la cepa UCD 67-385, y por lo tanto sugiere, junto a otros resultados, que esta cepa es diploide (Hermosilla *et al.*, 2003; Retamales *et al.*, 1998a).

Tabla 5. Frecuencia de obtención mutantes auxótrofos y porcentajes de sobrevida en cepas silvestres y mutantes de *X. dendrorhous*.

Cepa	Fenotipo	Colonias analizadas	% de sobrevida	Frecuencia Mutagénesis	Referencias
Atx3	Albino	16.418	0,12	2.4×10^{-4}	Retamales <i>et al.</i> , 1998
UCD 67-385	silvestre	16.350	0,09	2.4×10^{-4}	Retamales <i>et al.</i> , 1998
Atx5	amarillo	13.850	-	7.2×10^{-5}	Retamales <i>et al.</i> , 1998
Atx6	rosado	30.837	0,10	3.5×10^{-4}	Retamales <i>et al.</i> , 1998
VKM Y2786	silvestre	1600	0.08	2×10^{-2}	Este trabajo
S3-88	silvestre	1500	0.05	$1,6 \times 10^{-2}$	Este trabajo

La frecuencia y el porcentaje de sobrevida se han obtenido luego del tratamiento mutagénico en las mismas condiciones en las cepas UCD 67-385, Atx3, Atx5, Atx6, VKM Y2786 y S3-88 de *X. dendrorhous*. La frecuencia de mutagénesis se estimó a partir del número total de colonias que presentaban un fenotipo de auxotrofia, y el número total de colonias analizadas. El porcentaje de sobrevivencia se estimó a partir de un control sin el agente mutagénico.

Tabla 6. Número y tipo de mutantes auxótrofos obtenidos en eventos de mutagénesis independientes, en cepas con fondo genético UCD 67-385 y VKM Y2786 de *X. dendrorhous*.

Auxotrofia	Fondo UCD 67-385	Fondo VKM Y2786
Número de experimentos	7	4
Adenina	14 (42%)	9 (14%)
Triptofano	-	1 (1.5%)
Aspartato	-	3 (4.7%)
N.D.	-	8 (12.6%)
Leucina	-	8 (12.6%)
Prolina	4 (12%)	2 (3.1%)
Arginina	2 (6%)	6 (9.5%)
Citrulina	1 (3%)	5 (7.9%)
Ornitina	1 (3%)	5 (7.9%)
Metionina	5 (15%)	8 (12.6%)
Lisina	1 (3%)	7 (11.1%)
Nicotinamida	2 (6%)	-
Isoleucina-valina	1 (3%)	1 (1.5%)
Polivitaminas	1 (3%)	1 (1.5%)
Total	33	63

Los mutantes auxótrofos de cepas con fondo genético UCD 67-385 y VKM Y2786 han sido obtenidos mediante mutagénesis con NTG y tratamiento con nistatina en las mismas condiciones (Retamales *et al.*, 1998).

(%). Indica el valor del porcentaje al que corresponde el marcador de auxotrofia

N.D. No determinado.

3.2.3. Propiedades de la cepa S3-88 de *X. dendrorhous*. En la Figura 1 se muestran las características macro y microscópicas de la cepa S3-88 de *X. dendrorhous*. La cepa S3-88 fue elegida para experimentos de mutagénesis en base a sus propiedades útiles para futuros experimentos de complementación, transformación, y análisis de productos meióticos.

3.2.3.1. Efecto del recambio de oxígeno. Evidencias previas que la cepa S3-88 crecida en medio líquido producía holobasidios sólo en la superficie sugieren la necesidad de una interfase célula-aire y posiblemente la necesidad de oxígeno para inducir la esporulación. Para evaluar esta hipótesis y determinar el efecto del oxígeno sobre la esporulación se procedió a sembrar la cepa S3-88 en placas que fueron selladas para evitar el intercambio gaseoso con el medio. En la Figura 2 se muestra que las placas selladas (sin intercambio de oxígeno) presentan bajos niveles de holobasidios por colonia comparada con el grupo de placas control en presencia de oxígeno, indicando un efecto de este último sobre la esporulación. Lo anterior sugiere que una alteración en el metabolismo oxidativo tiene un efecto negativo sobre la esporulación.

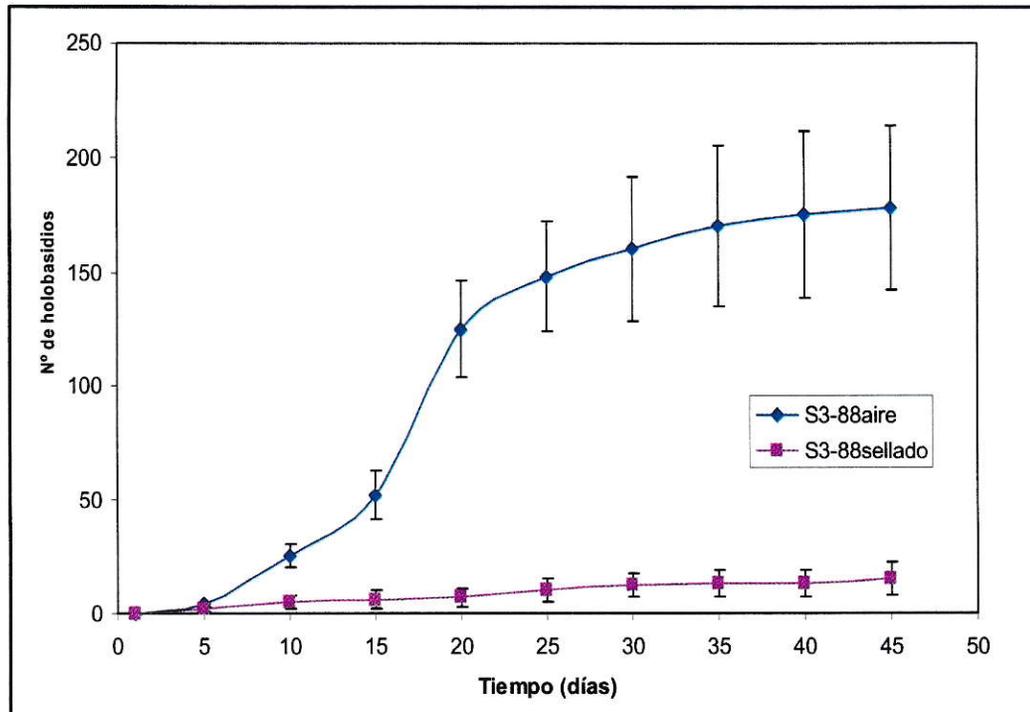


Figura 2. Efecto del recambio de oxígeno sobre la esporulación en la cepa S3-88 de *X. dendrorhous*.

Para evaluar el efecto del oxígeno sobre la esporulación en la cepa S3-88 de *X. dendrorhous* se procedió a sembrar placas YM-agar. Un grupo de placas fue sellado (S3-88 sellado) con parafilm y mantenido en condiciones de esporulación (Retamales *et al.*, 2002). Una réplica fue mantenida en condiciones de aireación (S3-88 aire) y mantenido en las mismas condiciones para que formaran holobasidios con basidiosporas. Para ambos grupos de placa se graficó el número de holobasidios producidos por colonia después de incubar a diferentes tiempos.

3.2.4. Identificación de requerimientos nutricionales:

Para la identificación de mutantes auxótrofos de la cepa S3-88 se realizó un proceso de selección basado inicialmente en la ausencia de crecimiento sobre placas MMv. Los requerimientos específicos fueron determinados replicando la colonia original sobre varios tipos de medios selectivos de acuerdo al método descrito por Rose (Rose *et al.*, 1990) con algunas modificaciones. Las mezclas de aminoácidos utilizados en la identificación del tipo de auxotrofia se muestran en la Tabla 2. De un total de 24 mutantes auxótrofos de esta cepa, 4 requieren lisina, 3 son *ade*⁻; 3 *met*⁻; 2 *arg*⁻; 3 *leu*⁻; 1 *trp*⁻; 1 *pro*⁻ y 1 doble mutante *ade*⁻*met*⁻ (Tabla 7). La mayoría de los mutantes mantienen la característica de producción de holobasidios (*hol*⁺) en medio completo y en medio mínimo. Además, mantienen el fenotipo aterciopelado y de coloración rojo naranja intenso de la cepa parental S3-88. Algunas cepas auxótrofas fueron analizadas mediante micromanipulación para determinar la capacidad de germinación de las basidiosporas (*ger*⁺) sobre medio completo, YM. Tres cepas mutantes presentaron un defecto en la capacidad de producir holobasidios y basidiosporas terminales, en todos los medios estudiados: S3-88A7-2 *met*⁻, S3-88A9-32 *asp*⁻ y S3-88A15-40 *pro*⁻ y fueron llamadas *hol*⁻ en este estudio (Tabla 7). Por otro lado, 3 mutantes auxótrofos presentaron crecimiento en el pool 5 y uno en el pool 9, lo cual sugiere que podrían corresponder a requerimientos dobles o triples.

Tabla 7. Lista de mutantes auxótrofos de la cepa S3-88 (*hol*⁺) de *X. dendrorhous*.

Mutante/nombre	Requerimiento Auxotrófico	Fenotipo	
		Esporulación	germinación
S3-88A1-24	<i>lis</i> ⁻	<i>hol</i> ⁺	n.d.
S3-88A2-86	<i>leu</i> ⁻	<i>hol</i> ⁺	<i>ger</i> ⁺
S3-88A3-B	pool5	<i>hol</i> ⁺	n.d.
S3-88A4-28	<i>ade</i> ⁻	<i>hol</i> ⁺	<i>ger</i> ⁺
S3-88A4-74	pool5	n.d.	n.d.
S3-88A4-79	<i>met</i> ⁻	n.d.	n.d.
S3-88A5-31	<i>arg</i> ⁻	<i>hol</i> ⁺	<i>ger</i> ⁺
S3-88A5-64	<i>ade</i> ⁻	<i>hol</i> ⁺	<i>ger</i> ⁺
S3-88A6-13	<i>ade</i> ⁻	<i>hol</i> ⁺	<i>ger</i> ⁺
S3-88A6-78	<i>leu</i> ⁻	<i>hol</i> ⁺	<i>ger</i> ⁺
S3-88A7-2	<i>met</i> ⁻	<i>hol</i>	n.d.
S3-88A8-11	<i>trp</i> ⁻	<i>hol</i> ^{+/-}	n.d.
S3-88A8-38	pool9*	<i>hol</i> ⁺	n.d.
S3-88A8-74	<i>ade</i> ⁻ , <i>met</i> ⁻	<i>hol</i> ⁺	n.d.
S3-88A9-32	<i>asp</i> ⁻	<i>hol</i>	n.d.
S3-88A9-79	<i>asp</i> ⁻	<i>hol</i> ⁺	n.d.
S3-88A10-23	<i>arg</i> ⁻	<i>hol</i> ⁺	n.d.
S3-88A10-100	pool5	<i>hol</i> ⁺	n.d.
S3-88A11-72	<i>lis</i> ⁻	<i>hol</i>	n.d.
S3-88A11-86	<i>met</i> ⁻	<i>hol</i> ⁺	n.d.
S3-88A11-87	<i>leu</i> ⁻	<i>hol</i> ⁺	n.d.
S3-88A15-2	<i>lis</i> ⁻	<i>hol</i> ⁺	<i>ger</i> ⁺
S3-88A15-40	<i>pro</i> ⁻	<i>hol</i>	n.d.
S3-88A15-70	<i>lis</i>	<i>hol</i> ⁺	n.d.

Nombre, auxotrofia y fenotipo de mutantes auxótrofos. Los mutantes auxótrofos de la cepa sobreproductora de holobasidios S3-88, han sido obtenidos mediante tratamiento con NTG y enriquecimiento con nistatina de acuerdo al protocolo descrito por Retamales *et al* (1998a).

hol⁺, sobreproduce holobasidios con basidiosporas.

hol⁻, no produce holobasidios.

ger⁺, produce basidiosporas capaces de germinar.

n.d., no determinado.

ade: adenina; **arg**: arginina; **asp**: aspartato; **lis**: lisina; **pro**: prolina; **met**: metionina; **leu**: leucina. **trp**: triptofano. **n.d.**: no determinado.

*, Algunos aislados fueron caracterizados por crecer mezclas de aminoácidos (pool 1 a 9 descritos en Tabla 2) y corresponden a dobles o triples mutantes auxótrofos.

3.3. Obtención de mutantes afectados en la carotenogénesis en las cepas VKM Y2786 y S3-88 de *X. dendrorhous*

3.3.1. Análisis de los mutantes de carotenogénesis.

Los mutantes afectados en la carotenogénesis han sido obtenidos mediante tratamiento mutagénico utilizando NTG mediante el método descrito por Retamales *et al* (1998a). Las cepas VKM Y2786 y S3-88 fueron mutagenizadas utilizando una concentración de NTG de 100 µg/ml sin agregar nistatina (Tabla 8). El fenotipo indicado en la tabla 8 corresponde a una interpretación del color desarrollado por la colonia luego de 7 días de incubación. Las colonias mutantes fueron identificadas por un cambio en el fenotipo de color con respecto a la cepa silvestre. Además, son capaces de mantener un fenotipo estable después de varias generaciones de cultivo en placas YM. No se observó la aparición de colonias sectorizadas luego de 10 a 20 generaciones.

3.3.2. Estabilidad de los mutantes de carotenogénesis de *X. dendrorhous*.

Los mutantes de carotenogénesis obtenidos fueron analizados para determinar la estabilidad del fenotipo de color, mostrando una frecuencia de reversión menor que 10^{-8} . Los resultados obtenidos en las cepas VKM Y2786 y S3-88, ambas con el mismo fondo genético, se muestran en la Tabla 8, donde se observa que el mayor número de fenotipos de color obtenidos son albinos, seguidos por amarillo y rojo.

Tabla 8. Número de mutantes afectados en la síntesis de pigmentos carotenoides en cepas con fondo genético VKM Y2786 de *X. dendrorhous*.

Fenotipo mutante	VKM Y2786*	S3-88
Albino	7	5
Amarillo	3	4
Rosado	1	1
Rojo	3	1
Pálido	2	1
Naranja	2	0
crema	0	0
Otros ^A	2	0
Número de mutagénesis independientes	4	2
Total	20	12

*: Cepa tipo de *X. dendrorhous*.

A: En este grupo se incluyen cepas que presentan un fenotipo de coloración distinta en tonalidad con respecto a las cepas parentales mutagenizadas.

3.4. Relación entre los niveles de esporulación y germinación en distintos aislados silvestres y mutantes de *X. dendrorhous*. Para determinar la presencia de posibles relaciones entre los niveles de esporulación y germinación entre distintas cepas se procedió a sembrar cepas silvestres y mutantes de *X. dendrorhous* en placas MMv e incubar en las condiciones de esporulación (Retamales *et al.*, 2002). A los 22 días se analizó las placas al microscopio óptico y se contabilizó el número de holobasidios con basidiosporas en las colonias, expresando los resultados con respecto a la cepa silvestre UCD 67-385 (Tabla 9). Paralelamente las colonias esporuladas fueron sometidas a disección de basidiosporas mediante micromanipulación. Finalmente las esporas se sembraron en placas medio YM y se sometieron a un pulso de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 20 min. En la Tabla 9 se indican los porcentajes de sobrevivencia de basidiosporas de las cepas silvestres UCD 67-385, VKM Y2786, VKM Y2266, VKM Y2059 y UCD 67-210. Además se analizaron las cepas mutantes S3-88, Atx5 y Atx3 y el fusante protótrofo Fs15 originado a partir de fusión de protoplastos de las cepas *Atx3*, *pro-* y *Atx5*, *ade-*. Los resultados de la Tabla 9 muestran que 3 cepas silvestres, UCD 67-385, VKM Y2059 y VKM Y2786, presentan formación de holobasidios con basidiosporas, en las condiciones definidas en nuestro laboratorio (Retamales *et al.*, 2002). La cepa VKM Y2059 presenta un nivel de esporulación muy bajo, menos del 10 % del nivel de la cepa UCD 67-385, y las cepas UCD 67-210 y VKM Y2266 no produjeron holobasidios con basidiosporas en estas condiciones. Nuestros resultados sugieren que no existe una relación proporcional entre el nivel de esporulación y el porcentaje de germinación en las cepas estudiadas.

Tabla 9. Análisis del nivel de esporulación y viabilidad de basidiosporas de cepas silvestres y mutantes de *X. dendrorhous*.

Cepas	Nivel de esporulación con respecto a la cepa UCD 67-385	% de Viabilidad de basidiosporas
UCD 67-385 wt	1.0	30±8
VKM Y2266 wt	0.0	-
VKM Y2786 wt*	0.5	81±11
VKM Y2059 wt	0.1	n.d.
Atx5	3.0	0
UCD 67-210 wt**	0.0	-
Atx3	0.8	34±9
Fs15 (Fs)	3.0	0
S3-88	6.0	88±11

Las cepas fueron incubadas en condiciones de esporulación durante 22 días a 9 °C en placas de medio MMv. Las esporas fueron sembradas en medio completo YM y sometidas a un pulso de frío de -20 °C durante 20 min. Finalmente se incubaron por 5 días a 22°C. El porcentaje de viabilidad se ha calculado como el cociente entre el número de basidiosporas germinadas (que forman colonias) y el número total de basidiosporas analizadas.

* : Cepa tipo de *X. dendrorhous*

** : Cepa tipo de *Phaffia rhodozyma*

nd: no determinado.

3.5. Mutantes afectados en la esporulación en *X. dendrorhous*. Con el objeto de obtener información acerca de los mecanismos involucrados en el control de la producción de estructuras sexuales en *X. dendrorhous*, hemos obtenido una serie de mutantes afectados en la formación de holobasidios y basidiosporas terminales. Los resultados mostrados en la Tabla 10 muestra que se obtuvo tres clases distintos de mutantes: En primer lugar, el grupo A, corresponde a mutantes incapaces de producir estructuras sexuales en cualquiera de las condiciones analizadas. A este grupo pertenecen los mutantes Atx5-hol1, S3-33 y S4-63, presumiblemente bloqueados en determinantes genéticos esenciales, que estarían operando en etapas iniciales de la vía de esporulación. En el grupo B están aquellos que producen estructuras sexuales normalmente en medio mínimo MMv y medio completo YM a 9 °C. En esta clase están los mutantes S4-70, H1, H2 y H35. A la tercera clase (grupo C) pertenece el mutante S3-88 que se caracteriza por sobreproducir estructuras sexuales en medio mínimo y medio completo a 9 °C (Figura 1). Adicionalmente sobreproduce holobasidios con basidiosporas a 22 °C en ambos medios MMv e YM.

3.6. Obtención de mutantes afectados en la morfogénesis sexual en *X. dendrorhous*.

Mediante experimentos de mutagénesis con NTG (Retamales *et al*, 1998a) fue posible generar una serie de mutantes morfológicos afectados en la formación de estructuras sexuales, holobasidios y basidiosporas terminales ovals en *X. dendrorhous*. Ellos se reconocen por inspección ocular de colonias formadas en condiciones de esporulación luego del tratamiento mutagénico.

Tabla 10. Niveles de esporulación en cepas silvestres y mutantes en *X. dendrorhous*.

Cepa	9 °C		22 °C	
	MMv	YM	MMv	YM
VKM Y2786	+	-	-	-
UCD 67-385	+	-	-	-
Atx5	+++	-	-	-
Atx5-hol1	-	-	-	-
S4-70	++	++	-	-
S3-88	+++++	+++++	++++	++++
H1	++	+	-	-
H2	++	+	-	-
H35	++	++	-	-
S3-33	-	-	-	-
S4-63	-	-	-	-

El nivel de esporulación fue estimado a partir del recuento del número de holobasidios con basidiosporas en la superficie de las colonias.

+, Nivel de esporulación con respecto a la cepa silvestre UCD 67-385.

-, No produce holobasidios.

3.6.1. Análisis de mutantes morfológicos mediante microscopía óptica. En la Figura 3 se observa el fenotipo de la cepa silvestre VKM Y2786 (Fig 3 A) y 5 mutantes morfológicos obtenidos a partir de ella. La cepa S3-88 sobreproduce estructuras sexuales en distintos medios, a temperaturas de 9 y 22 °C y presenta una colonia aterciopelada (Figura 1; Figura 3 B). La cepa bas2 genera holobasidios normalmente, pero muestra un defecto en la producción eficiente de basidiosporas terminales (Figura 3 D). La cepa curl genera holobasidios curvados, (Figura 3 C). La cepa ger1 genera abundantes microcolonias, las que son producidas por germinación de basidiosporas. Algunas de estas microcolonias generan nuevamente holobasidios con basidiosporas (Fig 3 E). La cepa S4-63 no produce holobasidios en ninguna de las condiciones analizadas (Fig 3 F).

3.6.2. Análisis de cepas silvestres mediante microscopía electrónica de barrido (SEM). El análisis de microscopía electrónica reveló diferencias estructurales de basidiosporas entre las cepas silvestres UCD 67-385 y VKM Y2786. Los resultados mostrados en la Figura 4 indican la presencia de alteraciones en la pared de basidiosporas de la cepa UCD 67-385. En esta cepa la mayoría de las basidiosporas presentan una superficie rugosa, irregular (Fig 4 A y D) y de forma colapsada, lo cual podría estar asociado a la baja viabilidad de las basidiosporas (Tabla 9). También es posible observar una célula madre generando un holobasidio. Además, se observa la cicatriz producida por una yemación sobre la pared de la célula madre (Fig 4 B).

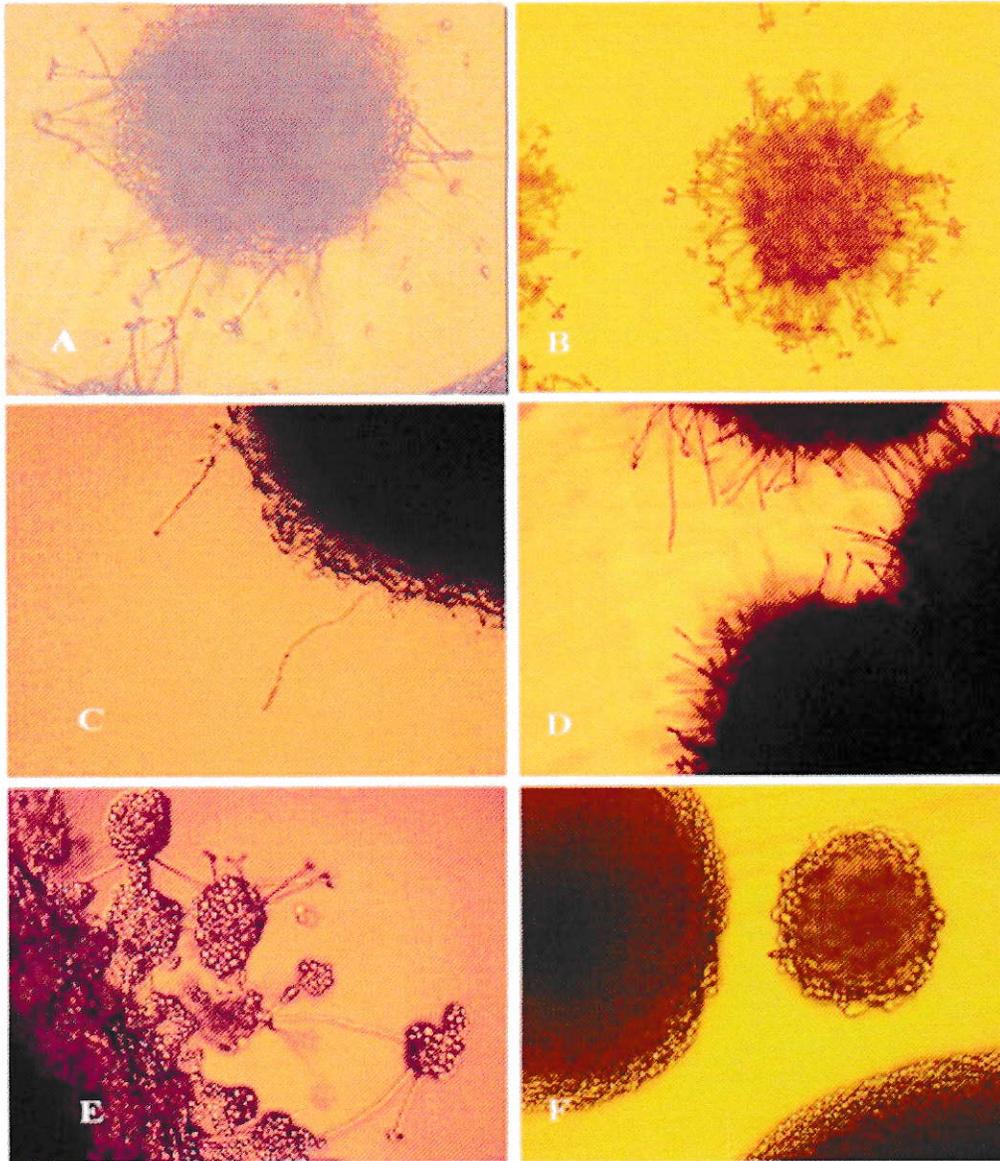


Fig 3. Fotografías de mutantes afectados en la morfogénesis de estructuras sexuales en *X. dendrorhous*. Las cepas han sido obtenidas mediante tratamiento con NTG a partir de la cepa silvestre VKM Y2786, crecidas en condiciones de esporulación y aisladas por su fenotipo morfológico. Las fotografías han sido obtenidas mediante la utilización de un microscopio AXIOLAB ZEISS con un aumento de 10X. **A:** cepa silvestre VKM Y2786; **B:** S3-88; **C:** cur1; **D:** bas2; **E:** ger1; **F:** S4-63.

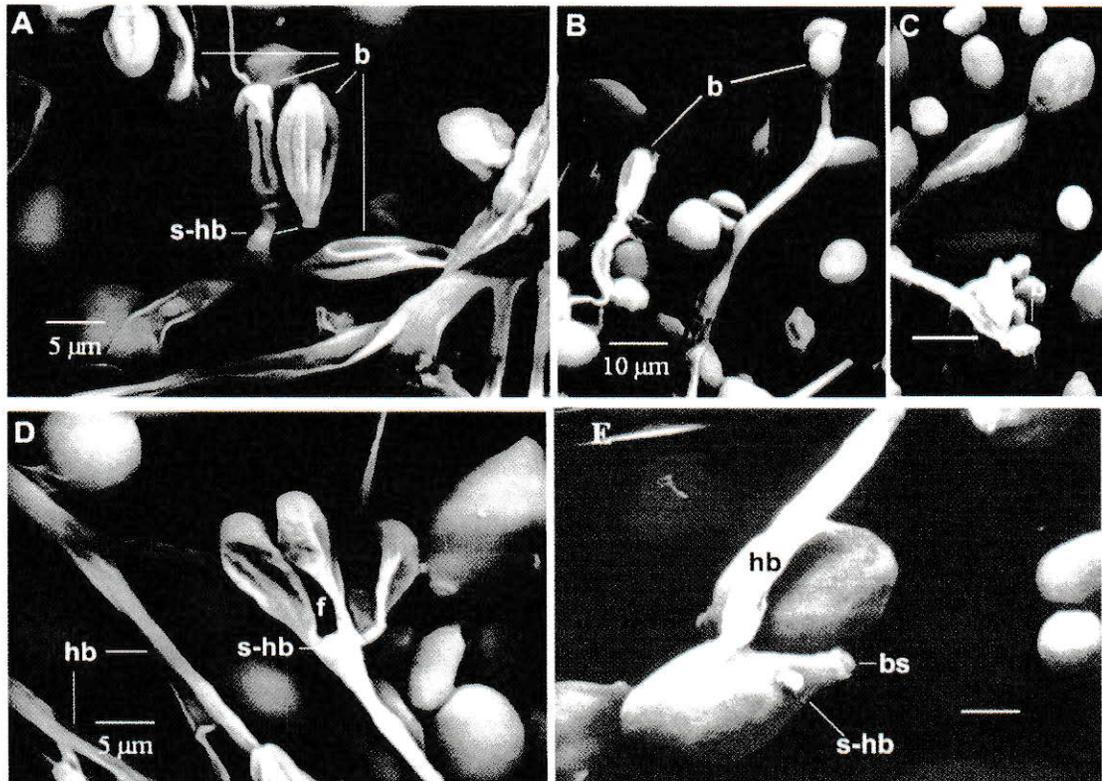


Figura 4. Fotografías de holobasidios y basidiosporas terminales obtenidas mediante microscopía electrónica (SEM) en la cepa silvestre UCD 67-385 de *X. dendrorhous*.

Estructura de holobasidios y basidiosporas terminales mediante microscopía electrónica (SEM) en la cepa UCD 67-385 de *X. dendrorhous*. **A** y **D**, basidiosporas con forma rugosa, irregular y colapsada. **E**, célula madre generando un holobasidio, la cicatriz de una pequeña yema y la cicatriz de un holobasidio. **B** y **C**, dos tipos de basidiosporas, la rugosa e irregular y otra que presenta una apariencia lisa y redondeada.

b, basidiospora; **hb**, holobasidio; **S-hb**, cicatriz del holobasidio; **bs**, cicatriz de la yema. En panel **A**, **D** y **E** la barra corresponde a 5 μm , paneles **B** y **C** la barra corresponde a 10 μm .

En estas preparaciones se observa la presencia de dos tipos de basidiosporas, las rugosas y colapsadas antes mencionadas y otras que presentan una apariencia lisa y regular (Fig 4). Es posible que estas últimas puedan germinar, dando cuenta de una baja viabilidad presente en las basidiosporas de esta cepa (Tabla 9).

Por otro lado, en la cepa silvestre VKM Y2786 (Figura 5) no se observan alteraciones en la pared de las basidiosporas. En todas las preparaciones analizadas hasta ahora en esta cepa, a diferencia de la cepa silvestre UCD 67-385, las basidiosporas son redondeadas, de pared lisa y sin rugosidades. Esto último podría explicar las diferencias en las frecuencias de germinación y por lo tanto de viabilidad que se presentan entre ambas cepas (Tabla 9). En la Figura 5 es posible observar una basidiospora pequeña en el extremo de un holobasidio, también pueden observarse los pedúnculos sobre los cuales crecen las basidiosporas, llamados esterigmatas, que corresponden a estructuras características de basidiomicetes. Adicionalmente, la Figura 5 muestra una célula madre generando un holobasidio, y la cicatriz dejada por el holobasidio (Panel B). En la Figura 5 C se observan tres basidiosporas pequeñas en proceso de maduración, y en la Figura 5 D se observan dos basidiosporas maduras de forma ovalada y superficie lisa en el extremo del holobasidio.

3.7. Análisis de basidiosporas de *X. dendrorhous*. El análisis de campo pulsado de cultivos originados a partir de basidiosporas individuales de la cepa UCD 67-385 se realizó de acuerdo a lo establecido en nuestro laboratorio (Cifuentes *et al.*, 1997).

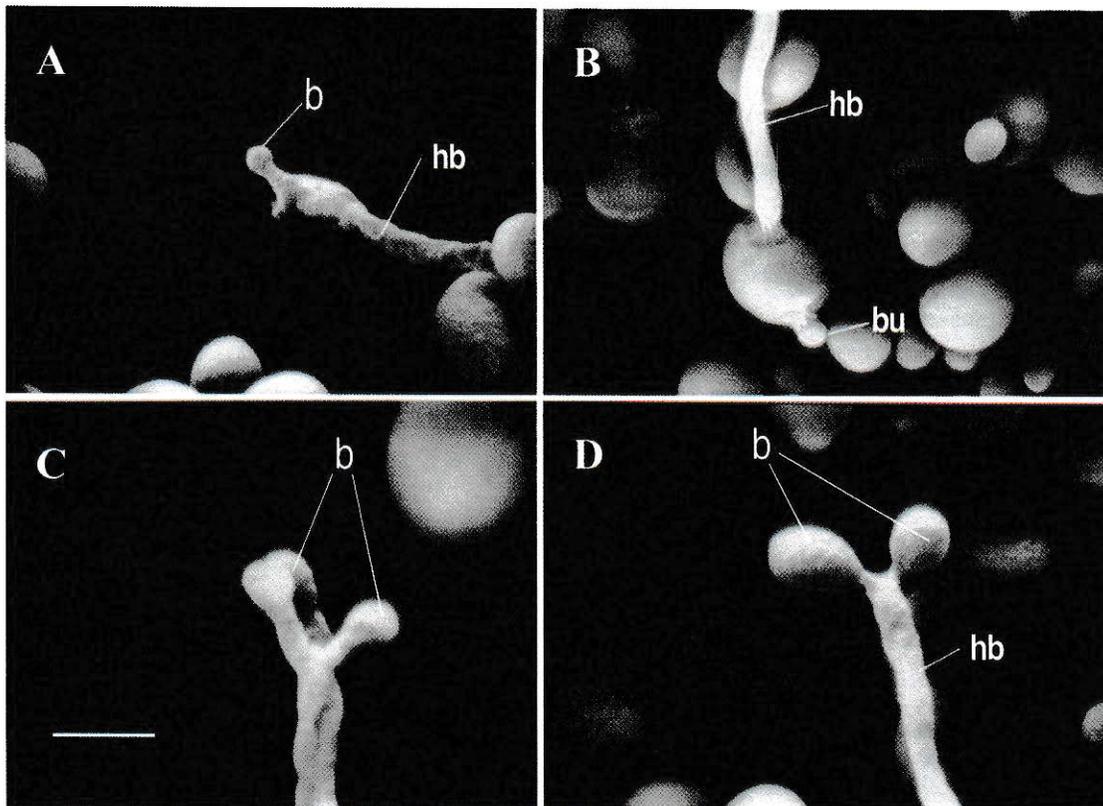


Figura 5. Fotografías de la estructura de holobasidios y basidiosporas, obtenidas mediante microscopía electrónica (SEM) en la cepa tipo VKM Y2786 de *X. dendrorhous*.

Estructura de holobasidios y basidiosporas, determinada mediante microscopía electrónica (SEM) en la cepa silvestre VKM Y2786 de *X. dendrorhous*. **A**, basidiospora pequeña en el extremo de un holobasidio y a su lado el pedúnculo de una basidiospora (esterigmata) que aun no ha emergido. **B**, una célula madre generando un holobasidio y una pequeña yema. **C**, tres basidiosporas en proceso de maduración en el extremo de un holobasidio. **D**, dos basidiosporas maduras de forma ovalada, aspecto regular y superficie lisa.

b, basidiospora; **hb**, holobasidio; **bu**, yema; **st**, esterigmata. La barra en el panel C indica 10 μm , válida para A, B y D.

3.7.1. Análisis de basidiosporas mediante electroforesis de campo pulsado. Las basidiosporas de la cepa silvestre UCD 67-385 fueron obtenidas mediante micromanipulación. Los cultivos originados a partir de basidiosporas fueron crecidos en medio completo YM, líquido, a 22 °C. En la Figura 6 se muestra el cariotipo electroforético de diferentes esporas, donde se observa la presencia de rearrreglos cromosómicos en 3 de las 7 preparaciones obtenidas a partir de las basidiosporas hermanas B1 y B2 (originadas a partir del mismo holobasidio) y de las basidiosporas obtenidas al azar, A1, C1, D1, E1 y F1.

Los cambios mostrados en los cariotipos electroforéticos de cultivos originados a partir de basidiosporas B1, C1 y E1 con respecto a la cepa parental UCD 67-385 sugieren la presencia de rearrreglos cromosómicos, posiblemente generados por eventos de recombinación durante la meiosis en la producción de basidiosporas de *X. dendrorhous* (Figura 6).

El análisis de electroforesis de campo pulsado de cultivos generados a partir de basidiosporas de las cepas VKM Y2786 y S3-88 no han mostrado diferencias en el cariotipo electroforético, lo cual puede asociarse al alto nivel de viabilidad de basidiosporas en esta cepa (Tabla 9). Esto último, sugiere que los cambios cromosómicos observados en la cepa UCD 67-385 pueden estar asociados a los bajos niveles de viabilidad presentes (Tabla 9).

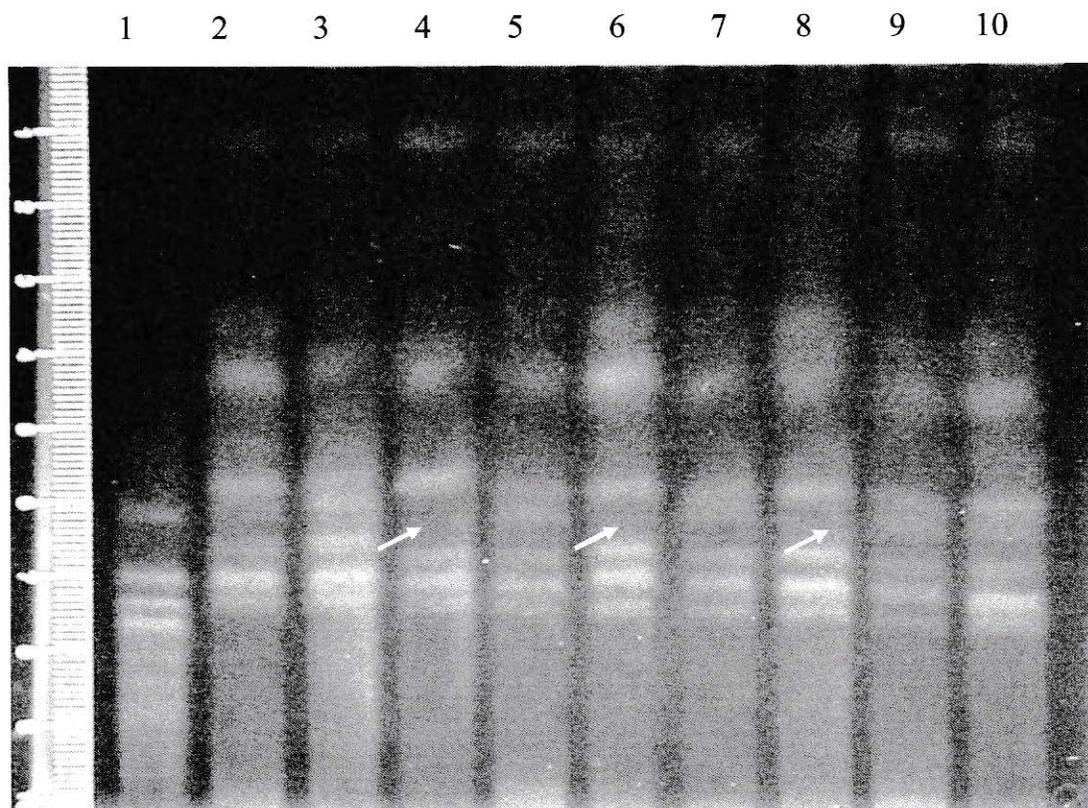


Figura 6. Análisis de campo pulsado de colonias originadas a partir de basidiosporas de la cepa silvestre UCD 67-385 de *X. dendrorhous*.

Las basidiosporas de la cepa UCD 67-385 de *X. dendrorhous* fueron aisladas mediante micromanipulación y germinadas en medio YM. A partir de cultivos individuales de basidiosporas se preparó DNA cromosómico intacto que fue analizado mediante electroforesis de campo pulsado. Las condiciones de corrida del CHEF DRII son las siguientes: Gel de agarosa 0,8%; TBE 0,5 X; ángulo de 120 °; Voltaje: 6 volt/cm; Temperatura: 14 °C. Block 1 Tiempo 12 h Switch inicial 120 s/ switch final 120 s. Block 2 Tiempo 12 h Switch inicial 60 s/ switch final 60 s. Las flechas indican la presencia de cambios cromosómicos. Orden en el gel. 1: YNN295 cepa control *S. cerevisiae*; 2: UCD 67-385; 3: A1; 4: B1; 5: B2; 6: C1; 7: D1; 8: E1; 9: F1; 10: UCD 67-385. B1 y B2 son basidiosporas hermanas (obtenidas del mismo holobasidio); A1, C1, D1, E1 y F1 son basidiosporas obtenidas al azar (de diferentes holobasidios).

3.8. Complementación de cepas afectadas en la esporulación en *X. dendrorhous*.

3.8.1. Fusión de protoplastos de cepas afectadas en la esporulación, *hol*⁻, en *X. dendrorhous*. La imposibilidad de realizar análisis genéticos mediante cruzamientos dirigidos en *X. dendrorhous*, representa un serio obstáculo para entender el proceso de desarrollo sexual, identificar alelos, definir grupos de complementación entre los mutantes afectados en el ciclo sexual y realizar análisis de recombinación meiótica. Debido a esto, la fusión de protoplastos constituye una herramienta fundamental para desarrollar el análisis genético en *X. dendrorhous*.

3.8.1.1. Análisis de complementación en *X. dendrorhous* mediante fusión de protoplastos. Con el objeto de determinar relaciones de dominancia y alelismo entre los dobles mutantes obtenidos en este trabajo se realizaron análisis de complementación entre mutantes dobles, incapaces de producir holobasidios y auxótrofos. La Tabla 11 muestra los resultados obtenidos de un experimento de fusión de protoplastos entre las cepas S3-88A15-40 *pro*⁻, *hol*⁻ y S3-88A9-32 *asp*⁻*hol*⁻. Los resultados de la Tabla 11 muestran que se han obtenido 3 fusantes protótrofos (FsAP1, FsAP2 y FsAP3) e indican que las mutaciones *hol*⁻ estudiadas son distintas en ambas cepas. Eso equivale a decir que no son alélicas y definen dos grupos de complementación distintos, el grupo **HolA** y el grupo **HolB**.

Tabla 11. Fusión de protoplastos de cepas auxótrofas y afectadas en la producción de holobasidios en *X. dendrorhous*.

Cepas fusionadas	Fenotipo	Número de Fusantes en MMv-KCl	Fenotipo fusante	% Reg. prot.
S3-88	rojo	0	—	5,0%
A: S3-88A9-32	<i>asp⁻, hol⁻</i>	0	—	5,0%
B: S3-88A15-40	<i>pro⁻, hol⁻</i>	0	—	1,4%
*A X B (FsAP1)	<i>hol+</i>	1	Rojo, protótrofo	2,4%
A X B (FsAP2)	<i>hol+</i>	1	Rojo, protótrofo	2,9%
A X B (FsAP3)	<i>hol+</i>	1	Rojo, protótrofo	—

A x B corresponde a una fusión de protoplastos de las cepas A: S3-88A9-32 *asp⁻hol⁻* y B: S3-88A15-40 *pro⁻,hol⁻*. Ninguna de las fusiones de las cepas auxótrofas (control) consigo misma originó fusantes protótrofos.

*. La fusión se realizó de acuerdo al método descrito en Materiales y Métodos, sección 2.7. MMv-KCl: medio mínimo KCl 0,8M de regeneración; *asp*: aspartato; *pro*: prolina, *hol*⁻: no produce holobasidios; *hol*⁺: produce holobasidios. El porcentaje de regeneración de protoplastos se ha obtenido como el cociente entre el número de colonias que crece en YM KCl 0,8M menos el número de colonias que crece sobre medio YM, sobre el número total de protoplastos contados al microscopio (Cámara Neubauer).

Los fusantes protótrofos han sido producidos con una frecuencia de $7,9 \times 10^{-4}$ y fueron seleccionados en placas de medio de regeneración MMv-KCl 0,8 M para forzar la complementación. Ninguno de los controles donde se fusiona cada cepa auxótrofa consigo misma originó fusantes de fenotipo protótrofo (Tabla 11). De acuerdo a los resultados es posible inferir un efecto de dominancia completa de los alelos silvestres *HOLA* y *HOLB* sobre sus alelos mutantes *hola*⁻ y *holB*⁻. Además los alelos que determinan las características de auxotrofia se comportarían como genes recesivos frente a sus alelos silvestres.

Las colonias fusantes fueron aisladas, replicadas y diluidas en placas de medio mínimo MMv y medio completo YM y fueron analizadas al microscopio óptico. En la Figura 7 se observan colonias protótrofos *hol*⁺, originadas a partir de la fusión de cepas auxótrofas *hol*⁻, donde segregan sectores que no producen holobasidios (*hol*⁻). Con respecto a esto, la presencia de fusantes protótrofos sectorizados indicaría que el carácter parental *hol*⁻ puede segregarse por recombinación mitótica en colonias fusantes *hol*⁺ (Fig 7). Alternativamente, el fenómeno puede ser explicado por pérdida de cromosomas o segregación nuclear. Por otra parte, se ha observado que en la mayoría de los casos las colonias fusantes protótrofas con el fenotipo de pigmentación silvestre, segregaron fenotipos de color parentales durante el período de estudio, mostrando inestabilidad fenotípica (Retamales *et al.*, 1998).



Figura 7. Colonias sectorizadas hol^+/hol^- a partir de cepas fusantes protótrofas de *X. dendrorhous*.

Las colonias sectorizadas provienen de cepas fusante protótrofas, originadas a partir de experimentos de fusión de protoplastos de las cepas mutantes hol^- (no producen holobasidios) S3-88A9-32 asp^-hol^- y S3-88A15-40 pro^-,hol^- . La colonia fusante fue diluída en medio MMv líquido y sembrada en placas medio YM. La fotografía fue obtenida mediante una cámara Kodak DS 120. Las flechas indican la presencia de sectores que segregan el fenotipo de producción de holobasidios (hol^+).

3.8.2. Análisis de complementación mediante transformación genética en *X. dendrorhous*.

Con el objeto de caracterizar determinantes genéticos involucrados en el desarrollo de holobasidios y basidiosporas terminales en *X. dendrorhous*, se realizó experimentos de transformación genética de cepas mutantes afectados en la producción de holobasidios (cepas *hol*⁻, Grupo de complementación A). Para ello se utilizó el procedimiento de transformación descrito por Adrio *et al.* (1995), y se utilizó como fuente de DNA de la cepa silvestre UCD 67-385 de *X. dendrorhous* una genoteca clonada en el sitio *Bam*HI del plasmidio integrativo YIp5. Esta genoteca esta compuesta por 65 grupos, y cada grupo poseen alrededor de 100 clones. En este trabajo se han utilizado 25 grupos de los 65 disponibles para experimentos de transformación. Los resultados de experimentos de transformación de la cepa S3-88A15-40 *pro*⁻, *hol*⁻ no han permitido obtener resultados positivos para el marcador *hol*⁻. Esto se debe fundamentalmente a la carencia de un vector apropiado, a la falta de un marcador de auxotrofia que permita la selección de transformantes y a que la genoteca disponible no es de la cepa VKM Y2786. Sin embargo, en uno de estos experimentos utilizando el pool PR25 de la genoteca se han obtenido 2 colonias transformantes que crecen en medio mínimo MMv (Tabla 12). Esto último, sugiere que en el pool PR25 de la genoteca esta presente el gen *PRO*⁺ (silvestre) de *X. dendrorhous*. Mayores estudios serán necesarios para confirmar este resultado.

Tabla 12. Electroporación de la cepa S3-88 A15-40 *pro⁻ hoI* de *X. dendrorhous*

Pool DNA Genoteca	PR25	PR2	PR10	PR12	Control sin DNA
Medio YM (15 placas)	0	0	0	0	0
Medio MMv (15 placas)	2*	0	0	0	0

Para el experimento de transformación por electroporación se procedió a sembrar un cultivo de 200 ml con la cepa S3-88 $pro^{-}hoI^{-}$ de *X. dendrorhous* de acuerdo a lo establecido en materiales y métodos sección 2.13.1. El DNA transformante corresponde a los pool PR25, PR10, PR12 y PR2 de la genoteca de la cepa UCD 67-385 construida en el sitio *Bam*HI del vector YIp5.

*Transformantes $pro^{+} ho^{-}$ que crecen en medio mínimo, MMv.

3.9 Análisis genético de basidiosporas y determinación de relaciones de ligamiento en *X. dendrorhous*. La imposibilidad de realizar cruzamientos dirigidos en esta levadura, fue superada mediante fusión de protoplastos de cepas afectadas en la producción de holobasidios (*hol*⁻), y portando diferentes marcadores genéticos. De esta manera, se fusionaron dos cepas que presentan requerimiento para arginina, la cepa sobreproductora roja A12-28 *hol*⁻ *arg3* que crece en citrulina pero no crece en ornitina (*orn*⁻), y la cepa albina (*al*), A4-69 *hol*⁺ que crece en ornitina y citrulina (*orn*⁺). El análisis mediante la utilización de intermediarios de la vía de síntesis de arginina reveló que estas cepas están afectadas en distintos productos génicos dentro de la vía (Figura 8). Además, la capacidad de la cepa roja A12-28 de crecer en citrulina y arginina sugiere que esta cepa podría estar afectada en la enzima ornitina carbamoil transferasa, que controla el paso entre ornitina y citrulina. En *S. cerevisiae* este paso es codificado por el gen *arg3* (Lacroute *et al.*, 1965). Esto permite definir el locus *ARG3* en de *X. dendrorhous*, y la cepa A12-28 portaría un alelo *arg3* responsable de su auxotrofia para arginina. El fusante protótrofo FS1AB (Figura 9) generado a partir de las cepas auxótrofas albina y roja presentó un fenotipo de color naranja sectorizado, indicando que los alelos mutantes se comportan en forma recesiva frente a sus alelos silvestres. Esto permitió definir el genotipo asociado a cada mutación. El análisis de recombinación mitótica reveló que algunas colonias naranjas, producidas a partir del sector de igual color del fusante FS1AB producían colonias que

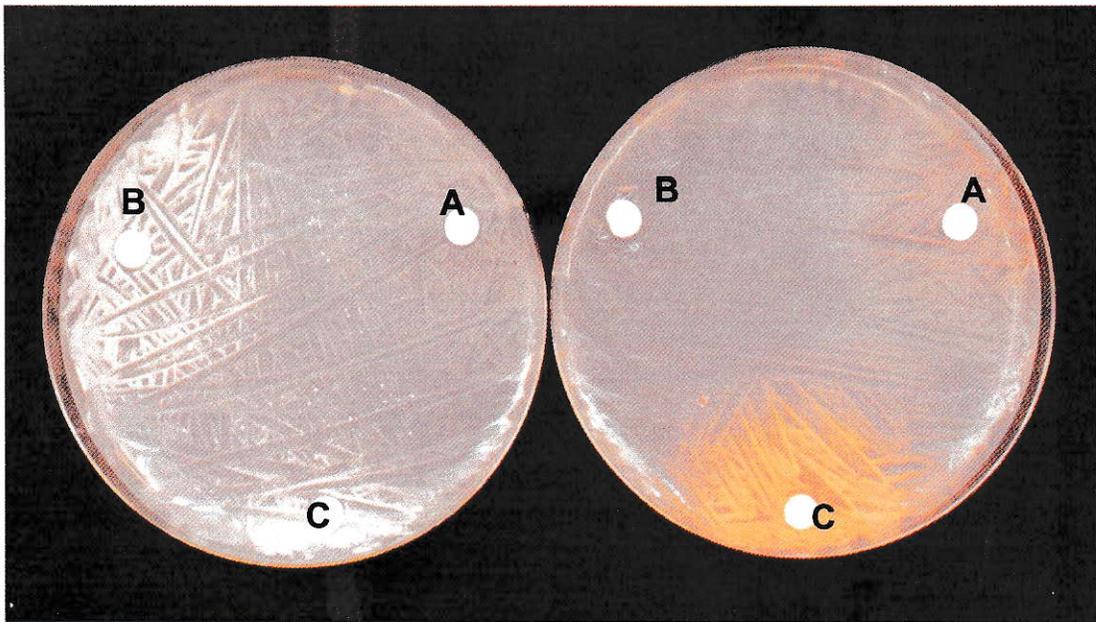


Figura 8. Análisis de mutantes auxótrofos utilizados en experimentos de fusión. Para determinar el tipo de auxotrofia de dos mutantes auxótrofos, uno albino, que produce holobasidios, A4-69 $al^- hol^+$ y otro de fenotipo rojo, y que no presenta producción de holobasidios A12-28 $hol^- sp^-$ se procedió a sembrar las cepas en placas MMv sobre las que se depositaron discos estériles a los que se agregó 15 μ l de una solución de cada intermediario. Las placas MMv se mantuvieron 5 días a 22 °C. **A:** arginina; **B:** ornitina; **C:** citrulina. La cepa A12-28 tiene una mutación posiblemente afectando al gen *arg3* que codifica por la enzima Ornitina carbamoil-P transferasa en *S. cerevisiae* (Lacroute *et al.*, 1965).

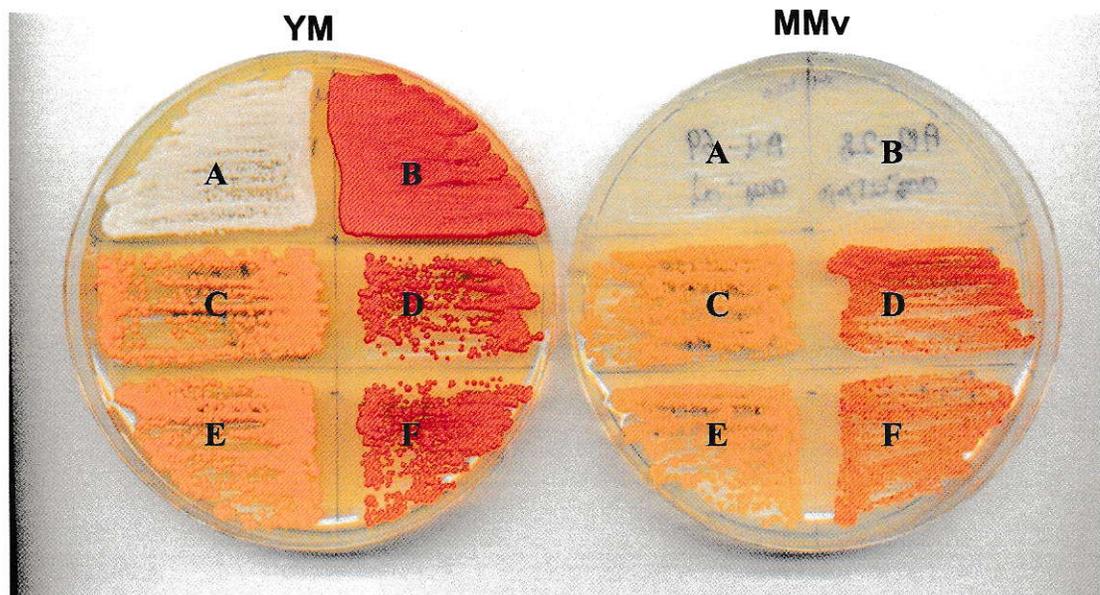


Figura 9. Fusante protótrofo FS1AB obtenido en experimentos de fusión de protoplastos. La fusión de protoplastos fue realizada según se indica en Materiales y métodos sección 2.7.2. La cepa fusante sectorizada fue obtenida a partir de una placa MMv-KCl, los sectores naranja y rojo fueron seleccionados y sembrados en duplicado en placas MMv e YM. Las placas fueron mantenidas a 22 °C durante 5 días. Cepas **A**: Control parental albino A4-69 *arg⁻ al⁻ hol⁺* **B**: Parental rojo A12-28 *arg⁻ hol⁻ sp⁻*. **C** y **E**: sector naranja de la colonia FS1AB, **D** y **F**: sector rojo de la colonia FS1AB.

sectorizaban los marcadores de carotenogénesis parentales, rojo y albino respectivamente. Además, el fusante protótrofo FS1AB segregó colonias auxótrofas que llamamos S12, S17, y S27 (Figura 10). Estos segregantes crecen en medio mínimo suplementado con algunos de los intermediarios de la vía de biosíntesis de arginina, indicando que segregan los marcadores de auxotrofia de los parentales A12-28 y A4-69.

Por otro lado, para el análisis de recombinación meiótica se indujo la esporulación de colonias naranjas obtenidas a partir del sector naranja del fusante FS1AB, posteriormente las basidiosporas fueron aisladas mediante micromanipulación e incubadas en condiciones de germinación. Las colonias originadas a partir de estas basidiosporas fueron picadas en replica en placas medio mínimo suplementadas con intermediarios de la vía de síntesis de arginina para determinar su auxotrofia (Figura 11). Finalmente, las colonias originadas a partir de las basidiosporas fueron analizadas en distintos tipos de medio. Los resultados del análisis de basidiosporas son mostrados en la Tabla 13 donde se indica el fenotipo, genotipo probable y número de basidiosporas analizadas. Mediante este procedimiento y aplicando una fórmula para determinar la distancia en unidades mapa se logró determinar que los marcadores sp^- y hol^- comparten un mismo grupo de ligamiento (9,1 um) junto a orn^- . Adicionalmente la distancia entre los marcadores hol y al fue mayor de 50 % indicando que estos marcadores no están ligados. Paralelamente la distancia entre los marcadores orn^- y al^- fue de 50,9 um indicando que estos se encuentran en diferentes grupos de ligamiento (Figura 12 A). Estos resultados permitieron proponer un mapa de ligamiento para estos marcadores genéticos en *X. dendrorhous* (Figura 12 B).

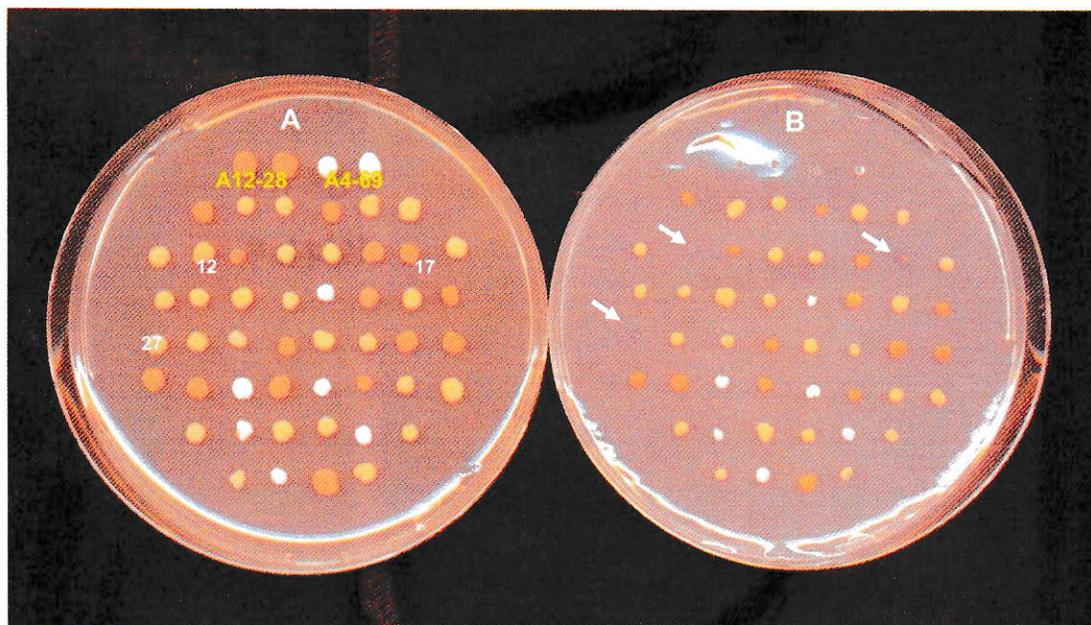


Figura 10. Análisis de segregación mitótica de marcadores de auxotrofia a partir del fusante FS1AB. Para el análisis de segregación mitótica de marcadores de auxotrofia la cepa FS1AB fue diluida en tubos con agua y las diluciones correspondientes fueron sembradas en placas YM. Las placas de las diluciones fueron incubadas por 6 días a 22 °C y posteriormente las colonias fueron picadas en placas de medio completo y mínimo. Los segregantes S12, S17 y S27 no crecen en medio mínimo MMv (flechas blancas). Los controles A4-69 y A12-28 sólo crecen en medio YM.

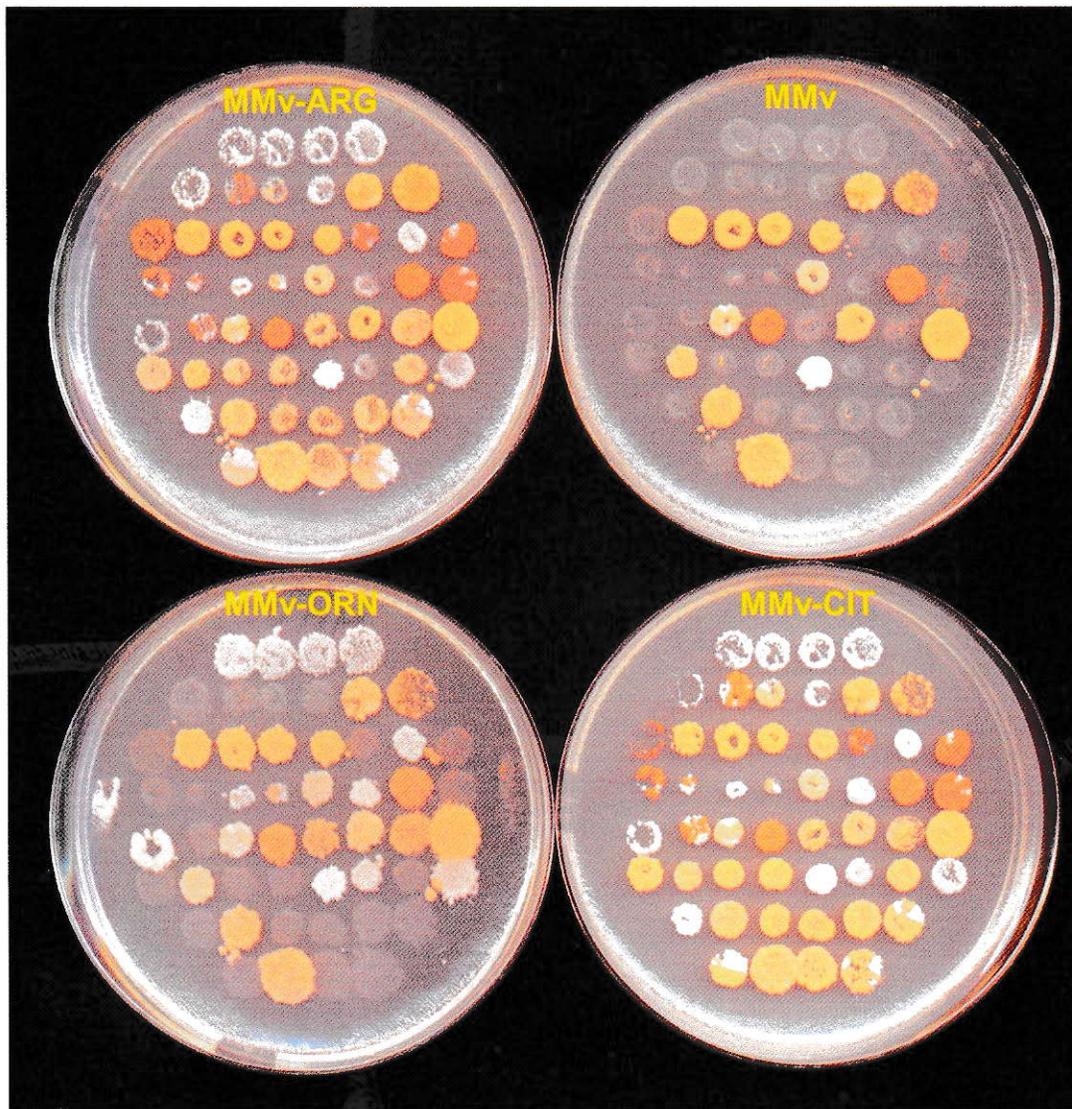


Figura 11. Análisis de basidiosporas de la cepa FS1AB de *X. dendrorhous*. Para el análisis de recombinación meiótica se indujo la esporulación de colonias naranjas obtenidas a partir del sector naranja del fusante FS1AB. Las basidiosporas fueron aisladas mediante micromanipulación e incubadas en condiciones de germinación. Para determinar el fenotipo de auxotrofia de cada basidiospora se procedió a sembrar las colonias en replicas de MMv suplementado con los intermediarios de la vía de síntesis de arginina. ORN: ornitina; ARG: arginina; CIT: citrulina.

Tabla 13. Fenotipo, genotipo y número de basidiosporas originadas a partir del sector naranja del fusante FS1AB de *X. dendrorhous*

Fenotipo basidiosporas	Genotipo				Número de basidiosporas
P1: A12-28 rojo	orn ⁻	sp ⁻	al ⁺	hol ⁻	6
P2: A4-69 albino	orn ⁺	sp ⁺	al ⁻	hol ⁺	6
r.n.*	orn ⁺	sp ⁺	al ⁺	hol ⁺	12
r.n.	orn ⁻	sp ⁺	al ⁺	hol ⁺	8
r.n.	orn ⁺	sp ⁺	al ⁺	hol ⁻	2
r.n.	orn ⁻	sp ⁺	al ⁺	hol ⁻	2
Albino	orn ⁺	sp ^{+/sp⁻?}	al ⁻	hol ⁻	4
Albino	orn ⁻	sp ^{+/sp⁻?}	al ⁻	hol ⁺	5
Albino	orn ⁻	sp ^{+/sp⁻?}	al ⁻	hol ⁻	7
Rojo	orn ⁺	sp ⁻	al ⁺	hol ⁻	2
Rojo	orn ⁺	sp ⁻	al ⁺	hol ⁺	1
Rojo	orn ⁻	sp ⁻	al ⁺	hol ⁺	1
Total					55

Para el análisis de recombinación meiótica las colonias originadas a partir de las basidiosporas de la cepa FS1AB fueron analizadas en distintos tipos de medio para determinar su color, fenotipo de auxotrofia y capacidad de producir holobasidios. El genotipo de las basidiosporas se dedujo a partir de las relaciones de complementación.

A

Marcadores analizados	Distancia (um)
d(orn+ al)	50,9
d(orn sp)	21,8
d(orn hol)	40,0
d(al hol+)	58,1
d(sp hol)	9,1
d(sp al)	43,6

B

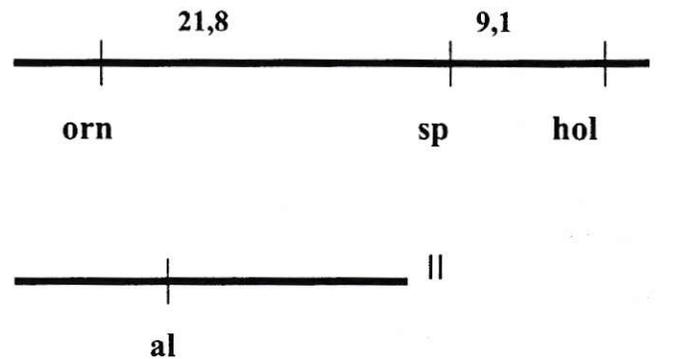


Figura 12. Determinación de relaciones de ligamiento en la cepa FS1AB de *X. dendrorhous*. Para el análisis de ligamiento se procedió a calcular la distancia en unidades mapa de recombinación a partir de los resultados de la Tabla 13. **A:** Distancia en unidades mapa entre los marcadores estudiados. **B:** Mapa de ligamiento. I y II representan grupos de ligamiento distintos en el genoma de *X. dendrorhous*.

4. DISCUSION

4.1. Condiciones de esporulación y germinación de basidiosporas en *X. dendrorhous*. Las diferencias en las frecuencia de germinación de basidiosporas en cepas silvestres y mutantes afectados en carotenogénesis parecen estar asociadas a diferencias fisiológicas y ambientales de las cepas estudiadas. Estimaciones cuantitativas del efecto de la temperatura sobre la esporulación han establecido un rango estrecho de temperaturas en las que es posible inducir la fase sexual en *X. dendrorhous*. El intervalo comprende temperaturas entre 4 y 10 °C, con un óptimo a 9 °C (Retamales *et al.*, 2002). Esto permite establecer que el rango de temperaturas que permite la esporulación es más estrecho que el rango que permite el crecimiento vegetativo, que en *X. dendrorhous* se registra entre 16 y 24 °C. Paralelamente, en nuestro laboratorio se realizaron experimentos tendientes a definir las condiciones óptimas de germinación en *X. dendrorhous*, encontrándose que un pulso frío de -20 °C por 20-25 min produce un aumento en las frecuencias de sobrevivencia de basidiosporas en todas las cepas de *X. dendrorhous* analizadas. En atención a esto, podemos suponer que la fase sexual de *X. dendrorhous* se ha adaptado a un medio-ambiente caracterizado por presentar un clima donde predominan bajas temperaturas, lo que permitiría explicar su inducción a temperaturas más bajas, que las correspondientes a su desarrollo vegetativo. Sin embargo, en medios conteniendo alcoholes polihídricos es posible inducir la fase sexual a temperaturas más altas, 18 °C, como ha sido descrito por Golubev (1995).

germinación está fuertemente influenciado por las condiciones de temperatura. Esta observación podría estar asociada a las características climáticas y ecológicas del hábitat natural en que se encuentran normalmente las cepas de *X. dendrorhous*. Con respecto a esto, las diferencias en el origen geográfico, las discrepancias en las frecuencias de germinación, y las características estructurales en la pared de basidiosporas de las cepas silvestres, UCD 67-385 y VKM Y2786 de *X. dendrorhous*, sugieren posibles diferencias ecofisiológicas entre estos aislados. Alternativamente, las diferencias en las frecuencias de germinación de los aislados estudiados, podrían indicar diferencias genéticas entre las cepas. Esto último, podría explicar las variaciones en los patrones de cariotipo electroforético, y su estudio podría permitir entender mejor la naturaleza del origen del polimorfismo cromosómico, su relación con el origen geográfico y las diferencias de viabilidad de esporas.

Por otra parte, la comparación de los porcentajes de germinación entre distintas cepas, silvestres y mutantes de *X. dendrorhous* sugieren que no existe una relación de proporcionalidad entre la relaciones de esporulación y la germinación en las cepas silvestres estudiadas. Esto significa que cada cepa silvestre representa junto a sus aislados mutantes (auxótrofos y afectados en la carotenogénesis) grupos que se comportan en forma independiente en cuanto a sus niveles de esporulación y frecuencias de germinación. Además, algunas cepas alto nivel de esporulación generan basidiosporas que no son capaces de germinar en las condiciones definidas en nuestro laboratorio. Un ejemplo de ello es la cepa Atx5, que presenta un nivel de esporulación tres veces mayor que la cepa silvestre UCD 67-385 pero no forma basidiosporas viables.

Esto último, podría ser explicado por una mutación que afecte algún componente del mecanismo de respuesta a las condiciones de desarrollo de basidiosporas, algún paso del proceso de germinación, o ambos. En *S. cerevisiae* la germinación de ascosporas es un proceso en el cual esporas quiescentes, en estado de latencia y que no presentan división celular llegan a ser competentes para experimentar división celular mitótica. A pesar de la importancia del proceso de germinación en el ciclo de desarrollo de levaduras, se han comunicado muy pocos estudios de este proceso. Los primeros estudios sobre germinación indicaron que este proceso es controlado por disponibilidad de nutrientes e identificaron una serie de cambios morfológicos que ocurren en la espora antes del primer ciclo celular (Hashimoto, *et al.*, 1958; Savarese, *et al.*, 1974). Estos revelaron que la germinación en *S. cerevisiae* no requiere oxígeno y es más eficiente cuando una fuente de carbono fermentable como glucosa o fructuosa está presente en el medio (Tingle *et al.*, 1974). La mayoría de los estudios pioneros sobre germinación usaron ensayos que medían eventos que ocurren tardíamente en el proceso de esporulación. Como consecuencia de ello, la identidad y requerimientos de los eventos de señalización iniciales y críticos que regulan la germinación de esporas son pobremente entendidos. Con respecto a este problema en 1997 se desarrolló un ensayo cuantitativo para analizar la germinación de esporas en *S. cerevisiae* (Herman, *et al.*, 1997). En dicho trabajo se estudió si genes importantes para la división mitótica son requeridos para la germinación y se examinó algunos requerimientos nutricionales y genéticos involucrados en el proceso. Se encontró que la germinación de esporas es un proceso de múltiples pasos, donde los requerimientos nutricionales son diferentes de aquellos que

se requieren para la división mitótica. La germinación no requiere la presencia de reguladores maestros de progresión del ciclo celular incluyendo la kinasa dependiente de ciclinas Cdc28p. Sin embargo, dos procesos esenciales para el desarrollo celular, la síntesis de proteínas y la señalización a través de proteínas Ras, son requeridos para la germinación de esporas (Herman *et al.*, 1997). Interesantemente, un aumento de la actividad de proteínas Ras en esporas resulta en un aumento de la velocidad de germinación en *S. cerevisiae*. Esto último podría explicar el fenotipo de la cepa mutante *ger1* de *X. dendrorhous*, la cual corresponde a hiper-germinación y sugiere que la activación de la vía de señalización de proteínas Ras es una limitante para la entrada en el programa de germinación (Herman *et al.*, 1997).

4.2. Mutantes auxótrofos y afectados en la carotenogénesis en *X. dendrorhous*.

Todas las cepas mutantes de color (Tabla 4) presentan una alta estabilidad fenotípica, sin producir revertantes en varias generaciones. Lo anterior permite suponer que el origen de la variación fenotípica en las cepas obtenidas, se deben a una alteración heredable en su genoma y no a cambios en el ámbito fisiológico, ya que estos últimos ocurren en una escala de tiempo corto y no son heredables. Por otro lado, la cepa sobreproductora de estructuras sexuales, S3-88 presenta un fenotipo de coloración rojo naranja más intensa que la cepa silvestre VKM Y2786. Esto podría estar asociado a un efecto de la composición de pigmentos carotenoides sobre la esporulación. En otros organismos el papel de los pigmentos carotenoides ha sido asociado a un efecto fotoprotector y a la intensidad de esporulación. Algunos mutantes *car* (incapaces de

sintetizar β -caroteno) en *Phycomyces*, difieren de la cepa silvestre en el número de macróforos y micróforos que producen en oscuridad. Se ha propuesto que la forogénesis sería influenciada por la cantidad de β -caroteno presente en la célula, sugiriendo una relación entre sexo, luz y carotenos (Corrochano *et al.*, 1992). Por otro lado, hay una relación bioquímica directa entre la vía de síntesis de β -caroteno y la morfogénesis sexual; ácidos trispóricos y hormonas sexuales en hongos filamentosos (mucorales), incluyendo *Phycomyces*, son sintetizados a partir de β -caroteno. Además, mutantes incapaces de producir β -caroteno fallan en el proceso de reconocimiento y estímulo sexual de la cepa complementaria y no pueden completar su ciclo sexual (Corrochano, *et al.* 1992).

La comparación entre las frecuencias de mutagénesis ha sido utilizada como una herramienta en la determinación de los niveles de ploidía de varios organismos. En relación a lo anterior encontramos que mutaciones recesivas tales como auxotrofías eran raramente obtenidos en *X. dendrorhous*, lo mismo ha sido reportado por otros autores (Nagy *et al.*, 1997; Wery *et al.*, 1997). De hecho, la dificultad para obtener mutantes auxótrofos en estudios previos (Martínez, 1995) fue superada al considerar a la cepa UCD 67-385 de *X. dendrorhous* como diploide, y aumentando la concentración del agente mutagénico de 40 a 80 y 100 $\mu\text{g/ml}$ de NTG (Retamales *et al.*, 1998a). Las condiciones de mutagénesis tienen un efecto crítico en la obtención de mutantes auxótrofos en la levadura. Factores como la concentración del mutágeno, el tiempo de exposición y el estado de desarrollo del cultivo pueden afectar notablemente la eficiencia del procedimiento. Por otra parte, la búsqueda de un sistema de selección de mutantes

bioquímicos en hongos permitió detectar la efectividad del antibiótico poliénico nistatina como un efectivo sistema cuando se utilizaba una población mezclada de células auxótrofas y protótrofas. El método desarrollado por Snow (Snow *et al.*, 1969) con *S. cerevisiae* fue aplicado satisfactoriamente en hongos filamentosos y levaduras como *Rhodotorula mucilaginosa* (Cook *et al.*, 1974), *Hansenula polymorpha* (Sanchez *et al.*, 1977) y *Candida tropicalis* (Gleeson *et al.*, 1990). Debido a las diferencias en la sensibilidad al antibiótico y en los patrones de desarrollo de diferentes microorganismos, métodos específicos de enriquecimiento con nistatina necesitan ser desarrollados para cada cepa en particular (Adrio *et al.*, 1993).

De un total de 42 mutantes aislados en esta tesis de la cepa tipo de *X. dendrorhous*, VKM Y2786, 16 son *arg-*, 5 son *leu-*, 4 *met-*, 3 *lis-*, 2 *ade-* y 1 *asp-* (Tabla 4). Estos resultados muestran que la frecuencia de mutagénesis en las cepas VKM Y2786 y S3-88 es de 0.02 y 0.016 respectivamente, casi dos ordenes de magnitud mayor que el rango observado en la cepa UCD 67-385 (Tabla 5). Esto último, sugiere que la cepa VKM Y2786 presentaría un nivel de ploidía menor que aquel observado en la cepa UCD 67-385, siendo haploide. Además, el espectro de mutantes auxótrofos obtenidos en la cepa UCD 67-385 muestra claramente la presencia de un fenómeno del tipo rango estrecho de mutantes, como ha sido descrito previamente en *C. albicans* (Whelan, *et al.*, 1981). Además, cuando se analiza el número total y el tipo de mutantes auxótrofos obtenidos con el fondo genético VKM Y2786, no se observan espectros restringidos de mutantes. Sin embargo, en la cepa UCD 67-385, 14 de los 33 mutantes auxótrofos obtenidos (42%) son *ade⁻* (Tabla 6). Este resultado fue interpretado como evidencia de

la presencia de una zona de heterocigosidad natural asociada al locus *ADE1* en la cepa UCD 67-385, y por lo tanto sugiere que esta cepa es diploide (Hermosilla *et al.*, 2003; Retamales *et al.*, 1998a).

4.3. Efecto del recambio de oxígeno en la esporulación. Los resultados de este trabajo sugieren que un aporte constante de oxígeno durante el período de diferenciación sexual es fundamental para la producción de holobasidios con basidiosporas en *X. dendrorhous*. Se puede concluir que una disminución en el aporte de oxígeno tiene un efecto negativo sobre la esporulación. Es posible que la disminución en el nivel de esporulación en las cepas que crecieron en placas sin recambio de oxígeno sea debida a un efecto indirecto generado por una alteración en el metabolismo oxidativo, muy posiblemente asociado a una disminución en la disponibilidad de ATP, y por lo tanto, una disminución de la actividad metabólica requerida para los procesos de morfogénesis de estructuras sexuales. Por otra parte, en *X. dendrorhous* una disminución en los niveles de oxígeno tienen un efecto negativo sobre la carotenogénesis que sugiere una relación entre sexo, oxígeno y carotenogénesis en *X. dendrorhous*.

En otros sistemas se han identificado varias clases diferentes de factores de transcripción que responden a los niveles de oxígeno. Por ejemplo en *S. cerevisiae* estos factores incluyen Rox1, el cual reprime la transcripción de genes hipóxicos bajo condiciones aeróbicas (Hon *et al.*, 2003). Mga2, el cual activa la transcripción de genes hipóxicos en respuesta a hipoxia (Jiang *et al.*, 2001) y Hap1 que promueve la transcripción de genes aeróbicos en condiciones aeróbicas (Creusot *et al.*, 1988). La

actividad de Hap1 y Rox1 es controlada por los niveles del grupo hemo. El grupo hemo activa Hap1 y permite que promueva la transcripción de una serie de genes requeridos para los procesos de respiración celular y estrés oxidativo. Estos genes incluyen *CYC1*, que codifica al citocromo c-iso-1; *CYC7*, que codifica al citocromo c-iso-2; *CYT1*, que codifica el citocromo c_1 ; *CTT1*, que codifica una catalasa e *YHB1*, que codifica una flavohemoglobina de levadura (Hon *et al.*, 2003). El grupo hemo es una molécula esencial que juega roles en reacciones involucrando oxígeno molecular debido a que su molécula forma parte del grupo prostético de hemo-proteínas, y participa en la regulación (funcionando como ligando) de una serie de factores de transcripción en procariontes (Monson *et al.*, 1995) y levaduras (Creusot *et al.*, 1988). También ha sido propuesto que el grupo hemo jugaría roles regulatorios similares en eucariontes (Sassa *et al.*, 1996). Sin embargo, a la fecha no se han identificado factores de transcripción en eucariontes superiores regulados directa o indirectamente por el grupo hemo. Tampoco se han identificado genes específicos de diferenciación sexual que sean regulados por los niveles de oxígeno molecular.

4.4. Mutantes afectados en la esporulación en *X. dendrorhous*. En este trabajo se obtuvo tres clases distintas de mutantes afectados en las condiciones de esporulación: En primer lugar, el grupo A, corresponde a mutantes incapaces de producir estructuras sexuales (mutantes *hol⁻*) en cualquiera de las condiciones analizadas. A este grupo pertenecen los mutantes Atx5, *hol⁻*, S3-33 y S4-63, presumiblemente bloqueados en determinantes genéticos esenciales para la vía de esporulación. Mutantes afectados en la

esporulación son ampliamente conocidos en otros sistemas, principalmente levaduras ascomicetes. Sin embargo, no se conocen otras levaduras basidiomicetes donde las células sean capaces de producir holobasidios con basidiosporas terminales, o bien no han sido descritas.

En el grupo B están aquellos mutantes que producen estructuras sexuales en medio mínimo y medio completo a 9 °C. En esta clase están los mutantes S4-70, H1, H2 y H35. La literatura disponible en otras levaduras indicaría que esta clase de mutantes estaría bloqueada en un sistema “sensor de nutrientes”, posiblemente mediado por un sistema proteína G-cAMP-PKA que estaría integrando las respuestas de apareamiento y “sensing de nutrientes”, tal como ocurre en *S. pombe*. Este sistema es ampliamente conservado en distintos eucariontes y regula la represión de ciertos genes en presencia de glucosa y otros nutrientes (Lengeler *et al.*, 2000). Uno de estos casos está representado por el mutante *git3* de *S. pombe* que presenta apareamiento sobre medio rico en nutrientes (Byrne *et al.*, 1993). La caracterización de *git3* indicó la presencia de una compleja trama de cascadas de señales de transducción mediadas por cAMP. La proteína Git3p desempeña el papel de un receptor transmembrana acoplado a la subunidad alfa de una proteína G específica que se activa en presencia de glucosa induciendo la actividad de una adenilato ciclasa, *git2/cyr1* (Isshiki *et al.*, 1992). En el modelo propuesto por Byrne *et al.* (1993) para *S. pombe*, una serie de genes denominados *git* (glucosa insensitive transcription) codifican por 6 proteínas (*git1*, 3, 4, 5 y 8) que detectan los niveles de glucosa y activan una adenilato ciclasa codificada por *git2* homóloga al producto del gen *cyr1* de *S. cerevisiae*. En esta cascada de señales *git8* codifica una sub-

unidad alfa de la proteína G que interactúa con un receptor transmembrana de glucosa (Git3p). Bajo condiciones de presencia de nutrientes, específicamente glucosa, Git3p activa a genes *git* río abajo y finalmente al gen *git2*. La adenilato ciclasa (*git2*) produce cAMP, que activa a una proteína kinasa dependiente de cAMP (cPKA), posiblemente codificada por el gen *git6*. La kinasa actúa inhibiendo la transcripción de una serie de genes involucrados con el metabolismo de glucosa y el apareamiento sexual (Byrne *et al.*, 1993). En *S. cerevisiae*, una segunda vía de señalización funciona en paralelo a la vía MAP-kinasa para regular la diferenciación pseudohifal en células diploides en respuesta a limitación de nutrientes. Esta segunda ruta es una vía de “sensing de nutrientes” e involucra un receptor acoplado a proteína G, Gpr1p, las sub-unidades alfa de proteína G; Gpa2p y Ras2p, una adenilil-ciclasa y una protein-kinasa dependiente de cAMP. Este sistema también regula la producción de cAMP en función de la glucosa extracelular, el cual modula la activación de genes específicos de filamentación, entre estos *Flo11* y *Flo8* (Lengeler *et al.*, 2000). Algunos autores han propuesto que los genes *Gpr1-Gpa2* jugarían un rol dual en el sistema de “sensing de nutrientes” sensando la presencia de un recurso de carbono fermentable, así como la presencia de nitrógeno (Xue *et al.*, 1998).

A la tercera clase (grupo C) pertenece un mutante (S3-88) que estaría afectado en determinantes genéticos “maestros” que controlarían el “sensing de nutrientes” y el “sensing de temperatura” o en determinantes genéticos que integrarían ambos sistemas. No se conocen otros sistemas de reguladores maestros que integren ambas variables y que estén asociados al control de la esporulación, o a otros aspectos del ciclo de desarrollo sexual en eucariontes. Las cepas mutantes generadas en este trabajo muestran

fenotipos que ponen en evidencia la presencia de distintos pasos en la morfogénesis sexual del ciclo reproductivo de *X. dendrorhous*. Estos resultados (sección 3.6.1) permiten inferir la presencia de determinantes genéticos específicos, que regularían la producción de esporas (*bas2*), independientemente de la producción de holobasidios (*hol¹*) en *X. dendrorhous*. Adicionalmente la presencia de una cepa que produce holobasidios curvados (*cur1*) permitiría inferir que existen determinantes genéticos que controlarían específicamente el proceso de elongación del holobasidio. Finalmente la presencia de mutantes que generan abundantes micro-colonias indicaría la presencia de determinantes genéticos específicos que controlarían el proceso de germinación en *X. dendrorhous*. Con respecto a esto un aumento de la actividad de proteínas Ras en ascosporas mutantes resulta en un aumento de la velocidad de germinación en *S. cerevisiae*. Esto podría explicar el fenotipo de la cepa mutante *ger1* de *X. dendrorhous*, que presenta un fenotipo de hiper-germinación y sugiere que la activación de la vía de señalización de proteínas Ras podría ser una limitante para la entrada en el programa de germinación (Herman *et al.*, 1997).

4.5. Microscopía electrónica de Barrido (SEM). El Análisis de microscopía electrónica ha revelado diferencias estructurales entre las cepas silvestres VKM Y2786 y UCD 67-385. En la Figura 4 fue posible observar una célula madre generando un holobasidio. Además se observa la cicatriz producida por una yemación sobre la pared de la célula madre. En todas estas preparaciones sólo fue posible observar un holobasidio por célula madre para cada célula esporulada. Sin embargo, fue posible observar

cicatrices dejadas por holobasidios anteriores en algunas preparaciones. Si cada holobasidio representa el conducto por donde migran los productos meióticos, como ha sido observado mediante tinción DAPI (Hermosilla., 1997), entonces cada célula madre podría experimentar más de un evento meiótico durante su ciclo reproductivo sexual. En la Figura 4 (B y C) se observó la presencia de dos tipos de basidiosporas, las rugosas y colapsadas antes mencionadas y otras que presentan una apariencia lisa y regular. Es posible que estas últimas puedan germinar, dando cuenta del 25% de viabilidad presente en las basidiosporas de la cepa UCD 67-385.

Por otro lado, en la cepa silvestre VKM Y2786 (Figura 5) no se observaron alteraciones en la pared de las basidiosporas. Esto podría explicar las diferencias en las frecuencias de germinación y por lo tanto de viabilidad que se presentan entre estas cepas. Adicionalmente, la Figura 5 B muestra una célula madre de la cepa VKM Y2786, generando un holobasidio y la cicatriz dejada por el holobasidio. Una observación interesante es que la célula madre está generando un holobasidio y por lo tanto, como se indicó antes, está en proceso de meiosis. Sin embargo, en esta misma figura fue posible observar que la célula madre también produjo una yema, lo cual se asocia a un proceso de división mitótico y a un ciclo vegetativo asexual. Esta observación es relevante desde el punto de vista genético y genera una pregunta que podría tener repercusiones importantes en el modelo de control del ciclo sexual en *X. dendrorhous*. ¿Cómo una misma célula puede estar coordinando paralelamente un proceso meiótico sexual y un proceso mitótico de división asexual?. La respuesta puede ser que existen dos núcleos distintos en un citoplasma compartimentalizado, generados por una mitosis pre-meiótica,

donde uno de ellos entra en meiosis y genera los núcleos que migran a través del holobasidio hacia las basidiosporas, y otro coordina la producción de una yema mitótica asexual. ¿Cómo la célula controla el tráfico de productos, citoplasma y núcleos a través del holobasidio?, ¿cómo impide la “conversación cruzada” entre productos génicos que resultarían incompatibles en un mismo citoplasma (mitosis/meiosis)?, y ¿cómo regula la distribución de núcleos a la basidiosporas? son preguntas que deberán ser abordadas en trabajos posteriores.

Por otro lado, las diferencias en el origen geográfico, las discrepancias en las frecuencias de germinación, y las diferencias estructurales en la pared de basidiosporas de las cepas silvestres, UCD 67-385 y VKM Y2786 de *X. dendrorhous*, sugieren posibles diferencias ecofisiológicas entre estos aislados. Además, es posible que las diferencias de viabilidad de basidiosporas estén asociadas a fenómenos de aneuploidía, traslocaciones, no-disyunción cromosómica u otro tipo de alteraciones cromosómicas durante la meiosis. Lo anterior podría estar relacionado con el desarrollo general de la espora, y en particular con aspectos básicos de la morfología de la pared celular. Con respecto a esto, la cepa UCD 67-385 de *X. dendrorhous* puede estar afectada en genes responsables de la síntesis de componentes específicos de la espora. En *S. cerevisiae* se han identificado una serie de genes requeridos para la rigidez de la pared celular, por ejemplo los genes *CDA1* y *CDA2* que están comprometidos en la actividad quitina deacetilasa, y son responsables de la síntesis de quitosan en la cubierta externa de la espora. Estos genes son específicamente expresados durante distintos períodos del proceso de esporulación (Christodoulidou, *et al.*, 1996). Esporas de las cepas mutantes

cda1 y *cda2* son más sensibles a enzimas hidrolíticas, pulsos de calor y presentan una baja viabilidad indicando la importancia de estos genes en la apropiada formación de la pared de la ascospora (Christodoulidou, *et al.*, 1996).

Por otro lado la cepa mutante *Atx5* en *X. dendrorhous* presenta un fenotipo donde las basidiosporas son incapaces de germinar (*ger2* Tabla 3). Es posible que esta cepa se encuentre afectada en determinantes genéticos que controlan la síntesis de componentes estructurales específicos de la espora, como por ejemplo *CDA1* o *CDA2* descritos anteriormente (Christodoulidou, *et al.*, 1996) o en genes que controlan la maduración de la pared de la espora, por ejemplo *SWMI* (spore wall maturation) descrito en *S. cerevisiae*. Alternativamente, la cepa *Atx5* puede estar afectada en componentes específicos de la vía de esporulación, por ejemplo en un sistema semejante a la cascada *Sps1p-Smk1p-MAP* kinasa específica de esporulación en *S. cerevisiae* (Ufano *et al.*, 1999).

Las alteraciones estructurales en la pared de basidiosporas observadas en la cepa silvestre UCD 67-385 de *X. dendrorhous*, puede tener importantes implicancias en la viabilidad y los procesos de germinación. En relación a esto, en *S. cerevisiae* la pared de la espora finalmente diferenciada provee una alta protección a diversas condiciones de estrés, comparada con la pared de la célula vegetativa y consiste de 4 láminas. Las dos capas internas están formadas por glucanos y mananos estrechamente yuxtapuestos y que a menudo aparecen al microscopio como una simple lamina. La tercera y cuarta lámina corresponden a estructuras específicas de la espora y están compuestas de quitosán y ditirosina respectivamente. Estas últimas confieren a la pared de la espora su

naturaleza protectora frente a diferentes condiciones de estrés (Briza *et al.*, 1990). La formación de estos componentes de pared celular requiere la actividad coordinada de enzimas involucradas en la biosíntesis de la pared de la espora (Briza *et al.*, 1990).

Los últimos eventos del programa de esporulación que conducen a la formación de la pared de la espora en *S. cerevisiae* requieren la activación de una cascada de genes. Un ejemplo es el gen *SWMI* el cual es expresado en bajos niveles durante el desarrollo vegetativo, mientras que su transcripción es fuertemente inducida bajo condiciones de esporulación (Ufano *et al.*, 1999). La delección del gen *SWMI* específicamente afecta la expresión de genes intermedio-tardíos y tardíos específicos de la esporulación. Todos los fenotipos *SWMI* observados afectan el desarrollo del asca y son similares a aquellos encontrados para la delección de *SPSI* o *SMK1*, dos componentes de la cascada Sps1p-Smk1p-MAP kinasa específica de esporulación y necesaria para distintos pasos de morfogénesis en *S. cerevisiae* (Wagner *et al.*, 1999; Ufano *et al.*, 1999). Es posible que determinantes homólogos a estos sistemas estén presentes en el proceso de morfogénesis de esporas en *X. dendrorhous*.

4.6. Polimorfismo cromosómico en esporas de *X. dendrorhous*. Los cambios mostrados en los cariotipos electroforéticos de cultivos originados a partir de basidiosporas B1, C1 y E1 con respecto a la cepa parental UCD 67-385, sugieren la presencia de eventos de recombinación durante la meiosis en la producción de basidiosporas en esta cepa de *X. dendrorhous* (Figura 6). Alternativamente, los eventos de recombinación meiótica pueden estar asociados a fenómenos de aneuploidía,

traslocaciones, no disyunción cromosómica, u otro tipo de alteraciones durante los procesos de desarrollo de basidiosporas. Paralelamente, los cambios cromosómicos observados pueden estar dando cuenta de las diferencias de viabilidad entre basidiosporas de diferentes cepas (Tabla 9). Análisis del cariotipo electroforético de cultivos generados a partir de basidiosporas de las cepas VKM Y2786 y S3-88 no han mostrado diferencias en el cariotipo electroforético (resultados no mostrados). Además, basidiosporas de las cepas VKM Y2786 y S3-88 presentan un alto nivel de viabilidad (80 %, Tabla 9). Esto sugiere que los cambios cromosómicos observados en la cepa UCD 67-385 pueden estar asociados a los bajos niveles de viabilidad de basidiosporas presentes en esta cepa.

4.7. Análisis de complementación en *X. dendrorhous* mediante fusión de protoplastos. Los trabajos de Golubev han permitido conocer la presencia de estructuras sexuales en esta especie. Mediante medios específicos este autor ha inducido la formación de holobasidios con basidiosporas terminales (Golubev, 1995). Aparentemente esta inducción estaría mediada por un proceso de pedogamia, donde el núcleo de la célula madre se fusiona con el de la yema (célula hija). Sin embargo se desconoce el aporte de células individuales en este proceso, tampoco se sabe si las basidiosporas resultantes son haploides o diploides, o si tipos de apareamiento complementario son necesarios. Todo lo anterior dificulta realizar un análisis genético clásico mediante cruzamientos en *X. dendrorhous* y hace necesaria la implementación de un sistema de análisis genético parasexual. Este tipo de estudios ha sido fundamental

para el análisis de especies de difícil estudio en las cuales no se conocía su fase perfecta, como es el caso de *Candida*, en la cual el desarrollo de técnicas parasexuales ha permitido establecer aspectos básicos de su biología, genética y patogenicidad. (Kakar *et al.*, 1983; Shepherd *et al.*, 1995; Kakar *et al.*, 1982).

El análisis parasexual de *X. dendrorhous* mediante fusión de protoplastos desarrollado en nuestro laboratorio, ha permitido conocer aspectos relevantes de su carotenogénesis (Martínez, *et al.*, 1995; Hermosilla *et al.*, 1997; Retamales *et al.*, 1998b). Con el objeto de determinar relaciones de dominancia y complementación entre los dobles mutantes se realizaron análisis de complementación entre dobles mutantes incapaces de producir holobasidios y auxótrofos. Los resultados indican que la cepa S3-88A15-40 *pro⁻ hol⁻* y la cepa S3-88A9-32 *asp⁻ hol⁻* no son alélicas, y definen dos grupos de complementación distintos, los grupos HolA y HolB. De acuerdo a esto es posible inferir un efecto de dominancia completa de los alelos silvestres *hol⁺*, sobre los alelos mutantes *hol⁻* y que los marcadores de auxotrofia se comportan como genes recesivos frente a sus alelos silvestres. Además, la presencia de fusantes protótrofos sectorizados indicaría que el carácter parental *hol⁻* puede segregarse por recombinación mitótica u otro mecanismo en colonias fusantes *hol⁺*. Por otra parte se ha observado que en la mayoría de los casos las colonias fusantes protótrofas con el fenotipo de pigmentación silvestre, segregaron fenotipos parentales durante el período de estudio, mostrando inestabilidad fenotípica. En relación a esto una cepa fusante de fenotipo silvestre, Fs15, que derivó de la fusión *Atx5;ade⁻* y *Atx3;pro⁻* mostró una frecuencia de segregación de colonias blancas y amarillas en medio YM (sin presión selectiva) de 5,0 x

10^{-3} y $5,4 \times 10^{-4}$ respectivamente. El análisis mediante curvas de crecimiento de la cepa FS15 establece claramente que la cepa silvestre posee la mayor tasa de crecimiento. Las cepas parentales (auxótrofas) tal como se esperaba no crecen en MMv. Por otro lado, los fusantes crecen en medio mínimo pero con una tasa menor a la de la cepa silvestre (Hermosilla, 1997). La presencia de fusantes estables e inestables permite evidenciar eventos de heterocariosis así como de cariogamia. El análisis de tinción de núcleos utilizando DAPI, en este mismo tipo de fusantes ha permitido establecer la presencia de más de un núcleo y la segregación de estos durante el evento de yemación (Hermosilla, 1997). En base a estos antecedentes es posible que la presencia de colonias sectorizadas, que segregan el carácter *hol⁻* se deba a segregación nuclear durante el desarrollo vegetativo en *X. dendrorhous*. Alternativamente, estos resultados pueden ser explicados por recombinación mitótica, pérdida de núcleos o por transferencia de material cromosómico entre núcleos. Con respecto a esto, la formación de un estado multicariótico en experimentos de fusión de protoplastos es un evento frecuente (Sarachek & Henderson, 1988). Una vez formado, los núcleos que lo constituyen pueden segregarse en forma aleatoria, originándose derivados monocarióticos (Sarachek *et al.*, 1981; sarachek *et al.*, 1986). También existe la posibilidad que ocurra fusión nuclear del heterocarión, aunque este evento ocurre en baja frecuencia, e incluso aún, con menor frecuencia puede darse la transferencia de material cromosómico desde un núcleo al otro (Sarachek & Weber, 1984).

4.8. Recombinación meiótica y determinación de relaciones de ligamiento en *X. dendrorhous*. El análisis de basidiosporas en la cepa fusante FS1AB mostró que es posible realizar estudios de genética clásica en *X. dendrorhous*. La imposibilidad de realizar cruzamientos dirigidos en esta levadura, fue superada mediante fusión de protoplastos de cepas afectadas en la producción de holobasidios (*hol⁻*), y portando diferentes marcadores genéticos. El fusante protótrofo FS1AB (Figura 9) generado a partir de las cepas auxótrofas albina y roja presentó un fenotipo de color naranja sectorizado, indicando que los alelos mutantes se comportan en forma recesiva frente a sus alelos silvestres. Esto permitió definir el genotipo asociado a cada mutación. Sin embargo, en el caso de las basidiosporas albinas no se pudo determinar el genotipo exacto debido a que esta mutación presenta un efecto epistático sobre la pigmentación y enmascara al fenotipo rojo sobreproductor (*sp⁻*) de la cepa A12-28.

El análisis de recombinación mitótica reveló que algunas colonias naranjas, producidas a partir del sector de igual color del fusante FS1AB producían colonias que sectorizaban los marcadores de carotenogénesis parentales, rojo y albino respectivamente. Esto puede explicarse por la presencia de eventos de segregación nuclear, fenómenos de haploidización, intercambio de cromosomas entre los núcleos del heterocarión u otros. Además, el fusante protótrofo FS1AB segregó colonias auxótrofas que llamamos S12, S17, y S27. Estos segregantes crecen en medio mínimo suplementado con algunos de los intermediarios de la vía de biosíntesis de arginina, confirmando que segregan los marcadores de auxotrofia de los parentales A12-28 y A4-69.

El análisis fenotípico de basidiosporas permitió determinar relaciones de complementación entre los marcadores utilizados e inferir el genotipo probable de los productos meióticos. Mediante este procedimiento y aplicando una fórmula para determinar la distancia en unidades mapa se logró determinar que los marcadores *sp⁻* y *hol⁻* comparten un mismo grupo de ligamiento junto a *orn⁻*. Adicionalmente la distancia entre los marcadores *hol* y *al* indicó que estos marcadores no están ligados. Paralelamente la distancia entre los marcadores *orn⁻* y *al⁻* fue de 50,9 um confirmando que el marcador *al⁻* se encuentra en un grupo de ligamiento diferente al de los otros marcadores estudiados.

4.9. Modelo del ciclo de desarrollo sexual. *X. dendrorhous* presenta actividad sexual inducida por el efecto de polioles en el medio de cultivo (Golubev, 1995) y adicionalmente en respuesta a cambios de temperatura y limitación de factores nutricionales sin la necesidad de utilizar polioles (Retamales *et al.*, 2002). Golubev ha propuesto que ciertos alcoholes polihídricos inducirían la conjugación entre la célula madre y su yema (pedogamia) y la formación de holobasidios alargados con basidiosporas terminales. Por otro lado, el análisis de diferentes mutantes auxótrofos y afectados en la carotenogénesis aporta evidencia genética de diploidía durante la fase vegetativa del ciclo de vida de *X. dendrorhous* (Hermosilla *et al.*, 2003). El apareamiento en esta levadura basidiomicete puede también deberse a la conjugación de dos células independientes. Este proceso estaría mediado por arresto en fase G1 del ciclo celular, al igual que en otras levaduras (Kucsera *et al.*, 1998). Por otro lado, esporas

aisladas desde tétradas de algunas cepas fueron capaces de esporular, indicando la presencia de parentales auto-esporulantes. Esto último sugiere un ciclo de vida homotálico en *X. dendrorhous*, un fenómeno raro en levaduras basidiomicetes (Kucsera *et al.*, 1998). Adicionalmente, análisis de cruzamientos de cepas portadoras de marcadores afectados en la carotenogénesis y auxótrofos ha revelado la presencia de células vegetativas diploides, las cuales podrían formar zigotos tetraploides transitorios después de la conjugación. Estos Zigotos no serían capaces de multiplicarse y entrarían inmediatamente en división meiótica para producir basidiosporas posiblemente diploides, aunque no se pueden descartar eventos de aneuploidia (Kucsera *et al.*, 1998). Las basidiosporas diploides podrían germinar y originar células vegetativas diploides, que en las condiciones adecuadas podrían generar holobasidios con basidiosporas mediante pedogamia. Esto último, podría estar asociado a un sistema de naturaleza homotálica como se muestra en el modelo de la Figura 13.

4.10. Disección genética del ciclo reproductivo en *X. dendrorhous*. En este trabajo hemos propuesto un modelo del ciclo sexual de *X. dendrorhous* basado en el estudio de mutantes morfológicos (que afectan la estructura de cuerpos fructíferos) y afectados en las condiciones de esporulación. El análisis de esta información permite inferir la presencia de potenciales componentes genéticos asociados al programa de esporulación (Figura 13). En primer lugar, el proceso de apareamiento, sea éste mediado por pedogamia o fusión de células independientes estaría controlado por determinantes genéticos que censan la presencia de las variables ambientales apropiadas.

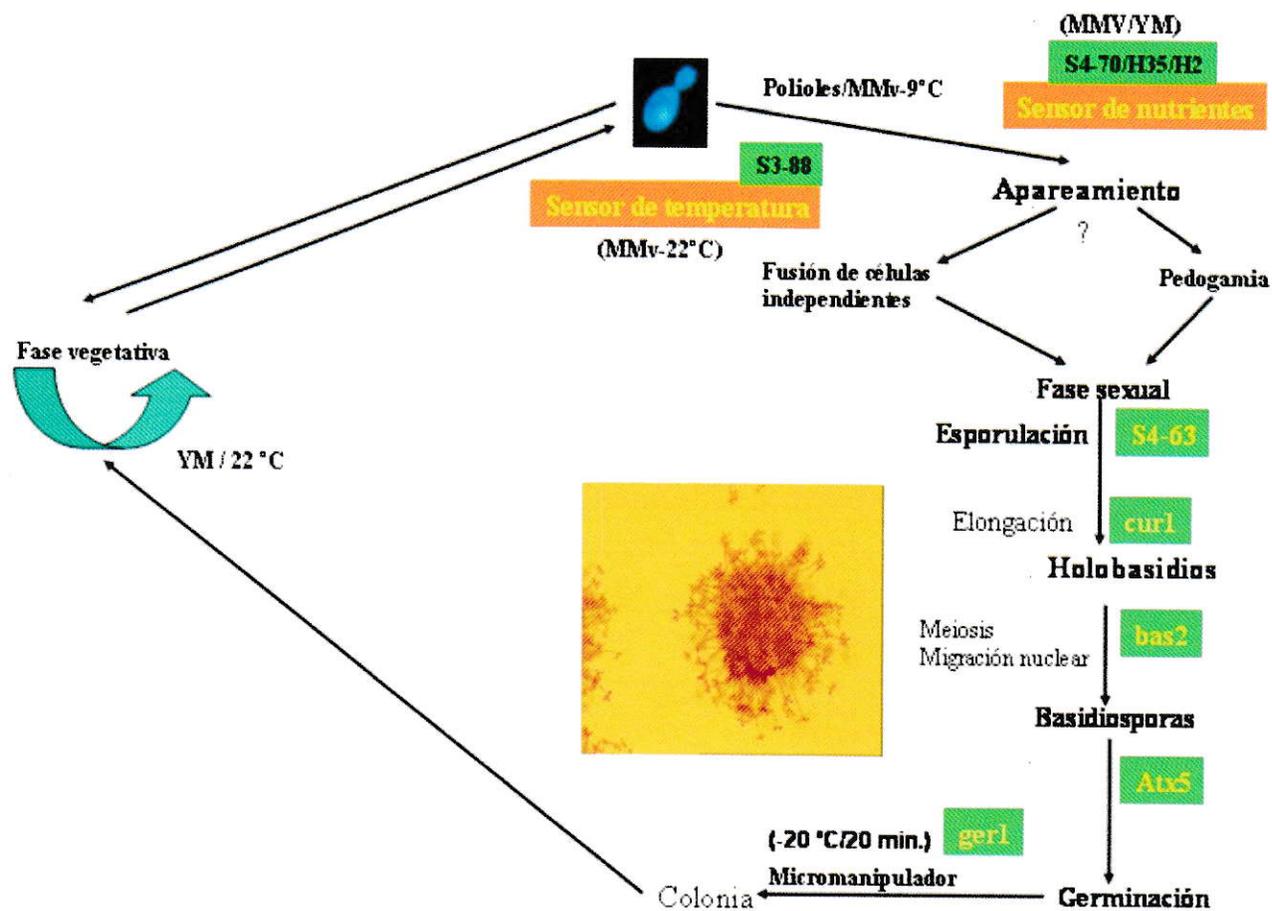


Figura 13. Modelo del ciclo reproductivo sexual de *X. dendrorhous*. Modelo del ciclo reproductivo sexual basado en análisis de disección genética, mediante el estudio de los fenotipos de mutantes afectados en la morfogénesis sexual y las condiciones de esporulación y germinación en *X. dendrorhous*.

Un grupo de mutantes que presenta esporulación en medio completo permite inferir la presencia de un Sistema Sensor de Nutrientes (SSN), y la presencia de cepas mutantes que desarrollan holobasidios con basidiosporas terminales a 22 °C permite inferir la presencia de un Sistema Sensor de Temperatura (SST) en *X. dendrorhous*. Estos sistemas dan cuenta de la presencia de mecanismos complejos, posiblemente involucrando cascadas de transducción de señales y circuitos moleculares complejos que asocian variables ambientales a programas de expresión genética diferencial durante el desarrollo de la fase perfecta del ciclo reproductivo sexual de *X. dendrorhous*. El Complejo SSN daría cuenta de genes que controlan que la esporulación sea inducida en un ambiente limitado de nutrientes. En general, la mayoría de las levaduras sólo presentan esporulación en medio mínimo. Lo anterior, sugiere la presencia de un mecanismo genético que sería capaz de iniciar la meiosis e inducir la formación de esporas sólo bajo condiciones de desarrollo desfavorables. Indudablemente que esto tiene implicancias adaptativas, relacionadas a que bajo condiciones adversas, grupos de células cambian su programa de desarrollo hacia meiosis para generar basidiosporas resistentes. Esto permitiría asegurar la sobrevivencia de la especie debido a que las basidiosporas pueden permanecer en largos períodos de latencia y germinar cuando las condiciones ambientales vuelven a ser favorables. Por otra parte, el complejo SST permite inferir la presencia de genes que controlan que la esporulación sea inducida bajo condiciones precisas de temperatura. Esto resulta relevante en un ambiente donde predominan bajas temperaturas la mayor parte del año. Adicionalmente, uno de los

mutantes obtenidos en este trabajo (S3-88) indica la existencia de determinantes genéticos que integrarían los sistemas SST y SSN.

Por otra parte, se han obtenido mutantes que están afectados en distintos pasos de la morfogénesis de estructuras sexuales reproductivas de *X. dendrorhous*. Por ejemplo, la cepa *bas2* es una cepa que produce holobasidios pero no genera basidiosporas terminales. Este fenotipo permite inferir la presencia de determinantes genéticos específicos, que controlarían la producción de la basidiospora espora en forma independiente de la producción del holobasidio. Adicionalmente, la etapa del ciclo bloqueada en esta cepa, coincide con aquella en que se presenta la meiosis y la migración de núcleos meióticos desde la célula madre a las basidiosporas. Por lo tanto, su incapacidad de producir basidiosporas puede deberse a anomalías durante alguna de las etapas del proceso de división meiótica o en alguno de los eventos o componentes que permiten la migración nuclear. Otro ejemplo es la cepa *curl* que genera holobasidios curvados. Este mutante permitiría inferir que existen determinantes genéticos que controlarían específicamente el proceso de elongación del holobasidio, siendo éste, un paso que debiera estar antes de aquellos que controlan la producción de basidiosporas.

Por otro lado, la cepa *ger1* genera abundantes microcolonias que son producidas por germinación de basidiosporas en la periferia de la colonia madre. Adicionalmente las microcolonias generan nuevamente holobasidios con basidiosporas, que a su vez, pueden germinar y generar otra microcolonia. Esto último, podría estar indicando la presencia de un sistema de apareamiento homotálico, donde cepas isogénicas podrían conjugar sin la necesidad de tipos de apareamiento complementarios en células independientes.

La mutación que afecta a la cepa *ger1* indicaría la presencia de determinantes genéticos específicos que controlarían el proceso de germinación en *X. dendrorhous*. Con respecto a esto último, un aumento de la actividad de proteínas Ras en ascosporas mutantes de *S. cerevisiae* resulta en un aumento de la velocidad de germinación (Herman *et al.*, 1997). Esto podría explicar el fenotipo de la cepa mutante *ger1* de *X. dendrorhous*, la cual presenta un fenotipo de hiper-germinación y sugiere que la activación de la vía de señalización mediada por proteínas Ras sería una limitante para la entrada en el programa de germinación. Finalmente, las mutantes S4-63 y S3-33 (no producen holobasidios) estarían asociadas a genes que controlan etapas iniciales en el proceso de esporulación, y la cepa *Atx5*, que no germina en ninguna de las condiciones estudiadas, indicaría que genes específicos regulan el proceso de germinación de basidiosporas en *X. dendrorhous* (Figura 13).

5. CONCLUSIONES

- 1) Las condiciones que inducen la germinación en *X. dendrorhous* están asociadas a un pulso de baja temperatura. Esto podría ser consecuencia de adaptaciones naturales a las condiciones ambientales, y en particular a las características de temperatura presentes en las regiones frías y montañosas donde estas cepas se obtuvieron.
- 2) La presencia de rearrreglos cromosómicos y las alteraciones en la pared de basidiosporas de la cepa silvestre UCD-67 385 podrían estar asociados a los bajos niveles de germinación en esta cepa.
- 3) Los mutantes obtenidos en este trabajo sugieren la presencia de determinantes genéticos que coordinarían un “Sistema Sensor de Nutrientes” y otro “Sistema Sensor de Temperatura” (SST), o en determinantes genéticos que integrarían ambos sistemas durante el proceso de esporulación en *X. dendrorhous*.
- 4) Las diferencias en los fenotipos de mutantes morfológicos sugieren la presencia de determinantes genéticos específicos que regularían diferencialmente la producción de esporas, la formación del holobasidios y la germinación de esporas en *X. dendrorhous*.
- 5) La cepa silvestre VKMY2786 de *X. dendrorhous* se comporta como una cepa haploide.
- 6) El desarrollo de estructuras sexuales en *X. dendrorhous* requiere una interfase aire-célula y la presencia de oxígeno.

7) La presencia de fusantes protótrofos (generados a partir de 2 cepas hol^-) capaces de generar holobasidios con basidiosporas, indica la presencia de dos grupos de complementación, *HOLA* y *HOLB* (S3-88A15-40 pro^-hol2 y S3-88A9-32 asp^-hol8). Adicionalmente, la presencia de fusantes protótrofos sectorizados indicaría que el carácter hol^- puede segregarse en colonias protótrofas hol^+ .

8) Es posible realizar estudios de genética clásica y determinar relaciones de ligamiento mediante análisis de basidiosporas en *X. dendrorhous*.

6. PROYECCIONES

Los resultados presentados en este trabajo generan una serie de proyecciones interesantes: En primer lugar, la determinación de las condiciones que permiten el desarrollo de basidiosporas y su germinación, facilitará enormemente el estudio de la biología reproductiva de la fase sexual de *X. dendrorhous*. Además, permitirá profundizar el estudio genético de esta levadura mediante el análisis de los productos meióticos, lo que conducirá a establecer relaciones de ligamiento entre marcadores genéticos de interés. El análisis de segregación podrá ser realizado mediante técnicas de micromanipulación de basidiosporas, a partir de holobasidios o bien de esporas obtenidas al azar. Esto, indudablemente permitirá realizar una determinación cuantitativa de las relaciones de ligamiento genético en términos de las frecuencias de recombinación meiótica y segregación de marcadores genéticos de interés.

Por otra parte, la descripción de mutantes morfológicos afectados en el desarrollo de holobasidios y basidiosporas, y otros afectados en las condiciones de esporulación, representan una oportunidad inmejorable para clonar los genes que participan en la formación de estructuras sexuales, y realizar estudios a nivel genético molecular en *X. dendrorhous*, que permitan un mejor conocimiento de las bases moleculares que controlan el ciclo reproductivo sexual, especialmente en aspectos del control genético de las condiciones de esporulación, germinación, morfogénesis y desarrollo del ciclo celular en *X. dendrorhous*.

Las cepas mutantes generadas en este trabajo pueden proyectarse en la construcción de cepas hospederas que permitirán optimizar el rescate de fusantes protótrofos y facilitar el reconocimiento de los transformantes para el clonado de genes. Adicionalmente estas cepas permitirán disponer de marcadores genéticos y cepas hospedantes adecuadas para profundizar en estudios relacionados a la carotenogénesis, y en optimizar el manejo biotecnológico industrial de *X. dendrorhous*.

Otro aspecto interesante de realizar sería la optimización de técnicas de extracción de proteínas a partir de cepas silvestres y mutantes de *X. dendrorhous*. La proyección de estos resultados permitirá enfocar aspectos relacionados a estudios de proteómica que conduzca a la identificación de proteínas específicas asociadas al ciclo sexual para lo cual se podrían utilizar procedimientos de análisis de geles bidimensionales de proteínas. El estudio de tales proteínas y su secuenciación permitirá realizar estudios de genética reversa, identificar, caracterizar y clonar los genes involucrados en la fase sexual de *X. dendrorhous*. Paralelamente, se podrán realizar estudios de “substracción de RNA” entre muestras sometidas a condiciones de “inducción” y “no inducción” de la esporulación. Esto último, permitirá caracterizar fragmentos de cDNA inducidos específicamente durante la fase sexual de *X. dendrorhous*.

El estudio de las alteraciones en la estructura de la pared de basidiosporas en la cepa silvestre UCD-67 385, lo cual podría dar una explicación de la reducida frecuencia de germinación de basidiosporas en esta cepa, comparada con la cepa tipo, VKMY2786. Esto último, podría sugerir la presencia de diferencias genéticas entre ambas cepas de *X. dendrorhous*. No obstante, las diferencias pueden estar asociadas a respuestas adaptativas, relacionadas con las condiciones ambientales del lugar de origen geográfico de las cepas, aspecto de la biología de esta especie que es necesario estudiar.

Por otra parte, clonar y caracterizar los genes involucrados en los sistemas “sensor de nutrientes” y “sensor de temperatura” permitirá un mejor entendimiento de los mecanismos generales que gobiernan la inducción de la fase sexual, y de los mecanismos y componentes específicos que controlan el programa de cascadas de transducción de señales que operan durante el ciclo celular en eucariontes. En particular, aquellos asociados a la transducción de señales relacionados con la presencia de nutrientes y cambios de temperatura.

Finalmente, nuestro sistema representa un modelo potencial para el estudio de los mecanismos de diferenciación celular, regulación genética de la meiosis, control del ciclo celular y aspectos moleculares del programa de desarrollo morfológico en el ciclo reproductivo sexual de eucariontes.

APENDICE N°1

Medios de cultivo.

1.- Medios de cultivo:

a) Medio YM

Extracto de levadura	0.3%
Glucosa	1.0%
Peptona	0.5%
Extracto de malta	0.3%

b) Medio YM-agar

Medio YM	
Agar	2.0%

c) Medio mínimo MMv

Glucosa	2.0%
Vogel 50 X	1 X

d) Medio mínimo MMv-agar

Medio mínimo MMv	
Agar	2.0%

e) Medio YEP

Extracto de levaduras	1%
Peptona	2%
Glucosa	2%

f) Medio YM-KCl-agar 0,7%

Medio YM	
KCl	0,8M
Agar	0,7%

g) Medio MMv-KCl-agar 0,7%

Medio YM	
KCl	0,8M
Agar	0,7%

2.- Soluciones para medios de cultivo

a) Vogel 25X

Citrato de sodio x 5H ₂ O	75.0 g/lt
KH ₂ PO ₄ anhidro	125.0 g/lt
NH ₄ NO ₃ anhidro	50.0 g/lt
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	5.0 g/lt
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	2.5 g/lt
Elementos trazas	2.5 ml
Biotina	24.0 mg/lt

APENDICE N° 2

Soluciones.

1.- Electroforesis de DNA

a) TAE 50X

Tris	242 g/lt
Acido acético glacial	57.1 ml/lt
EDTA (0.5 M) pH=8.0	100 ml/lt

b) TBE 5X

Tris base	54 g/lt
Acido bórico	27,5 g/lt
EDTA (0.5 M) pH=8.0	20 ml/lt

BIBLIOGRAFIA

- Adrio, J. and Veiga, M. 1995.** Transformation of the astaxanthin-producing yeast *Phaffia rhodozyma*. *Biotechnol. Tech.* **9**: 509-512.
- Adrio, J., Veiga, M., Casqueiro, J., López, M. and Fernández, C. 1993.** Isolation of *Phaffia rhodozyma* auxotrophic mutants by enrichment methods. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **39**: 303-312.
- Adrio, J., López, M., Casqueiro, J., Fernández, C. and Veiga, M. 1995.** Electrophoretic karyotype of astaxanthin-producing yeast *Phaffia rhodozyma*. *Curr. Genet.* **27**: 447-450.
- An, G. and Johnson, E. 1990.** Influence of light on growth and pigmentation of the yeast *Phaffia rhodozyma*. *Antonie Van Leeuwenhoek.* **57**: 191-203.
- An, G., Bielich, J., Auerbach, R. and Johnson, E. 1991.** Isolation and characterization of carotenoid hyperproducing mutants of yeast by flow cytometry and cell sorting. *Biotech.* **9**: 70-73.
- An, G., Schuman, D. and Johnson, E. 1989.** Isolation of *Phaffia rhodozyma* mutants with increased astaxanthin content. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**: 116-124.
- Andrewes, AG., Phaff, HJ. & Starr, MP. 1976.** Carotenoids of *P. rhodozyma*, a red pigmented fermenting yeast. *Phytochemistry* **15**:1003-1007.
- Begueret, J., Treq, B. and Clave, C. 1994.** Vegetative incompatibility in filamentous fungi : het genes begin to talk. *Trends Genet.* **10** : 441- 446.
- Briza P, Ellinger A, Winkler G, Breitenbach M. 1988.** Chemical composition of the yeast ascospore wall. The second outer layer consists of chitosan. *J Biol. Chem.***23**:11569-11574.
- Briza, P., Breitenbach, M., Ellinger, A., segall, J. 1990.** Isolation of two developmentally regulated genes involved in spore wall maturation in *saccharomyces cerevisiae*. *Genes. Dev.* **4**: 1775-1789.

- Byrne, S., and Hoffman, C. 1993.** Six *git* genes encode a glucose induced adenylate cyclase activation pathway in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Cell Sci.* **105**:1095-1100.
- Caldwell, G., Naidler, F. and Becker, J. 1995.** Fungal lipopeptide mating pheromones: a model system for the study of protein prenylation. *Microbiological. Rev.* **59**: 406-422.
- Calo, P. and Johnson, E. 1996.** Ploidy determination of *Phaffia rhodozyma* by flow cytometry. The congress on yeast genetics and molecular biology. Madison, Wisconsin, U.S.A. abstr. 126B, p.126. The Genetics Society of America, Bethesda, Md.
- Calo, P., Velázquez, J., Sicro, C., Blanco, P., Longo, E and Villa, T. 1995.** Analysis of astaxanthin and other carotenoids from several *Phaffia rhodozyma* mutants. *J. Agric. Food Chem.* **43**:1396-1399.
- Carrochano, L. and Cerdá-Olmedo, E. 1992.** Sex, light and carotenes: The development of *Phycomyces*. *Microbiol. rev.* **8**: 268-274.
- Castillo, A. and Cifuentes, V. 1994.** Presence of double-stranded RNA and virus-like particles in *Phaffia rhodozyma*. *Curr. Genet.* **26**: 364-368.
- Christodoulidou, A., Bouriotis, V and Thireos, G. 1996.** Two sporulation-specific chitin deacetylase-encoding genes are required for the ascospore wall rigidity of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **271**: 31420-31425.
- Chun, S., Chin, J., Bai, S. and An, G. 1992.** Strain improvement of *Phaffia rhodozyma* by protoplast fusion. *FEMS* **93**: 221-226.
- Cifuentes, V., Hermosilla, G., Martínez, C., León, R., Pincheira, G. & Jiménez, A. 1997** Genetics and electrophoretic karyotyping of wild-type and astaxanthin mutant strains of *Phaffia rhodozyma*. *Antonie van Leeuwenhoek* **72**: 111-117.
- Creusot F, Verdiere J, Gaisne M, Slonimski PP. 1988.** CYP1 (HAP1) regulator of oxygen-dependent gene expression in yeast. I. Overall organization of the protein sequence displays several novel structural domains. *J Mol Biol.* **(2)**:263-76.

- Cook, K. 1974.** Regulation of aromatic metabolism in fungi: Selection of mutants of the yeast *Rhodotorula mucilaginosa* with nystatin. *J. Gen. Microbiol.* **85**: 29-36.
- Ducrey, L., Sineriz, F., Spencer, J. and Spencer, D. 1992.** Characterization of intergeneric hybrids obtained by protoplast fusion between *Phaffia rhodozyma*, *Cryptococcus laurentii* and *Saccharomyces cerevisiae*. The sixteenth international conference on yeast genetics and molecular biology. Vienna, Austria. *In Yeast* **8**: S618 (Spec. Iss.)
- Esposito, RE. & Klapholz, S. 1981.** Meiosis and ascospore development. In *The Molecular Biology of the yeast Saccharomyces: Life cycle and inheritance* (ed. J.N. Strathern, E.W. Jones and J.R. Broach), pp. 211-287. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Evelyn, C., Debuchy, R., Arnais, S. and Picard, M. 1997.** Mating types and sexual development in filamentous ascomycetes. *Microbiol. and Molec Biol. Rev.* **61**: 411-428.
- Fang, T. and Cheng, Y. 1993.** Improvement of astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* through mutation and optimization of culture conditions. *J. Ferment. Bioeng.* **75**: 466-469.
- Gentles, A. and Haard, N. 1991.** Pigmentation of rainbow trout with enzyme-treated and spray-dried *Phaffia rhodozyma*. *Prog. Fish-cult.* **53**: 1-6.
- Girard, P., Falconnier, B., Bricout, J. and Vladescu, B. 1994.** β -carotene producing mutants of *Phaffia rhodozyma*. *Microbiol. Biotechnol.* **41**: 183-191.
- Gleeson, M., Haas, L. and Cregg, J. 1990.** Isolation of *Candida tropicalis* auxotrophic mutants. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 2562-2564.
- Golubev, W. 1995.** Perfect state of *Rhodomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*). *Yeast* **11**:101-110.
- Haard, N. 1988.** Astaxanthin formation by the yeast *Phaffia rhodozyma* on molasses. *Biotechnol. Lett.* **10**: 609-614.
- Hashimoto, T., Conti, S.F. and Naylor, H.B. 1958.** Fine structure of microorganisms: III electron microscopy of resting and germinating ascospores of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.*, **76**, 406-416

- Herman, P. and Rine, J. 1997.** Yeast spore germination: a requirement for Ras protein activity during re-entry into cell cycle. *EMBO. J.* **16:** 6171-6181.
- Hermosilla, G., Cifuentes, V., Martínez, C., León, R. y Jiménez, A. 1996.** Cariotipo electroforético de cepas silvestres y mutantes de astaxantina de *Phaffia rhodozyma*. *Acta Microbiol.* **6:** 26-28
- Hermosilla, G., León, R., Martínez, C. y Cifuentes, V. 1995.** Formación y regeneración de protoplastos en *Phaffia rhodozyma*. *Bol. Micol.* **10:** 71-75.
- Hermosilla, G. 1997.** Estudio de la organización del genoma de *Phaffia rhodozyma*. Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
- Hermosilla, G., Martínez, C., Retamales, P., León, R. and Cifuentes, V. 2003.** Genetic determination of ploidy level in *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Antonie Van Leeuwenhoek.* **84:** 279-287.
- Hon, T., Dodd, A., Dirmeier, R., Gorman, N., Sinclair, P., Zhang, L. and Poyton, R. 2003.** A Mechanism of Oxygen Sensing in Yeast. Multiple oxygen-responsive steps in the Heme biosynthetic pathway affect hap1 activity. *J. Biol. Chem.* **278 (50):** 50771-50780.
- Isshiki, T., Mochizuki, N., Maeda, T. and Yamamoto, M. 1992.** Characterization of a fission yeast gene, *gpa2*, that encode a Ga subunit involved in the monitoring of nutrition. *Genes Dev.* **6:**2455-2462.
- Jiang, Y., Vasconcelles, M. J., Wretzel, S., Light, A., Martin, E. and Goldberg, M. 2001.** MGA2 is involved in the low-oxygen response element-dependent hypoxic induction of genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **21:**6161-6169.
- Johnson, E. 1992.** New advances in astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma*. In *Profiles of Biotechnology*, p. 289-299. Villa T. and Abalde J. (eds). Servicio de publicaciones Universidad de Santiago. España..
- Johnson, E., Conklin, D. and Lewis, M. 1977.** The yeast *Phaffia rhodozyma* as a dietary pigment source for salmonids and crustaceans. *J. Fish. Res. Board Can.* **34:** 2417-2421.

- Lewis, M., Ragor, N., Berlant, M. and Miranda, M. 1990.** Selection of astaxanthin-overproducing mutants of *Phaffia rhodozyma* with *B*-Ionone. *App. Environ. Microbiol.* **56**: 2944-2945.
- Lengeler, K., Davidson, R., D'souza, C., Harashima, T., Shen, W., Wang, P., Pan, X., Waugh, M. and Heitman, J. 2000.** Signal transduction cascades regulating fungal development and virulence. *Microbiol. and Mol. Biol. Rev.* **64** (4):746-785.
- Lodato, P., Alcaino, J., Barahona, S., Retamales, P. and Cifuentes, V. 2003.** Alternative splicing of transcripts from *crtI* and *crtYB* genes of *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 4676-4682.
- Magee, P., Rikkerink, E. and Magee, B. 1988.** Methods for the genetics and molecular biology of *Candida albicans*. *Anal. Biochem.* **175**: 361-372.
- Martínez, C., Hermosilla, G., León, R., Urzúa, B. y Cifuentes, V. 1994.** Presencia de plásmidos de DNA de doble hebra en *Phaffia rhodozyma*. *Bol. Micol.* **9**: 25-30.
- Martínez, C. 1995.** Control genético de la síntesis de carotenos en *Phaffia rhodozyma*. Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
- Martínez, C., Hermosilla, G., León, R., Pincheira, G. & Cifuentes, V. 1998.** Genetic transformation of astaxanthin mutant strains of *P. rhodozyma*. *Antonie van Leeuwenhoek.* **73**: 147-153.
- Meyer, P. and Du Preez, J. 1993.** Effect of acetic acid on astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma*. *Biotechnol. Lett.* **15**: 919-924.
- Meyer, P. and Du Preez, J. 1994a.** Astaxanthin production by a *Phaffia rhodozyma* mutant on grape juice. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **10**: 178-183.
- Meyer, P. and Du Preez, J. 1994b.** Effect of culture conditions on astaxanthin production by a mutant of *Phaffia rhodozyma* in batch and chemostat culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **40**: 789-785.
- Meyer, P. and Du Preez, J. 1994c.** Photo-regulated astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* mutants. *Syst. Appl. Microbiol.* **17**: 24-31.

- Meyer, P., Du Preez, J. and Kilian, S. 1993. Selection and evaluation of astaxanthin-overproducing mutants of *Phaffia rhodozyma*. World J. Microbiol. Biotechnol. **9**: 514-520.
- Miller, M., Yoneyama, M. and Soneda, M. 1976. *Phaffia*, New yeast genus in the *Deuteromycotina* (*Blastomycetes*). Int. J. Syst. Bacteriol. **26**: 286-291.
- Mitchell, A. P. 1994. Control of meiotic gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. Microbiol. Rev. **58**: 56-70.
- Monson, E., Ditta, G., Helinski, D. 1995. The oxygen sensor protein, fixl, of *rhizobium meliloti*. Role of histidine residues in heme binding, phosphorylation, and signal transduction. J. Biol. Chem. **270**:5243-5250.
- Nag, D., Koonce, M and Axelrod, J. 1997. SSP1, a gene necessary for proper completion of meiotic divisions and spore formation in *saccharomyces cerevisiae*. Mol. Cell. Biol. **17**: 7029-7039.
- Nagy, A., Garamszegi, N., Vágvölgyi, C. and Ferenczy, L. 1994. Electrophoretic karyotypes of *Phaffia rhodozyma* strains. FEMS Microbiol. Lett. **123**: 315-318.
- Nagy, A., Palagy, Z., Ferenczy, L. and Vágvölgyi, C. 1997. Radiation induced chromosomal rearrangement as an aid to analysis of the genetic constitution of *Phaffia rhodozyma*. FEMS Microbiol. Lett. **152**:249-254.
- Okagbue, N. and Lewis, J. 1984a. Use of alfalfa residual juice as a substrate for propagation of the red yeast *Phaffia rhodozyma*. Appl. Microbiol. Biotechnol. **20**: 33-39.
- Okagbue, R. and Lewis, M. 1984b. Autolysis of the red yeast *Phaffia rhodozyma*: A potential tool to facilitate extraction of astaxanthin. Biotechnol. Lett. **6**: 247-250.
- Okagbue, R. and Lewis, M. 1985. Influence of mixed culture conditions on yeast-wall hydrolytic activity of *Bacillus circulans* WL-12 and on extractability of astaxanthin from the yeast *Phaffia rhodozyma*. J. Appl. Bacteriol. **59**: 243-255.

- Palagyi, Z., Nagy, A., Vagvoelgyi, C. and Ferenczy, L. 1995.** A new mutation protocol for obtaining auxotrophic mutants of the yeast *Phaffia rhodozyma*. *Biotechnol. Tech.* **9**: 401-402.
- Phaff, HJ. & Starmer, WT. 1989.** Yeast associated with plants, insects and soil, p.123-180. In *The Yeasts*, Rose A. and Harrison J. (eds.), **vol.2**. Academic Press, London.
- Pincheira, G. 1996.** Genes and Sex. Science essay. *The World*. Nov. 1996. Vol: **11** N°11. pag: 178-183.
- Poulter, R. and Rikkerink, E. 1983.** Genetic analysis of red, adenine-requiring mutants of *Candida albicans*. *J. Bacteriol.* **156**: 1066-1077.
- Poulter, R., Hanrahan, V., Jeffery, K., Markie, D., Shepherd, M. and Sullivan, P. 1982.** Recombination analysis of naturally diploid *Candida albicans*. *J. Bacteriol.* **152**: 969-975.
- Poulter, R., Jeffery, K., Hubbard, M., Shepherd, M. and Sullivan, P. 1981.** Parasexual genetic analysis of *Candida albicans* by spheroplast fusion. *J. Bacteriol.* **146**: 833-840.
- Retamales, P., León, R., Martínez, C., Hermosilla, G., Pincheira, G. and Cifuentes, V. 1998a.** Complementation analysis with new genetics markers in *P. rhodozyma*. *Antonie Van Leeuwenhoek.* **73**:229-236.
- Retamales, P. 1998b.** Caracterización genética de la fase sexuada de *Phaffia rhodozyma*. Tesis de Magíster. Facultad de Ciencias. Universidad de Chile.
- Retamales, P., Hermosilla, G., León, R., Martínez, C., Jiménez, A. Cifuentes, V. 2002.** Development of sexual reproductive cycle of *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *J. Microbiol. Methods.* **48**:87-93.
- Rose, M., Winston, F. and Heiter, P. 1990.** Techniques and protocols. In *Methods in yeast genetics: A laboratory course manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, U.S.A.
- Rubinstein, L., Altamirano, A., Ducrey-Santopietro, L., Baigori, M. & de Figueroa, LC. 1996.** Transformation of *P. rhodozyma* by electroporation. *Biotechnol. Techniques.* **10**:929-932.

- Sambrook, J., Fritsch, E. and Maniatis, T. 2001.** Molecular cloning: A laboratory manual. Third edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Sanchez, S. and Demain, A. 1977.** Enrichment of auxotrophic mutants in *Hansenula polymorpha*. Eur. J. Appl. Microbiol. **4**: 45-49.
- Sanderson, G. and Jolly, S. 1994.** The value of *Phaffia* yeast as a feed ingredient for salmonid fish. Aquaculture **124**: 193-200.
- Sarachek, A. and Henderson, L. 1988.** Variations for susceptibilities to ultraviolet induced cellular inactivation and gene segregation among protoplast fusion hybrids of *Candida albicans*. Cytobios **55**: 171-184.
- Sarachek, A. and Weber, A. 1984.** Temperature-dependent internuclear transfer of genetic material in heterokaryons of *Candida albicans*. Curr. Genet. **8**: 181-187.
- Sarachek, A. and Weber, A. 1986.** Segregant-defective heterokaryons of *Candida albicans*. Curr. Genet. **10**: 685-693.
- Sarachek, A., Rhoad, D. and Schwarzhoff, R. 1981.** Hybridization of *Candida albicans* through fusion of protoplast. Arch. Microbiol. **129**: 1-8.
- Sassa, S. and Nagai, T. 1996.** The role of heme in gene expression. Int. J. Hematol. **63**: 167-178.
- Savarese, J. 1974.** Germination studies on pure yeast ascospores. Can. J. Microbiol. **20(11)**:1517-1522.
- Schwartz, D., Cantor, C. 1984.** Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulse field gradient gel electrophoresis. Cell. **37**:67-75.
- Scherer, S. and P. Magee. 1990.** Genetics of *Candida albicans*. Microbiol. Rev. **54**: 226-241.
- Schroeder, W. and Johnson, E. 1995.** Singlet oxygen and peroxy radicals regulate carotenoid biosynthesis in *Phaffia rhodozyma*. J. Biol. Chem. **270**: 18374-18379.
- Schroeder, W. and Johnson, E. 1993.** Antioxidant role of carotenoids in *Phaffia rhodozyma*. J. Gen. Microbiol. **139**: 907-912.

- Shepherd, M., Poulter, R., and Sullivan, P. 1985. *Candida albicans*: Biology, genetics and pathogenicity. *Ann. Rev. Microbiol.* **39**:579-614.
- Slaninová, I., Kucsera, J. and Svoboda, A. 1999. Topology of microtubules and actin in the life cycle of *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*). *Antonie Van Leeuwenhoek.* **75**: 361-368.
- Snow, R. 1966. An enrichment method for auxotrophic yeast mutants using the antibiotic 'nystatin'. *Nature* **21**: 206-207.
- Spellman, P., Sherlock, G., Zhang, M., Lyer, V., Anders, K., Futcher, B. 1998. Comprehensive identification of cell cycle-regulated genes of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* by microarray hybridization. *Mol. Biol. Cell.* **9**: 3273-3297.
- Tingle, M.A., Kuenzi, M.T. and Halvorson, H.O. 1974. Germination of yeast spores lacking mitochondrial deoxyribonucleic acid. *J. Bacteriol.* **117**: 89-93.
- Varga, J., Vágvölgyi, C., Nagy, Á., Pfeiffer, Y. and Ferenczy, L. 1995. Isoenzyme, restriction fragment length polymorphism, and random amplified polymorphic DNA characterization of *Phaffia rhodozyma*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **45**:173-177.
- Verdoes, J.C., Krubasik, K.P., Sandmann, G., Van Ooyen, A.J. 1999a. Isolation and functional characterization of a novel type of carotenoid biosynthetic gene from *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Mol. Gen. genet.* **262**:453-461.
- Verdoes, J.C., Misawa, N., Van Ooyen, A.J. 1999b. Cloning and characterization of the astaxanthin biosynthetic gene encoding phytoene desaturase of *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Biotechnol. Bioeng.* **63**:750-755.
- Verdoes, J.C., Sandmann, G., Visser, H., Diaz, M., Mossel, M. and Ooyen, A.J. 2003. Metabolic engineering of the carotenoid biosynthetic pathway in the yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*). *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 3728-3738.
- Vogel, H.J. 1956. A convenient growth medium for *Neurospora* (medium N). *Microbiol. Genet. Bull.* **13** : 42-43.

- Ufano, S., San-segundo, P., Del Rey, F. and Vázquez, C. 1999. SWM1, a developmentally regulated gene, is required for spore wall assembly in *saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **19**: 2118-2129.
- Wagner, M., Briza, P., Pierce, M. and winter, E. 1999. Distinct steps morphogenesis requires distinct *SMK1* MAP Kinase Thresholds. *Genetics* **151**: 1327-1340.
- Wery, J., Dalderup, M., Ter linde, J., Boekhout, T. and Van Ooyen, A. 1996. Structural and phylogenetic analysis of the actin gene from the yeast *Phaffia rhodozyma*. *Yeast* **12**: 641-651.
- Wery, J., Gutker, D., Renniers, ACHM., Verdoes, JC. and Van Ooyen, AJJ. 1997. High copy number integration into the ribosomal DNA of the yeast *Phaffia rhodozyma*. *Gene* **184**: 89-97.
- Whelan, W. and Magee, P. 1981. Natural heterozygosity in *Candida albicans*. *J. Bacteriol.* **145**: 896-903.
- Whelan, W. and Soll, D. 1982. Mitotic recombination in *Candida albicans*: recessive lethal alleles linked to a gene required for methionine biosynthesis. *Mol. Gen. Genet.* **187**: 477-485.
- Whelan, W., Partridge R. and Magee, P. 1980. Heterozygosity and segregation in *Candida albicans*. *Mol. Gen. Genet.* **180**: 107-113.
- Wiame, J. 1971. The regulation of arginine metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*: Exclusion mechanisms. *Curr. Top. Cell. Regul.* **4**: 1
- Xue, Y., Batlle, M. and Hirsch, J. 1998. *GPR1* encodes a putative G protein-coupled receptor that associates with the Gpa2p G α subunit and functions in a Ras-independent pathway. *EMBO J.* **17**:1996-2007
- Yamada, Y. and Kawasaki, H. 1989. The genus *Phaffia* is phylogenetically separate from the genus *Cryptococcus* (Cryptococcaceae). *Agric. Biol. Chem.* **53**: 2845-2846.
- Yamada, Y., Nagahama, T. and Kawasaki, H. 1990. The phylogenetic relationship of the genera *Phaffia* Miller, Yoneyama *et* Soneda and *Cryptococcus* Kützing emend. Phaff *et* Spencer (Cryptococcaceae) based on the partial

sequences of 18S and 26S ribosomal ribonucleic acids. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **36**: 403-414.

Zickler, D., S. Arnais., E. Coppin., R. Debuchy., and M. Picard. 1995. Altered mating-type identity in the fungus *Podospora anserina* leads to selfish nuclei, uniparental progeny, and haploid meiosis. *Genetics.* **140** : 493-503.