

UCH-F  
MAG-B  
R437  
c.1

**CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE LA FASE  
SEXUADA DE *Phaffia rhodozyma***

Tesis

Entregada a la Universidad de Chile en  
cumplimiento parcial de los requisitos para optar  
al grado de Magister en Ciencias con mención en Biología

Facultad de Ciencias

por

**Patricio Edgardo Retamales Molina**

Director de tesis : Dr. Victor Cifuentes Guzmán

Co-Director : Dr. Guido Pincheira Vega

**1998**



**FACULTAD DE CIENCIAS  
UNIVERSIDAD DE CHILE**

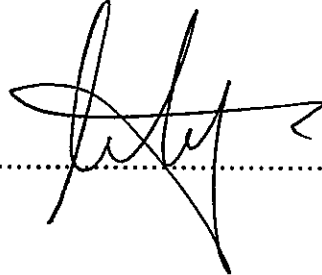
**INFORME DE APROBACIÓN  
TESIS DE MAGISTER**

Se informa a la comisión de postgrado de la Facultad de Ciencias que la tesis de Magister presentada por el candidato :

**Patricio Edgardo Retamales Molina**

ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la Tesis como requisito de Tesis para optar al grado de Magister en Ciencias con mención en Biología, en el examen de defensa de tesis rendido el

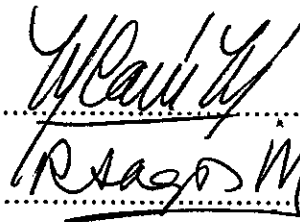
Director de Tesis :  
Dr. Víctor Cifuentes Guzmán



Co-Director de Tesis :  
Dr. Guido Pincheira Vega

Comisión Informante de Tesis :

Dra. Margarita Carú



Dra. Rosalba Lagos



Dr. Eduardo Piontelli

**A mis padres**

**María T. Molina y Edgardo Retamales**

**Por su amistad, amor y apoyo.**

## 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 acogerme en su laboratorio, por brindarme la oportunidad de trabajar y crecer junto a su equipo de trabajo, por darme su apoyo, preocupación, confianza y por haberme alentado en los momentos difíciles. También al Dr. Guido Pincheira por su estímulo, sabios consejos y por haber compartido con mi persona algo de su valiosa experiencia.

Al Dr. Claudio Martínez por sus valiosos consejos y críticas. También al Dr. Germán Hermosilla por su constante y desinteresado apoyo y a ambos por alentarme y motivarme cuando las cosas no resultaban, por brindarme sus consejos pero por sobre todo por distinguirme con su amistad.

A todos los miembros del subcomité de Genética, por su preocupación y apoyo en todo el desarrollo de mis estudios de Magister.

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.

A la Prof. Madeleine Lamborot por facilitar la realización de los experimentos de microscopía de epifluorescencia.

Al Dr. Julio Alcayaga por facilitar los experimentos de micromanipulación de basidiosporas.

A mis amigos del Laboratorio de Genética, Blanca Urzúa, Rubén León, Basilio Carrasco, Dionisia y Rafael Negrete quienes han sido un valioso apoyo, una fuente inagotable de sugerencias, ideas, estímulo y amistad.

A mis amigos, Fabián Flores, Dennis Morales, Luis Mondaca, Julio Maldonado, Eva Gática y Galia Rivera por enseñarme que fuera del laboratorio también existe un mundo.

A mis amigos del sindicato (Licenciatura) Martín Carmona, Rodolfo Madrid, Javier González, Claudio Solís, Carlos Rosa y Marco Cordova, por alentarme y por compartir conmigo su alegría y su amistad.

A toda mi familia, a mis padres Edgardo y María, a quienes dedico este trabajo, por su amor, su apoyo, y por enseñarme que el mejor camino es el derecho. A mis hermanas Catalina y Marcela Retamales que siempre me apoyaron e incentivaron a que siguiera estudios superiores.

A Rita Carrera por su cariño, apoyo y comprensión.

A mis sobrinas Cony y Vale por brindarme su ternura, su inocencia y por existir.

A todos los que me brindaron su amistad y apoyo, muchas gracias.

A la Universidad de Chile, historia y futuro de nuestra patria por brindarme el honor de egresar de sus aulas. A la Vicerrectoría Académica y Estudiantil por haberme otorgado la beca de tesis PG/030/97.

A Dios que me da la fuerza, la alegría y la pena para vivir cada día... sabiendo que hay tanto que amar... tanto que aprender... y tan poco tiempo.

## INDICE

	página
AGRADECIMIENTOS	ii
LISTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE TABLAS	vii
ABREVIATURAS	viii
RESUMEN	ix
ABSTRACT	xii
INTRODUCCION	1
MATERIALES Y METODOS	11
I. Materiales	11
1. Material biológico	11
1.1 Levaduras	11
1.2 Enzimas	12
2. Reactivos químicos y medios de cultivo	12
II. Métodos	13
1. Cultivos de microorganismos	13
1.1 Hongos	13
2. Mantención de cepas	13
2.1 Levaduras	13
3. Mutagénesis	14
3.1 Nitrosoguanidina	14
3.2 Enriquecimiento con nistatina	14
3.3 Selección de mutantes auxótrofos	15
3.4 Identificación de la auxotrofia	15
3.5 Selección e identificación de mutantes afectados en la carotenogénesis	16

3.6 Estabilidad de la mutación	16
4. Análisis parasexual	17
4.1 Obtención de protoplastos	17
4.2 Fusión de protoplastos	17
5. Análisis de los fusantes	19
5.1 Curvas de crecimiento	19
5.2 Tinción de núcleos de <i>Phaffia rhodozyma</i>	19
5.3 Análisis de pigmentos	20
5.4 Formación de estructuras sexuales	21
5.5 Análisis de segregación	21
6. Formación de estructuras sexuales en <i>Phaffia rhodozyma</i>	22
6.1 Determinación del efecto ambiental	22
6.1.1 Tipo de medio sólido	22
6.1.2 Recurso de nitrógeno	22
6.1.3 Fuente de carbono	22
6.1.4 Temperatura	23
7. Micromanipulación	23
7.1 Micromanipulación de las basidiosporas	23
8. Purificación de DNA	24
8.1 DNA genómico de <i>P. rhodozyma</i> .	24
8.2. Extracción de ácidos nucleicos	24
RESULTADOS	26
1. Obtención de mutantes afectados en la síntesis de pigmentos carotenoides	26
2. Análisis de los mutantes	30
2.1. Estabilidad de los mutantes en carotenogénesis	30
3. Obtención de mutantes auxótrofos en <i>Phaffia rhodozyma</i>	30
3.1. Identificación de requerimientos nutricionales	31
4. Fusión de protoplastos de cepas auxótrofas de <i>P. rhodozyma</i>	39
4.1 Análisis de complementación en <i>Phaffia rhodozyma</i>	39
4.1.1 Análisis de complementación entre mutantes auxótrofos <i>arg-</i> y <i>pro-</i>	41

4.1.2 Análisis de complementación entre cepas auxótrofas para adenina	42
4.1.3 Análisis de complementación entre cepas auxótrofas para prolina	43
5. Formación de estructuras sexuales en <i>Phaffia rhodozyma</i>	49
5.1 Influencia de factores ambientales en la esporulación	49
5.1.1 Efecto del medio de cultivo	49
5.1.2 Efecto del amonio como recurso de nitrógeno	52
5.1.3 Efecto de la glucosa como recurso de carbono	52
5.1.4 Efecto de la temperatura en la esporulación de <i>P. rhodozyma</i>	53
6. Inducción de estructuras sexuales por fusión de protoplastos	57
DISCUSION	62
CONCLUSIONES	88
PROYECCIONES	90
Apéndice N°1	93
Apéndice N°2	96
BIBLIOGRAFÍA	97

## LISTA DE FIGURAS

	Página
Fig. 1 : Cultivo en placa de la cepa silvestre UCD 67-385 de <i>Phaffia rhodozyma</i> y cinco mutantes en pigmentación derivados de ella.	29
Fig. 2 : Cultivo en placa del mutante auxótrofo NNatx5A17-11 de <i>Phaffia rhodozyma</i> .	34
Fig. 3 : Cultivo en placa del mutante auxótrofo NNatx6A10-6 de <i>Phaffia rhodozyma</i> .	35
Fig. 4 : Cultivo en placa del mutante auxótrofo NNatx6A19-16 de <i>Phaffia rhodozyma</i> .	36
Fig. 5 : Efecto del medio de cultivo sobre la formación de estructuras sexuales en el fusante Fs15 de <i>Phaffia rhodozyma</i>	50
Fig. 6 : Cinética de formación de estructuras sexuales en cuatro cepas de <i>Phaffia rhodozyma</i>	51
Fig. 7 : Efecto de la concentración de nitrato de amonio como fuente de nitrógeno, sobre la formación de estructuras sexuales en siete cepas de <i>Phaffia rhodozyma</i> .	54
Fig. 8 : Efecto de la concentración de glucosa como recurso de carbono en la formación de estructuras sexuales en <i>Phaffia rhodozyma</i> .	55
Fig. 9 : Efecto de la temperatura sobre la esporulación en seis cepas de <i>Phaffia rhodozyma</i> .	56
Fig. 10: Colonia Fs15 presentando estructuras sexuales.	60
Fig. 11: Microfotografía de una microcolonia en la cepa silvestre UCD 67-385 de <i>Phaffia rhodozyma</i> .	61
Fig. 12: Vía metabólica de arginina y prolina descrita en <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	71



## LISTA DE TABLAS

	Página
Tabla 1 : Frecuencia y porcentaje de sobrevivida en experimentos de mutagénesis de <i>Phaffia rhodozyma</i>	27
Tabla 2 : Número y fenotipo de mutantes nulimorficos para la síntesis de pigmentos carotenoides obtenidos en <i>Phaffia rhodozyma</i>	28
Tabla 3 : Frecuencia de obtención de mutantes auxótrofos en seis cepas de <i>Phaffia rhodozyma</i> .	32
Tabla 4 : Tipo, número y frecuencia de reversión de mutantes auxótrofos obtenidos por mutagénesis desde cepas de <i>Phaffia rhodozyma</i> .	37
Tabla 5 : Análisis de suplementación con intermediarios metabólicos de mutantes auxótrofos que requieren arginina y prolina en <i>Phaffia rhodozyma</i> .	38
Tabla 6 : Fusión de protoplastos de cepas auxótrofas y afectadas en carotenogénesis en <i>Phaffia rhodozyma</i> .	41
Tabla 7 : Fusión de protoplastos de cepas auxótrofas obtenidas en forma independiente y que presentan requerimiento para arginina.	43
Tabla 8 : Fusión de protoplastos entre cepas dobles mutantes, afectadas en carotenogénesis y que requieren adenina.	45
Tabla 9 : Fusión de protoplastos entre cepas dobles mutantes, afectadas en carotenogénesis y que requieren prolina.	48
Tabla 10 : Efecto de la fusión de protoplastos en el nivel de esporulación en <i>Phaffia rhodozyma</i> .	59

## ABREVIATURAS

DAPI	4,6-diamino-2-fenilindol
DNA	ácido desoxirribonucleico
D.O.	Densidad óptica
EDTA	ácido etilendiaminotetracético
Kb	Kilobases
Mb	Megabases
MMv	medio mínimo Vogel
MMv-KCl	medio mínimo Vogel, KCl 0,8M
NTG	N-metil-N'-nitro-nitrosoguanidina
P5C	pirrolina-5-carboxilato
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
RNA	ácido ribonucleico
SDS	dodecil sulfato de sodio
Tris	tris(hidroximetil)aminoetano
UV	ultravioleta
YM	medio rico para <i>Phaffia rhodozyma</i>
YM-KCl	medio rico, KCl 0,8M

## RESUMEN

Un eficiente tratamiento mutagénico de la cepa silvestre y cepas mutantes afectadas en la carotenogénesis de *P. rhodozyma* ha permitido obtener una serie de mutantes auxótrofos, luego de un enriquecimiento de mutantes con nistatina. El agente mutagénico utilizado ha sido nitrosoguanidina en concentraciones de 50, 80 y 100  $\mu\text{g/ml}$  y el enriquecimiento con nistatina a una concentración de 10  $\mu\text{g/ml}$ . La obtención de mutantes se logró con frecuencias que varían entre  $1 \times 10^{-3}$  y  $8,6 \times 10^{-4}$  con 0,12% de sobrevivencia, mientras que las frecuencias de reversión espontánea estuvieron entre  $3,8 \times 10^{-6}$  y  $1,5 \times 10^{-8}$  dependiendo de la cepa. Se han obtenido 33 mutantes auxótrofos, a partir de la cepa silvestre UCD 67-385 y se han seleccionado 5 cepas afectadas en la carotenogénesis. Entre los mutantes auxótrofos, los más frecuentes son aquellos que requieren adenina (42%) y metionina. Esto puede ser debido a una mayor sensibilidad de estos genes al agente mutagénico, determinado por la presencia de "puntos calientes" que definen sectores de inestabilidad en el genoma de *P. rhodozyma*, o bien a la presencia de zonas de heterocigosidad natural. En algunos casos se ha logrado determinar el gen involucrado en la auxotrofia, como en el mutante NNatx6A10-6 que requiere arginina y cuya mutación bloquea el paso entre ornitina y citrulina. Esto ha permitido definir el locus *ARG3* en *P. rhodozyma*, y la cepa NNatx6A10-6 portaría un alelo *arg3* responsable de la auxotrofia para arginina. Por otra parte, se han aislado 3 mutantes auxótrofos que requieren prolina como único suplemento, estas son las cepas NNatx3A5-88, NNatx10A1-4 y

NNatx10A22-6. En *S. cerevisiae*, este paso está catalizado por una pirrolina-5-carboxilato reductasa, producto del gen *PRO3*, de manera que estas cepas de *P. rhodozyma* podrían portar un alelo *pro3*.

Paralelamente, se han obtenido cepas mutantes afectadas en la carotenogénesis, como las cepas *atx8* y *atx10*, de fenotipos albino y amarillo respectivamente. Se ha demostrado además mediante experimentos de fusión de protoplastos de dobles mutantes, portadoras de auxotrofia, que la mutación *atx8* es alélica con la *atx3* y que la mutación *atx10* es alélica con *atx5*. Además se ha determinado el carácter recesivo de estas mutaciones frente a sus alelos silvestres.

El análisis de genética parasexual mediante fusión de protoplastos de dobles mutantes, auxótrofos y afectados en la carotenogénesis, ha permitido estudiar la complementación genética de los marcadores y establecer las relaciones de alelismo entre cepas auxótrofas portadoras del mismo requerimiento. Así las cepas NNatx6A10-6 y NNatx6A19-16, ambas requieren arginina y complementan sus respectivas mutaciones, indicando que poseen mutaciones no alélicas.

Adicionalmente, el análisis genético parasexual ha permitido definir un grupo de complementación constituido por 3 alelos diferentes, provenientes de 3 mutantes que requieren adenina. Estos fueron obtenidos en experimentos de mutagénesis independientes y a partir de 3 diferentes cepas parentales. De la misma forma, se ha determinado la presencia de dos grupos de complementación, entre mutantes afectados en la biosíntesis de arginina, y al menos 2 grupos de complementación entre mutantes afectados en la biosíntesis de prolina.

Por otra parte, se han determinado las condiciones óptimas que permiten la formación de estructuras sexuales y esporulación en *P. rhodozyma*. Tales condiciones se asocian a factores como la temperatura, concentración de glucosa, la fuente de nitrógeno y el tiempo de incubación. Bajo las condiciones óptimas y luego de 20 días, es posible observar estructuras sexuales consistentes en un largo holobasidio de 70 a 80  $\mu\text{m}$  de largo con cuatro a seis basidiosporas terminales. Adicionalmente, se ha determinado que existe una variación significativa en la producción de estructuras sexuales bajo las condiciones analizadas entre distintos mutantes afectados en la carotenogénesis. Además ha sido posible observar un incremento en la formación de estructuras sexuales en cepas que son productos de fusión de protoplastos.

Por otra parte, mediante observaciones al microscópico de estructuras sexuales teñidas con DAPI, se obtuvieron evidencias de una migración nuclear en los holobasidios. Además, cepas afectadas en la carotenogénesis muestran un número variable de estructuras sexuales, mientras que híbridos originados por la fusión de protoplastos, producen mayor número de cuerpos fructíferos que sus parentales, siendo posible obtener segregantes protótrofos con menor número de éstas. Nuestros resultados muestran la importancia del componente ambiental en la formación de estructuras sexuales en *P. rhodozyma*. Además, la segregación del fenotipo de producción de holobasidios y la obtención de un mutante incapaz de esporular, sugieren la presencia de determinantes genéticos que controlarían la formación de estructuras sexuales en esta levadura.

## ABSTRACT

A highly efficient mutagenic treatment of wild-type and astaxanthin mutant strains of *P. rhodozyma* has produced auxotrophic mutants after a nystatin enrichment procedure. The mutagenesis has been carried out using nitrosoguanidine at concentrations of 50, 80 and 100 µg/ml with the enrichment procedure using nystatin at a concentration of 10 µg/ml. The frequencies of mutant ranged between  $1 \times 10^{-3}$  and  $8.6 \times 10^{-4}$  with a 0.12% survival. The spontaneous reversion frequency ranged between  $3.8 \times 10^{-6}$  and  $1.5 \times 10^{-8}$  depending on the strain. 33 auxotrophic mutants and 5 mutants affected in the astaxanthin synthesis were isolated from the wild type strain UCD 67-385. The most frequent mutants were *ade*<sup>-</sup> (42%) and *met*<sup>-</sup>. This result may be associated with a possible diploid condition of this yeast. The high number of adenine auxotrophs obtained in relation to other auxotrophic mutants suggests the possibility of some degree of heterozygosity in the wild type strain. In some cases it has been possible to determine the gene involved in the auxotrophy, as the mutant NNatx6A10-6 that requires arginine. It also uses citrulline, but not ornithine and it is blocked in the ornithine to citrulline step catalyzed by ornithine carbamoyltransferase enzyme. this locus has been tentatively named as *ARG3*, which may code for the ornithine carbamoyltransferase enzyme in *P. rhodozyma*. In addition, we have obtained three mutants, NNatx3A5-88, NNatx10A1-4 and NNatx10A22-6, showing a proline deficient phenotype. They may be blocked in the pyrroline-5-carboxylate to proline reaction catalyzed by the product of the *PRO3* gene in *S. cerevisiae*.

On the other hand, mutant strains affected in the astaxanthin synthesis have been obtained. Among these strains, atx8 and atx10 show albino and yellow phenotypes respectively. Experiments of protoplast fusion indicated that the mutation atx8 is allelic with atx3 and that the mutation atx10 is allelic with atx5.

The parasexual genetic analysis by protoplasts fusion between double mutants affected in color and auxotrophy, has allowed us to study the genetic complementation relationships among auxotrophic mutants with the same requirement, as strains NNatx6A10-6 and NNatx6A19-16, both affected in arginine synthesis, indicating that arg- mutations carried by both strains were not allelic. The results indicate that genetic complementation was possible between color and nutritional genetic markers and it suggests that atx3 (albino), atx5 (yellow), atx6 (yellow) and the auxotrophy alleles were recessive to wild type.

In addition, a complementation group constituted by three different alleles *ade*<sup>+</sup> was also determined by parasexual genetic analysis. The presence of two complementation groups has been determined among mutants affected in the arginine synthesis, and at least two complementation groups among mutants affected in the proline biosynthesis.

On the other hand, the optimal environmental conditions for the development of holobasidia with terminal basidiospores in *P. rhodozyma* were established. The most important factors for the development of holobasidia were: the temperature, glucose and nitrogen concentration. The optimum was 9°C; a minimal medium with glucose at concentrations ranging between 80 to 100mM as carbon source, and ammonium nitrate with an optimal concentration of 28 mM. A period of 22 or more days was needed for the formation of holobasidia with basidiospores. An increment in the formation of sexual

structures in fusant strains obtained as products of protoplast fusion was also observed. Also, the presence of microcolonies, formed by budding of one or more basidiospores, suggests a concrete possibility of the viability of these. A better knowledge on the discharge, dispersion and germination conditions of the basidiospores will be necessary in the future. The sexual phase of *P. rhodozyma* may be induced in fusant prototrophs derived from the protoplast fusion of double mutants. This will allow the development of a system of genetic analysis based on the sexual phase of *P. rhodozyma*, by means of the characterization of the meiotic products, in terms of the segregation of auxotrophy and color markers in the basidiospores generated by meiotic recombination.



## INTRODUCCION

El género *Phaffia* fue descrito por Miller *et al.* en el año 1976 y está representado por una sola especie, *Phaffia rhodozyma*. Esta levadura de coloración rojo-naranja, ha sido aislada de exudados de árboles caducos de regiones montañosas y frías de Alaska, Japón y Rusia (Phaff, H. and Starmer, W, 1989). *P. rhodozyma* tiene las características estructurales y fisiológicas para ser clasificada como Basidiomicete (Miller M.W., *et al.*, 1976; Golubev., 1995., Yamada, Y., *et al.*1989). *P. rhodozyma* se caracteriza por la capacidad de fermentar glucosa, poseer una pared celular estructurada en multicapas y sintetizar pigmentos carotenoides tales como fitoeno, neurosporeno, licopeno, beta 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  $\mu\text{m}$  por 5.5 a 10.5  $\mu\text{m}$ , uninucleadas y frecuentemente yeman en el mismo lugar generando una cicatriz, propia de basidiomicetes. El origen filogenético de *P. rhodozyma* fue definido como basidiomicete por Miller *et al.* (1976), basándose en su habilidad para hidrolizar urea (Lewis *et al.*, 1990), la alta proporción de  $\alpha$ -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 mas importantes que definen su origen basidiomicete, son la pared celular estructurada en

multicapas y la cicatriz dejada por repetidas yemaciones en el mismo lugar, propia de basidiomicetes. Finalmente, el origen basidiomicete de *P. rhodozyma*, 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) y del gen de actina (Wery *et al.*, 1996) y por su ciclo reproductivo sexual (Golubev, 1995).

La propiedad de *P. rhodozyma* de fermentar glucosa y sintetizar pigmentos carotenoides, principalmente astaxantina, ha orientado los estudios especialmente al conocimiento de aspectos biotecnológicos de la carotenogénesis (An., *et al.*, 1989; Adrio. J.J., *et al.*, 1992; Calo P., *et al.*, 1992). Esto, se debe a que representa una importante fuente natural de pigmento para la industria de la salmonicultura (Johnson. E.A., *et al.*, 1977). En atención a esto último, 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 las condiciones de crecimiento de la levadura (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 han estudiado distintos métodos para extraer el pigmento desde las células de *P. rhodozyma* (Johnson *et al.*, 1978; Okagbue & Lewis, 1984b; Okagbue & Lewis, 1985). También, se han estudiado las propiedades nutricionales de *P. rhodozyma*, 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).

Paralelamente, 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). Los mutantes sobreproductores pueden llegar a sintetizar hasta 8 veces la cantidad de astaxantina de una cepa silvestre (400 µg por gramo de levadura seca), 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 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 (Soon *et al.*, 1992; Sarachek, *et al.*, 1981). De esta manera, experimentos de fusión de protoplastos entre cepas mutantes de *P. rhodozyma*, 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; Soon *et al.*, 1992). En estos estudios, se han utilizado dobles mutantes, auxótrofos y sobreproductores para generar clones híbridos hiperproductores de astaxantina (Soon *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 (Soon *et al.*, 1992).

Adicionalmente, a partir de experimentos con cepas sobreproductoras de astaxantina, mutantes albinas, mutantes que acumulan  $\beta$ -caroteno y cepas silvestres se ha llegado a establecer el papel protector de los carotenoides contra el estrés oxidativo impuesto sobre *P. rhodozyma* 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) tiene un papel importante en la regulación de la biosíntesis de carotenoides.

Los estudios genéticos en *P. rhodozyma* son escasos, y la mayoría consisten en experimentos de mutagénesis dirigidos a 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 hasta ahora pocos estudios sobre la constitución y organización genómica en *P. rhodozyma*. Al respecto, los resultados del análisis de RAPD en varias cepas de *P. rhodozyma* 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 asociadas a partículas tipo virus y al parecer

codificarían un sistema “killer” (Castillo & Cifuentes, 1994). Otro elemento genético extracromosomal presente en *P. rhodozyma* son plásmidos de DNA lineal en la cepa UCD 67-210, hasta ahora de función desconocida, aunque recientes evidencias también sugieren un fenotipo “killer” (Martínez *et al.*, 1994).

Recientemente, se han realizado algunos experimentos tendientes a definir el cariotipo electroforético de *P. rhodozyma*. 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 *P. rhodozyma* representa un enorme obstáculo para responder una serie de preguntas, como también para resolver aspectos relevantes acerca del origen y mantención de la diversidad genética, naturaleza del polimorfismo cariotípico, u otros aspectos de su biología, como el control genético de la carotenogénesis.

Desde su identificación y hasta el año 1995, *P. rhodozyma*, había sido considerada como una levadura imperfecta, debido a que se desconocía la fase sexual de su ciclo reproductivo (Miller M.W., *et al.*, 1976). En general, la mayoría de las levaduras de origen basidiomicete son heterotálicas, lo cual significa que la conjugación de cepas de tipo de apareamiento complementario es necesaria para obtener la fase sexual. Todos los intentos de obtener el estado perfecto en *P. rhodozyma* mediante la inducción de apareamiento entre distintas cepa de la especie han resultado infructuosos (Golubev, 1995).

Las levaduras imperfectas son consideradas como carentes de fase sexual y sólo capaces de reproducirse vegetativamente. Una levadura con sólo un tipo de

apareamiento se considera una especie imperfecta hasta que una cepa con un tipo de apareamiento opuesto se descubre. En este último caso se deben generar ciertas condiciones en la fisiología celular que permitan la conjugación de ambos tipos de células. Por otro lado es posible encontrar cepas incapaces de esporular, debido a la ausencia de los genes que permiten la diferenciación sexual o a la no-expresión de los mismos. Además, la presencia de un extensivo polimorfismo puede determinar la inviabilidad de las esporas generadas en la meiosis. Alternativamente la expresión de los genes que permiten la morfogénesis de estructuras sexuales, puede estar asociada a factores ambientales difíciles de identificar. Aparentemente este último caso parece ser el factor clave en la diferenciación sexual en *P. rhodozyma*. Recientemente, se ha descrito la formación de holobasidios con basidiosporas terminales, como resultado de la utilización de medios conteniendo polioles como agentes inductores de la formación de estructuras sexuales (Golubev, 1995). Este factor ambiental, estaría asociado a condiciones de estrés hídrico existente en el hábitat natural. En respuesta al estrés hídrico algunos microorganismos eucarióticos acumulan altas concentraciones de alcoholes polihídricos. Los estudios de Golubev, en *Phaffia rhodozyma*, 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  $\mu\text{m}$  de largo por 3 a 4  $\mu\text{m}$  de ancho, con basidiosporas terminales ovals o elipsoidales de 4 a 8  $\mu\text{m}$  de diámetro. Debido a que este tipo de estructuras sexuales era desconocida en la levadura *P. rhodozyma*, Golubev ha propuesto un nuevo género y especie *Xanthophyllomyces dendrorhous* (Golubev., 1995).

La falta de conocimientos sobre la fase sexual del ciclo reproductivo de *Phaffia rhodozyma* impide realizar análisis de recombinación meiótica, lo cual, representa un obstáculo para resolver preguntas fundamentales sobre la generación y mantención de la alta diversidad genética en la especie, la presencia de tipos de apareamiento, el nivel de ploidía u otros aspectos relevantes de su biología, entre ellos, el control genético de la carotenogénesis.

Al analizar cepas híbridas, provenientes de experimentos de fusión de protoplastos en nuestro laboratorio, se ha observado la aparición de holobasidios con esporas terminales. Se desconoce en que 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 último tiene gran relevancia, debido al hecho que sistemas de incompatibilidad son ampliamente encontradas en hongos filamentosos, lo cual previene 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 *Phaffia rhodozyma* plantea la posibilidad de la presencia 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 *Phaffia rhodozyma*, sin embargo, la reciente comunicación sobre la existencia de la fase perfecta (Golubev, 1995), permite vislumbrar una opción de ampliar el conocimiento genético, en base al estudio de la fase sexual de su ciclo reproductivo.

En nuestro laboratorio, y como parte de esta tesis, se han determinado las condiciones ambientales que permiten la formación de estructuras sexuales en *P. rhodozyma*. Además, se cuenta con una serie de mutantes afectados en la carotenogénesis y auxotrofia que constituyen marcadores que permitirán realizar los análisis para un mejor conocimiento genético de *P. rhodozyma*.

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,  $\alpha$  y  $\alpha$  complementarias, 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.

## PROPOSITO DE LA TESIS

Esta tesis tiene como propósito contribuir al conocimiento de la fase sexual del ciclo reproductivo de *Phaffia rhodozyma*. Para ello se propone realizar un estudio de las condiciones que permiten la formación de estructuras sexuales. Paralelamente se pretende explorar un sistema de análisis genético utilizando mutantes auxótrofos y afectados en la carotenogénesis como marcadores genéticos apropiados. Esto permitirá realizar estudios de complementación y determinación de relaciones de alelismo que facilitarán el manejo de *P. rhodozyma* en términos de su aplicación biotecnológica. Para ello y de acuerdo a los antecedentes descritos, se plantea la siguiente hipótesis acerca de la fase sexual de *P. rhodozyma*:

“La formación de estructuras sexuales en *P. rhodozyma* resultaría de un evento inducido por la fusión de protoplastos y asociado a ciertas condiciones ambientales, generando basidiosporas viables que permitirían desarrollar un sistema de análisis genético”.

Para resolver esto se proponen los siguientes objetivos:

- Inducción de la fase sexual del ciclo reproductivo mediante fusión de protoplastos de *Phaffia rhodozyma*.
- Evaluar el efecto ambiental (temperatura, recursos nitrogenados, fuente de carbono y otros) en la formación de estructuras sexuales en *P. rhodozyma*.
- Obtención de mutantes de auxotrofia o morfológicos que permitan desarrollar un sistema de análisis genético basado en la fase sexual del ciclo reproductivo.

## MATERIALES Y METODOS

### I. Materiales

#### 1.- Material biológico.

##### 1.1 Levaduras:

Las cepas silvestres de *Phaffia rhodozyma* UDC 67-383, UCD 67-385 y UCD 67-210 fueron adquiridas desde American Type Culture Collection (ATCC 24203, ATCC 24230 y ATC 24202), Rockville, MD, U.S.A. Las cepas mutantes Atx3 (albina), Atx5 (amarilla), Atx6 (amarilla-rosada) y AtxS1 (sobreproductora), corresponden a mutantes de pigmentación obtenidas en nuestro laboratorio y derivan de la cepa silvestre UCD 67-385. Las cepas Atx8 (albina), Atx9 (amarilla intensa), Atx11 (pálida) y Atx10 (amarilla pálida) corresponden a mutantes afectados en la carotenogénesis que han sido obtenidas en esta Tesis. Todas Las cepas mutantes auxótrofas utilizadas, han sido obtenidas en esta Tesis y son parte del cepario de hongos del Laboratorio de Genética, de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile. Todas las cepas se mantuvieron congeladas a -70 °C.

## 1.2 Enzimas:

La enzima Novozyma, se adquirió a Sigma Chemical Co. St. Louis, Missouri, U.S.A.

## 2.- Reactivos químicos y medios de cultivo.

Los siguientes reactivos fueron adquiridos a las compañías que se indican:

A Sigma Chemical Co. St. Louis, Missouri, U.S.A.: L-Triptofano, L-Arginina, 2,4-dihidroxypirimidina(uracilo), Adenina, L-Ornitina, L-Treonina, L-Metionina, L-Histidina, Tiamina (Aneurina, vitamina B<sub>1</sub>), L-Citrulina, L-Leucina, Ampicilina, sacarosa, tetraciclina, X-gal 4,6-dimanino-2-fenilindol (DAPI), N-metil-N<sup>7</sup>-nitro-nitrosoguanidina (NTG).

A 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.

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

A Nutritional Biochemical Corporation U.S.A. : DL-Isoleucina,  
L-Cisteina.

## II. Métodos

### 1.- Cultivos de Microorganismos.

#### 1.1.- Hongos:

Las cepas de *Phaffia rhodozyma* se crecieron en medio YM (Apéndice 1).

Para los experimentos de fusión de protoplastos, se creció la levadura en medio mínimo Vogel, MMv (Vogel, 1956). Los cultivos de *Phaffia* se incubaron a 22 °C, con agitación constante.

### 2.- Mantenimiento de cepas.

2.1.- Las cepas de *P. rhodozyma* 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%.

### 3.- Mutagénesis.

3.1.- Nitrosoguanidina: La mutagénesis con NTG se realizó de acuerdo al método descrito por León *et al*, 1995. Para ello, se inoculó 20 ml de medio YM con 200  $\mu$ l de un cultivo de *P. rhodozyma* 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 7000 rpm por 15 min en una centrífuga Sorvall con un rotor SS-34 y se resuspendieron en 10 ml de tampón citrato de sodio 100 mM pH5.5. Las células fueron lavadas 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 a 1 mg/ml para quedar a una concentración final de 50, 80 y 100  $\mu$ g/ml. Las células se incubaron en presencia del mutágeno a 22 °C durante 30 min y los tubos fueron centrifugados a 7000 rpm por 10 min. Las células fueron lavadas 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.

3.2.- Enriquecimiento de mutantes con nistatina: Las células tratadas con NTG, fueron centrifugadas a 7000 rpm por 10 min. Se resuspendió en 1 ml de MMv y se transfirió la suspensión a un matraz conteniendo 20 ml de medio mínimo MMv.

Se incubó a 22 °C por 5 hrs y después se agregó 0.2 ml de nistatina 1 mg/ml, para quedar a 10ug/ml final. Luego, se incubó a 22 °C por 1 hr 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 luego en 1 ml de medio YM. Se prepararon diluciones de  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  y  $10^{-3}$  de las cuales se plaquearon alicuotas de 100  $\mu$ l en placas YM-agar y finalmente se incubaron a 22 °C durante 5-7 días.

- 3.3.- Selección de mutantes auxótrofos: Los mutantes auxótrofos de *P. rhodozyma* 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.
- 3.4.- Identificación de la auxotrofia: Para determinar la deficiencia metabólica que portaban los potenciales mutantes auxótrofos, éstos fueron sembrados en placas MMv-agar (Apéndice 1) suplementadas con distintos aminoácidos, bases nitrogenadas, vitaminas y combinaciones de estos. El procedimiento de caracterización del requerimiento, se basó en sembrar 200  $\mu$ l de una suspensión de células de las cepas mutantes a una concentración de  $10^7$  cel./ml en MM<sub>v</sub>-agar (Apéndice 1). Sobre la placa sembrada se depositaron papeles filtro estéril sobre los que se agregaron alicuotas de 10-20  $\mu$ l de soluciones de los aminoácidos,

bases nitrogenadas o vitaminas adecuadas, primero como una mezcla y luego en forma independiente.

- 3.5.- 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 seleccionaron aquellas colonias que presentaban un fenotipo de color diferente a la de la cepa mutagenizada. Las cepas seleccionadas fueron replicadas en medio YM-agar, aquellas que mantuvieron una pigmentación alterada, fueron guardadas según el punto 2.1 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).

- 3.6.- Estabilidad de la mutación: Los mutantes seleccionados fueron crecidos 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 (Apéndice 1). 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 y como cambio a prototrofia en el caso de los mutantes auxótrofos.

#### 4.- Análisis parasexual.

4.1.- Obtención de protoplastos: Para el desarrollo del análisis genético basado en parasexualidad, se realizaron 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 0,8M (Hermosilla, *et al.*, 1995). Cada cepa de *P. rhodozyma* fue crecida en 100 ml de medio mínimo MMv o medio completo YM hasta alcanzar una  $DO_{550nm}=1.2$ . Luego, las células fueron lavadas dos veces con KCl 0.8 M, resuspendidas en 4.5 ml de KCl 0.8 M para luego agregar 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 hrs, tiempo en el cual se obtiene aproximadamente el 100% de protoplastos.

4.2.- 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, centrifugando a 3500 rpm por 7 min y resuspendidos en 2 ml del mismo estabilizador osmótico ( $1 \times 10^8$  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).

Aproximadamente  $1 \times 10^7$  protoplastos de cada cepa parental fueron mezclados suavemente, centrifugados a 3500 rpm por 7 min. Los protoplastos precipitados fueron resuspendidos en 1 ml de KCl 0.8 M, Tris- $\text{CaCl}_2$  10 mM, PEG 4000 26.4% e incubados por 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 depositaron alícuotas de 100  $\mu\text{l}$  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 depositaron alícuotas de 100  $\mu\text{l}$  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 MMv-KCl-agar 2%, incubando a 22 °C durante 15 días.

- 5.- Análisis de los fusantes: Los fusantes originados en los experimentos de fusión fueron sometidos a varios análisis para su caracterización.
- 5.1.- Curvas de crecimiento: Los fusantes de *P. rhodozyma* fueron inoculados en matraces de 125 ml conteniendo 10 ml de MM<sub>v</sub>, dando una DO<sub>550nm</sub> inicial de 0.01. Se incubó a 22 °C con agitación constante y registró el aumento de DO<sub>550nm</sub> en el tiempo para cada fusante.
- 5.2.- Tinción de núcleos de *P. rhodozyma* y *S. cerevisiae* con DAPI: Este protocolo es una adaptación del descrito para *Schizosaccharomyces pombe* (Moreno *et al.*, 1991). Desde un cultivo de la levadura, en medio MM<sub>v</sub>, en fase exponencial de crecimiento, se tomaron 900 µl y se fijaron las células añadiendo 100 µl de formaldehído 37% e incubando por 30 min a 24 °C. Las células fueron lavadas una vez en 1 ml de PBS (tampón fosfato salino) y una vez en 1 ml de PBS conteniendo Triton X-100 1%, mediante centrifugación en una microcentrífuga Eppendorf durante 10 seg, para luego resuspender en 100 µl de PBS. Aproximadamente 10 µl de la suspensión celular fue depositada sobre un portaobjeto limpio, esparciendo la gota de tal forma de dejar una delgada película de células sobre el portaobjeto, luego se agregó 2-3 µl de la solución de montaje DAPI (DAPI 1 µg/ml, p-fenilendiamina 1mg/ml, glicerol 50%) y se mezcló. La mezcla se cubrió con un cubreobjeto limpio y se sellaron los bordes con esmalte transparente. La preparación se guardó en oscuridad a 4 °C por 15 min antes de

ser sometida a observación microscópica. Para la observación microscópica se utilizó un microscopio de epifluorescencia Nikon Optiphot dotado de un filtro tipo UV. Las observaciones se registraron fotográficamente utilizando películas KODAK de 400 asas con tiempos de exposición determinados automáticamente por un fotómetro Nikon UFX.

- 5.3.- **Análisis de pigmentos:** Para extraer y cuantificar los pigmentos en microgramos por gramo de levadura seca (ppm), de las distintas cepas de levadura se realizó el siguiente protocolo, el cual corresponde a una modificación del método descrito por An *et al.* (1989). Se depositaron 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 centrifuga 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.

- 5.4 Formación de estructuras sexuales: Para determinar la formación de estructuras sexuales en cepas fusantes de *P. rhodozyma*, se procedió a preparar placas MMv-Agar Difco (Apendice1). Estas placas se sembraron con las cepas fusantes seleccionadas y los controles adecuados (cepas silvestres). Las placas sembradas y sus duplicados se hicieron crecer por dos días a 22°C, luego se transfirieron a un incubador a 9°C. 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 la 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.
- 5.5.- 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 µl en medio YM-agar, los distintos fenotipos de color que aparecieron fueron registrados. Las colonias incapaces de crecer en MMv fueron sometidas a análisis de suplementación, los cuales permitieron determinar el fenotipo auxótrofo segregante.

6.- Formación de estructuras sexuales en *Phaffia rhodozyma*.

6.1.- Determinación del efecto ambiental.

6.1.1.- Tipo de medio sólido: Para evaluar el efecto del tipo de medio sólido, las cepas de *P. rhodozyma* fueron sembradas sobre placas con distintos medios, principalmente placas medio mínimo MMv-agar, medio completo YM-agar (Apéndice 1) y placas MMv-agar más otros suplementos.

6.1.2.- Recurso de nitrógeno: Para determinar el efecto de la concentración de nitrógeno sobre la formación de estructuras sexuales, se procedió a preparar placas MMv-agar (Apéndice 1) con un gradiente de concentraciones de nitrato de amonio y cloruro de amonio. Se sembraron en dichas placas las cepas de interés y se incubaron por dos días a 22°C, posteriormente se trasladaron las placas a las condiciones de esporulación y se siguió el método de análisis de inspección ocular como indica el punto 5.4.

6.1.3.- Recurso de carbono: Para evaluar el efecto de la glucosa como recurso de carbono, se prepararon placas MMv-agar (Apéndice 1) con un gradiente de concentraciones de glucosa, en las cuales se sembraron las cepas de interés. Dichas placas se incubaron por 2 días a 22°C y posteriormente se incubaron bajo

condiciones de esporulación, siguiendo el método de análisis de inspección ocular descrito en el punto 5.4.

6.1.4.- Temperatura: Para determinar el efecto de la temperatura en la formación de estructuras sexuales en cepas de *P. rhodozyma*, se prepararon placas MMv-agar (Apéndice 1), se sembraron las cepas requeridas con sus respectivos duplicados y se crecieron por dos días a 22°C. Posteriormente se incubaron en condiciones de esporulación bajo un gradiente de temperaturas para lo cual se acondicionaron distintos incubadores. La tasa de formación de estructuras sexuales se determinó siguiendo el método de inspección ocular descrito en el punto 5.4.

## 7.- Micromanipulación.

7.1.- Micromanipulación de las basidioesporas: La micromanipulación de basidioesporas y de microcolonias, se realizó utilizando un micromanipulador Piezzo.

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 fueron tomadas con la punta de vidrio del aparato y sembradas en medio completo YM. Posteriormente se incubaron a 22°C y se dejaron crecer para determinar la viabilidad.

8.- Purificación de ácidos nucleicos.

8.1.- DNA genómico de *P. rhodozyma*: Para obtener DNA de alto peso molecular, sobre 23 kb, la purificación de ácidos nucleicos se realizó a partir de protoplastos.

8.2.- Extracción de ácidos nucleicos: Los protoplastos fueron centrifugados a 4000 rpm en una centrífuga Sorvall durante 4 min y se resuspendieron suavemente en 4.5 ml de Tris-HCl 10 mM, EDTA 20 mM. Luego se adicionaron 0.5 ml de SDS 10% y se incubó la mezcla a temperatura ambiente por 5 min, después se agregó 50 µl de proteinasa K a 20 mg/ml y se incubó a 55 °C por 1 hr. 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 4000 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, EDTA 20 mM y se agitó suavemente por 30 min, separando las fases nuevamente por centrifugación a 4000 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 4000 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 4000 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 microcentrífuga estéril. Luego de secar el DNA, este fue lavado con etanol al 70% y posteriormente resuspendido en 500 a 1000  $\mu$ l de tampón TE. Finalmente, el DNA fue observado y cuantificado mediante electroforesis en geles de agarosa al 0.5 -0.6%. Paralelamente se observó la presencia de moléculas de RNA de doble hebra descritos para la cepa silvestre UCD 67-385 de *P. rhodozyma* (Castillo & Cifuentes, 1994), para determinar la identidad de las cepas mutantes utilizadas en este trabajo como *P. rhodozyma*.

## RESULTADOS

### 1.- Obtención de mutantes afectados en la síntesis de carotenoides en *Phaffia rhodozyma*.

Con el objeto de obtener mutantes auxótrofos de *P. rhodozyma* afectados en la carotenogénesis se realizó una serie de experimentos de mutagénesis con nitrosoguanidina. En la tabla 1 se muestran los resultados obtenidos de mutagénesis de la cepa silvestre UCD 67-385 y las cepas afectadas en carotenogénesis, atx3, atx5 y atx6, de fenotipos albino, amarillo y rosado respectivamente. Los mutantes obtenidos se clasificaron según su pigmentación en albinos, amarillos, pálidos, sectorizadas, rosados y de fenotipo variable (tabla 2). El mayor número de mutantes se obtiene en la cepa atx6 con un total de 56, mientras que en la cepa atx3 no fue posible obtener mutantes afectados en la carotenogénesis (tabla 2). La mutagénesis de la cepa silvestre UCD 67-385, permitió la obtención de 19 mutantes de carotenogénesis. Uno de ellos de fenotipo albino ha sido denominado atx8, además se identificó una colonia sectorizada. Esta última, presentó dos sectores de igual tamaño pero de distinta tonalidad amarilla. Se seleccionaron ambos sectores y se determinó que después de varias replicas de cultivo en medio YM (Apéndice 1) presentaban un fenotipo estable. Tales sectores obtenidos por mutagénesis permitieron definir las cepas atx9 y atx10 de fenotipo amarillo intenso y amarillo pálido respectivamente (figura 1). Todos estos mutantes han mostrado ser estables, presentando frecuencias de reversión menores a  $10^{-8}$ .

Tabla 1

Frecuencia de aparición de mutantes de color y porcentaje de sobrevida de las cepas UCD 67-385, atx3, atx5 y atx-6 de *P. rhodozyma* tratadas con distintas concentraciones del agente mutagénico NTG.

Cepa	Fenotipo cepa mutagenizada	Concentración de NTG ug/ml	Colonias analizadas	% de sobrevida	Mutantes de color	Frecuencia Mutagenesis
atx3	albino	80	16.418	0,12	0	$<6 \times 10^{-5}$
385	silvestre	80	16.350	0,09	19	$1,2 \times 10^{-3}$
atx5	amarillo	50	13.850	-	10	$8,6 \times 10^{-4}$
atx6	rosado	80	30.837	0,10	56	$1,8 \times 10^{-3}$

La frecuencia de mutagénesis ha sido estimada a partir del número total de colonias que presentaban un fenotipo de color distinto al de la cepa parental mutagenizada y el número total de colonias analizadas. El porcentaje de sobrevida se ha estimado a partir de un control sin el agente mutagénico.

Tabla 2

Número de mutantes afectados en la síntesis de pigmentos carotenoides en *P. rhodozyma*.

Fenotipo mutante	UCD 67-385	atx5	atx3	atx6
Albino	4	2	-	43
Amarillo	2	-	-	3
Rosado	3	-	-	-
Rojo	-	-	-	3
Pálido	2	-	-	-
crema	-	3	-	4
Otros <sup>a</sup>	7	5	-	3
Sectorizada	1	-	-	-
Número de experimentos	3	4	2	2
Total	19	10	0	56

Los mutantes provienen de una cepa silvestre, UCD 67-385 y las cepas atx3, atx5 y atx6. El fenotipo indicado corresponde a una interpretación del color desarrollado por la colonia luego de 7 días de incubación a 22°C. El color de la colonia de la cepa silvestre UCD 67-385 es rojo-naranja.

(a) , En este grupo se incluyen cepas que presentan un fenotipo de coloración distinta en tonalidad con respecto a las cepas parentales mutagenizadas. Las mutantes de un mismo fenotipo que derivan de eventos de mutagénesis distintos han sido consideradas como mutantes independientes.

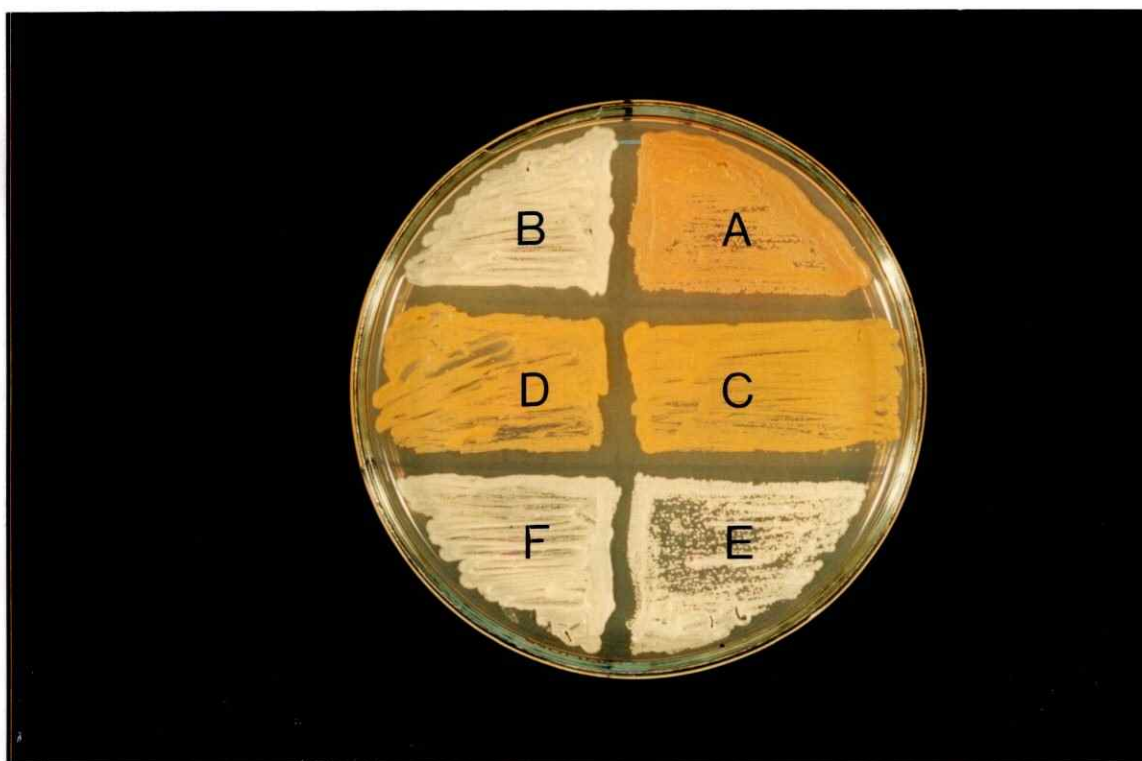


Figura 1:

Cultivo en placa de la cepa silvestre UCD 67-385 de *Phaffia rhodozyma* y tres mutantes en pigmentación derivados de ella. Los mutantes han sido obtenidos (esta Tesis) por tratamiento con NTG en un solo paso. **A:** UCD 67-385; **B:** atx8; **C:** atx9; **D:** atx10; **E:** atx11 y **F:** atx12.

## 2.- Análisis de los mutantes

### 2.1.- Estabilidad de los mutantes de carotenogénesis de *P. rhodozyma*.

Los mutantes de carotenogénesis obtenidos fueron analizados para determinar la estabilidad del fenotipo de color, como se indica en Métodos, sección 3.6. Todos los mutantes seleccionados presentaron una frecuencia de reversión menor que  $10^{-8}$ .

Las cepas mutantes atx8, atx9 y atx10, fueron seleccionadas por sus propiedades de fácil manejo, rápido crecimiento y por haber sido originadas en un solo paso de mutagénesis. 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.- Obtención de mutantes auxótrofos

La obtención de mutantes auxótrofos se realizó mediante experimentos de mutagénesis utilizando nitrosoguanidina como agente mutagénico, según las condiciones previamente establecidas en nuestro laboratorio (León, et al., 1994). Se implementó un sistema de enriquecimiento de dichos mutantes utilizando nistatina. Este sistema se desarrolló en condiciones que simulan el comportamiento de células auxótrofas y protótrofas (Snow, 1966). Se determinó que el tiempo óptimo para mantener una alta sobrevivencia de células auxótrofas es de 2 horas en presencia de nistatina 0,01 mg/ml (Martínez, et al., 1995; Retamales, et al., 1998a). En la Tabla 3 se muestran los

resultados de experimentos de mutagénesis, utilizando concentraciones de nitrosoguanidina de 80 y 100  $\mu\text{g/ml}$  en la cepa silvestre UCD 67-385 y las mutantes morfológicas atx3, atx6, atx8 y atx10. Se observa también que la cepa atx5 tratada con 50  $\mu\text{g/ml}$  de NTG, permitió obtener sólo un mutante auxótrofo. En total, se logró obtener 33 mutantes auxótrofos en las distintas cepas (ver tabla 3).

### 3.1.- Identificación de requerimientos nutricionales.

Los mutantes auxótrofos fueron seleccionados por la ausencia de crecimiento sobre placas MMv-Agar. Los requerimientos específicos fueron determinados con una prueba de la colonia original sobre varios tipos de medios selectivos.

Como se muestra en la tabla 4, se han seleccionado 33 mutantes de los cuales 31 han sido identificados en su requerimiento. La tabla 4 muestra además, el requerimiento nutricional, el fenotipo y la frecuencia de reversión de cada mutante.

La figura 2 muestra que la cepa NNatx5A17-11 requiere de adenina como suplemento para crecer en MMv. La cepa fue sembrada en MMv y luego se agregó suplementos nutricionales. Se observa que la cepa crece alrededor de un papel filtro estéril impregnado con una solución de adenina.

La figura 3 muestra que la cepa NNatx6A10-6 requiere arginina como suplemento para crecer en MMv. Además, la utilización de soluciones con los intermediarios de la ruta de síntesis de este aminoácido ha permitido constatar su capacidad de crecer en citrulina y su incapacidad de crecer en ornitina (ver figura 3).

Tabla 3

Fenotipo de auxotrofia, frecuencia de mutación y porcentaje de sobrevivencia de las cepas UCD 67-385, atx3, atx5, atx6, atx8 y atx10 de *P. rhodozyma* tratadas con distintas concentraciones del agente mutagénico NTG.

Cepa	Concentración de NTG ug/ml	Colonias analizadas	% de sobrevivencia	Mutantes auxótrofos	Frecuencia Mutag.
atx3	80	4.620	0,12	2ade <sup>-</sup> , 1pro <sup>-</sup> , 1nd	8,7X10 <sup>-4</sup>
385	80	2.240	0,09	3ade <sup>-</sup> , 1pro <sup>-</sup>	1,7X10 <sup>-3</sup>
385	100	1.400	0,03	2ade <sup>-</sup> , 1ilv <sup>-</sup>	2,1X10 <sup>-3</sup>
atx5	50	3.780	-	1ade <sup>-</sup>	2,6X10 <sup>-4</sup>
atx6	100	1.040	0,04	2ade <sup>-</sup> , 1lis <sup>-</sup> , 1arg <sup>-</sup> 1pol <sup>-</sup>	4,8X10 <sup>-3</sup>
atx6	80	2.180	0,10	3ade <sup>-</sup> , 1arg <sup>-</sup> , 1met <sup>-</sup> , 1cyt <sup>-</sup>	2,3X10 <sup>-3</sup>
atx8	80	1.000	0,13	1nic <sup>-</sup>	1,0X10 <sup>-3</sup>
atx10	80	1.470	0,03	2met <sup>-</sup> , 2nic <sup>-</sup> , 1pro <sup>-</sup>	3,4X10 <sup>-3</sup>
atx10	100	1.578	0,06	2ade <sup>-</sup> , 2met <sup>-</sup> , 1pro <sup>-</sup>	3,2X10 <sup>-3</sup>

La frecuencia de mutagénesis ha sido estimada a partir del número total de colonias analizadas y el porcentaje de sobrevivencia a partir de un control sin el agente mutagénico. ade: adenina; arg: arginina; cyt: citidina; lis: lisina; pro: prolina; met: metionina; nic: nicotinamida; pol: polivitaminas; ilv: isoleucina-valina. n.d.: no determinado.



La figura 4 muestra que la cepa NNatx6A19-16 requiere arginina como único suplemento para crecer en MMv.

La cepa NNatx3A5-88, presenta crecimiento en prolina. Sin embargo el nivel de desarrollo es menor, debido a que las concentraciones de prolina requeridas son mayores a las reportadas para otras levaduras y bacterias. Además, se han identificado otras cepas mutantes que requieren prolina, como es el caso de las cepas NNatx10A22-6 y NNatx10A1-4. Ambas crecen en prolina y no utilizan ningún otro de los intermediarios metabólicos estudiados (ver tabla 5). Ambas presentan el mismo fenotipo de color y derivan de un mismo evento de mutagénesis.

En la tabla 5 se muestran los resultados del análisis metabólico de mutantes auxótrofos que requieren arginina y prolina, suplementados con algunos intermediarios de la ruta de biosíntesis de estos aminoácidos.

En la tabla 5 se muestran además, los posibles genes que pueden estar afectados en cada una de las cepas. Esto último ha sido inferido a partir del análisis de los intermediarios metabólicos y la comparación de tales resultados con la vía de biosíntesis descrita para *S. cerevisiae*.

Por otra parte, se realizaron estudios para determinar si los mutantes auxótrofos corresponden a *P. rhodozyma*, entre ellas, se estudió la morfología celular, la morfología de la colonia, sensibilidad a la temperatura y presencia de moléculas de RNA de doble hebra. Todas estas pruebas confirmaron la identidad de los mutantes auxótrofos como *P. rhodozyma* (datos no mostrados).

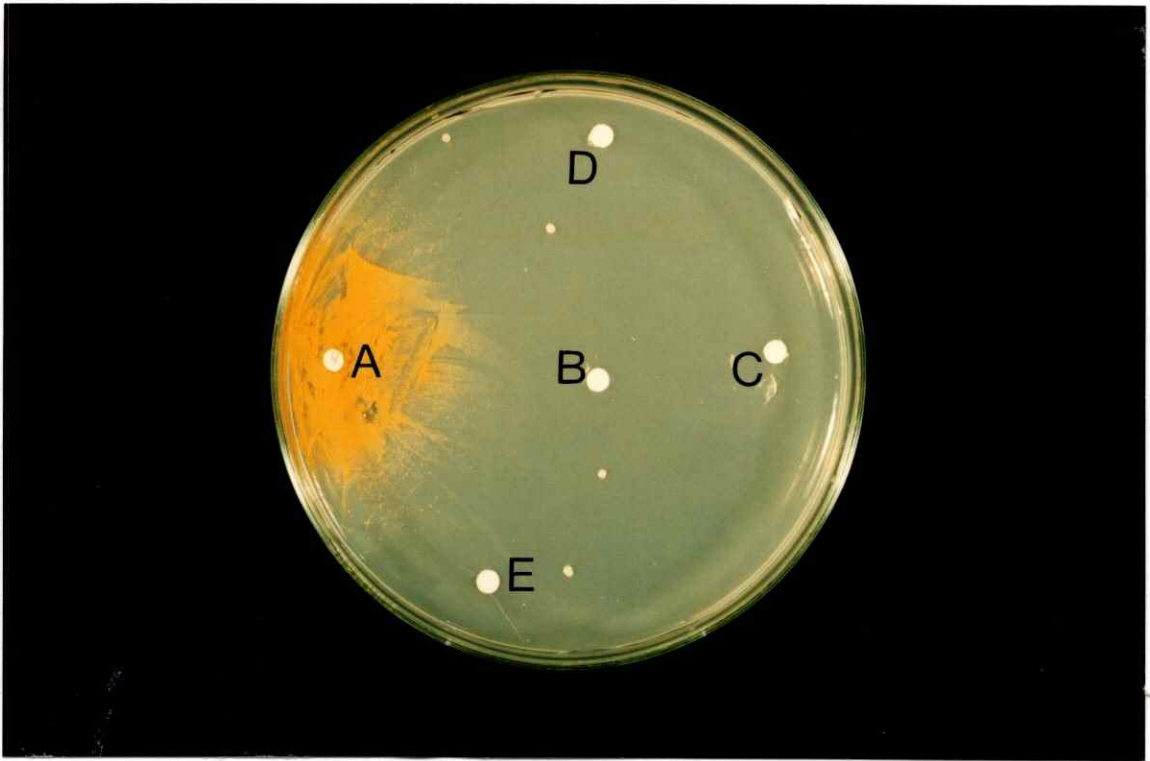


Figura 2:

Cultivo en placa del mutante auxótrofo NNatx5A17-11 (am,ade). El mutante fue inicialmente caracterizado por su incapacidad de crecer en medio mínimo, MMv (Apéndice 1). Posteriormente se determinó su capacidad de crecer en medio mínimo suplementado con una mezcla de nutrientes y finalmente se determinó el requerimiento específico. Este último paso se consiguió utilizando papeles filtro estéril sobre la placa MMv en los cuales se inoculó 12  $\mu$ l de una solución del nutriente específico. **A**: adenina; **B**: histidina; **C**: fenilalanina; **D**: glutamato; **E**: serina. La mutante crece en medio mínimo suplementado con adenina.

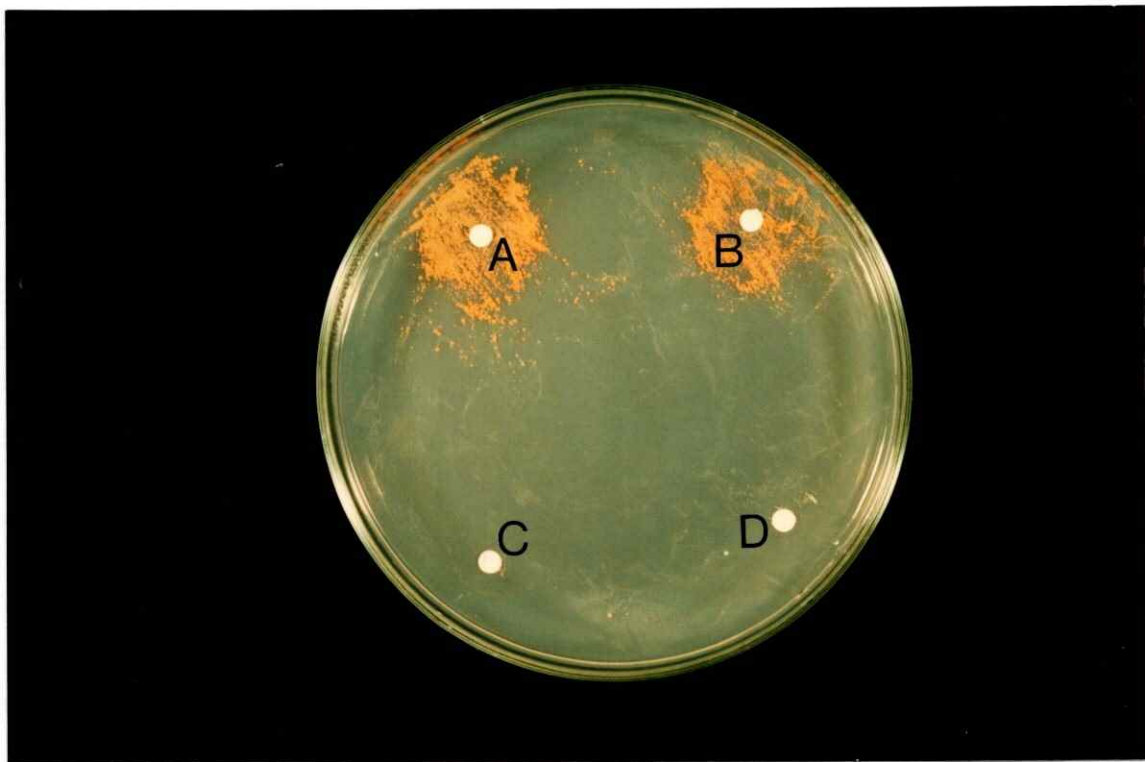


Figura 3:

Fotografía de un cultivo en placa MMv del mutante auxótrofo NNatx6A10-6 (am,arg) de *P.rhodozyma*, los papeles filtro estériles fueron impregnados con 12 ul de una solución del intermediario específico de la vía de síntesis de arginina. **A**: arginina; **B**: citrulina; **C**: ornitina; **D**: prolina.

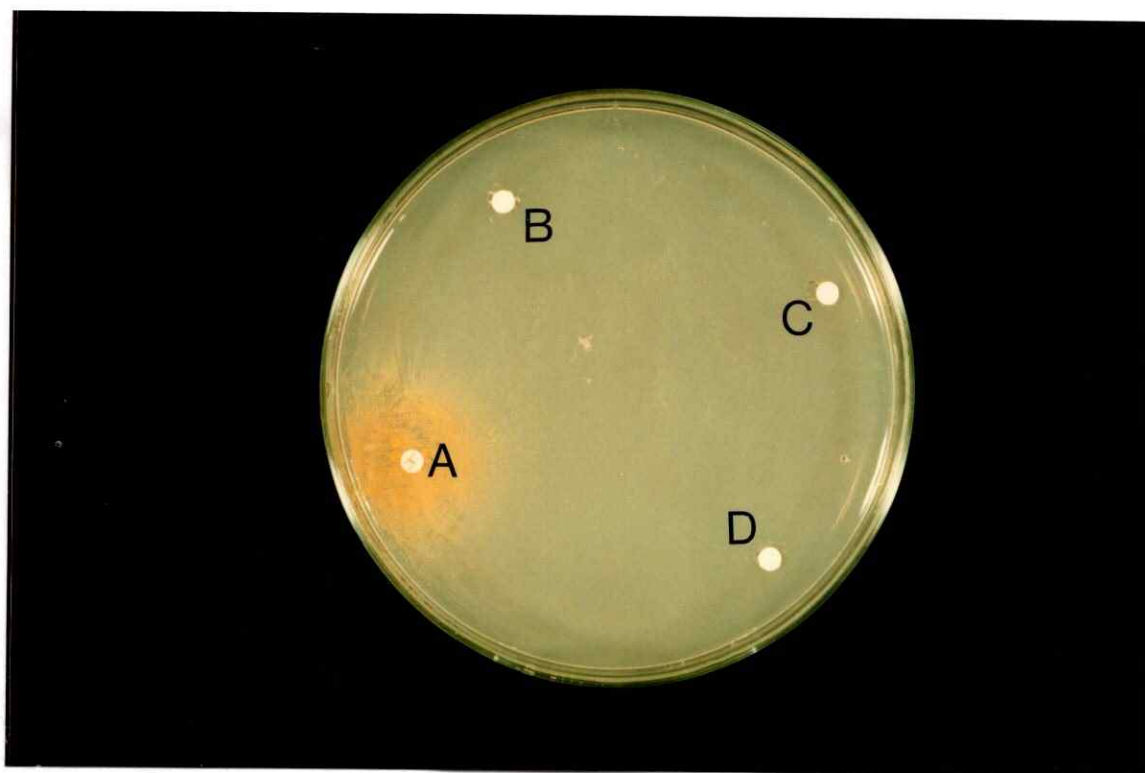


Figura 4

Cultivo en placa MMv del mutante auxótrofo NNatx6A19-16 (am,arg) de *P. rhodozyma*. Sobre la placa se han depositado papeles filtro estériles impregnados con intermediarios de la vía de síntesis de arginina. **A**: arginina; **B**: citrulina; **C**: prolina; **D**: ornitina.

**Tabla 4.** Tipo, número y frecuencia de mutantes obtenidos desde cepas de *P. rhodozyma*

Parental Cepa	Fenotipo	Nombre-Mutante	Requerimiento Auxotrófico	Fenotipo Mutante	Frecuencia Reversión
UCD 67-385	Cepa silvestre	NN385A17-2	Adenina	ade <sup>-</sup>	<6.9 x 10 <sup>-8</sup>
		NN385A9-1	Adenina	ade <sup>-</sup>	<1.2 x 10 <sup>-7</sup>
		NN385A13-21	Adenina	ade <sup>-</sup>	<3.3 x 10 <sup>-8</sup>
		NN385A25-29	Adenina	ade <sup>-</sup>	<2.8 x 10 <sup>-8</sup>
		NN385A13-100	Adenina	ade <sup>-</sup>	9.6 x 10 <sup>-8</sup>
		NN385A3-15	Isoleucina-valina	ilv <sup>-</sup>	4.4 x 10 <sup>-6</sup>
		NN385A25-4	Prolina	pro <sup>-</sup>	<4.6 x 10 <sup>-8</sup>
atx3	Albino (al)	NNatx3A6-14	Adenina	al,ade <sup>-</sup>	<9.6 x 10 <sup>-8</sup>
		NNatx3A9-130	Adenina	al,ade <sup>-</sup>	<1.5 x 10 <sup>-7</sup>
		NNatx3A5-88	Prolina	al,pro <sup>-</sup>	<7.7 x 10 <sup>-8</sup>
		NNatx3A10-113	n.d.	al,aux <sup>-</sup>	n.d.
atx5	Amarillo intenso	NNatx5A17-11	Adenina	am,ade <sup>-</sup>	<7.3 x 10 <sup>-8</sup>
-atx6	Amarillo (am)	NNatx6A3-47	Adenina	am,ade <sup>-</sup>	3.5 x 10 <sup>-4</sup>
		NNatx6A7-107	Adenina	am,ade <sup>-</sup>	<9.9 x 10 <sup>-8</sup>
		NNatx6A11-31	Adenina	am,ade <sup>-</sup>	<5.4 x 10 <sup>-8</sup>
		NNatx6A7-9	Lisina	am,lys <sup>-</sup>	<8.1 x 10 <sup>-8</sup>
		NNatx6A10-6	Citrulina	am,arg <sup>-</sup>	<3.8 x 10 <sup>-6</sup>
		NNatx6A19-16	Arginina	am,arg <sup>-</sup>	<8.4 x 10 <sup>-8</sup>
		NNatx6A13-56	Metionina	am,met <sup>-</sup>	<1.6 x 10 <sup>-6</sup>
		NNatx6A8-7	Polivitaminas	am,pol <sup>-</sup>	<6.4 x 10 <sup>-8</sup>
		NNatx6A2-43	Adenina	am,ade <sup>-</sup>	5.9 x 10 <sup>-8</sup>
		NNatx6A7-92	Cytidina	am,cyt <sup>-</sup>	<2.5 x 10 <sup>-8</sup>
atx8	Albino	NNatx8A7-1	Nicotinamida	al,nic <sup>-</sup>	<3.5 x 10 <sup>-8</sup>
atx10	Amarillo	NNatx10A7-10	Nicotinamida	am,nic <sup>-</sup>	<1.5 x 10 <sup>-8</sup>
		NNatx10A11-2	Nicotinamida	am,nic <sup>-</sup>	<3.1 x 10 <sup>-8</sup>
		NNatx10A13-17	Metionina	am,met <sup>-</sup>	n.d.
		NNatx10A1-4	Prolina	am,pro <sup>-</sup>	<8.5 x 10 <sup>-8</sup>
		NNatx10A2-6	Metionina	am,met <sup>-</sup>	<3.1 x 10 <sup>-7</sup>
		NNatx10A12-57	Metionina	am,met <sup>-</sup>	1.6 x 10 <sup>-8</sup>
		NNatx10A10-4	Metionina	am,met <sup>-</sup>	2.8 x 10 <sup>-5</sup>
		NNatx10A17-12	Adenina	am,ade <sup>-</sup>	n.d.
		NNatx10A17-23	Adenina	am,ade <sup>-</sup>	1.5 x 10 <sup>-8</sup>
		NNatx10A22-6	Prolina	am,pro <sup>-</sup>	n.d.

am: fenotipo amarillo. al: fenotipo albino. aux: fenotipo auxótrofo.

El requerimiento fue determinado según se indica en Métodos, sección 3.3.

La frecuencia de reversión fue determinada según se indica en Métodos, sección 3.6.

n.d., no determinado.

Tabla 5

Cepa	Pro	Arg	Glu	Orn	Ctr	Asp	Loci afectado
NN385A25-4	+	+	-	+	+	-	<i>pro1, pro2</i>
NNatx6A10-6	-	+	-	-	+	-	<i>arg3</i>
NNatx6A19-16	-	+	-	-	-	-	<i>arg10, arg4</i>
NNatx10A1-4	+/-	-	-	-	-	-	<i>pro3</i>
NNatx10A22-6	+	-	-	-	-	-	<i>pro3</i>
NNatx3A5-88	+/-	-	-	-	-	-	<i>pro3</i>

Análisis de suplementación de mutantes auxótrofos que requieren arginina y prolina con intermediarios metabólicos: **Pro**: Prolina; **Arg**: arginina; **Glu**: glutamina; **Orn**: ornitina; **Ctr**: Citrulina; **Asp**: Aspartato. Se indican las cepas correspondientes y los posibles genes afectados. +, crecimiento; - Ausencia de crecimiento; +/-, Crecimiento lento.

#### 4.- Fusión de protoplastos de cepas auxótrofas de *Phaffia rhodozyma*.

La fusión de protoplastos constituye una etapa fundamental para desarrollar el análisis genético parasexual en *P. rhodozyma*.

##### 4.1.- Análisis de complementación en *P. rhodozyma*.

Con el objeto de determinar relaciones de dominancia y complementación entre los dobles mutantes obtenidos en este trabajo, se realizaron análisis de complementación entre mutantes auxótrofos y otros afectados en la carotenogénesis. La tabla 6 muestra los resultados obtenidos de un experimento de fusión entre 4 cepas auxótrofas portadoras de diferentes marcadores de color. Con excepción de la fusión entre las cepas NNatx5A17-11 y NNatx6A7-9, en todos los experimentos se logró obtener fusantes protótrofos.

La fusión entre las cepas NNatx3A5-88 y NNatx5A17-11, albina y amarilla que requieren prolina y adenina respectivamente, originó fusantes protótrofos de color amarillo, albino y silvestre, en una proporción 11: 6 : 21 como se observa en la tabla 6. Estos fusantes protótrofos, producidos con una frecuencia de  $7,9 \times 10^{-3}$ , fueron seleccionados en placas MMv para forzar la complementación. Ninguno de los controles donde se fusiona cada cepa consigo misma originó fusantes de fenotipo silvestre. Esto revela que ha ocurrido complementación entre las mutaciones auxótrofas y entre las mutaciones que afectan la pigmentación. Por otro lado es posible inferir un efecto de dominancia de los alelos silvestres sobre los alelos mutantes. El fenotipo rojo naranja de la cepa silvestre es dominante sobre el amarillo y el blanco, sin embargo, los resultados

dan cuenta de una cierta proporción de protótrofos no silvestres para el color, lo cual puede ser explicado por recombinación de marcadores, pérdida de cromosomas o segregación nuclear.

El análisis mediante curvas de crecimiento, que se discutirá más adelante, 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 fusión entre las cepas NN385A3-15 (*ilv*<sup>-</sup>) y NNatx6A7-9 (*atx6,lis*<sup>-</sup>) (tabla 6) de pigmentación rojo-naranja y amarilla respectivamente, produce sólo fusantes protótrofos de fenotipo rojo naranja indicando que el color de la cepa silvestre es dominante sobre el fenotipo de pigmentación de la cepa *atx6*.

La fusión de las cepas auxótrofas NNatx3A5-88 (*atx3,pro*<sup>-</sup>) y NNatx6A7-9 (*atx6,lis*<sup>-</sup>) de pigmentación albina y amarilla respectivamente, produce fusantes protótrofos que presentan el fenotipo de carotenogénesis de ambos parentales, pero no se observan protótrofos de fenotipo silvestre (ver tabla 6).

La fusión entre las cepas NNatx5A17-11 (*atx5,ade*<sup>-</sup>) y NN385A3-15 (*ilv*<sup>-</sup>), de pigmentación amarilla y silvestre respectivamente, originó fusantes protótrofos de ambos fenotipos, sin embargo la proporción de colonias fusantes de fenotipo de color silvestre es 6 veces mayor. La presencia de protótrofos de fenotipo silvestre para la pigmentación, indica un efecto de dominancia de los alelos silvestres sobre los alelos mutantes como se observa en la tabla 6.



Tabla 6

Fusión de protoplastos de cepas auxótrofas y afectadas en la carotenogénesis de *P. rhodozyma*.

Cepas fusionadas	Fenotipo parental	Fusantes MMv	Fenotipo fusante protótrofo	% Reg. prot.	Frec. de Fusión
UCD 67-385	sil, rojo	0	—	5,0%	0
A: NNatx5A17-11	am, ade <sup>-</sup>	0	—	5,0%	0
B: NNatx3A5-88	al, pro <sup>-</sup>	0	—	1,4%	0
C: NNatx6A7-9	am, lis <sup>-</sup>	0	—	2,4%	0
D: NN385A3-15	sil., ilv <sup>-</sup>	5	5 sil.	2,9%	$8,3 \times 10^{-5}$ *
A x B	—	38	11 am, 6 al, 21 sil.	—	$7,9 \times 10^{-3}$
A x C	—	0	0	—	0
A x D	—	57	8 am, 49 sil.	—	$2,0 \times 10^{-3}$
B x C	—	11	8 al, 3 am.	—	$4,5 \times 10^{-3}$
B x D	—	39	7 al, 32 sil.	—	$7,8 \times 10^{-3}$
C x D	—	15	15 sil.	—	$6,3 \times 10^{-3}$

A x B corresponde a una fusión de protoplastos de las cepas NNatx5A17-11 y NNatx3A5-88. A x D corresponde a una fusión de protoplastos de las cepas NNatx5A17-11 y NN385A3-15, C x D a una fusión de mutantes NNatx6A7-9 y NN385A3-15, B x D a una fusión de mutantes NNatx3A5-88 y NN385A3-15, A x C corresponde a una fusión entre las cepas NNatx5A17-11 y NN385A3-15.

Ninguna de las fusiones de las cepas auxótrofas consigo misma originó fusantes, excepto la cepa NN385A3-15, lo cual da cuenta de una alta frecuencia de reversión en esta cepa \*. La fusión se realizó mezclando  $1 \times 10^7$  protoplastos de cada parental.

Después de la fusión las placas fueron dejadas a 22°C. A los 12 días se analizaron y se determinó la presencia de fusantes y su fenotipo. sil: rojo silvestre. am: amarillo. al: albino. MMv: medio mínimo de regeneración.

% Regeneración =  $\frac{\text{N}^\circ \text{ colonias placa [YM}_{\text{KCl}} - \text{YM}]}{\text{N}^\circ \text{ de protoplastos (microscopio)}}$

Nº de protoplastos (microscopio)

Frec. de fusión =  $\frac{\text{colonias fusantes en MMv-KCl}}{\text{Colonias placa [YM}_{\text{KCl}} - \text{YM}]}$

Colonias placa [YM<sub>KCl</sub> - YM]

La fusión de las cepas auxotróficas NNatx3A5-88 (atx3,pro<sup>-</sup>) y NN385A3-15 (ilv<sup>-</sup>) de fenotipo albino y naranja silvestre respectivamente, originó fusantes protótrofos de ambos fenotipos, sin embargo la proporción de colonias fusantes de fenotipo silvestre fue 4 veces mayor, esto puede implicar un efecto de dominancia del fenotipo silvestre sobre los alelos mutantes (ver tabla 6).

Por otra parte, se ha observado que, en la mayoría de los casos, las colonias protótrofas con el fenotipo de pigmentación silvestre segregaron fenotipos parentales durante el periodo de estudio, mostrando inestabilidad fenotípica. En relación a esto último, una cepa fusante de fenotipo silvestre, Fs15, que derivó de la fusión atx5;ade<sup>-</sup> y atx3;pro<sup>-</sup> mostró una frecuencia de segregación de colonias blancas y amarillas en medio YM (sin presión selectiva) de  $5,0 \times 10^{-3}$  y  $5,4 \times 10^{-4}$  respectivamente. 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. G, 1997).

#### 4.1.1 Análisis de complementación de marcadores de auxotrofia para arginina y prolina.

La tabla 7 muestra los resultados de experimentos de fusión entre 3 cepas auxótrofas que utilizan arginina, todas ellas forman fusantes protótrofos estables al ser fusionadas entre sí, indicando que se trata de mutaciones no alélicas. Cabe destacar que la cepa NN385A25-4 a pesar de ser auxótrofa para prolina, tiene la capacidad de crecer en MMv suplementado con arginina, ornitina o citrulina (ver tabla 5).

Tabla 7

Fusión de protoplastos de cepas auxótrofas de *P. rhodozyma* obtenidas en forma independiente y que son suplementadas con arginina

Cepas fusionadas	Fenotipo parental	Fusantes MMv	Fenotipo fusante protótrofo	% Reg. prot.	Frec. de Fusión
UCD 67-385	sil., rojo	0	—	5	0
A: NN385A25-4	sil.,pro <sup>-</sup>	0	—	10	0
B: NNatx6A10-6	am.,arg <sup>-</sup>	0	—	3	0
C: NNatx6A19-16	am.,arg <sup>-</sup>	0	—	1	0
A x B	—	769	sil.(rojo,protótrofo)	—	1,5x10 <sup>-3</sup>
A x C	—	370	sil.(rojo,protótrofo)	—	7,4x10 <sup>-3</sup>
B x C	—	850	(am, protótrofo)	—	1,7x10 <sup>-3</sup>

A x B corresponde a una fusión de protoplastos de las cepas NN385A25-4 y NNatx6A10-6, A x C a una fusión de protoplastos de las cepas NN385A25-4 y NNatx6A19-16 y B x D a una fusión de protoplastos de las cepas NNatx6A10-6 y NNatx6A19-16.

sil.: fenotipo rojo silvestre. am.: fenotipo amarillo. MMv: medio mínimo de regeneración. El porcentaje de regeneración de protoplastos y la frecuencia de fusión se han obtenido por las mismas fórmulas de la tabla 6.

Análisis posteriores utilizando los intermediarios de la vía de síntesis de arginina y prolina han confirmado este resultado, al constatar que las distintas cepas utilizan distintos precursores metabólicos. Además se han determinado los posibles genes que estarían dañados en estos mutantes auxótrofos (tabla 5). Este resultado permite definir dos grupos de complementación entre mutantes auxótrofos que requieren arginina. Además, estos experimentos de fusión, han permitido evidenciar un efecto de dominancia del alelo silvestre sobre la mutación que afecta a la cepa *atx6*. Esto se observa en la tabla 7 donde todos los fusantes protótrofos derivados de la fusión entre cepas auxótrofas de la cepa silvestre y la cepa afectada en carotenogénesis, *atx6*, presentan un fenotipo rojo naranja propio de la cepa silvestre.

#### 4.1.2.- Análisis de complementación de mutaciones de auxotrofia para adenina

Experimentos de fusión de protoplastos entre cepas que requieren adenina, ha permitido determinar la incapacidad de generar fusantes protótrofos estables (ver tabla 8). Se han fusionado protoplastos de las cepas *NNatx5A17-11* (*atx5,ade<sup>-</sup>*), *NNatx3A6-14* (*atx3,ade<sup>-</sup>*) y *NNatx10A17-23* (*atx10,ade<sup>-</sup>*) auxótrofos para adenina, de fenotipos de color amarillo, albino y amarillo pálido respectivamente. Ninguna de las combinaciones entre estas cepas a formado fusantes protótrofos. Sin embargo, todas ellas han generado fusantes estables al ser fusionadas con la cepa *NNatx3A5-88* (*atx3,pro<sup>-</sup>*) de fenotipo albino y que presenta un requerimiento de prolina (ver tabla 8).

Tabla 8

Fusión de protoplastos de cepas auxótrofas obtenidas en forma independiente y que requieren adenina

Cepas fusionadas	Fenotipo parental	Fusantes MMv	Fenotipo fusante protótrofo	% Reg. prot.	Frec. de Fusión
UCD 67-385	sil. rojo	0	—	1,0	0
A: NNatx5A17-11	am, ade <sup>-</sup>	0	—	0,9	0
B: NNatx3A6-14	al, ade <sup>-</sup>	0	—	1,9	0
C: NNatx10A17-23	am, ade <sup>-</sup>	0	—	0,9	0
D: NNatx3A5-88	al, pro <sup>-</sup>	0	—	0,5	0
A x B	—	0	—	—	0
A x C	—	0	—	—	0
A x D	—	50	40 sil, 3am, 7 al	—	$5,0 \times 10^{-4}$
B x C	—	0	—	—	0
B x D	—	54	54 al	—	$2,7 \times 10^{-4}$
C x D	—	32	17 sil, 12 am, 3 al	—	$3,2 \times 10^{-4}$

Las fusiones A x B, A x D y A x C corresponden a fusiones entre las cepas NNatx5A17-11 y las cepas NNatx3A6-14, NNatx3A5-88 y NNatx10A17-23 respectivamente. C x D a una fusión de mutantes NNatx10A17-23 y NNatx3A5-88, B x D a una fusión de mutantes NNatx3A6-14 y NNatx3A5-88.

sil: fenotipo rojo silvestre. am: Fenotipo amarillo. al: fenotipo albino. MMv: medio mínimo de regeneración. El porcentaje de regeneración de protoplastos y la frecuencia de fusión se han obtenido por las mismas fórmulas de la tabla 6.

La fusión entre protoplastos de las cepas NNatx3A6-14 (*atx3,ade*<sup>-</sup>) y NNatx3A5-88 (*atx3,pro*<sup>-</sup>) ambas de fenotipo albino y que presentan requerimiento para adenina y prolina respectivamente, han generado fusantes protótrofos, todos de fenotipo albino (tabla 8). Esto último resulta lógico si recordamos que ambas cepas se han originado por mutagénesis de la cepa *atx3* también de fenotipo albino. Esto significa que dichas cepas han complementado sus respectivas mutaciones auxótrofas, pero son incapaces de complementar la mutación que las afecta en la carotenogénesis. Además, en la tabla 8 se muestran los resultados de experimentos de fusión entre protoplastos de las cepas NNatx10A17-23 (*atx10,ade*<sup>-</sup>) y NNatx3A5-88 (*atx3,pro*<sup>-</sup>) de fenotipo amarillo pálido y albino respectivamente. Esta fusión ha generado un total de 32 fusantes protótrofos, 17 de los cuales presentan un fenotipo silvestre. Esto indica la capacidad de complementar sus respectivas mutaciones que afectan a la carotenogénesis en ambas cepas, y más aún, indica, que los alelos mutantes *atx10* y *atx3*, se comportan en forma recesiva frente a sus alelos silvestres.

#### 4.1.3.- Análisis de complementación de mutantes de auxotrofia para prolina.

En la tabla 9 se muestran los resultados de experimentos de fusión de protoplastos entre cepas auxótrofas que requieren prolina como único suplemento. En este caso se ha utilizado la cepa amarilla NNatx5A17-11 (*atx5,ade*<sup>-</sup>) que requiere adenina como control positivo. La fusión entre protoplastos de las cepas auxótrofas para prolina NNatx10A1-4 (*atx10,pro*<sup>-</sup>) y NNatx3A5-88 (*atx3,pro*<sup>-</sup>), de color amarillo y albino respectivamente han

originado 7 fusantes protótrofos, de los cuales 3 son de fenotipo silvestre. Estos resultados, permiten definir al menos dos grupos de complementación entre los mutantes que requieren prolina. Las dos cepas *pro*<sup>-</sup> antes mencionadas, generan fusantes estables cuando son fusionadas con protoplastos de la cepa control, NNatx5A17-11(*atx5,ade*<sup>-</sup>). lo cual da cuenta de un buen procedimiento de fusión y regeneración de protoplastos. Como se observa en la tabla 9, la fusión entre protoplastos de las cepas *pro*<sup>-</sup> NNatx10A22-6 (*atx10,pro*<sup>-</sup>) y NNatx3A5-88 (*atx3,pro*<sup>-</sup>) de fenotipos amarillo y albino respectivamente no generaron fusantes protótrofos. Este resultado se debe a que las mutaciones en ambas cepas presentan relaciones de alelismo, es decir, serían portadoras de mutaciones en el mismo gen de la vía de biosíntesis de prolina, sugiriendo que comparten el mismo grupo de complementación.

Por otro lado es posible observar que las fusiones entre protoplastos de las cepas de fenotipo amarillo, NNatx10A1-4 (*atx10,pro*<sup>-</sup>) con NNatx5A17-11 (*atx5,ade*<sup>-</sup>) y NNatx10A22-6 (*atx10,pro*<sup>-</sup>) con NNatx5A17-11 (*atx5,ade*<sup>-</sup>) han generado 28 y 29 fusantes protótrofos respectivamente, todos ellos de fenotipo amarillo (tabla 9). Esto último permite determinar una relación de alelismo entre ambas cepas, es decir *atx10* y *atx5* son mutaciones que afectan a un mismo gen, el cual determina la acumulación de  $\beta$ -caroteno, el fenotipo de pigmentación amarillo, y no son capaces de generar fusantes protótrofos de fenotipo silvestre.

Tabla 9

Fusión de protoplastos de cepas que requieren prolina

Cepas fusionadas	Fenotipo parental	Fusantes MMv	Fenotipo fusante protótrofo	% Reg. prot.	Frec. de Fusión
UCD 67-385	sil, rojo	0	-	-	0
A: NNatx10A1-4	am, pro <sup>-</sup>	0	-	4,9	0
B: NNatx10A22-6	am, pro <sup>-</sup>	0	-	2,0	0
C: NNatx3A5-88	al, pro <sup>-</sup>	0	-	1,5	0
D: NNatx5A17-11	am, ade <sup>-</sup>	0	-	4,9	0
A x B	-	2	2 am	-	$7 \times 10^{-6}$
A x C	-	7	3 sil, 3 al, 1 am	-	$2 \times 10^{-5}$
A x D	-	28	28 am	-	$5,0 \times 10^{-5}$
B x C	-	0	0	-	0
B x D	-	29	29 am	-	$1,0 \times 10^{-4}$
C x D	-	62	43 sil, 14 am, 5 al	-	$2,0 \times 10^{-4}$

A x B, A x C y A x D, corresponde a experimentos de fusión de protoplastos de las cepas NNatx10A1-4 con las cepas NNatx10A22-6, NNatx3A5-88 y NNatx5A17-11 respectivamente.

La cepa NNatx5A17-11(am, ade<sup>-</sup>) ha sido utilizada como control positivo.

sil: fenotipo rojo silvestre. am: fenotipo amarillo. al: fenotipo albino. MMv: medio mínimo de regeneración.

El porcentaje de regeneración y la frecuencia de fusión se han obtenido como en la tabla 6.



## 5.- Formación de estructuras sexuales en *P. rhodozyma*.

Con el objeto de caracterizar la fase sexual del ciclo reproductivo sexual de *P. rhodozyma*, se procedió a evaluar el efecto ambiental en la producción de estructuras sexuales (formación de holobasidios con basidiosporas terminales).

### 5.1.- Influencia de factores ambientales en la esporulación.

#### 5.1.1.- Medio de cultivo.

Para determinar el efecto del tipo de medio de cultivo sobre la formación de estructuras sexuales en *P. rhodozyma*, se utilizó un fusante protótrofo de fenotipo silvestre, Fs15, proveniente de una fusión entre las cepas NNatx5A17-11 (am, ade<sup>-</sup>) y NNatx3A5-88 (al, pro<sup>-</sup>). Se observó su capacidad de formar holobasidios en un medio mínimo. La figura 5 muestra los resultados de un experimento en el cual se creció el fusante Fs15 en medio agar YM, MMv y MMv-Adenina a 22°C durante 48 hrs, luego se transfirió las placas a 9°C durante 25 días para inducir la esporulación. Como se observa en la figura 5, tanto en medio completo YM como en medio mínimo MMv suplementado con adenina no se observó formación de holobasidios.

La figura 6 muestra la cinética de formación de estructuras sexuales en 4 cepas de *P. rhodozyma*, en la cual se confirman las observaciones con respecto a la variación en el nivel de producción de estructuras sexuales para las distintas cepas estudiadas.

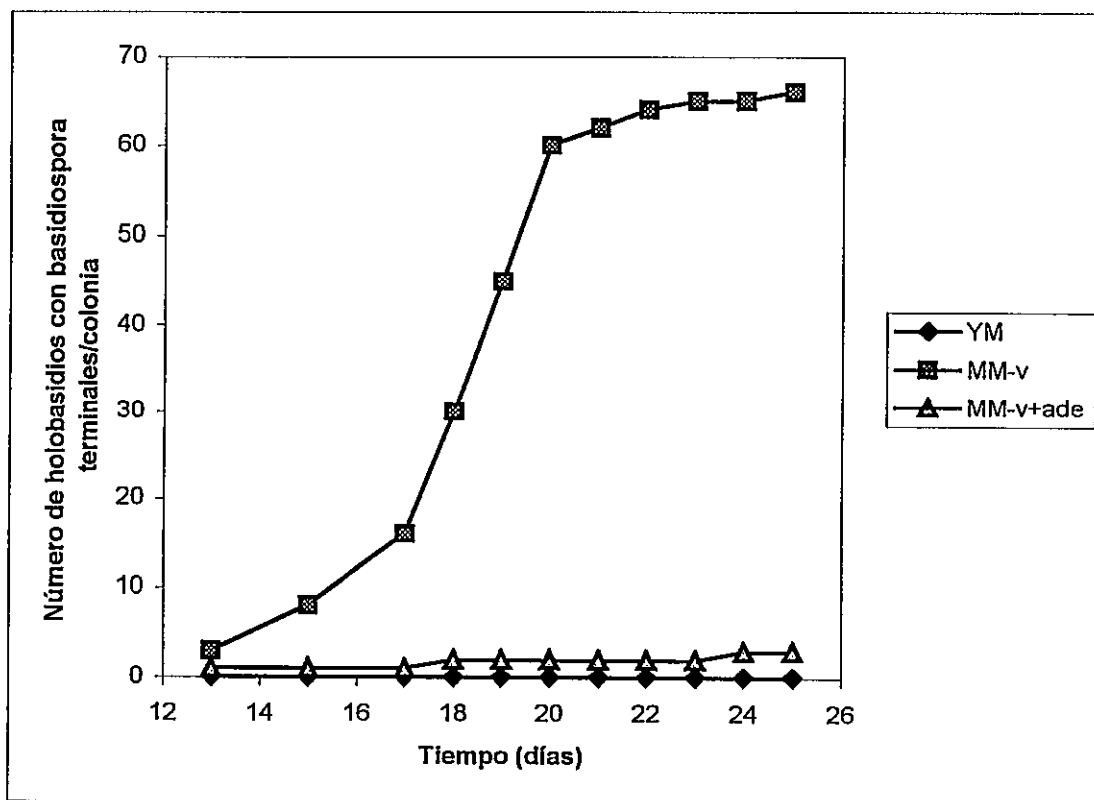


Figura 5:

Efecto del medio de cultivo sobre la formación de estructuras sexuales en el fusante Fs-15 de *P. rhodozyma*. Las placas MMv fueron incubadas por 48 hrs. a 22°C para crecer las colonias y posteriormente fueron mantenidas a 9°C por 25 días durante los cuales se evaluó la presencia de holobasidios con basidiosporas terminales. La concentración de adenina fue de 0,135 mg/ml en las placas correspondientes. Esta inhibición, es más evidente a mayor tiempo de exposición.

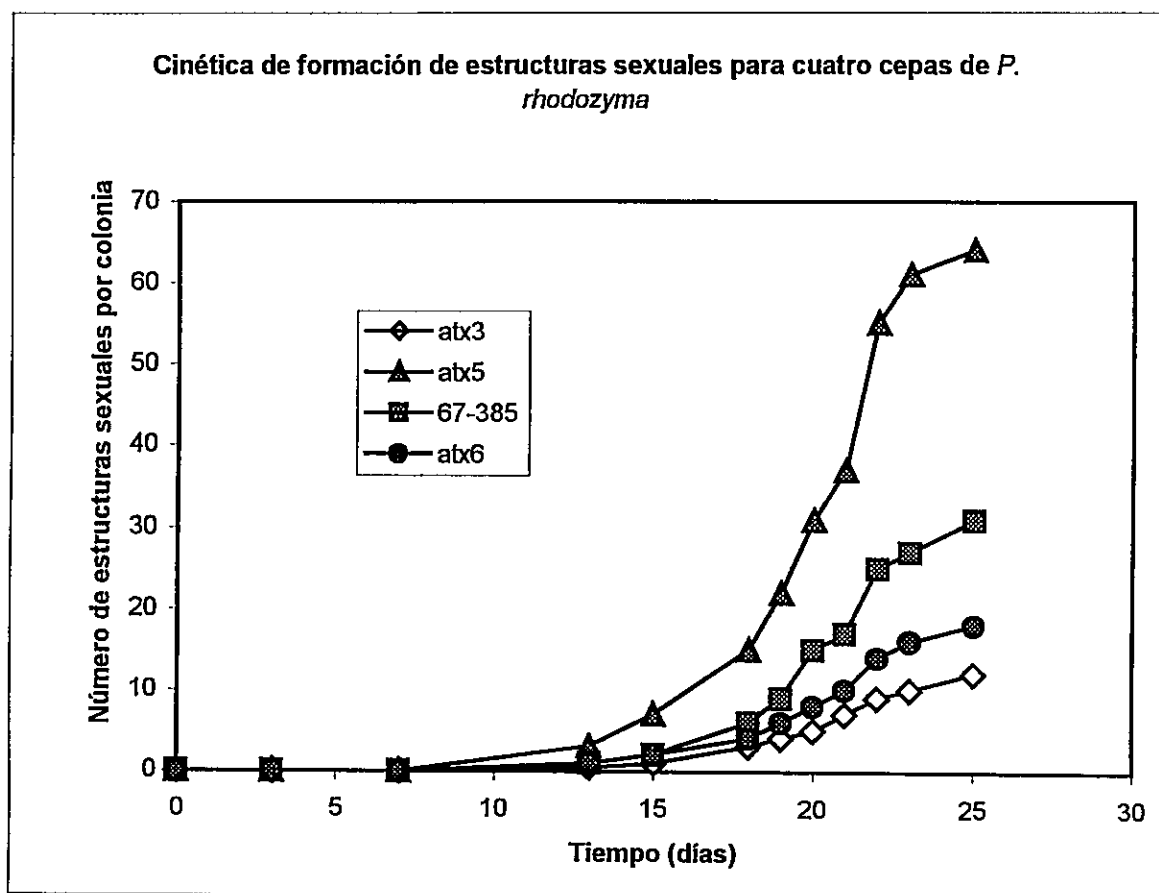


Figura 6:

Cinética de desarrollo de estructuras sexuales en *P. rhodozyma*. Las cepas se sembraron en placas MMv (Apéndice 1), luego fueron incubadas por 48 hrs. a 22°C para crecer las colonias y posteriormente mantenidas bajo condiciones de inducción de la esporulación. Esto es, a una temperatura de 9°C, con una concentración de glucosa de 80 mM y con una concentración de amonio de 25 mM (como en la figura 5). Luego de dos meses el número de estructuras sexuales se mantiene constante.

### 5.1.2.- Efecto de la fuente de nitrógeno en la formación de estructuras sexuales.

El efecto del nitrógeno sobre la formación de estructuras sexuales en *P. rhodozyma* fue evaluado en placas medio sólido con un gradiente de concentraciones entre 0 y 70 mM de nitrato de amonio. La figura 7 muestra los resultados del análisis de 6 cepas de *P. rhodozyma*. Concentraciones menores a 20 mM y mayores a 40 mM disminuyen significativamente el número de estructuras sexuales en todas las cepas estudiadas. Además es posible inferir que bajo condiciones de temperatura adecuadas (9°C), la concentración óptima de nitrato de amonio como fuente de nitrógeno tiene un rango estrecho con un máximo a 25mM (ver figura 7). Paralelamente se ha observado que cualquier aumento en la concentración de cloruro de amonio disminuye la producción de estructuras sexuales en una manera similar en todas las cepas estudiadas.

### 5.1.3.- Efecto de la glucosa como recurso de carbono en la formación de estructuras sexuales.

Se analizaron 4 cepas (UCD 67-385, atx3 atx5 y atx6 en placas MMv-agar). En el gráfico de la Fig. 8, con un gradiente de concentración de glucosa, se ilustra que existe un amplio rango de concentraciones de glucosa, que permite la formación de estructuras sexuales (50- 200 mM), siendo la concentración óptima 80 mM de glucosa para la cepa atx5, 100mM para la cepa silvestre UCD 67-385 y 50 mM para las cepas atx3 y atx6. Además, se observa una alta variación en la tasa de formación de estructuras sexuales

entre las distintas cepas analizadas, siendo la cepa atx5 la que presenta una mayor capacidad de esporular.

Con concentraciones de glucosa menores a 30 mM y mayores a 200 mM se observa que las colonias son de menor tamaño, indicando que concentraciones extremas del recurso de carbono pueden estar afectando el crecimiento celular y el desarrollo de las colonias.

#### 5.1.4.- Efecto de la temperatura.

Con el objeto de determinar las condiciones de temperatura para la formación de holobasidios, se procedió a sembrar la cepa silvestre UCD 67-385, atx3, atx5, atx6, y las cepas fusantes protótrofas FS14 y Fs15 en placas MMv-Agar. Las cepas fueron crecidas en medios sólidos MMv-agar durante dos días a 22°C y posteriormente se incubaron en distintas condiciones de temperatura, entre 0 y 28°C por 22 días. En la figura 9 se observa que todas las cepas estudiadas presentan un óptimo a 9°C, temperatura en la cual se alcanza una máxima esporulación. A temperaturas más bajas (4°C) o más altas (12°C o mayores) la formación de holobasidios disminuye.

se observan diferencias significativas en la producción de estructuras sexuales entre las cepas analizadas. Las cepas silvestre UCD 67-385, atx3 y atx6 producen un bajo promedio de estructuras sexuales, mientras que la cepa atx5 y las fusantes protótrofas Fs14 y Fs15 producen alto número de estructuras sexuales.

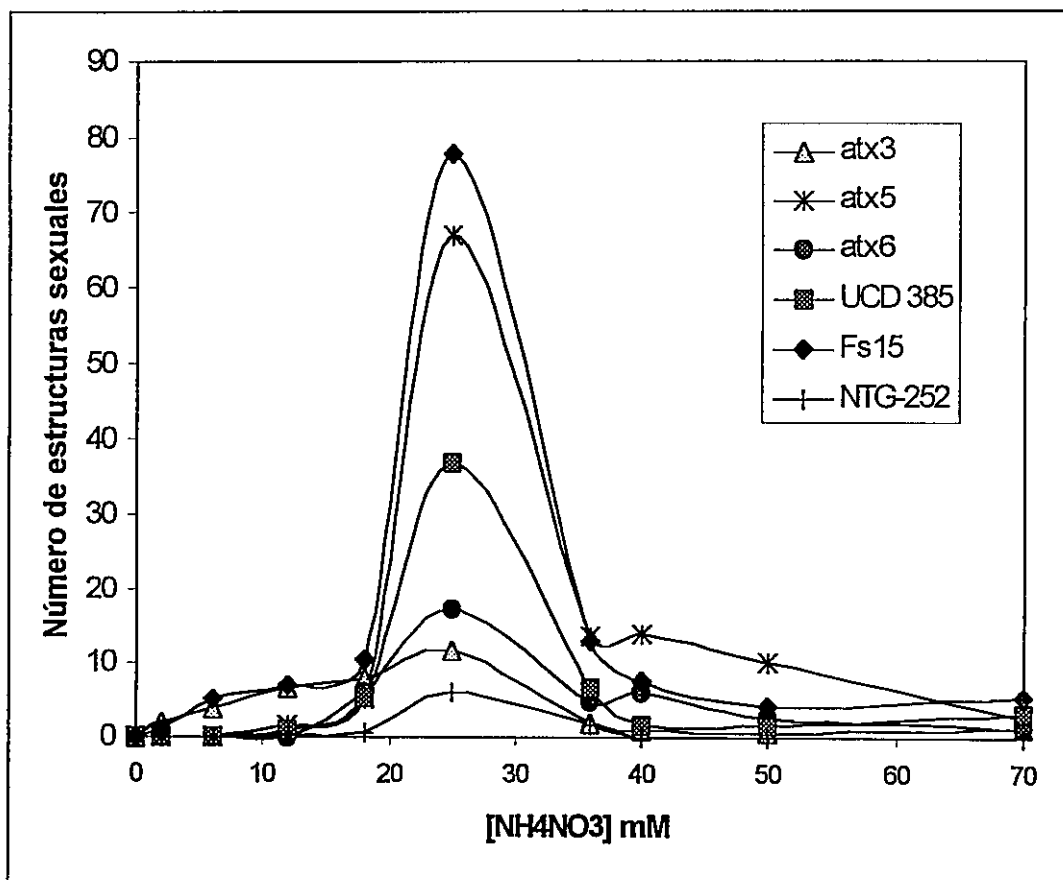


Figura 7:

Efecto de la concentración de nitrato de amonio sobre la formación de estructuras sexuales en *P. rhodozyma*. Las cepas analizadas son la cepa silvestre UCD 67-385, las cepas afectadas en la carotenogénesis atx3 (albina), atx5 (amarilla) y atx6 (amarilla rosada). Además se incluyen la cepa sobreproductora de astaxantina NTG-252 y la cepa fusante Fs15 de fenotipo silvestre, originada de una fusión entre las cepas auxótrofas atx3;pro- y atx5;ade- de fenotipos albino y amarillo respectivamente. Las condiciones de incubación son las mismas de la figura 6.

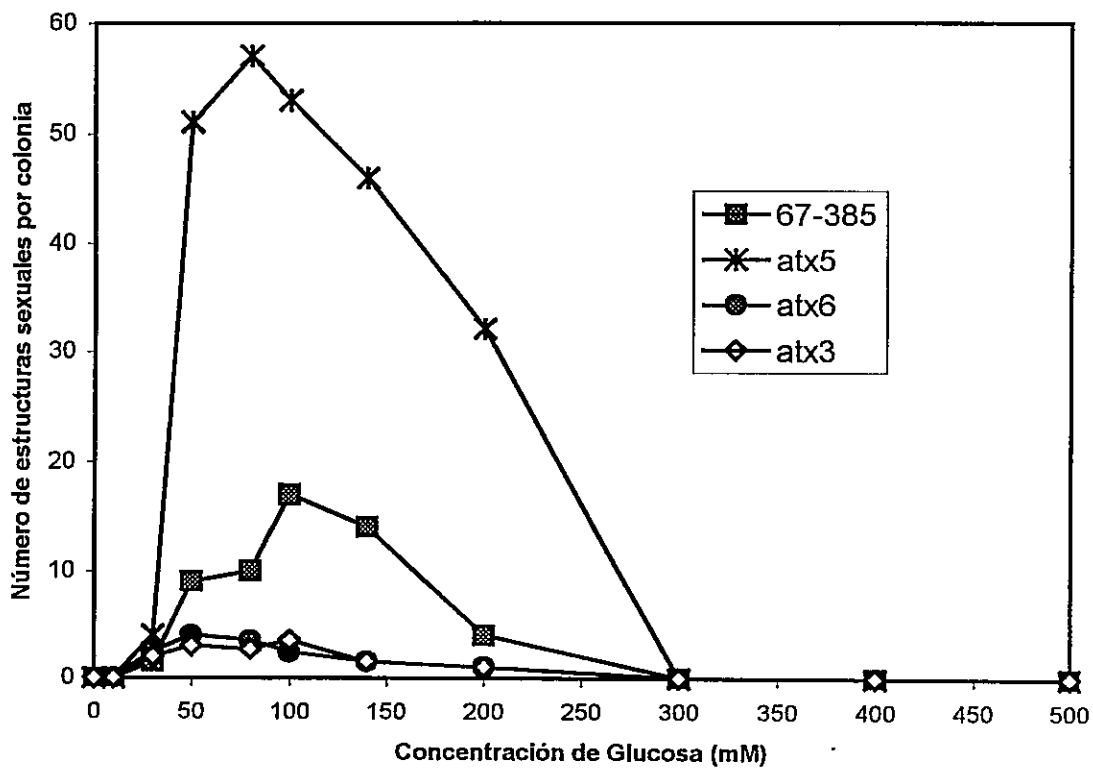


Figura 8:

Efecto de la glucosa como recurso de carbono en la formación de estructuras sexuales en 4 cepas de *P. rhodozyma*, UCD 67-385, atx3, atx5 y atx6. Las condiciones experimentales son las mismas que en la figura 6.

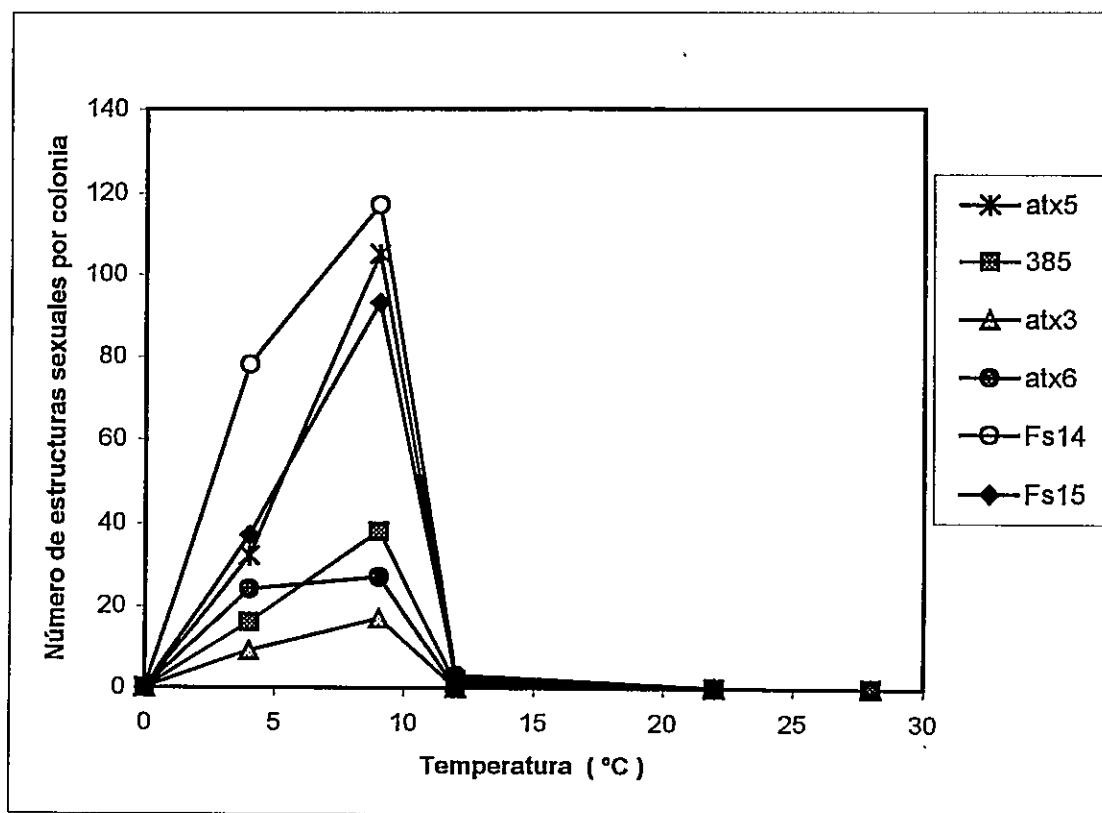


Figura 9:

Efecto de la temperatura sobre la formación de estructuras sexuales en seis cepas de *P. rhodozyma*. Las colonias se crecieron en placas MMv-Agar, las condiciones de incubación son como en la figura 6, excepto para la temperatura. Se determinó el efecto de la temperatura sobre la formación de estructuras sexuales ha 0, 4, 9, 12, 22 y 28 °C.



## 6.- Inducción de estructuras sexuales por fusión de protoplastos

Se procedió a sembrar las cepas fusantes y sus respectivos controles en placas MMv-agar. Las placas fueron incubadas por dos días a 22 °C y luego incubadas bajo condiciones de inducción de estructuras sexuales a 9°C. Posteriormente se siguió el método de inspección ocular como indica el punto 5.4 de métodos para determinar el número de estructuras sexuales por colonia. En la tabla 10 se muestran los resultados del efecto de la fusión de protoplastos en la formación de estructuras sexuales de *P. rhodozyma*. Se observa que los fusantes protótrofos Fs7, Fs8, Fs10, Fs14, Fs22, y Fs24 derivados de la fusión entre las cepas auxótrofas NNatx5A17-11 (am,ade<sup>-</sup>) y NNatx3A5-88 (al,pro<sup>-</sup>), producen mayor cantidad de holobasidios que las cepas parentales en las mismas condiciones. Sin embargo, fusantes con una menor producción de holobasidios también pueden ser observados (Fs11, Fs12). Por otro lado, se ha observado que segregantes derivados de esta fusión, muestran una menor capacidad de esporular. La tabla 10 muestra que el segregante S9, con un fenotipo similar a la cepa atx5, produce un bajo número de holobasidios, similar a la cepa atx3, de la cual deriva la cepa parental NNatx3A5-88 (al,pro<sup>-</sup>)

En la fusión entre las cepas NNatx3A5-88 (al,pro<sup>-</sup>) y NN385A3-15 (ilv<sup>-</sup>), los fusantes producen más holobasidios que las cepas parentales. En las mismas condiciones, el segregante albino S.2.3 produce muy pocos holobasidios (ver tabla 10).

En la figura 10 se observa una fotografía de la cepa fusante Fs15, presentando estructuras sexuales en su superficie.

Por otro lado, intentos de aislar basidiosporas mediante micromanipulación han resultado infructuosos. No obstante, ha sido posible observar con la utilización del microscopio óptico estructuras que han sido denominadas microcolonias. Tales estructuras se forman por la yemación de una o más de las basidiosporas y sugieren una posible evidencia de su viabilidad. La figura 11 muestra una microcolonia de la cepa silvestre UCD 67-385.

Por otra parte, mediante observaciones al microscópico de estructuras sexuales teñidas con DAPI, se obtuvieron evidencias de una migración nuclear en los holobasidios (Hermosilla, 1997). Además, cepas afectadas en la carotenogénesis muestran un número variable de estructuras sexuales, mientras que híbridos originados por la fusión de protoplastos, producen mayor número de cuerpos fructíferos que sus parentales, siendo posible obtener segregantes protótrofos con menor número de éstas. Nuestros resultados muestran la importancia del componente ambiental en la formación de estructuras sexuales en *P. rhodozyma*. Además, la segregación del fenotipo de producción de holobasidios y la obtención de un mutante incapaz de esporular, sugieren la presencia de determinantes genéticos que controlarían la formación de estructuras sexuales en esta levadura.

Tabla 10

Efecto de la fusión de protoplastos en la intensidad de esporulación en *P. rhodozyma*.

Cepa	Pigmento principal	Fenotipo	holobasidia/colonia
UCD 67-385	A	silvestre (rojo)	38
atx3	F	albino	10
atx5	C	amarillo	105
atx6	C	amarillo	27
atx11	n.d.	pálido	0
ilv	A	rojo	32
Fusión atx3,pro <sup>-</sup> : atx5,ade <sup>-</sup>			
Fs7	A	rojo	128
Fs8	A	rojo	132
Fs10	A	rojo	152
Fs11	A	rojo	71
Fs12	A	rojo	78
Fs14	C	amarillo	117
Fs15	A	rojo	93
Fs22	A	rojo	117
Fs24	A	rojo	175
S9	C	amarillo	1
S17	C	amarillo	89
S18	C	amarillo	35
S19	F	albino	0
S23	C	amarillo	52
S25	F	albino	4
S26	F	albino	3
Fusión atx3,pro <sup>-</sup> : ilv <sup>-</sup>			
Fs2.1	A	rojo	78
Fs2.2	A	rojo	81
Fs2.4	A	rojo	79
Fs2.5	A	rojo	75
Fs2.6	A	rojo	69
S2.3	F	albino	3

Los fusantes fueron sembrados en placas MMv-agar e inducidos a formar holobasidios con basidiosporas en condiciones similares a las descritas en la figura 6. Estas placas fueron sometidas a inspección ocular al microscopio para evaluar el número de estructuras sexuales en las colonias. A: astaxantina, C:  $\beta$ -caroteno, F: fitoeno, n.d. , no determinado.

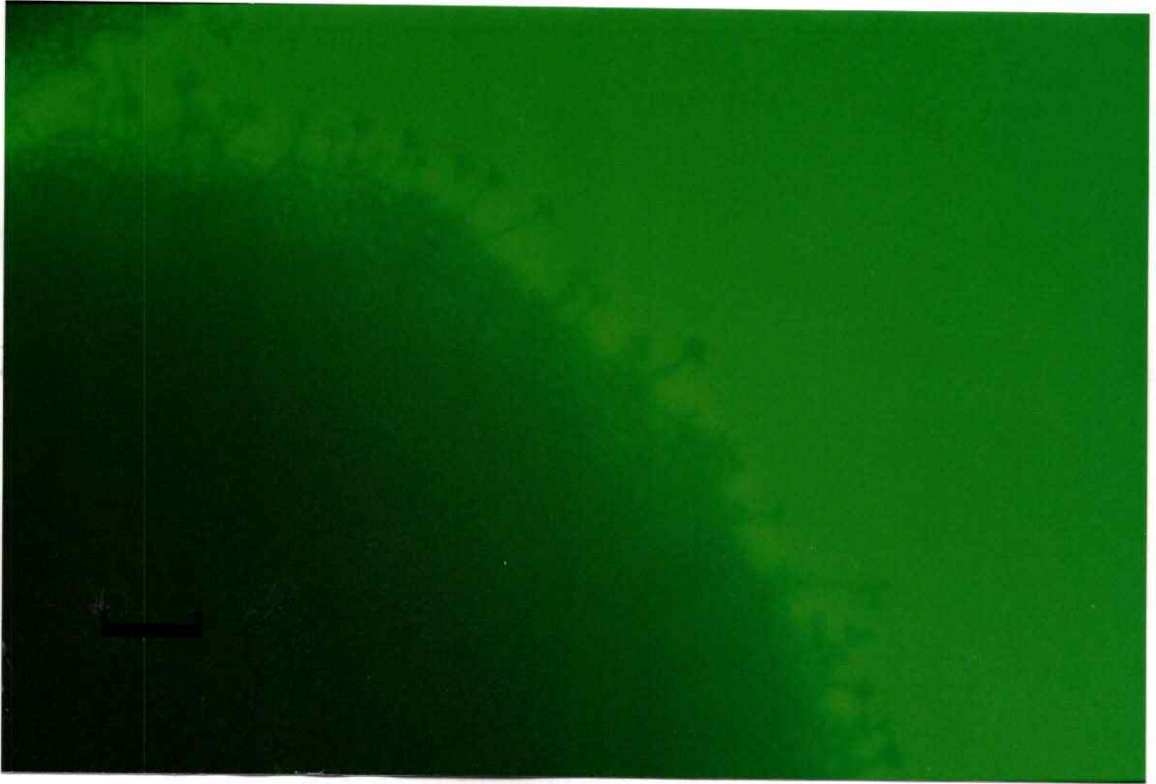


Figura 10:

Colonia Fs15 presentando estructuras sexuales. La colonia Fs15 deriva de la fusión de las cepas NNatx3A5-88 (al,pro<sup>-</sup>) y NNatx5A17-11 (am,ade<sup>-</sup>), presentando un gran número de estructuras sexuales en su superficie. Aumento 100X. La barra en la fotografía representa 100  $\mu$ m.

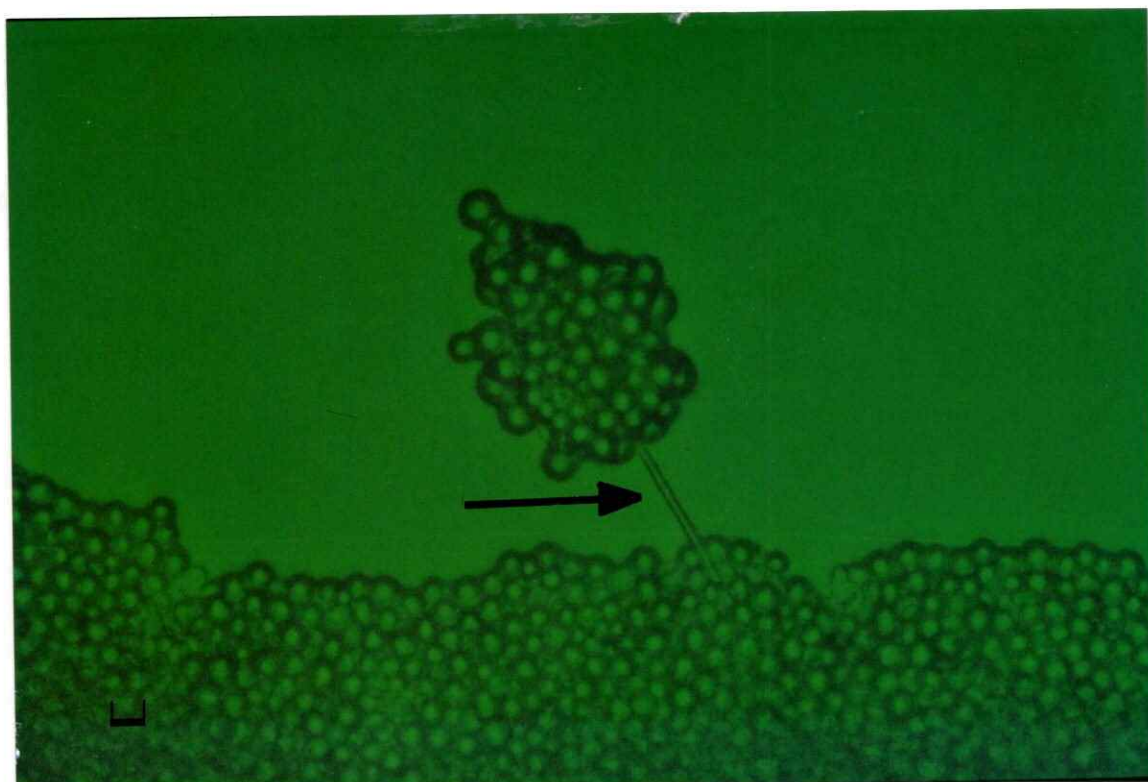


Figura 11

Fotografía de una microcolonia en la cepa silvestre UCD 67-385 de *P. rhodozyma*. La flecha indica la posición del holobasidio. La placa fue sometida a condiciones de inducción de la esporulación. Aumento 400 X. La barra en la fotografía representa 10  $\mu\text{m}$ .

## DISCUSION

### Sensibilidad mutagénica en *P. rhodozyma*.

La diferente frecuencia de formación de mutantes afectados en carotenogénesis inducidos por tratamiento con NTG parece estar asociada a una diferencia de susceptibilidad de las cepas al agente mutagénico (ver tabla 1), lo cual puede estar indicando diferencias a nivel del sistema de control genético de la síntesis de pigmentos, en los mecanismos de reparación del daño al DNA producido por NTG, en genes involucrados en otros sistemas de regulación pero de efecto indirecto sobre la carotenogénesis, o en diferencias en el ámbito de la organización genética de estos. La cepa atx6 es claramente diferente de la cepa atx3 con respecto a la sensibilidad mutagénica (tabla 2). En atención a esto último, cabe destacar que la cepa atx6 se diferencia de las otras mutantes por presentar un claro polimorfismo cromosómico detectado a partir de análisis de electroforesis de campo pulsado que podría sugerir la presencia de inestabilidad cromosómica explicando los resultados (Hermosilla, *et al*, 1996). La mayor frecuencia mutagénica que presenta la cepa atx6, a partir de la cual es posible obtener un alto número de mutantes afectados en la carotenogénesis, sugiere una mayor sensibilidad de los genes involucrados en pasos iniciales de la síntesis de pigmentos carotenoides, alternativamente es posible que una mayor permeabilidad de la

pared de esta cepa al NTG explique el alto número de mutantes albinos (Tabla 2) que se observan. La cepa *atx6* presenta un tipo especial de polimorfismo cromosómico, la falta de la banda más pequeña de 350kb (Hermosilla, 1997), lo cual ha sido determinado mediante análisis de cariotipo electroforético (Cifuentes *et al.*, 1997). Esto último podría causar una inestabilidad genética en la cepa *atx6*, probablemente debido a alteraciones inducidas por el agente mutagénico.

Por otra parte, no fue posible obtener mutantes de color a partir de mutagénesis en la cepa *atx3*, que acumula fitoeno. Es posible que mutaciones en pasos posteriores de la síntesis de pigmentos no sean visualizadas en esta cepa como una variación del fenotipo de color. Una explicación podría ser que el gen *atx3* actúa en una etapa inicial de la síntesis de pigmentos carotenoides, ejerciendo un efecto epistático sobre los genes que controlan la síntesis de  $\beta$ -caroteno y astaxantina (Tabla 2).

#### Mutantes en pigmentación de *P. rhodozyma*

Los experimentos de mutagénesis con NTG permitieron obtener sobre 80 mutantes de color que presentaron una coloración distinta a la de la cepa mutagenizada. Todas las cepas mutantes de color (Tabla 2) 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.

En el presente trabajo se han obtenido una serie de mutantes afectados en la carotenogénesis a partir de la cepa silvestre UCD 67-385. Entre estos se han obtenido 2 mutantes de fenotipo amarillo, atx9 y atx10. Además ha sido posible obtener mutantes albinos como el caso de la cepa atx8 (figura 1). Estos resultados, pueden ser debidos a un aumento de las concentraciones del agente mutagénico NTG utilizado para la obtención de mutantes.

#### Mutantes auxótrofos en *P. rhodozyma*

Los experimentos de mutagénesis con NTG, permitieron obtener 33 mutantes auxótrofos a una frecuencia que varía entre  $1 \times 10^{-3}$  y  $8,7 \times 10^{-4}$ . De estos, 31 han sido identificados en su requerimiento nutricional (Tabla 4). Cabe destacar que en todas las cepas mutagenizadas se aisló mutantes que requieren adenina, en general se logró obtener 14 ade<sup>-</sup> de los 33 auxótrofos obtenidos, lo que constituye un 42% del total de mutantes. Esto podría ser debido a una mayor sensibilidad al agente mutagénico de los genes que controlan la síntesis de adenina, determinados por la presencia de "puntos calientes" en el genoma de *P. rhodozyma*. Ello podría deberse a una posible aneuploidía que afecte a una región del genoma donde se encuentran dichos genes o a la presencia de zonas de heterocigosidad natural. Esto último solo tiene sentido si se considera a *P. rhodozyma* una levadura diploide, como ha sido sugerido en nuestro laboratorio (Cifuentes *et al.*,



1997; Hermosilla, 1997). De hecho, la dificultad para obtener mutantes auxótrofos en estudios previos (Martínez, 1995) ha sido superada al considerar a la levadura *P. rhodozyma* como diploide, aumentando la concentración del agente mutagénico de 40 a 80 y 100 ug/ml de NTG. Las condiciones de mutagénesis tienen un efecto crítico en la obtención de mutantes auxótrofos en *P. rhodozyma*. Estos factores como la concentración del mutágeno, el tiempo de exposición y el estado de desarrollo del cultivo pueden afectar notablemente la eficiencia del procedimiento.

En experimentos de mutagénesis previos, realizados en nuestro laboratorio y en el de otros grupos de investigadores, se observó que *P. rhodozyma* es poco susceptible al tratamiento mutagénico, obteniéndose un reducido número de mutantes auxótrofos. Esto puede ser una evidencia indirecta para sugerir un grado de ploidía mayor que la haploidía para esta levadura. En esta tesis, se logró superar tales dificultades, considerando a la levadura como diploide, de esta manera la obtención de mutantes auxótrofos requirió el incremento de concentraciones del agente mutagénico mayores a las utilizadas previamente (80 y 100 ug/ml), y a la implementación de un sistema de enriquecimiento, por muerte de células protótrofas con nistatina (10 ug/ml).

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 *Saccharomyces*, fue aplicado satisfactoriamente en hongos filamentosos y levaduras tales como *Rhodotorula mucilaginosa* (Cook *et al.*, 1974), *Hansenula polymorpha* (Sanchez *et al.*, 1977), y

*Candida tropicalis* (Gleeson *et al.*, 1988). 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).

Tal como se indicó previamente, la obtención de mutantes auxótrofos en *P. rhodozyma* ha requerido de un fuerte tratamiento mutagénico (Tabla 3), por lo tanto los mutantes han sido seleccionados entre unas pocas células sobrevivientes de la población inicial (frecuencia de mortalidad mayor a 99%). El aumento en la dosis del mutágeno y la implementación de un sistema de enriquecimiento de mutantes con nistatina han aumentado la probabilidad de que las células sobrevivientes lleven una o varias mutaciones. La mayoría de los mutantes obtenidos requieren adenina ( $\approx 42\%$ ). Esto concuerda con los resultados obtenidos por Adrio *et al.* en 1993. Sin embargo, también se obtuvieron mutantes que requieren metionina, arginina, prolina, lisina, y vitaminas (Tabla 4). Dobles mutantes fueron también aislados. Estos mutantes no crecen en ninguno de los medios selectivos ensayados, sin embargo crecen normalmente en placas medio YM que contiene todos los requerimientos necesarios. Es posible que tales mutantes posean requerimientos no considerados en nuestro análisis o que sean portadores de mutaciones múltiples.

La mayoría de los mutantes obtenidos poseen frecuencias de reversión menores a  $10^{-8}$  y no presentan crecimiento residual sobre medio mínimo (MMv), exceptuando las cepas NN385A3-15 auxótrofa para isoleucina-valina, NNatx6A13-56 auxótrofa para metionina y NNatx10A10-4 con requerimiento para metionina que presentan frecuencias

de reversión de  $4,4 \times 10^{-6}$ ,  $1,6 \times 10^{-6}$  y  $2,8 \times 10^{-5}$  respectivamente y la cepa NNatx6A25-4 que requiere prolina y presenta crecimiento residual en MMv.

#### Requerimientos nutricionales en mutantes auxótrofos de *P. rhodozyma*

Los mutantes auxótrofos fueron seleccionados inicialmente por la ausencia de crecimiento sobre placas MMv-Agar. Los requerimientos específicos fueron determinados con una prueba de la colonia original sobre varios tipos de medios selectivos con algunas variaciones del método descrito por Rose, M., et al., 1990.

Los experimentos de mutagénesis con NTG sobre la cepa silvestre UCD 67-385 y 5 cepas afectadas en la carotenogénesis, permitieron seleccionar 33 mutantes auxótrofos de los cuales 31 han sido identificados en su requerimiento. Las concentraciones del agente mutagénico y el requerimiento de los mutantes para cada una de las cepas mutagenizadas se observan en la tabla 4. El espectro de mutantes auxótrofos obtenidos muestra claramente la presencia de un fenómeno del tipo rango estrecho de mutantes, como ha sido descrito previamente en *Candida albicans* (Whelan, et al., 1981). De estos, se obtienen con mayores frecuencias, auxótrofos para adenina, metionina, prolina, arginina y polivitaminas (tabla 4). La cepa auxótrofa NNatx6A10-6 se ha caracterizado inicialmente por presentar un requerimiento para arginina, posteriormente la utilización de soluciones con los intermediarios de la ruta de síntesis de este aminoácido, ha permitido constatar su capacidad de crecer en citrulina y su incapacidad de crecer en ornitina (figura 3). Ello ha permitido definir que esta cepa se encuentra bloqueada en el paso que

lleva de ornitina a citrulina, La comparación de tales resultados con la ruta de biosíntesis de arginina descrita para la levadura *S. cerevisiae* indica que este paso sería controlado por la enzima ornitina carbamoiltransferasa producto del gen *ARG3* en la ruta de biosíntesis de arginina propuesta para *S. cerevisiae* (Lacroute et al, 1965). De esta forma, se ha definido el locus *ARG3* y la cepa NNatx6A10-6 de *P. rhodozyma* llevaría un alelo *arg3* responsable de la auxotrofia para arginina. Además se ha obtenido un mutante proveniente de un experimento de mutagénesis de la cepa atx6 que también requiere arginina. Este mutante auxótrofo, denominado NNatx6A19-16 (figura 4), tiene la capacidad de crecer en arginina y es incapaz de crecer en cualquiera de los intermediarios disponibles (ornitina o citrulina). Como muestra la figura 12, la citrulina es convertida por la argininosuccinato sintetasa a argininosuccinato y este a arginina por la argininosuccinato liasa. De esta forma dos genes están involucrados, *ARG10* o *ARG4* siguiendo el modelo propuesto para *S. cerevisiae* y por lo tanto, la cepa NNatx6A19-16 es portadora de una forma alelica *arg10* o *arg4* de estos genes. La identificación exacta, dependerá de la disponibilidad del intermediario arginino-succinato y del análisis molecular del gen en cuestión.

La cepa NN385A25-4 con un fenotipo rojo naranja fue obtenida a partir de una mutagénesis de la cepa silvestre UCD 67-385 y presenta además un fenotipo de requerimiento de prolina, citrulina o arginina como suplemento. De acuerdo a los análisis con intermediarios de las vías de biosíntesis de arginina y prolina (tabla 5), esta mutante auxótrofa puede estar bloqueada posiblemente, en la reacción que transforma glutamato a  $\gamma$ -glutamil-P (Brandriss, 1979). En *S. cerevisiae* el glutamato es convertido a  $\gamma$ -

glutamil-P por una glutamato kinasa (ATP: L-glutamato  $\gamma$ -fosfotransferasa) codificada por el gen *PRO1*. Posteriormente  $\gamma$ -glutamil-P es convertido a  $\gamma$ -glutamil semialdehido por una glutamil-P reductasa (L-glutamato- $\gamma$ -semialdehido: NAD(P) oxidoreductasa) codificada por el gen *PRO2* en la vía de síntesis de prolina (Brandriss, 1979). Hasta ahora no ha sido posible determinar cual locus, *PRO1* o *PRO2*, esta involucrado en la mutación que afecta a la cepa NN385A25-4 de *P. rhodozyma* (ver figura 12). En este mutante, arginina y citrulina pueden ser utilizados vía la actividad catabólica de arginina, mediante las enzimas arginasa (Bechet et al., 1970) y ornitina transaminasa (Brandriss & Magasanik, 1980). Además la ornitina puede ser utilizada vía ornitina transaminasa, produciendo en ambos casos  $\gamma$ -glutamil semialdehido, el cual experimenta una ciclización espontánea para dar pirrolina-5- carboxilato (P5C), el cual es convertido posteriormente a prolina por una pirrolina-5-carboxilato reductasa, producto del gen *PRO3* (Brandriss, 1979) en *S. cerevisiae*. Las enzimas arginasa producto del gen *CAR1*, y ornitina transaminasa producto del gen *CAR2*, las cuales participan en la conversión de arginina a glutamato semialdehido, son ambas inducibles (Middlehoven, W.1964).

Por otro lado también se han obtenido otros mutantes (tabla 5), NNatx10A22-6 y NNatx10A1-4, los cuales muestran un fenotipo deficiente en prolina. Estos mutantes requieren prolina y a diferencia de la cepa NN385A25-4, no son suplementadas con arginina, ornitina o citrulina. Estos mutantes pueden estar afectados en la reacción que lleva pirrolina-5-carboxilato a prolina en la vía de biosíntesis de prolina. En *S. cerevisiae* este paso está catalizado por el producto del gen *PRO3* (Brandriss, 1979) por lo tanto es

muy posible que las cepas NNatx10A22-6 y NNatx10A1-4 sean portadoras de un alelo *pro3* equivalente, lo que nos permite definir el locus *PRO3* en *P. rhodozyma*.

La cepa NNatx3A5-88, presenta un requerimiento de prolina, el análisis con los intermediarios metabólicos indica que esta cepa sólo crece en prolina y es incapaz de crecer en glutamato. Tampoco crece con los intermediarios de la vía de síntesis de arginina. Por lo tanto debe estar bloqueada en el gen *PRO3*. En la tabla 5 se muestran los resultados del análisis metabólico de mutantes auxótrofos que requieren arginina y prolina, suplementadas con algunos intermediarios de la ruta de biosíntesis de estos aminoácidos. En la misma tabla se indican además, los posibles genes que pueden estar afectados en cada una de estas cepas.

Los resultados obtenidos con tales mutantes, tanto a partir del análisis con los intermediarios metabólicos como aquellos generados mediante experimentos de genética parasexual, han entregado la primera evidencia concreta de que las vías de síntesis de arginina y prolina están relacionadas en *P. rhodozyma* en forma similar a lo descrito en *S. cerevisiae*. Esta relación está basada en la existencia de cepas mutantes que están dañadas en la vía de síntesis de prolina (NN385A25-4), y sin embargo pueden ser suplementadas con los intermediarios de la vía de síntesis de arginina (arginina, ornitina, citrulina...etc.). Esto puede ser debido a la presencia de vías catabólicas asociadas a arginina y ornitina, tal como ocurre en *S. cerevisiae*. En esta especie, las actividades arginasa y ornitina transaminasa son codificadas por los genes *CARI* y *CAR2* respectivamente (ver figura 12).

### Vía metabólica de biosíntesis de arginina y prolina en *S. cerevisiae*

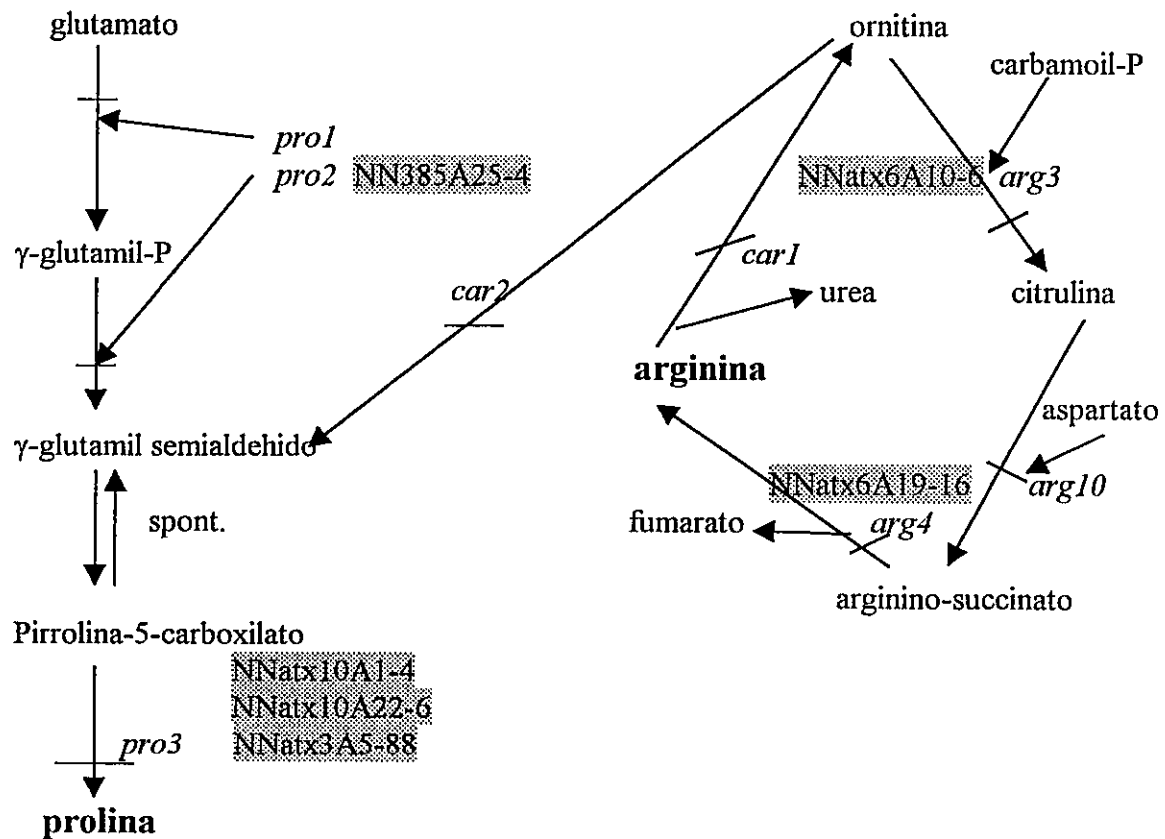


Figura 12

Esquema: vía metabólica de arginina y prolina descritas en *Saccharomyces cerevisiae*. Se observan además los genes involucrados para cada mutación.

1. *arg3*: ornitina carbamoil transferasa (Lacroute et al., 1965).
2. *arg4*: argininosuccinato liaza (Wiame, 1971; Hilger et al. 1973)
3. *arg10* (1): argininosuccinato sintetasa. (Wiame, 1971; Messenguy, 1976)
4. *car1*: arginasa (Bechet et al., 1970)
5. *car2*: ornitina transaminasa (Brandriss & Magasanik, 1980)
6. *pro1*: glutamato kinasa (Brandriss, 1979)
7. *pro2*: glutamil-P reductasa (Brandriss, 1979)
8. *pro3*: pirrolina-5-carboxilato reductasa (Brandriss, 1979)
9. Todas las cepas de *P. rhodozyma* se indican en las posiciones correspondientes a sus respectivos alelos mutantes y son parte de esta tesis (Retamales et al., 1998a).

### Análisis genético parasexual en *Phaffia rhodozyma*

Recientemente los trabajos de Golubev han permitido conocer la presencia de estructuras sexuales en esta especie, mediante medios especiales 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 viables o si tipos de apareamiento complementario son necesarios. Todo lo anterior dificulta realizar un análisis genético clásico mediante cruzamientos en *P. rhodozyma* 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. (Shepherd *et al.*, 1995). De esta manera, el análisis parasexual en *P. rhodozyma* desarrollado en nuestro laboratorio (Martínez, *et al.*, 1995; Hermosilla *et al.*, 1997; Retamales *et al.*, 1998) ha permitido conocer aspectos relevantes de su carotenogénesis mediante fusión de protoplastos. El aporte del presente trabajo en este ámbito se basa en la presencia de marcadores de auxotrofia asociados a los marcadores de carotenogénesis previamente utilizados. Estos mutantes han permitido facilitar el procedimiento de selección de fusantes y confirmar muchas de las observaciones previamente realizadas.



En el presente trabajo, el análisis genético parasexual mediante fusión de protoplastos se realizó utilizando mutantes auxótrofos derivados de cepas afectadas en la carotenogénesis obtenidas por mutagénesis de la cepa silvestre UCD-67 385 de *P. rhodozyma*. Los fusantes obtenidos, fueron sometidos a un análisis de pigmentación que permite reconocer la presencia de fusantes protótrofos cuyo fenotipo de pigmentación era parental o recombinante. Estos resultados pueden ser explicados por recombinación mitótica, pérdida de núcleos o por transferencia de material cromosómico entre núcleos. 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). 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).

Los resultados obtenidos indican que los productos no aparecen frecuentemente como colonias sectorizadas. Esto puede explicarse porque se utiliza medio mínimo como medio selectivo, produciéndose condiciones que fuerzan la formación de heterocariotes. Por el contrario, en medio completo se produce una amplia segregación de marcadores de color, los cuales pueden o no estar asociados a marcadores de auxotrofia, o bien ser recombinantes con nuevas combinaciones fenotípicas. Estos resultados revelan claramente que la naturaleza primaria de los fusantes protótrofos es la heterocariosis. Sin embargo, tampoco pueden descartarse eventos de cariogamia y posterior haploidización o

perdida de cromosomas que generen productos fusantes recombinantes. Esto último, explicaría la presencia de fusantes protótrofos de fenotipo parental en la fusión de una cepa albina *atx3* (NNatx3A5-88) que presenta una auxotrofia para prolina y una cepa amarilla *atx5* (NNatx5A17-11), que presenta una auxotrofia para adenina. En esta fusión se recuperaron fusantes protótrofos de ambos fenotipos parentales para la carotenogénesis, es decir albino y amarillo, en una proporción de 6 y 11 respectivamente, todos capaces de crecer en medio mínimo (tabla 6). Sin embargo más del 50% de los fusantes protótrofos obtenidos (21), presentan el fenotipo de pigmentación rojo naranja de la cepa silvestre y producen astaxantina como su principal pigmento carotenoide. Esto último permite inferir que los respectivos alelos silvestres para el color son dominantes sobre las mutaciones *atx3* y *atx5* (albino y amarillo respectivamente). Por otro lado estos experimentos también indican que los alelos mutantes de los marcadores de auxotrofia se comportan en forma recesiva frente a sus alelos silvestres.

La fusión entre las cepas NN385A25-4 (roja-naranja, *pro*<sup>-</sup>) y NNatx6A10-6 (amarilla, *arg*<sup>-</sup>) o NNatx6A19-16 (amarilla, *arg*<sup>-</sup>), originó 769 y 370 fusantes protótrofos de fenotipo silvestre respectivamente (tabla 7). Estos resultados indican que la complementación genética es posible entre cepas portando marcadores genéticos nutricionales y afectadas en la carotenogénesis. Además permiten establecer que el fenotipo rojo-naranja de la cepa silvestre UCD 67-385, se comporta en forma dominante sobre las mutaciones que afectan la carotenogénesis, *atx6* (amarilla), *atx5* (amarilla) y *atx3* (albina).

En la fusión entre las cepas NNatx6A10-6 (amarilla, *arg*<sup>-</sup>) y NNatx6A19-16 (amarilla, *arg*<sup>-</sup>), se obtuvieron 850 fusantes protótrofos amarillos, indicando que las mutaciones *arg*<sup>-</sup> portadas por ambas cepas son no alélicas, permitiendo la complementación y el desarrollo de fusantes capaces de crecer en medio mínimo.

La fusión de las cepas NNatx3A5-88 (albino, *pro*<sup>-</sup>) y NN385A3-15 (roja, *ilv*<sup>-</sup>), originó fusantes protótrofos de ambos fenotipos. Sin embargo la proporción de colonias fusantes de fenotipo silvestre fue 4 veces mayor. Esto sugiere un efecto de dominancia del alelo silvestre sobre los alelos mutantes. La presencia de colonias fusantes de fenotipo albino parental podría ser explicada por un evento de recombinación mitótica, permutación cromosómica, pérdida de cromosomas o segregación nuclear. Esto último se esperaba en el caso de que los productos de fusión fueran en su mayoría de origen heterocariótico.

En la mayoría de los casos, las colonias protótrofas con fenotipo de pigmentación silvestre, segregaron fenotipos parentales en medio no selectivo durante el periodo de estudio, mostrando ser inestables fenotípicamente. En relación con esto último, la cepa fusante protótrofa de fenotipo rojo-naranja, Fs15, derivada de la fusión *atx5*; *ade*<sup>-</sup>: *atx3*; *pro*<sup>-</sup> mostró una frecuencia de segregación de colonias blancas y amarillas en medio YM (sin presión selectiva) de  $5,0 \times 10^{-3}$  y  $5,4 \times 10^{-4}$  respectivamente. La presencia de fusantes estables e inestables permite evidenciar eventos tanto de heterocariosis como de cariogamia. Esto ya ha sido confirmado por la presencia de más de un núcleo mediante tinción con DAPI (Hermosilla, 1997).

Los resultados de experimentos de fusión entre 3 cepas que utilizan arginina, indican que todas ellas pueden formar fusantes protótrofos estables (tabla 7). Esto indica que se trata de cepas portadoras de mutaciones no alélicas. El análisis mediante la utilización de los intermediarios de la vía de síntesis de arginina y prolina confirma este resultado, al comprobarse que las distintas cepas utilizan distintos precursores metabólicos. Además se han determinado los posibles genes involucrados en estos mutantes auxótrofos (tabla 5). La cepa NN385A25-4 utiliza arginina, prolina, ornitina y citrulina, sin embargo el análisis con precursores metabólicos y comparaciones con las vías metabólicas descritas para *S. cerevisiae*, han permitido determinar que se encuentra bloqueada en la vía de síntesis de prolina. La cepa NNatx6A10-6 utiliza arginina y citrulina, mientras que la cepa NNatx6A19-16, utiliza arginina como único suplemento (tabla 5). Este resultado permite definir dos grupos de complementación entre mutantes auxótrofos que requieren arginina, a los cuales definiremos como grupo de complementación A y B respectivamente. Estos experimentos de fusión han permitido evidenciar un efecto de dominancia del alelo silvestre sobre la mutación que afecta a la cepa atx6. Esto se observa en la tabla 8 donde todos los fusantes protótrofos derivados de la fusión entre cepas auxótrofas de la cepa silvestre y la cepa amarilla, atx6, presentan un fenotipo rojo naranja, propio de la cepa silvestre.

## Determinación de grupos de complementación

Experimentos de fusión de protoplastos entre cepas que requieren adenina, obtenidas en eventos de mutagénesis independientes, han mostrado la incapacidad de generar fusantes protótrofos estables (tabla 8). Se han fusionado protoplastos de las cepas *ade*- NNatx5A17-11, NNatx3A6-14 y NNatx10A17-23, obtenidas por mutagénesis a partir de las cepas Atx5, Atx3 y Atx10, de fenotipos amarillo, albino y amarillo pálido respectivamente. Ninguna de las combinaciones de fusiones entre estas cepas ha formado fusantes protótrofos, indicando que se trata de cepas afectadas en el mismo gen. Sin embargo, todas ellas han generado fusantes estables al ser fusionadas con la cepa NNatx3A5-88 de fenotipo albino que presenta un requerimiento de prolina. Esta última se ha utilizado como un control para determinar la eficiencia de formación y regeneración de los protoplastos. La fusión entre las cepas NNatx5A17-11 de fenotipo amarillo, *ade*<sup>-</sup> y la cepa NNatx3A5-88 de fenotipo albino, *pro*<sup>-</sup> ha confirmado nuevamente los resultados de la tabla 6, generando fusantes protótrofos estables de fenotipo silvestre (rojo naranja). También ha confirmado la segregación de fenotipos de color en algunos fusantes, al obtener segregantes protótrofos de fenotipo correspondiente a ambos parentales (tabla 8).

La fusión entre protoplastos de las cepas NNatx3A6-14 (albino, *ade*<sup>-</sup>) y NNatx3A5-88 (albino, *pro*<sup>-</sup>), ha generado fusantes protótrofos, todos de fenotipo albino (tabla 8). Esto último resulta lógico, ya que ambas cepas se han originado por mutagénesis de la cepa *atx3* de fenotipo albino. Esto significa que dichas cepas han

complementado sus respectivas mutaciones auxótrofas, pero al llevar el mismo alelo *atx3* son incapaces de complementar para color. Adicionalmente, los resultados de experimentos de fusión entre protoplastos de las cepas NNatx10A17-23 (amarilla, *ade*<sup>-</sup>) y NNatx3A5-88 (albina, *pro*<sup>-</sup>) ha generado un total de 32 fusantes protótrofos, 17 de los cuales presentan un fenotipo silvestre. Esto indica la capacidad de complementación de las respectivas mutaciones que afectan a la carotenogénesis, sugiriendo que afectan a genes diferentes y entrega evidencia de que los alelos mutantes *atx10* y *atx3*, se comportan en forma recesiva frente a sus respectivos alelos silvestres.

Las cepas NNatx10A1-4 (amarilla, *pro*<sup>-</sup>), NNatx10A22-6 (amarilla, *pro*<sup>-</sup>) y NNatx3A5-88 (albina, *pro*<sup>-</sup>), sólo requieren prolina para crecer en medio mínimo (tabla 5). Análisis metabólicos han permitido inferir un bloqueo en la enzima pirrolina-5-carboxilato reductasa en las tres cepas. En *S. cerevisiae*, este paso es catalizado por el producto del gen *PRO3* (Brandriss, 1979). Los resultados de experimentos de fusión de protoplastos entre estas cepas auxótrofas que requieren prolina como único suplemento se encuentran en la tabla 9. La fusión entre protoplastos de las cepas NNatx10A1-4 (amarilla, *pro*<sup>-</sup>) y NNatx3A5-88 (albina, *pro*<sup>-</sup>), produjo 7 fusantes protótrofos, de los cuales 3 son de fenotipo rojo silvestre. Estos resultados, tanto en las mutaciones que afectan a la carotenogénesis, como a aquellas que afectan la auxotrofia, claramente permiten definir al menos dos grupos de complementación entre los mutantes que requieren prolina. Las dos cepas *pro*<sup>-</sup> antes mencionadas generan fusantes estables cuando son fusionadas con protoplastos de la cepa control, NNatx5A17-11 (amarilla,

*ade*), lo cual da cuenta de un buen procedimiento de fusión y regeneración de protoplastos (tabla 9).

Por otra parte, la fusión entre protoplastos de las cepas NNatx10A22-6 (amarilla, *pro*<sup>-</sup>) y NNatx3A5-88 (albina, *pro*<sup>-</sup>), no generó fusantes protótrofos (tabla 9). Considerando que en el mismo experimento, estas cepas generaron fusantes al ser fusionadas con la cepa control, se puede afirmar que la ausencia de colonias en las placas de medio mínimo no es debida a problemas de formación o regeneración de protoplastos, y tampoco a errores en el procedimiento de fusión. Este resultado se podría interpretar suponiendo que ambas mutaciones *pro*<sup>-</sup> son alélicas, en términos de que poseen afectado el mismo gen que controla uno de los pasos de la vía de biosíntesis de prolina. Esto significa que comparten el mismo grupo de complementación.

Al fusionar las cepas que requieren prolina, NNatx10A1-4 y NNatx10A22-6, ha sido posible generar 2 fusantes protótrofos de fenotipo amarillo. Esto último resulta lógico si se considera que ambas cepas auxótrofas derivan por mutagénesis de la cepa atx10 de fenotipo amarillo, lo cual no permite complementación de la carotenogénesis. Sin embargo, sugiere un evento de complementación de sus mutaciones auxótrofas. Es posible en este último caso que estemos en presencia de revertantes debido a la baja frecuencia de fusión,  $7,0 \times 10^{-6}$  (tabla 9). La cepa NNatx10A1-4 (amarilla, *pro*<sup>-</sup>) presenta una frecuencia de reversión menor a  $8,5 \times 10^{-8}$ , sin embargo la frecuencia de reversión de la cepa NNatx10A22-6 (amarilla, *pro*<sup>-</sup>) no ha sido determinada. Es posible que esta última este generando un mayor número de revertantes que de cuenta de las 2 colonias obtenidas en la fusión. Sin embargo, es posible que las cepas NNatx10A1-4 y

NNatx10A22-6, presenten mutaciones que estén afectando el mismo gen (posiblemente *pro3*), pero en distintos puntos. Esto, daría la oportunidad de explicar la baja frecuencia de fusión, entendiéndola como una frecuencia de recombinación intragénica, que se presenta con una baja probabilidad. Esto último, debido a que la sola formación del heterocarión no permite la generación de eventos de recombinación genética, para ello sería necesaria la cariogamia o el intercambio de cromosomas, eventos que se presentan en muy baja frecuencia en hongos.

Por otro lado es posible observar que las fusiones entre protoplastos de las cepas de fenotipo amarillo, NNatx10A1-4 (amarillo, *pro*<sup>-</sup>) con NNatx5A17-11 (amarilla, *ade*<sup>-</sup>) y NNatx10A22-6 (amarillo, *pro*<sup>-</sup>) con NNatx5A17-11(amarillo, *ade*<sup>-</sup>) han generado 28 y 29 fusantes protótrofos respectivamente, todos ellos de fenotipo amarillo (tabla 9). No fue posible obtener fusantes protótrofos de fenotipo silvestre en ninguno de los experimentos de fusión de protoplastos entre mutantes auxótrofos derivados de las cepas *atx5* y *atx10*. Esto último sugiere la presencia de una relación de alelismo entre las mutaciones *atx5* y *atx10* de ambas cepas, es decir *atx10* y *atx5* son mutaciones que afectan a un mismo gen, el cual determina la acumulación de  $\beta$ -caroteno, el fenotipo de pigmentación amarillo y no son capaces de generar fusantes protótrofos de fenotipo silvestre.

En resumen, es posible definir al menos un grupo de complementación entre las diferentes cepas mutantes NNatx5A17-11, NNatx3A6-14 y NNatx10A17-23. Las cuales han sido obtenidas de mutagénesis independientes partir de distintas cepas parentales afectadas en la carotenogénesis. Tales mutaciones *ade*<sup>-</sup> no complementan entre sí, al ser sometidas a experimentos de fusión de protoplastos, entregando evidencias de alelismo,



es decir, están afectando al mismo gen.

Por otro lado, en mutantes que requieren arginina ha sido posible definir al menos dos grupos de complementación. Estos resultados obtenidos mediante experimentos de fusión de protoplastos, han sido confirmados mediante el análisis metabólico utilizando los intermediarios de la vía de síntesis de arginina. Tales grupos de complementación han sido definidos como *argA* y *argB*, y están representados por las cepas NNatx6A19-16 y NNatx6A10-6 respectivamente. Adicionalmente la cepa NNatx6A10-6 nos permite definir el gen *ARG3* de la ruta de biosíntesis de arginina en *P. rhodozyma*, siendo esta cepa portadora de un alelo *arg3*, este gen codificaría por la enzima ornitina carbamoil sintetasa y estaría controlando el paso entre ornitina y citrulina (ver figura 12), siguiendo la nomenclatura descrita para *S. cerevisiae* (Lacroute *et al.*, 1965).

Por otro lado, el análisis genético parasexual ha permitido definir tres grupos de complementación entre cuatro cepas auxótrofas para prolina, las cuales han sido designadas como A, B y C. En primer lugar la cepa NN385A25-4 en el grupo de complementación A, en segundo lugar, las cepas NNatx10A22-6 y NNatx3A5-88, en el grupo de complementación B y finalmente la cepa NNatx10A1-4 en el grupo de complementación C. Análisis de suplementación, utilizando intermediarios de la vía de síntesis de prolina, han permitido definir que el grupo de complementación B sería portador de una mutación *pro3*, según la nomenclatura descrita para *S. cerevisiae* (Brandriss, 1979). Mientras que el grupo de complementación A puede ser portador de una mutación *pro1* o *pro2*.

### Formación de estructuras sexuales en *P. rhodozyma*.

Pese a que inicialmente se observó en nuestro laboratorio que en fusantes de fenotipo silvestre de *P. rhodozyma*, se formaban estructuras sexuales del tipo holobasidios con basidiosporas terminales, del mismo tipo que ha sido descrito por Golubev (Golubev., 1995), los resultados sugieren que la fusión de protoplastos no es prerequisite para la esporulación. Sin embargo, es posible observar que colonias fusantes presentan un mayor número de estructuras sexuales que sus parentales.

En nuestro laboratorio, ha sido posible observar que diferentes cepas de *P. rhodozyma*, afectadas en la carotenogénesis y obtenidas en eventos de mutagénesis independientes, muestran diferencias en la producción de holobasidios. La cepa atx5 de coloración amarilla debido a que acumula  $\beta$ -caroteno produce el mayor número de holobasidios, mientras que la cepa atx3 de coloración albina debido a la acumulación de fitoeno produce menos holobasidios que la cepa silvestre UCD 67-385. Además se ha obtenido una cepa incapaz de desarrollar holobasidios en todas las condiciones estudiadas, esta cepa de coloración pálida ha sido denominada atx11,hol<sup>-</sup>. Estos hallazgos pueden confirmar la idea de que los pigmentos carotenoides jugarían un papel importante en la fisiología de la diferenciación sexual, la evidencia principal ha sido generada en *Phycomyces*, un género formado por hongos filamentosos saprófitos, donde la conducta sexual ha sido operacionalmente definida como un conjunto de respuestas a estímulos ambientales. En estos organismos el papel de los pigmentos carotenoides ha sido asociado a la respuesta a la luz. Muchos mutantes *car* (incapaces de sintetizar  $\beta$ -

caroteno) en *Phycomyces*, difieren de la cepa silvestre en el número de macroforos y microforos que producen en oscuridad. Se ha propuesto que la forogénesis sería influenciada por la cantidad de  $\beta$ -caroteno presente en la célula (Corrochano, *et al.* 1992). Por otro lado, hay una relación bioquímica directa entre  $\beta$ -caroteno y la morfogénesis sexual; Ácidos trisporicos y hormonas sexuales en hongos filamentosos (mucorales), incluyendo *Phycomyces*, derivan desde  $\beta$ -caroteno. Además, mutantes incapaces de producir  $\beta$ -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).

#### Efecto ambiental en la formación de estructuras sexuales en *P. rhodozyma*.

Uno de los factores primarios en el estudio de la morfogénesis sexual, es definir el medio de esporulación. En *P. rhodozyma*, placas con medio mínimo, MMv-agar han resultado óptimas para inducir la esporulación. Este medio contiene además una solución que posee algunas sales minerales, biotina, elementos traza y unas pocas vitaminas. En placas con medio YM que define un medio completo, rico en nutrientes, no fue posible inducir esporulación. Además en ningún tipo de medio líquido ha sido posible observar la fase sexual. Tales antecedentes revelan que el tipo de medio es esencial para definir las condiciones de esporulación en *P. rhodozyma*. Por otro lado placas MMv suplementadas con adenina (figura 5) no han permitido generar estructuras sexuales, esto puede ser

explicado en términos de la utilización de la base nitrogenada como recurso de nitrógeno por células de *P. rhodozyma*. La utilización de pirimidinas exógenas como recurso de nitrógeno, ha sido reportada en la levadura *Rhodotorula glutinis*. (Milstein & Bekker, 1976).

### Efecto de la temperatura

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 *P. rhodozyma*, el intervalo comprende temperaturas entre 4 a 10°C con un óptimo a 9°C. (figura 9). Esto permite comprobar que el rango de temperaturas que permite la esporulación es normalmente más estrecho que la que permite el crecimiento que en *P. rhodozyma* esta entre 16 y 24°C.

En atención a esto, podemos suponer que la fase sexual de *P. rhodozyma* se ha adaptado para sobrevivir a un medio caracterizado por un invierno donde predominan bajas temperaturas, lo cual 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 en 1995.

## Efecto del recurso de nitrógeno

En hongos y levaduras, la concentración de nitrógeno en el medio es un factor de gran importancia en la esporulación. La concentración óptima debe ser determinada bajo condiciones específicas. En general altas concentraciones de nitrógeno suprimen la esporulación. En relación a esto, se ha determinado el efecto del nitrato de amonio como recurso de nitrógeno. Los resultados sugieren que concentraciones entre 18 y 38 mM permiten la esporulación en *P. rhodozyma*, con un óptimo a 28 mM (figura 7). Tales resultados han sido confirmados al determinar que concentraciones de cloruro de amonio como recurso de nitrógeno, superiores a 25 mM, también inhiben significativamente la esporulación. En el hongo basidiomicete *Phanerochaete chrysosporium*, se ha observado que el amonio conduce a una interferencia con el sistema enzimático lignolítico (Keyser P. et al. 1978). Se ha propuesto que el amonio, puede inducir cambios en el ámbito de una serie de eventos fisiológicos asociados al metabolismo secundario. En otros estudios, en *Coprinus cinereus*, se ha mostrado que el ion amonio y la glutamina, interfieren con la diferenciación de los meiocitos, además, dependiendo del estado y tiempo de exposición del inhibidor, pueden encontrarse esporas parcialmente desarrolladas o anormales (Chiu, S. and Moore, D., 1988) Se han reportado efectos similares en otros organismos, principalmente hongos, lo cual puede implicar que los eventos de esporulación son generalmente sensibles a la inhibición por el ion amonio (Chiu, S. and Moore, D., 1988).

### Efecto de la fuente de carbono

Westergaard y Mitchell en 1947, investigaron entre otros factores, la influencia de la proporción carbono-nitrógeno del medio sobre la formación de peritecios en *Neurospora crassa*. Estos estudios permitieron determinar las condiciones óptimas, 0,1% de  $\text{KNO}_3$  y 1,8 % de glucosa, para la esporulación en *N. crassa*. Es evidente que altas concentraciones de glucosa y nitrato de amonio resultan desfavorables para la esporulación.

En *P. rhodozyma*, se observa producción de estructuras sexuales en placas con concentraciones entre 50 y 200 mM de glucosa. Sin embargo la concentración óptima esta en un rango estrecho entre 80 y 100 mM de glucosa (figura 8). Con concentraciones menores a 30 mM y mayores de 200mM de glucosa, se observa un pequeño tamaño de las colonias, indicando que concentraciones extremas del recurso de carbono pueden estar afectando el crecimiento celular y el desarrollo de las colonias.

### Efecto de la fusión de protoplastos sobre la esporulación en *Phaffia rhodozyma*.

Como ha sido descrito en este trabajo, la producción de estructuras sexuales en cepas fusantes de *P. rhodozyma* fue mayor que la presentada en los parentales utilizados en la fusión. También se ha encontrado que los segregantes de color obtenidos en los experimentos de fusión de protoplastos muestran un número más bajo de holobasidios que el presentado por las cepas fusantes protótrofas de fenotipo silvestre. Estos

resultados pueden sugerir la presencia de determinantes genéticos que regulan la producción de holobasidios en *P. rhodozyma*, tales determinantes segregarían en forma independiente de los marcadores de color y experimentarían recombinación mitótica, lo cual permitiría explicar la presencia de algunos fusantes que presentan un bajo número de estructuras sexuales. En la fusión de protoplastos entre las cepas dobles mutantes atx3,pro- y atx5,ade- los fusantes mostraron un incremento en el número de holobasidios comparado con las cepas parentales (tabla 10). Este hecho también fue observado en fusantes derivados de la fusión de protoplastos entre las cepas ilv- y atx3,pro-, ello sugiere que la fusión de protoplastos puede tener un efecto inductivo sobre el ciclo reproductivo sexual de *P. rhodozyma* (Retamales *et al* 1998b).

Por otro lado, se ha obtenido una nueva cepa, atx11, incapaz de producir holobasidios (*hol-*). Este fenotipo fue mantenido aún después de varias replicas sobre medio YM y posterior transferencia a medio mínimo de esporulación. Este hecho sugiere la existencia de determinantes genéticos en la formación de holobasidios en *Phaffia rhodozyma*. También se ha observado que segregantes protótrofos muestran un menor número de holobasidios que los fusantes (segregantes S9 y S18 en tabla 10). Tales resultados sugieren que los determinantes genéticos que controlan la producción de estructuras sexuales no están asociados a las mutaciones *atx3* o *atx5*, pudiendo ser posible la existencia de un gen controlador de la esporulación en *P. rhodozyma*. Esto último, indudablemente, puede ser una poderosa herramienta para facilitar la manipulación de cruzamientos y análisis genéticos en *P. rhodozyma*.

## CONCLUSIONES

- 1.- Existe un fuerte componente ambiental en la inducción de la fase sexual del ciclo reproductivo de *P. rhodozyma*, encontrándose que la temperatura de inducción óptima corresponde a los 9 °C. La concentración óptima de glucosa como fuente de carbono esta entre 80 y 100 mM, mientras que la concentración óptima de nitrato de amonio como recurso de nitrógeno corresponde a 25 mM.
- 2.- La fusión de protoplastos no es requisito para inducir la formación de estructuras sexuales en *P. rhodozyma*. Sin embargo, cepas fusantes presentan un número mayor de estructuras sexuales que sus parentales.
- 3.- Existe una inhibición de la esporulación en *Phaffia rhodozyma* en medio completo YM y en medio mínimo conteniendo adenina (inhibición por nutrientes).
- 4.- La presencia de microcolonias formadas por yemación de una o más de las basidiosporas permite sugerir una posibilidad concreta de la viabilidad de las basidiosporas.



- 5.- Pueden existir determinantes genéticos asociados al fenotipo de formación de estructuras sexuales, que eventualmente pueden segregarse por recombinación o intercambio de cromosomas, lo cual permitiría explicar la presencia de fusantes que producen bajo número de estructuras sexuales.
- 6.- El análisis de complementación de mutantes de auxotrofia y afectados en la carotenogénesis mediante la fusión de protoplastos, indica relaciones de dominancia de los alelos silvestres sobre los alelos mutantes generados en el presente estudio.
- 7.- Se ha logrado obtener una serie de mutantes auxótrofos, en algunos de los cuales han sido identificados los posibles genes afectados, permitiendo aportar al conocimiento de algunas rutas metabólicas y al conocimiento bioquímico de *P. rhodozyma*.
- 8.- El espectro restringido de mutantes auxótrofos obtenidos sugiere la existencia de zonas sensibles (puntos calientes) en el genoma de *P. rhodozyma*, lo cual sugiere la presencia de zonas de heterocigosidad natural de acuerdo a la hipótesis de diploidía.
- 9.- El análisis de complementación y alelismo es posible en *P. rhodozyma*, mediante fusión de protoplastos de mutantes afectados en carotenogénesis y auxotrofia.

## PROYECCIONES

El análisis genético mediante recombinación meiótica en eucariontes, principalmente hongos y levaduras, se ha desarrollado en especies de fácil manejo experimental, que presentan una fase sexual conocida y donde ha sido posible obtener una amplia gama de marcadores genéticos. Todo lo anterior, ha permitido la aplicación de técnicas clásicas de análisis. En estas especies, ha sido posible inferir relaciones de ligamiento entre marcadores, determinar complementación y construir mapas genéticos basados en recombinación y segregación de marcadores en los productos meióticos. Sin embargo, debido a la carencia de conocimientos de la fase sexual en el ciclo reproductivo de muchas especies, se han debido implementar técnicas de análisis genético parasexual. En este sentido, la levadura *P. rhodozyma*, puede ser un buen modelo de estudio ya que su sistema de análisis genético parasexual se ha desarrollado extensivamente, principalmente debido al desarrollo de técnicas de fusión de protoplastos y a la caracterización de una serie de dobles mutantes, de auxotrofia y afectados en la carotenogénesis (Adrio, *et al.*, 1993; Retamales, *et al.*, 1998).

El estudio genético parasexual realizado en esta tesis, ha permitido definir relaciones de complementación y alelismo entre una serie de mutantes afectados en carotenogénesis. Además, el análisis de complementación entre mutantes auxótrofos afectados en el mismo requerimiento, ha permitido definir grupos de complementación,

los cuales han sido confirmados por estudios de suplementación con los intermediarios de las vías de síntesis que afectan a estos mutantes.

Los mutantes generados en esta tesis, podrán ser utilizados en estudiar aspectos bioquímicos y del control genético del metabolismo de *P. rhodozyma*. También, podrán utilizarse como marcadores genéticos que faciliten el procedimiento de selección de transformantes en experimentos de transformación, permitiendo el clonamiento de genes involucrados en la carotenogénesis. La obtención de cepas afectadas en carotenogénesis y portadoras de mutaciones de auxotrofia, puede proyectarse a 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. Además, la caracterización de tales cepas permitirá la construcción de vectores de clonado y la subsecuente proyección en el campo de la genética molecular. Por otro lado, servirán como marcadores en estudios de recombinación tendientes a establecer grupos de ligamiento y grupos genéticos, mediante disección genética que involucren el análisis meiótico y de segregación en las basidiosporas. Esto último tiene gran relevancia si consideramos la reciente descripción de la fase sexual en *P. rhodozyma* (Golubev, 1995).

Por otra parte, en el presente trabajo se han determinado las condiciones ambientales que permiten el desarrollo de estructuras sexuales en *P. rhodozyma*. Esto, facilitará enormemente el estudio de la fase sexual de su ciclo reproductivo, en términos de la facilidad de inducción de holobasidios con basidiosporas sin la necesidad de utilizar medios conteniendo polioles. Las basidiosporas podrán ser obtenidas mediante técnicas de micromanipulación u obtención al azar y posteriormente estudiadas en

términos de recombinación meiótica y segregación de marcadores genéticos. La posibilidad de inducir la fase sexual en fusantes protótrofos de *P. rhodozyma*, como ha sido descrito en este trabajo, representa una herramienta de análisis poderosa que debe ser desarrollada. Para ello es necesario realizar estudios que permitan conocer las condiciones de descarga, diseminación y germinación de las basidiosporas, esto facilitará el análisis genético y ampliará el conocimiento de la fisiología reproductiva de *P. rhodozyma*. Por otra parte, la descripción de un mutante incapaz de esporular y la posibilidad de obtener otros mutantes que afecten el desarrollo de estructuras sexuales, representa una oportunidad inmejorable para clonar los genes que participan en la formación de estructuras sexuales en *P. rhodozyma*.

Nuestro sistema de estudio, representa un modelo potencial para el estudio de la diferenciación celular y la regulación genética durante la esporulación.

## 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 <sub>2</sub> O	75.0 g/lt
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> anhidro	125.0 g/lt
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> anhidro	50.0 g/lt
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	5.0 g/lt
CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> 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.
- Bechet, J., Grenson, M. and Wiame, J. 1970. Mutations affecting the repressibility of arginine biosynthetic enzymes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* **12**: 31
- Begueret, J., Treq, B. and Clave, C. 1994. Vegetative incompatibility in filamentous fungi : het genes begin to talk. *Trends Genet.* **10** : 441- 446.
- Brandriss, M. 1979. Isolation and preliminary characterization of *Saccharomyces cerevisiae* proline auxotrophs. *J. Bacteriol.* **138**: 816.
- Brandriss, M. and Magasanik, B. 1980. Proline: An essential intermediate in arginine degradation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **143**: 1403.

- Caldwell, G., Naider, 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., Siero, 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.
- Chiu, SW., Moore, D. 1988.** Ammonium ions and glutamine inhibit sporulation of *Coprinus Cinereus* basidia assayed in vitro. *Cell. Biol Int. Rep.* **12** : 7.
- 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., and A. Jiménez. 1997.** Genetics and electrophoretic Kariyotyping of wild type and astaxanthin mutant strain of *Phaffia rhodozyma*. *Antonie Van Leeuwenhoek.* En prensa.
- Cook, K. Regulation of aromatic metabolism in fungi: Selection of mutants of the yeast *Rhodotorula mucilaginosa* whit nystatin. 1974..** *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.)

- Evelyne, C., Debuchy, R., Arnaise, 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.  $\beta$ -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.
- Griffiths, A., Miller, J., Suzuki, D., Lewontin, R. and Gelbart, W. 1996. An Introduction to Genetic Analysis. Sixth Edition. W. H. Freeman and Company. New York. U.S.A.
- Haard, N. 1988. Astaxanthin formation by the yeast *Phaffia rhodozyma* on molasses. *Biotechnol. Lett.* **10**: 609-614.
- Herbert, A., Allaudeen, H., Whitman, M., Koltin, Y. and Gorman, J. 1988. Isolation and characterization of a  $\beta$ -tubulin gene from *Candida albicans*. *Gene* **63**: 53-63.
- 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.

- Hilger, F., Culot, M., Piérard, A., Grenson, M. and Wiame, J. 1973. Studies on the Kinetics of the enzyme sequence mediating arginine synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Gen. Microbiol. 75: 33.
- 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.
- Johnson, E., Villa, T., Lewis, M. and Phaff, H. 1978. Simple method for the isolation astaxanthin from the basidiomycetous yeast *Phaffia rhodozyma*. Appl. Environ. Microbiol. 35: 1155-1159.
- Kakar, S. and Magee, P. 1982. Genetic analysis of *Candida albicans*: Identification of different isoleucine-valine, methionine and arginine alleles by complementation. J. Bacteriol. 151: 1247-1252.
- Kakar, S., Partridge, R. and Magee, P. 1983. A genetic analysis of *Candida albicans*: isolation of a wide variety of auxotrophs and demonstration of linkage and complementation. Genetics 104: 241-255.
- Keyser, P., Kirk, T. and Zeikus, J. 1978. Ligninolytic enzyme system of *Phanaerochaete chrysosporium*: Synthesized in the absence of lignin in response to nitrogen starvation. J. Bacteriol. 135: 3-7
- Klebs, G. 1900. Jahrb. wiss. Botan. 35: 80-203.
- Kurtz, M., Cortelyou, M. and Kirsch, D. 1986. Integrative transformation of *Candida albicans*, using a cloned *Candida ADE2* gene. Mol. Cell. Biol. 6: 142-149.
- Kurtz, M., Kirsch, D. and Kelly, R. 1988. The molecular genetics of *Candida albicans*. Microbiol. Sci. 5: 58-63.
- Lacroute, F., Piérard, A., Grenson, M. and Wiame, J. 1965. The biosynthesis of carbamoyl phosphate in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Gen. Microbiol. 40: 127.

- León, R., Hermosilla, G., Martínez, C. y Cifuentes, V. 1995. Mutagénesis en *Phaffia rhodozyma*. Acta Microbiol. 5: 93-101.
- 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.
- 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. 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., Urzúa, B. y Cifuentes, V. 1994. Presencia de plásmidos de DNA de doble hebra en *Phaffia rhodozyma*. Bol. Micol. 9: 25-30.
- Matthew, L. Springer. 1993. Genetic control of fungal differentiation: The three sporulation pathways of *Neurospora crassa*. BioEssay. 15: 365-374.
- Messenguy, F. 1976. Regulation of arginine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*: Isolation of a cis-dominant, constitutive mutant for ornithine carbamoyltransferase synthesis. J. Bacteriol. 128: 49.
- 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.

- Meyer, P., Du Preez, J. and Van Dyk, M. 1994. The effect of monoterpenes on astaxanthin production by a mutant of *Phaffia rhodozyma*. *Biotechnol. Lett.* **16**: 125-128.
- Middelhoven, W, 1964. The Pathway of arginine breakdown in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta* **93**: 650.
- Milstein, O. and Bekker L. 1976. Utilization of exogenous pyrimidines as a source of nitrogen by cells of the yeast *Rhodotorula glutinis*. *J. Bacteriol.* **127**: 1-6.
- Miller, M., Yoneyama, M. and Soneda, M. 1976. *Phaffia*, New yeast genus in the *Deuteromycotina* (*Blastomycetes*). *Int. J. Syst. Bacteriol.* **26**: 286-291.
- Nagy, A., Garamszegi, N., Vágvölgyi, C. and Ferenczy, L. 1994. Electrophoretic karyotypes of *Phaffia rhodozyma* strains. *FEMS Microbiol. Lett.* **123**: 315-318.
- 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.
- Pincheira, G. 1996. Genes and Sex. Science essay. The World. Nov. 1996. Vol: 11 N°11. pag: 178-183.
- Pomés, R., Concepción, G. and César, N. 1985. Genetic analysis of *Candida albicans* morphological mutants. *J. Gen. Microbiol.* **131**: 2107-2113.

- 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. New genetic Markers in *Phaffia rhodozyma*. Genetic complementation analysis. *Antonie van Leeuwenhoek*. (en prensa).
- Retamales, P., Hermosilla, G., León, R., Martínez, C. and Cifuentes, V. 1998b. Induction of sexual reproductive cycle of *Phaffia rhodozyma*. Enviado a *J. Bacteriol.*
- 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.
- Sambrook, J., Fritsch, E. and Maniatis, T. 1989. Molecular cloning: A laboratory manual. Second 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.
- 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.
- Snow, R. 1966. An enrichment method for auxotrophic yeast mutants using the antibiotic 'nystatin'. *Nature* **21**: 206-207.
- 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.
- Vogel, H.J. 1956. A convenient growth medium for *Neurospora* (medium N). *Microbiol. Genet. Bull.* **13** : 42-43.
- 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.
- 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
- 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.