

DOC-17
H 557 es
c. 1

**ESTUDIO DE LA ORGANIZACIÓN DEL GENOMA
DE *Phaffia rhodozyma***

Tesis

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

Facultad de Ciencias

por

Germán Humberto Hermosilla Díaz

1997



Director de Tesis: Dr. Víctor Cifuentes Guzmán

Co-Director: Dr. Guido Pincheira Vega

**FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE**

INFORME DE APROBACION

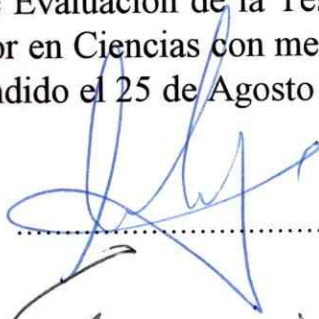
TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Comisión de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato:

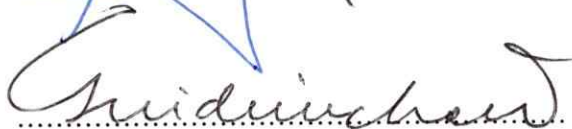
Germán Humberto Hermosilla Díaz

ha sido aprobada por la Comisión de Evaluación de la Tesis como requisito de Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Biología, en el examen de Defensa de Tesis rendido el 25 de Agosto de 1997.

Director de Tesis:
Dr. Víctor Cifuentes Guzmán

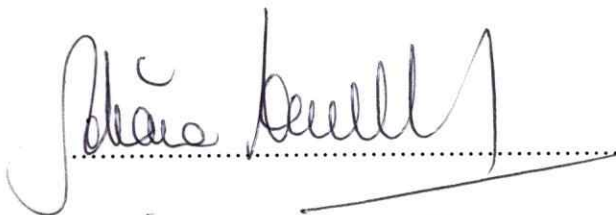


Co-Director de Tesis:
Dr. Guido Pincheira Vega



Comisión Informante de Tesis:

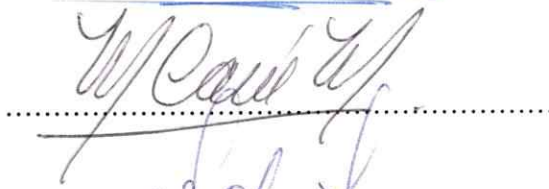
Quím. Farm. Eliana Canelo



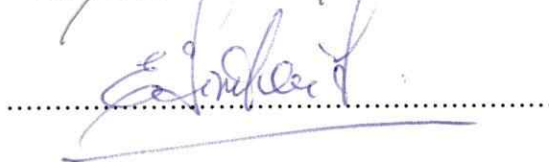
Dra. Liliana Cardemil



Dra. Margarita Carú



Dr. Eduardo Piontelli



A mis Padres

Belisario Herмосilla y Carmen Díaz

Por su amor y apoyo

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a todas las personas que de una u otra forma han estado ligadas al desarrollo y conclusión de esta Tesis.

En especial, quiero dar gracias a mi tutor, el Dr. Victor Cifuentes, por todo su apoyo brindado, por compartir su experiencia y por sobre todo por su amistad. También al Dr. Guido Pincheira por sus consejos y críticas. Al Dr. Claudio Martínez, quién a través de su amistad y estímulo ha sabido alentarme en forma oportuna en aquellas etapas difíciles.

A todos los miembros del subcomité de Genética, quienes siempre han estado interesados en mi formación. A la Dra. Madeleine Lamborot por facilitar la realización de los experimentos de microscopía de epifluorescencia.

A mis amigos de laboratorio, Blanca Urzúa, Rafael Negrete, Rubén León y Patricio Retamales, quienes fueron partícipes de este esfuerzo a través de sus discusiones, ideas y sugerencias, brindándome además su valiosa amistad.

A mis amigos, Fredy Díaz, Patricio Pellet, René Rubilar y Juan Carlos Retamal, quienes a pesar de la distancia, siempre han demostrado una estimuladora preocupación por mi desarrollo académico.

A mis padres Belisario Hermosilla y Carmen Díaz y mis hermanas Kattia, Alejandra, Elizabeth y Ximena que en todo momento han estado a mi lado con su cariño y amor.

INDICE GENERAL

	página
AGRADECIMIENTOS	iii
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABLAS	x
ABREVIATURAS	xii
RESUMEN	xiii
ABSTRACT	xvi
INTRODUCCION	1
MATERIALES Y METODOS	13
I. Materiales	13
1. Material biológico	13
1.1 Bacterias	13
1.2 Levaduras	13
1.3 Plásmidos	14
1.4 Enzimas	14
1.5 Acidos desoxirribonucleicos	15
2. Reactivos químicos y medios de cultivo	15
3. Sistemas de purificación y marcado radioactivo de ácidos nucleicos	16
4. Equipos	17
II. Métodos	18
1. Cultivos de microorganismos	18
1.1 Bacterias	18
1.2 Levaduras	18
2. Mantenición de cepas	18

2.1 Bacterias	18
2.2 Levaduras	19
3. Mutagénesis	19
3.1 Nitrosoguanidina	19
3.2 Radiación ultravioleta	20
3.3 Enriquecimiento con nistatina	20
3.4 Selección de mutantes auxótrofos	21
3.5 Determinación de auxotrofia	21
4. Formación de protoplastos	21
4.1 Enzima lítica	21
5. Análisis parasexual	22
5.1 Fusión de protoplastos	22
5.2 Análisis de los fusantes	24
5.2.1 Tinción de núcleos de <i>Phaffia rhodozyma</i> y <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	24
5.2.2 Curvas de crecimiento	25
5.2.3 Pigmentos	25
5.3 Análisis de descendencia	26
6. Purificación de DNA	26
6.1 DNA plasmidial	26
6.2 Extracción de DNA desde geles de agarosa	27
6.3 DNA genómico de <i>P. rhodozyma</i>	28
6.3.1 Formación de protoplastos	28
6.3.2 Extracción de ácidos nucleicos	29
7. Transformación genética	30
7.1 <i>Escherichia coli</i>	30
7.1.1 Células competentes	30
7.1.2 Transformación	31
7.1.3 Selección de clones con inserto	31
8. Análisis de DNA	32

8.1 Subclonamiento gen de actina	32
8.2 Subclonamiento gen de β -tubulina	32
8.3 Mapas de restricción	33
8.4 Hibridación DNA-DNA	34
8.4.1 Marcado de las sondas	34
8.4.2 Hibridación	35
8.5 Hibridación en librería genómica	36
8.6 Hibridación de DNA en colonia	37
8.7 Secuenciación	38
8.7.1 Preparación de la muestra	39
8.7.2 Denaturación alcalina	39
8.7.3 Reacción de marcaje	39
8.7.4 Reacción de terminación	39
8.7.5 Gel de secuenciación: Sistema "Base Ace de Stratagene tm "	40
8.7.6 Autorradiografía	41
9. Separación de DNA cromosómico	41
9.1 <i>P. rhodozyma</i>	41
9.2 <i>S. cerevisiae</i>	42
9.3 Electroforesis de campo pulsado	43
9.4 Hibridación	43
10. Formación y análisis de heterocigotos	44
10.1 Reversión de mutantes por NTG	44
10.2 Mutagénesis de las cepas revertantes	45
10.3 Selección e identificación de mutantes	45
10.3.1 Mutantes de color	45
10.3.2 Mutantes auxótrofos	46
RESULTADOS	47
1. Electroforesis de campo pulsado	47
2. Asignación de sondas a las bandas cromosómicas de <i>P. rhodozyma</i>	50
3. Selección de mutantes auxótrofos en <i>P. rhodozyma</i>	59

4. Formación de protoplastos	65
5. Fusión de protoplastos y análisis de descendencia	71
5.1 Fusión de mutantes de pigmentación	71
5.2 Fusión de dobles mutantes	74
6. Clonamiento genes de actina y β -tubulina	89
7. Formación de revertantes	99
8. Comportamiento de los revertantes en la mutagénesis	101
DISCUSION	105
CONCLUSIONES	136
PROYECCIONES	138
Apéndice N°1	140
Apéndice N°2	142
Apéndice N°3	147
Apéndice N°4	148
BIBLIOGRAFIA	149

LISTA DE FIGURAS

	Página
Fig. 1 : Cariotipo electroforético de <i>Phaffia rhodozyma</i> , cepa silvestre UCD 67-385.	48
Fig. 2 : Cariotipo electroforético de <i>Phaffia rhodozyma</i> , cepas silvestres UCD 67-385 y UCD 67-210.	49
Fig. 3 : Alineamiento de secuencia entre el gen <i>ef-1α</i> de <i>Phaffia rhodozyma</i> y <i>ef-1α</i> de otros organismos.	55
Fig. 4 : Hibridación de la sonda transportando secuencias de <i>ef-1α</i> con la banda cromosómica VIII de la cepa UCD 67-385.	56
Fig. 5 : Hibridación de la sonda transportando DNA repetitivo con la banda cromosómica I de varias cepas de <i>Phaffia rhodozyma</i> .	57
Fig. 6 : Hibridación de la sonda transportando el locus <i>R2</i> con las bandas cromosómicas VIII y IX de varias cepas de <i>Phaffia rhodozyma</i> .	58
Fig. 7 : Hibridación de la sonda pPR1.4-12 transportando un fragmento <i>Bam</i> HI 1.4 kb con la banda cromosómica I de <i>Phaffia rhodozyma</i> .	60
Fig. 8 : Hibridación de la sonda pPR5.0 transportando un fragmento <i>Bam</i> HI de 5.0 kb con la banda cromosómica I de <i>Phaffia rhodozyma</i> .	61
Fig. 9 : Hibridación de la sonda pPR1.4-6 transportando un fragmento <i>Bam</i> HI de 1.4 kb con la banda cromosómica II de <i>Phaffia rhodozyma</i> .	62
Fig. 10 : Formación de protoplastos en la cepa silvestre UCD 67-210.	68
Fig. 11 : Formación de protoplastos en la cepa silvestre UCD 67-385.	69
Fig. 12 : Formación de protoplastos en la cepa silvestre UCD 67-383.	70

Fig. 13 : Célula de <i>Phaffia rhodozyma</i> multicariótica.	75
Fig. 14 : Célula madre y su yema dicariótica de <i>Phaffia rhodozyma</i> .	76
Fig. 15 : Curvas de crecimiento de la cepa silvestre UCD 67-385 y fusantes Atx3; Aux : Atx5; Ade.	79
Fig. 16 : Células de una fusante Atx3; Aux : Atx5; Ade.	80
Fig. 17 : Colonia Fs21 presentando estructuras sexuales.	86
Fig. 18 : Células de <i>Phaffia rhodozyma</i> con estructuras sexuales.	87
Fig. 19 : Tinción DAPI de las estructuras sexuales de <i>Phaffia rhodozyma</i> .	88
Fig. 20 : Mapa de restricción del plásmido pYact I.	90
Fig. 21 : Esquema de clonamiento de los plásmidos pGHac I y pGHtu I.	91
Fig. 22 : Mapa de restricción del cósmido 3 :11H.	92
Fig. 23 : Hibridación del gen de β -tubulina contra DNA de la librería genómica de <i>Phaffia rhodozyma</i> .	94
Fig. 24 : Hibridación DNA-colonia, utilizando el gen β -tubulina como sonda.	95
Fig. 25 : Mapas de restricción de los clones seleccionados por hibridación con β -tubulina.	97
Fig. 26 : Diseño experimental del análisis de recombinación mitótica.	128
Fig. 27 : Intercambio de material genético entre cromosomas homólogos, durante la mitosis.	130

LISTA DE TABLAS

	Página
Tabla 1 : Tamaño de las bandas cromosómicas de la cepa silvestre UCD 67-210.	51
Tabla 2 : Tamaño de las bandas cromosómicas de la cepa silvestre UCD 67-385.	52
Tabla 3 : Plásmidos utilizados para la asignación de sondas al cariotipo electroforético de <i>Phaffia rhodozyma</i> .	53
Tabla 4 : Frecuencia de mutantes auxótrofos en <i>Phaffia rhodozyma</i> .	63
Tabla 5 : Frecuencia de mutantes auxótrofos en <i>Phaffia rhodozyma</i> después del enriquecimiento con nistatina.	64
Tabla 6 : A. Efecto del medio de cultivo en la formación de protoplastos con novozima. B. Formación de protoplastos de <i>Phaffia rhodozyma</i> con distintas enzimas líticas.	66 66
Tabla 7 : Resultados de los experimentos de fusión entre cepas mutantes de pigmentación de <i>Phaffia rhodozyma</i> .	72
Tabla 8 : Análisis de descendencia de colonias sectorizadas de varias fusiones.	73
Tabla 9 : Fusión entre cepas dobles mutantes de <i>Phaffia rhodozyma</i> .	77
Tabla 10 : Distribución de núcleos en cepas de <i>Phaffia rhodozyma</i> .	81
Tabla 11 : Síntesis de astaxantina en algunos fusantes Atx3; Aux : Atx5; Ade.	83
Tabla 12 : Análisis de descendencia de los productos de la fusión Atx3; Aux : Atx5; Ade.	84

Tabla 13 : Clones seleccionados desde la hibridación en colonia.	96
Tabla 14 : Análisis de restricción de los clones seleccionados por hibridación con β -tubulina.	98
Tabla 15 : Obtención de revertantes de <i>Phaffia rhodozyma</i> mediante mutagénesis con NTG.	100
Tabla 16 : Mutagénesis de los revertantes Atx10 y Adel de <i>Phaffia rhodozyma</i> .	103
Tabla 17 : Frecuencia de mutantes, obtenidos por mutagénesis con NTG, en cepas revertantes de <i>Phaffia rhodozyma</i> .	104
Tabla 18 : Estimación del contenido de DNA por célula en cepas silvestres de <i>Phaffia rhodozyma</i> .	133

ABREVIATURAS

BSA	albúmina sérica de bovino
CHEF	campo eléctrico de contorno homogéneo
DAPI	4,6-diamino-2-fenilindol
DNA	ácido desoxirribonucleico
DO	densidad óptica
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido etilendiaminotetracético
IPTG	isopropil β -D-tiogalactopiranosido
kb	kilobases
LB	medio Luria Bertani
Mb	megabases
MM _v	medio mínimo Vogel
NTG	N-metil-N'-nitro-nitrosoguanidina
PBS	tampón fosfato salino
PEG	polietilenglicol
RAPD	polimorfismo del DNA por amplificación al azar
RFLP	polimorfismo de largo de los fragmentos de restricción
RNA	ácido ribonucleico
RNAsa A	ribonucleasa A
SDS	dodecil sulfato de sodio
TAE	tampón tris-acetato-EDTA
TBE	tampón tris-borato-EDTA
TE	tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-tetra-metiletildiamina
Tris	tris(hidroximetil)aminometano
UV	ultravioleta
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β D-galactopiranosido
YEP	medio rico para <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
YM	medio rico para <i>Phaffia rhodozyma</i>

RESUMEN

Phaffia rhodozyma es una levadura de alto interés biotecnológico por su capacidad de sintetizar astaxantina (3,3'-dihidroxi- β,β -caroten-4,4'-diona) como su principal pigmento, dando lugar a la realización de diversos estudios orientados a dilucidar aspectos fisiológicos y genéticos de la carotenogénesis.

Aunque recientemente se ha descrito la fase sexual de *Phaffia rhodozyma*, existe un escaso conocimiento genético de este organismo debido a la imposibilidad de realizar estudios con metodologías genéticas clásicas. Esto ha significado un obstáculo para resolver aspectos de su biología, tales como la organización general y tamaño de su genoma, el número de sus cromosomas, su nivel de ploidía, etc.

En esta Tesis, se ha podido determinar el cariotipo de *P. rhodozyma* mediante electroforesis de campo pulsado. Los resultados obtenidos, en las cepas silvestres UCD 67-210 y UCD 67-385, sugieren un número haploide de 15 cromosomas y un tamaño genómico haploide de 25.3 Mb y 23.9 Mb, respectivamente. Los tamaños de los cromosomas pueden variar entre 2.5 Mb y 350 kb. Los patrones electroforéticos en ambas cepas silvestres dejaron en evidencia un alto grado de polimorfismo cromosómico. El origen del polimorfismo cromosómico es aún desconocido, pero probablemente comprende rearrreglos cromosómicos, como lo indica la pérdida de una

banda cromosómica electroforética (banda IX) en la cepa mutante Atx6 derivada de UCD 67-385.

La utilización de sondas permitió la identificación de cromosomas específicos. En las cepas silvestres, la banda cromosómica electroforética I fue identificada por hibridación con la sonda pPR7.6 (conteniendo DNA repetitivo de *P. rhodozyma*), la banda cromosómica electroforética VIII por hibridación con la sonda pPR5.6 (conteniendo la secuencia parcial de *ef-1 α*) y las bandas VIII y IX por hibridación con la sonda pPR5.3 (fragmento *Bam* HI de 5.3 kb de función desconocida).

Con respecto al análisis genético, se desarrolló un sistema de análisis basado en la parasexualidad, mediada por la obtención y fusión de protoplastos. Ello ha permitido establecer relaciones de dominancia entre genes y hacer pruebas de complementación entre diferentes mutantes de carotenogénesis y auxotrofia. En los análisis de segregación, fue posible obtener fenotipos recombinantes entre los segregantes, probablemente originados por recombinación mitótica. Por otro lado, la fusión de protoplastos generó fusantes con la capacidad de formar estructuras sexuales consistentes en un largo holobasidio con 4 a 6 basidiosporas terminales.

La fase sexual en *P. rhodozyma* ocurre por pedogamia, a través de la conjugación de la célula madre con su yema. Por lo tanto, el evento de fusión entre cepas con distintos marcadores y posterior inducción de la fase sexual en los fusantes derivados puede ampliar el análisis genético.

El nivel de ploidía de *P. rhodozyma* es aún desconocido, aunque hay pruebas indirectas que apuntan a un estado diploide. Esta Tesis, presenta dos líneas de evidencias

experimentales, independientes, que sugieren la condición diploide. Primero, experimentos de mutagénesis con nitrosoguanidina, en cepas revertantes, mostraron frecuencias de mutaciones mayores a la cepa silvestre UCD 67-385. Esto indica una condición heterocigota para los revertantes y homocigota dominante para la cepa silvestre. La alta tasa de mutagénesis en los revertantes se explica por recombinación mitótica más que por mutación *de novo*. Al parecer, la recombinación mitótica ocurrió a través del intercambio de material genético entre cromosomas homólogos.

Segundo, el contenido haploide de DNA por célula, estimado en este trabajo por métodos electroforéticos, es de 40 fg para UCD 67-210 y 37.8 fg para UCD 67-385. Estos valores representan aproximadamente el 50% del contenido de DNA por célula determinado químicamente por otros estudios en ambas cepas silvestres, 74.3 fg y 75.8 fg, respectivamente. Por lo tanto, esta extensión del análisis del cariotipo electroforético obtenido en las cepas silvestres UCD 67-210 y UCD 67-385 también demuestra la condición diploide de *P. rhodozyma*.

ABSTRACT

Phaffia rhodozyma is a yeast with a high biotechnological interest due to its capacity to synthesize astaxanthin (3,3'-dihydroxy- β,β -carotene-4,4'-dione) as its principal pigment. Many studies have been oriented to know the physiological and genetic aspects of carotenogenesis in this organism.

Though, recently, the sexual phase of *Phaffia rhodozyma* life cycle has been described, the genetic knowledge of this organism is very limited. This has been an obstacle to know the general organization and size of its genome, its chromosome number and the level of ploidy in different strains.

In this thesis, it has been possible to determine the karyotype of *P. rhodozyma* by pulsed-field electrophoresis. The results obtained suggest an haploid number of 15 chromosomes in the wild type strains UCD 67-210 and UCD 67-385, and haploid genomic sizes of 25.3 Mb and 23.9 Mb, respectively. The size of the chromosomes may vary between 2.5 Mb and 350 kb. The electrophoretic patterns in both wild type strains gave evidence of a high degree of chromosome length polymorphism, whose origin is yet unknown, but probably involve chromosome rearrangements, as indicated by the loss of an electrophoretic chromosome band (band IX) in the mutant strain Atx6, derived from UCD 67-385.

The utilization of different probes allowed the identification of specific chromosomes. In the wild type strains, the electrophoretic chromosome band I was identified by hybridization with the probe pPR7.6 (DNA repetitive of *P. rhodozyma*). Similarly, the electrophoretic chromosome band VIII was identified by hybridization with the probe pPR5.6 (ef-1 α) and the bands VIII and IX by hybridization with the probe pPR5.3 (fragment *Bam* HI of 5.3 kb).

With respect to the genetic analysis, a system based on parasexual characters, mediated by the formation and fusion of protoplasts, was developed. This has permitted to establish relationships of dominance between alleles of certain genes and to make complementation tests between different carotenogenetic and auxotrophic mutants. In the segregation analysis, it was possible to obtain recombinant phenotypes between the segregants, originated probably by mitotic recombination. On the other hand, the fusion of protoplasts generated fusants with the capacity to form sexual structures consistent in a slender holobasidium with 4-6 terminal basidiospores. The *P. rhodozyma* sexual phase occurs through the conjugation of the mother cell with its bud, a process known as pedogamy. Therefore, the fusion event between strains with different markers and subsequent induction of the sexual phase in the derived fusants may widen the perspectives for genetic analysis.

The level of ploidy of *P. rhodozyma* is still a matter of controversy, though there are indirect evidences pointing to a basic diploid condition. This thesis presents two experimental independent lines suggesting this character. First, the mutagenesis experiments with nitrosoguanidine in revertant strains revealed higher mutation

frequencies in comparison with those observed in the wild type strain UCD 67-385. This seems to indicate a heterozygous condition for the revertants and a homozygous dominant character for the wild type strain. The high rate of mutagenesis in the revertants may be better explained by mitotic recombination than by *de novo* mutation. Apparently, the mitotic recombination occurred through mitotic crossing over.

Second, the estimated haploid DNA content per cell, by electrophoretic methods, is 40 fg for UCD 67-210 and 37.8 fg for UCD 67-385. These values represent approximately 50% of the DNA content per cell determined chemically by other studies in the wild type strains, 74.3 fg and 75.8 fg respectively. Therefore, the results of the analysis of the electrophoretic karyotype obtained in the wild type strains UCD 67-210 and UCD 67-385 also demonstrates the diploid condition of *P. rhodozyma*.

INTRODUCCION

Phaffia rhodozyma es una levadura fermentativa de coloración rojo-naranja, aislada desde exudados de árboles en Alaska (Lago Rainbow) y Japón (Islas Hokkaido y Honshu), (Miller *et al.*, 1976). También ha sido encontrada en el árbol *Betula verrucosa*, en regiones frías de Rusia, (Golubev, 1995).

Phaffia rhodozyma se caracteriza por presentar una pared celular estructurada en multicapas, formar yemas enteroblásticas y clamidosporas que germinan por yemación, no originar micelio, sintetizar pigmentos carotenoides (principalmente xantófilas), producir compuestos amiloides y ser capaz de fermentar azúcares. Sus células son elipsoidales de 3.8 a 7.5 μm por 5.5 a 10.5 μm , uninucleadas y frecuentemente yeman en el mismo sitio. Además, posee un contenido G + C de 48.3 mol% (Miller *et al.*, 1976).

El origen filogenético de *P. rhodozyma* fue definido como basidiomicete por Miller *et al.* (1976), basándose en sus siguientes características: la alta proporción de α -1,3-glucano en la pared celular; la habilidad de hidrolizar urea, la incapacidad para utilizar inositol, y la formación de compuestos amiloides, siendo los dos primeros rasgos encontrados más frecuentemente en basidiomicetes que en ascomicetes. Por otro lado, *P. rhodozyma* contiene pigmentos carotenoides, los cuales no se observan en levaduras ascomicetes. Sin embargo, la evidencia más fuerte acerca de su origen filogenético es su

pared celular estructurada en multicapas y la cicatriz dejada por repetidas yemaciones en el mismo lugar, propias de los basidiomicetes.

Posteriormente, el origen basidiomicete de *P. rhodozyma* fue confirmado por la presencia del sistema ubiquinona Q-10, característico de basidiomicetes, y 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).

Hasta hace muy poco, *P. rhodozyma* fue clasificada como una levadura imperfecta por desconocerse la fase sexual de su ciclo reproductivo. En general, una cepa con sólo un tipo de apareamiento es considerada como una especie imperfecta, hasta que una cepa con un tipo de apareamiento opuesto sea descubierta y la condición fisiológica celular haga posible el apareamiento sexual. Alternativamente, pueden existir cepas que son incapaces de esporular, ya sea por la falta de los genes relacionados con la formación de esporas o la no expresión de los mismos, la presencia de un amplio aneuploidismo que determina la inviabilidad de los segregantes, o bien la necesidad de un particular estado fisiológico celular que puede ser determinado por condiciones ambientales. De acuerdo a Golubev (1995), esta última opción parece ser el caso de *P. rhodozyma*. La condición de estrés hídrico, existente en su hábitat natural, fue simulada por incubación de *P. rhodozyma* en un medio que contenía alcoholes polihídricos (Golubev, 1995). Estas condiciones inducen la fase sexual de *P. rhodozyma* por pedogamia, proceso en el cual el núcleo de la célula madre se conjuga con el núcleo de la célula hija (Golubev, 1995). Después de esto se desarrolla un largo holobasidio de 70 a 80 μm de longitud y de 2 a 3.5 μm de diámetro, el cual presenta de 4 a 6 basidiosporas

terminales ovales o elipsoidales de 4 x 8 μm . Debido a que este ciclo de vida es desconocido en levaduras basidiomicetes Golubev (1995) propone el nuevo género y especie *Xanthophyllomyces dendrorhous* para el estado perfecto de *P. rhodozyma*.

Las características de *P. rhodozyma* de sintetizar xantófilas, principalmente astaxantina, y de fermentar glucosa, la convierten en una fuente natural de pigmentos para la industria de la salmonicultura (Johnson *et al.*, 1977; Johnson, 1992). Por esta razón, en los últimos años, los estudios realizados en *P. rhodozyma* han estado especialmente dirigidos a la carotenogénesis, con énfasis en sus aspectos 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). 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, 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).

Experimentos de fusión de protoplastos entre *P. rhodozyma* y *Saccharomyces cerevisiae* o *Cryptococcus laurentii*, tendientes a generar híbridos con propiedades más ventajosas para el manejo industrial y genético de la carotenogénesis, no han sido exitosos (Ducrey *et al.*, 1992). Aunque los autores indican haber obtenido híbridos relativamente estables entre *Phaffia* y *Saccharomyces*, estos no fueron capaces de producir astaxantina. Por otro lado, experimentos de fusión involucrando cepas mutantes de *P. rhodozyma* han generado fusantes con un aumento de la producción de astaxantina (Chun *et al.*, 1992).

Por otra parte, a partir de experimentos con cepas sobreproductoras de astaxantina, mutantes albinas, mutantes que acumulan β -caroteno y cepas silvestres se ha llegado a establecer el rol protector de los carotenoides contra el estrés oxidativo impuesto sobre *P. rhodozyma* por sustancias antifúngicas fotogeneradas por el árbol huésped *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 rol importante en la regulación de la biosíntesis de carotenoides.

Tal como se indicó anteriormente, 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 lo representan las mutaciones auxotróficas (Adrio *et al.*, 1993; Chun *et al.*, 1992; Palagyi *et al.*, 1995).

Aunque hay pocos trabajos en biología molecular, se puede destacar la reciente transformación de células de *P. rhodozyma* utilizando un vector capaz de replicarse en la levadura. Dicho plásmido porta el marcador seleccionable URA3 de *S. cerevisiae* y el gen de resistencia a kanamicina (Km^R) del transposón bacterial Tn903. (Adrio & Veiga, 1995). También, se han clonado genes de *P. rhodozyma*, como el gen de actina, el que fue analizado a nivel de su secuencia y estructura (Wery *et al.*, 1996). Este estudio demostró que el procesamiento de los intrones del gen de actina en *P. rhodozyma* difiere del que ocurre en *S. cerevisiae* (Wery *et al.*, 1996). Además del clonamiento del gen de actina, se ha intentado aislar los genes relacionados con la vía de síntesis de astaxantina (Martínez, 1995).

Existen hasta ahora muy pocos estudios orientados a reunir información en relación a 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). Una falta de correlación entre la variabilidad genética estimada por RAPD y la estimada por isoenzimas también fue encontrada en *Candida albicans* (Scherer & Magee, 1990).

Además, se ha descrito la presencia de cuatro moléculas de RNA de doble hebra en la cepa UCD 67-385, designados como L, M, S₁ y S₂, cuyos tamaños moleculares son 4.3, 3.1, 0.9 y 0.75 kb, respectivamente. 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 reciente descubrimiento del estado perfecto en *P. rhodozyma* trae consigo nuevas interrogantes, tales como: ¿qué fase es predominante en su ciclo de vida, la fase sexual o la asexual? y en este mismo sentido, ¿qué fase ha contribuido más a la variabilidad genética representada en los patrones de RAPD y polimorfismo cariotípico encontrados en *Phaffia*? ¿cuál es el valor adaptativo de la pedogamia en términos de variabilidad genética? y ¿representa el polimorfismo cariotípico alguna limitación al proceso de meiosis durante la esporulación?

El escaso conocimiento genético de *P. rhodozyma* representa un enorme obstáculo para responder tales 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.

Antecedentes sobre la organización general del genoma de *P. rhodozyma* son desconocidos. Existe limitada información sobre el tamaño de su genoma, el número de sus cromosomas y su nivel de ploidía. Además, se desconoce en qué grado distintas cepas silvestres de *P. rhodozyma* poseen una organización genómica común o muestran variaciones que representan grupos taxonómicos diferentes dentro de la especie. Por lo tanto, es necesario realizar esfuerzos tendientes a estudiar la organización del genoma de *P. rhodozyma* que contribuyan a su mejor conocimiento genético.

Intentos de profundizar genéticamente en aspectos de su biología sin contar con tales antecedentes incrementará el esfuerzo invertido y será una fuente constante de confusión en el análisis de resultados experimentales. Este ha sido el caso en la levadura imperfecta, *Candida albicans*, un agente común de infecciones micóticas (Poulter *et al.*, 1981; Pomés *et al.*, 1985).

El estudio del cariotipo electroforético en *C. albicans* mediante electroforesis de campo pulsado reveló información importante acerca de su organización genómica. Ha sido la prueba gráfica de la naturaleza diploide de *Candida* y ha revelado la existencia de un gran polimorfismo cromosómico entre distintas cepas de la especie (Magee & Magee, 1987; Snell *et al.*, 1987; Doi *et al.*, 1992). Además, permitió estimar el tamaño de su genoma y el número de sus cromosomas (Doi *et al.*, 1992). En general, la electroforesis de campo pulsado ha provisto información en relación a la organización genómica de muchos eucariotas inferiores, tales como *Saccharomyces cerevisiae* (Carle & Olson, 1985), *Schizosaccharomyces pombe* (Smith *et al.*, 1987), *Neurospora crassa* (Orbach *et*

al., 1988), *Aspergillus nidulans* (Brody & Carbon, 1989), *Kluyveromyces* (Sor & Fukuhara, 1989), *Phytophthora megasperma* (Howlett, 1989), *Pichia stipitis* (Passoth *et al.*, 1992), *Pycnoporus cinnabarinus* (Cifuentes y Martínez, 1992), y *Coprinus cinereus* (Zolan *et al.*, 1994). Por tales razones, se espera que tal metodología entregue valiosa información al estudio del genoma de *P. rhodozyma*.

Además, el nivel de ploidía en *C. albicans* fue resuelto al demostrar que varias cepas clínicas, después de ser irradiados por luz ultravioleta, daban un espectro de auxótrofos restringido (Whelan & Magee, 1981). Se sugirió que las cepas eran heterocigotas y que el tratamiento inducía la recombinación mitótica por intercambio de material genético entre cromosomas homólogos, generando homocigotos dominantes y recesivos (mutaciones de auxotrofia). Tal hipótesis fue comprobada al demostrar que desde cepas auxotróficas era posible obtener heterocigotos por selección de revertantes (Whelan & Magee, 1981). Análisis de recombinación de revertantes portadores de mutaciones ligadas, también confirmaron que los revertantes eran heterocigotos y por lo tanto, diploides (Poulter *et al.*, 1982; Whelan & Soll, 1982; Poulter & Rikkerink, 1983). Aunque la recombinación mitótica puede tener otros componentes, como conversión génica, normalmente estos representan sólo una fracción de la recombinación total (Scherer & Magee, 1990). Una importante extensión del análisis de recombinación en revertantes es la posibilidad de definir grupos de ligamiento por cosegregación de marcadores genéticos (Kakar *et al.*, 1983; Poulter & Hanrahan, 1983).

Sólo después de demostrar la condición diploide natural de *C. albicans*, el entendimiento de su genética ha crecido rápidamente (Kurtz *et al.*, 1988; Magee *et al.*,

1988; Scherer & Magee, 1990). Esto la ha convertido en un modelo general para el análisis genético y molecular de levaduras imperfectas.

Los enfoques moleculares aplicados en el estudio de *C. albicans* también pueden ser aplicados a *P. rhodozyma*. El clonamiento de genes ha sido logrado mediante dos estrategias: por complementación de mutaciones en *S. cerevisiae* (Gillum *et al.*, 1984; Rosenbluh *et al.*, 1985) y por homología a genes conservados de *S. cerevisiae* (Herbert *et al.*, 1988; Kirsch *et al.*, 1988; Lott *et al.*, 1989). Por otro lado, muchos de los genes clonados han sido asignados a bandas del cariotipo electroforético lo que ha permitido definir cromosomas homólogos, una complicación que debe ser considerada en el análisis de organismos diploides con un extensivo polimorfismo cromosómico. Igualmente, experimentos de disrupción génica (Kurtz *et al.*, 1988) y transformación integrativa (Kurtz *et al.*, 1986) en *C. albicans* son posibles en *P. rhodozyma* (Martínez, 1995).

Respecto de la organización genómica de *P. rhodozyma*, existe evidencia de la naturaleza diploide de la levadura. Los experimentos de mutagénesis realizados para seleccionar mutantes auxótrofos en *P. rhodozyma*, a través del tratamiento de las células con radiación UV, radiación gamma y NTG, han tenido una baja frecuencia de mutantes (Adrio *et al.*, 1993). Sin embargo, cuando se han aplicado procedimientos de enriquecimiento, utilizando nistatina, la frecuencia de auxótrofos ha aumentado (Adrio *et al.*, 1993). Tal situación puede ser reflejo de un estado de diploidía o poliploidía en *P. rhodozyma*. Por otra parte, la obtención de mutantes completamente albinos a partir de la cepa silvestre UCD 67-385 ha requerido de experimentos de mutagénesis con luz ultravioleta en dos etapas. Además, algunos mutantes de color sobreproductores de

pigmentos originan colonias sectorizadas, lo que podría indicar eventos de recombinación mitótica y heterocigocidad (Martínez, 1995).

Experimentos preliminares de electroforesis de campo pulsado, realizados en nuestro laboratorio, han revelado la presencia de 9 bandas cromosómicas electroforéticas. Considerando la intensidad de fluorescencia de cada banda se ha estimado un posible número haploide de 15 cromosomas, con un rango de tamaño desde 2.5 Mb para el mayor cromosoma a 0.35 Mb para el menor de ellos. Además, como sucede en otras especies de levaduras imperfectas, se ha encontrado que cepas silvestres de *P. rhodozyma* no presentan un cariotipo electroforético común, sugiriendo la presencia de un polimorfismo cromosómico en la especie.

PROPOSITO DE LA TESIS

Esta Tesis tiene como propósito contribuir al conocimiento de la organización genómica de *Phaffia rhodozyma*. Para ello, y de acuerdo a los antecedentes descritos, se plantea la siguiente hipótesis acerca de la organización del genoma de *P. rhodozyma*:

“*Phaffia rhodozyma* sería un organismo de condición diploide, cuyo cariotipo electroforético debe exhibir un número haploide de cromosomas, con posibilidades de un alto grado de polimorfismo cromosómico entre cepas”.

Para resolver esto, se proponen los siguientes objetivos:

- Estimar el tamaño molecular del genoma de *P. rhodozyma*.
- Determinar el número de cromosomas.
- Evaluar la presencia de polimorfismo cromosómico entre cepas.
- Establecer el nivel de ploidía.
- Desarrollar un sistema de genética parasexual, que eventualmente permita la identificación de grupos de ligamiento.

El conocimiento de la organización del genoma en *P. rhodozyma* servirá de base para el estudio genético clásico, análisis parasexual y biología molecular. De esta forma, aspectos relacionados con la carotenogénesis podrán ser abordados en forma más eficiente mediante el clonamiento de los genes implicados, lo que hará posible establecer si existe una relación entre la carotenogénesis y el desarrollo de su fase sexual, como ocurre en otros hongos. Eventualmente, los genes clonados podrán ser asignados a cromosomas específicos, permitiéndonos determinar como estos están organizados en el genoma de *P. rhodozyma*. No menos importante, será la posibilidad de estudiar los procesos por los cuales *P. rhodozyma* genera y mantiene su diversidad genética, así como, determinar el origen y extensión del polimorfismo cromosómico, y su influencia en la fase sexual descrita recientemente.

MATERIALES Y METODOS

I. Materiales

1.- Material biológico.

1.1 Bacterias:

La cepa de *Escherichia coli* DH5 α (Sambrook *et al.*, 1989) fue utilizada como vehículo de clonado y obtención de plásmidos.

1.2 Levaduras:

Las cepas silvestres de *Phaffia rhodozyma* UDC 67-383 y UCD 67-385 fueron adquiridas desde American Type Culture Collection, (ATCC 24230 y ATC 24202, respectivamente), Rockville, MD, U.S.A. La cepa silvestre UCD 67-210 proviene de Spain Type Culture Collection, Valencia, España. Las cepas mutantes Atx3 (albina), Atx5 (amarilla), Atx6 (rosada), Atx8 (albina), Atx9 (amarilla intensa), Atx10 (amarilla pálida) y AtxS1 (sobreproductora), corresponden a mutantes de pigmentación obtenidas en nuestro laboratorio y derivan de la cepa silvestre UCD 67-385. La cepa mutante Adel es auxótrofa para adenina y deriva de la cepa UCD 67-385. Las cepas dobles mutantes

Atx5; Ade y Atx6; Lis, son portadoras de auxotrofías obtenidas en nuestro laboratorio a partir de las cepas Atx5 y Atx6, respectivamente. La cepa Atx3; Aux, obtenida en esta Tesis, es una doble mutante albina auxótrofa. Todas las cepas fueron mantenidas congeladas a -70°C en medio YM más 20 a 30% de glicerol y son parte del cepario de hongos del Laboratorio de Genética, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile. En el Apéndice 4 se destaca el fenotipo y el origen de las cepas utilizadas en esta Tesis.

La cepa de *Saccharomyces cerevisiae* AB1380 es parte del cepario de hongos del Laboratorio de Genética.

1.3 Plásmidos:

Los plásmidos pBlueScript SK (Sambrook *et al.*, 1989), utilizado en el clonamiento de genes y pYact I (Ng & Abelson, 1980), portador del gen de actina de *Saccharomyces cerevisiae*, fueron donados por el Dr. Antonio Jiménez, Centro de Biología Molecular, Universidad Autónoma de Madrid, España.

El cósmido 3:11:H (Schmidhauser *et al.*, 1990), portador del gen de resistencia a benomil, β -tubulina de *Neurospora crassa*, fue obtenido desde Fungal Genetics Stock Center, Arcata, California, U.S.A..

1.4 Enzimas:

Las endonucleasas de restricción utilizadas en este trabajo fueron adquiridas en Biolabs, Inc. U.S.A. y Gibco-BRL, U.S.A.

Las enzimas lisozima, novozima, biocelulasa, bioglucanasa, bioxilanasas, β -glucuronidasa, zimoliasa, proteinasa K y ribonucleasa A, fueron adquiridas en Sigma Chemical Co. St. Louis, Missouri, U.S.A.

1.5 Acidos desoxirribonucleicos:

El DNA del bacteriófago lambda digerido con la endonucleasa de restricción *Hind* III, fue adquirido desde BioLabs Inc. U.S.A. y Bethesda Research Laboratories Inc. U.S.A. El DNA de espermatozoos de salmón 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.:
2,4-dihidroxipirimidina (Uracilo), 8-hidroxiquinolina, adenina, ampicilina, ATP, bromuro de etidio, BSA (fracción V), cloruro de litio, ioduro de sodio, IPTG, L-arginina, L-histidina, L-leucina, L-metionina, L-treonina, L-triptófano, p-fenilendiamina, sacarosa, SDS, tetraciclina, tiamina (Vitamina B₁), X-gal, DAPI.

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, DL-valina, EDTA, etanol absoluto, éter de petróleo, fenol, formamida, glicerol, glucosa, hidróxido de potasio, hidróxido de sodio, nitrato de amonio, L(+)-alanina, L-asparagina, L-fenilalanina, L-tirosina, L-serina, N-metil-N'-nitro-nitrosoguanidina, polietilenglicol 4000, sulfato de magnesio, tris-HCl

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

A Nutricional Biochemical Corporation U.S.A.: DL-iso-leucina, L-cisteina.

A Du Pont, Company, U.S.A.: α -³²P-dCTP, ³⁵S-dATP.

3.- Sistemas de purificación y marcado radioactivo de ácidos nucleicos.

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

A Bio 101, California, U.S.A.: Kit.GeneClean II

A Gibco-BRL: Kit Random Primers DNA labeling System.

A United Stated Biochemical: Sequenase V(2.0), DNA sequencing Kit.

4.- Equipos.

Se utilizaron:

Centrífuga refrigerada marca Sorvall, modelo RC-5B, equipada con un rotor de ángulo fijo SS-34.

Microcentrífuga Eppendorf.

Campana de flujo laminar Class II, Envirco

Equipo de Electroforesis de Campo Pulsado LKB 2015 Pulsaphor.

Cámaras para electroforesis

Fuentes de poder para electroforesis

Equipo de secuenciación "Base Ace de Stratagenetm".

Secador de geles BioRad SE 1125B

Microscopio Nikon

Microscopio Nikon Optiphot de epifluorescencia, dotado de un fotómetro Nikon UFX.

Cámara Nikon

Incubadores Precision a 22 °C, 30 °C y 37 °C.

Refrigeradores General Electric a 4 °C y -20 °C

Refrigerador NesLab PF-80 a -70 °C

Espectronic 20, Bausch & Lomb

Espectrofotómetro Shimadzu UV-150-02

Transiluminador Mighty Bright, Hoeser Cientific Instrument

Lámpara germicida, dotada de un tubo General Electric G8T5 de 260 nm

pHmetro ALTEX 3500, Beckmann

II. Métodos

1.- Cultivos de Microorganismos.

1.1.- Bacterias: *Escherichia coli* fue crecida en medio de cultivo Luria Bertani (LB) (Apéndice 1). Los cultivos bacterianos fueron incubados a 37 °C, con agitación.

1.2.- Levaduras: Las cepas de *P. rhodozyma* fueron crecidas en medio YM (Apéndice 1). Para los experimentos de fusión de protoplastos, la levadura fue crecida en medio mínimo Vogel, MM_v (Apéndice 1). Los cultivos de *P. rhodozyma* fueron incubados a 22 °C, con agitación constante. *S. cerevisiae* fue crecida en YEP (Apéndice 1) a 30 °C, con agitación constante.

2.- Mantención de cepas.

2.1.- Bacterias: *E. coli* se creció hasta saturación en medio LB. Se adicionó ampicilina 100 µg/ml o tetraciclina 20 µg/ml en el caso de cepas portadoras de plásmidos. Se tomaron 600 µl del cultivo y se mezclaron con 400 µl de glicerol al 87% y se mantuvieron indefinidamente a -70 °C.

2.2.- Levaduras: Las cepas de *P. rhodozyma* fueron crecidas en medio YM durante 7 días hasta una $DO_{550nm}=1.2$ para luego congelarlas a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ en presencia de glicerol a una concentración final de 20 a 30%.

3.- Mutagénesis.

3.1.- Nitrosoguanidina: La mutagénesis con nitrosoguanidina (NTG) fue realizada de acuerdo al método descrito en nuestro laboratorio (León *et al.*, 1995). Para ello, se inocularon 20 ml de medio YM con 200 μl de un cultivo de *P. rhodozyma* a una concentración de 10^7 células/ml. El cultivo fue incubado a $22\text{ }^{\circ}\text{C}$ con agitación constante a 250 rpm, hasta una densidad óptica de 0.3 a 550 nm. Las células fueron colectadas 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 pH 5.5. 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 0.4 ml de una solución fresca de NTG a 1 mg/ml. Las células se incubaron en presencia del mutágeno a $22\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 30 min y luego se centrifugaron a 7000 rpm por 10 min. Posteriormente, las células fueron lavadas 4 veces con 5 ml de tampón fosfato de potasio 100 mM pH 7.0 y se resuspendieron en 10 ml de medio YM e incubaron 12 hrs a $22\text{ }^{\circ}\text{C}$. Finalmente,

las células tratadas fueron plaqueadas en medio YM-agar (Apéndice 1) en forma directa y en las diluciones 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3} .

3.2.- Radiación ultravioleta: Los experimentos de mutagénesis con radiación UV fueron realizados a partir de cultivos frescos de *P. rhodozyma*. Para ello, 20 ml de un cultivo en medio YM, con una $DO_{550nm}=1.2$, fueron centrifugados a 7000 rpm en una centrífuga Sorvall, utilizando un rotor SS-34, durante 10 min. Las células fueron lavadas dos veces con agua destilada estéril, centrifugando después por 10 min y resuspendiendo en 4 ml de agua destilada estéril. La suspensión de 4 ml fue transferida a una placa Petri estéril para ser irradiados durante 10 min con una lámpara germicida, dotada de un tubo General Electric G8T5 de 260 nm, ubicada a 25 cm de distancia. Se colectaron alícuotas de 100 μ l, las que se diluyeron y plaquearon en medio YM-agar y se incubaron a 22 °C durante 5 días. Toda la manipulación de las células fue realizada en una cámara oscura para evitar la fotorreactivación (León *et al.*, 1995).

3.3.- Enriquecimiento con nistatina: Las células tratadas con UV o NTG, fueron traspasadas a un tubo Corex estéril y centrifugadas a 7000 rpm por 10 min. Se resuspendió en 1 ml de MM_v , y se traslado la suspensión a un matraz de 50 ml conteniendo 20 ml de MM_v . Se incubó a 22 °C por 5 hrs y después se agregó 0.2 ml de nistatina 1 mg/ml, incubando a 22 °C por 1 hr con agitación suave. El cultivo fue centrifugado 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 convenientes (10^{-3}), se plaquearon alícuotas de 100 μ l en placas YM-agar y finalmente se incubaron a 22 °C durante 5-7 días.

3.4.- Selección de mutantes auxótrofos: Los mutantes auxótrofos de *P. rhodozyma* fueron seleccionados en base a su incapacidad para crecer en MM_v sin suplemento. Para ello, las células tratadas con el agente mutagénico fueron replicadas ordenadamente en placas con medios YM-agar y MM_v -agar (Apéndice 1).

3.5.- Determinación de auxotrofia: Para determinar la deficiencia metabólica que portaban los mutantes auxótrofos potenciales, fueron plaqueados en placas MM_v suplementadas ya sea con los aminoácidos, DL-isoleucina, DL-valina, L(+)-alanina, L-arginina, L-asparagina, L-cisteína, L-histidina, L-leucina, L-metionina, L-serina, L-tirosina, L-treonina, L-triptófano, L-fenilalanina; vitamina B₁ y bases nitrogenadas, adenina, uracilo; o bien mezcla de ellos.

4.- Formación de protoplastos.

4.1.- Enzima lítica: Para determinar la enzima lítica que forma protoplastos con mayor eficiencia en *P. rhodozyma*, distintas cepas fueron cultivadas en MM_v hasta fase

exponencial (1×10^7 células/ml). Luego, las células fueron lavadas dos veces en KCl 0.8 M, como estabilizador osmótico, centrifugando en una centrifuga Sorvall, con un rotor SS34, a 7000 rpm por 10 min. Se resuspendió en KCl 0.8 M, para dar una concentración de 2×10^7 células/ml y fueron incubadas a 37 °C por 4 hrs con las enzimas comerciales biocelulasa (actividad de celulasa), bioglucanasa (actividades de xilanasa, celulasa y glucanasa), bioxilanas (actividad de xilanasa), β -glucuronidasa (actividades de glucuronidasa y sulfatasa), novozima (actividades de celulasa, proteasa y quitinasa) y zimoliasa 100T (hidroliza polímeros de glucosa con uniones β 1-3), a una concentración final de 2 mg/ml (Hermosilla *et al.*, 1995). La formación de protoplastos fue constatada por observación microscópica de células esféricas, registrando su número a través del conteo directo con una cámara de Neubauer. Alternativamente, se determinó también la presencia de protoplastos por lisis celular después del tratamiento con SDS al 1%. Para seguir la formación de protoplastos en el tiempo, las células fueron tratadas con la enzima lítica a una concentración de 1 mg/ml, a 22 °C y por tiempos variables.

5.- Análisis genético parasexual.

5.1.- Fusión de protoplastos: Cada cepa de *P. rhodozyma* fue crecida en 100 ml de medio mínimo MM_v hasta alcanzar una DO_{550nm}=1.2. Luego, las células fueron

lavadas dos veces con KCl 0.8 M, se resuspendieron en 4.5 ml de KCl 0.8 M y se agregó novozima a una concentración final de 1 mg/ml, completando un volumen total de 5 ml. La mezcla fue incubada a 22 °C con agitación suave por aproximadamente 12 hrs, tiempo en el cual se obtiene un 100% de protoplastos. Los protoplastos fueron lavados tres veces con KCl 0.8 M, centrifugando a 3000 rpm por 7 min y se resuspendieron en 2 ml del mismo estabilizador osmótico (1×10^8 células/ml). La concentración de protoplastos fue determinada por conteo directo con una cámara de Neubauer y por plaqueo en medio de regeneración YM-KCl-agar 0.7% (Apéndice 1).

Se mezclaron aproximadamente 1×10^7 protoplastos de cada cepa parental y se centrifugó a 3000 rpm por 7 min, para luego resuspender en 1 ml de KCl 0.8 M, Tris-CaCl₂ 10 mM, PEG 4000 26.4% e incubar por 10 min a 22 °C. La solución fue diluida con 6 ml de KCl 0.8 M, se lavó dos veces con KCl 0.8 M y luego se resuspendió en 1 ml de medio YM o MM_v (en el caso de cepas parentales auxótrofas) en presencia de KCl 0.8 M y finalmente se incubó 45 min a 22 °C. Para el caso de mutantes de pigmentación, se depositaron alícuotas de 100 µl en tubos que contenían 3 ml de medio de regeneración YM-KCl-agar 0.7% precalentado a 45 °C. Inmediatamente el contenido del tubo fue depositado sobre placas que contenían medio YM-KCl-agar 2% e incubó a 22 °C durante 15 días. En el caso de fusión entre mutantes auxótrofos, se depositaron alícuotas de 100 µl en tubos con 3 ml de medio MM_v-KCl-agar 0.7% (Apéndice 1), precalentado a 45 °C. El contenido del tubo fue depositado

inmediatamente sobre placas que contenían medio MM_v-KCl-agar 2%, incubando a 22 °C durante 15 días.

5.2.- Análisis de los fusantes: Los fusantes originados en los experimentos de fusión fueron sometidos a varios análisis para su caracterización.

5.2.1.- Tinción de núcleos de *Phaffia rhodozyma* y *Saccharomyces cerevisiae*: Este protocolo es una adaptación del descrito para *Schizosaccharomyces pombe* (Moreno *et al.*, 1991). Desde un cultivo de la levadura en medio MM_v, 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 tampón fosfato salino (PBS) 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 esta suspensión celular fue depositada sobre un portaobjeto limpio, esparciendo la gota de tal forma de dejar una película delgada de células, 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 cuidadosamente. La mezcla fue cubierta con un cubreobjeto limpio y se sellaron los bordes con esmalte transparente. La preparación fue guardada en oscuridad a 4 °C por 15 min antes de ser sometida a observación microscópica. Para la observación microscópica fue utilizado un microscopio Nikon Optiphot de epifluorescencia

dotado de un filtro tipo UV. Las observaciones fueron registradas fotográficamente utilizando películas KODAK de 400 asas con tiempos de exposición determinados automáticamente por un fotómetro Nikon UFX.

5.2.2.- Curvas de crecimiento: Los fusantes de *P. rhodozyma* fueron inoculados en matraces de 125 ml conteniendo 10 ml de MM_v, dando una DO_{550nm} inicial de 0.01. Se incubó a 22 °C con agitación constante y registró el aumento de DO_{550nm} en el tiempo para cada clon fusante.

5.2.3.- Pigmentos: Para extraer y cuantificar los pigmentos en microgramos por gramo de levadura seca (ppm), se realizó una modificación al método descrito por An *et al.* (1989), utilizando 10 a 15 mg peso seco de células. Las células fueron depositadas en un tubo de vidrio de 20 x 150 mm conteniendo 2.5 cm de perlas de vidrio de 0.5 mm de diámetro. El tubo fue agitado 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 (40 gr/lit) y 6 ml de éter de petróleo. El tubo fue agitado nuevamente en vórtex por 1 min y se centrifugó durante 6 min a 4000 rpm. en una centrífuga Sorvall a 4 °C. La fase éter fue traspasada a un tubo de vidrio y se midió el volumen recuperado. Se midió la absorbancia de la fase éter a 450 nm y se estimó la concentración de pigmentos, (An *et al.*, 1989).

5.3.- Análisis de descendencia: Las colonias que aparecieron después de la fusión de protoplastos y que presentaban un fenotipo distinto al de los parentales fueron sometidas a un análisis de descendencia. Para esto, la colonia fue resuspendida en 1 ml de agua destilada estéril en un tubo Eppendorf. La suspensión fue diluida en forma seriada y se plaqueó en alícuotas de 100 μ l en medio YM-agar, los distintos fenotipos que aparecieron fueron registrados.

6.- Purificación de DNA.

6.1.- DNA plasmidial: Para aislar DNA plasmidial de cultivos bacterianos, se utilizó el método de purificación de DNA descrito por Birnboim & Doly (1979). Las cepas bacterianas fueron crecidas en 10 ml de medio LB suplementado con el antibiótico correspondiente. Se tomaron 3 ml de cultivo y se centrifugó en una microcentrífuga Eppendorf, para luego resuspender en 100 μ l de una solución compuesta por glucosa 50 mM, EDTA 10 mM, Tris-HCl 25 mM pH 8.0, lisozima 4 mg/ml. La suspensión fue incubada por 5 min a temperatura ambiente y se agregó 200 μ l de una solución fresca de NaOH 0.2 N, SDS 1%. La mezcla fue invertida 3 a 4 veces y se dejó en hielo por 5 min. Posteriormente, se agregó 150 μ l de una solución fría de acetato de potasio 5 M y el tubo se invirtió nuevamente tres veces e inmediatamente se dejó en hielo por 5 min. La mezcla fue centrifugada durante 5 min en una microcentrífuga Eppendorf a 4 °C. La

fase líquida fue transferida a un tubo Eppendorf estéril y fue desproteinizada con un volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1), seguido de un lavado de la fase acuosa con un volumen de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1). Los ácidos nucleicos fueron precipitados por la adición de dos volúmenes de etanol absoluto frío (-20 °C) e incubación de la mezcla a -20 °C por 60 min. Los tubos fueron posteriormente centrifugados durante 10 min en una microcentrífuga Eppendorf, eliminando el sobrenadante y secando el precipitado a 37 °C. El precipitado fue resuspendido en 50 µl de tampón TE (Tris-HCl 10 mM pH 8.0, EDTA mM) conteniendo RNAsa A a una concentración de 30 µg/ml. La solución fue incubada durante 15 min a 37 °C, finalmente la concentración y calidad del DNA fue visualizada por electroforesis en gel de agarosa (Sambrook *et al.*, 1989).

- 6.2.- Extracción de DNA desde geles de agarosa: En algunos casos fue necesario limpiar el DNA mediante "GeneClean" (GeneClean II kit, Bio 101, CA). Para ello, 1 µg de ácidos nucleicos aislados fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 0,7% a 7 v/cm por 3 hrs. Posteriormente, se aisló un fragmento de gel que contenía el DNA de interés y se depositó en un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml. Al tubo se agregaron 3 volúmenes de NaI 6 M y se incubó a 50 °C por 10 min hasta que la agarosa se disolvió completamente. Luego, se agregó al tubo 5 µl de la resina "Glassmilk" y se incubó en hielo por 5 min. Posteriormente, el tubo fue centrifugado en una centrífuga Eppendorf a 12000 rpm por 5 seg, el

sobrenadante fue eliminado y la resina fue lavada en 500 μ l de solución "New Wash" (Etanol 70%, TE 30%), proporcionada en el kit. El lavado con la solución "New Wash" fue repetido dos veces más y finalmente se agregó 20 μ l de tampón TE. El tubo fue incubado por 5 min a 50 °C para permitir que el DNA se separara de la resina, y posteriormente, fue centrifugado en una centrifuga Eppendorf a 12000 rpm por 30 seg. El sobrenadante que contenía el DNA fue recuperado y traspasado a un tubo estéril.

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

6.3.1.- Formación de protoplastos: Los protoplastos fueron obtenidos por tratamiento de las células de *P. rhodozyma* con la enzima lítica novozima (Hermosilla *et al.*, 1995). Para ello, la cepa de levadura fue crecida en 20 ml de MM_v hasta una DO_{550 nm}=1.2. Las células fueron lavadas dos veces con KCl 0.8 M y resuspendidas en 9 ml de KCl 0.8 M. Luego, se agregó 1 ml de novozima (20 mg/ml) preparada en el mismo estabilizador osmótico y se incubó a 22 °C durante 2-4 hrs con agitación suave. Una vez obtenido cerca del 100% de protoplastos, estos fueron lavados tres veces con KCl 0.8 M, mediante centrifugación a 4000 rpm a 4 °C para impedir su lisis y resuspendidos suavemente en 5 ml de KCl 0.8 M.

6.3.2.- Extracción de ácidos nucleicos: Los protoplastos de *P. rhodozyma* fueron centrifugados a 4000 rpm en una centrífuga Sorvall (rotor SS-34) durante 4 min y se resuspendieron suavemente en 4.5 ml de Tris-HCl 10 mM, EDTA 20 mM. Luego, se agregó 0.5 ml de SDS al 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. Posteriormente, se agregó 10 µl de RNAsa a 10 mg/ml y se incubó a 30 °C por 30 min. La solución con el DNA fue desproteinizada 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, 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 agregaron 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 fue repetido una vez más y posteriormente se agregaron 5 ml de una mezcla de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) a la fase acuosa. Se mezcló y ambas fases fueron separadas 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 con ayuda de una pipeta de 10 ml en posición invertida 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 μ l de tampón TE. Finalmente, el DNA fue analizado mediante electroforesis en geles de agarosa al 0.5-0.6%.

7.- Transformación genética.

7.1.- *Escherichia coli*: La transformación genética de la cepa DH5 α de *E. coli*, utilizada en esta Tesis, fue realizada según el método de RbCl (Utermohlen, 1994).

7.1.1.- Células competentes: La cepa DH5 α , de *E. coli*, fue sembrada en medio LB sólido con un asa de platino para obtener colonias aisladas y las placas se incubaron durante dos días a 37°C. Se tomaron tres colonias aisladas y con ellas se inoculó un matraz de 50 ml que contenía 7 ml de medio ϕ (Apéndice 1). El cultivo fue incubado con agitación constante hasta una $DO_{550nm} = 0.3$ y 5 ml del cultivo se utilizaron para inocular 100 ml de medio ϕ precalentado a 37°C, el cual se incubó con agitación hasta una $DO_{550nm} = 0.48$. Este cultivo fue distribuido en tubos de vidrio preenfriados de 25 x 150 mm y las células fueron

precipitadas mediante centrifugación a 5000 rpm en una centrífuga Sorvall a 4°C. Las células fueron resuspendidas suavemente en 30 ml de solución TfβI (Apéndice 2) y se volvieron a centrifugar bajo las mismas condiciones. Posteriormente, las células fueron resuspendidas en 4 ml de solución TfβII (Apéndice 2) y se distribuyeron alícuotas de 100 µl en tubos de microcentrífuga de 1.5 ml y se guardaron inmediatamente a -70°C.

7.1.2.- Transformación: Las células competentes fueron descongeladas en hielo. Posteriormente, se adicionó el DNA transformante en un volumen no superior a los 10 µl y la mezcla fue incubada en hielo por 15 min, luego de lo cual fue sometida a un pulso térmico de 2 min a 42 °C. Después, las células fueron incubadas en hielo por 2 min y posteriormente a temperatura ambiente por 10 min. Con la finalidad de permitir la expresión del gen de resistencia codificado en el vector transformante, se adicionó a la mezcla 1 ml de medio LB y se incubó a 37 °C por un período de 1 hr. Finalmente, se sembraron alícuotas de 100 µl de células en placas con medio LB que contenía los antibióticos apropiados e incubadas a 37 °C por 12-16 hrs.

7.1.3.- Selección de clones con inserto: Para el plásmido pBluescript, la selección fue realizada directamente debido a que las bacterias transformadas fueron sembradas en placas con medio LB-agar, ampicilina 100 µg/ml, IPTG 32 µg/ml, X-gal 32 µg/ml. En este medio de cultivo, aquellas colonias

que poseen el plásmido con un inserto en el gen *lacZ*, se evidencian mediante cambio de color (Sambrook *et al.*, 1989).

8.- Análisis de DNA.

8.1.- Subclonamiento gen de actina: El gen de actina de *S. cerevisiae* fue subclonado en el plásmido pBluescript SK. Para ello, 1 µg del plásmido pYact I fue sometido a digestión con 2 unidades de las enzimas *Bam* HI y *Hind* III. Los fragmentos resultantes de la digestión fueron separados por electroforesis en un gel de agarosa 0.7% y se recuperó un fragmento de 1.6 kb, conteniendo el gen de actina, mediante "GeneClean" (ver sección 6.2). Luego, 200 ng de este fragmento fue ligado a 50 ng del plásmido pBluescript SK, digerido con las mismas enzimas, mediante la enzima T4 DNA ligasa. Se transformó con la mezcla de ligado la cepa de *E. coli*, DH5α. Desde los clones con inserto se aisló DNA plasmidial y para determinar la identidad del inserto se realizó un análisis de digestión del plásmido híbrido de acuerdo a su mapa de restricción.

8.2.- Subclonamiento gen de β-tubulina: Se subclonó el gen de β-tubulina desde el cósmido 3:11:H. Se digirió 1 µg de DNA de este cósmido con 2 unidades de la enzima de restricción Sal I durante 6 hrs a 37 °C. Los fragmentos resultantes de la digestión fueron separados por electroforesis en un gel de agarosa 0.7% y se

recuperó un fragmento de 2.6 kb, conteniendo el gen de β -tubulina, mediante "GeneClean" (ver sección 6.2). Luego, 200 ng de este fragmento fueron ligados a 50 ng del plásmido pBluescript SK, digerido con la misma enzima, mediante la enzima T4 DNA ligasa. Se transformó con la mezcla de ligado la cepa de *E. coli*, DH5 α . Desde los clones con inserto se aisló DNA plasmidial y para determinar la identidad del inserto se realizó un análisis de digestión del plásmido híbrido de acuerdo a su mapa de restricción.

- 8.3.- Mapas de restricción: Los análisis de restricción fueron realizados según lo descrito en Sambrook *et al.* (1989). Se incubó 0.5 a 1 μ g de DNA plasmidial con 1 a 2 unidades de enzima de restricción durante 3 hrs en tampón y temperatura requeridos por la enzima (según instrucciones del fabricante). Las reacciones de digestión fueron realizadas en un volumen final de 20 μ l y se detuvieron mediante la adición de EDTA a una concentración final de 20 mM. Cuando fue necesario digerir el DNA plasmidial con dos enzimas de restricción, las reacciones fueron realizadas en forma simultánea, si ambas enzimas requerían condiciones similares de tampón. En aquellos casos en que las dos enzimas requerían tampones muy diferentes, el DNA fue incubado primero con una de ellas y luego el DNA fue desproteinizado con un volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1), luego con un volumen de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) y posteriormente precipitado con dos

volúmenes de etanol a -20°C . Finalmente, el DNA fue resuspendido en agua y se procedió a digerirlo con la segunda enzima de restricción.

Los productos de digestión fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa. Los tamaños de los fragmentos generados fueron calculados utilizando el programa computacional DNAFRAG versión 3.03 (Schaffer & Sederoff, 1981), obtenido desde European Molecular Biology Laboratories (EMBL).

8.4.- Hibridación DNA-DNA: Los análisis de hibridación de ácidos nucleicos fueron realizados en base a la técnica desarrollada por Southern (1975) y descrita en Sambrook *et al.* (1989) y Rose *et al.* (1990).

8.4.1.- Marcado de las sondas: Las sondas de DNA fueron marcadas con α - ^{32}P -dCTP mediante la técnica de "random primers" (Sambrook *et al.*, 1989). Para ello se utilizó el sistema "Random Primers DNA Labeling System" (Gibco-BRL) según instrucciones del fabricante. Se denaturaron 30 ng de sonda, disueltos en 20 μl de agua, mediante calentamiento en baño maría por 5 min e inmediatamente el tubo fue depositado en hielo. Luego, se agregaron 6 μl de una solución que contenía una mezcla equimolar de desoxinucleótidos (dATP, dGTP y dTTP), 15 μl de una mezcla de partidores sintéticos, 5 μl de α - ^{32}P -dCTP (50 μCi) y 3 μl de agua destilada (Apéndice 2). La solución fue mezclada suavemente y se agregó 1 μl de una solución que contenía el fragmento Klenow de la DNA polimerasa I (Apéndice 2). La reacción fue incubada durante 3 hrs a

25 °C, luego de lo cual se agregaron 5 µl de la solución "Stop Buffer" (Apéndice 2). La sonda marcada fue separada de los nucleótidos no incorporados mediante sucesivas precipitaciones con dos volúmenes de etanol en presencia de acetato de amonio 3.8 M. Finalmente, la sonda fue resuspendida en 100 µl de agua y mantenida a -20 °C hasta ser utilizada.

8.4.2.- Hibridación: Los experimentos de hibridación de DNA fueron realizados en base a la técnica desarrollada por Southern (1975). La electroforesis se realizó utilizando 7 a 10 µg de DNA genómico de alto peso molecular tratado con enzima de restricción o 40 a 100 ng de DNA plasmidial, en geles de agarosa en presencia de bromuro de etidio 0.5 µg/ml, TAE 1X. El tampón de corrida fue TAE 1X. Luego de la electroforesis, el gel fue irradiado con radiación UV de 260 nm y fotografiado con una referencia de distancia, para registrar la migración del DNA. Posteriormente, el gel fue sumergido en 300 ml de solución HCl 0.25 M por 15 min para depurinar y luego en 300 ml de solución NaCl 1.5 M, NaOH 0.5 M a temperatura ambiente por 30 min para denaturar el DNA. Posteriormente, el gel fue neutralizado incubándolo en 300 ml de Tris-HCl 0.5 M (pH 7.4), NaCl 3.0 M durante 2 hrs. El DNA fue transferido a una membrana de nylon (Pall) como se describe en Sambrook, *et al.* (1989), utilizando una solución de citrato de sodio 10X (SSC 10X) como tampón de transferencia (Apéndice 2). La transferencia se realizó durante 16 a 20 hrs y el DNA fue fijado covalentemente a la membrana mediante irradiación del filtro

con radiación UV de 260 nm durante 5 min. La membrana fue incubada con solución de pre-hibridación (Apéndice 2) durante 4 hrs a 42 °C y luego se incubó por 24 hrs a 42 °C en presencia de la sonda marcada, previamente denaturada mediante calentamiento a 90 °C por 5 min. Una vez terminada la hibridación, la membrana fue lavada dos veces con una solución de SSC 5X, SDS 0.5% durante 15 min con agitación a temperatura ambiente, luego dos veces con una solución SSC 1X, SDS 0.5% a 37 °C por 15 min y finalmente, se lavó tres veces en SSC 0.1X, SDS 1% por 15 min a 65 °C, para una alta estrictez. En caso de necesitar baja estrictez, el filtro fue lavado dos veces por 15 min en SSC 1X, SDS 0.1% a temperatura ambiente y luego dos veces por 15 min en SSC 1X, SDS 0.1% a 37° C. Posteriormente, la membrana fue secada entre papel filtro y se dispuso sobre una plataforma de cartulina, la cual estaba previamente recubierta con papel plástico ("Saran-Wrap"), y todo fue cubierto con el mismo tipo de papel plástico. El armado fue puesto en una caja de exposición autorradiográfica con pantalla intensificadora Kodak, que contenía una placa autorradiográfica tipo R. La caja fue incubada a -70 °C por 2 hrs, para hibridación de DNA plasmidial o 12 a 24 hrs para hibridación de DNA genómico. Las placas fueron reveladas y fijadas según los procedimientos fotográficos rutinarios.

- 8.5.- Hibridación en librería genómica. Se utilizó una librería genómica en pBlueScript de *P. rhodozyma*, cepa UCD 67-385 (Martínez, 1995). Se analizaron 16 grupos provenientes de esta librería, cada uno de ellos

conteniendo entre 100 y 150 clones recombinantes. De cada grupo se aisló DNA de acuerdo a Birnboim & Doly (1979), como se detalla en la sección 6.1. El DNA aislado de cada grupo fue digerido con la enzima de restricción *Bam* HI. La hibridación fue realizada según el procedimiento descrito en la sección 8.4.2, excepto que se utilizó aproximadamente 1 µg de DNA por carril de cada grupo.

- 8.6.- Hibridación de DNA en colonia: La hibridación de DNA en colonia fue realizada según Sambrook (1989). Para cada grupo de la librería genómica de *P. rhodozyma*, se aislaron colonias por plaqueo en placas LB conteniendo ampicilina 100 µg/ml, X-gal 32 µg/ml, IPTG 32 µg/ml e incubando por 24 hrs a 37 °C. Se prepararon en réplica cinco placas con medio LB y ampicilina (100 µg/ml), cada una con una densidad de 100 colonias por placa para cada grupo analizado. Luego, se incubó por 24 hrs a 37 °C y se procedió a transferir las colonias de una de las réplicas a filtros de nylon BRL recortados circularmente con un diámetro menor al de la placa. Este filtro fue puesto sobre la placa y se marcó en cuatro posiciones de forma asimétrica mediante la perforación con una aguja estéril. Durante 5 min se dejó el filtro en contacto con la placa. Toda la manipulación de las placas fue realizada bajo campana para minimizar los riesgos de contaminación. Posteriormente, el filtro fue retirado por medio de pinzas delgadas y sometido a los procesos de denaturación y neutralización. Para la denaturación, el filtro fue puesto en

contacto con papel Whatman humedecido con una solución de NaOH 0.5 N, durante 7 min. Para la neutralización el filtro fue puesto en contacto con papel Whatman saturado con Tris-HCl 1M, pH 8.0 por 5 min. Luego, el filtro fue depositado sobre papel Whatman saturado con Tris-HCl, pH 8.0, NaCl 1.5 M por 5 min. y lavado con una solución de SSC 2X (Apéndice 2). Por último el DNA fue fijado al nylon por irradiación con luz UV durante 5 min.

La prehibridación fue realizada de acuerdo a la sección 8.4.2 por 4 hrs a 42 °C. La hibridación, fue efectuada en condiciones de hibridación estrictas en presencia de 50% de formamida, y a 42 °C durante 24 hrs. Se utilizaron 30 ng de sonda marcada, denaturada por simple ebullición durante 5 min.

Los lavados posthibridación fueron realizados en condiciones de alta estrictez, en los que el nylon fue lavado dos veces con una solución de SSC 5X, SDS 0.5% durante 15 min, con agitación suave a temperatura ambiente, después dos veces con una solución SSC 1X, SDS 0.5% a 37 °C por 15 min y finalmente, tres veces en SSC 0.1X, SDS 1% por 15 min a 65 °C. Para la autorradiografía, el nylon fue expuesto a -70 °C durante 48 hrs.

8.7.- Secuenciación: Se realizó de acuerdo al procedimiento descrito en el manual de instrucción del fabricante del "DNA sequencing Kit, version 2.0".

8.7.1.- Preparación de la muestra: La muestra de DNA a secuenciar fue purificada mediante extracción fenólica, y mantenida sin congelar a -20 °C para evitar la formación de puntos de ruptura en la hebra de DNA.

8.7.2.- Denaturación alcalina: En un tubo Eppendorf se pusieron 3 μg de DNA previamente purificado y se completó el volumen a 8 μl con agua destilada. Se agregó 2 μl de NaOH 1 M, más 1 μl del partidor adecuado (Apéndice 2), se mezcló e incubó a 37 °C por 10 min, para luego poner la mezcla inmediatamente en hielo. Para neutralizar la solución se añadió 2 μl de HCl 1 M junto con 2 μl del tampón de reacción (Apéndice 2), completando un volumen total de 15 μl . La mezcla fue incubada a 37 °C durante 10 min y nuevamente se enfrió en hielo.

Se prepararon cuatro tubos Eppendorf cada uno con 2.5 μl de la mezcla de terminación (Apéndice 2) para guanina, adenina, timina y citocina, los cuales fueron precalentados a 37 °C justo antes de usar.

8.7.3.- Reacción de marcaje: La mezcla de marcaje (Apéndice 2) fue diluida 5 veces para ser utilizada en la reacción de marcaje. La reacción de marcaje contiene 15 μl del DNA previamente denaturado, 1 μl de DTT 0.1 M, 2 μl de la mezcla de marcaje diluida, 0.5 μl de $^{35}\text{SdATP}$ y por último 2 μl de la enzima polimerasa (diluida 1 : 8 con tampón de dilución (Apéndice 2) suplido en el kit. Se mezcló e incubó a temperatura ambiente por 2 a 5 min.

8.7.4.- Reacción de terminación: Se transfirió 4.5 μl de la reacción de marcaje a cada tubo de terminación preparados anteriormente y preincubados a 37 °C. Se mezcló y continuó incubando a 37 °C por 5 min. Las reacciones fueron

detenidas por la adición de 4 μ l de solución "Stop Buffer" suplido por el kit. Cada muestra fue calentada a 75 °C por 2 min inmediatamente antes de cargar el DNA en el gel de secuenciación.

8.7.5.- Gel de secuenciación: Sistema "Base Ace de Stratagenetm".

Se preparó 50 ml de solución para un gel al 6% (Apéndice 2) y se agregó 30 μ l de TEMED y 250 μ l de persulfato 10% para iniciar la polimerización, mezclando suavemente. Con ayuda de una jeringa y evitando la formación de burbujas, se vierte toda la solución por la parte superior de dos placas de vidrio separadas por 0.2 mm y selladas completamente en tres de sus lados (los vidrios deben estar completamente limpios). Las placas de vidrio fueron puestas en posición horizontal para eliminar el exceso de solución e inmediatamente se colocó una peineta con "dientes de tiburón", sellando con papel plástico "Saran-Wrap" el borde superior para evitar la deshidratación. Se dejó polimerizando a temperatura ambiente por aproximadamente 12 hrs.

Una vez polimerizado el gel, éste se montó en el sistema de electroforesis Stratagenetm, siguiendo las instrucciones del fabricante. Una vez fijados los vidrios al sistema, se procedió a llenar las cámaras inferior y superior con 500 ml de TBE 1X. Se retiró la peineta y se introdujo nuevamente, pero esta vez en forma invertida para formar los pocillos de carga. El gel fue precorrído a 1500 volts para estabilizar la temperatura a 50 °C, usando 3 μ l de

“Stop Buffer” como trazador. Antes de cargar las muestras, éstas fueron calentadas a 72 °C por 2 min. Se cargó de cada muestra un volumen de 4 µl rápidamente, en el orden establecido G, A, T y C. Cada muestra fue sometida a una corrida corta, de 120 min aproximadamente y a una corrida larga de 240 min.

8.7.6.- Autorradiografía: Una vez finalizada la electroforesis de secuenciación el gel fue transferido cuidadosamente a papel Whatman 3M y secado en un secador de geles a 80 °C al vacío. Luego, el gel deshidratado fue puesto en una placa autorradiográfica junto con una película Kodak, todo ello en oscuridad. Se dejó exponiendo aproximadamente 24 hrs y posteriormente se reveló la autorradiografía. La autorradiografía fue interpretada en la forma convencional para determinar la secuencia de cada una de las muestras.

9.- Separación de DNA cromosómico.

9.1.- *P. rhodozyma*: Se creció *P. rhodozyma* en 100 ml de cultivo MM_v hasta fase estacionaria, colectando las células por centrifugación a 7000 rpm por 10 min. Las células fueron lavadas dos veces con una solución de EDTA 50 mM pH 8.0, para luego resuspender en 1 ml de la misma solución conteniendo 10 mg/ml de novozima. La suspensión fue mezclada con 3 ml de agarosa de

bajo punto de fusión 1%, EDTA 125 mM pH 8.0 (precalentada a 42 °C) y distribuida en moldes LKB de 100 µl, dejando enfriar a 4 °C durante 15 min. Los bloques fueron sumergidos en 5 ml de solución LET (Apéndice 2) conteniendo 0.4 mg/ml de novozima e incubados por 16 hrs a 37 °C. Después, los bloques fueron lavados dos veces con EDTA 50 mM y sumergidos en 5 ml de solución NDS con proteinasa K 1 mg/ml (Apéndice 2), incubando a 50 °C por 24 hrs. Por último, los bloques fueron lavados dos veces con EDTA 50 mM y mantenidos en esta solución a 4 °C hasta ser utilizados. Para un tiempo largo de almacenamiento fueron sumergidos en una solución de EDTA 50 mM, glicerol 50% y puestos a -20 °C.

- 9.2.- *S. cerevisiae*: Se crecieron 100 ml de cultivo en medio YEP hasta fase estacionaria, colectando las células por centrifugación a 7000 rpm por 10 min. Las células fueron lavadas dos veces con una solución de EDTA 50 mM pH 8.0, para luego resuspender en 1 ml de la misma solución junto con 25 µl de zimoliasa 2 mg/ml en tampón fosfato 10 mM y glicerol 50%. La suspensión fue incubada a 37 °C por 20 min y luego mezclada con 3 ml de agarosa de bajo punto de fusión 1%, EDTA 125 mM pH 8.0, la cual estaba precalentada a 42 °C. La mezcla fue distribuida en moldes LKB de 100 µl, dejando enfriar a 4 °C durante 15 min. Los bloques fueron sumergidos en 5 ml de solución LET que contenía 0.04 mg/ml de zimoliasa e incubados por 16 hrs a 37 °C. Los bloques fueron lavados dos veces con EDTA 50 mM y sumergidos en 5 ml de

solución NDS más proteinasa K 1 mg/ml, incubando a 50 °C por 24 hrs. Por último, los bloques fueron lavados dos veces con EDTA 50 mM y mantenidos en esta solución a 4 °C hasta ser utilizados. Para un mayor tiempo de almacenamiento fueron sumergidos en una solución de EDTA 50 mM, glicerol 50% y puestos a -20 °C.

9.3.- Electroforesis de campo pulsado: El DNA cromosómico fue separado mediante electroforesis de campo pulsado del tipo CHEF en un equipo LKB 2015 Pulsaphor (Chu *et al.*, 1986) de 15 cm². Para ello, se utilizaron geles de agarosa 0.85-1% en tampón TBE 0.5x (Apéndice 2). La electroforesis fue realizada a 14 °C en TBE 0.5x como tampón de corrida. Se utilizaron diferentes condiciones de electroforesis las cuales se describen en los resultados. Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio, 1 µg/ml, durante 6 hrs y después destañidos por 3 a 4 hrs en agua destilada. Finalmente, el DNA cromosómico fue visualizado mediante irradiación UV.

9.4.- Hibridación: Se realizó de acuerdo a lo descrito en la sección 8.4.2, excepto que el gel correspondió al de la electroforesis de campo pulsado. Como sondas se utilizaron fragmentos *Bam* HI derivados de los plásmidos pPR1.4-6, pPR1.4-12, pPR5.0, pPR5.3 y pPR5.6, los cuales son parte de la librería genómica de la cepa UCD 67-385 de *P. rhodozyma* en el vector pBluescript SK (Martínez, 1995). Además, se utilizó un fragmento de 7.6 kb de DNA repetitivo, el cual

fue aislado desde un gel de agarosa con DNA de *P. rhodozyma* digerido totalmente con *Bam* HI, purificado mediante tres lavados con GeanClean II (Bio 101) y clonado en pBluescript SK.

10.- Formación y análisis de heterocigotos.

La formación de heterocigotos fue realizada a través de la reversión de mutantes de *P. rhodozyma*.

10.1.- Reversión de mutantes por NTG: Se incubaron cepas mutantes de pigmento y mutantes de auxotrofia en 30 ml de medio YM hasta fase estacionaria temprana. Se centrifugaron los cultivos a 7000 rpm por 10 min y luego se lavó dos veces en tampón citrato de sodio 0.1 M pH 5.5. Se resuspendió en un volumen final de 4 ml del mismo tampón y se adicionó NTG a una concentración final de 80 µg/ml completando un volumen de 5 ml. Posteriormente, se incubaron las células a 22 °C por 30 min y se lavaron cuatro veces con tampón fosfato 0.1 M pH 7.0. Para fijar las potenciales mutaciones, las células fueron incubadas a 22 °C por 12 hrs en 10 ml de medio YM. Se plaquearon las células tratadas en varias diluciones en placas YM-agar en el caso de cepas mutantes de color. Las cepas auxótrofas fueron lavadas dos veces con MM_v a través de centrifugación a 7000 rpm por 10 min y resuspendidas en

2 ml de MM_v, éstas fueron plaqueadas sin dilución en placas MM_v-agar en alícuotas de 100 µl. Se seleccionaron aquellas colonias que presentaban un fenotipo silvestre para el carácter analizado y fueron denominadas revertantes.

10.2.- Mutagénesis de las cepas revertantes: Se crecieron las cepas revertantes seleccionadas en 20 ml de medio YM o MM_v, dependiendo si provenían de una mutante de pigmento o de auxotrofia, respectivamente. Los cultivos fueron tratados con NTG o radiación UV, de acuerdo a lo descrito en las secciones 3.1 y 3.2, respectivamente. Con el fin de aumentar la probabilidad de detectar mutantes de auxotrofia, las células tratadas se sometieron a un enriquecimiento con nistatina.

10.3.- Selección e identificación de mutantes: Se seleccionaron e identificaron aquellas mutantes que presentaron un fenotipo similar a la cepa parental del revertante analizado.

10.3.1.- Mutantes de color: Se seleccionaron en base a sus características de pigmentación. Para ello, después de incubar las placas YM-agar a 22 °C por 7-10 días, se determinó la presencia de colonias con un fenotipo igual a la cepa parental del revertante y se calculó su frecuencia.

10.3.2.- Mutantes auxótrofos: Fueron seleccionados en base a su incapacidad para crecer en MM_v sin suplemento. Para ello, las células fueron replicadas ordenadamente en placas con medios YM-agar y MM_v -agar. Se seleccionaron aquellas colonias que presentaron sólo crecimiento en YM-agar, determinándose el tipo de auxotrofia y su frecuencia.

RESULTADOS

1.- Electroforesis de campo pulsado.

Para estimar el número de cromosomas y el tamaño de su genoma se procedió a resolver el cariotipo electroforético de varias cepas de *P. rhodozyma*.

De acuerdo a los resultados después del tratamiento de *P. rhodozyma* con distintas enzimas comerciales (ver punto 4 en Resultados), se utilizó novozima para la formación de protoplastos en la electroforesis de campo pulsado. La Figura 1 muestra el resultado de la electroforesis de campo pulsado de la cepa UCD 67-385, en dos condiciones diferentes de corrida (A y B). En la condición A, la electroforesis se realizó en un gel de agarosa al 1% con pulsos de 60, 80 y 100 seg a 200 volts durante 7, 8 y 9 horas, respectivamente. La resolución de las bandas cromosómicas electroforéticas (bandas cromosómicas) de mayor tamaño fue pobre (Figura 1A). Como se observa en la Figura 1B, se obtuvo mejor resolución al usar un gel de agarosa 0.9% y corriendo la electroforesis por 20 hrs a 200 volts con pulsos de 90 seg.

Con el fin de determinar la presencia de polimorfismo cromosómico, se realizó electroforesis de campo pulsado en dos cepas silvestres (UCD 67-385 y UCD 67-210). Para ello, se utilizó un gel de agarosa al 0.9% y la electroforesis

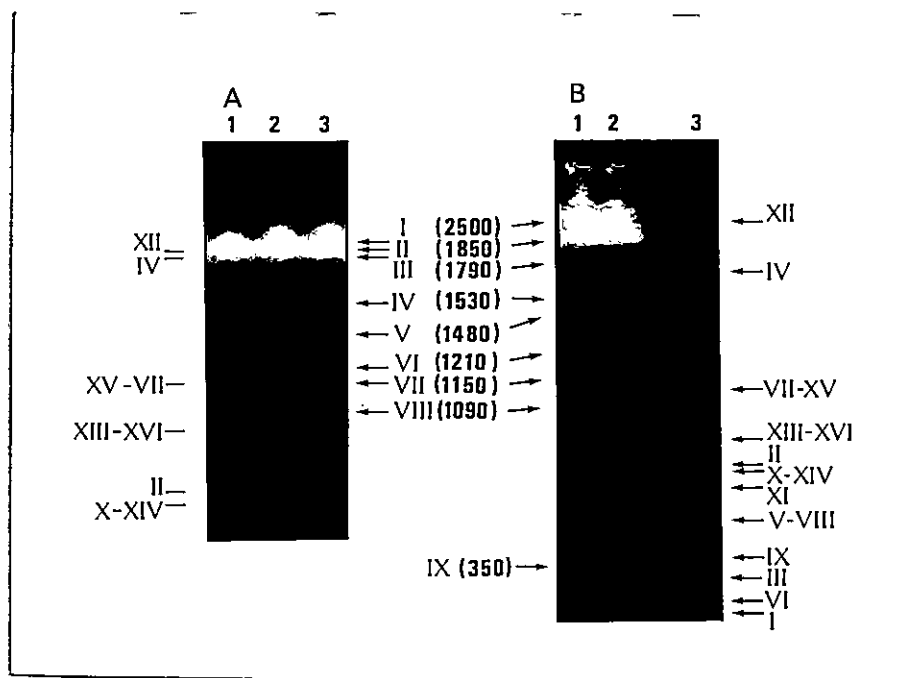


Figura 1:

Cariotipo electroforético de *Phaffia rhodozyma*, cepa silvestre UCD 67-385. Comparación de dos condiciones de electroforesis de campo pulsado. **A:** Carriles 1, 2 y 3, cepa UCD 67-385 (200 V, pulsos de 60, 80 y 100 seg por 7, 8 y 9 hrs, respectivamente en un gel de agarosa 1%). A la izquierda, se consignan en números romanos los cromosomas de *Saccharomyces cerevisiae* y en la derecha, en números romanos, las bandas cromosómicas de *P. rhodozyma*, junto con sus tamaños estimados en kb. **B:** Carriles 1 y 2, cepa UCD 67-385; carril 3, cepa AB 1380 de *S. cerevisiae* (200 V, pulsos de 90 seg por 20 hrs en un gel de agarosa 0.9%). A la izquierda, en números romanos, las bandas cromosómicas de *P. rhodozyma* y a la derecha, los cromosomas de *S. cerevisiae*.

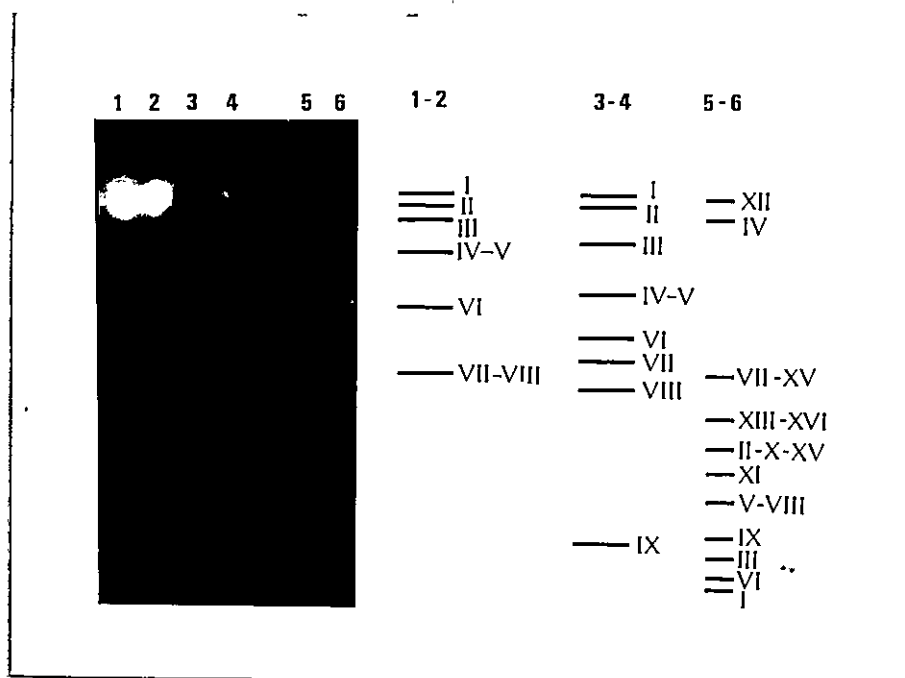


Figura 2:

Cariotipo electroforético de *Phaffia rhodozyma*, cepas silvestres UCD 67-385 y UCD 67-210. Carriles 1 y 2, cepa UCD 67-210; carriles 3 y 4 UCD 67-385; carriles 5 y 6, *Saccharomyces cerevisiae*, cepa AB1380. Condiciones de electroforesis: 200 V, pulsos de 90 seg por 20 hrs en un gel de agarosa 0.9%. A la derecha, una interpretación gráfica del patrón electroforético en las tres cepas.

fue corrida durante 20 hrs a 200 volts con pulsos de 90 seg. Como se muestra en la Figura 2, en la cepa UCD 67-210 se observan 8 bandas cromosómicas, mientras que en la cepa UCD 67-385 se observan 9 bandas, destacando la presencia de una banda de DNA cromosómica pequeña de 350 kb, ausente en la cepa UCD 67-210 (Figura 2).

A partir de los resultados se puede estimar el tamaño de genoma haploide para ambas cepas. En la Tabla 1 y Tabla 2 se encuentra consignada cada banda cromosómica observada para las dos cepas silvestres, el número de entidades cromosómicas que representa, dependiendo de sus intensidades relativas y sus tamaños respectivos. De acuerdo a esto, el tamaño del genoma haploide para la cepa UCD 67-210 es de 25.3 Mb y para UCD 67-385 de 23.9 Mb. Ambas cepas silvestres presentan un número haploide de 15 cromosomas.

2.- Asignación de sondas a las bandas cromosómicas de *P. rhodozyma*:

Con el objeto de distinguir una banda cromosómica de otra, se realizaron experimentos de hibridación de DNA. Las sondas utilizadas se describen en la Tabla 3, junto con sus características de tamaño y función.

El plásmido pPR5.6, transporta un inserto *Bam* HI de 5.6 kb de *P. rhodozyma*, en el cual los primeros 88 nucleótidos tienen una identidad del 84% y 79% con el gen para el factor de elongación de la traducción 1-alpha (*ef-1 α*)

Tabla 1

Tamaño de las bandas cromosómicas de la cepa silvestre UCD 67-210.

Cepa UCD 67-210			
Banda	Tamaño (kb)	Nº Cromosomas	Nº Cromosoma x Tamaño (kb)
I	2500	3	7500
II	1850	3	5550
III	1820	2	3640
IV	1500	1	1500
V	1450	1	1450
VI	1250	2	2500
VII	1130	1	1130
VIII	1120	2	2240
TOTAL →		15	25310

El número de cromosomas por banda fue determinado de acuerdo a las intensidades relativas de cada una de ellas.

Tabla 2

Tamaño de las bandas cromosómicas de la cepa silvestre UCD 67-385.

Cepa UCD 67-385			
Banda	Tamaño (kb)	Nº Cromosomas	Nº Cromosoma x Tamaño (kb)
I	2500	3	7500
II	1850	3	5550
III	1790	1	1790
IV	1530	1	1530
V	1480	1	1480
VI	1210	2	2420
VII	1150	1	1150
VIII	1090	2	2180
IX	350	1	350
TOTAL →		15	23950

El número de cromosomas por banda fue determinado de acuerdo a las intensidades relativas de cada una de ellas.

Tabla 3

Plásmidos utilizados para la asignación de sondas al cariotipo electroforético de *Phaffia rhodozyma*.

Plásmido	Tamaño del inserto (kb) ^a	Función
pPR1.4-6	Fragmento <i>Bam</i> HI 1.4	Desconocida
pPR1.4-12	Fragmento <i>Bam</i> HI 1.4	Desconocida
pPR5.0	Fragmento <i>Bam</i> HI 5.0	Desconocida
pPR5.3	Fragmento <i>Bam</i> HI 5.3	Desconocida
pPR5.6	Fragmento <i>Bam</i> HI 5.6	ef-1 α
pPR7.6	Fragmento <i>Bam</i> HI 7.6	DNA repetitivo

(a), el tamaño del inserto fue determinado por digestión con *Bam* HI y posterior electroforesis.

de *Drosophila melanogaster* y *Saccharomyces cerevisiae*, respectivamente (Figura 3), de acuerdo al estudio con el programa para análisis de secuencias de Genetics Computer Group (Devereux *et al.*, 1992). La hibridación de la sonda ef-1 α contra las bandas cromosómicas separadas por electroforesis de campo pulsado de la cepa silvestre UCD 67-385 se muestra en la Figura 4. El factor ef-1 α hibridó solamente a la banda cromosómica VIII.

El plásmido pPR.7.6, porta un fragmento *Bam* HI de 7.6 kb de DNA repetitivo (rDNA) de *P. rhodozyma*. En los experimentos de hibridación del fragmento *Bam* HI de 7.6 kb con los cromosomas de la cepa silvestre UCD 67-385 de *P. rhodozyma*, cepas mutantes AtxS1 y Atx5, separados por CHEF, se observa que esta sonda hibridó fuertemente con la banda cromosómica de mayor tamaño, identificada como banda cromosómica I y no muestra hibridación adicional con otra banda cromosómica en las cepas analizadas. Las intensidades relativas de las bandas que hibridaron fueron similares en ambas muestras de la cepa silvestre (Figura 5B, carril 1 y 2).

El plásmido pPR.5.3, porta un inserto *Bam* HI de 5.3 kb de función desconocida el cual fue denominado locus R2. Dicha sonda hibridó con sólo una banda cromosómica en la cepa silvestre UCD 67-210 y Atx6 (banda cromosómica VIII) y con dos bandas en la cepa silvestre UCD 67-385 y cepa mutante Atx5 (bandas cromosómicas VIII y IX) (Figura 6).

De esta misma forma, dos fragmentos *Bam* HI de 1.4 kb y 5.0 kb, de los plásmidos pPR1.4-12, pPR5.0, respectivamente, hibridaron con la banda

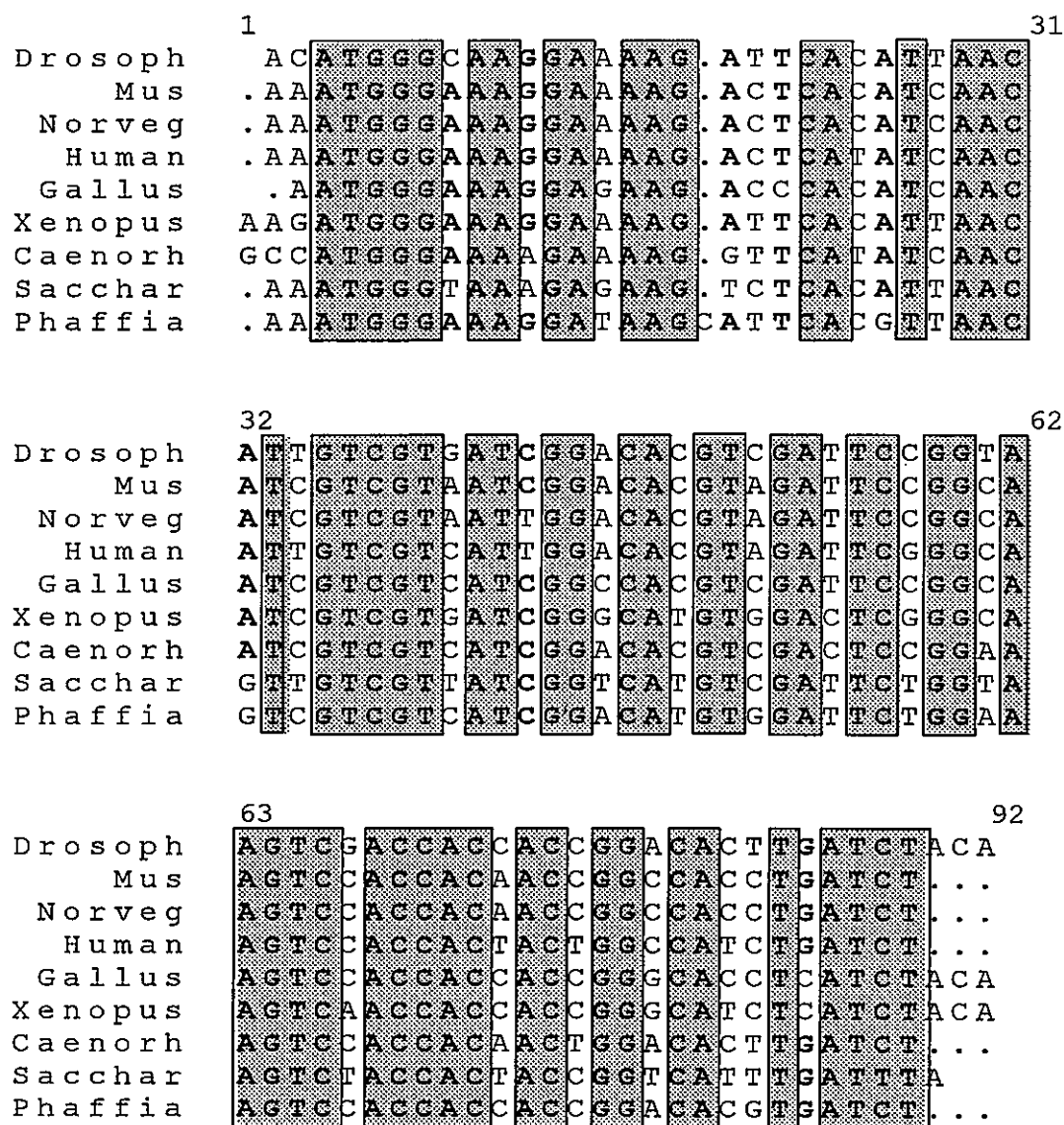


Figura 3:

Alineamiento de secuencia entre el gen *ef-1 α* de *Phaffia rhodozyma* y *ef-1 α* de otros organismos. Se muestra el alineamiento para 88 nucleotidos secuenciados del gen *ef-1 α* de *P. rhodozyma* utilizando el programa para análisis de secuencia de Genetics Computer Group. Drosoph, *Drosophila melanogaster*; Mus, *Mus musculus*; Norveg, *Rattus norvegicus*; Human, *Homo sapiens*; Gallus, *Gallus gallus*; Xenopus, *Xenopus laevi*; Caenorh, *Caenorhabditis elegans*; Sacchar, *Saccharomyces cerevisiae*; Phaffia, *Phaffia rhodozyma*.

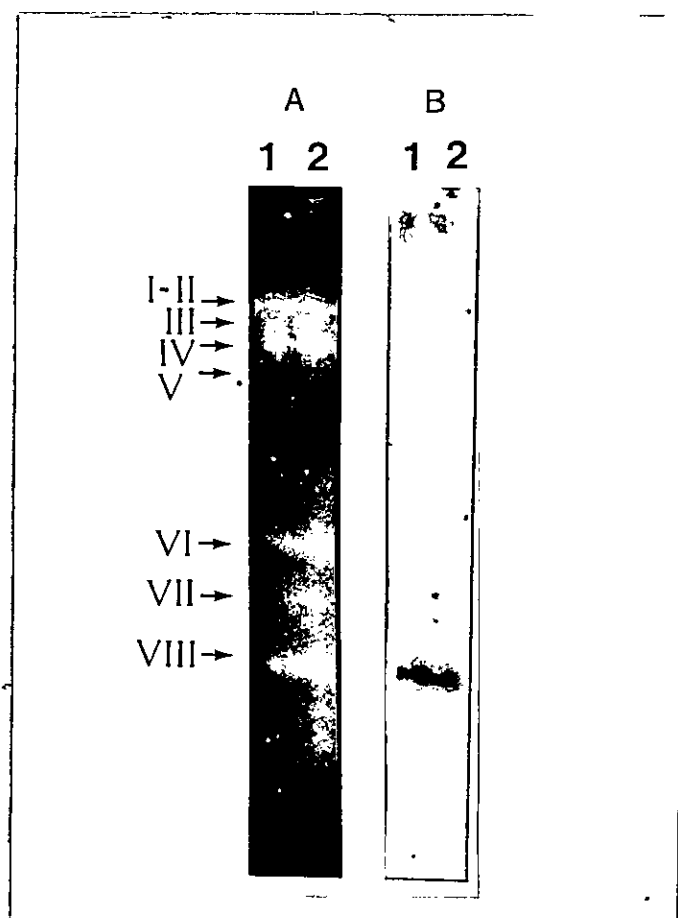


Figura 4:

Hibridación de la sonda transportando secuencias de *ef-1 α* con la banda cromosómica VIII de la cepa UCD 67-385. Las condiciones de electroforesis fueron 200 V, pulso de 90 seg por 24 hrs en un gel de agarosa 0.85%. Carriles 1 y 2, cepa UCD 67-385. **A:** Cariotipo electroforético teñido con bromuro de etidio. **B:** Autorradiografía después de la hibridación.

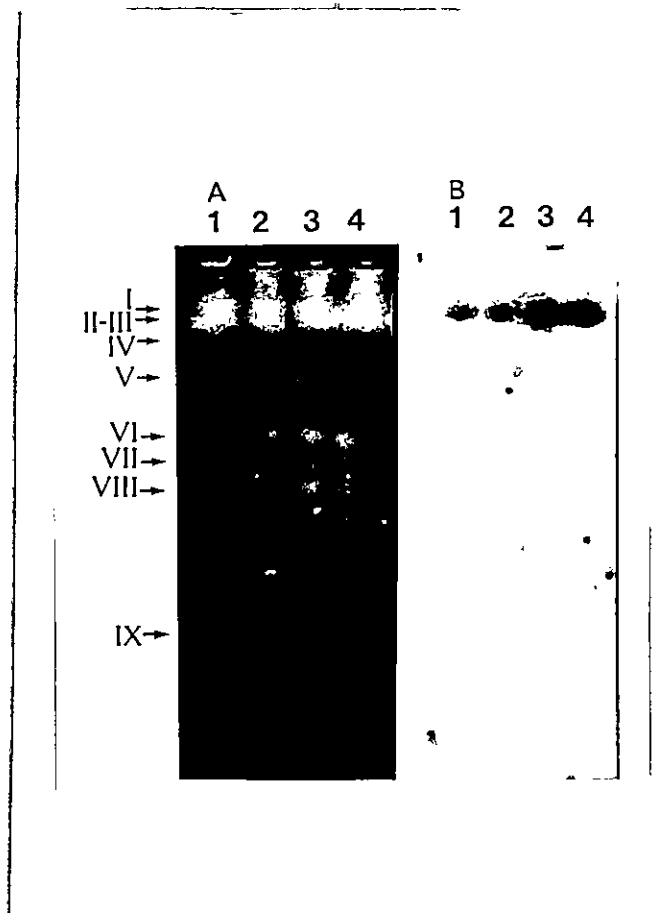


Figura 5:

Hibridación de la sonda transportando DNA repetitivo con la banda cromosómica I de varias cepas de *Phaffia rhodozyma*. Las condiciones de electroforesis fueron 200 V, pulso de 90 seg por 20 hrs en un gel de agarosa 0.9%. Carriles 1 y 2, cepa UCD 67-385; carril 3, cepa mutante AtxS1; carril 4, cepa mutante Atx5. **A:** Cariotipo electroforético teñido con bromuro de etidio. **B:** Autorradiografía después de la hibridación.

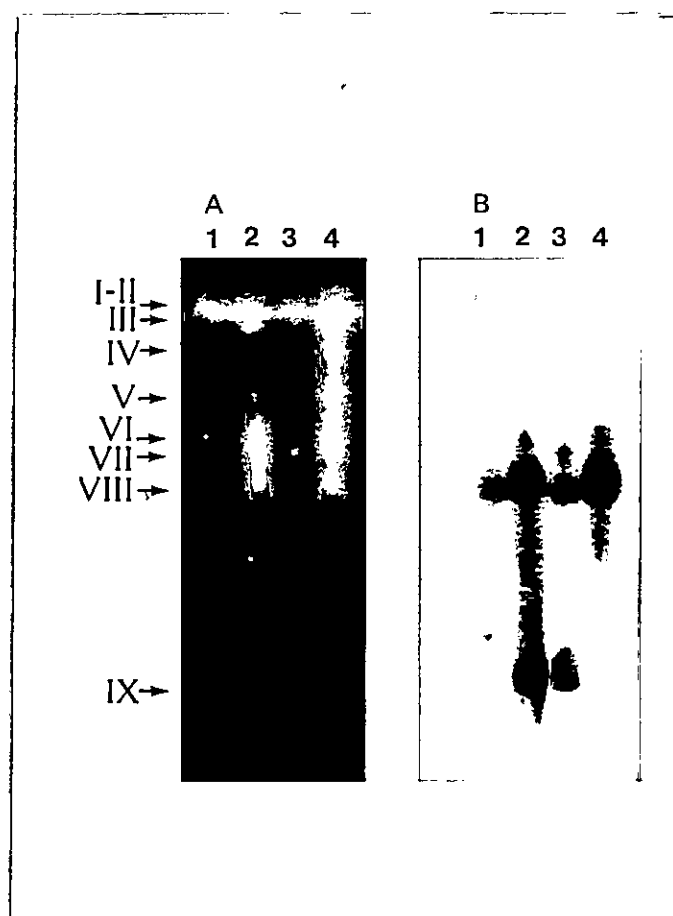


Figura 6:

Hibridación de la sonda transportando el locus *R2* con las bandas cromosómicas VIII y IX de varias cepas de *Phaffia rhodozyma*. Las condiciones de electroforesis fueron 200 V, pulso de 90 seg por 24 hrs en un gel de agarosa 0.9%. Carril 1, cepa silvestre UCD 67-210; carril 2, cepa silvestre UCD 67-385; carril 3, cepa mutante Atx5; carril 4, cepa mutante Atx6. A: Cariotipo electroforético teñido con bromuro de etidio. B: Autorradiografía después de la hibridación.

cromosómica I de la cepa UCD 67-385 (Figura 7 y Figura 8), mientras que otro fragmento Bam HI de 1.4 kb (plásmido pPR1.4-6) hibridó sólo con la banda cromosómica II en la cepa UCD 67-385 y cepa mutante Atx6 (Figura 9).

3.- Selección de mutantes auxótrofos en *P. rhodozyma*.

Con el fin de obtener mutantes auxótrofos para el análisis genético, se realizaron experimentos de mutagénesis de distintas cepas de *P. rhodozyma*.

Los experimentos realizados en las cepas silvestres UCD 67-385, UCD 67-383 y UCD 67-210, y en las cepas mutantes Atx3 y Atx5, derivadas de la cepa UCD 67-385 (Martínez, 1995), no permitieron aislar mutantes auxótrofos (Tabla 4). Sin embargo, en todos los experimentos de mutagénesis aparecieron distintos mutantes afectados en la síntesis de pigmentos, con una frecuencia promedio de 3×10^{-4} .

Como una alternativa para obtener mutantes auxótrofos, se aplicó el método de enriquecimiento por nistatina (Martínez, 1995). Los resultados muestran la obtención de sólo un mutante auxótrofo a partir de la cepa Atx3 (Tabla 5). Este fue incapaz de crecer en una placa con MM_v sin suplemento, aún después de 15 días de incubación a 22 °C. Para determinar el tipo de auxotrofia, se sembró dicho mutante en medio mínimo MM_v con distintos suplementos nutricionales, como se indica en Métodos. Sin embargo, la mutación no fue

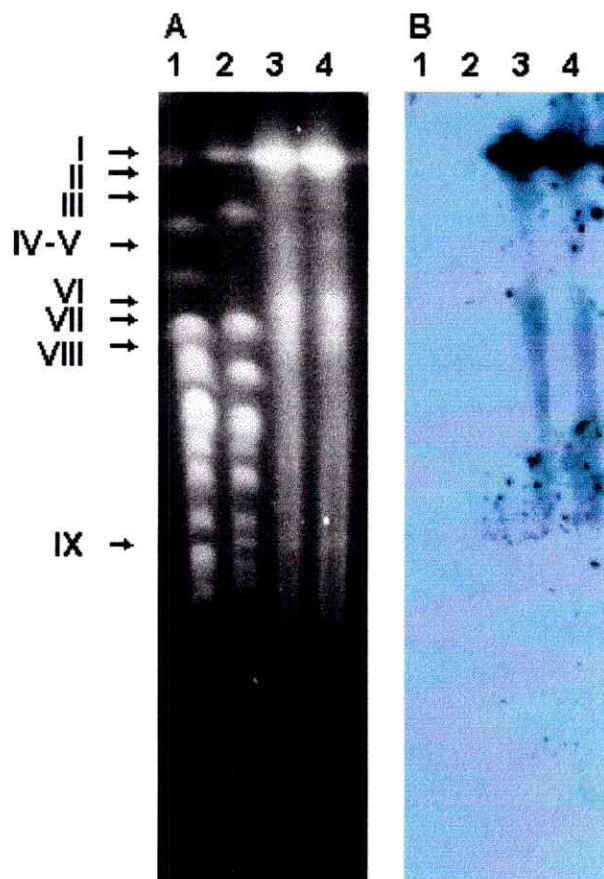


Figura 7:

Hibridación de la sonda pPR1.4-12 transportando un fragmento *Bam* HI 1.4 kb con la banda cromosómica I de *Phaffia rhodozyma*. Las condiciones de electroforesis fueron 180 V, pulsos de 90 seg por 8 hrs, pulsos de 120 seg por 8 hrs, 160 V, pulsos de 150 seg por 8 hrs, pulsos de 180 seg por 6 hrs, en un gel de agarosa 0.8%. Carril 1, *Saccharomyces uvarum*; carril 2, cepa *Saccharomyces cerevisiae*; carril 3, cepa UCD 67-385; carril 4, cepa UCD 67-385. **A:** Cariotipo electroforético teñido con bromuro de etidio. **B:** Autorradiografía después de la hibridación.

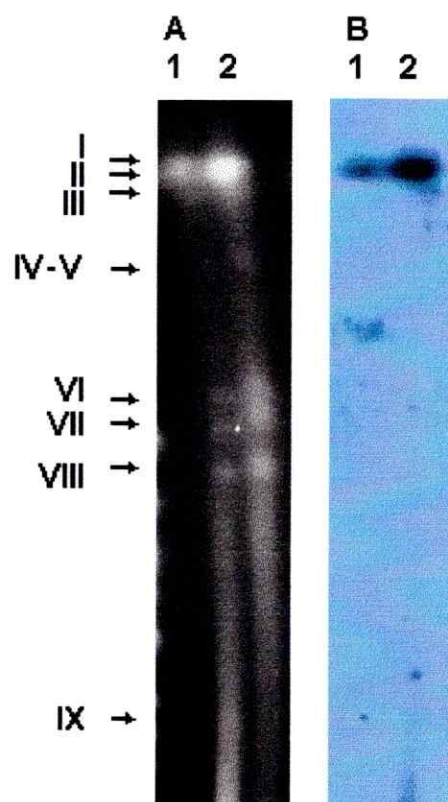


Figura 8:

Hibridación de la sonda pPR5.0 transportando un fragmento *Bam* HI de 5.0 kb con la banda cromosómica I de *Phaffia rhodozyma*. Las condiciones de electroforesis fueron 180 V, pulsos de 100 seg por 12 hrs, 120 seg por 12 hrs, 160 V, pulsos 150 seg por 12 hrs, 180 seg por 6 hrs en un gel de agarosa 0.8%. Carril 1, cepa UCD 67-385; carril 2, cepa Fusante. **A:** Cariotipo electroforético teñido con bromuro de etidio. **B:** Autorradiografía después de la hibridación.

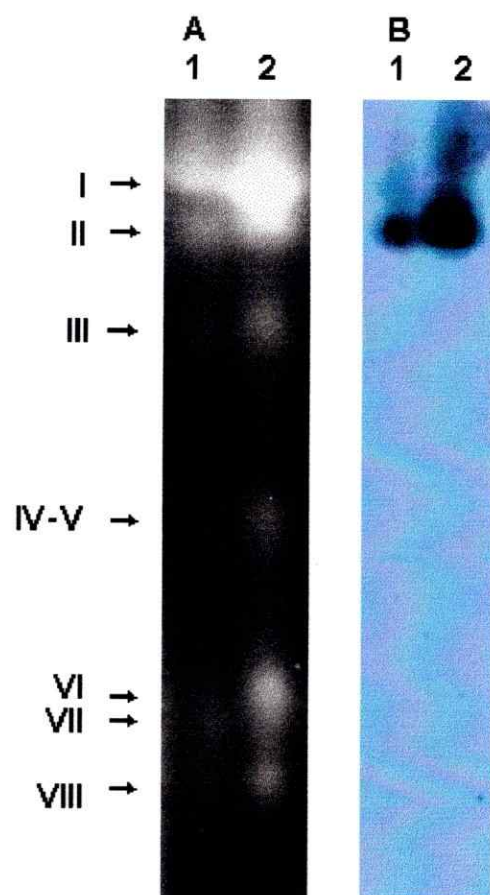


Figura 9:

Hibridación de la sonda pPR1.4-6 transportando un fragmento *Bam* HI de 1.4 kb con la banda cromosómica II de *Phaffia rhodozyma*. Las condiciones de electroforesis fueron 200 V, pulsos de 100 seg por 12 hrs, 180 V, pulsos de 120 seg por 12 hrs, 150 seg por 12 hrs, 180 V, pulsos de 180 seg por 6 hrs, en un gel de agarosa 0.8%. Carril 1, cepa UCD 67-385; carril 2, cepa mutante Atx6. **A:** Cariotipo electroforético teñido con bromuro de etidio. **B:** Autorradiografía después de la hibridación.

Tabla 4

Frecuencia de mutantes auxótrofos en *Phaffia rhodozyma*.

Cepas	Mutágeno	Frec. Mutagénesis ^a
UCD 67-210	UV	$< 5 \times 10^{-4}$
UCD 67-383	UV	$< 10^{-3}$
UCD 67-385	UV, NTG	$< 3.3 \times 10^{-4}$
Atx3	UV	$< 10^{-3}$
Atx5	UV	$< 10^{-3}$

(a), los mutantes de colores aparecidos después de la mutagénesis no fueron considerados en el cálculo.

Tabla 5

Frecuencia de mutantes auxótrofos en *Phaffia rhodozyma* después del enriquecimiento con nistatina.

Cepas	Mutágeno	Nº mutantes	Frec. mutagénesis
UCD 67-385	NTG	0	$< 10^{-3}$
Atx3	NTG	1	1×10^{-3}
Atx5	NTG	0	$< 10^{-3}$

Para el enriquecimiento se utilizó nistatina 0.01 mg/ml, de acuerdo a lo indicado en Métodos.

suplementada por ninguno de los aminoácidos o vitaminas utilizados, por lo que este mutante fue denominado Atx3; Aux. Por otra parte, se realizaron pruebas para verificar que el mutante Atx3; Aux correspondiera a *P. rhodozyma*, entre ellas, se estudio la morfología de la colonia, morfología celular, sensibilidad a temperatura y presencia de moléculas de RNA de doble hebra descritas para la cepa silvestre 67-385 (Castillo & Cifuentes, 1994). Todas estas pruebas confirmaron la identidad de la mutante Atx3; Aux como *P. rhodozyma*.

En las cepas UCD 67-385 y Atx5, aún bajo las mismas condiciones en que se obtuvo Atx3; Aux, no aparecieron mutantes de auxotrofia después del tratamiento con NTG y enriquecimiento con nistatina (Tabla 5).

4.- Formación de protoplastos.

Para el análisis genético parasexual fue necesario un método de formación de protoplastos. Para ello, se determinó la enzima lítica capaz de formar protoplastos rápida y eficientemente en *P. rhodozyma* mediante el tratamiento de las células con enzimas comerciales. La formación de protoplastos se realizó utilizando cultivos de *P. rhodozyma* crecidos en MM_v, debido a que se encontró que las células cultivadas en un medio rico, como YM, eran resistentes al tratamiento enzimático (Tabla 6A).

Como se muestra en la Tabla 6B, sólo novozima fue capaz de degradar la pared celular de algunas cepas de *P. rhodozyma*. Esto fue constatado por

Tabla 6

A:

Efecto del medio de cultivo en la formación de protoplastos con novozima.

Cepas [2×10^7 células/ml]	Formación de protoplastos (%)	
	Medio YM	Medio MM _v
UCD 67-210	0	99
UCD 67-385	0	100
UCD 67-383	0	0

Los cultivos fueron crecidos a 22° C por 5 días. Se utilizó novozima 2 mg/ml e incubó las células a 22° C por 2 hrs.

B:

Formación de protoplastos de *Phaffia rhodozyma* con distintas enzimas líticas.

Enzima [2 mg/ml]	UCD 67-210	UCD 67-383	UCD 67-385
Biocelulasa	-	-	-
Bioglucanasa	-	-	-
Bioxilanasas	-	-	-
β -glucuronidasa	-	-	-
Novozima	+++	-	+++
Zimoliasa	-	-	-

Todas las digestiones fueron realizadas a 22 °C y con agitación suave. Se trató aproximadamente 2×10^7 células por cada cepa.

inspección microscópica y lisis por SDS al 1%. Todos los protoplastos formados fueron sensibles a SDS al 1%, así como a soluciones hipotónicas. Las cepas silvestres UCD 67-210 y UCD 67-385 fueron sensibles a novozima, en cambio la cepa UCD 67-383 mostró ser resistente a todas las enzimas, incluyendo novozima.

Por otro lado, experimentos de formación de protoplastos con novozima demostraron que concentraciones entre 0.2 M y 2 M de sorbitol no estabilizan osmóticamente los protoplastos formados y además la preincubación de las células con el agente reductor DTT no tiene ningún efecto en la eficiencia de formación de protoplastos (datos no mostrados).

Para estimar el tiempo necesario requerido para la formación de protoplastos de las cepas silvestres de *P. rhodozyma*, UCD 67-210, UCD 67-385 y UCD 67-383, se siguió la cinética de formación de protoplastos bajo las condiciones óptimas. Estas son KCl 0.8 M como estabilizador osmótico, novozima 1 mg/ml e incubación a 22 °C.

Bajo estas condiciones se observa que con tratamientos de 30 a 60 min se obtiene entre un 80 a 90% de protoplastos en las cepas UCD 67-210 (Figura 10) y UCD 67-385 (Figura 11), en cambio la exposición prolongada de células de la cepa UCD 67-383 a novozima no origina protoplastos, como se muestra en la Figura 12. Las tres cepas silvestres muestran una disminución de la sobrevivencia, probablemente por lisis celular, aún en presencia del estabilizador osmótico.

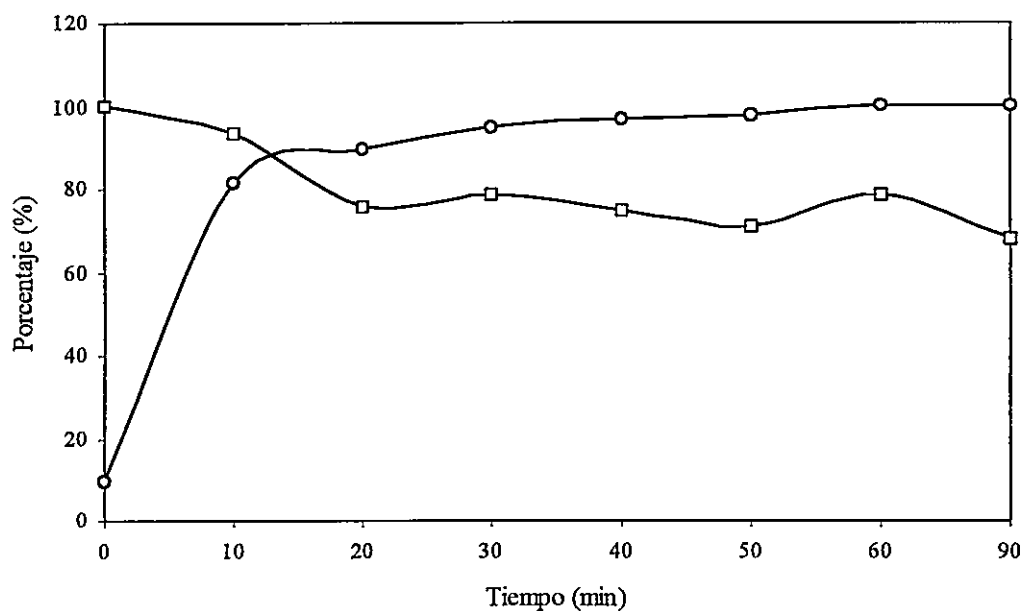


Figura 10:

Formación de protoplastos en la cepa silvestre UCD 67-210. Se trataron 2×10^7 células de la cepa silvestre con 1 mg/ml de novozima en los tiempos indicados. El porcentaje de protoplastos (o) fue determinado indirectamente por lisis celular con SDS 1%. La sobrevivencia (□) fue calculada dividiendo el número de células que no han sufrido lisis, por el tratamiento con novozima, por el número de células a tiempo 0 (2×10^7).

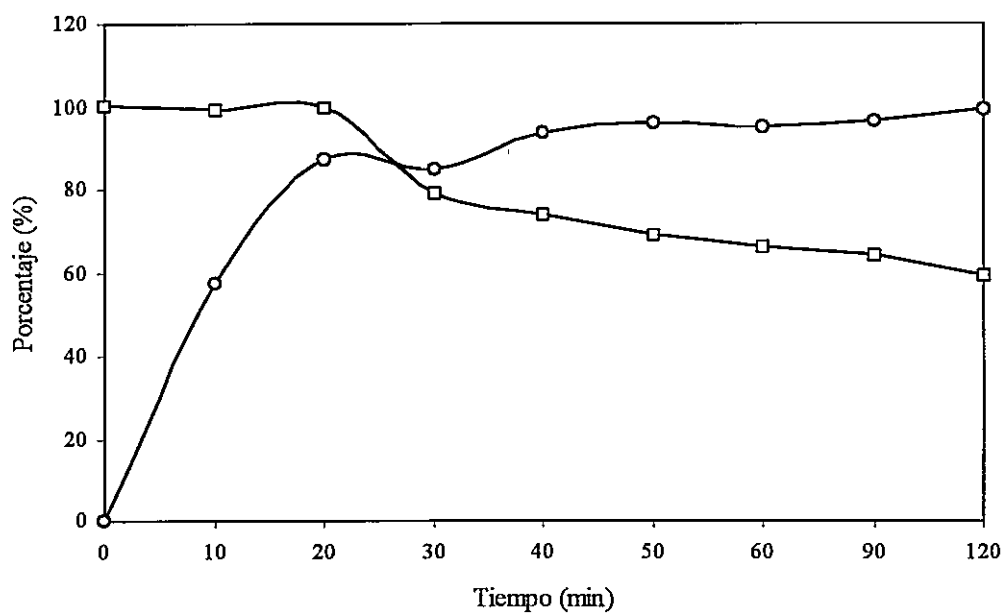


Figura 11:

Formación de protoplastos en la cepa silvestre UCD 67-385. Se trataron 2×10^7 células de la cepa silvestre con 1 mg/ml de novozima en los tiempos indicados. El porcentaje de protoplastos (o) fue determinado indirectamente por lisis celular con SDS 1%. La sobrevivencia (□) fue calculada dividiendo el número de células, que no han sufrido lisis por el tratamiento con novozima, por el número de células a tiempo 0 (2×10^7).

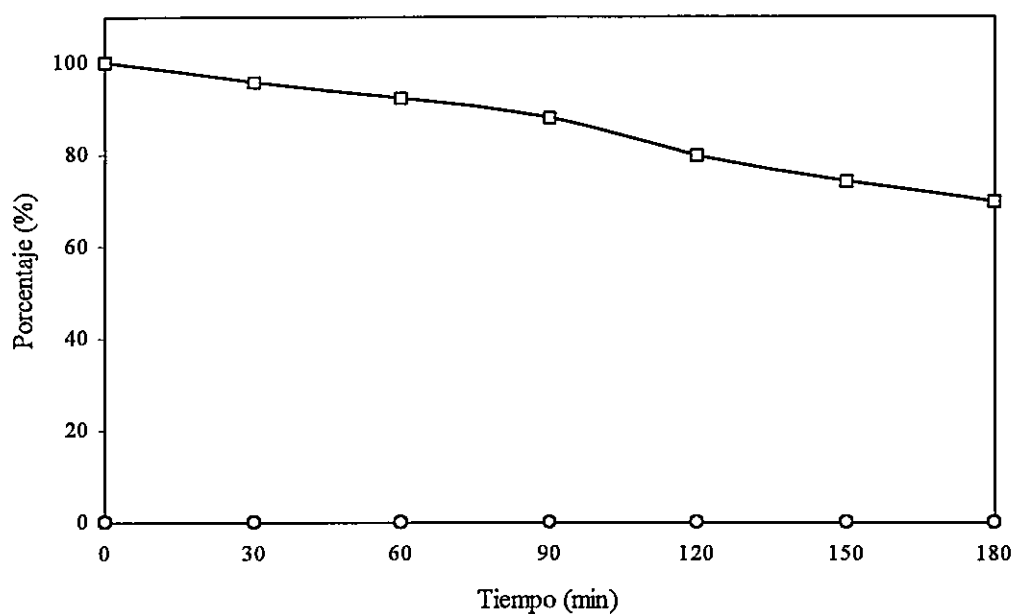


Figura 12:

Formación de protoplastos en la cepa silvestre UCD 67-383. Se trataron 2×10^7 células de la cepa silvestre con 1 mg/ml de novozima en los tiempos indicados. El porcentaje de protoplastos (o) fue determinado indirectamente por lisis celular con SDS 1%. La sobrevivencia (□) fue calculada dividiendo el número de células, que no han sufrido lisis por el tratamiento con novozima, por el número de células a tiempo 0 (2×10^7).

5.- Fusión de protoplastos y análisis de descendencia.

La fusión de protoplastos constituye el paso inicial para el análisis genético parasexual en *P. rhodozyma*.

5.1.- Fusión de mutantes de pigmentación.

Los resultados obtenidos en fusiones entre cepas mutantes afectados en pigmentación y de la cepa silvestre UCD 67-385 con algunas de estas mutantes, se presentan en la Tabla 7. El resultado más relevante en estos experimentos es la formación de colonias sectorizadas, las cuales poseen sectores con ambos fenotipos parentales. Las colonias más frecuentes fueron aquellas que exhibían el fenotipo parental.

Para establecer si las colonias sectorizadas originadas en estos experimentos son realmente producto de la fusión de protoplastos, se realizaron análisis de descendencia. Los resultados se muestran en la Tabla 8. Cada colonia sectorizada volvió a generar colonias sectorizadas con una frecuencia menor a la encontrada inicialmente en los productos directos de la fusión, excepto en la colonia sectorizada Atx5 : Atx6. Como control se realizaron mezclas de células sin tratar con novozima, provenientes de las cepas mutantes de pigmentación. En ninguno de los controles aparecieron colonias sectorizadas.

Tabla 7

Resultados de los experimentos de fusión entre cepas mutantes de pigmentación de *Phaffia rhodozyma*.

Fusión	Fenotipos (%)			
	Tipo parental		Tipo Recombinante	
	Parental 1	Parental 2	Sectorizada	Silvestre
Parental 1 : Parental 2				
Atx3 : Atx5	98.4	0.6	1.0	0
Atx3 : Atx6	56.6	41.9	1.5	0
Atx5 : Atx6	29.1	70.6	0.3	0
WT ^a : Atx3	53.8	44.2	2.0	-
WT ^a : Atx5	78.9	20.7	0.3	-
WT ^a : Atx6	42.2	57.4	0.3	-

Ninguna cepa fusionada consigo misma generó colonias sectorizadas o con fenotipo silvestre. (a), cepa silvestre UCD 67-385. Las colonias sectorizadas muestran sectores con fenotipos de cepas parentales en variables proporciones. Se analizaron un promedio de 500 colonias por cada fusión.

Tabla 8

Análisis de descendencia de colonias sectorizadas de varias fusiones.

Fusión	Colonia sectorizada Generación 1		
	Parental 1 (%)	Parental 2 (%)	Sectorizada (%)
Parental 1 : Parental 2			
Atx3 : Atx5	93.3	6.5	0.1
Atx3 : Atx6	78.3	21.2	0.5
Atx3 : Atx6	28.6	71.4	0
Atx3 : Atx6	96.7	2.8	0.5
Atx5 : Atx6	64.6	34.1	1.2
WT ^a : Atx3	64.8	33.2	2.0
WT ^a : Atx3	29.1	69.2	1.7
WT ^a : Atx3	53.5	44.4	2.0
WT ^a : Atx6	77.1	22.7	0.2

Se analizó la descendencia en una generación para colonias sectorizadas derivadas de distintas fusiones. Para la primera generación, se tomó la colonia sectorizada y se resuspendió en agua destilada estéril. Luego las células fueron plaqueadas sobre medio YM. Se analizó un promedio de 300 colonias por colonia sectorizada. (a), cepa silvestre UCD 67-385.

En la Tabla 8 se puede observar que tres colonias sectorizadas, derivadas de la fusión Atx3 : Atx6, difieren en el patrón de segregación de colonias con fenotipo parental y colonias sectorizadas. El mismo resultado fue encontrado entre las colonias sectorizadas producto de la fusión UCD 67-385 : Atx3.

Mediante tinción con 4,6-diamino-2-fenilindol (DAPI), se realizó un conteo de núcleos por célula en las colonias sectorizadas y cepa silvestre UCD 67-385. En todas las colonias sectorizadas analizadas se comprobó la presencia de células con más de un núcleo, mientras que en la cepa silvestre sólo se observó células con un núcleo. La Figura 13 muestra la presencia de más de un núcleo por célula en una de las fusantes sectorizadas. Además, se observaron en algunos casos la presencia de dos núcleos en la célula madre y su respectiva yema (Figura 14). Sin embargo, también fue posible observar eventos de segregación nuclear, sugiriendo la inestabilidad mitótica de los fusantes sectorizados.

5.2.- Fusión de dobles mutantes.

Con el fin de lograr productos de fusión más estables, se utilizaron protoplastos derivados de cepas dobles mutantes, portando mutaciones de auxotrofia y deficiencia en la síntesis de pigmentos.

Como se muestra en la Tabla 9, la fusión Atx3; Aux : Atx5; Ade, dio 32 fusantes protótrofos, equivalentes a una frecuencia de 5.8×10^{-6} . Estos fusantes protótrofos fueron seleccionados y mantenidos en placas con medio MM_v, para

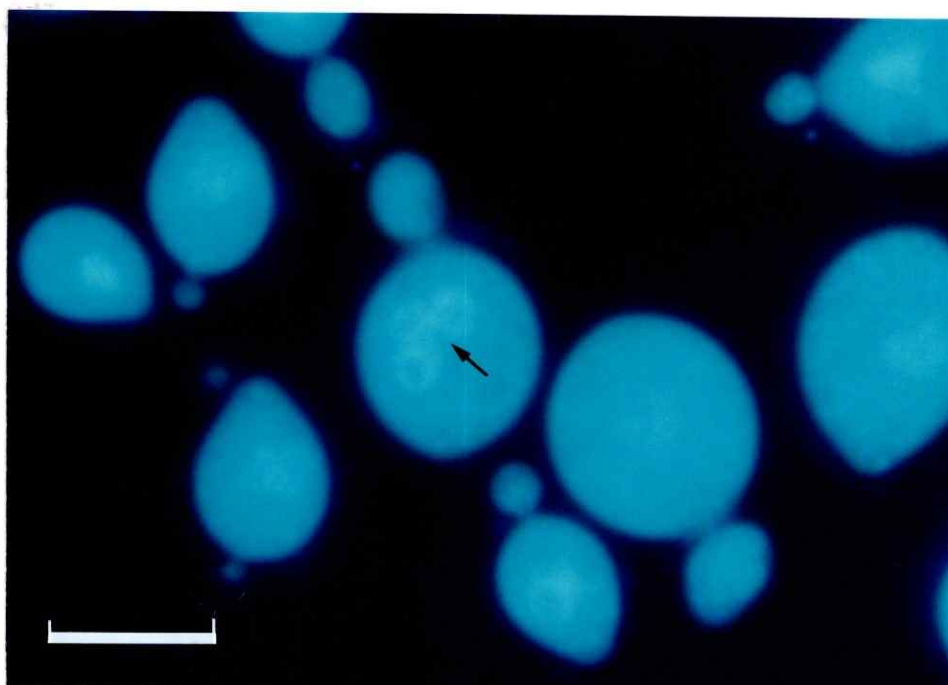


Figura 13:

Célula de *Phaffia rhodozyma* multicariótica. Microfotografía de células de una colonia sectorizada derivada de la fusión Atx5 : Atx6. Mediante tinción DAPI se destaca la presencia de tres núcleos en la misma célula (→). Aumento 400X. La barra en la microfotografía representa 10 μm .

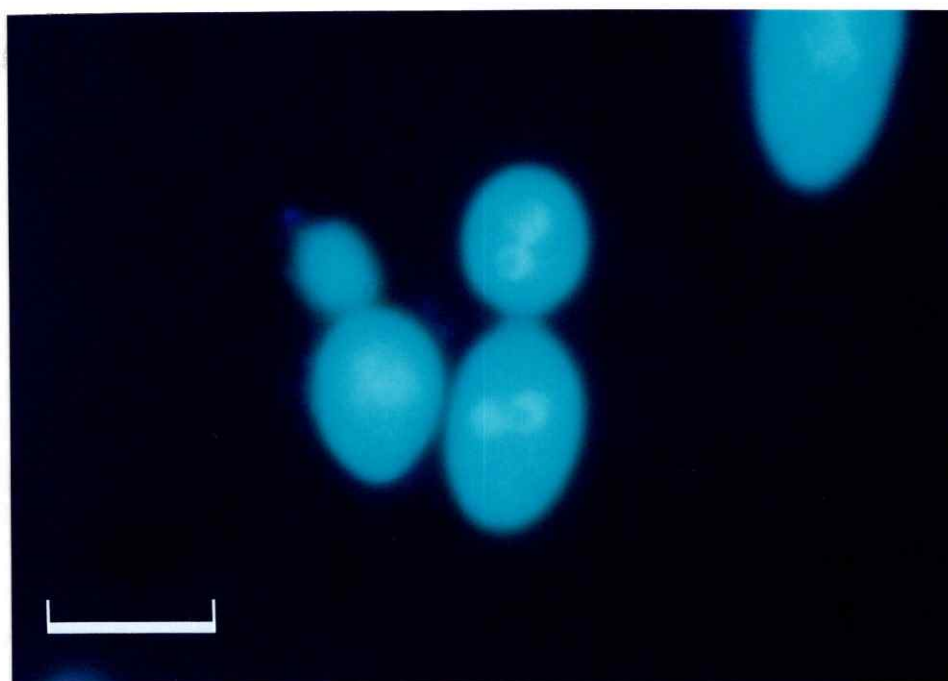


Figura 14:

Célula madre y su yema dicariótica de *Phaffia rhodozyma*. Microfotografía de una célula de una colonia sectorizada derivada de la fusión Atx5 : Atx6. Se observan la presencia de dos núcleos en la célula madre e hija. Tinción DAPI. Aumento 400X. La barra en la microfotografía representa 10 μ m.

Tabla 9

Fusión entre cepas dobles mutantes de *Phaffia rhodozyma*.

Fusión Parental 1 : Parental 2	Regeneración (%)	Frecuencia Fusantes Protótrofos
Atx3; Aux : Atx5; Ade	27.1	5.8×10^{-6}
Atx5; Ade : Atx6; Lis	3.3	0
Atx3; Aux	16.0	0
Atx5; Ade	77.2	0
Atx6; Lis	n.d	0

Los fusantes fueron seleccionados después de incubar las células a 22 °C por 15 días en placas MM_v. El porcentaje de regeneración fue estimado a partir del número de colonias aparecidas en placas con medio YM+KCl. Se analizaron entre 1.0×10^6 y 5.5×10^6 células por fusión.

forzar la complementación. Con respecto al fenotipo de pigmentación, todos los fusantes protótrofos presentaban un color similar a la cepa silvestre UCD 67-385, aunque con distinta tonalidad, excepto uno (denominado Fs18, el cual fue albino). Estos resultados indican algún grado de complementación de las mutaciones auxótrofas y de pigmentación.

Dos experimentos de fusión independientes entre las cepas Atx5; Ade y Atx6; Lis no originaron fusantes. Sin embargo, la regeneración de los protoplastos promedio en esta fusión fue de 3.3%, ocho veces inferior a la regeneración de los protoplastos de la fusión Atx3; Aux : Atx5; Ade (Tabla 9). Los fusantes Atx3; Aux : Atx5; Ade fueron replicados en placas con MM_v para mantener la selección. Se determinaron las curvas de crecimiento para algunos de ellos y se compararon con la de la cepa silvestre UCD 67-385 (Figura 15). Se observa claramente que la cepa silvestre posee la mayor tasa de crecimiento, y que las cepas parentales Atx3; Aux y Atx5; Ade, como se esperaba, no son capaces de crecer en MM_v. Sin embargo, los fusantes crecen en el mismo medio, con una tasa menor que la de la cepa silvestre, lo cual podría ser explicado por su inestabilidad durante las divisiones mitóticas. Se realizó un análisis de núcleos mediante tinción con DAPI, observándose la presencia de más de un núcleo en los fusantes protótrofos (Figura 16A) y la segregación de éstos durante el evento de yemación (Figura 16B). Las células con más de un núcleo representan sólo un bajo porcentaje de la población celular (1.4 a 7.3%), siendo la mayoría uninucleadas (Tabla 10). En muy raros casos se encontraron células conteniendo más de dos núcleos en su interior (1.35%).

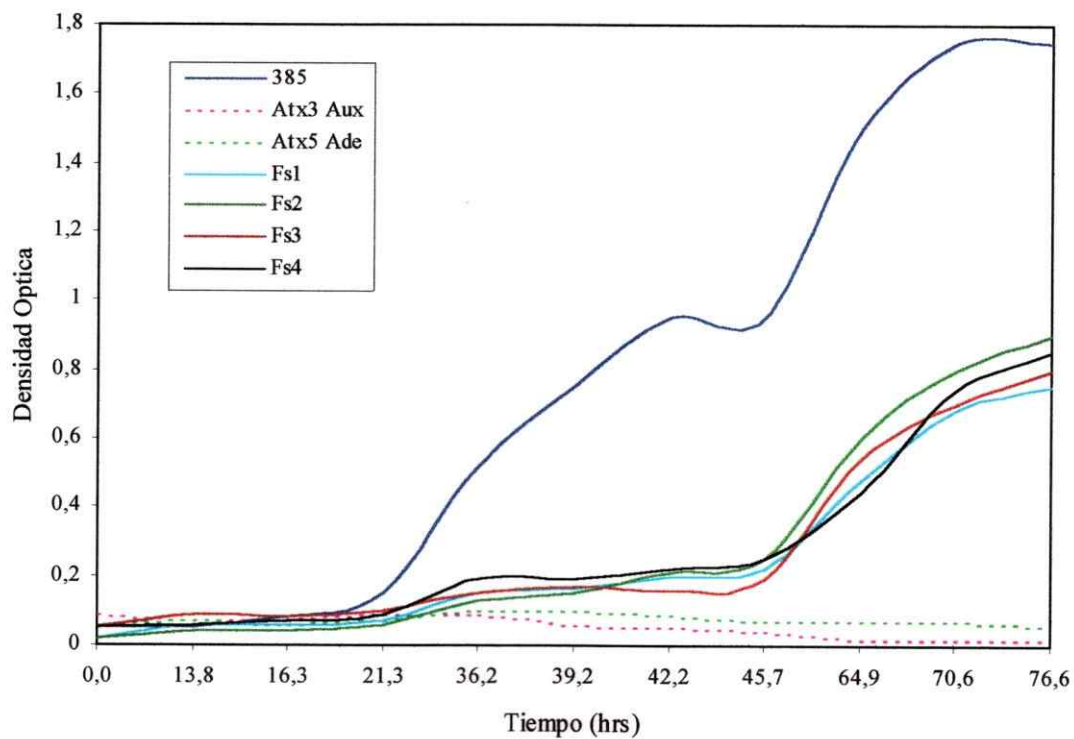


Figura 15:

Curvas de crecimiento de la cepa silvestre UCD 67-385 y fusantes Fs1, Fs2, Fs3 y Fs4 derivados de la fusión Atx3; Aux : Atx5; Ade,. Todos los cultivos fueron realizados en medio MM_v. Se incluyeron ambos parentales de la fusión, Atx3; Aux y Atx5; Ade, como control.

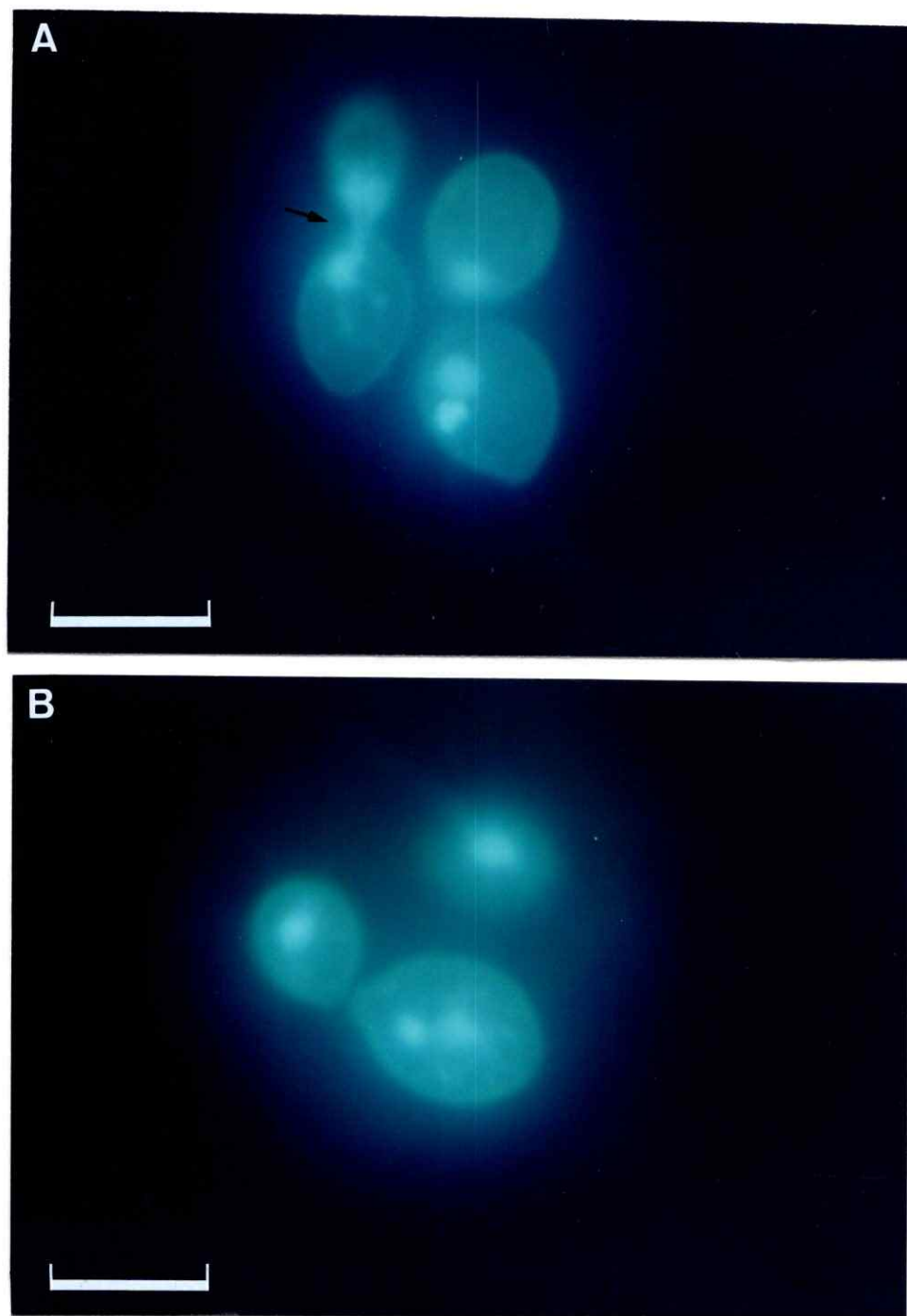


Figura 16:

Células de una fusante Atx3; Aux : Atx5; Ade. Microfotografía de células teñidas con DAPI. **A:** Se muestra el evento de segregación de un núcleo desde la célula madre a su célula hija (→). **B:** Célula madre dicariótica y su célula hija presentando sólo un núcleo por segregación nuclear. Aumento 400X. Las barras en las microfotos representan 10 µm.

Tabla 10

Distribución de núcleos en cepas de *Phaffia rhodozyma*.

Cepas	1 Núcleo (%)	2 Núcleos (%)	3 Núcleos (%)	Nº Células analizadas
UCD 67-385	100.0	0	0	751
Atx3; Aux	100.0	0	0	500
Atx5; Ade	100.0	0	0	516
Fs1	92.7	7.3	0	385
Fs2	92.4	6.5	1.1	370
Fs3	92.4	6.5	1.0	382
Fs4	92.3	6.8	0.9	235
Fs5	91.5	5.1	3.4	117
Fs6	91.7	6.9	1.4	144
Fs18	99.6	0.4	0	670
Fs21	92.0	7.6	0.3	288
Fs31	98.6	1.4	0	418

El número de núcleos se determinó por observación microscópica después de tinción con DAPI.

Paralelamente, se determinó la producción de astaxantina en algunos de los fusantes (Tabla 11). La mayoría de los fusantes analizados mostraron un incremento en la síntesis de pigmento respecto de la cepa silvestre UCD 67-385. Los fusantes Fs6 y Fs9 producen dos veces más pigmento (887 y 720 ppm, respectivamente), mientras que Fs4 muestra una cantidad de astaxantina similar al de la cepa silvestre (334 ppm) y Fs18 no produce astaxantina (Tabla 11).

Los resultados del análisis de descendencia en cuatro fusantes, Fs1, Fs2, Fs18 y Fs21 se presentan en la Tabla 12. Los fusantes protótrofos analizados muestran una amplia segregación de colores en las placas YM sin presión selectiva, con excepción del fusante Fs18. El fenotipo observado con mayor frecuencia fue el silvestre (anaranjado) en los fusantes Fs1 y Fs2 (Tabla 12). El fusante Fs21, en cambio, mostró segregación para los fenotipos albino y amarillo, con valores similares, 44.1 y 49.6%, respectivamente. El fusante Fs18 no mostró segregación en medio YM ni MM_v, siendo todas sus colonias derivadas albinas. Adicionalmente, se observó la presencia de colonias sectorizadas que se derivaron de las cepas Fs1 y Fs2 en una proporción alta, mientras que Fs21 muestra un bajo porcentaje de tales colonias y en Fs18 no están presentes. Colonias con un color rojo intenso fueron observadas en los fusantes Fs1, Fs2 y Fs21. Colonias con fenotipo amarillo sólo aparecieron cuando la Fs21 fue incubada en medio YM (49.6%). Por otro lado, en las placas con MM_v la segregación de colores no fue tan amplia, los fenotipos más frecuentes fueron el color silvestre (rojo-naranja) y rosado. Sólo los fusantes Fs18 y Fs21 generaron colonias con un fenotipo albino (100% y 4.8%,

Tabla 11

Síntesis de astaxantina en algunos fusantes provenientes de la fusión Atx3; Aux : Atx5; Ade.

Cepas	Astaxantina ^a
UCD 67-385	350
Fs1	619
Fs2	693
Fs3	538
Fs4	334
Fs5	450
Fs6	887
Fs7	504
Fs8	511
Fs9	720
Fs10	541
Fs18	0

(a), concentración en ppm, estimada de acuerdo a An *et al.* (1989).

Tabla 12

Análisis de descendencia de los productos de la fusión Atx3; Aux : Atx5; Ade1.

Fenotipo	% de colonias de la descendencia con fenotipo:							
	Placas YM				Placas MM _v			
	Fs1	Fs2	Fs18	Fs21	Fs1	Fs2	Fs18	Fs21
Rojo	1.2	3.6	0	2.5	0	0	0	0
Naranja	54.5	76.4	0	3.4	38.9	67.9	0	72.1
Rosado	12.1	3.6	0	0	57.9	32.1	0	23.1
Albino	2.4	1.8	100	44.1	3.1	0	100	4.8
Amarillo	0	0	0	49.6	0	0	0	0
Sectorizado	29.7	14.5	0	0.33	0	0	0	0
Células/ml	8.2×10^6	5.5×10^6	3.5×10^6	9.0×10^6	6.3×10^5	8.1×10^5	2.9×10^6	5.2×10^5

Colonias fusantes protótrofas crecidas en placas YM fueron resuspendidas en agua estéril para luego ser plaqueadas en diluciones adecuadas en placas con MM_v e YM. La cepa Atx3; Aux tiene fenotipo albino y es auxótrofa, la cepa Atx5; Ade1 es amarilla y auxótrofa para adenina.

respectivamente). Obviamente, todas las colonias en placas MM_v fueron protótrofas.

Los productos fusantes Fs fueron almacenados en placas MM_v a 12 °C. Después de 10 días a esta temperatura, la superficie de las colonias presentaba un aspecto aterciopelado en todos los fusantes. La observación microscópica de estas colonias mostró la presencia de estructuras sexuales en toda la superficie, consistentes de un largo holobasidio con basidiosporas terminales (Figura 17). El número de basidiosporas terminales depende de la edad de la colonia, colonias de 7 días presentan holobasidios con dos basidiosporas, mientras que colonias de más de 14 días poseen entre 4 y 6 basidiosporas por holobasidio. Además, en algunos casos, se observaron basidiosporas germinando por yemación. En la Figura 18A, se muestra una microfotografía de un holobasidio emergiendo desde una colonia de la fusante Fs21, con cuatro basidiosporas terminales. En la Figura 18B se presenta una microfotografía de una célula aislada, su holobasidio y basidiosporas terminales. Mediante tinción DAPI se observó la presencia de un solo núcleo por basidiospora y la migración de estos a través del holobasidio desde la célula madre hacia las basidiosporas (Figura 19).

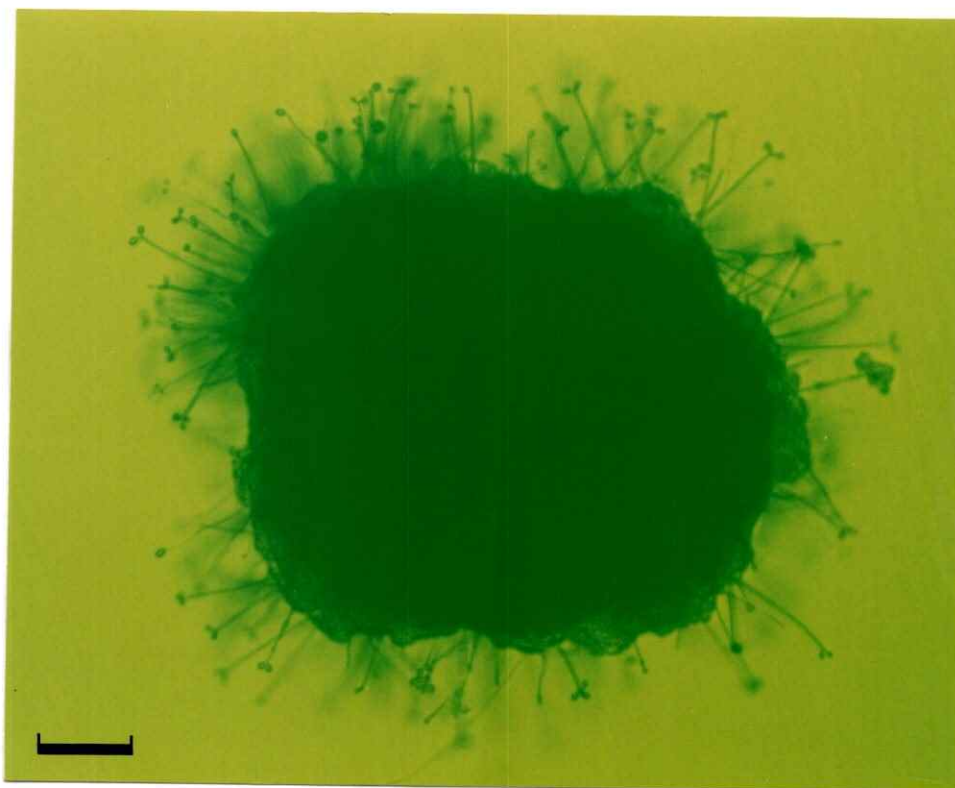


Figura 17:

Colonia Fs21 presentando estructuras sexuales. La colonia Fs21 deriva de la fusión Atx3; Aux : Atx5; Ade, presentando un gran número de estructuras sexuales en su superficie. Aumento 100X. La barra en la microfotografía representa 100 μm .

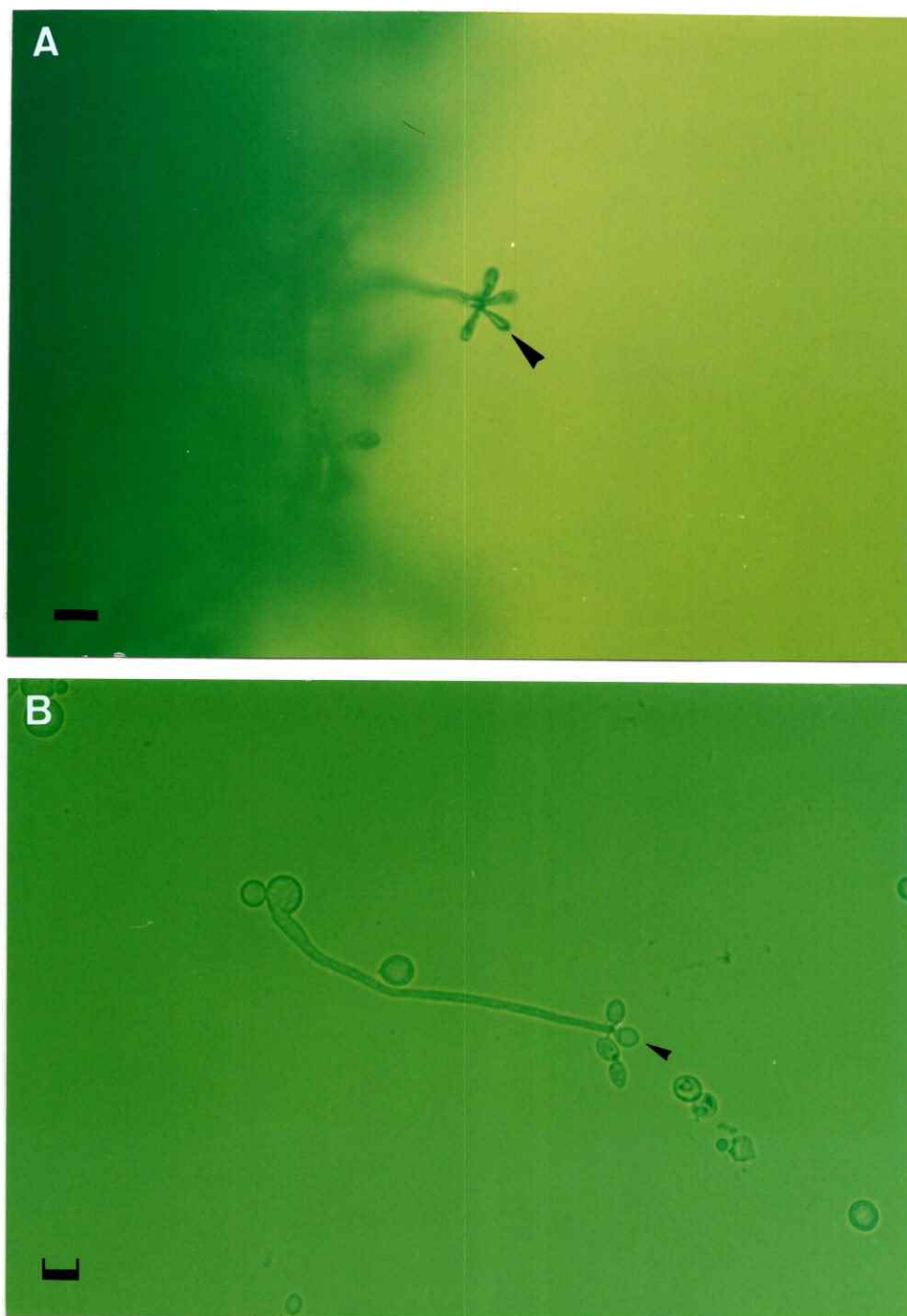


Figura 18:

Células de *Phaffia rhodozyma* con estructuras sexuales. Estructuras sexuales en la fusante Fs21 (Atx3; Aux : Atx5; Ade). **A:** Microfotografía de un holobasidio con cuatro basidiosporas terminales (►) emergiendo desde la colonia. **B:** Microfotografía destacando la formación de un holobasidio con basidiosporas terminales (►) a partir de una célula aislada. Aumento 400X. Las barras en las microfotos representan 10 μm.

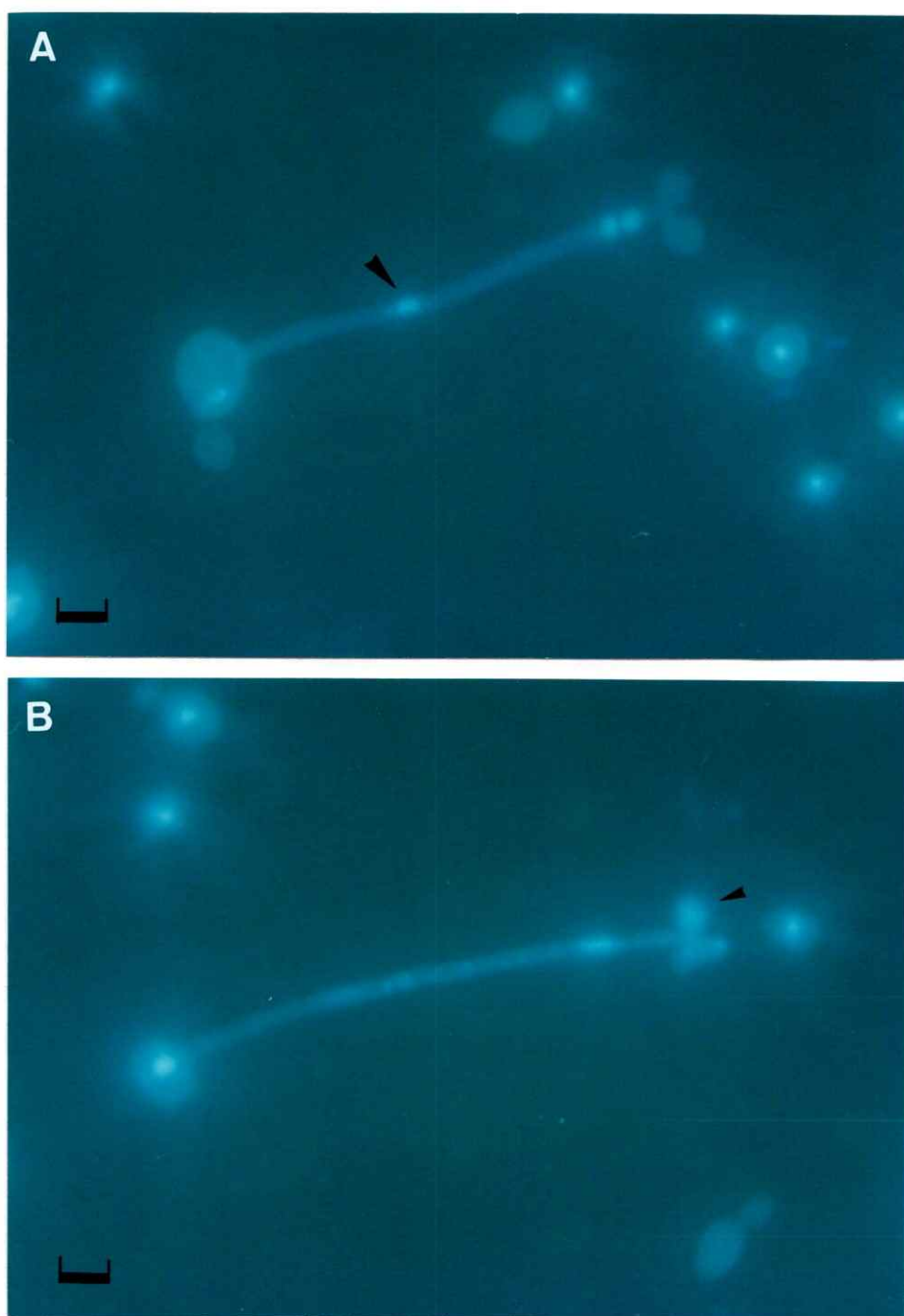


Figura 19:

Tinción DAPI de las estructuras sexuales de *Phaffia rhodozyma*. Estructuras sexuales en la fusante Fs21 (Atx3; Aux : Atx5; Ade) con tinción DAPI. **A y B:** Microfotografías destacando la migración de núcleos (►) desde la célula madre hacia la basidiosporas terminales, nótese la presencia de un solo núcleo por basidiospora (►). Aumento 400X. Las barras en las microfotos representan 10 μ m.

6.- Clonamiento genes de actina y β -tubulina.

Con el propósito de obtener información respecto del nivel de ploidía de *P. rhodozyma*, se intentó clonar los genes esenciales de actina y β -tubulina para realizar experimentos de disrupción génica.

Gen actina de *S. cerevisiae*: Un fragmento interno del gen de actina de *S. cerevisiae* fue subclonado a partir del plásmido pYact I, del cual se muestra un mapa de restricción en la Figura 20. El fragmento *Bam* HI-*Hind* III de 1.6 kb, que codifica para actina, fue ligado al plásmido pBlueScript SK, digerido también con *Bam* HI y *Hind* III (Figura 21). El plásmido híbrido se denominó pGHac I. Su identidad y la orientación del inserto *Bam* HI-*Hind* III de 1.6 kb fueron confirmadas por análisis de restricción.

Gen β -tubulina de *N. crassa*: El gen de β -tubulina, que confiere resistencia a benomil en *N. crassa*, fue subclonado a partir del cósmido 3 :11H, proveniente de una librería genómica de *N. crassa* (Schmidhauser *et al.*, 1990). Un mapa de restricción parcial de este cósmido se presenta en la Figura 22. El fragmento *Sal* I de 2.6 kb, conteniendo el gen de tubulina, fue ligado a pBlueScrip SK (Figura 21). El plásmido híbrido se denominó pGHtu I. Su identidad fue confirmada por análisis de restricción.

Los resultados de las hibridaciones con sondas constituidas por los fragmentos subclonados de los genes de actina y β -tubulina contra DNA genómico de *P. rhodozyma*, digerido con *Bam* HI, de las cepas silvestres

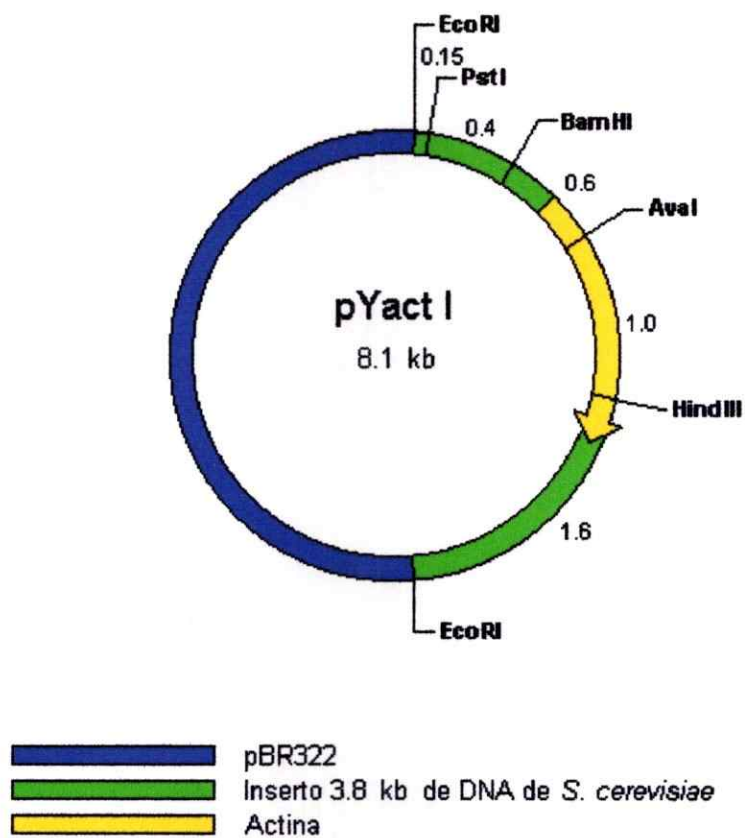


Figura 20:

Mapa de restricción del plásmido pYact I. Sólo se muestran los sitios de restricción relevantes. El gen de actina en el inserto corresponde a *Saccharomyces cerevisiae*. Las distancias entre los sitios de restricción del inserto están en kb y no existe escala.

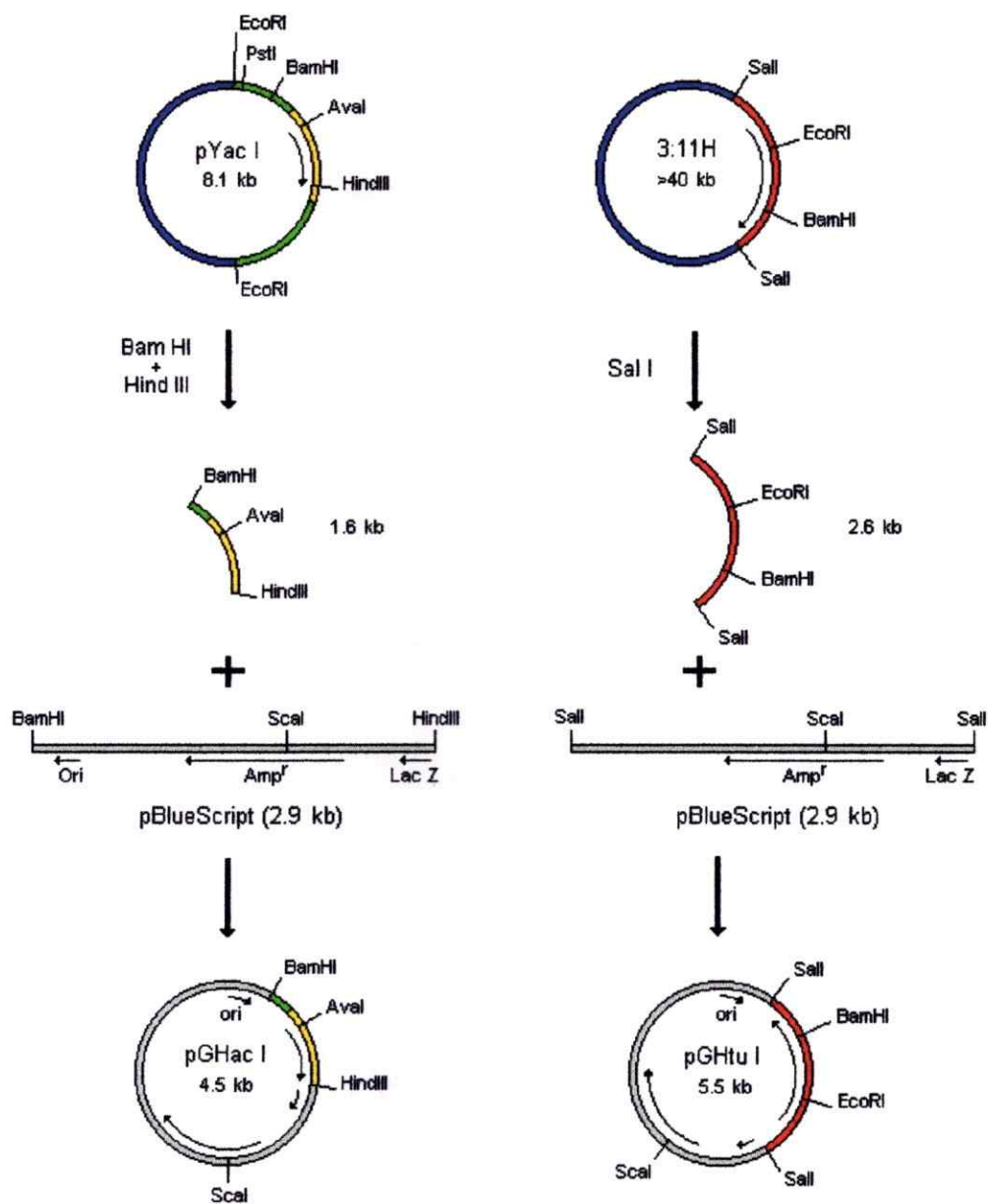


Figura 21:

Esquema de clonamiento de los plásmidos pGHac I y pGHtu I. El plásmido receptor fue pBlueScript SK para ambos fragmentos.

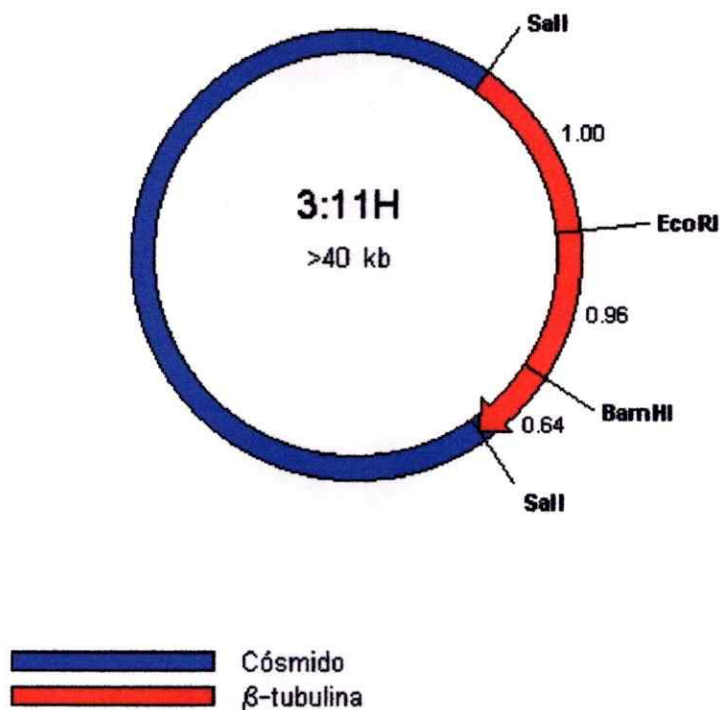


Figura 22:

Mapa de restricción del cósmido 3:11H. Sólo se muestran los sitios de restricción relevantes. El gen de β -tubulina corresponde a *Neurospora crassa*. Las distancias entre los sitios de restricción del inserto están en kb y no existe escala.

UCD 67-210 y UCD 67-385, fueron negativos o pocos claros, aún en condiciones de baja restricción, por lo que se decidió hacer experimentos de hibridación de DNA en colonia. Para ello se utilizó la librería genómica de *P. rhodozyma* construida en pBlueScript SK, la que está organizada en grupos de 100 a 150 clones recombinantes (Martínez, 1995). Con el propósito de limitar los grupos a analizar se hibridó contra el DNA aislado desde varios grupos de la genoteca, usando como sondas DNA que codifica para actina (pGHac I) y β -tubulina (pGHtu I). En la Figura 23 se muestran los resultados de la hibridación con la sonda para β -tubulina. Se seleccionaron los grupos 10 y 11 de la genoteca, por presentar una hibridación fuerte. La sonda para actina no hibridó con ninguno de los grupos analizados.

La hibridación a colonias derivadas de los grupos 10 y 11 de la genoteca, con la sonda β -tubulina, mostró una fuerte hibridación con los clones 10 :46 y 10 :80 (Figura 24) y una débil hibridación con los clones 11 :3, 11 :81 y 11 :90 (Tabla 13).

Por análisis de restricción se determinó que los clones 10 :46 y 10 :80 eran idénticos. El mapa de restricción para ambos clones se muestra en la Figura 25. Este análisis indica que ambos clones tienen un inserto de 2.9 kb y que han perdido un sitio de restricción *Bam* HI.

En cambio, los clones 11 :3, 11 :81 y 11 :90 muestran patrones de restricción totalmente distintos (Tabla 14) conteniendo insertos de 5.1, 7.1 y 9.1 kb, respectivamente (Figura 25).

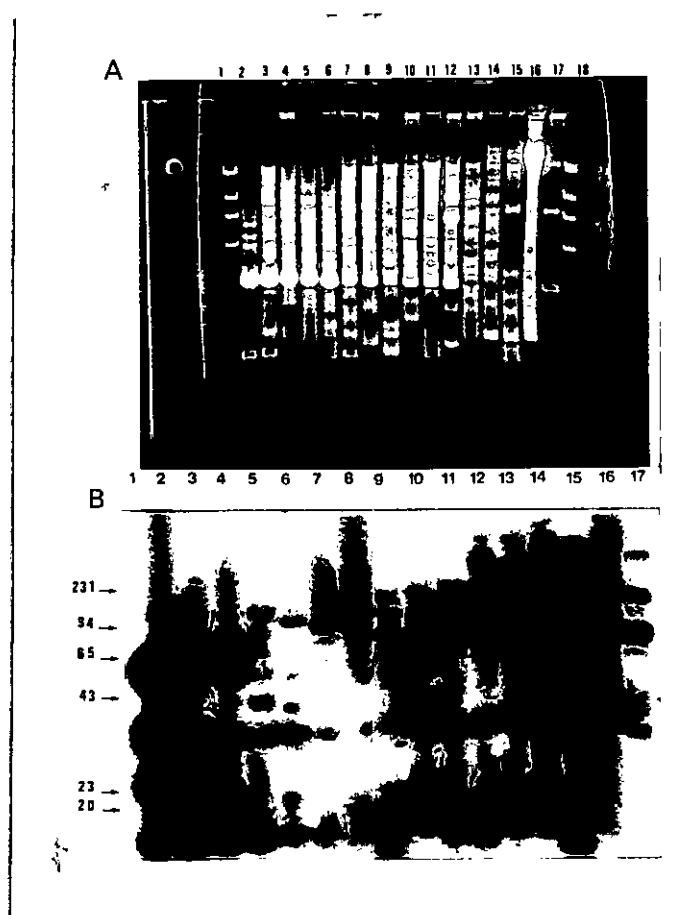


Figura 23:

Hibridación del gen de β -tubulina contra DNA de la librería genómica de *Phaffia rhodozyma*. La librería genómica en pBluescript SK está organizada en grupos de 140 clones (Martínez, 1995). A: Carriles 1 y 18, DNA del fago lambda digerido con *Hind* III, carriles 2 al 17, DNA de los grupos de clones 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 19, 21, 23, 24, 25, 22, 14, 18, 20, 8, respectivamente, digeridos con *Bam* HI. B: Autorradiografía después de hibridar con un fragmento *Sal* I de 2.6 kb que contiene el gen de β -tubulina de *Neurospora crassa*.

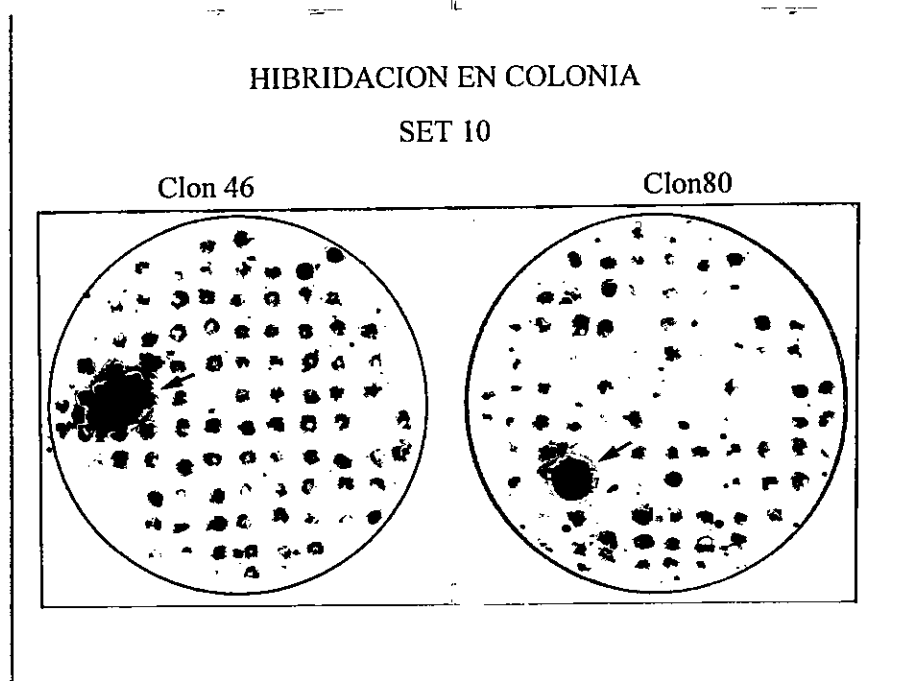


Figura 24:

Hibridación DNA-colonia, utilizando el gen β -tubulina como sonda. Se muestran colonias del grupo 10 de la genoteca de *Phaffia rhodozyma*. \rightarrow , indica los clones 46 y 80. La sonda corresponde a un fragmento *Sal* I de 2.6 kb que contiene el gen de β -tubulina de *Neurospora crassa*.

Tabla 13

Clones seleccionados desde la hibridación en colonia.

Clones			Hibridación	Inserto (kb)
Grupo 10	Colonia 46		+++	2.9
	Colonia 80		+++	2.9
Grupo 11	Colonia 3		++	5.1
	Colonia 81		++	7.1
	Colonia 90		++	9.1

Los tamaños del inserto fueron determinados por digestión del plásmido recombinante con *Bam* HI.

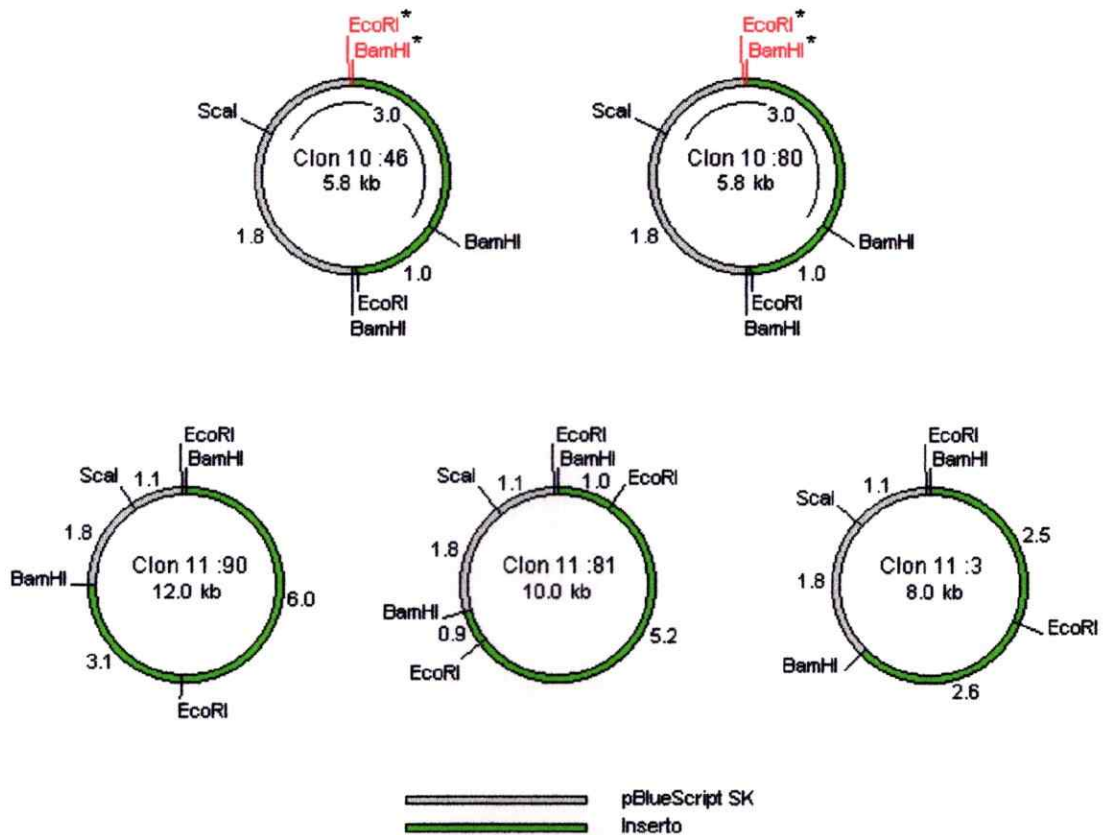


Figura 25:

Mapas de restricción de los clones seleccionados por hibridación con β -tubulina. Los clones provienen de la genoteca de *Phaffia rhodozyma* en BlueScript. Sólo se muestran los sitios de restricción relevantes y no existe escala. Sitios de restricción perdidos en pBlueScript, se indican como *.

Tabla 14

Análisis de restricción de los clones seleccionados por hibridación con β -tubulina.

Enzima	Fragmentos (kb)			
	Clon 10 :46	Clon 11 :3	Clon 11 :81	Clon 11 :90
<i>Bam</i> HI	4.8, 1.0	5.1, 2.9	7.1, 2.9	9.1, 2.9
<i>Eco</i> RI	5.8	5.5, 2.5	5.2, 3.8, 1.0	6.0
<i>Sca</i> I	5.8	8.0	10.0	12.0
<i>Bam</i> HI + <i>Sca</i> I	3.0, 1.8, 1.0	5.1, 1.8, 1.1	7.1, 1.8, 1.1	9.1, 1.8, 1.1
<i>Eco</i> RI + <i>Sca</i> I	4.0, 1.8	4.4, 2.5, 1.1	5.2, 2.7, 1.1, 1.0	6.0, 4.9, 1.1
<i>Bam</i> HI + <i>Eco</i> RI	4.8, 1.0	2.9, 2.6, 2.5	5.2, 2.9, 1.0, 0.9	6.0, 3.1, 2.9
Tamaño del clon	5.8	8.0	10.0	12.0

Los fragmentos fueron separados por electroforesis en geles de agarosa 0.7% y sus tamaños fueron estimados utilizando el programa DNAFRAG v3.03.

Se determinó la secuencia del clon 10:46 por el método del dideoxinucleotido. El análisis de la secuencia de este clon, mediante el uso del paquete de software de Genetics Computer Group (Devereux *et al.*, 1992), no reveló identidad con genes de tubulina previamente clonados en otros organismos, incluyendo a *S. cerevisiae*.

7.- Formación de revertantes.

Para determinar el nivel de ploidía de *P. rhodozyma* se empleó un análisis de recombinación mitótica. Para ello, fue necesario formar cepas revertantes a partir de cepas con fenotipo mutante de pigmentación y auxotrofia.

Mutantes de colores y auxótrofos fueron sometidos a mutagénesis con NTG con el fin de inducir reversión de la mutación. Se emplearon mutantes que provenían de la cepa silvestre UCD 67-385, obtenidas por mutagénesis con NTG. Estas son las cepas Atx8, Atx9, Atx10, Ade1 y Atx6; Arg2 (Apéndice 4).

En la Tabla 15, se observa que sólo las cepas mutantes Atx10, Ade1 y Atx6; Arg2 dieron origen a revertantes. A partir de la cepa mutante Atx10 se obtuvieron revertantes con fenotipo rojo-naranja, desde Ade1 se obtuvieron revertantes protótrofos, capaces de crecer en medio MM_v y desde Atx6; Arg2 sólo revertantes protótrofos.

Tabla 15

Obtención de revertantes de *Phaffia rhodozyma* mediante mutagénesis con NTG.

Cepa mutante	NTG	Revertantes
Atx8	80 µg/ml	0
Atx9	80 µg/ml	0
Atx10	80 µg/ml	2
Adel	80 µg/ml	8
Atx6; Arg2	80 µg/ml	3 ^a

Todos los revertantes fueron seleccionados por su fenotipo similar al de la cepa silvestre. (a), sólo revertantes Atx6; Rev Arg2.

Los revertantes fueron denominadas como sigue:

Atx10 → Rev Atx10-1 y Rev Atx10-2
Ade1 → Rev Ade1-1, Rev Ade1-2, Rev Ade1-3, Rev Ade1-4,
Rev Ade1-5, Rev Ade1-6, Rev Ade1-7 y Rev Ade1-8
Atx6; Arg2 → Atx6; Rev Arg2-1, Atx6; Rev Arg2-2 y
Atx6; Rev Arg2-3

8.- Comportamiento de los revertantes en la mutagénesis.

Con el fin de estudiar el comportamiento de las cepas revertantes en experimentos de mutagénesis, se utilizó luz UV como agente mutagénico. Como se muestra en la Tabla 16, ninguno de los revertantes tratados dio origen a mutantes. El enriquecimiento con nistatina, después de irradiar con UV las células de los revertantes Rev Ade1, no resultó en el aislamiento de mutantes auxótrofos. Por esta razón, se realizaron experimentos de mutagénesis con NTG. En esta oportunidad aparecieron mutantes en una alta frecuencia.

En la Tabla 17, se observa que la frecuencia de mutantes amarillos originados desde la cepa Rev Atx10-1 supera, al menos, en 63 veces la frecuencia observada en la cepa silvestre UCD 67-385, como control. Por otro lado, la cepa Rev Atx10-2 muestra una frecuencia de mutantes amarillos, al menos, 9 veces mayor que la cepa UCD 67-385. Además, esta cepa tiene una

frecuencia de mutantes albinos, inducidos por NTG, 5 veces mayor que la cepa silvestre, lo cual se discute más adelante. La cepa revertante Rev Ade1-1 muestra una frecuencia de mutantes adenina 4 veces mayor que la cepa UCD 67-385 y la cepa revertante Atx6; Rev Arg2-1 da una frecuencia de mutantes arginina dos veces más grande que en la cepa silvestre.

Tabla 16

Mutagénesis de los revertantes Atx10 y Ade1 de *Phaffia rhodozyma*.

Revertantes	UV	Nistatina	Frecuencia mutantes
Revertantes de pigmentación			
UCD 67-385	10 min	n.a.	$< 2.0 \times 10^{-5}$
Rev Atx10-1	10 min	n.a.	$< 1.1 \times 10^{-5}$
Rev Atx10-2	10 min	n.a.	$< 7.0 \times 10^{-5}$
Revertantes de auxotrofia			
UCD 67-385	10 min	0 $\mu\text{g/ml}$	$< 1.0 \times 10^{-3}$
Rev Ade1-1	10 min	0 $\mu\text{g/ml}$	$< 1.0 \times 10^{-3}$
Rev Ade1-1	10 min	10 $\mu\text{g/ml}$	$< 8.9 \times 10^{-4}$
Rev Ade1-7	10 min	0 $\mu\text{g/ml}$	$< 1.1 \times 10^{-3}$

n.a. no aplicable

Tabla 17

Frecuencia de mutantes, obtenidos por mutagénesis con NTG, en cepas revertantes de *Phaffia rhodozyma*.

Revertantes de color	Fenotipos	
	Amarillo	Albino
UCD 67-385	$< 1.0 \times 10^{-4}$	5.3×10^{-4}
Rev Atx10-1	6.3×10^{-3}	3.3×10^{-4}
Rev Atx10-2	9.4×10^{-4}	2.5×10^{-3}
Revertantes de auxotrofia	Auxotrofia original	Otra auxotrofia
UCD 67-385	1.2×10^{-3}	1.7×10^{-3}
Rev Ade1-1	4.5×10^{-3}	3.5×10^{-3}
UCD 67-385	n.d.	1.7×10^{-3}
Atx6; Rev Arg2-1	3.8×10^{-3}	5.7×10^{-3}

Los fenotipos de color fueron registrados después de incubar a 22 °C durante 7 días.
n.d. no determinado.

DISCUSION

En hongos y levaduras, a diferencia de lo que ocurre en eucariontes superiores, el estudio citogenético está limitado a unos pocos casos. La razón de ello se debe principalmente al pequeño tamaño de sus cromosomas y su débil compactación en los procesos de mitosis y meiosis. Su comportamiento durante la mitosis y meiosis, así como sus características estructurales (ubicación del centrómero, regiones heterocromáticas, etc.) son casi desconocidas. Además, en muchos hongos sin fase sexual, el número de cromosomas no está aún definido, debido a la imposibilidad de realizar estudios citogenéticos con técnicas clásicas.

La electroforesis de campo pulsado, acoplada a experimentos de hibridación, ha proporcionado información acerca de la organización genómica de muchos organismos eucariontes inferiores (Carle & Olson, 1985; Magee & Magee, 1987; Smith *et al.*, 1987; Orbach *et al.*, 1988; Brody & Carbon, 1989; Sor & Fukuhara, 1989; Howlett, 1989; Cifuentes & Martínez, 1992).

En algunos hongos, donde el conocimiento genético es extenso, está demostrado que las bandas cromosómicas separadas por electroforesis de campo pulsado (cariotipo electroforético) corresponden a grupos de ligamiento definidos genéticamente (Zolan, 1995).

La electroforesis de campo pulsado aplicada a las cepas silvestres UCD 67-210 y UCD 67-385 de *P. rhodozyma* reveló la presencia de 8 y 9 bandas cromosómicas, respectivamente. Considerando las intensidades relativas de las bandas cromosómicas en los cariotipos electroforéticos, las bandas I y II en ambas cepas silvestres (Figura 2) representarían 3 cromosomas, una situación concordante con otro estudio (Adrio *et al.*, 1995). En cambio, las bandas cromosómicas VI y VIII parecen ser dobletes, mientras que la banda cromosómica III en UCD 67-210 representa igualmente dos cromosomas (Tabla 1y Tabla 2). Por lo tanto, estos resultados sugieren la presencia de un número haploide de 15 cromosomas en las dos cepas silvestres analizadas y un tamaño genómico haploide para UCD 67-210 de 25.3 Mb y para UCD 67-385 de 23.9 Mb. Los tamaños de genoma estimados por este procedimiento están de acuerdo a lo determinado por Adrio *et al.* (1995), UCD 67-210 = 22.8 Mb y UCD 67-385 = 26.7 Mb ; y por Nagy *et al.* (1994), UCD 67-210 = 23.2 Mb. Las diferencias en las estimaciones se deben principalmente a las condiciones de electroforesis empleadas para la separación de las bandas cromosómicas. Según sean las características de la electroforesis de campo pulsado, el patrón de un cariotipo electroforético puede variar de acuerdo a los parámetros de pulso inicial, pulso final, voltaje, tiempo de corrida, y temperatura de corrida (Chu *et al.*, 1986), cómo lo demuestra la Figura 1. Los tamaños de los cromosomas varían entre 350 kb y 2.5 Mb, rango de tamaños que concuerda con lo descrito por Adrio *et al.* (1995) y Nagy *et al.* (1994).

El análisis del cariotipo electroforético en las cepas silvestres determinó la presencia de un alto polimorfismo cromosómico en *P. rhodozyma*, resultado congruente con lo encontrado en otras cepas silvestres de la especie mediante electroforesis de

campo pulsado (Adrio *et al.*, 1995; Nagy *et al.*, 1994). El polimorfismo cromosómico, revelado por la electroforesis de campo pulsado, es común en una gran número de especies fúngicas (Magee & Magee, 1987; Orbach *et al.*, 1988; Brody & Carbon, 1989; Sor & Fukuhara, 1989; Passoth *et al.*, 1992; y Zolan *et al.*, 1994). De hecho, en 38 estudios independientes sobre diferentes organismos fúngicos, cerca del 80% mostró un polimorfismo cromosómico intra-especie (Zolan, 1995).

La naturaleza exacta del polimorfismo cromosómico es desconocida y su significado biológico para el organismo no está claro. Inicialmente, se propuso que el polimorfismo cromosómico era un medio por el cual los hongos imperfectos (sin ciclo sexual), generan y mantienen su diversidad genética. Sin embargo, hoy se sabe que este polimorfismo se distribuye, tanto, en especies asexuales como sexuales (Zolan, 1995).

Los mecanismos por los cuales se genera dicho polimorfismo son poco claros, pero se cree que involucran rearrreglos cromosómicos tanto en eventos mitóticos como meióticos (Zolan, 1995).

Existen varios tipos de rearrreglos en los cromosomas que podrían conducir al establecimiento de un polimorfismo cromosómico. Por ejemplo, eventos intracromosómicos pueden producir deleciones, causadas tanto por la recombinación entre secuencias repetidas (orientadas en el mismo sentido), como por intercambios desiguales entre repetidos en "tandem" en cromátidas hermanas u homólogas. Los quiebres en los cromosomas también pueden producir acortamientos de su tamaño, pérdida de DNA o bien translocaciones del tipo recíproca o no recíproca (Zolan, 1995). Por otro lado, la recombinación ectópica entre secuencias repetidas en cromosomas no homólogos también da origen a translocaciones, y la recombinación entre las regiones

subteloméricas puede generar extremos cromosómicos variables. Además, la recombinación entre cromosomas homólogos con tamaños diferentes pueden a su vez generar cromosomas con nuevos tamaños. Por último, cromosomas completos podrían perderse si estos carecen de secuencias esenciales para el crecimiento (Zolan, 1995).

Las sondas empleadas en experimentos de hibridación usando el cariotipo electroforético de cepas silvestres y mutantes de *P. rhodozyma* identificaron una banda cromosómica particular. La sonda ef-1 α hibridó solamente con la banda cromosómica VIII, la cual parece ser un doblete en UCD 67-385 (Figura 4) lo que sugiere que ef-1 α identifica uno de estos cromosomas.

Por otro lado, el fragmento *Bam* HI de 7.6 kb del plásmido pPR7.6, el cual corresponde a un fragmento *Bam* HI de DNA repetitivo, hibridó intensamente con la banda cromosómica I en la cepa silvestre UCD 67-385, y mutantes *AtxS1* y *Atx5* (Figura 5). Dado que la banda cromosómica I puede ser un triplete, se intentó resolver mejor la banda I bajo otras condiciones de electroforesis sin éxito, por lo tanto, el DNA repetitivo de 7.6 kb identificaría al menos un cromosoma en esta banda. En otro estudio, un fragmento de 7.8 kb (pMN1), el cual codificaría para los rRNA 5.8S, 18S y 26S de *Apergillus nidulans*, hibridó con la banda cromosómica mayor del cariotipo electroforético de la cepa UCD 67-210 (Nagy *et al.*, 1994). La naturaleza repetitiva del fragmento *Bam* HI de 7.6 kb (pPR7.6), sugeriría que contiene los genes que codifican para los rRNA de *P. rhodozyma*. Sin embargo, sólo la secuenciación de dicho fragmento podrá confirmar esta sugerencia, dado que pueden existir otros elementos repetitivos en el genoma, por ejemplo en *C. albicans* el DNA repetitivo, además del que codifica para

los rRNA, consiste también de repetidos invertidos en el DNA mitocondrial, las secuencias repetidas dispersas Ca3 y 27A, y las secuencias repetidas telomérica Ca7 (Scherer & Magee, 1990).

En otro experimento de hibridación, se utilizó como sonda un fragmento *Bam* HI de 5.3 kb de *P. rhodozyma*, derivado del plásmido pPR5.3. El plásmido pPR5.3 fue escogido al azar desde la librería genómica en pBlueScript SK de *P. rhodozyma*. El fragmento *Bam* HI de 5.3 kb tiene función desconocida y fue nombrado arbitrariamente como locus *R2*. La sonda hibridó únicamente a la banda cromosómica VIII en la cepa UCD 67-210 (Figura 6B, carril 1) y a las bandas VIII y IX en la cepa UCD 67-385 (Figura 6B, carril 2), sugiriendo que en esta última cepa las bandas cromosómicas VIII y IX tienen secuencias duplicadas. De esta forma, la sonda *R2* es capaz de revelar el polimorfismo cromosómico entre ambas cepas silvestres. La hibridación del cariotipo electroforético de las mutantes *Atx5* y *Atx6* con la sonda *R2*, también reveló el polimorfismo cromosómico ligado a las bandas VIII y IX (Figura 6B, carriles 5 y 6). Este resultado sorprende si se considera que ambas cepas mutantes provienen de la cepa silvestre UCD 67-385, por mutagénesis, lo que supone un cariotipo electroforético común. A diferencia de las cepas silvestres UCD 67-210 y UCD 67-385, las cepas mutantes parecen sólo diferir entre sí por la presencia (*Atx5*) y ausencia (*Atx6*) de la banda cromosómica IX (Figura 6A y B, carriles 3 y 4). Todo esto indica que *Atx6* pudo perder la banda cromosómica IX por un rearrreglo cromosómico después de la mutagénesis que la originó a partir de UCD 67-385.

La pérdida de la banda cromosómica IX en *Atx6* no tiene ningún efecto aparente sobre la viabilidad de la mutante. Esto puede significar que los genes localizados en la

banda cromosómica IX no son esenciales o bien estos están duplicados en otra entidad cromosómica. Esto último, podría ser el caso si los cromosomas representados por las bandas cromosómicas VIII y IX fueran cromosomas homólogos.

Mutagénesis en *Phaffia rhodozyma*.

La no obtención de mutantes auxótrofos a partir de las cepas silvestres y cepas mutantes Atx3 y Atx5, indica que la frecuencia de mutagénesis está por debajo del número de células analizadas en cada experimento. Aún la cepa silvestre UCD 67-383, la cuál en todos los casos presenta la mayor tasa de mutagénesis determinado por el número de mutantes de pigmentación (Martínez, 1995), no generó mutantes auxótrofos.

Estos resultados podrían ser explicados por la posible naturaleza diploide de *P. rhodozyma* propuesta en la hipótesis, sin embargo no es posible descartar otras causas, como la existencia de un sistema de reparación del daño al DNA muy eficiente o, alternativamente, una mayor protección a radiación UV debida a la presencia de pigmentos intracelulares. Dicho efecto protector de los pigmentos podría ser descontado si se considera que el tratamiento con luz UV de la cepa albina Atx3, tampoco dio mutantes auxotróficos (Tabla 4). Sin embargo, debe tenerse en cuenta que esta última cepa acumula fitoeno, ya que tiene afectado el gen *atx3*, que codifica para la fitoeno deshidrogenasa (Martínez, 1995).

Como una alternativa, se intentó obtener mutantes auxótrofos mediante un procedimiento de enriquecimiento por nistatina de la población de células auxótrofas. La

nistatina afecta sólo células en crecimiento, como por ejemplo los protótrofos en medio mínimo MM_v. En cambio, las células auxotróficas no pueden crecer en MM_v por lo que el antibiótico no tiene efecto sobre ellas (Snow, 1966). Sólo la cepa albina Atx3, originó un mutante auxótrofo entre 1000 colonias probadas (Tabla 5). El análisis de dicho mutante no permitió determinar el requerimiento para el cual es deficiente, lo cual permite descartar un requerimiento de vitaminas o aminoácidos, aunque, no se puede eliminar la posibilidad que el mutante porte una deficiencia nutricional no considerada en el análisis o bien presente mutaciones múltiples.

Estos resultados, concuerdan con otros estudios realizados en *P. rhodozyma* (Adrio *et al.*, 1993). Por lo tanto, la baja frecuencia de mutantes auxótrofos en distintas cepas de *P. rhodozyma*, aún en aquellos experimentos involucrando enriquecimiento por nistatina, parece concordar con una condición diploide de esta levadura.

Formación de protoplastos.

Los resultados obtenidos indican que ha sido posible desarrollar un procedimiento para la formación de protoplastos viables. De acuerdo a los resultados experimentales, se observó que sólo novozima fue capaz de degradar la pared celular de *P. rhodozyma*. Obviamente, este resultado está en estrecha relación con la composición de la pared celular, siendo el polisacárido α -1,3-glucano uno de los componentes principales de la pared celular (Miller *et al.*, 1976). Tanto zimoliasa como bioglucanasa,

fueron incapaces de desorganizar la pared celular de *P. rhodozyma*. El mismo resultado fue obtenido al tratar las células con las enzimas biocelulasa y bioxilanasas.

Novozima, (preparado a partir de extractos del hongo *Trichoderma harzianum*) posee actividad de celulasa, pero difiere de las otras enzimas utilizadas porque además tiene las actividades de proteasas y quitinasas.

Para formar protoplastos en forma eficiente, fue necesario crecer las cepas en medio MM_v (Tabla 6A). Cultivos crecidos en medio YM, durante el mismo periodo de tiempo (4 a 5 días), fueron resistentes al tratamiento con novozima. Probablemente la razón de esta diferencia tiene relación con las tasas de crecimiento en ambos medios. Los cultivos en medio YM alcanzan la fase estacionaria más rápidamente que los crecidos en MM_v, por lo que sus células presentan paredes celulares más gruesas. Además, se sabe que la composición de la pared celular en un organismo es dependiente de las condiciones de cultivo, por lo que es probable que células de *P. rhodozyma* crecidas en un medio YM tengan una composición tal que las haga más resistentes al tratamiento con novozima.

De las tres cepas silvestres utilizadas, no se logró formar protoplastos en la cepa UCD 67-383 (Tabla 6B). Esto indica una diferencia en la composición y organización de su pared celular. Observaciones realizadas al microscopio electrónico dan evidencia de ello, ya que la cepa UCD 67-383 presenta una pared celular más gruesa que la cepa UCD 67-385 (Martínez, 1995). Cabe mencionar que la cepa UCD 67-383 muestra otras diferencias respecto de la cepa silvestre UCD 67-385. Por ejemplo, presenta un tamaño celular menor, tiene una tasa de crecimiento más alta y presenta un patrón cromatográfico de pigmentos más complejo (Martínez, 1995). Además, posee una

sobrevida mayor a la radiación UV y NTG en comparación con otras cepas silvestre (León *et al.*, 1995) y sus niveles de sensibilidad a cicloheximida y otros antifúngicos es claramente diferente a las cepas silvestres UCD 67-210 y UCD 67-385. Todas estas diferencias hacen suponer la posibilidad que la cepa UCD 67-383 corresponda a otra especie de levadura.

Como se observa en las Figura 7 y Figura 8, la formación de protoplastos en las cepas silvestres UCD 67-210 y UCD 67-385 es progresiva. Sin embargo, después de varias horas de incubación con novozima el número total de protoplastos disminuye, lo que indica que las células privadas de pared celular son muy lábiles, aún en presencia del estabilizador osmótico KCl 0.8 M.

Cepas mutantes para pigmentación y auxótrofas, derivadas de la cepa silvestre UCD 67-385, también resultaron ser sensibles al tratamiento con novozima, aunque presentaron diferencias leves en la eficiencia de formación protoplastos.

Todas las cepas silvestres y mutantes tratadas, fueron capaces de regenerar su pared celular en medio sólido conteniendo YM agar-0.7%, y el estabilizador osmótico KCl 0.8 M. La ausencia del estabilizador osmótico en el medio de cultivo provoca la lisis de los protoplastos, por lo tanto las colonias aparecidas en estas placas derivan de células con su pared celular intacta después del tratamiento con novozima.

La capacidad de formar protoplastos en *P. rhodozyma*, junto con su regeneración en un medio estabilizado osmóticamente, abre la posibilidad de realizar estudios de genética parasexual a través de la fusión de protoplastos y el posterior análisis de los productos derivados de la fusión. Además, hace posible el estudio del cariotipo de *P. rhodozyma* por medio de la electroforesis de campo pulsado. Mas aún, la posibilidad de

disponer de protoplastos en *P. rhodozyma*, es una herramienta fundamental que permite el desarrollo inmediato de otras metodologías que aumentarán el conocimiento de la organización genética de la levadura.

Fusión de protoplastos.

La fusión de protoplastos derivados de cepas mutantes en pigmentación dio como resultado, principalmente, dos tipos de productos, colonias con uno u otro fenotipo parental y colonias sectorizadas, las cuales muestran sectores de ambos parentales. Dado que en experimentos en los que se mezclaron células intactas o protoplastos en ausencia de PEG no originaron el mismo resultado, se concluye que las colonias sectorizadas se generan a través de la fusión de protoplastos.

La baja frecuencia de colonias sectorizadas puede explicarse por la baja frecuencia de ocurrencia del proceso de fusión (Poulter *et al.*, 1981; Sarachek *et al.*, 1981; Scherer & Magee, 1990) y a la falta de un sistema selectivo que permita una identificación fácil de los productos de la fusión.

El análisis microscópico de células derivadas de las colonias sectorizadas, a través de la tinción con DAPI, reveló la presencia de un solo núcleo por célula. Sin embargo, en todas las colonias sectorizadas también se observó la presencia de células con más de un núcleo (principalmente dos núcleos), lo que sugiere su estado multicariótico. Esto, junto al hecho que todas las colonias sectorizadas presentan ambos fenotipos parentales es indicativo de su origen a partir de un estado heterocariótico.

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 la fusión nuclear dentro del heterocarión, aunque este evento ocurre en baja frecuencia, e incluso aún, con menor frecuencia se puede dar la transferencia de material genómico desde un núcleo a otro (Sarachek & Weber, 1984).

Por lo tanto, la sectorización de las colonias es el resultado de la ocurrencia de segregación nuclear durante el estado heterocariótico, originado por la fusión de protoplastos. Además, ninguna de las fusiones realizadas (Tabla 7) dio como resultado colonias sectorizadas que presentaran un fenotipo similar a la cepa silvestre, lo cual indica que la colonia es inestable y el evento de segregación nuclear ha ocurrido tempranamente durante el desarrollo de ésta. Esto puede deberse a la falta de un sistema de selección para forzar el estado heterocariótico, por ejemplo a través de la fusión de mutantes auxotróficos.

El tamaño de los sectores (de un fenotipo u otro) presente en las colonias sectorizadas de una misma fusión, abarcó pequeñas áreas de la colonia hasta el 50% de la misma. La razón de ello radica en que el proceso de fusión no es un evento 1 : 1 en relación a los parentales involucrados, esto porque la fusión consiste en la agregación inicial de un número variable de ambos tipos de protoplastos parentales y sus núcleos pueden segregarse en forma aleatoria desde el sincicio formado (Sarachek & Henderson, 1988).

Como se ha indicado, en todas las colonias sectorizadas se observaron células con más de un núcleo. Por lo tanto, en un análisis de segregación, toda colonia sectorizada debería generar nuevamente colonias sectorizadas y colonias con fenotipo parental. Como se señala en los resultados (Tabla 8), todas las colonias sectorizadas, derivadas desde diferentes fusiones, dieron origen a colonias con fenotipo sectorizado. En la mayoría de los casos, la frecuencia de las colonias sectorizadas formadas en el análisis de segregación fue menor a la frecuencia con que se originaron a partir de la fusión de protoplastos. Este resultado sugiere el carácter de inestabilidad de los heterocariotes presentes en las colonias sectorizadas.

El análisis de segregación sobre células provenientes de un sector de las colonias sectorizadas originales (producto directo de la fusión) demuestra el estado monocariótico de éstas debido a que no se forman nuevamente colonias sectorizadas. Lo anterior, concuerda con la ausencia de más de un núcleo en células derivadas de las regiones terminales de un sector.

Como se mencionó anteriormente, el análisis de segregación realizado sobre tres colonias sectorizadas provenientes las fusiones Atx3 : Atx6 y UCD 67-385 : Atx3 reveló diferencias en el número de colonias con fenotipo parental que segregaban (Tabla 8). Este resultado era esperado dado que las colonias analizadas, producto de tales fusiones, presentaban diferencias en el tamaño de sus sectores. Por ejemplo, una colonia sectorizada de la fusión Atx3 : Atx6 presentaba un sector con fenotipo albino (Atx3) abarcando la mayor parte de la colonia, lo que determinó una segregación de un 78.3% de colonias con fenotipo albino y un 21.2% con fenotipo rosado (Atx6), contrariamente, otra colonia sectorizada de la misma fusión presentaba un sector con

fenotipo rosado, abarcando gran parte de la colonia, lo que resultó en una segregación de un 28.6% de colonias con fenotipo albino y un 71.4% con fenotipo rosado (Tabla 8).

Por otro lado, La fusión entre los dobles mutantes Atx3; Aux y Atx5; Ade, generó heterocariones nutricionalmente balanceados los cuales fueron fáciles de detectar por su capacidad de crecer en medio mínimo (Sarachek *et al.*, 1981). Sólo 32 fusantes fueron obtenidos desde esta fusión, todos ellos protótrofos y además presentaban un fenotipo de color similar a la cepa silvestre UCD 67-385, a excepción de un producto fusante (Fs18), el cual presentaba una pigmentación albina (Tabla 9). Atx3; Aux deriva por mutagénesis de la cepa Atx3 (fenotipo albino) la cual porta una mutación en el gen *atx3* que codifica para la fitoeno deshidrogenasa (Martínez, 1995) y la cepa Atx5; Ade proviene de la cepa Atx5 (fenotipo amarillo) que porta una mutación en el gen *atx5* que codifica para una enzima compleja la cual cataliza las reacciones que transforman β -caroteno en astaxantina (Martínez, 1995). Por lo tanto, la aparición de un fenotipo silvestre en el 97% de los fusantes revela la complementación de las mutaciones y su recesividad frente al alelo silvestre. De la misma forma, las mutaciones *aux* y *ade*, definidas por las cepas Atx3; Aux y Atx5; Ade, respectivamente, complementan sugiriendo la condición recesiva de ambas. Estos resultados son apoyados por los controles, ya que protoplastos de cada cepa doble mutante por separado no son capaces de generar colonias protótrofas y con pigmentación silvestre.

La fusión entre los dobles mutantes Atx5; Ade y Atx6; Lis, no generó fusantes capaces de crecer en medio mínimo. Esto puede ser explicado por el bajo rendimiento de

regeneración en medio enriquecido YM+KCl, obtenidos en los experimentos de fusión entre estas cepas (Tabla 9).

Como se ha observado en otros organismos, los heterocariones formados por fusión de protoplastos pueden segregarse a formas monocarióticas durante su replicación en medio mínimo (Sarachek, *et al.*, 1981). La forma monocariótica más frecuente en segregarse sería aquella que porta uno de los núcleos parentales de la fusión (Sarachek & Weber, 1984), así en la fusión Atx3; Aux : Atx5; Ade, estos segregantes tendrían fenotipos Atx3; Aux y Atx5; Ade, ambos auxótrofos. Las curvas de crecimiento en MM_v para algunos de los fusantes Atx3; Aux : Atx5; Ade demuestra claramente esto (Figura 15), donde la menor tasa de crecimiento de los fusantes Fs1, Fs2, Fs3 y Fs4, sería explicada por la inestabilidad mitótica del heterocarión al segregarse células auxótrofas incapaces de crecer en medio mínimo. La naturaleza heterocariótica de los fusantes fue comprobada por la presencia de células con más de un núcleo en una frecuencia entre el 1.4 y 7.3% (Tabla 10). La mayor parte de la población celular es uninucleada, principalmente originadas de la segregación aleatoria de núcleos lo que confirma la proposición de inestabilidad de los heterocariones.

La otra clase monocariótica consiste de protótrofos que se caracterizan por crecer rápidamente en MM_v, los cuales pueden portar un núcleo euploide o aneuploide formado por la cariogamia ocasional o la transferencia internuclear de material genómico dentro del heterocarión, evento que ha sido descrito en los hongos (Sarachek & Weber, 1984). El fusante Fs18 es esencialmente monocariótico (sólo se encontró un 0.4% de células dicarióticas, Tabla 10) y posee un fenotipo recombinante dado que es un protótrofo albino. El volumen celular y los núcleos observados en Fs18 no fueron mayores a los

encontrados en la cepa silvestre, como podría esperarse de un evento de cariogamia (Chun *et al.*, 1992). Además, la fusión nuclear supondría un producto híbrido protótrofo, de pigmentación rojo-naranja, y no albino, como es el caso en Fs18. Sin embargo, no se puede descartar esta posibilidad si se considera que sobre el núcleo híbrido formado por cariogamia pueden mediar otros procesos, como la pérdida de cromosomas y haploidización (Sarachek & Weber, 1986) que pueden dar cuenta de la aparición del protótrofo albino Fs18.

Cuando se determinó la cantidad de pigmentos producida por cada fusante Atx3; Aux : Atx5; Ade, se encontró que la mayoría de los fusantes Fs sintetizan una cantidad mayor de astaxantina que la cepa silvestre UCD 67-385, con excepción de los fusantes Fs4 y obviamente Fs18. Estos resultados, concuerdan con los de Chun *et al.* (1992) al fusionar cepas mutantes sobreproductoras de astaxantina. La variación en los niveles de astaxantina sintetizada por cada fusante, se explica por la heterogeneidad genética de los fusantes Fs1 a Fs32 (Sarachek & Weber, 1986). Esta heterogeneidad genética se debe a que el proceso de fusión no es un evento balanceado por lo cual la composición de núcleos dentro de un multicarión puede variar, de tal forma que un medio selectivo, como lo es el MM_v, sólo garantiza la presencia de al menos un representante de cada núcleo parental. A esto hay que agregar además la inestabilidad genética a la que están sujetos los núcleos dentro de un multicarión (Sarachek & Weber, 1986). Por lo tanto, la variación en la cantidad de pigmento producido en un fusante puede ser explicada por una cuestión de dosis génica y nuevas interacciones génicas.

De la misma forma que en las fusiones entre mutantes simples de pigmentación, se realizó un análisis de segregación en algunos de los productos de la fusión

Atx3; Aux : Atx5; Ade. Dado que para el análisis de segregación los fusantes son crecidos en medio YM, no existen restricciones a las posibles combinaciones que puedan surgir por inestabilidad genética. Los segregantes pueden ser agrupados en tres clases de fenotipos de acuerdo a su pigmentación, una clase con pigmentación similar a la cepa silvestre UCD 67-385 (colonias rojas, anaranjadas y rosadas), otra con fenotipo de uno de los parentales de la fusión (colonias albinas o amarillas) y por último una clase con colonias sectorizadas (Tabla 12).

En la primera clase, la variación de intensidad del color silvestre anaranjado en estas colonias probablemente se debe a un efecto de dosis, como ha sido sugerido para el caso de los productos directos de la fusión, Fs1 a Fs32. Por otro lado, los fenotipos parentales, Atx3 y Atx5, pueden ser explicados principalmente por segregación nuclear, esto es cierto particularmente para el caso de el fusante Fs21, el cual presentó una segregación de un 44.1% de colonias albinas y un 49.6% de colonias amarillas en placas con medio YM. Cuando Fs21 es sembrado en placas con medio no suplementado, estos valores son de 4.8% y 0%, respectivamente, lo que sugiere que las colonias derivan de células uninucleadas auxótrofas del tipo parental. Este resultado concuerda con lo descrito para *C. albicans* (Sarachek & Weber, 1984).

Las colonias sectorizadas en las placas con medio YM, se originan también por simple segregación nuclear debido a que no existe selección en favor del heterocarión. Esto es confirmado por la ausencia de colonias sectorizadas en placas con medio MM_v en las cuatro fusantes analizadas.

En las placas con MM_v los fusantes Fs1, Fs2 y Fs21 son capaces aún de generar colonias con fenotipo similar al silvestre, lo cual indica la complementación tanto de las

mutaciones de pigmentación como las de auxotrofia. Sin embargo, las fusantes Fs1, Fs18 y Fs21 dieron origen a colonias recombinantes, las cuales fueron protótrofos albinas (Tabla 12). El origen de estas colonias protótrofas albinas y el de Fs18 puede ser atribuible a un mecanismo común. No se encontró recombinantes protótrofos amarillos. El fusante Fs18 se comportó en forma estable en el análisis de segregación, dando origen, tanto en medio YM como MM_v, sólo colonias protótrofas albinas. Esto está en acuerdo con la condición monocariótica y recombinante del fusante Fs18.

Por otro lado, los fusantes Fs1 y Fs2 producen como segregantes, en alta proporción, colonias que muestran complementación de las mutaciones *atx3* y *atx5*, denotado por su fenotipo de pigmentación rojo, anaranjado y rosado. Así, Fs1 muestra un 67.8% y Fs2 un 83.6% de colonias con fenotipo similar a la cepa silvestre. Sin embargo, Fs21 sólo genera un 5.9% de colonias con fenotipo rojo o anaranjado, mostrando segregación de los fenotipos albino y amarillo, sugiriendo una mayor inestabilidad genética de este fusante. Estos resultados hacen suponer que los fusantes heterocarióticos o derivados monocarióticos de ellos, pueden presentar diferencias en su estabilidad genética y los patrones de segregación. Está descrito que estas diferencias en los productos de fusión, pueden abarcar rasgos como el contenido de DNA por célula, su susceptibilidad a radiaciones y drogas, tamaño celular y habilidad para esporular, entre otros (Sarachek y Henderson, 1988)

Dada la inestabilidad genética a la que están sujetos los heterocariones, se ha optado por analizar más profundamente sus derivados híbridos monocarióticos, sean estos originados por cariogamia o transferencia internuclear de material genómico. Estos pueden ser reconocidos por un fenotipo recombinante o, en el caso de existir cariogamia,

por un aumento del tamaño celular y nuclear, además de un crecimiento rápido en medio no suplementado (Chun *et al.*, 1992). Ninguno de los fusantes obtenidos presentó estas características, a excepción del recombinante Fs18.

En su conjunto, los resultados obtenidos en los experimentos de fusión de protoplastos y los análisis de segregación no pueden utilizarse para definir el grado de ploidía de *P. rhodozyma* dado la complejidad del sistema. Hasta aquí, los datos obtenidos pueden ser interpretados considerando a *P. rhodozyma* como un organismo haploide, diploide total o parcial (aneuploide).

Los productos fusantes Atx3; Aux : Atx5; Ade fueron mantenidos en placas con MM_v a 16 °C. En estas condiciones, después de 15 días, todos fueron capaces de entrar en fase sexual, formando estructuras sexuales alrededor de toda la colonia. Estas estructuras consisten de un largo holobasidio que emerge desde la célula, conteniendo 4 a 6 basidiosporas terminales, capaces de germinar por simple yemación, similar a lo descrito por Golubev (1995), lo que sugiere la viabilidad de las basidiosporas. Además, se debe destacar que la presencia de sólo un núcleo por basidiospora, el cual debe migrar desde la célula madre a través del holobasidio. Sin embargo, a diferencia de los resultados de Golubev (1995), para inducir la fase sexual, no fue necesario simular condiciones de estrés hídrico con la adición de polioles al medio de crecimiento. Aunque, todos los fusantes derivados de la fusión Atx3; Aux : Atx5; Ade presentaron estructuras sexuales, incluyendo el fusante protótrofo albino (Fs18), la fusión no es el único factor que induce la fase sexual en *P. rhodozyma*, dado que las cepas UCD 67-385 y mutantes Atx5 y Atx3 también muestran dichas estructuras, pero en menor proporción, cuando son crecidas en placas con MM_v y mantenidas a baja temperatura (Retamales, P.,

comunicación personal). La mayor frecuencia de estructuras sexuales en los productos fusantes puede deberse a una mayor probabilidad de cariogamia entre núcleos que comparte un citoplasma común en un multicarión.

Clonamiento de genes de actina y β -tubulina.

El clonamiento de los genes de actina y β -tubulina tiene como propósito su utilización en los experimentos de disrupción génica en *P. rhodozyma*. La inactivación de genes esenciales de copia única, por medio de disrupción génica (Rothstein, 1991), podría entregar valiosa información respecto de la ploidía. Está demostrado que actina y β -tubulina son proteínas esenciales (Smith *et al.*, 1988; Shortle *et al.*, 1982) y altamente conservadas, lo que facilita su clonamiento en los organismos (Smith *et al.*, 1988; Ng & Abelson, 1980).

De esta forma, la obtención de transformantes viables en experimentos de disrupción génica de los genes de actina o β -tubulina, sugeriría el carácter disómico del gen mutado y por lo tanto diploidía. El requerimiento para este análisis es que actina y tubulina estén presentes como genes de copia única en el organismo, lo cual puede ser fácilmente determinado por análisis de restricción del DNA genómico e hibridación con las sondas adecuadas (Smith *et al.*, 1988; Shortle *et al.*, 1982).

Las hibridaciones, aún en condiciones de baja estrictez, involucrando DNA genómico de las cepas silvestres UCD 67-210 y UCD 67-385 digerido con enzimas de

restricción, con las sondas heterólogas derivadas del gen de actina de *S. cerevisiae* (pGHac I) y β -tubulina de *N. crassa* (pGHtu I) fueron infructuosos. Si se considera que las hibridaciones fueron realizadas en condiciones tales que aseguraran la hibridación a genes de copia única, estos resultados podrían estar indicando una baja identidad entre las sondas heterólogas y los respectivos genes de *P. rhodozyma*.

En las hibridaciones a colonias provenientes de la genoteca de *P. rhodozyma*, cepa UCD 67-385, en pBlueScript SK, sólo la sonda para β -tubulina dio señal positiva. El análisis de restricción reveló que los clones 10 :46 y 10 :80, los cuales hibridaron con mayor fuerza, son idénticos. Además, este análisis sugiere un rearrreglo en estos clones dado que, en ambos, uno de los sitios *Bam* HI ha desaparecido, generándose dos fragmentos de 4.8 kb y 1.0 kb por digestión con *Bam* HI. La interpretación de los datos de restricción (Figura 25) indica también la falta del sitio *Eco* RI en pBlueScript SK, lo que fue confirmado por secuenciación. De acuerdo a estos resultados, el mapa de restricción de los clones 10 :46 y 10 :80 muestra un sitio *Bam* HI y *Eco* RI dentro del inserto, de tamaño estimado 2.9 kb. Se determinó la secuencia del inserto en el clon 10 :46, y ésta no reveló identidad con secuencias previamente clonadas del gen de β -tubulina en otros organismos, sugiriendo un falso positivo.

El resultado negativo en la hibridación a DNA de la genoteca de *P. rhodozyma*, con la sonda heteróloga para actina de *S. cerevisiae*, nuevamente apunta a una falta de identidad entre ésta y el gen de actina de *P. rhodozyma*. Recientemente, se ha logrado clonar el gen de actina mediante hibridación heteróloga con una secuencia de 200 pb del gen de actina de *Kluyveromyces lactis* y posterior clonamiento por PCR inverso (Wery

et al., 1996). En un análisis estructural y filogenético se concluyó que el gen de actina de *P. rhodozyma* difiere de otros genes de actina encontradas en levaduras ascomicetes (Wery *et al.*, 1996), lo que está en acuerdo a nuestros resultados.

Las diferencias del gen de actina de *P. rhodozyma*, y probablemente las del gen de tubulina, con los de otros organismos, imposibilitó su clonamiento y posterior utilización en experimentos de disrupción génica, orientados a determinar el nivel de ploidía en *P. rhodozyma*.

Reversión de mutantes, mutagénesis y recombinación mitótica.

Mediante la mutagénesis con NTG, se obtuvieron 2 revertantes del mutante Atx10 (fenotipo amarillo, similar a Atx5) , 8 revertantes para el mutante Ade1 (auxótrofo para adenina) y 3 revertantes para el doble mutante Atx6; Arg2 (fenotipo rosado y auxótrofo para arginina). Los dos primeros mutantes (Atx10 y Ade1) derivan de la cepa UCD 67-385 a través de un solo paso mutagénico (Apéndice 4). La cepa Atx6; Arg2 deriva de la cepa Atx6. La cepa Atx10 define el gen recesivo *atx10*, la cepa Ade1 el gen recesivo *ade1* y la cepa Atx6; Arg2 los genes *atx6* y *arg2*. Debido a que el fenotipo de pigmentación de las cepas Atx5 y Atx10 es el mismo (color amarillo), se podría sugerir que ambas cepas mutantes están afectadas en el gen *atx5* (Martínez, 1995). Sin embargo, sólo una prueba de complementación podría establecer esto.

Con el propósito de estudiar el comportamiento de los revertantes frente a experimentos de mutagénesis, estos fueron irradiados con luz UV por 10 min. No se

obtuvieron mutantes de pigmentación a partir de Rev Atx10-1 y Rev Atx10-2, ni tampoco mutantes auxótrofos derivados de Rev Ade1-1 Rev Ade1-7, aún cuando se realizó enriquecimiento con nistatina (Tabla 16). Estos resultados están en acuerdo con la baja frecuencia de mutagénesis de la luz UV, estimada del orden de 1.4×10^{-4} en la cepa UCD 67-385 (Martínez, 1995) y la capacidad de fotoprotección que confieren los pigmentos en *P. rhodozyma*.

Por estas razones, se procedió a realizar mutagénesis en los revertantes Rev Atx10-1, Rev Atx10-2, Rev Ade1-1 y Atx6; Rev Arg2-1, empleando en esta ocasión el mutágeno NTG, cuya tasa de mutagénesis es de 5.1×10^{-4} en UCD 67-385 (Martínez, 1995). El resultado de este experimento mostró que ambos revertantes mutan al fenotipo amarillo con mayor frecuencia que la cepa silvestre UCD 67-385 (Rev Atx10-1, 63 veces, Rev Atx10-2, 9 veces, Rev Ade1-1, 4 veces y Atx6; Rev Arg2-1, 2 veces sobre la cepa silvestre).

Estos datos pueden ser explicados si los revertantes Rev Atx10-1, Rev Atx10-2, Rev Ade1-1 y Atx6; Rev Arg2-1 corresponden a heterocigotos para los genes *atx10*, *atx10*, *ade1* y *arg2*, respectivamente. Si se considera que de 2.04×10^4 células analizadas de Atx10, se obtuvieron sólo dos revertantes silvestres por tratamiento con NTG, la frecuencia de mutación con NTG estimada para el gen *atx10* es de 9.8×10^{-5} . Por lo tanto, la alta frecuencia de colonias amarillas en ambos revertantes (Rev Atx10-1 = 6.3×10^{-3} y Rev Atx10-2 = 9.4×10^{-4}), se podría deber más a eventos de recombinación mitótica que por mutación de novo en el gen *atx10* (Poulter & Rikkerink, 1983; Poulter *et al.*, 1982; Whelan & Soll, 1982). La proposición de heterocigocidad de los revertantes tiene sentido si se considera a *P. rhodozyma* una levadura diploide.

Alternativamente, si *P. rhodozyma* fuera haploide, las frecuencias de mutantes amarillos, en las cepas UCD 67-385 y revertantes Rev Atx10-1, Rev Atx10-2, Rev Adel-1 y Atx6; Rev Arg2-1, deberían ser iguales. La Figura 26 resume el diseño experimental de este tipo de análisis, destacando el resultado esperado para un individuo haploide y otro diploide.

Por lo tanto, la cepa mutante Atx10, podría tener el genotipo homocigoto recesivo *atx10/atx10* y la reversión del fenotipo mutante podría ser explicada por la mutación de uno de los alelos *atx10* a *ATX10*, de tal forma que el genotipo del revertante será *ATX10/atx10*. En los organismos diploides pueden ocurrir eventos de recombinación mitótica a través del intercambio de material genético entre cromosomas homólogos, en forma espontánea o inducida por daño al DNA con agentes mutagénicos (Whelan *et al.*, 1980; Whelan & Magee, 1981; Poulter *et al.*, 1982). El intercambio entre cromosomas homólogos durante la mitosis, a igual que en la meiosis, genera productos recíprocos, y se caracteriza por hacer homocigotos a todos los genes encontrados distalmente al punto de intercambio (Griffiths *et al.*, 1996).

Estos antecedentes, pueden explicar los resultados de la Tabla 17 de la siguiente forma: Supongamos el caso de los revertantes Rev Atx10-1 y Rev Atx10-2, estos tendrían el genotipo heterocigoto *ATX10/atx10*, mientras que la cepa silvestre UCD 67-385 sería *ATX10/ATX10*. Cuando son tratados con NTG, la cepa silvestre sólo puede generar mutantes amarillos si sus dos alelos *ATX10* mutan a *atx10*, la frecuencia estimada para esto sería de $(9.6 \times 10^{-5})^2 = 9.6 \times 10^{-9}$. En cambio los revertantes, además de tener la posibilidad que ocurra una mutación en el alelo dominante *ATX10* a *atx10*, tienen la oportunidad de sufrir un intercambio de material genético entre los

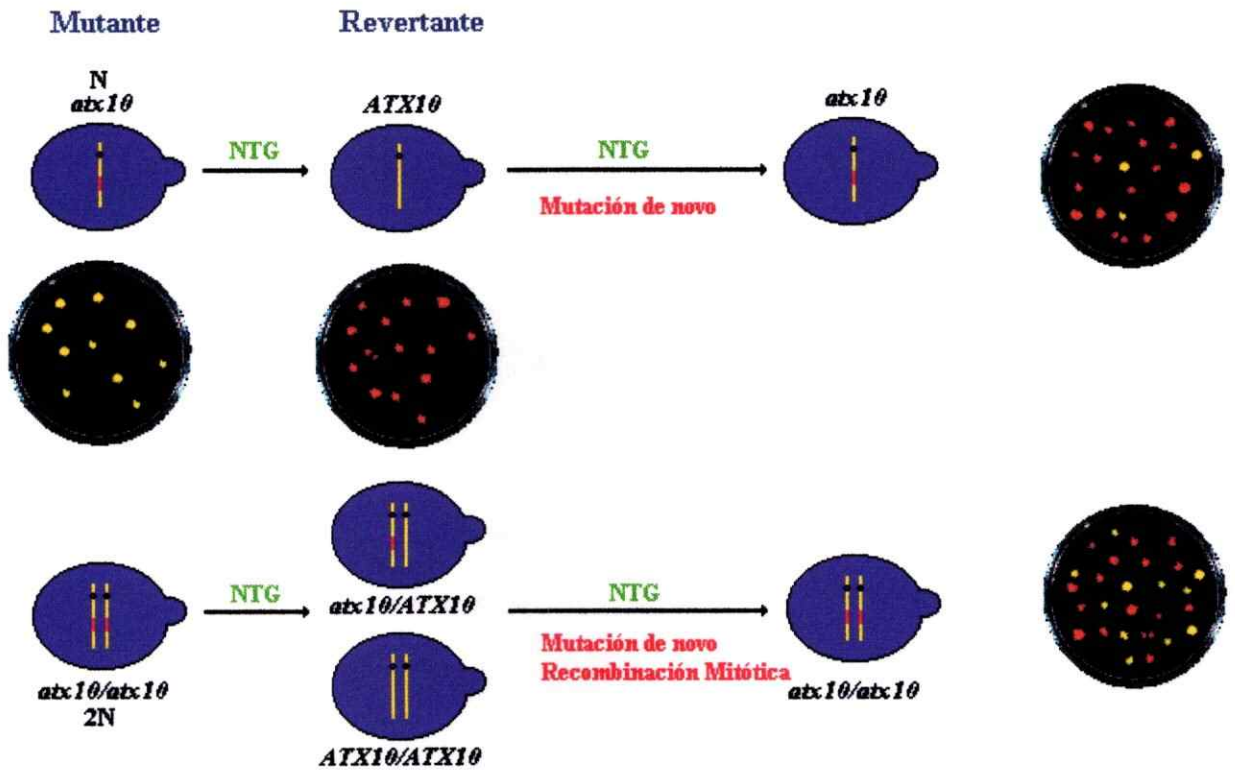


Figura 26:

Diseño experimental del análisis de recombinación mitótica. Se señalan los resultados esperados en un experimento de mutagénesis de revertantes para un individuo haploide o diploide.

cromosomas homólogos y generar en forma recíproca los homocigotos *ATX10/ATX10* y *atx10/atx10*, este último fácilmente identificable por su fenotipo amarillo.

En la mutagénesis de las cepas UCD 67-385, Rev Atx10-1 y Rev Atx10-2 con NTG, aparecieron también colonias con fenotipo albino. En la Tabla 17, la cepa revertante Rev Atx10-2 presenta una frecuencia de mutantes albinos (2.5×10^{-3}) 5 veces superior a la frecuencia obtenida en la cepa silvestre (5.3×10^{-4}). Por lo tanto, de acuerdo a estos resultados, se puede sugerir que Rev Atx10-2 es heterocigoto para el gen definido por el fenotipo albino y que las cepas UCD 67-385 y Rev Atx10-1 son homocigotos para dicho gen. Debido a que ambos revertantes Rev Atx10 derivan de la misma cepa (Atx10), la condición heterocigota del gen albino en Rev Atx10-2, se generó, probablemente, durante el tratamiento mutagénico de Atx10 con NTG que dio origen a los revertantes.

Aunque esta explicación se ajusta a los resultados, debe considerarse la posibilidad que el fenotipo revertante de Rev Atx10 se deba a supresión genética y no a reversión, sin embargo, si este fuera el caso, no explica las diferencias en las frecuencias de mutantes amarillos obtenidos entre los revertantes Rev Atx10-1 y Rev Atx10-2 por tratamiento con NTG y no podría explicar los mismos resultados con los revertantes Rev Ade1-1 y Atx6; Rev Arg2-1. Por esta misma razón, es poco probable que estos resultados puedan ser explicados por puntos calientes de mutaciones, dado que este análisis incluyó tres loci diferentes.

En la Figura 27 se presenta un esquema que muestra un evento de intercambio de material genético entre cromosomas homólogos durante la mitosis en el heterocigoto *ATX10/atx10* hipotético.

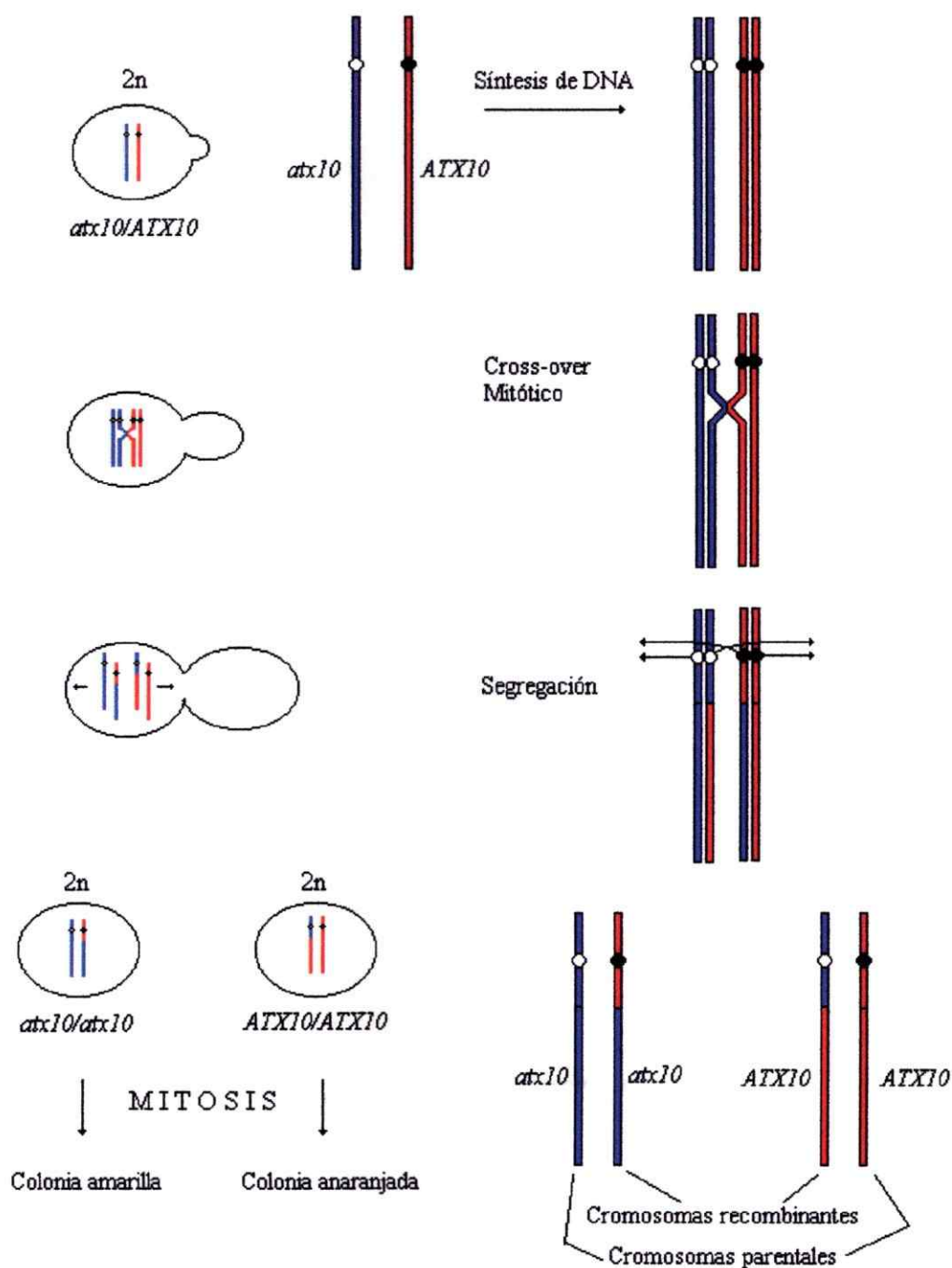


Figura 27:

Intercambio de material genético entre cromosomas homólogos, durante la mitosis. El esquema supone una célula con genotipo *ATX10/atx10* y un “crossing over” entre el gen *ATX10* y el centrómero, de tal forma que el resultado es la formación de un individuo *ATX10/ATX10* y *atx10/atx10*, distinguibles por su fenotipo.

Organización genómica en *Phaffia rhodozyma*.

Estimaciones del tamaño de genoma en *P. rhodozyma*, derivados de los resultados de electroforesis de campo pulsado, establecen valores entre 23.9 Mb a 25.3 Mb dependiendo de la cepa silvestre analizada. El genoma haploide se encontraría organizado en 15 cromosomas, los cuales pueden presentar distintos tamaños que van desde los 350 kb a los 2.5 Mb. Además, *P. rhodozyma* presenta un extensivo polimorfismo cromosómico entre cepas, lo cual es frecuentemente encontrado entre las levaduras (Magee & Magee, 1987; Orbach *et al.*, 1988; Brody & Carbon, 1989; Sor & Fukuhara, 1989; Passoth *et al.*, 1992). El polimorfismo cromosómico en *P. rhodozyma* concuerda con los altos niveles de variabilidad genética e stimada a través de patrones RAPD (Varga *et al.*, 1995).

Por otro lado, a pesar de los intentos de clonar genes relacionados con la carotenogénesis, el único gen hasta ahora clonado y secuenciado en *P. rhodozyma* corresponde al gen de actina, el cuál ha sido sometido a un extenso análisis estructural (Wery *et al.*, 1996). Además, aunque no está clonado completamente, existe un fragmento *Bam* HI de 5.6 kb, secuenciado parcialmente en esta Tesis, que muestra identidad con el gen que codifica para el factor de elongación ef-1 α de la traducción en otros organismos.

Respecto del nivel de ploidía, los experimentos de mutagénesis de revertantes realizados en ésta Tesis sugieren que *P. rhodozyma* es diploide. Esta conclusión se basa en el intercambio de material genético entre cromosomas homólogos durante la mitosis

(Poulter *et al.*, 1982; Whelan & Soll, 1982) y está en contradicción con lo propuesto por Chun *et al.* (1992), quien a partir de sus datos de fusión de protoplastos, plantea la condición haploide de *P. rhodozyma* (74 fg de DNA por célula) y diploide de los productos fusantes (146 fg de DNA por célula), basándose en el contenido de DNA por célula y tamaño celular. Chun *et al.* (1992), considera que el factor de 2 que diferencia los contenidos de DNA/célula entre las cepas parentales de la fusión y sus productos fusantes, es indicativo de diploidía. Sin embargo, para un organismo diploide, los productos de una fusión de protoplastos serán tetraploides, cuyo contenido de DNA también representará un factor de 2 sobre los parentales.

Por otro lado, los datos de electroforesis de campo pulsado también apoyan la condición diploide de *P. rhodozyma* e indican que el tamaño del genoma haploide estimado para UCD 67-210 es de 25.3 Mb y para UCD 67-385 es de 23.9 Mb. Por lo tanto, si se considera la composición de G+C del genoma de *P. rhodozyma* es 48% (Miller *et al.*, 1976), se puede estimar el contenido de DNA haploide por célula (por comparación con *S. cerevisiae*) para UCD 67-210 en 40 fg y para UCD 67-385 en 37.8 fg (Tabla 18). Mediante la determinación química del contenido de DNA total por célula se ha establecido que UCD 67-210 posee 74.3 fg de DNA, mientras que UCD 67-385 tiene 75.8 fg de DNA (Chun *et al.*, 1992). La discrepancia entre los valores determinados químicamente por Chun *et al.* (1992) y los valores estimados a partir del cariotipo electroforético, sugiere fuertemente que las cepas silvestres analizadas son diploides o están cercanas a la diploidía (Cifuentes *et al.*, 1997).

Tabla 18

Estimación del contenido de DNA por célula en cepas silvestres de *Phaffia rhodozyma*.

Organismo	Contenido G+C	Tamaño haploid	Contenido/célula	Contenido diploid
<i>S. cerevisiae</i>	40 %	14.0 Mb	22.2 fg	44.0 fg
UCD 67-385	48 %	23.9 Mb ^a	37.8 fg	75.8 fg ^b
UCD 67-210	48 %	25.3 Mb ^a	40.0 fg	74.3 fg ^b

(a), estimado a través del cariotipo electroforético. (b), determinación química del contenido de DNA/célula (Chun *et al.*, 1992)

Esta conclusión, concuerda con lo propuesto por Calo & Johnson (1996), quienes realizaron un estudio comparativo del contenido de DNA/célula en cepas silvestres y mutantes de *P. rhodozyma* y cepas de *S. cerevisiae* de ploidía conocida, utilizando citometría de flujo. Si se utiliza el fluorocromo apropiado (Ioduro de propidio para DNA), el método de citometría de flujo puede determinar en forma precisa la cantidad de DNA por célula, sin embargo, tiene una limitación importante. Dos cepas pueden presentar el mismo contenido de DNA por célula y tener niveles de ploidía diferentes, por ejemplo, una cepa puede ser haploide con complejidad X y la otra cepa diploide con complejidad $X/2$, o alternativamente, dos cepas pueden tener igual nivel de ploidía, y diferir en la complejidad de sus genomas en una razón de 2. En ambos casos, basándose sólo en el contenido total de DNA/célula, la citometría de flujo puede inducir a una conclusión errónea.

Por lo tanto, los resultados obtenidos en esta Tesis constituyen una evidencia de la naturaleza diploide de *P. rhodozyma*. La condición diploide de *P. rhodozyma* puede explicar los resultados de los experimentos de mutagénesis realizados en la cepa silvestre UCD 67-385. En ellos, la frecuencia de mutantes Ade fue mayor a la frecuencia de mutantes de otra auxotrofia, de tal forma que el 50% de todas los mutantes auxótrofos obtenidos tienen requerimiento para adenina (Retamales, P., comunicación personal). Esto sugiere la probable heterocigocidad del gen *ade1* en la cepa silvestre, por lo que su genotipo probable es *ADE1/ade1*. La presencia de heterocigocidad natural también se ha descrito para la levadura *C. albicans* (Whelan *et al.*, 1980; Whelan & Magee, 1981).

Aunque los antecedentes presentados apuntan a un estado diploide de *Phaffia rhodozyma*, es imposible definir con certeza si existe diploidía total o parcial, dado que

no se puede descartar la posibilidad de aneuploidía. Sin embargo, esto podrá ser resuelto en la medida que se cuente con más marcadores genéticos para el análisis parasexual y con más sondas específicas de cromosomas separados por electroforesis de campo pulsado.

Por último, la fase sexual basada en la pedogamia, cobra especial relevancia si se considera el estado diploide de *P. rhodozyma* y la existencia de genes heterocigotos naturales. Esto, junto a la alta inestabilidad cromosómica encontrada, constituye una importante fuente de variabilidad genética. Además, la posibilidad de inducir la fase sexual en fusantes monocarióticos híbridos, derivados de experimentos de fusión de protoplastos podrá enriquecer el análisis genético.

CONCLUSIONES

- 1.- El tamaño del genoma de *P. rhodozyma*, estimado por electroforesis de campo pulsado, es de 25.3 Mb en la cepa UCD 67-210 y de 23.9 Mb en la cepa UCD 67-385.
- 2.- Entre las cepas silvestres UCD 67-210 y UCD 67-385 existe un extensivo polimorfismo cromosómico, probablemente originado por rearrreglos cromosómicos.
- 3.- Las cepas silvestres UCD 67-210 y UCD 67-385 de *P. rhodozyma* presentan un genoma haploide constituido por 15 cromosomas, cuyos tamaños varían desde 2.5 Mb a 350 kb.
- 4.- El plásmido pPR5.6, transporta un inserto *Bam* HI de 5.6 kb el cual presenta una identidad del 84% y 79% con el gen que codifica para el factor de elongación de la traducción 1-alpha (ef-1 α) de *Drosophila melanogaster* y *S. cerevisiae*, respectivamente. Este fragmento, identifica a un cromosoma de la banda cromosómica VIII en la cepa UCD 67-385.

- 5.- La sonda de DNA repetitivo identifica la banda cromosómica I en las cepas UCD 67-385, AtxS1 y Atx5. Además, el locus *R2* identifica la banda cromosómica VIII en la cepa silvestre UCD 67-210 y Atx6, y las bandas cromosómicas VIII y IX en la cepa UCD 67-385 y Atx5. Por otro lado, las sondas pPR1.4-12 y pPR5.0 hibridan sólo con la banda cromosómica I, mientras que la sonda pPR1.4-6 hibrida únicamente con la banda cromosómica II en la cepa UCD 67-385.
- 6.- Novozima fue el único preparado enzimático con la capacidad de degradar la pared celular de *Phaffia rhodozyma* en forma eficiente, permitiendo la obtención de protoplastos viables.
- 7.- El análisis parasexual en *P. rhodozyma* es posible a través de la fusión de protoplastos y el análisis de descendencia.
- 8.- Las colonias sectorizadas, derivadas de los experimentos de fusión, son originadas por eventos de segregación nuclear.
- 9.- *P. rhodozyma* es diploide y puede presentar genes en condición heterocigota.
- 10.- Los productos fusantes son capaces de entrar en fase sexual por incubación en medio MM_v a 12 °C durante 10 días. La estructura sexual consiste de un largo holobasidio que nace de la propia célula y presenta de 4 a 6 basidiosporas terminales.

PROYECCIONES

La organización genómica en organismos eucariontes inferiores, especialmente en aquellos que carecen de reproducción sexual, siempre ha constituido un tema difícil de abordar. En este sentido, los mayor parte de los estudios aplicados en *P. rhodozyma* en esta Tesis, constituyen un conjunto de herramientas aplicables a otros organismos fúngicos.

Para *P. rhodozyma*, la fusión de protoplastos junto con el análisis de segregación de los productos fusantes monocarióticos híbridos, entregará información valiosa que eventualmente permita definir cromosomas o grupos de ligamiento en términos genéticos, mediante la recombinación genética, de forma similar a lo realizado en *C. albicans* (Kakar *et al.*, 1983; Poulter & Hanrahan, 1983; Poulter *et al.*, 1983). Además, permitirá realizar estudios de complementación que determinen las relaciones de dominancia y alelismo entre marcadores que afectan procesos biológicos como la carotenogénesis (Chun *et al.*, 1992; Girard *et al.*, 1994; Martínez, 1995), de la misma forma en que ha sido aplicado en la levadura *C. albicans* (Poulter *et al.*, 1981; Kakar & Magee 1982). También entrega una oportunidad única para el estudio de rasgos genéticos transmitidos citoplasmáticamente, así como los efectos de distintos citoplasmas sobre la expresión de genes nucleares.

La separación de bandas cromosómicas mediante electroforesis de campo pulsado en *P. rhodozyma* puede facilitar el clonamiento de genes a través del desarrollo de librerías cromosómicas (cromosomotecas), lo que permitirá concentrar el esfuerzo de clonamiento sobre un cromosoma particular. Por otro lado, no sólo demuestra la presencia de un polimorfismo cromosómico, sino que constituye una herramienta de estudio de los mecanismos involucrados en su formación y mantención. La asignación de más genes clonados a determinados cromosomas podrá resolver la presencia de cromosomas homólogos con distinto tamaño molecular y además entregará antecedentes sobre la organización topológica de genes relacionados.

El conocimiento aportado por esta Tesis sobre la organización genómica en *P. rhodozyma* es relevante para el estudio genético de cualquier aspecto de su biología. De esta forma, los estudios sobre el control genético de la síntesis de carotenoides en *P. rhodozyma*, a través de técnicas moleculares, deberían considerar a *P. rhodozyma* como un organismo diploide, lo cual es especialmente importante en experimentos de mutagénesis al azar, mutagénesis dirigida por disrupción génica y transformación genética.

Por otro lado, el descubrimiento de la fase sexual en *P. rhodozyma*, da la oportunidad de estudiar este proceso en términos del control genético involucrado y el desarrollo evolutivo de la sexualidad desde los organismos inferiores a los eucariontes superiores.

Por último, la inducción de la fase sexual de *P. rhodozyma* en fusantes monocarióticos híbridos puede ser una herramienta muy poderosa, con lo cual es posible esperar que el conocimiento sobre su genoma aumente vertiginosamente.

APENDICE N° 1

Medios de cultivo.

1.- Medios de cultivo:

a)	Medio LB (Luria Bertani)	
	Tryptona	1.0%
	Extracto de levadura	0.5%
	Cloruro de sodio	0.5%
b)	Medio LB-agar	
	Medio LB	
	agar	2%
c)	Medio YM	
	Extracto de levadura	0.3%
	Glucosa	1.0%
	Peptona	0.5%
	Extracto de malta	0.3%
d)	Medio YM-agar	
	Medio YM	
	Agar	2%
e)	Medio Mínimo MM _v	
	Glucosa	2.0%
	Vogel	1X
f)	Medio mínimo MM _v -agar	
	Medio mínimo MM _v	
	Agar	2.0%

- g) Medio YM-KCl-agar 0.7%
- | | |
|----------|-------|
| Medio YM | |
| KCl | 0.8 M |
| Agar | 0.7% |
- h) Medio MM_v-KCl-agar 0.7%
- | | |
|------------------------------|-------|
| Medio mínimo MM _v | |
| KCl | 0.8 M |
| Agar | 0.7% |
- i) Medio φ.
- | | |
|----------------------|----------|
| Triptona | 2.0% |
| Extracto de levadura | 0.5% |
| Cloruro de potasio | 10 mM |
| Sulfato de Magnesio | 0.4% p/v |
- El medio fue llevado a pH 7.6 con hidróxido de potasio 1M.
Se utiliza agua tridestilada.
- j) Medio YEP
- | | |
|-----------------------|----|
| Extracto de levaduras | 1% |
| Peptona | 2% |
| Glucosa | 2% |

APENDICE N° 2

Soluciones.

1.- Transformación de *E.coli*.

a) Solución T β I.

Cloruro de Rubidio	100 mM
Cloruro de manganeso tetrahidratado	50 mM
Acetato de potasio	30 mM
Cloruro de calcio	10 mM
Glicerol	15%

La solución es llevada a pH 5.8 con 0.2 M de ácido acético.

b) Solución T β II.

MOPS pH 7.0	10 mM
Cloruro de rubidio	10 mM
Cloruro de calcio	75 mM
Glicerol	15%

2.- Hibridación de ácidos nucleicos.

a) Solución de prehibridación.

SSC	6X
Reactivo de Denhardt	5X
SDS	0.5%
DNA esperma de salmón	100 μ g/ml
Formamida	50%

b)	Solución de hibridación.	
	SSC	6X
	Reactivo Denhardt's	5X
	SDS	0.5%
	DNA esperma de salmón	100 µg/ml
	Formamida	50%
	Sonda radiactiva denaturada	>10 ⁹ cpm/µg

c)	Solución de Denhart	
	Ficoll	1%
	Polivinilpirrolidona	1%
	BSA (fracción V)	1%

d)	SSC 20X	
	NaCl	175.3 g/lt
	Citrato de sodio	88.2 g/lt

3.- Marcado radiactivo de ácidos nucleicos.

a)	Mezcla de partidores sintéticos	
	HEPES	0,67 M
	Tris-HCl	0,17 M
	MgCl ₂	17 mM
	2-mercaptoetanol	33 mM
	BSA	1,33 mg/mL
	Partidores sintéticos (hexámeros)	18 DO ₂₅₆ unidades/ml

b)	Mezcla de desoxinucleótidos	
	Tris-HCl pH 7.0	3 mM
	Na ₂ EDTA	0.2 mM
	dATP, dGTP, dTTP	0.5 mM

c)	Solución fragmento Klenow	
	Fragmento Klenow de la DNA polimerasa I de <i>E. coli</i>	3 unidades/ul
	Tampón fosfato de potasio pH 7.0	100 mM
	2-mercaptoetanol	10 mM
	Glicerol	50%(v/v).

- d) Solución "Stop Buffer"
 Na_2EDTA , pH 7.5 0.2 M

4.- 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

5.- Soluciones para la secuenciación.

- a) Primer
 $5'\text{-GTTTTCCCAGTCACGAC-3}'$ 0.5 pmol/ μl
- b) Tampón de reacción (5X)
 Tris-HCl, pH 7.5 200 mM
 MgCl_2 100 mM
 NaCl 250 mM
- c) Mezcla de terminación
 ddG : dGTP 80 μM , dATP 80 μM , dCTP 80 μM ,
 dTTP 80 μM , ddGTP 8 μM ,
 NaCl 50 mM
 ddA : dGTP 80 μM , dATP 80 μM , dCTP 80 μM ,
 dTTP 80 μM , ddATP 8 μM ,
 NaCl 50 mM
 ddT : dGTP 80 μM , dATP 80 μM , dCTP 80 μM ,
 dTTP 80 μM , ddTTP 8 μM ,
 NaCl 50 mM
 ddC : dGTP 80 μM , dATP 80 μM , dCTP 80 μM ,
 dTTP 80 μM , ddCTP 8 μM ,
 NaCl 50 mM

- d) Mezcla de marcaje
- | | |
|------|-------------|
| dGTP | 7.5 μ M |
| dCTP | 7.5 μ M |
| dTTP | 7.5 μ M |
- e) Tampón de dilución de la enzima
- | | |
|------------------|-----------|
| Tris-HCl, pH 7.5 | 10 mM |
| DTT | 5 mM |
| BSA | 0.5 mg/ml |
- f) Solución "Stop Buffer"
- | | |
|-----------------|-------|
| Formamida | 95% |
| EDTA | 20 mM |
| Azul bromofenol | 0.05% |
| Cianol xileno | 0.05 |

6.- Gel de secuenciación.

- a) Solución acrilamida-bisacrilamida
- | | |
|------------------|----------|
| Acrilamida | 38 gr |
| Bisacrilamida | 2 gr |
| H ₂ O | → 100 ml |

Filtrar la solución y mantener a 4 °C en oscuridad

- b) Gel 6 %
- | | |
|-----------------------------------|---------|
| Urea ultrapura | 23 gr |
| Solución Acrilamida-bisacrilamida | 7.5 ml |
| H ₂ O | → 40 ml |
| TBE 5X | 10 ml |

Filtrar antes de usar

7.- Soluciones para medios de cultivo

a)	Vogel 25X	
	Citrato de sodio x 5H ₂ O	75.0 g/lt
	KH ₂ PO ₄ anhidro	125.0 g/lt
	NH ₄ NO ₃ anhidro	50.0 g/lt
	MgSO ₄ x 7 H ₂ O	5.0 g/lt
	CaCl ₂ x 2 H ₂ O	2.5 g/lt
	Elementos trazas	2.5 ml
	Biotina	24.0 mg/lt

8.- Soluciones para electroforesis de campo pulsado

a)	LET	
	EDTA (0.5 M) pH 8.0	925 ml/lt
	Tris, pH 7.5	1.5 g/lt
	β-mercaptoetanol	75 ml/lt
b)	NDS	
	EDTA (0.5 M) pH 8.0	890 ml/lt
	Tris, pH 7.5	1.5 g
	N-laurilsarcosina	100 ml/lt

APENDICE N° 3

Marcador de tamaño molecular, λ /*Hind* III.

Tamaño y peso molecular de los fragmentos obtenidos al tratar el DNA del bacteriófago lambda con la endonucleasa de restricción *Hind* III.

N° fragmento	Tamaño molecular (kb)
1	23.130
2	9.419
3	6.557
4	4.371
5	2.322
6	2.028
7	0.564
8	0.125

Marcador de tamaño molecular, cromosomas de *S. cerevisiae* cepa AB1380. Electroforesis de campo pulsado a 200 V, pulso de 90 seg por 24 hrs en un gel de agarosa 0.9%.

Cromosoma	Tamaño molecular (kb)
XII	2200
IV	1600
VII-XV	1125
XIII-XVI	1020
II-X-XV	850
XI	700
V-VIII	630
IX	460
III	320
VI	290
I	245

APENDICE N° 4

Cepas silvestres y mutantes de *Phaffia rhodozyma* utilizadas en el desarrollo de esta Tesis.

CEPAS	FENOTIPO	PARENTAL	OBTENCION	REFERENCIA
UCD 67-210	Rojo-naranja	Silvestre	Naturaleza ^a	STCC
UCD 67-383	Rojo-naranja	Silvestre	Naturaleza ^a	ATCC
UCD 67-385	Rojo-naranja	Silvestre	Naturaleza ^a	ATCC
AtxS1	Sobreproductora	UCD 67-385	NTG	Martínez, 1995
Atx3	Albina	UCD 67-385	UV ^b	Martínez, 1995
Atx5	Amarilla	AtxS1	NTG ^b	Martínez, 1995
Atx6	Rosada	AtxS1	NTG	Martínez, 1995
Atx8	Albina	UCD 67-385	NTG	Retamales, 1997 ^c
Atx9	Amarilla intensa	UCD 67-385	NTG	Retamales, 1997 ^c
Atx10	Amarilla pálida	UCD 67-385	NTG	Retamales, 1997 ^c
Ade1	Ade	UCD 67-385	NTG ^c	Retamales, 1997 ^c
Atx3; Aux	Albina, Aux	Atx3	NTG ^c	Esta Tesis
Atx5; Ade	Amarilla, Ade	Atx5	NTG ^c	Retamales, 1997 ^c
Atx6; Arg2	Rosada, Arg	Atx6	NTG ^c	Retamales, 1997 ^c
Atx6; Lis	Rosada, Lis	Atx6	NTG ^c	Retamales, 1997 ^c
Fs1 a Fs32	Anaranjadas ^d (32 cepas)	Atx3 Aux Atx5 Ade	Fusión	Esta Tesis
Rev Atx10-1 y Rev Atx10-2	Anaranjadas (2 cepas)	Atx10	Reversión con NTG	Esta Tesis
Rev Ade-1 a Rev Ade-8	Protótrofas (8 cepas)	Ade	Reversión con NTG	Esta Tesis
Atx6; Rev Arg2-1 a Atx6; Rev Arg2-3	Protótrofas (3 cepas)	Atx6; Arg2	Reversión con NTG	Esta Tesis

STCC, Spain Type Culture Collection. ATCC, American Type Culture Collection. NTG, mutagénesis con nitrosoguanidina. UV, mutagénesis con luz ultravioleta. (a), cepas silvestres aisladas directamente desde la naturaleza. (b), dos pasos de mutagénesis. (c), enriquecimiento con nistatina. (d), fusantes con distintas tonalidades rojo-naranja. (e), Tesis de Magister, Universidad de Chile, en desarrollo.

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.
- Birnboim, H. and Doly, J. 1979.** A rapid alkaline procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic. Acids Res.* **3**: 2303-2308.
- Brody, H., and Carbon, J. 1989.** Electrophoretic karyotype of *Aspergillus nidulans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 6260-6263.
- 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.

- Calo, P., Velázquez, J., Sieiro, 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
- Carle, G. and Olson, M. 1985.** An electrophoretic karyotype for yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**: 3756-3760.
- Castillo, A. and Cifuentes, V. 1994.** Presence of double-stranded RNA and virus-like particles in *Phaffia rhodozyma*. *Curr. Genet.* **26**: 364-368.
- Chu, G., Vollrath, D. and Davis, R. 1986.** Separation of large molecules by contour-clamped homogeneous electric field. *Science* **234**: 1582-1585.
- Chun, S., Chin, J., Bai, S. and An, G. 1992.** Strain improvement of *Phaffia rhodozyma* by protoplast fusion. *FEMS* **93**: 221-226.
- Cifuentes, V. y Martínez, C. 1992.** Análisis del genoma de *Picnoporus cinnabarinus* mediante electroforesis de campo pulsado. *Bol. Micol.* **7**: 31-37.
- Cifuentes, V., Hermosilla G., Martínez, C., León, R., Pincheira, G., and A. Jiménez. 1997.** Genetics and electrophoretic karyotyping of wild-type and astaxanthin mutant strains of *Phaffia rhodozyma*. *Antonie Van Leeuwenhoek*. En prensa.
- Devereux, J., Haerberli, P. and Smithies, O. 1992.** A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. *Nucleic Acids Res.* **12**: 387-205.
- Doi, M., Homma, M., Chindamporn, A. and Tanaka, K. 1992.** Estimation of chromosome number and size by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) in medically important *Candida* species. *J. Gen. Microbiol.* **138**: 2243-2251.
- 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.)

- 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.
- Gillum, A., Emma, Y. and Kirsch, D. 1984. Isolation of the *Candida albicans* gene for orotidine-5'-phosphate decarboxylase by complementation of *S. cerevisiae ura3* and *E. coli pyrF* mutations. Mol. Gen. Genet. 198: 179-182.
- Girard, P., Falconnier, B., Bricout, J. and Vladescu, B. 1994. β -carotene producing mutants of *Phaffia rhodozyma*. Microbiol. Biotechnol. 41: 183-191.
- 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 β -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.
- Howlett, B. 1989. An Electrophoretic karyotype for *Phytophthora megasperma*. Exp. Mycol. 13: 199-202.
- 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.
- Kirsch, D., Lai, M. and O'Sullivan, J. 1988.** Isolation of the gene for cytochrome P450 L1A1 (lanosterol 14a-demethylase) from *Candida albicans*. *Gene* **68**: 229-237.
- 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.
- 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.
- Lott, T., Page, L., Boiron, P., Benson, J. and Reiss, E. 1989.** Nucleotide sequence of the *Candida albicans* aspartyl proteinase gene. *Nucl. Acids Res.* **17**: 1779.
- Magee, B., and Magee, P. 1987.** Electrophoretic karyotypes and chromosome numbers in *Candida* species. *J. Gen. Microbiol.* **133**: 425-430.

- 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.
- 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.
- Miller, M., Yoneyama, M. and Soneda, M. 1976. *Phaffia*, New yeast genus in the *Deuteromycotina* (*Blastomycetes*). *Int. J. Syst. Bacteriol.* **26**: 286-291.
- Moreno, S., Klar, A. and Nurse, P. 1991. Molecular genetic analysis of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*, p 795-823. In Abelson J. and Simon M. (eds), *Methods in enzymology*, vol. 194. Academic Press, New York.
- Nagy, A., Garamszegi, N., Vágvölgyi, C. and Ferenczy, L. 1994. Electrophoretic karyotypes of *Phaffia rhodozyma* strains. *FEMS Microbiol. Lett.* **123**: 315-318.

- Ng, R., and Abelson, J. 1980. Isolation and sequence of the gene for actin in *Saccharomyces cerevisiae*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 3912-3916.
- 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.
- Orbach, M., Vollrath, D., Davis, R. and Yanofsky, C. 1988. An electrophoretic karyotype of *Neurospora crassa*. Mol. Cell. Biol. 8: 1469-1473.
- 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.
- Passoth, V., Hansen, M., Klinner, U. and Emeis, C. 1992. The electrophoretic banding pattern of the chromosomes of *Pichia stipitis* and *Candida shehatae*. Curr. Genet. 22 :429-431.
- Pomés, R., Concepción, G. and César, N. 1985. Genetic analysis of *Candida albicans* morphological mutants. J. Gen. Microbiol. 131: 2107-2113.
- Poulter, R. and Hanrahan, V. 1983. Conservation of genetic linkage in nonisogenic isolates of *Candida albicans*. J. Bacteriol. 156: 498-506.
- 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.
- 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.
- Rosenbluh, A., Mevarech, M., Koltin, Y. and Gorman, J. 1985.** Isolation of genes from *Candida albicans* by complementation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.* **200**: 500-502.
- Rothstein, R. 1991.** Targeting, disruption, replacement, and allele rescue: Integrative DNA transformation in yeast, p.281-301. Abelson J. and Simon M. (eds). *In* Methods in enzymology, vol. 194. Academic Press, New York.
- 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.
- 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*. *Current Genetics* **8**: 181-187.
- Sarachek, A. and Weber, A. 1986.** Segregant-defective heterokaryons of *Candida albicans*. *Current Genetics* **10**: 685-693.
- Sarachek, A., Rhoad, D. and Schwarzhoff, R. 1981.** Hybridization of *Candida albicans* through fusion of protoplast. *Arch. Microbiol.* **129**: 1-8.
- Schaffer, H. and Sederoff, R. 1981.** Least squares fit of DNA fragment length to gel mobility. *Anal. Biochem.* **115**: 113-122.

- Scherer, S. and P. Magee. 1990. Genetics of *Candida albicans*. Microbiol. Rev. 54: 226-241.
- Schmidhauser, T., Lauter, F., Russo, V. and Yanofsky, C. 1990. Cloning, sequence, and photoregulation of *al-1*, a carotenoid biosynthetic gene of *Neurospora crassa*. Mol. Cell. Biol. 10: 5064-5070.
- 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.
- Shortle, D., Haber, J. and Botstein, D. 1982. Lethal disruption of the yeast actin gene by integrative DNA transformation. Science 217: 371-373.
- Smith, C., Matsumoto, T., Niwa, O., Klco, S., Fan, J., Yanagida, M. and Cantor, C. 1987. An electrophoretic karyotype for *Schizosaccharomyces pombe* by pulsed field gel electrophoresis. Nucl. Acids Res. 15: 4481-4489.
- Smith, H., Allaudeen, H., Whitman, M., Koltin, Y. and Gorman, J. 1988. Isolation and characterization of a β -tubulin gene from *Candida albicans*. Gene 63: 53-63.
- Snell, R., Hermans, I., Wilkins, R. and Corner, B. 1987. Chromosomal variations in *Candida albicans*. Nucl. Acids Res. 15: 3625.
- Snow, R. 1966. An enrichment method for auxotrophic yeast mutants using the antibiotic 'nystatin'. Nature 21: 206-207.
- Sor, F. and Fukuhara, H. 1989. Analysis of chromosomal DNA patterns of the genus *Kluyveromyces*. Yeast 5: 1-10.
- Southern, E. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol. 98: 503-517.
- Ultermohlen, J. 1994. RbCl transformation procedure for improved efficiency. The NEB Transcript. 6: 7.

- 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* Miller et al. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **45**:173-177.
- 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. Gen.* **187**: 477-485.
- Whelan, W., Partridge R. and Magee, P. 1980. Heterozygosity and segregation in *Candida albicans*. *Mol. Gen. Gen.* **180**: 107-113.
- 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.
- Zolan, M., Heyler, K. and Yeager, N. 1994. Inheritance of chromosome-length polymorphisms in *Coprinus cinereus*. *Genetics* **137**: 87-94.
- Zolan, M. 1995. Chromosome-length polymorphism in fungi. *Microbiol. Rev.* **59**: 686-698.