

UCH-FC
MAD-□
OSI

C1

**Estudio de la capacidad
fotorreactivante en *Oocystis* sp
(Clorofita).**

Tesis

Entregada a la Universidad de Chile en
cumplimiento parcial de los requisitos para
optar al grado de Magister en Ciencias
Biológicas mención en Genética
Facultad de Ciencias

por

Maria Isabel Olmedo Castro



Director de tesis: Prof. Sergio Cabrera Silva
Co-Director: Dra. Margarita Carú Marambio

1995

**FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE**

**INFORME DE APROBACION
TESIS DE MAGISTER**

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Magister presentada por el candidato:

María Isabel Olmedo Castro

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito de Tesis para optar al grado de Magister en Ciencias Biológicas mención Genética, en el examen de defensa de Tesis rendido el 21 de Diciembre de 1994.

Director de Tesis:
Prof. Sergio Cabrera Silva.



Co-Director de Tesis:
Dra. Margarita Carú Marambio

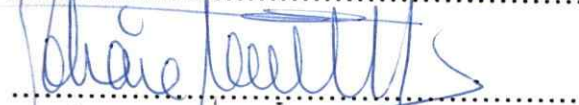


Comisión Informante de Tesis:

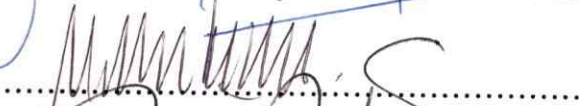
Dra. Liliana Cardemil



Quim. Farc. Eliana Canelo



Prof. Vivian Montecino



Dr. Raúl Morales



*Con todo mi amor a mis padres,
hermanas y especialmente a mi amigo,
compañero y esposo Claudio.*

AGRADECIMIENTOS

Este tesis fue terminada gracias a la colaboración de muchas personas entre las cuales debo destacar en primer lugar a mis tutores, el Profesor Sergio Cabrera y la Dra. Margarita Carú por su dedicación y sus comentarios.

También fue de mucha importancia la ayuda brindada por el Laboratorio de Genética de la Facultad de Ciencias, en especial al Dr. Victor Cifuentes por su generosidad y apoyo continuo durante toda mi etapa de estudiante pero especialmente por su amistad.

Al laboratorio donde realice todos los experimentos, a mi "casa" durante casi 3 años, dirigido por la Profesora Vivian Montecino la cual fue una gran maestra, discutió conmigo cada avance o retroceso de los experimentos y me acogió como una de sus tesistas, por su amistad y su gran entusiasmo, así como a Ximena, Gemita y Ginger quienes siempre estuvieron dispuestas a ayudar en todo lo que fuese necesario.

INDICE DE MATERIAS

	página
AGRADECIMIENTOS.....	iii
INDICE.....	iv
LISTA DE FIGURAS.....	vi
LISTA DE TABLAS.....	ix
LISTA DE ABREVIATURAS.....	x
RESUMEN.....	xi
ABSTRACT.....	xiii
INTRODUCCIÓN.....	1
HIPOTESIS.....	8
OBJETIVO GENERAL.....	8
OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	9
MATERIALES Y METODOS.....	10
1 Aislamiento y cultivo de <i>Oocystis</i> sp.....	10
2 Curva de crecimiento.....	11
3 Fotorreactivación.....	14

4 Aislación de mutantes.....	16
5 Exposiciones dosificadas a RUV-B.....	18
6 Estadísticos.....	22
RESULTADOS.....	23
1 Identificación y caracterización de la cepa silvestre.....	23
2 Caracterización de los mutantes MN18 y MN42.....	29
3 Comparación de la capacidad fotorreactivante entre la cepa silvestre y los mutantes MN18 y MN42.....	34
4 Caracterización de los clones UB3 y UB5.....	38
5 Comparación de la capacidad fotorreactivante entre la cepa silvestre y los clones UB3 y UB5.....	44
DISCUSIÓN.....	47
PROYECCIONES.....	55
CONCLUSIONES.....	58
BIBLIOGRAFIA.....	59

LISTA DE FIGURAS

	página
Fig.1: Espectro de transmitancia del poliestireno	13
Fig.2: Espectro de transmitancia de filtro amarillo	15
Fig.3: Aislamiento de mutantes	17
Fig.4: Espectro de transmitancia micas	20
Fig.5: Protocolo de dosificación de RUV-B	21
Fig.6: Curva de crecimiento de la cepa silvestre.....	26
Fig.7: Sobrevida de células de la cepa silvestre irradiadas con RUV-B.....	27

Fig.8: Sobrevida de células de la cepa silvestre irradiadas con RUV-C.....	28
Fig.9: Curva de crecimiento de los mutantes MN18 y MN42.....	31
Fig.10: Sobrevida de los mutantes MN18 y MN42 irradiados con UV-B...	32
Fig.11: Sobrevida de los mutantes MN18 y MN42 irradiados con UV-C...	33
Fig.12: Comparación de las curvas de sobrevida con RUV-B de la cepa silvestre y el mutante MN18.....	36
Fig.13: Comparación de las curvas de sobrevida con RUV-B de la cepa silvestre y el mutante MN42.....	37
Fig.14: Curva de crecimiento de los clones UB3 y UB5.....	41
Fig.15: Sobrevida de los clones UB3 y UB5 irradiados con RUV-B.....	42
Fig.16: Sobrevida de los clones UB3 y UB5 irradiados con RUV-C.....	43
Fig.17: Comparación de las curvas de sobrevida con RUV-B de la cepa silvestre y el clon UB3.....	45

Fig.18: Comparación de las curvas de sobrevida con RUV-B de la cepa silvestre y el clon UB5.....46

LISTA DE TABLAS

	página
Tabla 1: Pendientes y r^2 de las curvas de fotorreactivación de MN18 y MN42.....	30
Tabla 2: Pendientes y r^2 de las curvas de fotorreactivación de UB3 y UB5.....	40

LISTA DE ABREVIATURAS

CFCs: Clorofluorocarbonos

DNA: Acido desoxirribonucleico

PAR: Radiación fotosintéticamente activa

RUV-A: Radiación ultravioleta-A

RUV-B: Radiación ultravioleta-B

RUV-C: Radiación ultravioleta-C

r: Coeficiente de correlación lineal

r^2 : Coeficiente de determinación

t: Estadístico "t" de Student

df: Grados de libertad

α : Nivel de significación

RESUMEN

Numerosas evidencias indican que existe un aumento de la cantidad de RUV-B que alcanza hoy la superficie terrestre. Este incremento se atribuye a la destrucción de la capa de ozono por contaminantes atmosféricos, en particular los clorofluorocarbonos. Esta radiación puede tener efectos adversos en la biota a nivel celular y molecular e incluso a nivel de ecosistemas.

Las alteraciones inducidas por RUV-B a nivel del DNA son reparadas mayoritariamente por un sistema de fotorreactivación que es gatillado por radiación visible en el intervalo del azul (400-500 nm).

En este estudio se analiza la capacidad que tiene una microalga clorófito, *Oocystis* sp, para enfrentar el incremento de RUV-B. Se compararon las curvas de crecimiento de la cepa silvestre de *Oocystis* sp. irradiada solo con radiación visible (400-700 nm) y con radiación visible + RUV-B y se determinó la capacidad fotorreactivante de la cepa silvestre expuesta a radiación visible luego de ser irradiada con RUV-B y RUV-C.

Mediante mutagénesis con RUV-C se aislaron dos mutantes de fotorreactivación los cuales fueron probados en su habilidad de reparar el daño producido por RUV-B y RUV-C.

Por último se irradió la cepa silvestre con cantidades progresivas de RUV-B manteniendo constante la radiación visible con fotoperíodo 14:10; del cultivo resultante se aislaron clones los cuales fueron probados en su capacidad fotorreactivante con RUV-B y RUV-C.

Los resultados permiten concluir que la cepa silvestre posee un mecanismo de reparación de DNA activado por radiación visible del intervalo del azul, el cual aumenta la sobrevida entre un 42.6 y un 38% dependiendo de las longitudes de onda de RUV con que se irradie. Los mutantes de fotorreactivación inducidos por RUV-C presentaron un aumento significativo de la sobrevida en presencia de radiación visible comparados con la cepa silvestre original.

Adem'ss, los experimentos con aumento progresivo de RUV-B en presencia de radiación visible indican que esta radiación es capaz de generar cambios heredables a nivel poblacional ya que las curvas de sobrevida son distintas a las curvas de sobrevida de la cepa silvestre original.

ABSTRACT

Today there are data that confirm an increasing level of UV-B radiation reaching the earth surface. This increase in radiation is attributed to the destruction of the ozone layer as a consequence of atmospheric contaminants, in particular CFCs. These radiations can produce adverse effects in the biota both at the cellular and the molecular level and also on the ecosystems.

DNA alterations produced by RUV-B are repaired by a system of photoreactivation induced by blue visible radiation (400-500 nm).

In this work I have tested the ability of *Oocystis* sp. a Chlorophyta microalgae to cope with increase of RUV-B. I have compared the growth curves of a wild strain of *Oocystis* sp. under visible radiation only (400-700 nm) and grown under visible radiation plus RUV-B. I have also built survival curves to evaluate the photoreactivating capacity of the wild strain of *Oocystis* sp. exposed to RUV-B and RUV-C.

Two RUV-C induced photoreactivating mutants were isolated and then tested for the capacity to photorepair damage produced by RUV-B and

RUV-C. The wild strain was also irradiated with increasing quantities of RUV-B, but keeping constant the amount of visible radiation and a photoperiod of 14:10, from the surviving population, clones were isolated that were tested afterwards for their photoreactivating capacity under RUV-B and RUV-C.

The results indicate that the wild strain of *Oocystis* sp. has a mechanism of self repair of the DNA activated by the blue visible radiation, that increased *Oocystis* sp. survival in the range of 42.6 to 38% depending on wavelength of RUV used. Selected mutants induced by RUV-C and then grown under blue visible wavelengths due to the DNA repairing mechanism increased rates of survival.

The experiments with increasing levels of RUV-B showed that this radiation can induce hereditary changes in the population, since the survival curves were different from the survival curves of the wild strains.

INTRODUCCIÓN

La radiación ultravioleta se divide arbitrariamente en 3 intervalos, RUV-A correspondiente a las longitudes entre los 400 y los 320 nm, RUV-B entre los 320 y los 280 nm y por último RUV-C que corresponde a las longitudes de onda inferiores a los 280 nm.

El ozono es el principal componente atmosférico capaz de absorber parte de la radiación ultravioleta-B que alcanza la atmósfera terrestre llegando a la superficie solo un pequeño porcentaje de ésta (Weiler, 1988). La radiación ultravioleta-C, en cambio, no llega a la tierra ya que es absorbida en las capas superiores de la atmósfera.

Estimaciones recientes indican que la cantidad de ozono estratosférico disminuye a razón de un 0.5% anual (Fuenzalida, 1991) con un incremento de la radiación ultravioleta-B de un 2% por cada 1% de disminución de ozono (Roy *et al*, 1990). Esto tendría como consecuencia que las longitudes de onda entre 280 y 320 nm. incrementaran su flujo por causa de la disminución de ozono (Kerr & McElroy, 1993).

Si bien la RUV-B sólo corresponde al 1% de toda la energía que llega del sol (Vincent & Roy, 1993), es un componente altamente activo ya que tiene potencial para causar diversos efectos (Halldal & Taube, 1972), debido a que su sitio de acción en las células es preferencialmente el DNA y proteínas, donde se acumula el daño resultando en muerte celular o mutación (Mitchell & Karentz, 1993).

La radiación ultravioleta-B produce daño al DNA, sin embargo, el medio ambiente celular puede proteger al DNA nuclear del efecto de la RUV-B, resultando en cerca de un 50% de reducción en la dosis efectiva que le llega para la formación de fotoproductos (Lippke *et al*, 1981).

El fitoplancton puede enfrentar este aumento de radiación, aumentando su tolerancia al RUV-B por medio de: pigmentos fotoprotectores como los carotenoides (De Fabo *et al*, 1976), compuestos absorbedores de RUV (Carreto, 1990), motilidad y migración vertical, y por último, mediante la reparación del daño celular producido.

Este último punto podemos dividirlo en dos: 1) La reparación del daño a nivel celular (membranas, sistema fotosintético, etc..) a partir de la renovación de proteínas dañadas por proteínas sintetizadas *de novo* (Murphy, 1983; Akimoto, 1987) y 2) Por reparación del DNA dañado.

La radiación ultravioleta induce diferentes tipos de daño al DNA entre los que se distinguen quiebres en el DNA (Peak & Peak, 1982), sitios apirimidínicos o apurínicos, ínter o intra cruzamiento de hebras, uniones DNA-proteínas (Karentz *et al*, 1991), y los más importantes numéricamente serían los dímeros de pirimidina. Estos últimos representan entre el 80 y el 98% del daño total dependiendo de la longitud de onda con que se irradie (Davies, 1980; Hodges *et al*, 1980)

Se considera a los dímeros de pirimidina como los fotoproductos más importantes debido a que, por ejemplo, en las microalgas *Chlamydomonas reinhardtii* y *Anacystis nidulans* los mutantes defectivos para la reparación de dichos dímeros presentan un incremento de la letalidad y de la mutagénesis (Asato, 1972; Podstavková *et al*, 1991). Por el contrario la fotorreversión de los dímeros de pirimidina por radiación visible revierte las consecuencias letales y mutagénicas de la radiación ultravioleta (Haseltine, 1983)

La ubicación de todos estos daños en el DNA no es azarosa, y dependerá de la secuencia de DNA e interacciones DNA-proteína en la cromatina, como del porcentaje de potenciales dímeros y la base 5' flanqueante, ya que si esta corresponde a una pirimidina aumenta el potencial

de dimerización, en cambio las purinas y especialmente la guanina inhiben la dimerización (Mitchell & Karentz, 1993).

Los daños producidos por RUV en el DNA pueden ser reparados mediante reparación por excisión, por reparación post-replicativa y por fotorreactivación (Griffiths *et al*, 1993).

La fotorreactivación es un mecanismo de reparación de DNA activado por radiación visible entre 400-500 nm (intervalo del azul); este mecanismo es específico para los dímeros de pirimidina (Setlow & Carrier, 1966)

Este sistema de reparación de los dímeros fue el primer sistema de reparación de DNA en ser dilucidado a nivel molecular. En 1949, Kelner observó que aumentaba la sobrevivencia de bacterias irradiadas con RUV si eran expuestas a una fuente de radiación azul. En 1958, Rupert y colaboradores demostraron la existencia de una enzima fotorreactivante (fotoliasa), estableciendo sus propiedades básicas, en la oscuridad la enzima se une al dímero de pirimidina para formar un complejo enzima-sustrato, este complejo absorbe luz y el sustrato es convertido en dos pirimidinas monoméricas liberándose la enzima (en: Robberecht, 1989).

La fotorreactivación ha sido descrita en diversas clases de organismos, entre los cuales se cuentan bacterias, hongos, protozoos, insectos y animales

superiores (Jagger, 1958). Aparentemente la existencia del mecanismo de fotorreactivación no estaría asociada necesariamente a la exposición a RUV, ya que incluso ha sido descrita en el pez *Anoptichtys jordani*, que corresponde a un organismo abisal cuyo hábitat no recibe este tipo de radiación (Woodhead & Achey, 1979).

La enzima involucrada en este proceso ha sido aislada de varios organismos y presenta en todos los casos una alta similitud en su secuencia de aminoácidos (Sancar, 1990). En las fotoliasas extraídas de procariontes, eucariontes y arqueobacterias se encuentra básicamente un idéntico contacto con el DNA que rodea al dímero (Sancar, 1990).

Si bien, este sistema fotorreparador está ampliamente distribuido en diferentes tipos de organismos, no es universal ya que existen algunas excepciones como es el caso de las bacterias *Clostridium butyricum* y *Clostridium acetobutylicum* (Carrasco, 1989) y de *Streptomyces coelicolor* (Hopwood *et al*, 1973)

Durante décadas el estudio de los mecanismos de reparación de DNA y de tolerancia al daño en el DNA, fue realizado en procariontes, por lo que la comprensión de los eventos moleculares que determinan los efectos biológicos de RUV en eucariontes es precario. Por otro lado, las

investigaciones realizadas hasta la fecha sobre fotorreactivación se han llevado a cabo irradiando con UV-254 nm, longitud de onda que no llega naturalmente a la tierra, por lo que es importante evaluar el efecto de la RUV con flujos naturales en presencia de radiación fotorreactivante (Karentz, 1991), ya que ésta es la forma en que los organismos la reciben.

Es necesario considerar también que la proporción en que se producen los distintos tipos de dímeros en el DNA varía según la longitud de onda de RUV con que se irradie. Por ejemplo al irradiar con RUV-B se producen más dímeros que involucran citosinas que en el caso de irradiaciones con RUV-C, siendo de esta manera más mutagénica que RUV-C debido a que las citosinas son más reactivas a la RUV-B que las timinas (Mitchell *et al*, 1992).

Por lo anterior, es de gran importancia comprender como responden los organismos que se encuentran normalmente expuestos a RUV-B, en especial, cuando se ha demostrado que la RUV-B puede penetrar profundidades biológicamente significativas en lagos y océanos (zona fótica) (Vincent & Roy, 1993). Desde esta perspectiva, los organismos pertenecientes al plancton parecen ser un modelo adecuado para medir la respuesta a la RUV-B.

En esta tesis se propone estudiar la respuesta de una microalga eucariótica en términos de su sobrevivencia sometida a distintas condiciones y dosis de radiación RUV-B que simulan condiciones naturales y se compara con condiciones extremas usualmente utilizadas en los protocolos de mutagénesis (RUV-C). El organismo utilizado como modelo en el diseño experimental, *Oocystis* sp., aislado de la Laguna de Aculeo, fue seleccionado por su capacidad de permanecer en estado vegetativo, por crecer en forma aislada formando colonias en placas de agar y por pertenecer a un género cosmopolita descrito a lo largo de casi todo el territorio nacional.

Hipótesis general:

"La sobrevivencia de *Oocystis* sp. a la irradiación UV depende fundamentalmente de su capacidad fotorreactivante."

Objetivo General.

Caracterizar la sensibilidad que presenta *Oocystis* sp. frente a radiación ultravioleta a través del estudio de las curvas de crecimiento, curvas de sobrevivencia y eficiencia del sistema fotorreparador.

Objetivos Específicos

- 1.- Aislar y cultivar *Oocystis sp.*
- 2.- Caracterizar su curva de crecimiento en condiciones controladas de laboratorio y evaluar la tolerancia (medida como tasa de sobrevivencia) de las microalgas a diferentes intensidades de flujo de fotones de RUV-B en presencia de radiación visible.
- 3.- Cuantificar la capacidad fotorreactivante de *Oocystis sp* irradiadas con RUV-B y RUV-C.
- 4.- Aislar mutantes de *Oocystis sp.* resistentes a radiación ultravioleta.
- 5.- Analizar el efecto de la simulación de flujos naturales de radiación sobre las curvas de fotorreactivación antes y después de exposiciones dosificadas a RUV-B.

MATERIALES Y METODOS

Material biológico:

La microalga utilizada, *Oocystis* sp., fue obtenida a partir de una muestra integral de agua de la Laguna de Aculeo.

Aislamiento y cultivo de *Oocystis* sp:

Muestras de agua de la Laguna de Aculeo se cultivaron en medio líquido M&S (Sigma) a 25 °C con iluminación constante de 50 $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ de PAR provenientes de 4 tubos fluorescentes, luego se realizó un esparcido en medio sólido (agar al 2%) con Ampicilina (1mg mL⁻¹). Se dejó crecer durante 2 semanas en iguales condiciones (25 °C y 50 $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ de PAR) al cabo de las cuales los distintos tipos de colonias verdes resultantes fueron aisladas y puestas a crecer en medio líquido, se aislaron evitando los hongos y las bacterias que crecieron proliferamente.

De las colonias que crecieron en mejores condiciones, vale decir, más rápido, limpias y aisladas se tomaron inóculos los cuales fueron sembrados en medio de cultivo líquido con Cicloheximida (1 $\mu\text{g mL}^{-1}$) y Glucosa (0,8 gL⁻¹) a 30°C, durante 24h, luego las células fueron lavadas y sembradas en

medio sólido M&S con Ampicilina, después de repetir varias veces el proceso se obtuvieron colonias aisladas y axénicas. (Gómez, B. adaptado 1992).

Curva de crecimiento:

Inóculos de 10 ml con una concentración aproximada de 1×10^6 cel ml⁻¹ fueron sembradas en 10 ml de medio de cultivo M&S líquido e incubadas a 25°C en placas de petri de poliestireno, que permiten el paso de la radiación UV-B (Fig. 1). Las lámparas utilizadas corresponden a tubos fluorescentes para radiación visible y tubos fluorescentes de UV-B-313 nm. (Q-Pannel). Réplicas que no recibieron RUV-B fueron cubiertas con un vidrio de 3 mm de espesor.

El ciclo diario de radiación simulado fue de 10 h de oscuridad y 14 h de luz. A la mitad del ciclo de luz se adicionó 4 h de RUV-B, quedando como sigue: 10h oscuridad/ 5h PAR/ 4h PAR+UV-B/ 5h PAR, lo que simula un ciclo de luz diario en Santiago de Chile (33°S) a comienzos del verano. La intensidad de RUV-B proporcionada a las microalgas, $6 \mu\text{Wcm}^{-2}\text{s}^{-1}$, fue equivalente al doble de lo que la ciudad de Santiago recibe en la actualidad ($3 \mu\text{Wcm}^{-2}\text{s}^{-1}$ de 305nm).

Diariamente se extrajo una muestra de *Oocystis* sp. para ser contada en una cámara de Neubauer (4 réplicas).

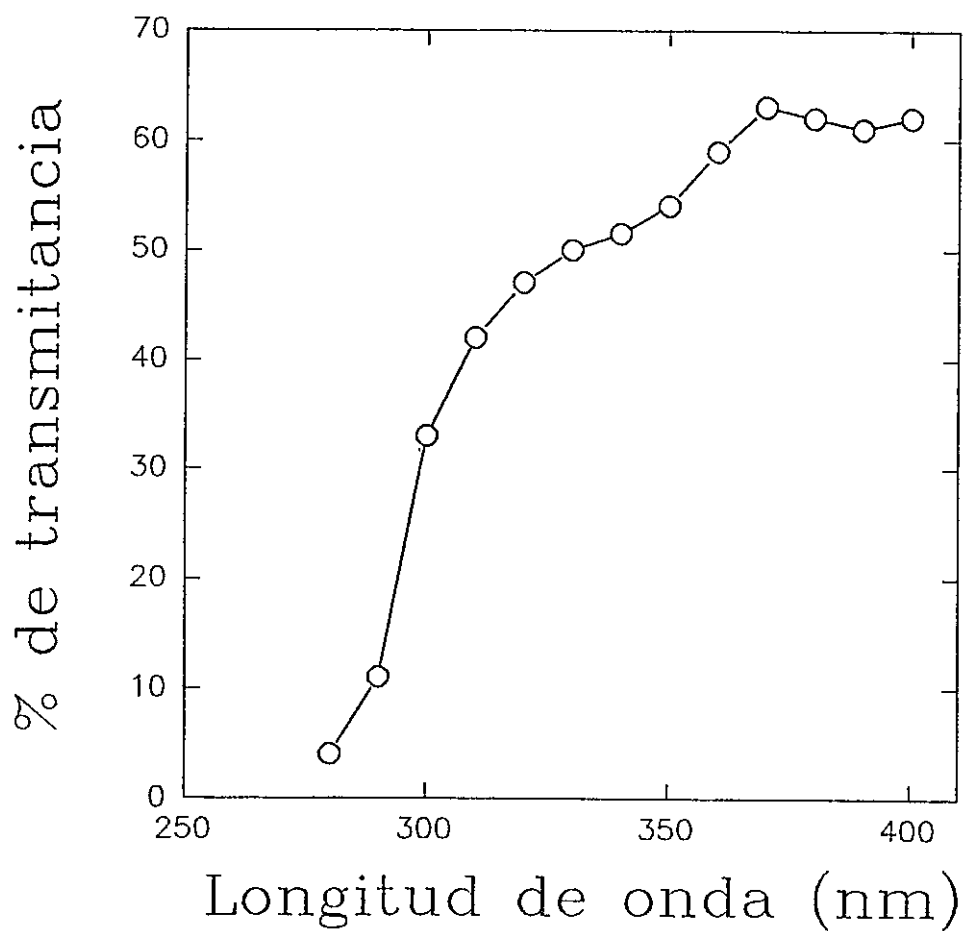


Figura 1: Espectro de transmitancia del poliestireno.

Transmitancia de placas de poliestireno, medida en un espectrofotómetro Shimadzu UV-150-02.

Fotorreactivación:

Cultivos líquidos en fase exponencial fueron irradiados en oscuridad con RUV-C (254 nm a 20 cm de la fuente) y con RUV-B (313 nm a 20 cm de la fuente), a distintos tiempos se extrajeron alícuotas las cuales se sembraron en placas con duplicado, en medio sólido y en diluciones apropiadas.

Las placas se incubaron a 25°C bajo radiación visible (tubo fluorescente común de 30 W) pero un set de placas fué cubierto con un filtro amarillo (Fig. 2), el cual impide el paso de las longitudes de onda fotorreactivante (350-450 nm) permitiendo que las microalgas realicen fotosíntesis (Karentz 1991).

Catorce días después las colonias fueron contadas, y los resultados fueron expresados como porcentaje de células sobrevivientes por ml, la diferencia entre los dos tratamientos (con y sin radiación fotorreactivante) se considera fotorreactivación.

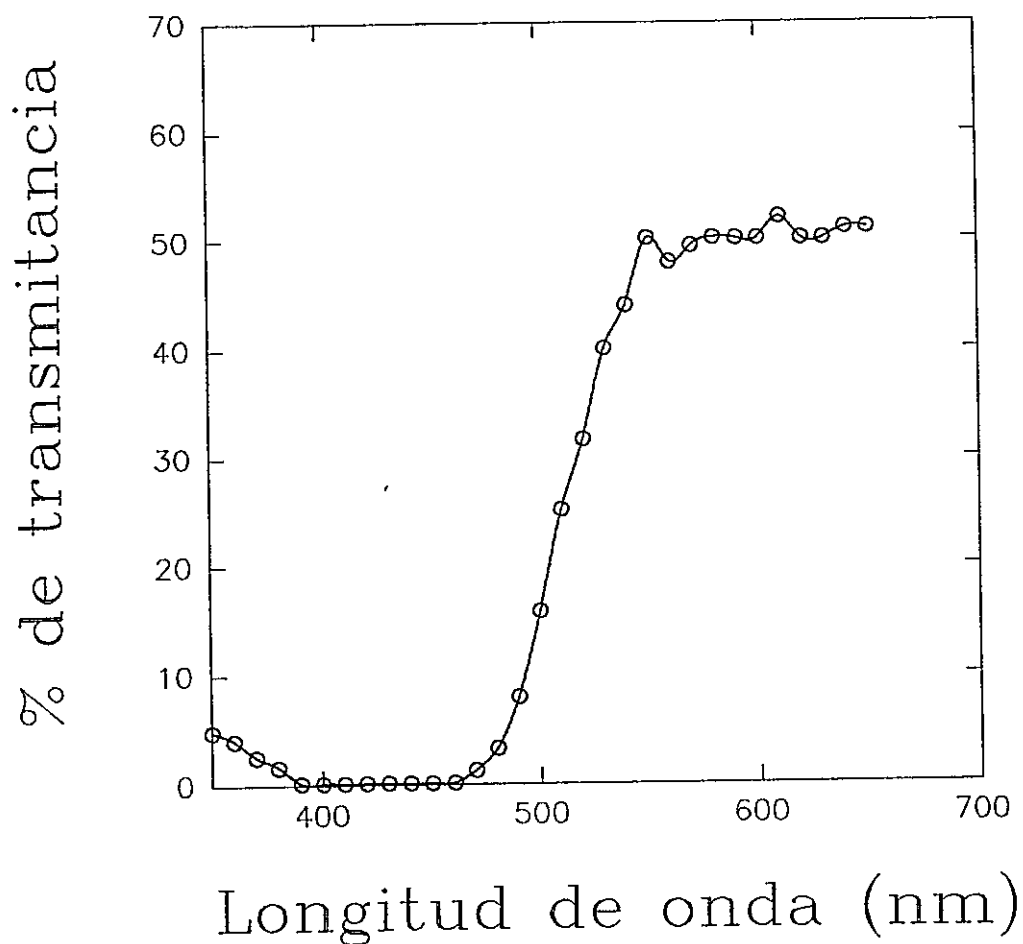


Figura 2: Espectro de transmittancia filtro amarillo.

Transmittancia de dos capas de filtro amarillo utilizado para cortar las longitudes de onda del intervalo del azul. Medida en un espectrofotómetro Shimadzu UV-150-02.

Aislación de mutantes:

Cultivos líquidos en fase exponencial fueron irradiados con RUV-C de 254 nm durante 6 min, luego se sembraron en medio sólido y se incubó bajo filtro amarillo (sin radiación azul) durante 3 semanas bajo las condiciones descritas en el protocolo de aislamiento.

Aproximadamente 50 colonias resultantes se aislaron y se probaron irradiando y cultivando bajo filtro amarillo e irradiando y cultivando bajo radiación visible. El tiempo de irradiación fue escogido a partir de los resultados de la curva de fotorreactivación con RUV-C (fig. 8) de la cepa silvestre. 6 min para condiciones no-fotorreactivante y 20 min. para condiciones fotorreactivante, en ambos casos los tiempos corresponde a una sobrevida de un 0.1% (fig. 3).

Al cabo de tres semanas 42 colonias resultantes en ambos tratamientos fueron aisladas y cultivadas para determinar la capacidad fotorreactivante, la cual se comparó con la curva de fotorreactivación de la cepa silvestre.

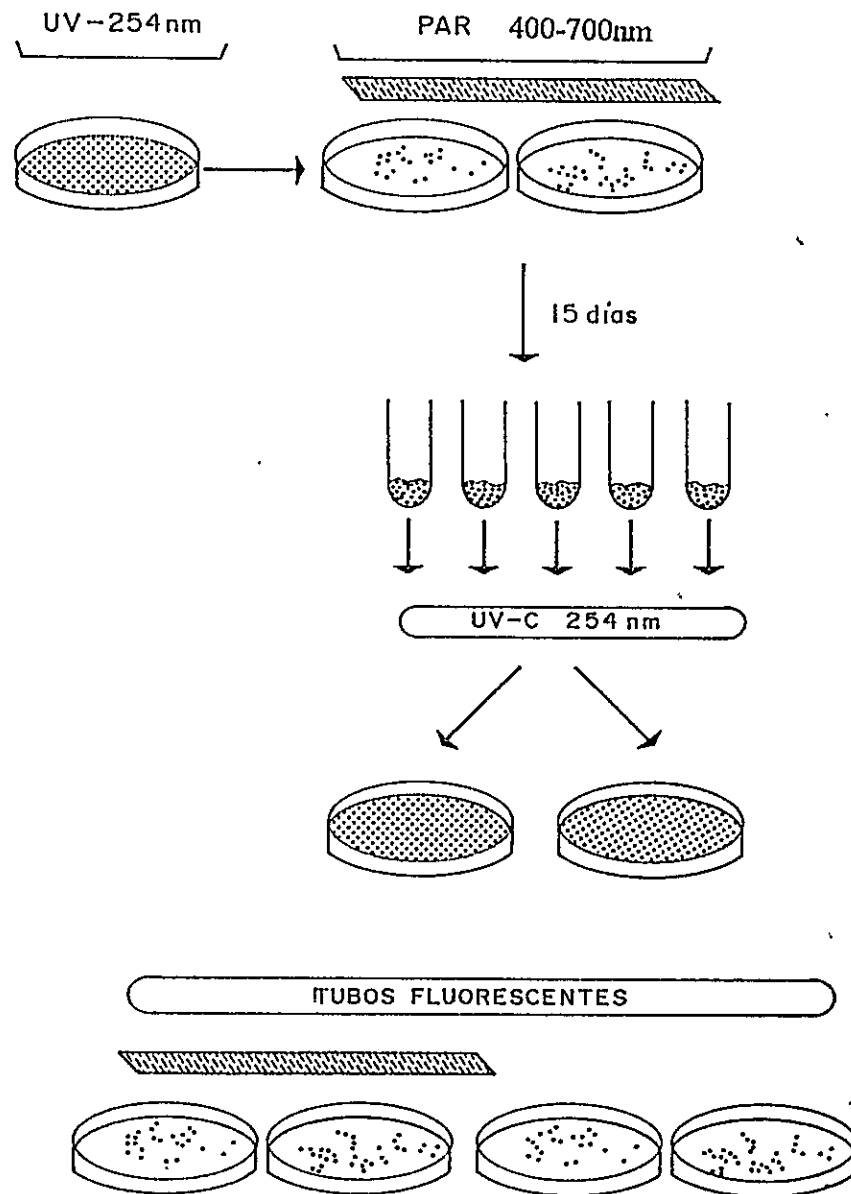


Figura 3: Protocolo de aislamiento de mutantes.

Las células fueron irradiadas con RUV-C y luego puestas a crecer en medio sólido bajo filtro amarillo, se aislaron colonias las cuales se volvieron a irradiar con RUV-C, durante 6 min. e incubadas bajo filtro amarillo o 20 min. e incubadas bajo radiación visible. A las colonias sobrevivientes al tratamiento se les realizó una curva de fotorreactivación como prueba.

Exposiciones dosificadas a RUV-B:

Para simular el incremento de la radiación UV-B se utilizó un filtro de mica que permite el paso de aproximadamente un 80% de la RUV-B incidente (Fig. 4).

Una alícuota de 2 ml con una concentración aproximada de 1×10^6 cel. mL⁻¹ de *Oocystis* sp en fase exponencial fue sembrada en 2 ml de medio líquido en placas petri de poliestireno las que fueron cubiertas con 5 capas de filtro de PVC laminado (mica) de 0.18mm de espesor. El control permaneció cubierto con vidrio doble (2 mm de espesor). El ciclo diario de luz utilizado fue el mismo descrito en el protocolo de las curvas de crecimiento.

A intervalos de tres días las células se retiraron, lavaron y contaron para luego ser nuevamente sembradas en las condiciones iniciales, pero con una capa de mica menos y así sucesivamente hasta completar tres días sin filtro con lo cual completamos una dosis de aproximadamente $6 \mu\text{Wcm}^{-2}\text{s}^{-1}$ de 306 nm. Al finalizar este tratamiento las células fueron lavadas y sembradas en medio sólido (Fig. 5).

10 clones aislados al azar fueron sometidos a irradiación con RUV-B para determinar su capacidad fotorreactivante y compararla con aquella de la cepa silvestre y de los mutantes aislados .

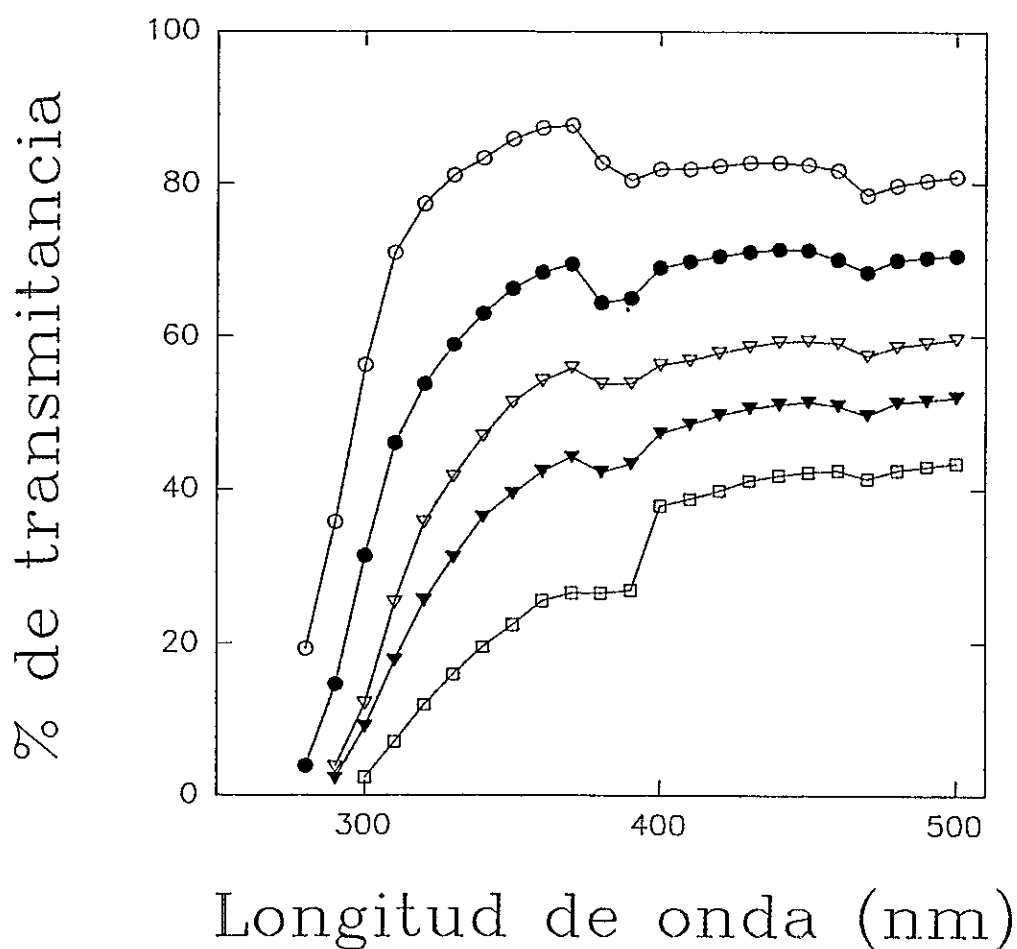


Figura 4: Espectros de transmitancia de micas.

Transmitancia de los filtros de mica utilizados para dosificar la radiación ultravioleta. ○ = 1 capa de mica; ● = 2 capas; △ = 3 capas; ▲ = 4 capas y □ = 5 capas de mica, medida en un espectrofotómetro Shimadzu UV-150-02.

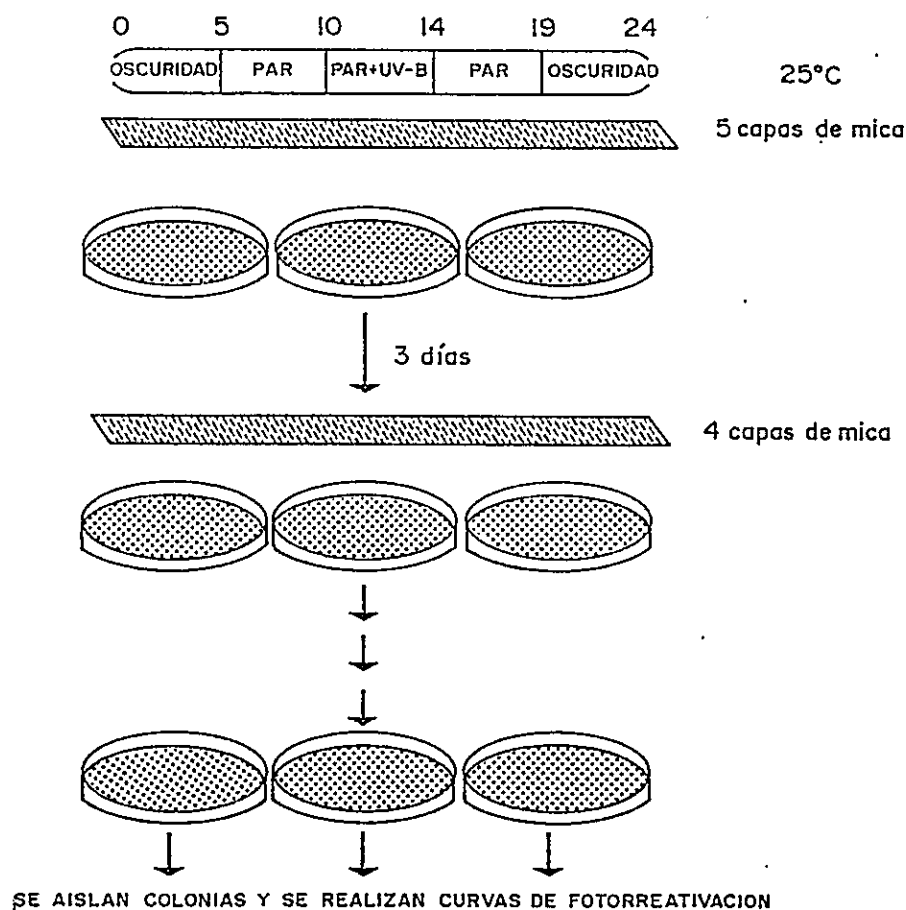


Figura 5: Protocolo de dosificación de RUV-B

Las células fueron incubadas en medio M&S líquido en placas Petri de poliestireno las cuales fueron cubiertas con 5 capas de mica, al cabo de tres días las células fueron contadas, lavadas y vueltas a sembrar en medio nuevo cubriendo las placas con solo 4 capas de mica, esto se repitió sucesivamente hasta que las células estuvieron 3 días sin mica.

Estadísticos usados:

Se utilizó el programa SIGMA plot para calcular las curvas de regresión lineal y determinar la desviación de dicha regresión.

Con el programa Stat View 512 se obtuvieron los datos de r , r^2 y pendientes.

La comparación de las distintas pendientes se realizó a partir de los datos anteriores en el programa Statcana, este programa compara las pendientes a través de un análisis de "t" de Student, el valor entregado se comparó con un "t" crítico para un test de 2 colas y con un $\alpha = 0,05$.

RESULTADOS

Identificación y caracterización de la cepa silvestre:

El modelo biológico utilizado, aislado de la Laguna de Aculeo, *Oocystis* sp. pertenece a la familia Oocystaceae. En cultivo se observaron como células solitarias, de forma elíptica u ovoides con extremos redondeados y no presentan flagelos, todas estas características concuerdan con las descritas por Bold & Wynne en 1985 los cuales agregan sobre su reproducción que es exclusivamente por autosporas lo cual nos indica que no se encuentra reproducción sexual. (Foto 1)

Las curvas de crecimiento con y sin RUV-B se muestran en la figura 6. El ciclo de luz utilizado fue de 10h oscuridad/ 5h luz/ 4h luz+UV-B/ 5h luz. El control no recibió RUV-B y presentó una curva de crecimiento "normal", con un período de retardo de unos 5 días y una tasa de crecimiento de 0,4 cel/día calculada en el período medio de la fase exponencial (n=3). Las células incubadas con RUV-B no alcanzaron la fase

exponencial, el número de células se mantuvo constante en el período de registro.

La curva de sobrevivencia de *Oocystis* sp. expuesta a RUV-B se muestra en la figura 7. Cuando la microalga se incubó en presencia de radiación visible completa, después de su irradiación con RUV-B a distintas dosis se observó un aumento significativo de la sobrevivencia de aproximadamente un 42.6% en relación a las células incubadas bajo filtro amarillo (condición no fotorreactivante).

Su capacidad fotorreactivante también se determinó con RUV-C (Fig. 8), en este caso la exposición a radiación visible completa (400-700 nm) aumenta la sobrevivencia en un 38% por sobre las células incubadas bajo filtro amarillo.

Cuando se comparan ambas curvas se observa que la RUV-C es más letal que RUV-B en las dosis estudiadas ya que las pendientes de las curvas incubadas bajo filtro amarillo en el tratamiento con RUV-B es de -0.168 y en el caso del tratamiento con RUV-C fue de -0.472, las cuales son significativamente distintas según el test de pendientes STATCANA.

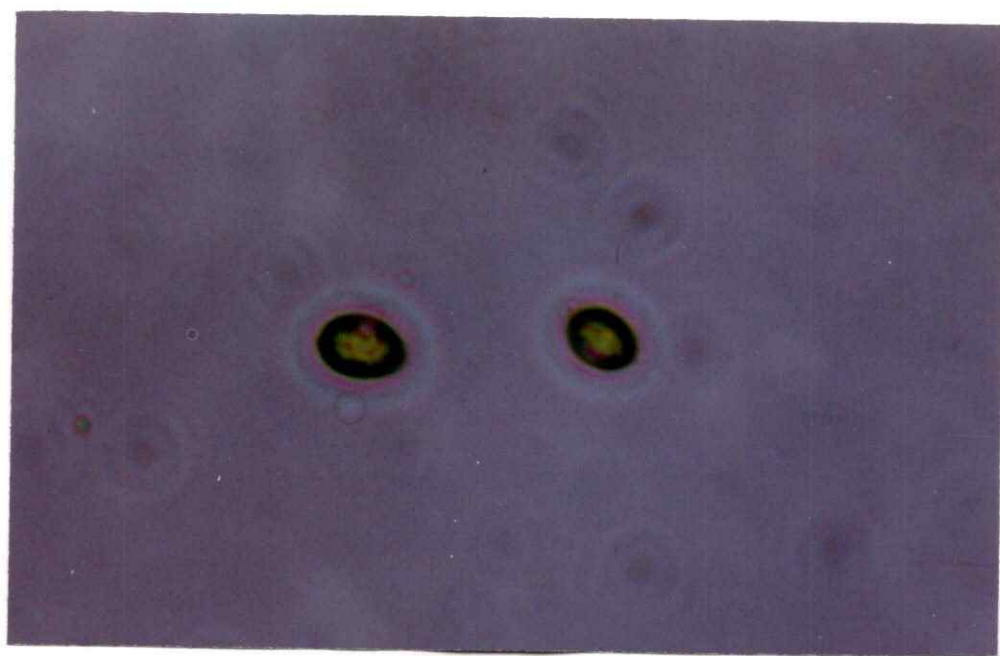


Foto 1: Células de *Oocystis* sp. en cultivo líquido de 12 días, donde se observa su forma ovalada y extremos redondeados, aumento 40x.

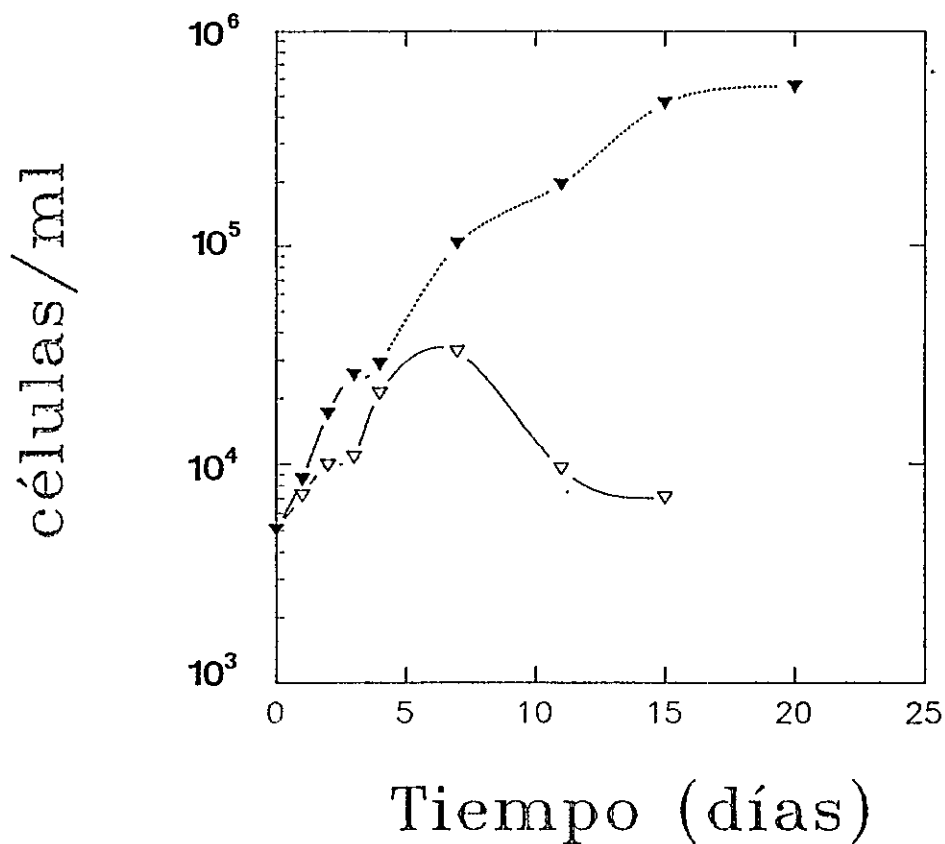


Figura 6: Curva de crecimiento de la cepa silvestre.

Las microalgas fueron cultivadas en medio M&S líquido a 25°C en presencia (▽) y ausencia (▼) de RUV-B. El fotoperíodo está descrito en materiales y métodos. Cada punto corresponde a n=3.

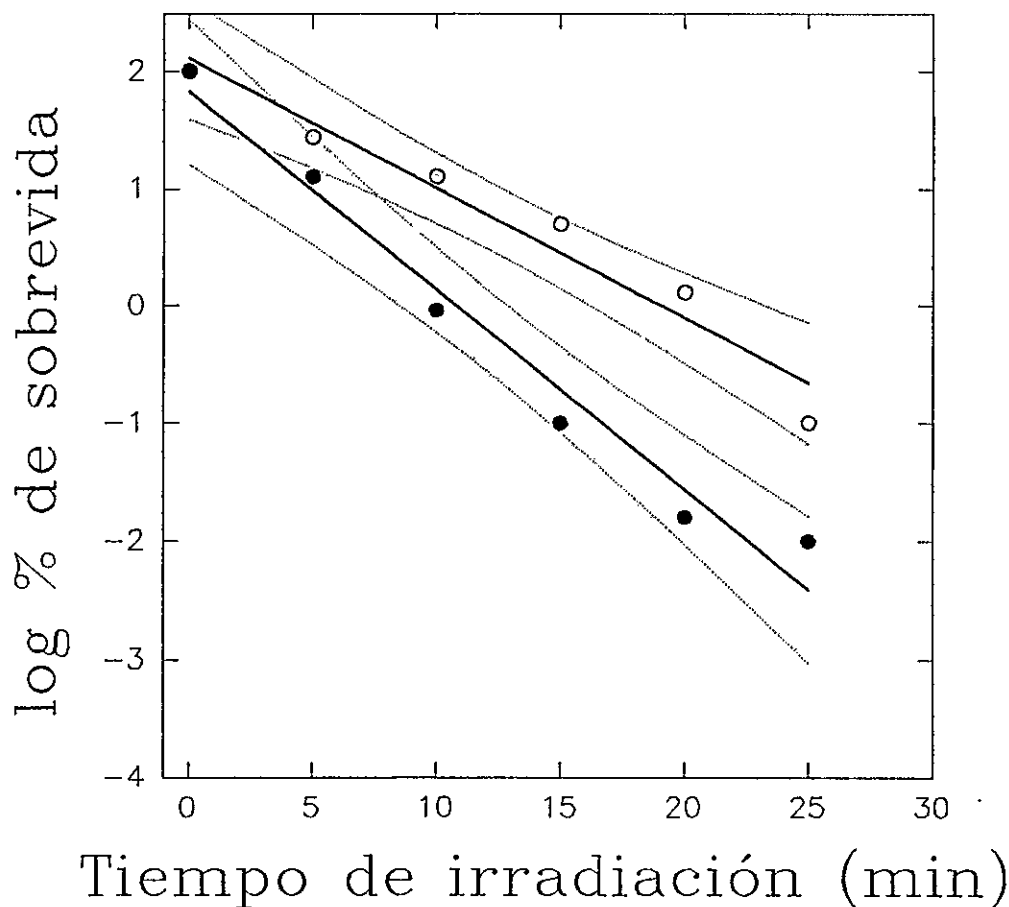


Figura 7: Sobrevida de células de la cepa silvestre irradiadas con RUV-B.

Las células fueron irradiadas distintos tiempos con RUV-B (Tubos Q-Pannel) y luego fueron incubadas a 25°C con radiación azul (○) o en ausencia de radiación azul (●), para después de 15 días contabilizar las colonias sobrevivientes. Cada punto corresponde a un promedio (n=3)

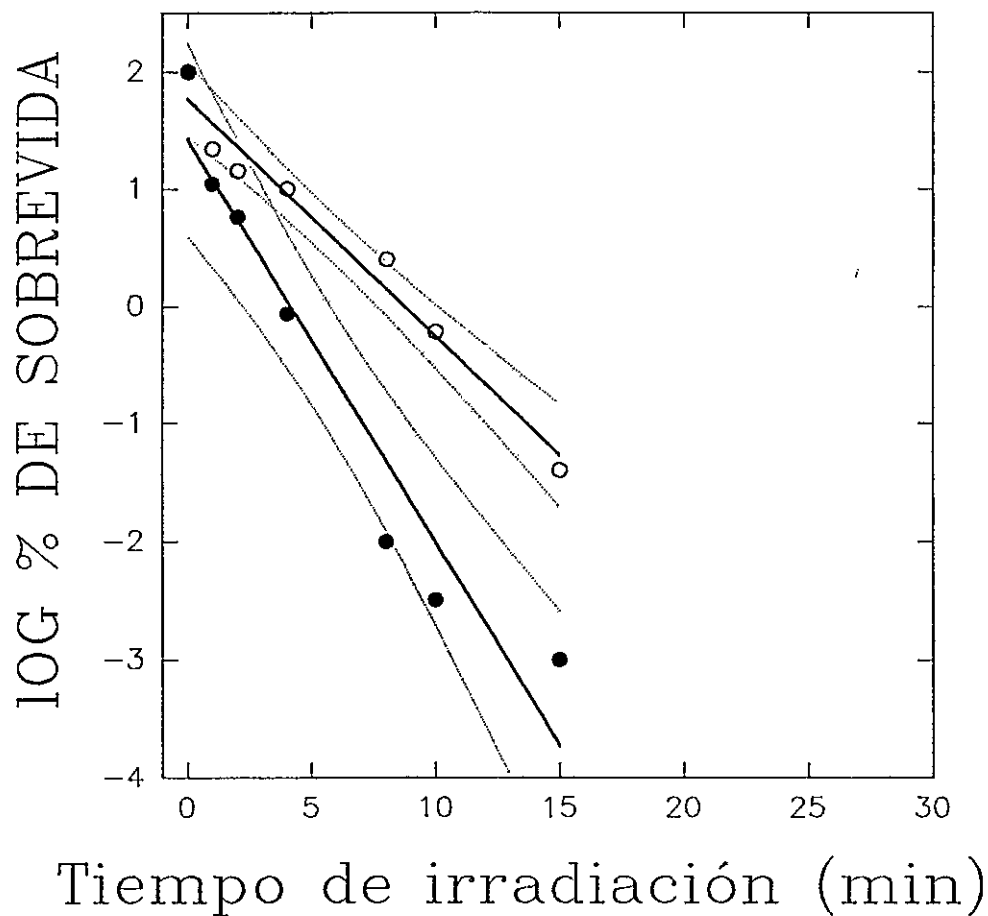


Figura 8: Supervivencia de células de la cepa silvestre irradiadas con RUV-C.

Las células fueron irradiadas con RUV-C (lámpara de 254 nm.) y luego fueron incubadas con radiación azul (○) o en ausencia de radiación azul (●), para después contabilizar las colonias sobrevivientes. Cada punto corresponde a un promedio ($n=3$).

Caracterización de los mutantes MN18 y MN42:

Curva de crecimiento:

Las curvas de crecimiento de los mutantes aislados se muestran en la fig. 9. Las curvas con y sin RUV-B, no presentan diferencias con las curvas de crecimiento de la cepa silvestre, creciendo en forma exponencial cuando fueron incubadas sin RUV-B, y manteniéndose constante durante unos 10 días para luego empezar a decaer cuando crecieron en presencia de RUV-B.

Capacidad fotorreactivante:

La capacidad fotorreactivante fue medida en ambos mutantes posterior a su aislamiento y crecimiento en medio M&S.

Los cultivos en fase exponencial fueron irradiados con RUV-B (fig. 10a), el mutante MN18 aumentó la sobrevivencia cuando fue expuesto a radiación azul en un 61.2% con respecto a las células incubadas bajo filtro amarillo y el mutante MN42 aumentó su sobrevivencia en un 56.7%.

En el caso de irradiación con RUV-C (Fig. 11), el mutante MN18 aumentó la sobrevivencia en un 46% por sobre las células incubadas bajo filtro amarillo y el mutante MN42 aumentó su sobrevivencia en un 43%, los datos calculados a partir de las gráficas son presentados en la Tabla N° 1.

Tabla N°1

" Pendientes y r^2 de las curvas de fotorreactivación de MN18 y MN42"

	RUV-B			RUV-C		
	r^2	Pendiente	df	r^2	Pendiente	df
MN18						
c/luz	0.951	-0.074(1)	5	0.975	-0.209	8
MN42						
c/luz	0.933	-0.071(1)	5	0.962	-0.205	7
Silv.						
c/luz	0.952	-0.11(1)	5	0.97	-0.203	6

(1) Pendientes de los mutantes distintas estadísticamente a las de la cepa silvestre (Sil=-0.11)

MN42						
s/luz	0.984	-0.196(2)	5	0.961	-0.34	5
MN18						
s/luz	0.947	-0.222(2)	5	0.938	-0.388	6
Silv.						
s/luz	0.973	-0.168(2)	5	0.986	-0.472	6

2. Pendientes de los mutantes estadísticamente iguales a las de la cepa silvestre (Sil= -0.168).

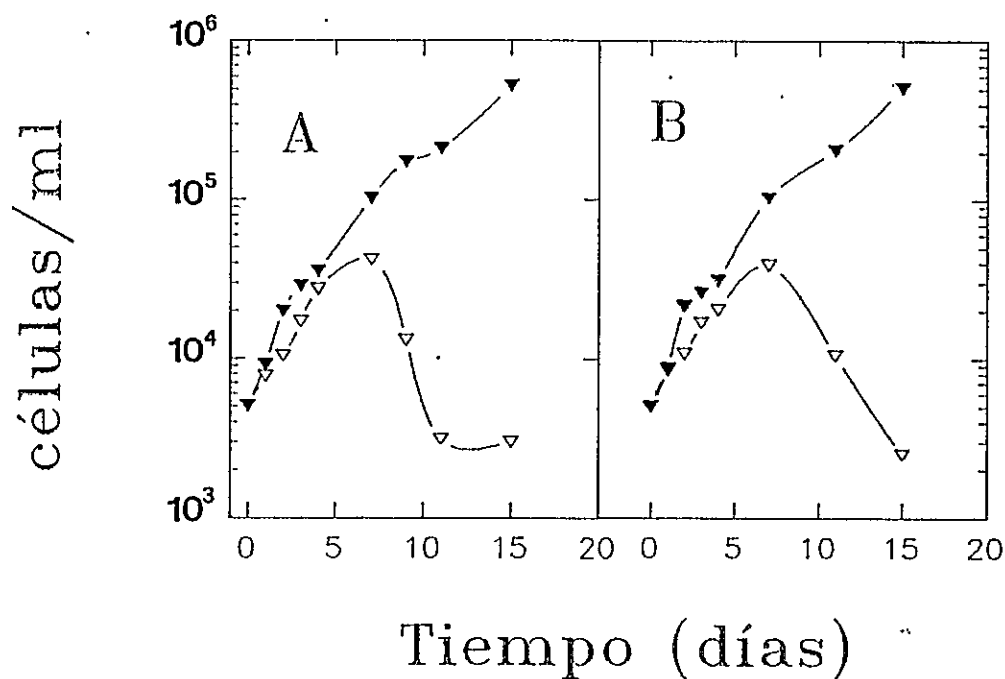


Figura 9: Curva de crecimiento de los mutantes MN18 y MN42.

Los mutantes fueron cultivados en medio líquido M&S en placas Petri de poliestireno e incubadas bajo radiación visible y en presencia ∇ o en ausencia \blacktriangledown de RUV-B. A: MN18 y B: MN42. Diariamente se extrajeron muestras las cuales fueron contadas en una cámara de Neubauer.

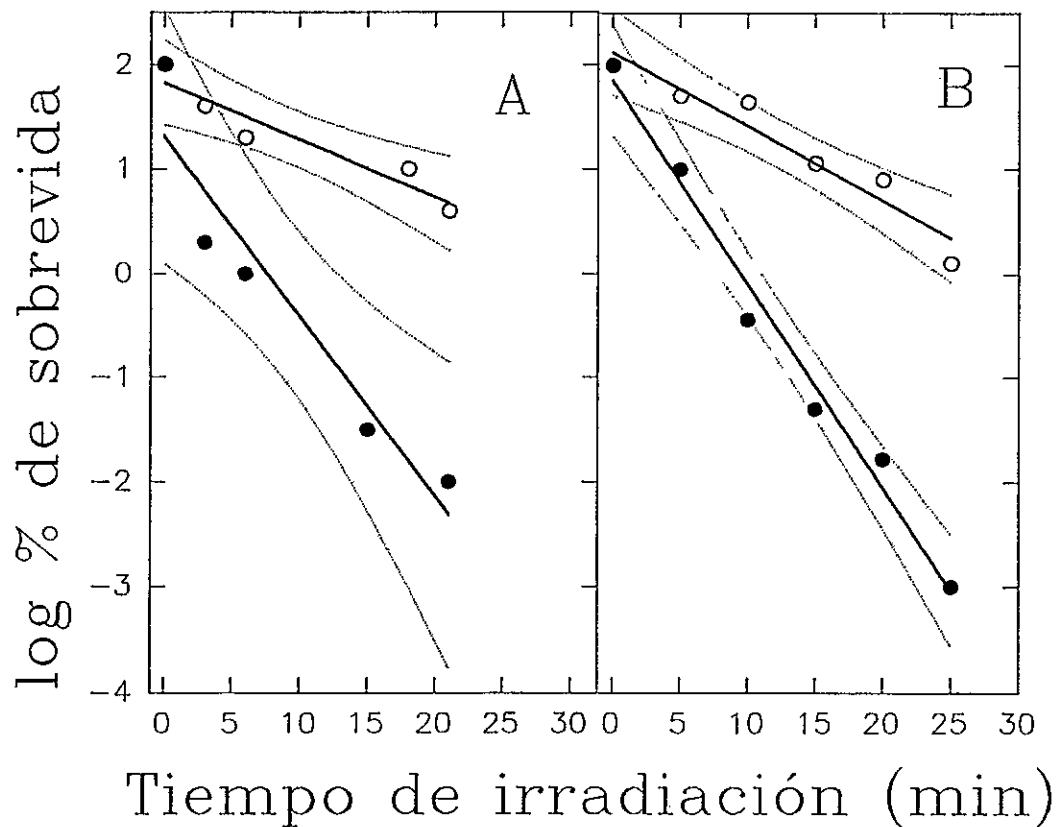


Figura 10: Sobrevida de los mutantes MN18 y MN42 irradiados con RUV-B.

Los mutantes fueron irradiados con RUV-B (tubos Q-Pannel) en ausencia de radiación visible y luego fueron incubadas a 25°C con radiación azul (○) o en ausencia de radiación azul (●), para después de 15 días contabilizar las colonias sobrevivientes. Cada punto corresponde a un promedio (n=3), A:MN18 y B:MN42.

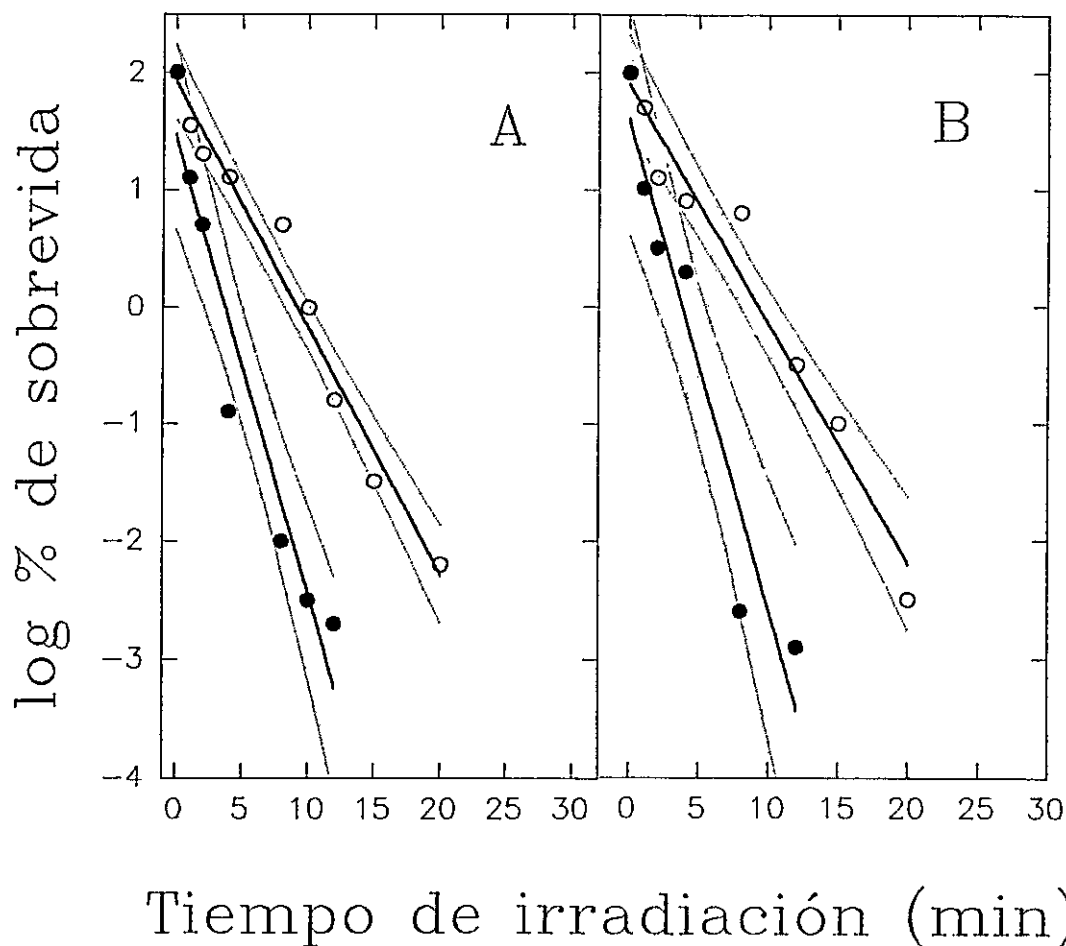


Figura 11: Sobrevida de los mutantes MN18 y MN42 irradiados con RUV-C.

Los mutantes fueron irradiados con RUV-C (lámpara de 254 nm) en ausencia de radiación visible y luego fueron incubados a 25°C con radiación azul (○) o en ausencia de radiación azul (●), para después de 15 días contabilizar las colonias sobrevivientes. Cada punto corresponde a un promedio (n=3), A:MN18 y B:MN42.

Comparación de la capacidad fotorreactivante entre la cepa silvestre y los mutantes MN18 y MN42:

Las curvas de fotorreactivación de los mutantes resistentes a radiación ultravioleta mostraron una diferencia significativa entre las curvas de sobrevida en presencia de luz fotorreactivante, con respecto a la cepa silvestre (Fig. 12 y 13). Estas curvas fueron determinadas varios ciclos celulares posteriores (aproximadamente 30 generaciones) a la irradiación mutagénica y repetidas 3 veces lo que permite afirmar que no estamos frente a un fenómeno de fotoaclimatación.

Las curvas de sobrevida de células que no recibieron luz fotorreactivante de los mutantes y la cepa silvestre son estadísticamente iguales entre sí, por lo cual podemos decir que los mutantes se comportan igual al silvestre (sobrevivencia) en ausencia de radiación azul.

Cuando las células fueron incubadas en presencia de luz fotorreactivante se observa una mayor sobrevida de los mutantes en comparación con la cepa silvestre (ver Tabla N°1), ya que el mutante MN18 aumenta en un 18.6% y en un 8.25% (RUV-B y RUV-C respectivamente) y

el mutante MN42 aumenta su sobrevida en un 14.1% y en un 5.13% (RUV-B y RUV-C respectivamente) en relación a la cepa silvestre.

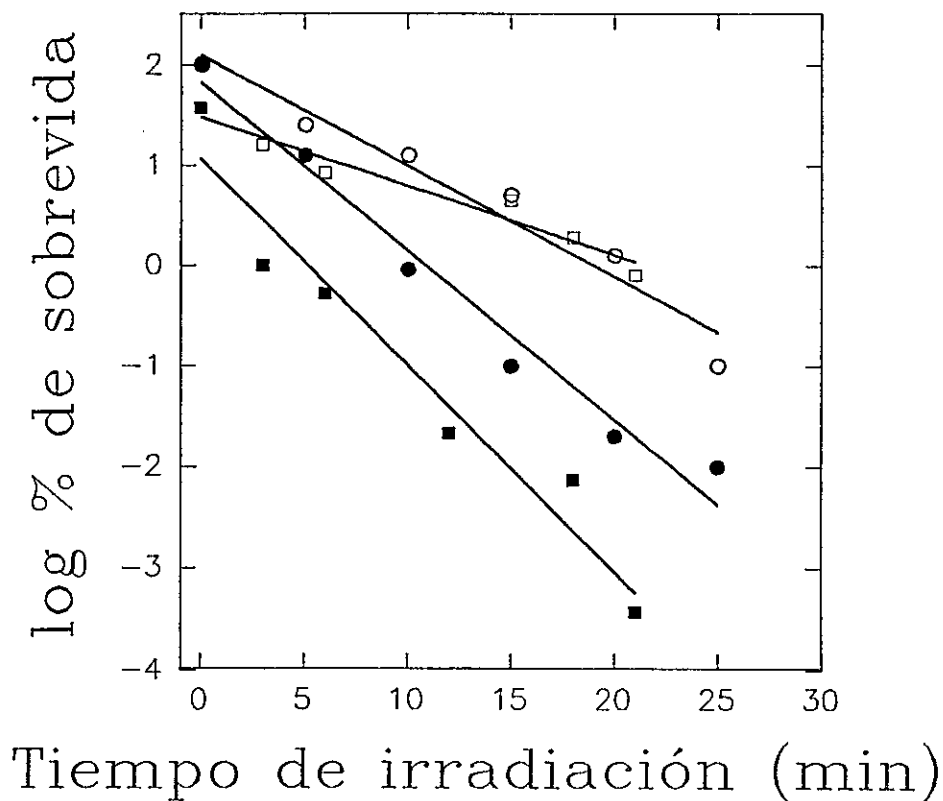


Figura 12: Comparación de las curvas de supervivencia con RUV-B de la cepa silvestre y el mutante MN18.

Las células de la cepa silvestre y el mutante fueron irradiados con RUV-B en oscuridad y posteriormente incubadas bajo radiación azul (símbolos abiertos) o en ausencia de radiación azul (símbolos cerrados). ●, ○: cepa silvestre y ■, □: cepa mutante MN18.

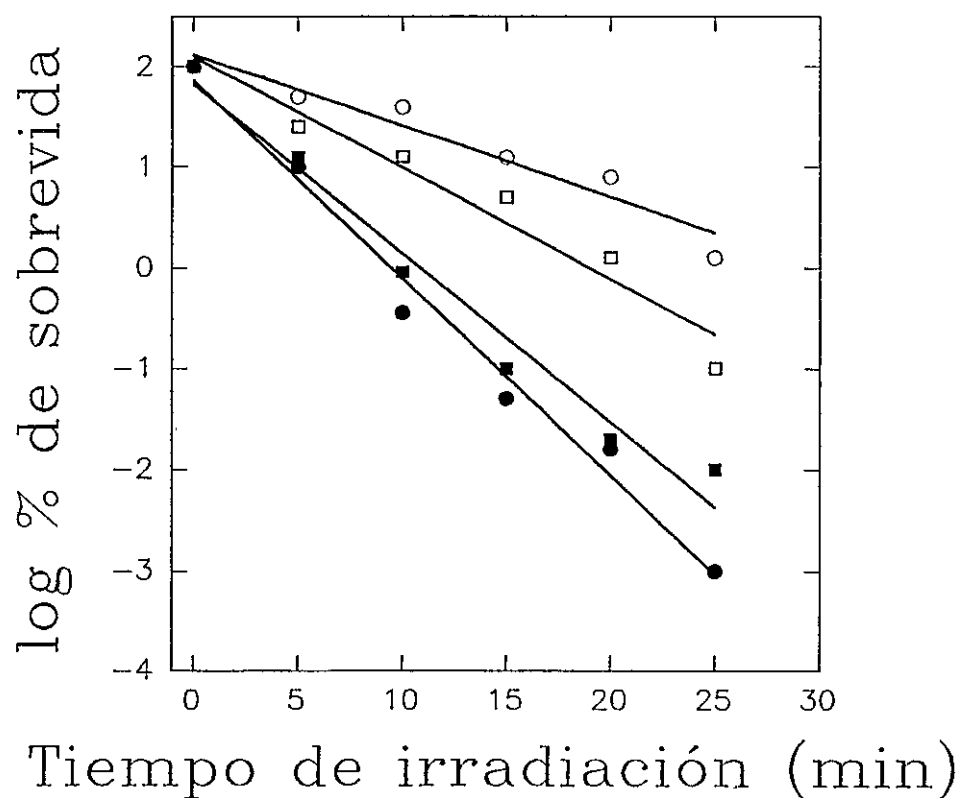


Figura 13: Comparación de las curvas de supervivencia con RUV-B de la cepa silvestre y el mutante MN42.

Las células de la cepa silvestre y el mutante MN42 fueron irradiados con RUV-B en oscuridad y posteriormente incubadas bajo radiación azul (símbolos abiertos) o en ausencia de radiación azul (símbolos cerrados. ●, ○: cepa silvestre y ■, □: cepa mutante MN42

Caracterización de los clones UB3 y UB5:

Curva de crecimiento:

Posterior al tratamiento de un aumento dosificado de RUV-B, las células fueron lavadas y sembradas en medio sólido M&S, luego se aislaron clones, los que fueron sembrados en medio M&S líquido. A estas células se les caracterizó su curva de crecimiento (Fig. 14), las que son similares entre sí y con las curvas de la cepa silvestre, tanto en la curva control como en la curva con RUV-B, con una tasa de crecimiento de 0.45 cel/día para UB3 y de 0.4 cel/día. para UB5

Capacidad fotorreactivante:

La capacidad fotorreactivante se cuantificó en células provenientes de cultivos en fase exponencial, crecidas en medio de cultivo M&S líquido. Se midió la sobrevivencia de los clones UB3 y UB5 posterior a la irradiación con RUV-B (Fig. 15) apreciándose un aumento de la sobrevivencia al ser incubadas con el espectro completo de radiación visible de un 58% para UB3 y de 52.7% para UB5. También se midió la capacidad fotorreactivante posterior a irradiación con RUV-C (Fig. 16)

Ambos clones analizados, UB3 y UB5 se comportan en forma similar al ser irradiados con RUV-B y RUV-C, en presencia y ausencia de radiación visible.

Los valores de pendientes y r^2 de los diversos tratamientos se resumen en la Tabla N°2

Tabla N° 2

" Pendientes y r^2 de las curvas de fotorreactivación de UB3 y UB5"

	RUV-B			RUV-C		
	r^2	pendiente	df	r^2	pendiente	df
UB3 c/luz	0.929	-0.121(1)	4	0.96	-0.218	4
UB5 c/luz	0.962	-0.118(1)	4	0.972	-0.238	4
Silv. c/luz	0.952	-0.11 (1)	5	0.97	-0.203	6

1. Pendientes de los clones UB3 y UB5 estadísticamente iguales de la cepa silvestre (Silv=-0.11)

UB3 s/luz	0.978	-0.241(2)	4	0.663	-0.917	3
UB5 s/luz	1	-0.273(2)	3	0.995	-0.848	3
Silv. s/luz	0.973	-0.168(2)	5	0.986	-0.472	6

(2) Pendientes de los clones UB3 y UB5 estadísticamente distintas de la cepa silvestre(Silv=-0.168)

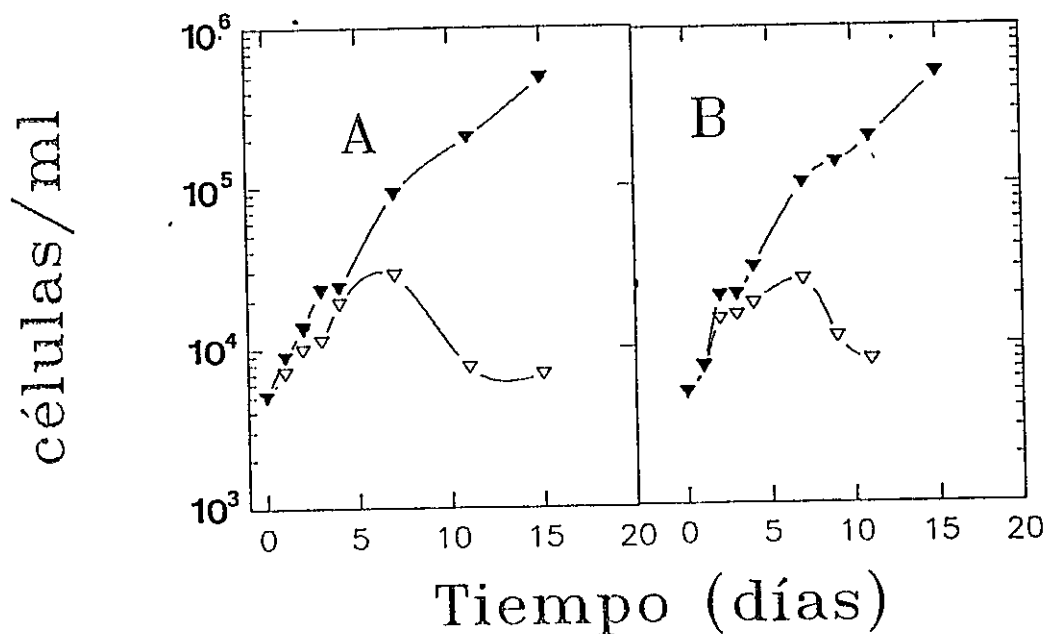


Figura 14: Curva de crecimiento de los clones UB3 y UB5.

Las microalgas fueron cultivadas en medio líquido M&S en placas Petri de poliestireno e incubadas a 25°C bajo radiación visible (fotoperíodo en materiales y métodos), en presencia (∇) o en ausencia (▽) de RUV-B.

A: clon UB3 y B: clon UB5. Diariamente se extrajeron muestras, las cuales fueron contadas en una cámara de Neubauer.

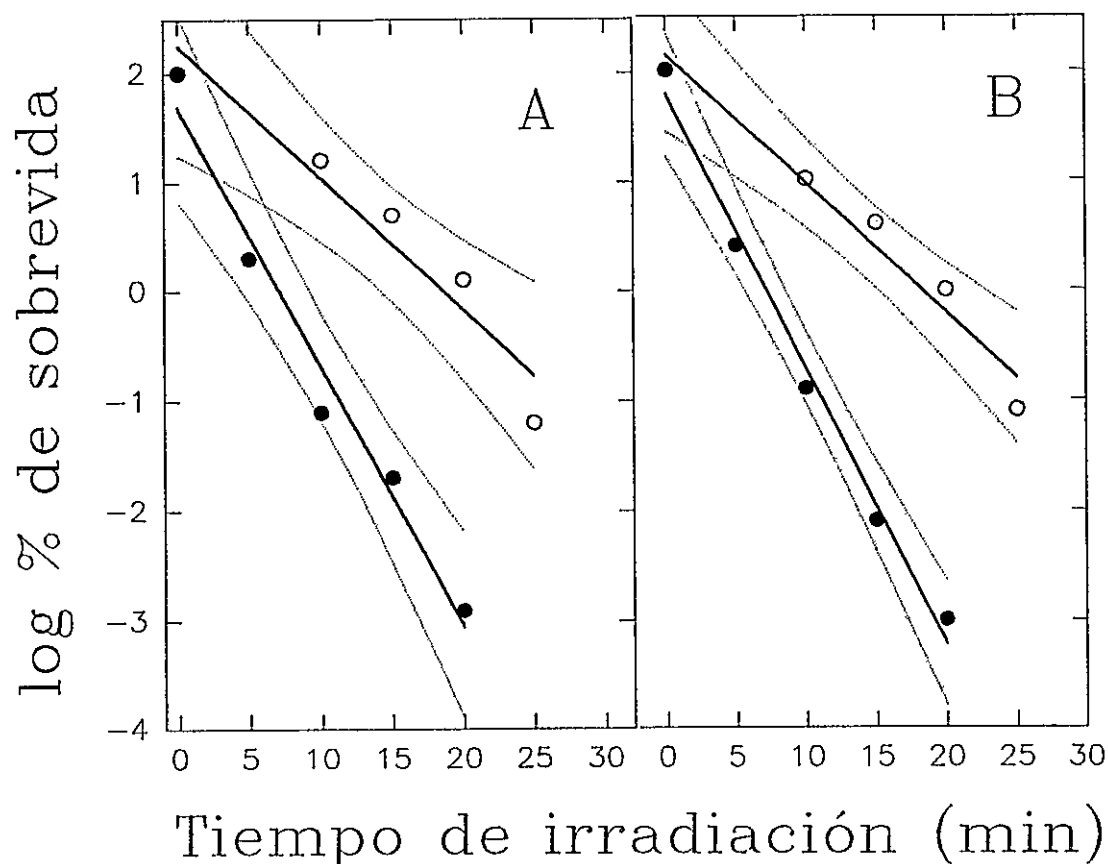


Figura 15: Sobrevida de los clones UB3 Y UB5 irradiados con RUV-B.

Los clones fueron irradiados con RUV-B en oscuridad y luego fueron incubados a 25°C con radiación azul (○) o en ausencia de radiación azul (●), para después de 15 días contabilizar las colonias sobrevivientes. Cada punto corresponde a un promedio (n=3). A:UB3 y B:UB5.

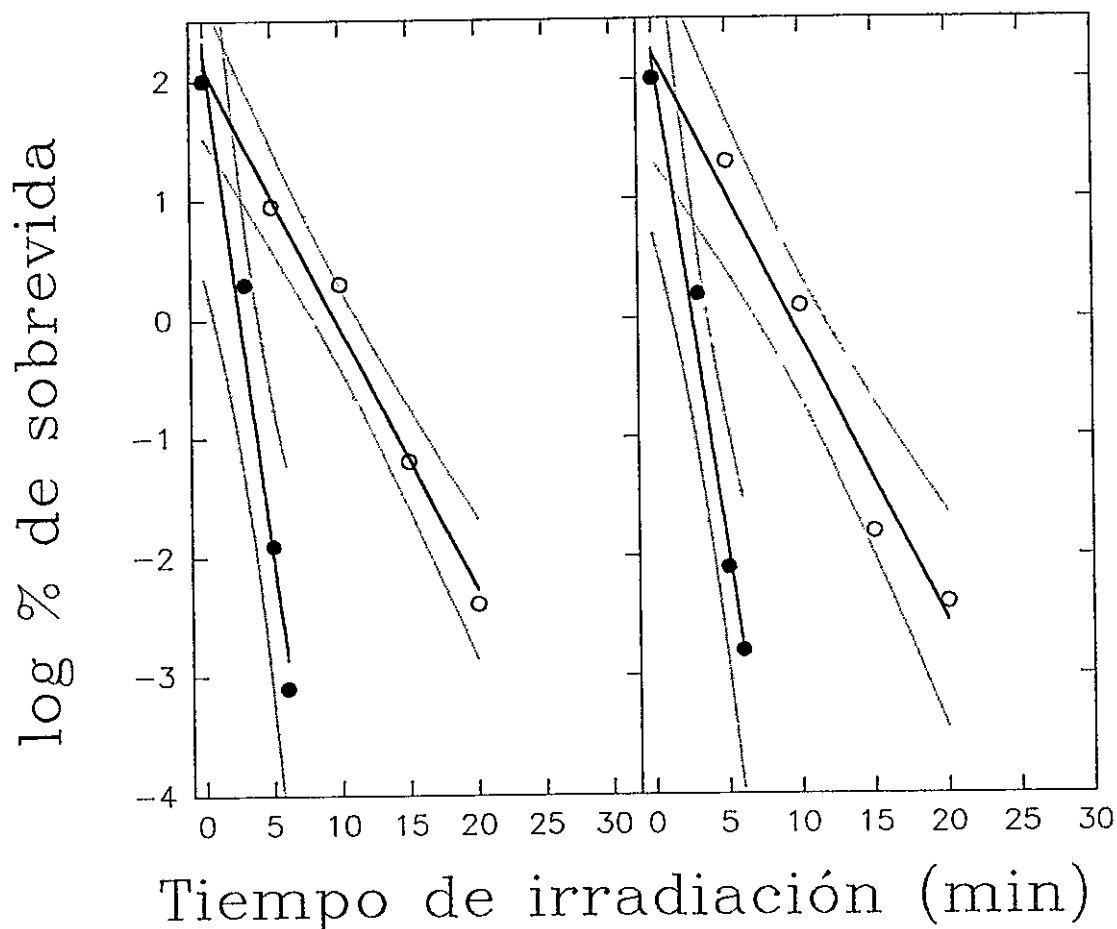


Figura 16: Sobrevida de los clones UB3 y UB5 irradiados con RUV-C.

Los clones fueron irradiados con RUV-C (lámpara de 254 nm.) en oscuridad y luego fueron incubados a 25°C con radiación azul (○) o en ausencia de radiación azul (●), para después de 15 días contabilizar las colonias sobrevivientes. Cada punto corresponde a un promedio (n=3). A:UB3 y B:UB5.

Comparación de la capacidad fotorreactivante entre la cepa silvestre y los clones UB3 y UB5:

Las curvas de fotorreactivación de las cepas provenientes del experimento de dosificación de RUV-B, UB3 y UB5 en comparación con las curvas de sobrevivencia de la cepa silvestre (fig. 17 y 18) nos muestran que la sobrevivencia en presencia de radiación azul es igual estadísticamente en ambos casos. Sin embargo se aprecia un aumento de la sobrevivencia en presencia de radiación azul en relación a la cepa silvestre de un 15.4% en UB3 y de un 10.1% en UB5. Esto se explica debido a que las curvas de sobrevivencia en oscuridad de UB5 y UB3 son significativamente distintas a la curva de la cepa silvestre siendo menor la sobrevivencia en las células que fueron expuestas al tratamiento de dosificación de RUV-B (ver tabla N°2).

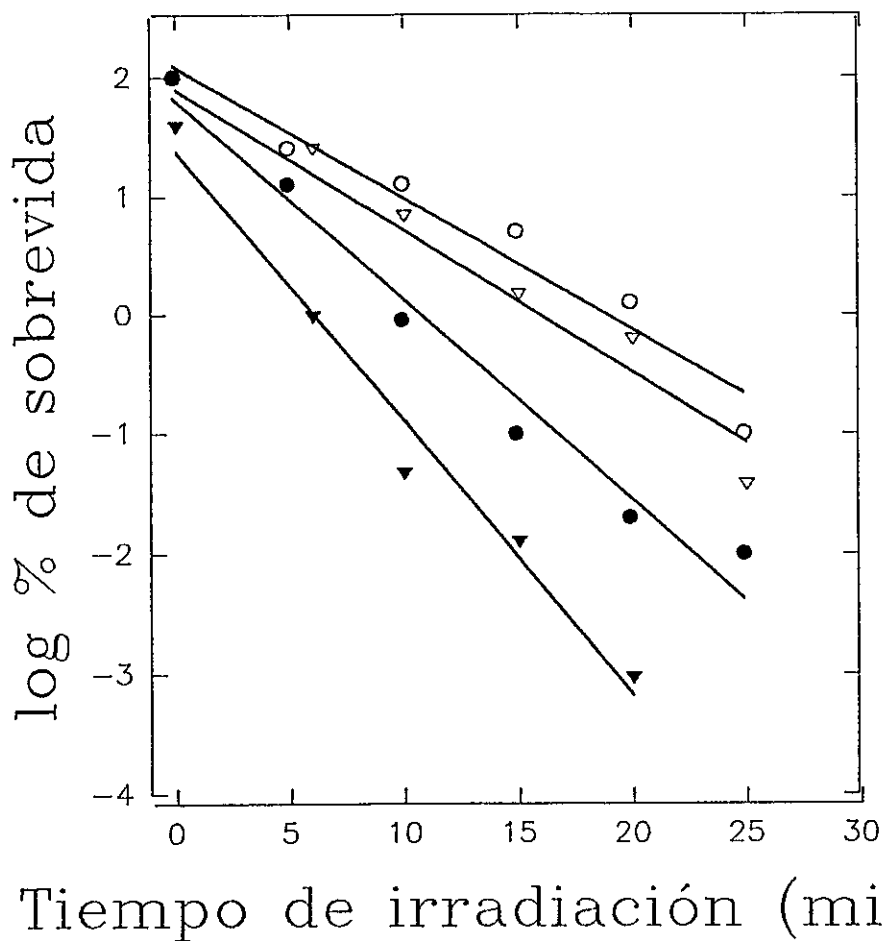


Figura 17: Comparación de las curvas de sobrevida con RUV-B de la cepa silvestre y el clon UB3.

Las células de la cepa silvestre y el clon UB3 fueron irradiados con RUV-B en oscuridad y posteriormente incubadas a 25°C bajo radiación azul (símbolos abiertos) o en ausencia de radiación azul (símbolos cerrados). ●, ○: cepa silvestre y ▼, ▽: clon UB3.

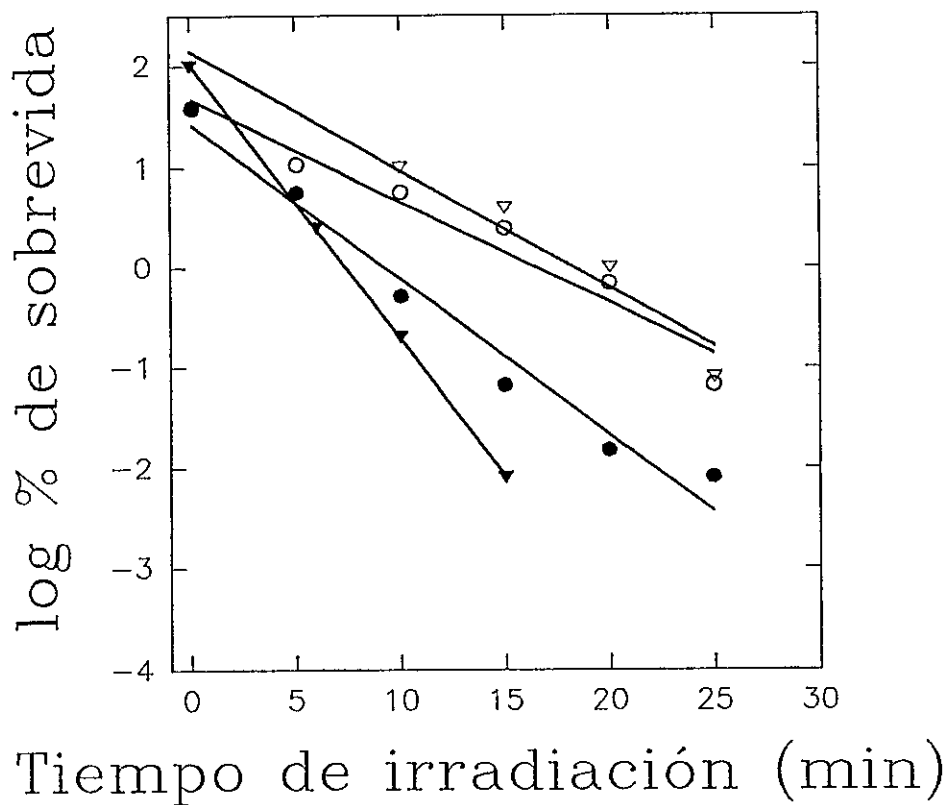


Figura 18: Comparación de las curvas de sobrevida con RUV-B de la cepa silvestre y el clon UB5.

Las células de la cepa silvestre y el clon UB5 fueron irradiados con RUV-B en oscuridad y posteriormente incubadas a 25°C bajo radiación azul (símbolos abiertos) o en ausencia de radiación azul (símbolos cerrados. ●,○: cepa silvestre y ▼,▽: clon UB5).

DISCUSIÓN

La radiación solar es la principal fuente de energía que ingresa a los ecosistemas acuáticos y terrestres. La variabilidad en el espectro y la intensidad de esta radiación produce cambios importantes en el flujo de materia sobre distintas escalas temporales y espaciales. Estas variaciones pueden alterar las interacciones entre poblaciones y comunidades de organismos las cuales están dadas por estos flujos de materia y energía.

La dependencia de la dinámica de los ecosistemas acuáticos a la radiación solar es atribuida a varios foto-procesos: fotosíntesis, fotoinhibición, fototaxis y fotoprotección, mecanismos que han evolucionado durante milenios y que son regulados o al menos influenciados por la composición espectral de la radiación solar.

Es por esto que un aumento de la radiación ultravioleta-B debido a una disminución de la capa de ozono puede alterar los mecanismos indicados anteriormente, con consecuencias desconocidas, ya que si aumenta la RUV-B en la superficie de los cuerpos de agua, esta también se verá

incrementada proporcionalmente a las distintas profundidades de la columna de agua (Smith & Baker, 1979).

Formando parte del fitoplancton en ríos y lagos se encuentra *Oocystis* sp. una microalga Clorófita, la que fue utilizada como modelo para estudiar el efecto de la radiación ultravioleta sobre la sobrevivencia de la microalga.

El género *Oocystis* habita en gran parte de los sistemas acuáticos de nuestro país como por ejemplo en el lago Riñihue, Lago Panguipulli, Cuenca río Valdivia, Laguna Negra y Laguna Aculeo. (Parra *et al*, 1983).

Si comparamos las figuras 9, 11 y 15 correspondiente a las curvas de crecimiento de la cepa silvestre, y las cepas MN18, MN42, UB3 y UB5 podemos apreciar que en todas ellas la radiación ultravioleta-B inhibe el crecimiento de la microalga, si bien hasta el quinto día no existen diferencias significativas con la curva de crecimiento sin radiación ultravioleta-B (control). Las células irradiadas no exhiben crecimiento exponencial manteniendo su número constante (medido como células viables) durante el tiempo de determinación. Esto concuerda con los datos obtenidos por varios autores sobre el efecto negativo de la RUV en la sobrevivencia celular (Van Baalen, 1968; Karentz *et al*, 1991; Smith *et al*, 1992).

La forma de las curvas tampoco presentó diferencias entre los casos analizados ni con curvas de sobrevivencia de otros organismos, (Peak & Peak, 1983) lo cual puede indicar que los tratamientos para diferenciar a las cepas MN18, MN42, UB3 y UB5 de la cepa silvestre no afectaron características fisiológicas que alterarán el comportamiento de sus curvas de crecimiento.

Las curvas de fotorreactivación, en el caso de la cepa silvestre (Fig. 10) sugieren claramente que, al irradiar con RUV-B o RUV-C existe un sistema de reparación de DNA activado por radiación visible, ya que la sobrevivencia se incrementa significativamente en los tratamientos con exposición al intervalo azul del espectro visible. Este efecto según la literatura debiera corresponder a un mecanismo de fotorreparación enzimático específico para dímeros de pirimidina. (Halldal & Taube, 1972; Asato, 1972; Podstavkova *et al*, 1991).

El método de selección de los mutantes, el cual es a su vez mutagénico, pareció ser el adecuado debido a que al comparar las curvas de fotorreactivación de la cepa silvestre con los mutantes, estos últimos presentan una mayor sobrevivencia dada por una pendiente menor en las curvas de sobrevivencia en presencia de radiación visible (Fig. 12), estas diferencias son significativas en comparación con la cepa silvestre según la prueba de

pendientes (t:2.506 para MN42 y t:2.365 para MN18), las curvas de las células incubadas bajo radiación amarilla son iguales a la cepa silvestre según el mismo análisis (t:1.500 para MN42 y t:1.869 para MN18). Esto sugiere que la resistencia exhibida por los mutantes a RUV podría ser consecuencia de una mejor capacidad fotorreactivante.

Las curvas de fotorreactivación de los mutantes fueron realizadas 60 días después de haber sido aislados (aproximadamente 30 generaciones), tiempo suficiente que permite descartar un proceso de aclimatación espectral en la microalga (Falkowski & La Roche, 1991) ya que este tipo de procesos ocurren en una escala de tiempo corta, menor o comparable al tiempo generacional, no es heredable, esta dado por cambios en la concentración de pigmentos y lípidos (Prézelin & Alberte, 1978; Falkowski & Owens, 1980), y cambios a nivel fisiológicos como cambios en el intercambio de oxígeno, respiración y tasa de crecimiento (Falkowski *et al*, 1985).

En este caso particular tampoco se trataría de selección de una mutación preexistente, ya que la cepa utilizada es genéticamente homogénea. En condiciones naturales el mecanismo de fotorreactivación podría exhibir variabilidad genética, de tal manera que la exposición a RUV-B pueda seleccionar aquellos clones más resistentes.

Sin embargo queda pendiente otra comprobación de la real existencia de los mutantes, lo cual no puede realizarse mediante cruzamientos ya que esta microalga solo presenta reproducción asexual, por lo cual se podría analizar su genoma mediante fragmentos de restricción para intentar encontrar la mutación ocurrida, construir una genoteca y luego hibridar con la cepa silvestre y las cepas mutantes tarea que se vería facilitada por la incorporación de la técnica de PCR.

La obtención de dos mutantes con mayor capacidad fotorreactivante respecto de la cepa silvestre, indica que dicho mecanismo puede tener un umbral superior el cual puede ser alcanzado por medio de una mutación. Esta mutación podría afectar a distintos niveles la fotorreactivación, por ejemplo: a) aumentar la velocidad de reacción de la enzima fotoliasa, b) aumentar la concentración intracelular de la enzima mediante la alteración del promotor del gen de la fotoliasa c) alterar el sistema degradativo de la enzima intracelular, reduciendo su tasa de degradación con lo cual aumentaría su concentración en la célula, u otro paso de la vía de reparación.

La obtención de estos mutantes por irradiación con RUV-C genera la posibilidad de que este proceso de inducción mutagénica se dé naturalmente en el medio ambiente pero inducidos por RUV-B, originando de esta manera

mutantes que se pudieran adaptar mejor a un aumento de la radiación ultravioleta producto de la disminución de la capa de ozono.

Ademas, la generación de mutantes resistentes a RUV-B podría darse por otras vías en la naturaleza, por ejemplo, aumentando los pigmentos fotoprotectores, como los carotenoides, aumentando las sustancias absorbedoras de RUV (aminoácidos tipo micosporinas) los cuales son capaces de absorber longitudes específicas dentro de la RUV-B (Karentz *et al* , 1991) o favoreciendo los tipos celulares de mayor tamaño para así evitar que la RUV-B llegue al DNA, sin embargo en el caso de los mutantes aislados en esta tesis, corresponderían más bien a una mutación en el sistema de fotorreactivación que en los últimos descritos ya que de ser así, la sobrevivida en los tratamientos incubados bajo filtro amarillo debería haberse visto incrementada en relación al silvestre debido a que estas mutaciones disminuyen el daño producido por la irradiación RUV-B.

En el caso de los clones obtenidos mediante una dosificación de RUV-B (ver materiales y métodos), las curvas de sobrevivida de las células incubadas en condiciones de radiación visible son iguales a la cepa silvestre según la prueba de pendiente ($t:0.500$ para UB-3 y $t:0.437$ para UB-5) y en el caso de las células incubadas bajo radiación amarilla las curvas fueron

significativamente distintas a la cepa silvestre según la misma prueba ($t:2.985$ para UB-3 y 4.280 para UB-5), siendo en ambos casos la curva de los clones con mayor pendiente que la cepa silvestre.

Al comparar los clones UB3 y UB5 con los mutantes MN18 y MN42 se observa un comportamiento mas complejo debido a que en los clones se aprecia una disminución de la sobrevida en ausencia de radiación fotorreactivante y un aumento de la sobrevida bajo radiación fotorreactivante, en cambio en los mutantes solo se aprecia un cambio de la sobrevida en presencia de radiación fotorreactivante.

Esto nos indica que ambos clones, de alguna manera han disminuido su capacidad de reparar el DNA en condiciones de oscuridad, pero a la vez han aumentado su capacidad fotorreactivante de tal manera que la suma de ambas origina la misma sobrevida final que la cepa silvestre.

Las características fenotípicas de los clones pueden corresponder al resultado de un proceso mutagénico inducido durante el período de exposición dosificada a RUV-B. Por lo tanto estos clones aislados pueden ser considerados "mutantes" ya que sus características son heredables. Estos mutantes así obtenidos pueden ser progresivamente seleccionados durante

los distintos ciclos de irradiación de tal manera que el cultivo final estaría enriquecido en aquellos clones más resistentes.

Si este proceso de mutagénesis y selección esta operando en condiciones naturales, entonces la RUV-B sobre las poblaciones de microalgas podría llegar a producir cambios en la estructura genética de las poblaciones naturales.

PROYECCIONES

Oocystis sp. es un organismo que podría ofrecer ventajas para el estudio de los efectos de la RUV sobre las poblaciones naturales. También podría considerarse como un modelo biológico adecuado para el desarrollo de un sensor biológico de RUV ya que por encontrarse formando parte del fitoplancton son los más expuestos a este tipo de radiación.

Los resultados obtenidos en esta tesis podrían aproximarnos al diseño de un sensor biológico, ya que un aspecto previo es determinar cual es el rol de la RUV-B como agente mutagénico y también como un medio de selección en condiciones naturales. Estos aspectos permitirían calibrar la sensibilidad de un sensor biológico para evaluar los cambios en la magnitud de la RUV-B con significado para los sistemas biológicos

Buenas aproximaciones a un sensor biológico se han realizado, Karentz & Lutze en 1990 diseñaron un sensor biológico a partir de *Escherichia coli* CSRO6, la cual es una mutante deficiente en reparación por escisión y fotorreparación. Las debilidades del modelo son claras ya que *E.*

coli no pertenece naturalmente a ese ambiente y además, siendo un mutante de reparación de DNA, resulta extremadamente sensible a la RUV.

En 1992, Regan *et al*, proponen un dosímetro solar a partir de DNA, los resultados obtenidos fueron claves en reconocer la importancia de un dosímetro biológico, y la poca concordancia con los datos entregados por los métodos ópticos de medición de RUV-B.

El experimento consistió en colocar DNA de secuencia conocida en bolsas transparentes a la RUV-B y ubicarlas a distintas profundidades en el mar (en una zona tropical), luego de cierto tiempo las muestras eran retiradas y cuantificado el número de dímeros de pirimidina que se había formado. Así se mostró que el DNA no se ve afectado mas allá de 4 metros de profundidad, aún cuando los métodos físicos indican una penetración bastante mayor. Sin embargo el modelo sigue no siendo óptimo por que el ambiente intracelular juega un papel relevante en proteger al DNA de la RUV, como por ejemplo, no se encuentran presentes los sistemas de reparación de DNA, por lo cual no estamos tomando en cuenta un factor altamente importante.

Determinar cuales son los sensores más adecuado para evaluar los efectos biológicos de la RUV-B y así poder predecirlos abordando el

problema en su real magnitud requiere de un conocimiento de la biología y la genética del organismo seleccionado, como también conocer sus respuestas frente a cambios en la magnitud y en la calidad de la radiación incidente bajo condiciones naturales.

CONCLUSIONES

Las conclusiones obtenidas con los resultados de esta tesis son las siguientes:

(1) *Oocystis* sp. cuenta con un mecanismo de fotorreparación de DNA activado por luz azul, la cual le permite aumentar en un 42.6% la sobrevivencia después de irradiaciones con RUV-B o en un 38% después de irradiaciones con RUV-C.

(2) Experimentos de mutagénesis permitieron obtener cepas de *Oocystis* sp con un sistema de fotorreparación más eficiente.

(3) La radiación UV-B en presencia de radiación visible puede tener efectos mutagénicos como también actuar como sistema de selección.

4) Debido a que se lograron obtener mutantes más resistentes a RUV-B, *Oocystis* sp. podría enfrentar con éxito un progresivo aumento de RUV-B en su ambiente natural.

BIBLIOGRAFIA:

Akimoto, Y & Shiroya, T. 1987 Changes in the protein complement following UV irradiation and their photoreversal in sea urchin (*Hemicentrotus pulcherrimus*) embryos. *Photochemistry and Photobiology* 45(6): 809-814.

Asato, Y. 1972 Isolation and characterization of ultraviolet light-sensitive mutants of the blue-green alga *Anacystis nidulans*. *Journal of Bacteriology* 110(3):1058-1064.

Bold, H & Wynne, M. 1985 Introduction to the Algae. Ed. Prentice-Hall, Inc, Englewood Cliffs. New Jersey.

Carrasco, A. 1989 Photoreactivating capacity in *Clostridium butyricum* and *Clostridium acetobutylicum*. *Letters in Applied Microbiology* 8:131-134.

Carreto, J.; Carignan, M; Daleo, G & De Marco, S. 1990 Occurrence of Mycosporine-like aminoacides in the redtide dinoflagellate *Alexandrium excavatum*. UV-protective compounds?. *Journal Plankton Research* 12:909-921.

Davies, R. 1980 The Ultraviolet photochemistry of Nucleic Acids and their components. *Photochemistry and Photobiology* 31:623-626.

Falkowski, P. & La Roche, J. 1991 Acclimation to spectral irradiance in Algae. *Journal Phycology* 27:8-14.

Falkowski, P. & Owens, T. 1980 Light-shade adaptation: two strategies in marine phytoplankton. *Plant Physiology* 69:969-973.

Falkowski, P.; Dubinsky, Z & Wyman, K. 1985 Growth-irradiance relationships in marine phytoplankton. *Limnology and Oceanography* 30:311-321.

De Fabo, E; Harding, R & Shropshire, W. 1976 Action spectrum between 260 and 800 nanometers for the photoinduction of carotenoid biosynthesis in *Neurospora crassa*. *Plant Physiology* 57:440-445.

Fuenzalida, H. 1991 Disminución primaveral de ozono sobre la Antártida. Documento presentado a ICSU. Santiago, Chile mimeografiado 20 pg.

Griffiths, A.; Miller, J.; Susiki, D.; Lewontin, R. & Gilbert, W. 1993 Mechanisms of genetic change I: gene mutation In: An introduction to genetic analysis. 5^aEd. W.H Freedman & Company. New York.

Halldal, P & Taube, Ö. 1972 Ultraviolet action and photoreactivation in algae. In: Photophysiology Vol VII Giese A.C. ed. Academic Press, N. York.

Haseltine, W. 1983 Ultraviolet light repair and mutagenesis revisite. *Cell* 33:13-17

Hodges, N; S. Moss & D. Davies. 1980 The Role of pyrimidine dimers and non-dimer damage in the inactivation of *Escherichia coli* by UV radiation. *Photochemistry and Photobiology* 31:571-577

Hopwood, D; K. Chater; J. Dowding & A. Vivian. 1973 Advances in *Streptomyces coelicolor* genetics. *Bacteriological Reviews* 37(3):371-405

Jagger, J. 1958 Photoreactivation. *Bacteriological Reviews*. 22:99-142.

Karentz, D. 1991 Ecological considerations of Antarctic ozone depletions. *Antarctic Science* 3(1):3-11.

Karentz, D; Cleaver, J. & Mitchell, D. 1991 Cell survival characteristic and molecular responses of Antarctic phytoplankton to ultraviolet-B radiation. *Journal Phycology* 27:326-341.

Karentz, D. & Lutze, L. 1990 Evaluation of biologically harmful ultraviolet radiation in Antarctica with a biological dosimeter designed for aquatic environments. *Limnology and Oceanography* 35(3):549-561

Karentz, D; McEuen, F; Land, M. & Dunlap, W. 1991 Survey of mycosporine-like amino acid compounds in Antarctic marine organisms: potential protection from ultraviolet exposure. *Marine Biology* 108:157-166

Kerr, J. & McElroy, C. 1993 Evidence for large upward trends of ultraviolet-B radiation linked to ozone depletion. *Science* 262:1032-1034.

Lippke, J; Gordon, L.; Brash D. & Haseltine, W. 1981 Distribution of UV light-induced damage in a defined sequence of human DNA: Detection of alkaline-sensitive lesions at pyrimidine nucleoside-cytidine sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 78(6):3388-3392.

- Mitchell, D; Jen, J. & Cleaver, J. 1992** Sequence specificity of cyclobutane pyrimidine dimers in DNA treated with solar (ultraviolet B) radiation. *Nucleic Acids Research* 20(2): 225-229
- Mitchell, D. & Karentz, D. 1993** The induction and repair of DNA photodamage in the environment. In: Environmental UV photobiology. Ed. by A. Young et al. Plenum Press, New York.
- Murphy, T. 1983** Membranes as targets of ultraviolet radiation. *Physiology plantarum*. 58:381-388
- Parra, O; Gonzalez, M & Dellarossa, V. 1983** Chlorophyceae. En: Manual taxonómico del fitoplancton de aguas continentales. Ed. Universidad de Concepción.
- Peak, M. & Peak, J. 1982** Single-strand breaks induced in *Bacillus subtilis* DNA by ultraviolet light: action spectrum and properties. *Photochemistry and Photobiology* 35:675-680.

Peak, M. & Peak, J. 1983 Use of action spectra for identifying molecular targets and mechanisms of action of solar ultraviolet light. *Physiology Plantarum* 58:367-372.

Podstavková, S; Miadoková, E. & Vlcek, D. 1991 Induction of new UV-sensitive mutants of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Archiv Protistenkunde* 139:201-206

Prézelin, B & Alberte, R. 1978 Photosynthetic characteristics and organization chlorophyll in marine dinoflagelates. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 75: 1801-1804.

Regan, J.; Carrier, W.; Gucinski, H.; Olla, B.; Yoshida, H.; Fujimura, R. & Wicklund, R. 1992 DNA as a solar dosimeter in the ocean. *Photochemistry and Photobiology* 56(1): 35-42.

Robberecht, R. 1989 UV radiation effects, DNA repair and mutagenesis. In: The Science of Photobiology. Ed. K.C. Smith. Plenum press, New York. pp. 111-133.

- Roy, C; Gies, P. & Elliot, G. 1990** Ozone depletion. *Nature* 347:235-236.
- Sancar, G. 1990** DNA photolyases: physical properties, action mechanism, and roles in dark repair. *Mutation Research* 236:147-160
- Setlow, R & Carrier, W. 1966** Pyrimidine dimers in ultraviolet-irradiated DNA's. *Molecular Biology* 17:237-254.
- Smith, R & Baker, K. 1979** Penetration of UV-B and biologically effective dose-rates in natural waters. *Photochemistry and Photobiology* 29:311-323.
- Smith, R; Prézelin, B.; Baker, K.; Bidigare, R.; Boucher, N.; Coley, T.; Karentz, D.; MacIntyre, S.; Matlick H.; Menzies, D.; Ondrusek, M.; Wan, Z. & Waters, K. 1992** Ozone depletion: Ultraviolet radiation and phytoplankton biology in Antarctic waters. *Science* 255:952-959

- Van Baalen C. 1968** The effects of ultraviolet irradiation on a Coccoid blue-green alga: Survival, photosynthesis, and photoreactivation. *Plant Physiology* 43:1689-1695.
- Vincent, W. & Roy, S. 1993** Solar ultraviolet-B radiation and aquatic primary production: damage, protection, and recovery. *Environmental Reviews* 1:1-12.
- Weiler, C. 1988** Radiation and biological Antarctic. Workshop on UV. National Science Foundation, Washington D.C.
- Woodhead, A. & Achey. P. 1979** Photoreactivating enzyme in the blind cave fish, *Anoptichthys jordani*. *Comparative Biochemistry Physiology* 63:73-76