

104-FC
DC-B
1385
C. A

**CONTROL GENETICO DE LA SINTESIS DE
CAROTENOS EN *Phaffia rodozoma***

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

Claudio Andrés Martínez Fernández

Director de Tesis: Dr. Víctor Cifuentes Guzmán

Co-Director: Dr. Guido Pincheira Vega

1995



**FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE**

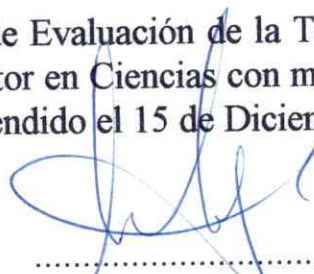
**INFORME DE APROBACION
TESIS DE DOCTORADO**

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

Claudio Andrés Martínez Fernández

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 15 de Diciembre de 1995.

Director de Tesis:
Dr. Víctor Cifuentes Guzmán



.....

Co-Director de Tesis:
Dr. Guido Pincheira Vega



.....

Comisión Informante de Tesis:

Dra. Liliana Cardemil



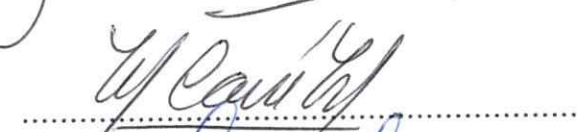
.....

Quim. Farc. Eliana Canelo



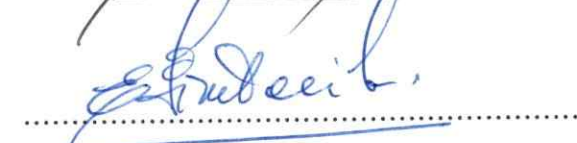
.....

Dra. Margarita Carú



.....

Dr. Eduardo Piontelli



.....

A la memoria de Alvaro Loyola,
por su entrega a nuestros ideales.

A mis padres,
por su estímulo.

A Francisca Paz,
por existir.

A María Isabel,
por su comprensión
y constante amor.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer muy sinceramente a todas las personas e instituciones que me ayudaron a completar esta meta, en especial :

Al Dr. Víctor Cifuentes G. por su constante e irrestricto apoyo en la realización de esta tesis, su confianza, pero principalmente por su amistad.

Al Dr. Guido Pincheira V. por acogerme en su laboratorio, por su apoyo, orientación y por sus palabras las que me han permitido ampliar mi forma de ver el conocimiento.

A la Prof. Eliana Canelo y la Dra. Margarita Carú M, por sus consejos, apoyo y su gran amistad.

A mis amigos del Laboratorio de Genética, a Blanca, Germán, Rubén, los Antonios Silvia, Patricio, Basilio y Rafael, por su gran amistad.

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

A la Dra. Silvia Copaja, por las facilidades brindadas para la realización de los experimentos en HPLC.

A CONICYT, por la beca concedida que me permitió iniciar mis estudios doctorales.

A toda mi familia, a mis padres Luciano y Greta, mis hermanas Chany, Tita y Vivi, mi hermano Gastón, a Mary y a todos los que me apoyaron y comparten este título.

A mi suegros Raquel y Guillermo, parte fundamental de mi nueva familia, por su constante y desinteresado apoyo, y también a Coni, Carmen Gloria y Germán por alegrarse con cada adelanto de mis estudios.

A la Universidad de Chile, la más grande y hermosa institución educacional que tiene este país. Un orgullo egresar de sus aulas.

A mi hija, por darme sin saber todos esos momentos que no pude compartir con ella y darle un nuevo estímulo a mi vida.

Y muy especialmente a mi esposa, María Isabel Olmedo, quien me estimuló y me entregó todo su cariño y comprensión para que pudiera terminar esta tesis. A ella todo mi amor.

INDICE

	página
AGRADECIMIENTOS	ii
INDICE	iii
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABLAS	x
ABREVIATURAS	xii
RESUMEN	xiv
ABSTRACT	xvii
INTRODUCCION	1
MATERIALES Y METODOS	16
I. Materiales	16
1 Material biológico	16
1.1 Bacterias	16
1.2 Hongos	16
1.3 Plásmidos	17
1.4 Enzimas	17
1.5 Acidos desoxirribonucleicos	18
2. Reactivos químicos y medios de cultivo	18
3. Sistemas de purificación y marcado radiactivo de ácidos nucleicos	19
4. Equipos	19
II. Métodos	21
1. Cultivo de microorganismos	21
1.1 Bacterias	21

1.2 Hongos	21
2. Mantenimiento de las cepas	21
2.1 Bacterias	21
2.2 Levaduras	22
3. Mutagénesis	22
3.1 Nitrosoguanidina	22
3.2 Radiación ultravioleta	23
3.3 Selección e identificación de mutantes	24
3.4 Enriquecimiento de mutantes	24
3.5 Mutantes auxótrofos para uracilo	25
3.6 Estabilidad de la mutación	26
4. Análisis parasexual	26
4.1 Fusión de protoplastos	26
5. Pigmentos	28
5.1 Extracción	28
5.2 Análisis de pigmentos	29
5.2.1 Cromatografía de capa fina	29
5.2.2 Cromatografía líquida de alta resolución	30
5.2.3 Absorbancia máxima	31
5.3 Cuantificación de pigmentos	32
6. Purificación de DNA	32
6.1 DNA plasmidial	32
6.2 Ácidos nucleicos totales de <i>Phaffia rhodozyma</i>	34
6.3 DNA de alto peso molecular de <i>Phaffia rhodozyma</i>	35
6.3.1 Formación de protoplastos	35
6.3.2 Extracción de ácidos nucleicos	36
6.4 DNA de <i>Neurospora crassa</i>	37
7. Genoteca	38

7.1 Construcción de genoteca	38
7.2 Obtención de ácidos nucleicos	38
7.2.1 DNA de <i>Phaffia rhodozyma</i>	38
7.2.1.1 Digestión parcial de DNA genómico	39
7.2.1.2 Separación de fragmentos mayores	39
7.2.1.2.1 Gradiente de sacarosa	40
7.2.1.2.2 Electroelución de DNA a partir de geles de agarosa	40
7.2.2 DNA plasmidial	41
7.3 Genoteca en YCp50 y pBluescript	42
7.4 Selección de clones con inserto	45
7.5 Almacenamiento	45
8. Transformación genética	45
8.1 <i>Escherichia coli</i>	45
8.1.1 Células competentes	46
8.1.2 Transformación	46
8.2 <i>Phaffia rhodozyma</i>	47
8.2.1 Acetato de litio	47
8.2.2 Protoplastos	48
8.2.2.1 Formación de protoplastos	48
8.2.2.2 Transformación	48
9. Análisis de los transformantes de <i>Phaffia rhodozyma</i>	49
9.1 Pigmentación	49
9.2 Recuperación de DNA plasmidial de <i>Phaffia rhodozyma</i>	49
10. Análisis de DNA	51
10.1 Subclonamiento	51
10.1.1 Gen <i>al-1</i> (fitoeno deshidrogenasa)	51
10.1.2 Gen <i>al-3</i> (geranilgeranil pirofosfato sintetasa)	52

10.2 Mapas de digestión	52
10.3 Hibridación DNA- DNA	54
10.3.1 Marcado de las sondas	54
10.3.2 Hibridación	55
RESULTADOS	57
1. Obtención de mutantes afectados en la síntesis de carotenoides en <i>Phaffia rhodozyma</i> .	57
2. Análisis de los mutantes	63
2.1 Estabilidad de los mutantes de carotenogénesis de <i>Phaffia rhodozyma</i>	63
2.2 Análisis de pigmentación de los mutantes en carotenogénesis	67
3. Selección de mutantes auxótrofos de <i>Phaffia rhodozyma</i>	72
4. Análisis de complementación	78
5. Construcción de genoteca de DNA total de <i>Phaffia rhodozyma</i>	81
5.1 Digestión parcial de DNA genómico de <i>Phaffia rhodozyma</i>	81
5.2 Genoteca en YCp50	83
5.3 Genoteca en pBluescript	83
6. Transformación de <i>Phaffia rhodozyma</i>	85
6.1 Transformación con DNA genómico lineal	85
6.2 Transformación con genoteca	86
7. Análisis de los transformantes	91
7.1 Identidad de las colonias transformantes	91
7.2 Hibridación del DNA de los transformantes con pBluescript	91
7.3 Recuperación a partir de los transformantes de <i>Phaffia rhodozyma</i> , del vector utilizado en la construcción de la genoteca	95
7.4 Hibridación de DNA de colonias rojas transformantes con el fragmento BamH1 de 2.6 kb del plásmido pPR14.2H2	100
8. Hibridación heteróloga con genes de carotenogénesis de	100

<i>Neurospora crassa</i>	
DISCUSION	107
Mutagénesis en <i>Phaffia rhodozyma</i>	107
Mutantes en pigmentación de <i>Phaffia rhodozyma</i>	110
Análisis genético parasexual	113
- Fusión de protoplastos	114
- Transformación de <i>Phaffia rhodozyma</i>	115
Carotenogénesis en <i>Phaffia rhodozyma</i>	123
Proyecciones	129
Conclusiones	131
Apéndice N°1 Medios de cultivo	133
Apéndice N°2 Soluciones	135
Apéndice N° 3 Marcador de tamaño molecular	138
BIBLIOGRAFIA	139

LISTA DE FIGURAS

	página
Fig. 1: Células de <i>Phaffia rhodozyma</i>	6
Fig. 2: Ruta de biosíntesis de xantófilas en <i>Phaffia rhodozyma</i>	9
Fig. 3: Esquema de la construcción de la genoteca de <i>Phaffia rhodozyma</i> en YCp50	43
Fig. 4: Esquema de la construcción de la genoteca de <i>Phaffia rhodozyma</i> en pBluescript	44
Fig. 5: Cultivo en placa de la cepa silvestre UCD 67-383 y mutantes de pigmentación derivados de ella	61
Fig. 6: Cultivo en placa de la cepa silvestre UCD 67-385 y mutantes de pigmentación derivados de ella	62
Fig. 7: Espectro de absorbancia en el rango de luz visible de pigmentos purificados de dos cepas de <i>Phaffia rhodozyma</i>	69
Fig. 8: Perfil HPLC de la cepa silvestre UCD 67-385 y dos mutantes nulimórficos derivados de ella	74
Fig. 9: Efecto de nistatina sobre <i>Phaffia rhodozyma</i>	75
Fig. 10: Electroforesis en gel de agarosa de DNA plasmidial de la genoteca en pBluescript	84
Fig. 11: Cromatograma HPLC de dos cepas transformantes rojas	93
Fig. 12: Hibridación del plásmido pBluescript contra DNA de cepas transformadas	94
Fig. 13: Electroforesis en gel de agarosa de DNA aislado desde colonias de <i>Escherichia coli</i> transformadas con ácidos nucleicos obtenidos de transformantes rojos de <i>Phaffia rhodozyma</i>	98

Fig. 14: Electroforesis en gel de agarosa de los productos de digestión con enzimas de restricción de los plásmidos pBluescript y pPR14.4L1	99
Fig. 15: Mapa de restricción del plásmido pPR14.3L1	103
Fig. 16: Mapa de restricción del plásmido pPR14.2H2	104
Fig. 17: Hibridación de DNA de transformantes rojos de <i>Phaffia rhodozyma</i> con el fragmento BamHI de 2.6 kb del plásmido pPR14.2H2	105
Fig. 18: Esquema de recuperación del plásmido pPR14.3L1 a partir del genoma de la cepa transformante roja am10-14-3	121
Fig. 19: Esquema de recuperación del plásmido pPR14.2H2 a partir del genoma de la cepa transformante roja am10-14-2	122
Fig. 20: Esquema del control genético de la vía de síntesis de astaxantina en <i>Phaffia rhodozyma</i>	128

LISTA DE TABLAS

	página
Tabla 1: Experimentos de mutagénesis realizados sobre cepas silvestres y mutantes en pigmentación de <i>Phaffia rhodozyma</i>	58
Tabla 2: Fenotipo de pigmentación en mutantes obtenidos mediante mutagénesis con radiación ultravioleta y nitrosoguanidina	59
Tabla 3: Clases fenotípicas de mutantes	60
Tabla 4: Frecuencia de mutagénesis en <i>Phaffia rhodozyma</i>	64
Tabla 5: Número de mutantes nulifórmicos para la síntesis de astaxantina provenientes de dos cepas silvestres de <i>Phaffia rhodozyma</i>	65
Tabla 6: Variación de la cantidad de astaxantina en mutantes sobreproductores de pigmentos de <i>Phaffia rhodozyma</i> a través de varias generaciones	66
Tabla 7: Patrón cromatográfico en capa fina de cepas silvestres y de mutantes obtenidos por mutagénesis con radiación ultravioleta o nitrosoguanidina	68
Tabla 8: Comparación de fenotipos de crecimiento y pigmentación entre cepas silvestre y mutantes en pigmentación	70
Tabla 9: Análisis mediante HPLC de los pigmentos presentes en la cepa silvestre UCD 67-385 y mutantes derivados de ella	71
Tabla 10: Selección de mutantes auxótrofos de <i>Phaffia rhodozyma</i> mediante enriquecimiento de mutantes con nistatina	76

Tabla 11: Selección mediante ácido-5-fluoro-orótico de mutantes auxótrofos para uracilo en <i>Phaffia rhodozyma</i>	77
Tabla 12: Fusión de cepas mutantes y silvestres de <i>Phaffia rhodozyma</i>	79
Tabla 13: Características de la cepa fusante fs-1	80
Tabla 14: Análisis de descendencia de colonias sectorizadas de la fusión atx3-atx6	82
Tabla 15: Experimentos de transformación de cepas mutantes en pigmentación con DNA genómico de la cepa silvestre	87
Tabla 16: Transformación de la cepa amarilla atx5 con DNA plásmidial de la genoteca en pBluescript	89
Tabla 17: Transformación de la cepa albina atx3 con DNA de la genoteca en pBluescript	90
Tabla 18: Características de las colonias obtenidas por transformación de las cepas atx3 y atx5 de <i>Phaffia rhodozyma</i>	92
Tabla 19: Recuperación del plásmido pBluescript a partir de los transformantes rojos de <i>Phaffia rhodozyma</i>	96
Tabla 20: Análisis de restricción de plásmidos recuperados de las colonias transformantes rojas	102
Tabla 21: Hibridación de genes de carotenogénesis de <i>Neurospora crassa</i> con <i>Phaffia rhodozyma</i>	106

ABREVIATURAS

ATP	trifosfato de adenosina
D.O.	densidad óptica
DAPI	4,6-diamidino-2-fenilindol
dATP	desoxiadenosina 5'-trifosfato
dCTP	desoxicitidina 5'-trifosfato
dGTP	desoxiguanidina 5'-trifosfato
DNA	ácido desoxiribonucleico
DTT	ditiotreitól
dTTP	desoxitimidina 5'-trifosfato
EDTA	ácido etilendiaminotetracético
HPLC	cromatografía líquida de alta resolución
HDCO	3-hidroxi-3',4'-didehidro- β - ψ -caroten-4-ona
IPTG	isopropiltiogalactósido
MOPS	tampón ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico
NTG	N-metil-N'-nitro-nitrosoguanidina
PEG	polietilenglicol

ppm	microgramo por gramo de levadura seca
RAPD	amplificación aleatoria de DNA polimórfico
R _f	velocidad de flujo
R _t	tiempo de retención
RNAsa A	ribonucleasa A
SDS	dodecil sulfato de sodio
TLC	cromatografía en capa fina
Tris	tris(hidroximetil)aminometano
UV	ultravioleta
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactósido

RESUMEN

Los carotenoides son el grupo de pigmentos más ampliamente distribuidos en la naturaleza y cumplen variadas funciones relacionadas con fotoprotección, fotosíntesis y recepción de señales ambientales. Con respecto a su ruta biosintética, es posible apreciar una alta conservación hasta la formación de fitoeno, el primer caroteno de la vía. Sin embargo, tanto, los carotenos formados a partir de fitoeno como el efecto de distintas señales ambientales sobre su biosíntesis, presentan diferencias en las especies estudiadas. Los estudios tendientes a conocer el control genético de la síntesis de carotenos y xantófilas, realizados principalmente en bacterias y hongos, han permitido determinar algunos de los genes responsables de la biosíntesis de estos pigmentos. Por otra parte, análisis moleculares indican una alta conservación de las enzimas carotenogénicas entre hongos y bacterias la cual permite complementación funcional entre estos dos grupos. Además, se ha descrito la participación de enzimas complejas en distintas etapas de la biosíntesis de carotenos.

Phaffia rhodozyma es una levadura carotenogénica de alto interés industrial, que sintetiza como su principal pigmento un derivado de β -caroteno denominado astaxantina (3,3'-dihidroxi- β , β -caroten-4,4'-diona). La ruta de biosíntesis y su regulación no están totalmente claras. Sin embargo, se ha sugerido que dicho pigmento se sintetizaría mediante la transformación de β -caroteno en equinenona \rightarrow 3-hidroxi equinenona \rightarrow fenicoxantina \rightarrow

astaxantina. La imposibilidad hasta ahora de conocer la fase perfecta de esta levadura ha obligado a desarrollar sistemas de estudios genéticos basados en parasexualidad, con el fin de identificar los genes responsables de la síntesis de astaxantina, su regulación y organización en el genoma.

Antecedentes experimentales indirectos, tal como la obtención de cepas mutantes incapaces de producir astaxantina, permiten plantear que en *P. rhodozyma* la síntesis de este pigmento, a partir de β -caroteno, es catalizada por una enzima con más de una actividad o por varias enzimas que formarían un complejo multienzimático.

Para aportar a la resolución de este problema, se realizaron estudios tendientes a obtener mutantes en pigmentación, los cuales se analizaron mediante TLC, HPLC, fusión de protoplastos y transformación. Entre los mutantes alterados en su capacidad de producir astaxantina, se obtuvieron mutantes albinos, amarillos, hiperpigmentados y decolorados en dos cepas silvestres en estudio. El análisis de sus pigmentos permiten determinar seis clases fenotípicas distintas, las cuales pueden corresponder a alteraciones producidas en genes regulatorios o estructurales.

Del análisis de las clases fenotípicas se desprende que los posibles grupos de mutantes estructurales obtenidos, representarían alteraciones en la vía de síntesis antes de la producción de fitoflueno y bloqueo a nivel de la producción de β -caroteno. Los mutantes albinos representan una alteración en la etapa de la vía de síntesis de carotenos que modifica fitoeno y definen el gen *atx3* que codifica para la enzima fitoeno deshidrogenasa. Los mutantes amarillos, que acumulan β -caroteno, estarían afectados a nivel de un gen que ha sido definido

atx5, que codificaría por un oxidasa. Durante este estudio, no fue posible aislar mutantes que acumulen alguno de los intermediarios entre β -caroteno y astaxantina.

El mismo tipo de análisis, permite plantear que la regulación de la vía de síntesis de pigmentos en *P. rhodozyma*, podría ser ejercida en dos etapas de la vía carotenogénica, las que estarían definidas por los mutantes sobreproductores *atxS1* y *atxS2*. El gen *atxS1*, definido por el mutante *atxS1*, controlaría el flujo de la vía antes de la producción de β -caroteno. La mutación en este gen desregula el sistema y permite un aumento del flujo metabólico que provoca un aumento en los niveles de β -caroteno y astaxantina. Por otra parte, el gen *atxS2*, definido por el mutante *atxS2*, tendría su efecto en la etapa siguiente a la producción de β -caroteno, ya que esta mutación permite un aumento en los niveles de síntesis de astaxantina y no de β -caroteno.

Los experimentos de transformación genética de cepas que acumulan β -caroteno a cepas productoras de astaxantina, sumado a la imposibilidad de obtener mutantes que acumulen algún intermediario posterior a β -caroteno, apoya la hipótesis de que una enzima compleja catalizaría las reacciones de oxidación que transforman β -caroteno en astaxantina y permiten suponer que estas etapas son controladas por el producto de un gen complejo.

ABSTRACT

Carotenoids are the most widely distributed group of pigments in nature, and fulfill assorted functions related to photoprotection, photosynthesis and reception of environmental signs. Their biosynthetic pathway is highly conserved up to the formation of phytoene, the first carotene of the pathway. However, both the carotenes formed from phytoene as well as the effects of environmental signs on their biosynthesis are different among species. Studies of the genetic control of the synthesis of carotenes and xanthophylls, mainly in bacteria and fungi, have permitted the determination of some of the responsible genes for the biosynthesis of these pigments. On the other hand, molecular analyses indicate a high conservation of the carotenogenic enzymes between fungi and bacteria, which permits functional complementation between these two groups. Furthermore, the participation of complex enzymes has been described in different stages of carotene biosynthesis.

Phaffia rhodozyma has become the promising microbial source of astaxanthin (3,3'-dihydroxy- β,β -carotene-4,4'-dione) for use in the aquaculture industry. The biosynthetic pathway and its regulation are not totally clear. However, it has been suggested that this pigment could be synthesized through the transformation of β -carotene, by equinenone \rightarrow 3-hydroxyequinenone \rightarrow phenicoxantine \rightarrow astaxanthin. The impossibility up to now of obtaining the perfect phase of this yeast, has obliged researchers to develop genetic study

systems based on parasexuality in order to identify the genes responsible for astaxanthin biosynthesis, regulation and genome organization.

Indirect experimental evidence, such as the obtention of mutant strains unable to produce astaxanthin, allowed me to propose that the synthesis of this pigment from β -caroteno in *P. rhodozyma* is catalyzed by an enzyme with more than one activity, or by several enzymes that form a multienzymatic complex.

To resolve this proposal, I produced pigmentation mutants, which were analyzed by TLC, HPLC, protoplast fusion and genetic transformation.

The mutagenesis experiments produced a number of mutants altered in their capacity to produce astaxanthin. White, yellow, dark red, yellow orange and pale mutants were obtained from both wild type strains used. Pigment analysis of the mutants allowed the determination of six phenotypic classes, which may correspond to alterations produced in regulatory or structural genes of the carotenoid biosynthetic pathway of this yeast.

From the analysis of the phenotypic classes, I show that the possible groups of structural mutants obtained represent alterations in the synthesis pathway before the production of phytofluene and/or a block at the level of β -carotene production. The white mutants represent an alteration in the stage of the pathway that modifies phytoene and define the gene *atx3*, which codifies for the enzyme phytoene dehydrogenase. The yellow mutants, that accumulate β -carotene, are affected at level of a gene denominated *atx5*, that appears to codify an oxidase. During this study, it was not possible to isolate mutants that accumulate some intermediate between β -caroteno and astaxanthin.

This same analysis suggests that the regulation of the pathway of pigment synthesis in *P. rhodozyma* may occur in two stages of the carotenogenic pathway. These controls would be defined by the hyperproducing mutants atxS1 and atxS2. The gene *atxS1*, defined by the mutant atxS1, would regulate the flow of the pathway before the production of β -carotene. The mutation in this gene deregulates the system and permits an increase in the metabolic flow that augments the levels of both β -carotene and astaxanthin. On the other hand, the gene *atxS2*, defined by the mutant atxS2, would affect the following step to the production of β -carotene, since this mutation permits an increase in the synthesis levels of astaxanthin and not β -carotene.

Both genetic transformation experiments of strains that accumulate β -carotene into astaxanthin producers, and the inability to obtain mutants that accumulate some intermediate subsequent to β -carotene, support the hypothesis that a complex enzyme catalyzes the oxidation reactions that transform β -carotene into astaxanthin and suggest that these steps are controlled by the product of a complex gene.

INTRODUCCION

Los carotenoides comprenden la clase de pigmentos de color amarillo, naranja y rojo, que se encuentra más ampliamente distribuida en la naturaleza. Dichos pigmentos están presentes en organismos procarióticos y eucarióticos, sean éstos fotosintetizadores o no (Armstrong, 1994a., Armstrong, 1994b., Luckner, 1990). Pese a su amplia distribución taxonómica, los pigmentos carotenoides son sintetizados sólo por microorganismos y plantas. En animales, tales como aves, insectos, peces e invertebrados marinos, los carotenoides son incorporados por medio de la dieta (Liaaen-Jensen, 1979., Harrison, 1986).

Aunque su estructura molecular es muy variable la mayoría de los carotenoides tienen en común la presencia de un esqueleto polieno que contiene de 3 a 15 dobles enlaces conjugados responsables de la coloración de la molécula (Goodwin, 1979). En general, los carotenoides poseen 40 átomos de carbono. No obstante, existen pigmentos con 30, 35, 45 y 50 carbonos. Además, algunos pigmentos poseen anillos de 5 ó 6 carbonos en uno a ambos extremos. También pueden tener áreas hidrogenadas o bien contener oxígeno en forma de grupos hidroxilo, ceto u otros. Por otra parte, dependiendo

de su composición química, estos pigmentos se denominan carotenos si no poseen oxígeno, o xantófilas si tienen oxígeno en su estructura (Karnaukhov, 1990).

En general los carotenoides son compuestos hidrofóbicos que se encuentran presentes en membranas biológicas y tienen un rol importante como agentes protectores contra el daño causado por oxidaciones mediadas por luz (Krinsky, 1979., Moore *et al*, 1989., Deeming-Adams, 1990., Middleton & Teramura, 1993). Por otra parte, se ha determinado que además de su actividad fotosintética accesoria en organismos autótrofos, los carotenoides son precursores de vitamina A en mamíferos (De Luca *et al*, 1979).

Desde el punto de vista de su biosíntesis, los carotenoides son derivados de la ruta general de biosíntesis de isoprenoides. De esta manera, están relacionados con los terpenos con los cuales comparten los sustratos bases de sus respectivas vías de síntesis, estableciéndose una relación biosintética con compuestos tales como esteroides, giberelinas y quinonas. (Cerdá-Olmedo *et al*, 1994., Bramley & Mackenzie, 1988). Sin embargo, la relación entre las rutas de biosíntesis no es necesariamente a nivel de su control genético, como ha sido demostrado para la biosíntesis de esteroides y carotenos en *Phycomyces*. Lo anteriormente mencionado tendría su explicación al considerar la existencia de isoenzimas que catalizan reacciones idénticas en vías metabólicas que conducen a distintos productos finales, las cuales están reguladas genéticamente por procesos independientes (Bejerano & Cerdá-Olmedo, 1992).

Los organismos que sintetizan carotenos se caracterizan por presentar una alta conservación de las etapas iniciales de la vía de síntesis. La primera reacción propia de la vía metabólica de los carotenoides, es la condensación de dos moléculas de geranylgeranyl pirofosfato para generar fitoeno, el primer caroteno de la vía (Harrison, 1986, Porter & Spurgeon, 1979). Este compuesto es común a todos los organismos productores de carotenoides de 40 carbonos y es por lo tanto, intermediario de los más de 500 pigmentos cuya estructura molecular es conocida (Luckner, 1990., Karnaukhov, 1990). Fitoeno es posteriormente desaturado, mediante la inserción de tres o cuatro dobles enlaces, que llevan finalmente a la síntesis de licopeno y este último es transformado en β -caroteno mediante dos reacciones de ciclación. A medida que aumenta la complejidad estructural de los carotenoides, ya sea a nivel de la formación de licopeno o de etapas posteriores, se observa una mayor ramificación de las vías de síntesis entre las especies estudiadas (Armstrong, 1994a., Bramley & Mackenzie, 1988).

Estudios comparativos de las rutas de biosíntesis de carotenoides realizados en distintas especies que sintetizan estos compuestos, han demostrado diferencias importantes en relación a la formación de sus intermediarios. Esto sugiere diferencias específicas a nivel de las enzimas que catalizan dichas reacciones y del control genético de sus etapas (Bramley & Mackenzie, 1988).

La formación de xantófilas es una de las etapas de la ruta de síntesis de carotenoides más compleja hasta ahora observada. Esto se debe principalmente a la amplia gama de compuestos del tipo de las xantófilas que existen en la naturaleza y a la

presencia de distintos mecanismos que los regulan. Además, el conocimiento de tales mecanismos se ha visto limitado por el escaso número de especies estudiadas en estas etapas de la producción de carotenoides, sobre todo en eucariontes. Es así que, hasta ahora no se ha podido clonar ningún gen que codifique para enzimas relacionadas con la síntesis de xantófilas en eucariontes.

El estudio de la regulación genética de la biosíntesis de carotenoides en hongos se ha desarrollado a partir de la excelente correlación existente entre la información genética y bioquímica obtenida a partir de mutantes afectados a nivel de la síntesis de tales pigmentos. Además, con este tipo de mutantes se han podido aislar genes involucrados en la síntesis de carotenoides a través de complementación de dichas mutaciones mediante transformación genética (Schmidhauser *et al*, 1990., Nelson *et al*, 1989). La información obtenida, sumada al conocimiento desarrollado a partir de estudios realizados en bacterias, ha permitido conocer con detalle las etapas iniciales de la biosíntesis de carotenoides en hongos. Sin embargo, debido a que el estudio genético de la carotenogénesis se ha desarrollado en pocas especies (*Neurospora*, *Phycomyces*, *Giberella*, etc.) (Avalos & Cerdá-Olmedo, 1987., Salgado & Cerdá-Olmedo, 1992., Cerdá-Olmedo & Torres-Martínez, 1979), los estudios se han limitado a las rutas de síntesis de los pigmentos presentes en dichas especies y que corresponden a las primeras etapas de la vía de síntesis de carotenos.

Por otra parte, en ninguna especie de hongos se han determinado los genes responsables de la biosíntesis de xantófilas, por lo que existe muy poca información sobre

el control genético de la síntesis de tales carotenoides oxigenados en eucariontes (Bramley & Mackenzie, 1988).

Un microorganismo eucarionte que sintetiza xantófilas es la levadura *Phaffia rhodozyma* (figura 1). Por sus características carotenogénicas, de cultivo y manejo, este microorganismo se puede transformar en una especie interesante para utilizar como modelo para el estudio del control genético de la síntesis de carotenos en eucariontes inferiores, especialmente a nivel de la síntesis de xantófilas.

P. rhodozyma es un hongo unicelular que no presenta formación de micelio verdadero. Debido a que no se conoce su fase perfecta o sexual, este microorganismo se clasifica taxonómicamente como perteneciente a la clase Deuteromycotina y al orden Blastomycete. Sin embargo, antecedentes fisiológicos y morfológicos indican que posee un origen filogenético en los hongos Basidiomicetes, principalmente por su capacidad de hidrolizar urea, sintetizar pigmentos carotenoides, incapacidad para utilizar inositol y poseer una pared celular en forma de multicapas en el área de formación de la yema (Miller *et al*, 1976). Esto fue confirmado recientemente por Golubev quien ha logrado obtener holobasidios con basidiosporas, luego de realizar conjugación entre células madre e hija en varias cepas de *P. rhodozyma*, incluyendo la cepa tipo de la especie. De esta forma, Golubev a propuesto un nuevo genero denominado *Xanthophylomyces* (Filobasidiaceae, Tremellales) con una especie, denominada *dendrorhous*, debido a que según este autor, *P. rhodozyma* ya habría sido descrita como *Rhodomyces dendrorhous* por Ludwig en 1891 (Golubev, W. 1995).

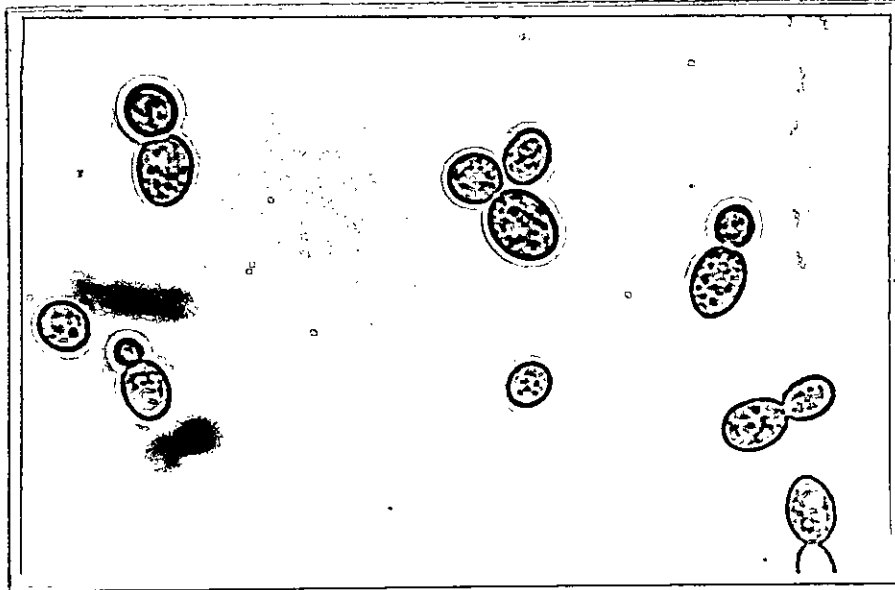


Figura 1:

Células de *Phaffia rhodozyma*. Microfotografía óptica de células de la levadura crecidas en medio YM. Aumento 400X.

La extendida fase asexual de *P. rhodozyma* impide que pueda generar variabilidad genética mediante meiosis. Esta deficiencia podría ser compensada en parte, mediante mayores tasas de recombinación mitótica que pueden generar polimorfismo cromosómico entre cepas. De hecho, se ha observado que especies de levaduras con largos periodos asexuales, presentan una alta variabilidad en sus cariotipos electroforéticos (Varga *et al*, 1995). Recientemente, análisis mediante electroforesis de campo pulsado realizados en varias cepas silvestres de *P. rhodozyma* y en mutantes de pigmentación derivados de la cepa silvestre UCD 67-385, indican la presencia de un alto grado de polimorfismo cromosómico en esta especie (Nagy *et al*, 1994., Adrio *et al*, 1995., Cifuentes *et al*, 1995).

Esta especie, única de su género, fue aislada a principios de los años setenta desde exudados de árboles en zonas montañosas de Alaska y Japón. Ha adquirido gran relevancia debido a que es la única levadura, hasta ahora conocida, que además de poseer la capacidad de crecer en condiciones fermentativas, sintetiza astaxantina (3,3'-dihidroxi- β,β -caroten-4,4'-diona), como su principal pigmento carotenoide. Dependiendo de la cepa silvestre, astaxantina puede llegar a constituir entre el 85-87% del total de carotenoides presentes en sus células, lo cual la convierte en una especie de alto interés industrial (Andrewes *et al*, 1976., Johnson & Lewis, 1979).

La síntesis del pigmento astaxantina en *P. rhodozyma* está afectada por varios factores, tales como la fuente de carbono y su concentración, los procesos de respiración celular, el pH del medio, la presencia de oxígeno y la luz (An *et al*, 1989., Haard, N.

1988., Johnson & Lewis, 1979., Meyer & Du Preez, 1994., An & Johnson, 1990). Sin embargo, algunos de estos factores actúan sobre *P. rhodozyma* de manera distinta a como influyen en la síntesis de pigmentos en otros hongos carotenogénicos (Lewis *et al*, 1990).

La vía de síntesis de astaxantina a partir de β -caroteno en *P. rhodozyma*, estaría compuesta por β -caroteno, equinenona, 3-hidroxi equinenona, fenicoxantina y astaxantina (figura 2) (Andrewes *et al*, 1976). La naturaleza de las enzimas responsables de la síntesis de estos compuestos y el orden en que actúan, son materia de especulación. La presencia en la levadura de varios carotenoides que pueden ser convertidos en astaxantina, entre ellos, 3,3'-dihidroxi- β,ψ -caroteno-4,4'-diona (DCD), 3,3'-dihidroxi-3',4'-didehidro- β,ψ -caroteno-4-one (HDCO), β -zeacaroteno y 4-hidroxi-3',4'-didehidro- β,ψ -caroteno (HDC), ha servido como base para postular la existencia de vías alternativas para la biosíntesis de astaxantina (Johnson, 1992).

El rol de los carotenoides, y en especial astaxantina, en *P. rhodozyma* se ha relacionado principalmente a sus propiedades antioxidantes. Se ha observado que la adición al medio de cultivo de un agente generador de superóxido intracelular, como duroquinona, incrementa significativamente la formación de xantófilas y cepas mutantes hiperproductoras de astaxantina son más resistentes a duroquinona que la cepa silvestre (Schroeder y Johnson, 1993). Además se ha determinado en esta levadura la existencia de un solo tipo de enzima superóxido dismutasa (Mn-SOD), a diferencia de *S. cerevisiae* que posee tres tipos de enzimas (Mn-SOD, Fe-SOD y Cu/Zn-SOD). La falta de enzimas

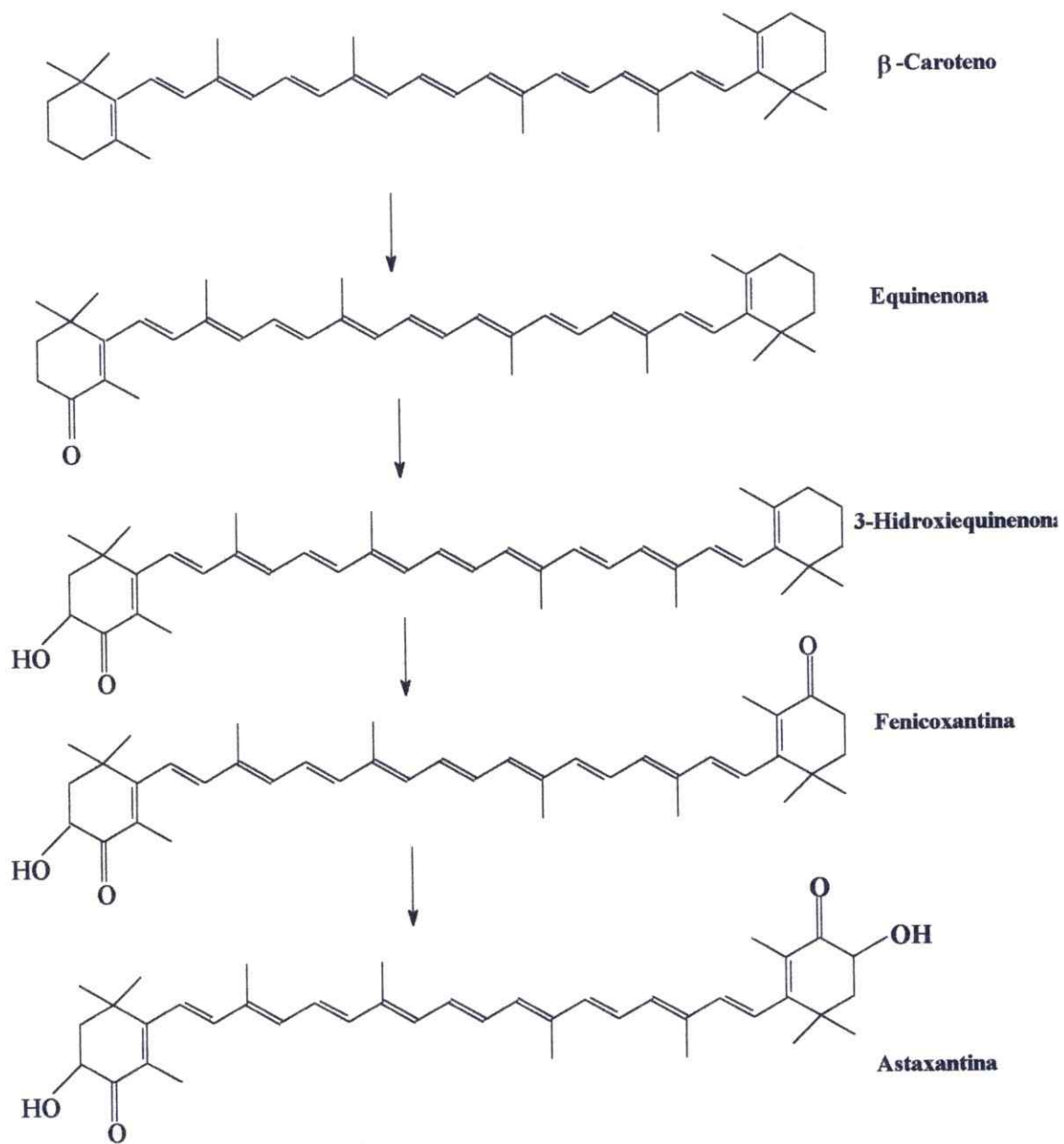


Figura 2:

Ruta de biosíntesis de xantófilas en *Phaffia rhodozyma*. Se esquematizan los pasos de la vía de síntesis desde β -caroteno a astaxantina. Adaptado de Andrewes *et al*, 1976.

que protegen a la célula de oxígeno, sería compensada por la presencia de pigmentos carotenoides (Johnson, 1992).

Por otra parte, mutantes hiperproductores de astaxantina son más resistentes a peróxido de hidrógeno que cepas que acumulan β -caroteno, mutantes albinos o la cepa silvestre (Johnson, 1992). Además, mutantes más sensibles a inhibidores de la cadena respiratoria, tal como antimicina A, son capaces de producir una mayor cantidad de pigmentos (An *et al*, 1989). El proceso biológico involucrado en la selección de mutantes hiperproductores de astaxantina mediante antimicina A puede ser explicado a partir del papel antioxidante atribuido a los carotenoides en *P. rhodozyma*. De acuerdo a esto y dado que antimicina A inhibe específicamente la cadena respiratoria entre citocromo b y citocromo c1, se ha sugerido que una acumulación de citocromo b reducido podría aumentar la reducción de citocromo P450 mediante una actividad NADPH-citocromo P-450 reductasa. Esto último tendría como consecuencia un incremento de moléculas activadas por oxígeno y la sobrevivencia a estas condiciones sería favorecida por una mayor producción de carotenoides (Johnson, 1992).

Por otra parte, en nuestro laboratorio hemos encontrado que la producción de astaxantina es dependiente de la fase de crecimiento del hongo, iniciándose cuando la curva de crecimiento está en la etapa terminal de la fase exponencial. De esta manera, se abre la posibilidad que los genes necesarios para síntesis de las enzimas se expresen en esta etapa específica.

La aproximación al estudio del control genético de la síntesis de carotenoides y su regulación en *P. rhodozyma* debe realizarse a partir de estudios de genética parasexual y genética molecular, evaluados en términos de la producción de pigmentos. Para este objetivo es necesario la obtención de mutantes auxótrofos, transformación genética y formación y regeneración de protoplastos. Este enfoque se debe principalmente a la dificultad de realizar cruzamientos que permitan un análisis genético mediante técnicas clásicas, lo cual ha significado que el conocimiento de la genética de esta levadura sea escaso. Más aún, la síntesis de astaxantina no había sido abordada desde este punto de vista, limitándose a la obtención de cepas mutantes hiperproductoras con fines industriales sin adentrarse en los fenómenos que controlan su expresión (An *et al*, 1991).

Si bien algunos grupos de investigación han obtenido una amplia gama de mutantes de carotenogénesis en *P. rhodozyma* (An *et al*, 1989., Girard *et al*, 1994., Calo *et al*, 1995., Chun *et al*, 1992), se conoce poco sobre la genética molecular de esta levadura. En atención a esto, se han observado recientemente algunos trabajos que intentan aproximarse a un análisis genético de la carotenogénesis (Chun *et al*, 1992., Girard *et al*, 1994). Estos trabajos coinciden en la utilización de técnicas de análisis parasexual como estrategia de estudio, lo cual permitirá realizar un análisis básico destinado a conocer aspectos esenciales de la biología y de la vía de síntesis de pigmentos de este organismo.

El alto grado de conservación de la secuencia de aminoácidos deducida a partir de los genes de carotenogénesis clonados de hongos y bacterias (Bartley *et al*, 1990.,

Armstrong *et al*, 1990., Armstrong, 1994b), permiten plantear el uso de estas secuencias como sondas para el aislamiento de genes homólogos. En este sentido, el estudio de los genes que codifican para las enzimas fitoeno deshidrogenasa (*al-1*), geranilgeranil pirofosfato sintetasa (*al-3*) y fitoeno sintetasa (*al-2*) pueden aportar importante información sobre dichas etapas en *P. rhodozyma*.

Por otro lado, considerando la carotenogénesis en *P. rhodozyma* como parte de su metabolismo secundario, es posible plantear la existencia de tres tipos de genes involucrados en este proceso. Genes estructurales que codifican por las enzimas involucradas en las reacciones de síntesis de pigmentos, genes regulatorios que controlan la expresión de parte o la totalidad de los genes estructurales y genes que poseen un efecto indirecto sobre el fenotipo de pigmentación, como podrían ser aquellos genes que controlan flujos de precursores y cosustratos o facilitan la acumulación de pigmentos (Luckner, 1990). En este sentido, los mutantes que más información pueden entregar en relación a la síntesis de carotenoides en *P. rhodozyma* son aquellos que poseen alteraciones en genes estructurales y regulatorios. Ambos fenotipos pueden ser reconocibles fácilmente ya sea, por presentar acumulación de pigmentos o alteración en los niveles de pigmentos individuales y totales, respectivamente.

Los pigmentos presentes en mutantes del tipo regulatorio, descritos en *P. rhodozyma*, se caracterizan por presentar patrones de pigmentación variable. Así, los mutantes subproductores de pigmentos poseen niveles proporcionalmente bajos de todos los carotenoides presentes. En cambio, los mutantes sobreproductores de pigmentos se

caracterizan por presentar un patrón de pigmentación que implica diferencias significativas en la proporción de los niveles de carotenos y xantófilas, específicamente entre β -caroteno y astaxantina (Girard *et al*, 1994., Calo *et al*, 1995).

Por otro lado, los mutantes en genes estructurales de la síntesis de astaxantina, son de tres tipos. Dos de ellos son albinos y se diferencian en los niveles de acumulación de fitoeno (Girard *et al*, 1994) y el tercer grupo acumula β -caroteno (An *et al*, 1989., Girard *et al*, 1994).

Debido a que no ha sido posible obtener cepas que estén bloqueadas a nivel de algún intermediario entre β -caroteno y astaxantina, se podría considerar que todas las etapas de la síntesis de astaxantina a partir de β -caroteno son controladas por un solo gen complejo, el cual codificaría por una enzima con todas las dos actividades de oxidación necesarias para la formación de astaxantina. Alternativamente, se puede considerar que dichas actividades son realizadas por polipéptidos individuales los cuales forman un complejo multienzimático dependiente de varios genes.

La existencia de genes complejos que codifican para proteínas multifuncionales es un fenómeno frecuente en eucariontes inferiores (Braus, 1991). Estos sistemas pueden haber evolucionado como una estrategia de regulación coordinada de la expresión génica en este grupo de organismos. Además, existe evidencia bioquímica y genética que involucran complejos multienzimáticos en la biosíntesis de carotenoides en otros hongos (Dobgo *et al*, 1988). La veracidad de esta hipótesis podrá ser probada mediante estudios

de la biosíntesis de enzimas y de la genética de la formación de astaxantina en *P. rhodozyma*.

El poder disponer de un cuadro claro en relación a los aspectos genéticos que regulan la síntesis de astaxantina en *P. rhodozyma* permitirá dirigir esfuerzos hacia el entendimiento de los procesos genéticos que regulan la expresión de xantófilas y el clonamiento de los genes más relevantes para dicho proceso. Este tipo de estudios podría entregar importante información sobre los mecanismos regulatorios involucrados en la síntesis de carotenoides, no sólo en esta levadura, sino también en otros eucariontes que los producen.

La aplicabilidad de este conocimiento es inmediata, puesto que permitiría la elaboración de nuevas estrategias de producción de astaxantina que conducirán a la superación de los límites impuestos por las metodologías actualmente en uso.

En relación a los antecedentes descritos, el propósito de esta tesis es conocer factores genéticos involucrados en el control de la síntesis de xantófilas en hongos superiores. De esta forma, se propone estudiar la carotenogénesis en *Phaffia rhodozyma* mediante técnicas de análisis genético en base a parasexualidad. Para ello, se ha pretendido determinar la participación de uno o más genes en la síntesis de astaxantina desde β -caroteno, mediante la obtención y análisis de mutantes que afectan su producción y el clonamiento de genes que participan en la vía de síntesis de dicho pigmento. La posibilidad de alcanzar dicho objetivo, depende de la siguiente hipótesis de trabajo:

"Si la situación observada es reflejo de que el producto de un sólo gen complejo catalice las reacciones desde β -caroteno hasta astaxantina, se podrían aislar mutantes que sólo acumulen β -caroteno y que en términos de ligamiento génico podrían conformar un grupo de complementación"

Para determinar la veracidad de dicha hipótesis, esta tesis considera los siguientes objetivos específicos:

- Obtener y analizar mutantes afectados en la síntesis de astaxantina en *Phaffia rhodozyma*.
- Construir una genoteca de DNA total de *Phaffia rhodozyma*.
- Transformar genéticamente a mutantes en carotenogénesis de *Phaffia rhodozyma*.

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, obtención de plásmidos y construcción de genotecas.

1.2 Hongos:

Las cepas silvestres de *Phaffia rhodozyma* UDC 67-383 y UCD 67-385, se adquirieron a American Type Culture Collection (ATCC 24203 y ATCC 24230), Rockville, MD, U.S.A. Las cepas al1-12, al1-14, am10-11, am10-14-1, am10-14-2, am10-14-3, am10-14-4, am10-15, am10-16, am10-17, am-2, am-6, atx2, atx3, atx5, atx6, atxS1, atxS2, EMS7.132, LG1, NTG2.252, NTG8, pal 1, UVal1, UVam3 y UVam5, corresponden a mutantes en pigmentación obtenidas en este trabajo. Todas las cepas se mantuvieron congeladas a -70 °C en medio YM más 20 a 30 % de glicerol.

Las cepas de *Neurospora crassa*, 74A, y de *Saccharomyces cerevisiae*, AB1380, se obtuvieron del cepario de hongos del Laboratorio de Genética, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

1.3 Plásmidos:

Los plásmidos YCp50 (Pouwels *et al*, 1988) y pBluescript (Sambrook *et al*, 1989) utilizados para la construcción de las genotecas y clonado de genes, fueron donados por el Dr. Antonio Jiménez, Centro de Biología Molecular, Universidad Autónoma de Madrid, España.

El plásmido pNC39 (Nelson *et al*, 1989) portador del gen *al-3* de *Neurospora crassa*, fue donado por el Dr. Giuseppe Macino, Universidad de Roma, Italia.

El clon 3:11:H (Schmidhauser *et al*, 1990), portador del gen *al-1* de *Neurospora crassa*, se obtuvo de Fungal Genetics Stock Center, Arcata, California, U.S.A.

1.4 Enzimas:

Las endonucleasas de restricción utilizadas en este trabajo se adquirieron a BioLabs, Inc. U.S.A. y Gibco-BRL, U.S.A.

Las enzimas lisozima, Novozyma 234, proteinasa K y ribonucleasa A, se adquirieron a Sigma Chemical Co. St. Louis, Missouri, U.S.A.

1.5 Ácidos desoxirribonucleicos:

El DNA del bacteriófago lambda digerido con la endonucleasa de restricción HindIII, se adquirió a BioLabs Inc. U.S.A. y Bethesda Research Laboratories Inc. U.S.A. DNA de esperma 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, U.S.A.: 2,4-dihidroxypirimidina (uracilo), 8-hidroxiquinolina, ampicilina, ATP, bromuro de etidio, BSA (fracción V), cloramfenicol, cloruro de litio, ioduro de sodio, IPTG, sacarosa, SDS, tetraciclina y X-gal.

A Merck Química Chilena Soc. Ltda.: Acetato de amonio, acetato de potasio, acetona, acetonitrilo y metanol grado licrosorb para HPLC, ácido acético, ácido bórico, alcohol isoamílico, alcohol isoamílico, β -caroteno, citrato de sodio, cloroformo, cloruro de calcio, cloruro de litio, cloruro de magnesio, cloruro de potasio, cloruro de sodio, DTT, EDTA, etanol absoluto, éter de

petróleo, fenol, formamida, glicerol, glucosa, hidróxido de potasio, hidróxido de sodio, MOPS, NTG, polietilenglicol 8000 y 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 W & R Balston Limited, Inglaterra: Papel Whatman #1, papel cromatografía.

A Du Pont, Company, USA: α -³²P-dCTP.

3.- Sistemas de purificación y marcado radiactivo de ácidos nucleicos:

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

A Bio 101, California, USA: Genclean II kit.

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

4.- Equipos:

Se utilizaron los siguientes equipos:

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

Ultracentrífuga refrigerada marca Sorvall, equipada con un rotor de ángulo variable AH-629.

Cromatógrafo líquido de alta resolución marca Shimadzu. Equipado con controlador, dos bombas, detector UV-VIS y registrador en papel.

Cámara para cromatografía en capa fina marca Gelman, modelo 51325-1.

II. Métodos

1.- Cultivo de Microorganismos.

1.1.- Bacterias: *Escherichia coli* se creció en medio de cultivo Luria Bertani (LB) (Apéndice 1). Cuando fue necesaria la transformación genética de *E. coli*, ésta se creció en medio ϕ (Apéndice 1). Los cultivos bacterianos se incubaron a 37 °C.

1.2.- Hongos: Las cepas de la levadura *Phaffia rhodozyma* se crecieron en medio YM (Apéndice 1). Cuando fue necesario la levadura se creció en medio mínimo MM (Apéndice 1). Los cultivos de la levadura se incubaron a 22 °C. Por otra parte, *Neurospora crassa* se creció en medio completo (Apéndice 1) a 30 °C y *Saccharomyces cerevisiae* se creció en medio YEP (Apéndice 1) a 30 °C.

2.- Mantención de las cepas.

2.1.- Bacterias: *E. coli* se creció hasta saturación en medio LB. En caso que la bacteria portara plásmidos, el medio fue suplementado con Ampicilina 100 $\mu\text{g/ml}$, Cloramfenicol 30 $\mu\text{g/ml}$, o Tetraciclina 20 $\mu\text{g/ml}$. Para congelar las

bacterias, 600 μ l del cultivo se mezclaron con 400 μ l de glicerol al 87% y se mantuvieron indefinidamente a -70°C .

2.2.- Levaduras: Las cepas de *P. rhodozyma* se crecieron en medio de cultivo YM durante 7 días y para congelarla, los cultivos fueron tratados de la misma manera que las cepas bacterianas estableciendo una concentración final de glicerol de 20 a 30%.

3.- Mutagénesis.

3.1.- Nitrosoguanidina: Mutagénesis con NTG se realizó basándose en el método descrito por An *et al*, 1989 y modificado en nuestro laboratorio (León *et al*, 1995). Para ello, se inocularon 20 ml de medio YM con 200 μ l de un cultivo de *P. rhodozyma* a una concentración de 10^7 células/ml. El cultivo se incubó con 250 rpm de agitación constante a 22°C hasta una densidad óptica de 0.3 a 550 nm. Posteriormente, las células se colectaron por centrifugación a 7000 rpm durante 15 min en centrifuga Sorvall y se resuspendieron en 10 ml de tampón citrato de sodio 100 mM pH5.5. Las células fueron lavadas una vez con un volumen del tampón y luego resuspendidas en el mismo tampón de forma tal que la suspensión quedó a una $\text{D.O}_{550\text{nm}} = 1.5$. De esta suspensión se tomaron

alícuotas de 960 μ l y se depositaron en tubos Eppendorf estériles a los cuales se agregó 40 μ l de una solución fresca de NTG a 1 mg/ml. Las células se incubaron en presencia del mutágeno a 25 °C durante 30 min y los tubos fueron centrifugados en una microfuga Eppendorf a 12000 rpm por 1 min. Las células fueron lavadas 4 veces con 1 ml de tampón fosfato de potasio 100 mM pH 7.0 y posteriormente, se resuspendieron en 1 ml del mismo tampón. Finalmente, las células fueron diluidas en medio YM hasta una dilución de 10^{-3} y se plaquearon en medio YM-agar (Apéndice 1). Luego de 7 días de incubación a 22 °C, las placas fueron revisadas para determinar la aparición de mutantes de pigmentación.

- 3.2.- Radiación ultravioleta: Los experimentos de mutagénesis con radiación UV se realizaron a partir de cultivos frescos de la cepa UCD 67-385. Para ello, 20 ml de un cultivo en medio YM crecido hasta una $D.O_{550nm} = 1.0$ a 1.2, fue centrifugado a 7000 rpm en una centrífuga Sorvall durante 10 min. Las células fueron lavadas 2 veces con agua destilada estéril, centrifugando a 7000 rpm por 10 min. Posteriormente, las células fueron resuspendidas en 4 ml de agua destilada estéril y depositadas en una placa Petri. Finalmente las células fueron irradiadas con una lámpara germicida (usando un tubo General Electric G8T5 de 260 nm de longitud de onda) ubicada a 25 cm de distancia durante 2.7 a 4 min (sobrevivencia de 1 a 0.1%). 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. Este procedimiento fue realizado en una cámara oscura, para evitar fotorreactivación (León *et al*, 1995).

- 3.3.- Selección e identificación de mutantes: Los mutantes en carotenogénesis fueron seleccionados en base a sus características de pigmentación, por lo cual luego de incubar las colonias por 7-10 días, se revisaron y seleccionaron aquellas que presentaban un fenotipo de color diferente a la de la cepa mutagenizada. Las colonias seleccionadas fueron replicadas en medio YM-agar y aquellas cepas que mantuvieron una pigmentación alterada, fueron guardadas según el punto 2.2 para su posterior estudio.

La identidad taxonómica de los mutantes seleccionados se realizó por análisis morfológico de las colonias y de células al microscopio. Además, se realizó un análisis de ácidos nucleicos totales, según el punto 5.2, en el cual se determinó la presencia de elementos extracromosómicos de RNA de doble hebra descritos en la cepa silvestre UCD 67-385 (Castillo & Cifuentes, 1994).

- 3.4.- Enriquecimiento de mutantes: Para obtener mutantes auxótrofos de *P. rhodozyma*, la mezcla de células mutagenizadas, ya sea con radiación UV o NTG, fue resuspendida en 10 ml de medio YM e incubada con agitación constante durante 16 hrs a 22 °C. Las células fueron lavadas con agua estéril

mediante centrifugación a 4000 rpm por 5 min en centrífuga Sorvall, resuspendidas en 20 ml de medio mínimo MM e incubadas durante 1 hr a 22 °C. Posteriormente, al cultivo se agregó nistatina a una concentración final de 0.01 mg/ml y se incubó a 22 °C durante 2 hrs. Las células fueron lavadas dos veces mediante centrifugación a 4000 rpm por 5 min y resuspensión en 10 ml de agua estéril. Finalmente fueron resuspendidas en 2 ml de medio YM, y plaqueadas en medio YM-agar e incubadas durante 7 días a 22 °C.

- 3.5.- Mutantes auxótrofos para uracilo: Con el objetivo de obtener mutantes que no pudieran crecer en medio mínimo y fueran deficientes en la actividad orotidine-5'-fosfato descarboxilasa (URA3), se utilizó el método de selección directa descrito por Boeke *et al*, 1984. Para ello, las células mutagenizadas mediante NTG o UV fueron tratadas con nistatina como se indica en el punto 3.4, pero plaqueadas en medio 5-FOA (Apéndice 1). Las placas fueron selladas con papel "Parafilm" e incubadas por 1 a 4 semanas a 22 °C. Las colonias que crecieron, fueron replicadas ordenadamente sobre placas con medios YM-agar y mínimo MM-agar (Apéndice 1), y se seleccionaron aquellas colonias con incapacidad de crecimiento en medio mínimo MM-agar. Las colonias seleccionadas fueron analizadas para determinar si su incapacidad para crecer en medio MM era producto de una deficiencia en la vía de síntesis de uracilo, por lo tanto fueron replicadas ordenadamente sobre medios YM-agar, mínimo MM-agar y mínimo

MM-agar suplementado con uracilo a 20 $\mu\text{g/ml}$, e incubadas a 22 °C por 1 a 2 semanas.

3.6.- Estabilidad de la mutación: Los mutantes seleccionados fueron crecidos en medio YM a 22 °C durante 8 días. Posteriormente, el cultivo fue diluido 100.000 veces en tampón fosfato de sodio 100 mM, pH 7.0 y sembrado sobre medio YM-agar o medio mínimo MM-agar. Luego de 7 días se revisaron las placas y se determinó el número de colonias revertantes.

4.- Análisis parasexual.

4.1.- Fusión de protoplastos: Con el objeto de estudiar las relaciones de dominancia que existirían entre los factores que controlan la vía de síntesis de carotenoides en *P. rhodozyma*, se realizaron análisis de complementación por medio de fusión de protoplastos. Se analizaron cepas fusantes obtenidas mediante fusión de protoplastos de cepas mutantes en carotenogénesis. Los fusantes fueron obtenidos en el Laboratorio de Genética de la Facultad de Ciencias (Universidad de Chile), mediante una adaptación del protocolo desarrollado por Hinnen *et al* (1978), para *S. cerevisiae* (Hermosilla *et al*, 1995). Cada cepa se creció en 20 ml de medio mínimo MM hasta alcanzar una $\text{D.O}_{550\text{nm}}=1.0$. Luego, las células de 3

ml del cultivo se lavaron tres veces en KCl 0.8 M mediante centrifugación en una centrífuga Sorvall a 4.000 rpm y se resuspendieron finalmente en 5 ml de la misma solución. A esta suspensión se agregó Novozyma 234 a una concentración final de 5 mg/ml y se incubó a 22 °C hasta obtener sobre un 99% de protoplastos. Los protoplastos se lavaron tres veces en KCl 0.8 M y se resuspendieron finalmente en 1 ml de KCl 0.8M, Tris-CaCl₂ 10 mM. Los protoplastos de cada cepa se cuantificaron mediante una cámara de Neubauer y se juntaron las alícuotas correspondientes. La mezcla se llevó a 0.4 ml con la misma solución y se agregaron 0.6 ml de una solución de PEG 4000 44%, KCl 0.8 M, Tris-CaCl₂ 10 mM. Se incubó a temperatura ambiente por 10 min y se agregaron 6 ml de KCl 0.8 M. Los protoplastos se lavaron una vez en KCl 0.8 M y se resuspendieron finalmente en 4 ml de medio YM, KCl 0.8 M, CaCl₂ 5 mM. Esta suspensión se incubó durante 1 hr a 22 °C y luego se diluyó 100 a 1000 veces y se depositaron alícuotas de 100 µl en tubos que contenían 3 ml de medio YM, agar 0.7%, KCl 0.8 M, CaCl₂ 5 mM, precalentado a 42 °C. Inmediatamente, el contenido del tubo se depositó sobre placas que contenían medio YM-agar, KCl 0.8 M, CaCl₂ 5 mM y estas fueron incubadas a 22 °C durante 15 días.

Las colonias que crecieron fueron analizadas fenotípicamente para el color desarrollado y comparadas con sus parentales. Aquellas colonias que mostraron diferencias de pigmentación, fueron sometidas a un análisis de descendencia.

Para esto, cada colonia fue depositada en un tubo de microcentrífuga que contenía 1 ml de medio YM y agitada para disgregarla completamente. La suspensión se diluyó en el mismo medio y se sembraron alícuotas de 100 μ l en medio YM-agar y se cuantificaron los distintos fenotipos que aparecieron en las placas. En caso de aparecer colonias sectorizadas, se repitió el protocolo anterior.

5.- Pigmentos.

- 5.1.- Extracción: Para extraer los pigmentos de las distintas cepas de levadura se realizó el siguiente protocolo. Las cepas de *P. rhodozyma* fueron crecidas en 50 ml de medio YM durante 7 días, luego, las células fueron colectadas por centrifugación a 4000 rpm a 4 °C y lavadas dos veces en agua estéril. Posteriormente, las células fueron resuspendidas en 0.5 a 1 ml de agua destilada y depositadas en un tubo de vidrio de 22x190 mm que contenía 1 a 1.5 ml de perlas de vidrio de 0.5 mm de diámetro. El tubo se agitó en vórtex a máxima velocidad por 2 min y se dejó en hielo por igual período de tiempo. A la mezcla se agregó 3 ml de acetona y se repitió el ciclo de agitación e incubación en hielo dos veces. Luego, se agregó 300 μ l de una solución de NaCl 5M y 1 ml de éter de petróleo. Se repitió el ciclo de agitación y la fase líquida se traspasó a un tubo

de vidrio de 16x100 mm. La suspensión fue centrifugada a 3000 rpm por 5 min a 4°C y se recuperó la fase superior, la cual se depositó en un tubo de microcentrífuga de 1.8 ml. El solvente fue totalmente evaporado mediante la inyección de gas nitrógeno y el precipitado fue finalmente disuelto en éter de petróleo. Todo el proceso de rompimiento celular y extracción de pigmentos se realizó en un cuarto oscuro, en hielo y manteniendo una atmósfera enriquecida en nitrógeno para evitar la descomposición de los pigmentos.

5.2.- Análisis de pigmentos: El patrón de pigmentación de cada cepa estudiada, así como la identificación de los pigmentos producidos, fue realizada mediante cromatografía en capa fina, análisis espectrofotométrico y cromatografía líquida de alta resolución.

5.2.1.- Cromatografía de capa fina: Los carotenoides disueltos en éter de petróleo fueron separados mediante cromatografía en capa fina utilizando placas de sílica gel. El método utilizado fue una adaptación de los métodos descritos para este tipo de pigmentos (Randerath, 1965., Zechmeister *et al*, 1941). La atmósfera de la cámara cromatográfica se saturó con la fase móvil para asegurar la repetibilidad de los valores de velocidad de flujo (R_f) de cada pigmento. Para ello, se humedeció papel absorbente con la fase móvil y se depositó 25 ml de esta solución en los compartimientos superior e inferior de la cámara

cromatográfica. La fase móvil utilizada fue 20% acetona en éter de petróleo. Las muestras fueron depositadas sobre la placa cromatográfica mediante un dispensador, de modo tal de formar una línea de 1 cm de largo paralela al borde inferior de la placa y a 4 cm de él. La placa cromatográfica fue introducida en la cámara y esta fue sellada con parafina sólida para mantener una atmósfera estable durante toda la corrida. Finalmente, la cámara cromatográfica fue cubierta con nylon negro para permitir la corrida en completa oscuridad. Cuando la fase móvil alcanzó los últimos dos centímetros antes del borde superior de la placa cromatográfica, ésta fue retirada de la cámara e inmediatamente con lápiz grafito, se marcaron los contornos de todas las manchas visibles. Para la determinación de los R_f se consideró el centro de la señal como la distancia recorrida de cada pigmento.

5.2.2.- Cromatografía líquida de alta resolución: La separación de los pigmentos por HPLC se realizó basándose en los principios descritos para la separación de carotenoides en HPLC de fase reversa por Craft, 1992 y en las condiciones determinadas en nuestro laboratorio. Para ello se utilizó una columna LiChrospher 100 RP-18, 5 μm (Merck). Los pigmentos obtenidos según el punto 5.1 fueron resuspendidos en 200 μl de éter de petróleo y alícuotas de 50 μl fueron sometidas al análisis cromatográfico utilizando como fase móvil una mezcla de acetonitrilo:metanol (9:1). Se aplicó un flujo de 1 ml/min durante toda

la corrida cromatográfica (35 min) y los pigmentos fueron registrados a 450 nm de longitud de onda. Cuando fue posible, los pigmentos fueron identificados mediante co-migración con compuestos comerciales puros. Para el análisis de fitoeno, los pigmentos fueron medidos a 287 nm.

- 5.2.3.- Absorbancia máxima: Para la identificación de pigmentos mediante su espectro de absorbancia en el rango de la luz visible, éstas se aislaron a partir de placas de cromatografía en capa fina. Los pigmentos fueron aislados según el punto 5.1 y fueron resuspendidos en 30 a 60 μ l de éter de petróleo. Toda la solución fue cargada en una placa de sílica gel y sometida a cromatografía según el punto 5.2.1. Se recuperó inmediatamente, mediante raspado de la fase sólida, la zona de la placa que contenía el pigmento a analizar y se depositó en un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml. Luego, se agregó al tubo 0.5 ml de éter de petróleo y se agitó en vórtex a máxima velocidad. Posteriormente, se retiró la sílica mediante centrifugación del tubo a 12000 rpm por 5 min en una microcentrífuga Eppendorf a 4 °C y se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo. El pigmento aislado fue analizado realizando un barrido espectrofotométrico de 350 a 650 nm en un espectrofotómetro Hewlett Packard 8452A y comparando la absorbancia máxima con los valores publicados para cada pigmento (An *et al*, 1989).

5.3.- Cuantificación de pigmentos: La determinación de pigmentos en microgramos por gramo de levadura seca (ppm), se realizó mediante una modificación del método descrito por An *et al*, 1989. Se depositaron 10 a 15 mg de células en un tubo de vidrio de 20x150 mm que contenía 2.5 cm de perlas de vidrio de 0.5 mm de diámetro. El tubo se agitó durante 2 min en un vórtex a máxima velocidad y se agregó 6 ml de acetona. Se agitó nuevamente en vórtex por 1 min y se agregó 2 ml de una solución de NaCl (40 gr/l) y 6 ml de eter de petróleo. El tubo se volvió a agitar en vórtex por 1 min y se centrifugó durante 6 min a 4.000 rpm en una centrifuga Sorvall a 4 °C. La fase éter se traspasó a un tubo de vidrio y se midió el volumen recuperado. Se midió la absorbancia de la fase éter y se estimó la concentración de pigmentos, según el método descrito por An *et al*, 1989.

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 *et al*, 1979. Las colonias bacterianas se crecieron en matraces de 50 ml, con 10 ml de medio LB suplementado con el antibiótico correspondiente. Se recuperaron 3 ml de cultivo, mediante centrifugación en una microcentrifuga Eppendorf, y se resuspendieron en 100 µl de una solución compuesta por glucosa 50 mM,

EDTA 10 mM, Tris-HCl 25 mM pH 8.0, lisozima 4 mg/ml. La suspensión se incubó por 5 min a temperatura ambiente y se agregó 200 µl de una solución fresca de NaOH 0,2 N, SDS 1%. La mezcla se invirtió 3 a 4 veces y se dejó en hielo por 5 min. Posteriormente, se adicionó 150 µl de una solución fría de acetato de potasio 5 M y el tubo se agitó en vórtex a baja velocidad durante 10 seg e inmediatamente se dejó en hielo por 5 min. La mezcla se centrifugó durante 5 min en una centrífuga Eppendorf a 4 °C. La fase líquida se transfirió a un tubo estéril y se desproteinizó 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 se precipitaron mediante la adición de dos volúmenes de etanol absoluto frío (-20 °C) e incubación de la mezcla a -20°C durante 20 min. Los tubos fueron posteriormente centrifugados durante 5 min en una centrífuga Eppendorf a 4 °C. Se eliminó el sobrenadante, luego el precipitado se secó en un desecador al vacío y se agregó al tubo 50 µl de tampón TE (Tris-HCl 10 mM pH 8.0, EDTA 1 mM) que contenía RNasa A a una concentración final 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.- Ácidos nucleicos totales de *P. rhodozyma*: La obtención de ácidos nucleicos totales de *P. rhodozyma*, se realizó mediante la ruptura mecánica de células con perlas de vidrio (Martínez *et al*, 1994). Se colectaron células de 20 ml de un cultivo en medio YM en fase exponencial tardía, mediante centrifugación a 4000 rpm en centrifuga Sorvall a 10 °C. Las células fueron lavadas dos veces en agua destilada y recuperadas mediante centrifugación. Luego, fueron resuspendidas en 0.1 ml de tampón Tris-HCl 10 mM, EDTA 20 mM y depositadas en un tubo de microcentrífuga de 1.8 ml que contenía 300 µl de perlas de vidrio de 0.5 mm de diámetro. Posteriormente, el tubo fue invertido y sometido a agitación en un vórtex a máxima velocidad, hasta completar 3 min de agitación distribuidos en pulsos de 1 min de agitación y 1 min en hielo. Luego, se agregó al tubo 400 µl de una mezcla de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y el tubo se agitó en vórtex a máxima velocidad por 30 segundos. Se recuperó la fase acuosa mediante centrifugación a 12000 rpm en una microcentrífuga Eppendorf a temperatura ambiente y se depositó en un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml. A la fase fenólica se le agregaron 300 µl de solución Tris-HCl 10 mM, EDTA 20 mM y se agitó por 30 segundos en vórtex. Ambas fases acuosas se juntaron y se agregó 400 µl de una mezcla cloroformo:alcohol isoamílico (24:1). Luego de agitar en vórtex por 30 seg mas, las fases se separaron por centrifugación a 12000 rpm a temperatura ambiente y se recuperó la fase acuosa que contenía los ácidos nucleicos. Estos fueron precipitados con dos volúmenes de etanol

absoluto a -20°C durante 12-16 hrs. Los ácidos nucleicos fueron centrifugados a 12000 rpm por 10 min en microcentrífuga a 4°C y luego de eliminado el etanol fueron resuspendidos en tampón TE. El DNA obtenido fue visualizado y cuantificado a través de electroforesis en gel de agarosa.

6.3.- DNA de alto peso molecular de *P. rhodozyma*: El DNA de sobre 23 kb de *P. rhodozyma* se obtuvo mediante la purificación de ácidos nucleicos a partir de protoplastos.

6.3.1.- Formación de protoplastos. Los protoplastos se obtuvieron por tratamiento de células de *P. rhodozyma* con una mezcla de enzimas líticas (Hermosilla *et al*, 1995). Para ello, la cepa de levadura se creció en 20 ml de medio mínimo MM hasta una $\text{D.O}_{550\text{nm}} = 0.8$ a 1.0. Las células se recuperaron mediante centrifugación a 4000 rpm en centrífuga Sorvall y se resuspendieron en 10 ml del estabilizador osmótico KCl 0.8 M. Las células fueron lavadas dos veces en el mismo estabilizador osmótico y resuspendidas finalmente en 10 ml de KCl 0.8 M. A la suspensión celular se agregó 100 μl de Novozyma 234 (100 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 mediante centrifugación a 4000 rpm a 4°C para impedir la lisis de ellos y resuspendidos suavemente en 5 ml de KCl 0.8 M.

6.3.2.- Extracción de ácidos nucleicos. Los protoplastos fueron recuperados por centrifugación a 4000 rpm en centrífuga Sorvall durante 4 min y se resuspendieron en 4.5 ml de Tris-HCl 10 mM, EDTA 20 mM. A los protoplastos resuspendidos, se agregaron 0.5 ml de una solución de SDS al 10%. La mezcla fue incubada a temperatura ambiente por 5 min, se agregó 50 µl de proteinasa K a 20 mg/ml y se incubó a 55 °C por 1 hr. Posteriormente, se adicionó 10 µl de RNAsa A a 10 mg/ml y se incubó a 30 °C por 30 min. A la suspensión obtenida se agregó 5 ml de fenol saturado en tampón Tris-HCl pH 7.4 y se agitó suavemente durante 30 min. Las fases fueron separadas mediante centrifugación a 4000 rpm por 4 min y la fase acuosa fue transferida a un tubo de vidrio de 25x150 mm con una pipeta de vidrio de 10 ml en posición invertida. A la fase fenólica, se agregó 2 ml de solución Tris-HCl 10 mM, EDTA 20 mM y se agitó suavemente por 30 min, para luego separar las fases mediante centrifugación a 4000 rpm por 4 min. Ambas fases acuosas se juntaron y se agregó 4 ml de fenol saturado. Luego de agitar la mezcla por 30 min, se recuperó la fase acuosa mediante centrifugación a 4000 rpm por 4 min. Este último paso se repitió una vez más y posteriormente se agregó 5 ml de una mezcla de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) a la fase acuosa. Luego de mezclar, ambas fases se separaron por centrifugación a 4000 rpm por 4 min y se recuperó la fase acuosa. Para retirar los restos de fenol, se agregó 5 ml de una

mezcla de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) y agitando por 30 min mediante agitación suave, y las fases se separaron por centrifugación a 4000 rpm por 4 min. Finalmente, el DNA fue precipitado mediante la adición de 2,5 volúmenes de etanol absoluto e incubando la suspensión en hielo por 10 min. Los ácidos nucleicos fueron retirados de la suspensión mediante una varilla de vidrio y depositados en un tubo de microcentrífuga estéril. Luego de evaporado los restos de etanol, los ácidos nucleicos fueron lavados con etanol al 70% y posteriormente resuspendidos en 500 a 1000 μ l de tampón TE. Finalmente, los ácidos nucleicos fueron visualizados y cuantificados mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.5 - 0.6%.

- 6.4.- DNA de *Neurospora crassa*. DNA genómico de *N. crassa* fue aislado mediante el método descrito por Leach *et al* (1987) y modificado en nuestro laboratorio (Cifuentes *et al*, 1990). Se cosechó el micelio de la cepa 74A de *N. crassa* de 5 días de crecimiento mediante filtración en papel Whatman #1. Este micelio se lavó con agua destilada y se congeló a -20°C por 2 hrs. El micelio congelado se trituró en un mortero y se transfirió a un tubo de centrífuga de 30 ml. A esta mezcla se agregó 3 ml de solución LETS (LiCl 0.1 M, EDTA 10 mM, Tris-HCl 10 mM, SDS 0.5%) y el tubo se incubó a temperatura ambiente por 30 min con agitación suave. Posteriormente, se agregó 1/2 volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) al tubo y se agitó suavemente por

15 min. Se centrifugó en una centrífuga Sorvall a 3000 rpm por 5 min y la fase acuosa se traspasó a un tubo de centrífuga de 15 ml. Se agregó 2 volúmenes de etanol frío (-20°C) y se incubó a -20°C por 1 hr. El tubo se centrifugó por 15 min a 7000 rpm y se eliminó el sobrenadante. El precipitado se resuspendió en 0.1 ml de amortiguador TE con RNasa A (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1mM, RNasa A 50 ug/ml).

7.- Genoteca.

7.1.- Construcción de genoteca. La genoteca de DNA genómico de *P. rhodozyma*, cepa UCD 67-385, se construyó mediante digestión parcial de DNA de levadura y se clonaron los fragmentos obtenidos en los plásmidos YCp50 y pBluescript.

7.2.- Obtención de ácidos nucleicos.

7.2.1.- DNA de *Phaffia rhodozyma*. La obtención de DNA de alto peso molecular para la construcción de la genoteca de *P. rhodozyma*, se realizó a partir de formación y lisis de protoplastos (ver punto 6.3).

7.2.1.1.- Digestión parcial de DNA genómico: Para determinar la concentración adecuada de la enzima de restricción BamHI utilizada para digerir parcialmente el DNA genómico de *P. rhodozyma*, se prepararon 150 μ l de una solución que contenía 125 μ g de DNA, Tris-HCl 50 mM, MgCl₂ 10 mM y NaCl 100 mM. La solución se distribuyó en 8 tubos con 15 μ l, los que se enumeraron del 2 al 9, y 1 tubo con 30 μ l rotulado como tubo 1. Al tubo 1, se agregó 24 unidades de la enzima BamHI. El tubo se agitó y se traspasaron 15 μ l al tubo 2. Este último se agitó y se traspasaron 15 μ l al tubo 3. Sucesivamente se diluyó la enzima hasta el tubo 8, no agregando enzima al tubo 9, el cual representó el control sin enzima. Todos los tubos fueron incubados a 37 °C durante 1 hr, y la reacción se detuvo agregando 1 μ l de EDTA 250 mM. Las digestiones se chequearon por electroforesis en gel de agarosa al 0.7%, en presencia de bromuro de etidio 0.5 μ g/ml, y se determinó la acción de la enzima de restricción, visualizando el producto de la reacción mediante radiación UV.

7.2.1.2.- Separación de fragmentos mayores. Con el objeto de disminuir el número de clones necesarios para tener una genoteca representativa del genoma de *P. rhodozyma*, se procedió a purificar fragmentos de DNA genómico de tamaño mayor a 6 Kb mediante centrifugación en gradiente de sacarosa o separación por electroforesis y posterior electroelución.

7.2.1.2.1.- Gradiente de Sacarosa. El gradiente de sacarosa se preparó manualmente a partir de soluciones de sacarosa al 10%, 20%, 30% y 40%. Para ello se depositó suavemente en un tubo de nitrocelulosa de 5 ml de capacidad, 1 ml de cada una de las soluciones de sacarosa en orden descendente de concentración. Luego, el tubo fue mantenido por 16 hrs a 4 °C para permitir la formación de la gradiente. Posteriormente, se depositaron 200 µl de muestra de DNA digerido sobre la superficie de la gradiente teniendo cuidado de no perturbarla y el tubo fue centrifugado en ultracentrífuga Sorvall a 40000 rpm por 5 hrs a 4 °C utilizando un rotor de ángulo variable. Finalizada la centrifugación, se tomaron alícuotas de 200 µl de la superficie de la gradiente y se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 0,4 %. Las fracciones que presentaban fragmentos de 6 a 23 Kb se juntaron y precipitaron agregando 2 volúmenes de agua y 6 volúmenes de etanol al 96% e incubando por 16 hr a -20 °C. Posteriormente, el tubo fue centrifugado a 30000 rpm por 1 hr a 4 °C, se eliminó el sobrenadante, se secó el precipitado y resuspendió en 200 a 500 µl de tampón TE.

7.2.1.2.2.- Electroelución de DNA a partir de geles de agarosa: 5 a 10 µg de DNA digerido fueron disueltos en 50 µl de tampón TE y cargados en un gel de agarosa al 0,6% en tampón TAE 1X (Apéndice 2). Los ácidos nucleicos fueron sometidos a un campo eléctrico de 3 V/cm hasta completar la corrida (10 a 12 hrs). Posteriormente, el gel fue iluminado con radiación UV de 320 nm y se

cortó con un bisturí, una banda de gel que contenía fragmentos de 6 a 23 Kb aproximadamente. Esta banda de gel fue depositada en el interior de una bolsa de diálisis, la cual fue firmemente cerrada. La bolsa con el trozo de gel fue introducida en una cámara de electroforesis que contenía tampón TAE 1X y sometida a un campo eléctrico de 7 V/cm durante 16 hrs. Luego, el campo eléctrico fue invertido durante 3 min y el tampón dentro de la bolsa de diálisis fue recuperado y depositado en un tubo de vidrio de 25x150 mm. Posteriormente, el DNA fue precipitado mediante la adición de 2,5 volúmenes de etanol e incubado durante 16 hrs a -20 °C. Finalmente, el tubo fue centrifugado en una centrifuga Sorvall por 30 min a 10000 rpm a 4 °C, y luego de secado, el DNA fue resuspendido en 200 a 500 µl de tampón TE.

7.2.2.- DNA plasmidial. Los plásmidos utilizados fueron aislados de cepas bacterianas que los portaban según el punto 6.1. Posteriormente, el DNA plasmidial fue purificado mediante GeanClean (GeanClean II kit, Bio 101, CA). Para ello, 5 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 plasmidial y se depositó en un tubo de microcentrifuga de 1.5 ml. Al tubo se agregó 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 Glassmilk¹ y se incubó en hielo por 5 min. Posteriormente, el tubo fue centrifugado en una centrifuga Eppendorf a 12000 rpm por 5 seg, el sobrenadante fue eliminado y la resina fue lavada en 500 µl de solución New². El lavado con la solución New se repitió dos veces mas y finalmente se agregó 30 µl de tampón TE. El tubo fue incubado por 5 min a 50 °C para permitir que el DNA se separe de la resina, y posteriormente, fue centrifugado en una centrifuga Eppendorf a 12000 rpm por 30 seg. El sobrenadante que contenía el DNA plasmidial, fue recuperado y traspasado a un tubo estéril.

- 7.3- Genoteca en YCp50 y pBluescript. El procedimiento de construcción de la genoteca en los plásmidos YCp50 y pBluescript, se detallan en las figuras 3 y 4. Para la construcción de la genoteca en estos plásmidos, se procedió a ligar DNA genómico, digerido parcialmente con BamHI, con DNA plasmidial linearizado con la misma enzima en la razón de 3:1. La reacción se realizó mediante la enzima T4 DNA ligasa en tampón Tris-HCl 50 mM, MgCl₂ 10 mM, ATP 1 mM, PEG 8000 5% y DTT 1 mM, y en un volumen final no superior a 25 µl durante 16 hrs a 20 °C. El ligado se chequeó mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,7%. Se transformaron células de *E. coli* cepa DH5α con la mezcla de ligado según el punto 7.1.

¹ Componente del Kit. Sin referencia de composición.

² Componente del Kit. Solución alcoholica. Sin referencia de composición.

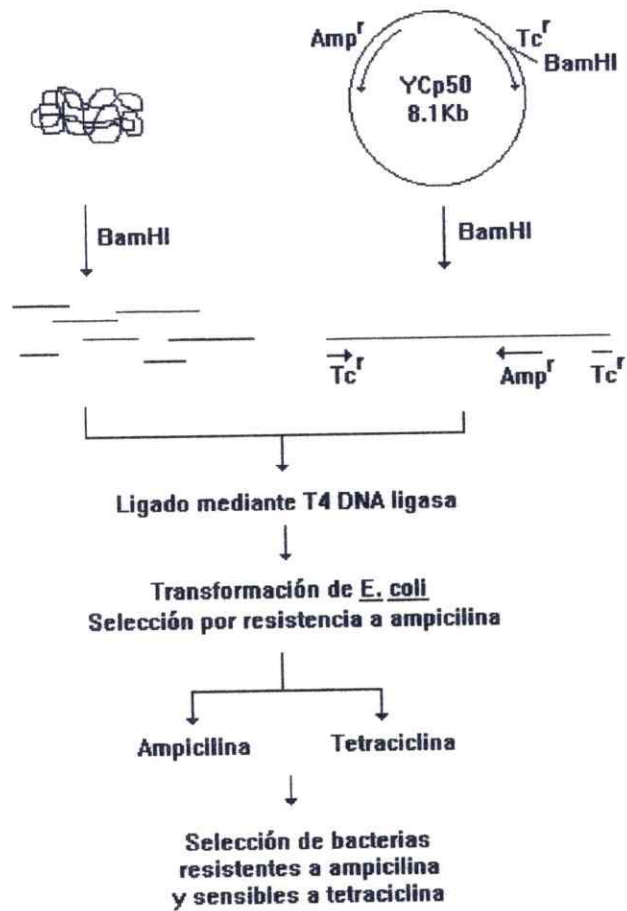


Figura 3:

Esquema de construcción de la genoteca de *Phaffia rhodzyma* en YCp50.

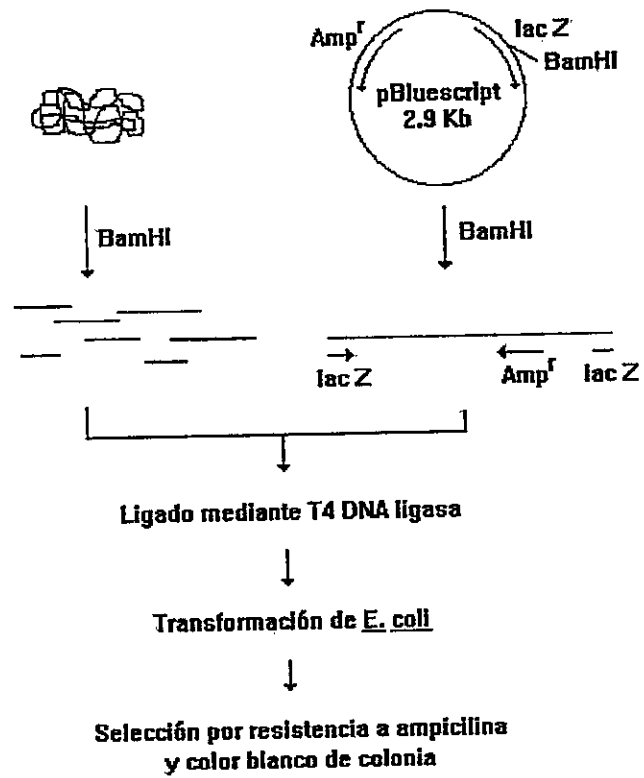


Figura 4:

Esquema de construcción de genoteca de *Phaffia rhodozyma* en pBluescript.

7.4.- Selección de clones con inserto: En el caso de la genoteca con el plásmido YCp50, los clones que presentaban resistencia a ampicilina fueron replicados ordenadamente en placas con medio LB-agar más ampicilina 100 µg/ml y placas con medio LB-agar más tetraciclina 20 µg/ml. Se seleccionaron aquellas colonias que presentaban un fenotipo resistente a ampicilina y sensible a tetraciclina.

En el caso de la genoteca con el plásmido pBluescript, la selección se realizó 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).

7.5.- Almacenamiento. Las colonias seleccionadas fueron reunidas en grupos de 150 a 200 colonias y congeladas a -70 °C según el punto 2.1.

8.- Transformación genética.

8.1.- *Escherichia coli*: La transformación genética de las cepas de *E. coli* utilizadas durante esta tesis se realizó según el método de RbCl (Utermohlen, 1994).

- 8.1.1.- Células competentes: La cepa DH5 α , de *E. coli*, se sembró 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 . El cultivo se incubó con agitación constante hasta una D.O_{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 D.O_{550nm}=0.48. Este cultivo se distribuyó en tubos de vidrio preenfriados de 25x150 mm y las células se precipitaron mediante centrifugación a 5000 rpm en una centrífuga Sorvall a 4°C. Las células se resuspendieron suavemente en 30 ml de solución T β I y se volvieron a centrifugar bajo las mismas condiciones. Posteriormente, las células se resuspendieron en 4 ml de solución T β II y se distribuyeron alícuotas de 100 μ l en tubos de microcentrífuga de 1.5 ml y se guardaron inmediatamente a -70°C.
- 8.1.2.- Transformación: Las células competentes fueron descongeladas a temperatura ambiente e inmediatamente se pasaron a hielo. Posteriormente, se adicionó el DNA transformante en un volumen no superior a los 10 μ l y la mezcla se incubó en hielo por 15 min, luego de lo cual fue sometida a un pulso térmico de 2 min a 42°C. Inmediatamente, las células fueron incubadas en hielo por 2 min y posteriormente a temperatura ambiente por 10 min. Con la finalidad de permitir

la expresión de resistencia que portaba el vector transformante, a la mezcla se adicionó 1 ml de medio LB y se incubó a 37°C por un período de 45-60 min. Finalmente, se sembraron alícuotas de 100 µl de células en placas con medio LB que contenía los suplementos apropiados e incubadas a 37°C por 12-16 hrs.

8.2.- *Phaffia rhodozyma*: La transformación genética de *P. rhodozyma* se realizó mediante adaptaciones de protocolos de transformación, descritos para *S. cerevisiae* (Rose *et al*, 1990, Becker *et al*, 1991). Se ensayaron los métodos de transformación mediante la utilización de sales de litio (Ito *et al*, 1983) y transformación de protoplastos (Hinnen *et al*, 1978).

8.2.1.- Acetato de litio. La cepa de *P. rhodozyma* fue crecida en 50 ml de medio YM a 22 °C hasta alcanzar una concentración de 2×10^7 células/ml. Posteriormente, 10 ml de cultivo celular se recuperaron mediante centrifugación en centrífuga Sorvall a 4000 rpm por 10 min. Las células fueron resuspendidas en 5 ml de una solución de acetato de litio 0.1 M, Tris-HCl 10 mM, EDTA 1mM pH 7.5 y luego fueron centrifugadas a 4000 rpm por 10 min. Posteriormente, las células fueron resuspendidas en 1 ml de la solución de acetato de litio en TE e incubadas a 22 °C con agitación suave por 1 hr. Luego se dispusieron alícuotas de 0,1 ml en tubos de microcentrífuga de 1.5 ml y se agregó el DNA transformante en un volumen no superior a 10 µl y 10 µl de DNA de esperma de

salmón a 5 mg/ml. La mezcla se incubó durante 30 min a 22 °C y se agregó 0.7 ml de una solución al 40% de PEG 4000, 0,1 M acetato de litio, Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM pH 7.5. La mezcla fue incubada durante 1 hr a 22 °C y luego se aplicó un pulso térmico de 30 °C durante 5 min. Las células fueron recuperadas mediante centrifugación en una microcentrífuga Eppendorf por 5 seg y el sobrenadante fue eliminado. Las células fueron resuspendidas en 1 ml de tampón TE pH 7.5 y se determinó la concentración de células mediante un hemocitómetro. Finalmente, la suspensión celular fue diluida y plaqueada en medio YM-agar y las placas fueron incubadas a 22 °C durante 7 días o hasta el desarrollo de color.

8.2.2.- Protoplastos.

8.2.2.1.- Formación de protoplastos. Ver punto 6.3.1.

8.2.2.2.- Transformación. Los protoplastos fueron precipitados mediante centrifugación a 4000 rpm en una centrífuga Sorvall a 4°C y resuspendidos en 1 ml de KCl 0.8 M, CaCl₂ 10 mM, Tris-HCl 10 mM. Inmediatamente la suspensión fue dividida en alícuotas de 100 µl y depositadas en tubos de microcentrífuga de 1.5 ml y mantenidos en hielo. Posteriormente, se agregó el DNA transformante en un máximo de 10 µl de agua estéril y se incubó la mezcla por 10 min a 22 °C.

Luego se agregó 1 ml de PEG 4000 26,4%, KCl 0.8 M, Tris-HCl 10 mM, CaCl₂ 10 mM y se incubó por 10 min a 22 °C. Los protoplastos fueron recuperados mediante centrifugación a 2500 rpm por 5 min y resuspendidos en 1 ml de medio YM-KCl 0.8 M, CaCl₂ 5 mM e incubados durante 1 hr a 22 °C para permitir la regeneración de la pared celular. Finalmente, se depositaron alícuotas de 100 µl en 3 ml de medio YM-KCl 0.8 M, agar 0.7% a 45 °C y, luego de mezclar rápidamente la suspensión, ésta se depositó homogéneamente sobre la superficie de placas petri que contenían medio YM-agar, KCl 0.8 M. Las placas fueron incubadas a 22 °C por 7 a 10 días, hasta el desarrollo de color.

9.- Análisis de los transformantes de *P. rhodozyma*.

9.1.- Pigmentación: Se analizó el patrón de pigmentación de las colonias transformantes mediante cromatografía en capa fina y HPLC, como se indica en el punto 5.

9.2.- Recuperación de DNA plasmidial de *P. rhodozyma*: La recuperación de DNA plasmidial de cepas transformantes de *P. rhodozyma*, se realizó mediante la transformación de células competentes de *E. coli* con ácidos nucleicos totales obtenidos de las cepas transformadas de levadura. Para ello, 2 µg de DNA

obtenido a partir de cultivos de cepas transformadas de *P. rhodozyma* fue digerido totalmente, con 10 unidades de endonucleasa EcoRI en tampón Tris-HCl 50 mM, MgCl₂ 10 mM y NaCl 100 mM, durante 16 horas a 37 °C. Luego, la enzima fue retirada lavando la solución con un volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1), un volumen de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), y precipitando el DNA de la fase acuosa con 2,5 volúmenes de etanol. Posteriormente, 1.7 µg de DNA digerido fue ligado mediante la enzima T4 DNA ligasa de *E. coli* a 37 °C por 16 hrs, en un volumen final de 200 µl de reacción para permitir ligado intramolecular. Finalmente, se transformaron células competentes de *E. coli* con 8 µl de la mezcla de ligado (70 ng de DNA), y las células transformadas se plaquearon sobre 25 ml de medio LB-agar, X-gal 32 µg/ml, IPTG 32 µg/ml y ampicilina 100 µg/ml.

Para descartar la posible aparición de colonias resistentes a ampicilina que no fueran producto de DNA plasmidial proveniente de las cepas transformadas, se realizaron tres controles negativos. El primero de ellos consistió en depositar alícuotas de 10 µl de ácidos nucleicos totales provenientes de las cepas transformadas, digerido y ligado, sobre placas con medio selectivo. Además, se depositaron 100 µl de células competentes sobre placas con medio selectivo y finalmente, se realizó un protocolo similar al utilizado para las cepas de *P. rhodozyma* transformadas, con DNA proveniente de la cepa albina atx3.

10.- Análisis de DNA.

10.1.- Subclonamiento: Con el objetivo de determinar la presencia de secuencias homólogas a los genes *al-1* y *al-3* de *Neurospora crassa* en *P. rhodozyma*, se subclonó los genes *al-1* y *al-3* de *N. crassa* en el plásmido pBluescript, a partir de los plásmidos 3:11:H (Schmidhauser *et al*, 1990) y pNC39 (Nelson *et al*, 1989). Los plásmidos recombinantes fueron utilizados como sondas en el análisis de hibridación del DNA genómico de *P. rhodozyma*.

10.1.1.- Gen *al-1* (Fitoeno deshidrogenasa): Se digirieron 5 µg de DNA del cósmido 3:11:H con 10 unidades de las enzimas de restricción Sma I y HindIII, en tampón KCl 20 mM, Tris-HCl 6 mM, MgCl₂ 6 mM, pH 8.0, durante 6 hrs a 37 °C. Los fragmentos resultantes de la digestión fueron separados mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.7 % y se recuperó un fragmento de 3.1 Kb mediante GeanClean (ver punto 7.2.2). Luego, 150 ng de este fragmento se ligaron mediante la enzima T4 DNA ligasa a 50 ng del plásmido pBluescript digerido con las mismas enzimas, y la mezcla de reacción fue utilizada para transformar células de *E. coli* cepa DH5α, según el punto 7.1. De los clones con inserto se aisló DNA plasmidial y para determinar la identidad del inserto, se

realizó un análisis de digestión del plásmido recombinante, el cual se comparó con la secuencia publicada del gen *al-1* (Schmidhauser *et al*, 1990).

10.1.2.- Gen *al-3* (geranil geranil pirofosfato sintetasa): El gen *al-3* se subclonó a partir del plásmido pNC39, gentilmente donado por A. Carattoli (comunicación personal). Para ello, se sometió a digestión 5 µg del plásmido con las enzimas HindIII y PstI durante 2 hrs a 37 °C, en tampón KCl 20 mM, Tris-HCl 6 mM, MgCl₂ 6 mM, pH 8.0. Los fragmentos de la digestión fueron separados mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.7%, y se purificó un fragmento de 4.9 kb que contenía el gen *al-3* mediante GeanClean (ver punto 7.2.2). Posteriormente, 100 ng de este fragmento se ligaron mediante la enzima T4 DNA ligasa, a 50 ng del plásmido pBluescript digerido con las mismas enzimas, y la mezcla de reacción fue utilizada para transformar células de *E. coli* cepa DH5α, según el punto 7.1. Con el objeto de determinar la identidad del inserto, se aisló DNA plasmidial y se realizó un análisis de digestión del plásmido recombinante, el cual se comparó con el mapa de digestión del fragmento HindIII-PstI de 4.9 kb publicado por Schmidhauser *et al* (1990).

10.2.- Mapas de digestión: Los análisis de digestión de los plásmidos de interés, generados durante el presente trabajo de tesis, se realizaron según las técnicas descritas en Sambrook *et al*, 1989. Se incubó 0.5 a 1 µg 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 se realizaron 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, la reacción se realizó en forma simultánea, si ambas enzimas requerían condiciones similares de tampón. En aquellos casos en que las dos enzimas requerían tampones diferentes, el DNA se incubó 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 se analizaron por electroforesis en gel de agarosa. Los tamaños de los fragmentos generados fueron calculados utilizando el programa computacional DNAFRAG versión 3.03 (Schaffer *et al*, 1981), obtenido desde European Molecular Biology Laboratories (EMBL) a través de Internet.

10.3.- Hibridización DNA-DNA. Los análisis de hibridación de ácidos nucleicos se realizaron en base a la técnica desarrollada por Southern, 1975 y descrita en Sambrook *et al*, 1989., y Rose *et al*. 1990.

10.3.1.- Marcado de las sondas: Las sondas de DNA fueron marcadas con α -³²P-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 denaturó 50 ng de sonda disueltos en 20 μ l de agua, mediante calentamiento en baño maría por 5 min e inmediatamente el tubo fue depositado en hielo. Luego, se agregó al tubo 6 μ l de una solución que contenía una mezcla equimolar de desoxinucleótidos (dATP, dGTP y dTTP), 15 μ l de una mezcla de partidores sintéticos, 5 μ l de α -³²P-dCTP (50 uCi) y 3 μ l de agua destilada. La solución se mezcló suavemente y se agregó 1 μ l de una solución que contenía el fragmento Klenow de la DNA polimerasa I (Apéndice 2). La reacción se incubó durante 3 hrs a 25 °C, luego de lo cual se agregó 5 μ l de una 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 μ l de agua y mantenida a -20 °C hasta ser utilizada.

10.3.2.- Hibridación: Los experimentos de hibridación de DNA se realizaron en base a la técnica desarrollada por Southern, 1975. La electroforesis se realizó utilizando 7 a 10 μg de DNA cromosómico digerido por carril o 40 a 100 ng de DNA plasmidial en gel de agarosa en presencia de bromuro de etidio 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, TAE 1X. Luego de desarrollada 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 desnaturalizar el DNA. Posteriormente, el gel se neutralizó 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 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 prehibridación (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 desnaturalizada mediante calentamiento a 90 °C por 5 min. Una vez terminada la hibridación, la membrana se lavó 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. Posteriormente, la membrana se secó 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 se colocó en una caja de exposición autorradiográfica con pantalla intensificadora, que contenía una placa autorradiográfica tipo R. La caja se incubó a -70 °C por 2 hrs, para hibridación de DNA plasmidial o 12 a 24 hrs para hibridación de DNA genómico. Las placas se revelaron y fijaron según los procedimientos fotográficos rutinarios.

RESULTADOS

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

Para la obtención de mutantes afectados en la síntesis de pigmentos se realizaron una serie de experimentos de mutagénesis utilizando luz ultravioleta y nitrosoguanidina (tabla 1). Los experimentos realizados en dos cepas silvestres de *P. rhodozyma* (UCD 67-385 y UCD 67-383), y en cepas derivadas de ellas, permitieron obtener sobre 150 cepas mutantes que presentaron un fenotipo de pigmentación alterado en relación a su parental (tabla 2).

Los mutantes obtenidos se clasificaron según su pigmentación en albinos, pálidos, amarillos y sobreproductores (tabla 3). Además, se obtuvieron colonias sectorizadas en las que se observó que la descendencia de cada sector, luego de ser aislado, mantenía su fenotipo de pigmentación en forma estable. En las figuras 5 y 6 se muestran las dos cepas silvestres y algunos mutantes seleccionados por sus características de pigmentación.

Tabla 1

Experimentos de mutagénesis realizados sobre cepas silvestres y mutantes en pigmentación de *Phaffia rhodozyma*

Experimentos	Cepa	Mutágeno
10	UCD 67-385	UV
5	UCD 67-385	NTG
3	UCD 67-383	UV
2	atxS1	UV
2	atxS1	NTG
4	atxS2	UV
7	atxS2	NTG
3	atx3	UV
2	pal1	UV
1	LG1	NTG
1	LG1	UV
1	NTG8	NTG

Las cepas UCD 67-383 y UCD 67-385 corresponden a cepas silvestres. Todas las cepas restantes son mutantes en pigmentación derivados de la cepa silvestre UCD 67-385.

Tabla 2

Fenotipo de pigmentación de mutantes obtenidos mediante mutagénesis con radiación ultravioleta y nitrosoguanidina

Fenotipo de la colonia	Número
Naranja claro	23
Amarilla	17
Albina	20
Sectorizada	22
Roja	7
Variable ^a	102

El fenotipo indicado corresponde a una interpretación del color desarrollado por la colonia luego de 7 días de incubación a 22 °C. El color de la colonia de la cepa silvestre es naranja.

(a) En este grupo se incluyen cepas que presentan un fenotipo de coloración que varía en tonalidad con respecto a la cepa silvestre.

Tabla 3

Clases fenotípicas de mutantes

Clase	Fenotipo	Pigmento mayoritario ^a	Niveles ^b
I	Albino	Ninguno	Mínimos
II	Amarillo	β -caroteno	Equivalentes
III	Amarillo	β -caroteno	Mayores
IV	Naranja claro	astaxantina	Menores
V	Amarillo naranja	β -caroteno y astaxantina	Mayores
VI	Rojo naranja	astaxantina	Mayores

Todos los mutantes corresponden a cepas derivadas del silvestre UCD 67-385. El fenotipo de los mutantes se determinó por inspección visual de las colonias que ellos generan.

(a), pigmento determinado por TLC. (b), nivel de pigmentación en relación a la cepa silvestre.



Figura 5:

Cultivo en placa de la cepa silvestre UCD 67-383 y mutantes de pigmentación derivados de ella. Los mutantes fueron obtenidos mediante tratamiento simple con luz ultravioleta. (S), cepa silvestre.

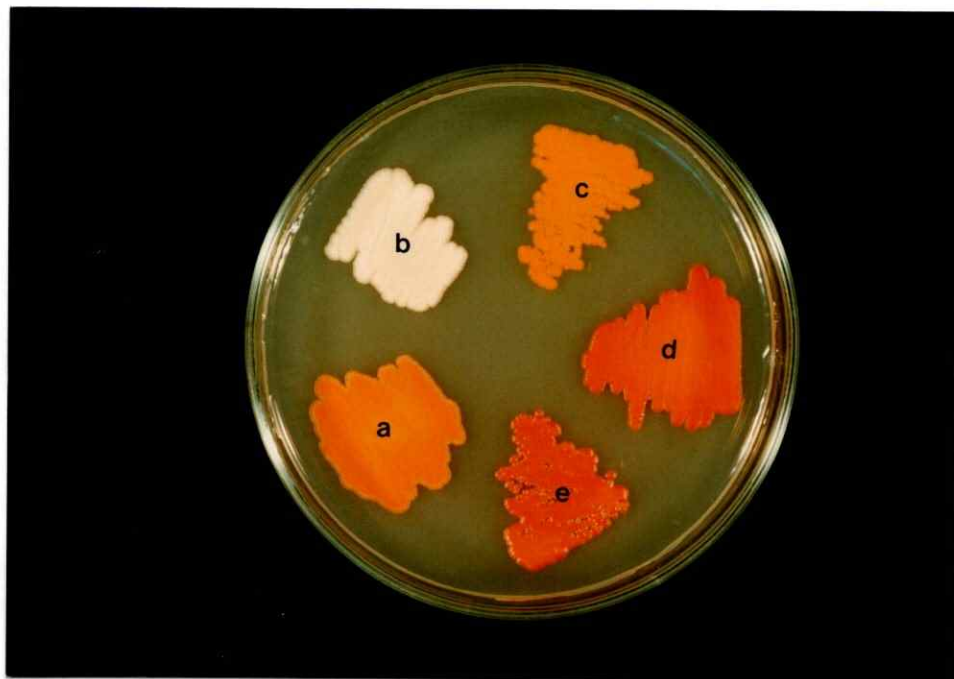


Figura 6:

Fotografía de un cultivo en placa de la cepa silvestre UCD 67-385 y mutantes de pigmentación derivados de ella. Se presentan cepas originadas por mutagénesis simple (D) y múltiples (B,C,E). A: UCD 67-385; B: atx3; C: atx5; D: atxS1; E: atxS2.

En ambas cepas silvestres la aparición de colonias con un fenotipo de pigmentación distinto, luego del tratamiento mutagénico, fue una por cada 10^4 colonias analizadas (tabla 4). Sin embargo, la obtención de mutantes nulimórficos para la síntesis de astaxantina fue más eficiente en la cepa UCD 67-383 que en la cepa UCD 67-385 (tabla 5).

2.- Análisis de los mutantes.

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

Los mutantes obtenidos fueron analizados para determinar la estabilidad del fenotipo mutante, como se indica en Métodos, sección 3.6. Todos los mutantes seleccionados presentaron una estabilidad mayor que 10^{-6} . Los mutantes nulimórficos, así como los pálidos no produjeron colonias revertantes. Algunos mutantes sobreproductores, si bien tampoco revirtieron durante la determinación de la estabilidad del carácter, variaron el nivel de sobreproducción de pigmentos luego de varias réplicas del cultivo, pero mantuvieron el carácter sobreproductor (tabla 6). Las colonias sectorizadas presentaron un comportamiento estable en cuanto al fenotipo de cada sector, luego de varias réplicas del cultivo.

Tabla 4

Frecuencia de mutagénesis en *Phaffia rhodozyma*

Cepa	UCD 67-383	UCD 67-385	UCD 67-385
Mutágeno	UV	UV	NTG
Sobrevida (%)	0.8	0.47	0.86
Frecuencia de mutagénesis	1.8×10^{-4}	1.4×10^{-4}	5.1×10^{-4}

Los experimentos de mutagénesis se realizaron como se indica en Métodos. La frecuencia de mutagénesis se refiere a la aparición de colonias con fenotipo de pigmentación distinto a la cepa parental.

Tabla 5

Número de mutantes nulimórficos para la síntesis de astaxantina provenientes de dos cepas silvestre de *Phaffia rhodozyma*.

Cepa silvestre	Número de mutantes	
	Albinos	Amarillos
UCD 67-383	17	13
UCD 67-385	3	4

Tabla 6

Variación de la cantidad de astaxantina^a en mutantes sobreproductores de pigmentos de *Phaffia rhodozyma* a través de varias generaciones

Cepa	Generaciones			
	1	2	3	4
LG1	1300	1300	1295	1308
EMS7.132	1376	1458	1572	1320
NTG2.252	1318	1528	1424	1577

(a), concentración en ppm.

2.2.- Análisis de pigmentación de los mutantes en carotenogénesis.

El patrón de pigmentación de los mutantes obtenidos se determinó mediante cromatografía en capa fina (tabla 7). La identidad de los pigmentos se determinó a partir tanto de los valores de R_f (An *et al*, 1989), como de comigración con muestras comerciales puras. Aquellos pigmentos que están presentes en la célula en mayor cantidad se purificaron desde las placas cromatográficas y se confirmó su identidad mediante análisis espectrofotométrico (figura 7).

A partir de los resultados del análisis mediante cromatografía en capa fina, se seleccionaron 7 cepas mutantes en pigmentación para un análisis más completo. Estas cepas fueron escogidas considerando que representan a todas las clases fenotípicas de mutantes obtenidas (tabla 3). En las tablas 7 y 8 se presenta un resumen de las características más relevantes de estas cepas junto a las cepas silvestres. Además, en la tabla 9 se presenta el análisis realizado mediante HPLC a los pigmentos de estas cepas. En ella se indican los tiempos de retención para los pigmentos determinados en la cepa silvestre UCD 67-385. La identificación de dichos pigmentos se realizó a partir de la comparación de sus tiempos de retención con los tiempos de retención de compuestos puros (astaxantina y β -caroteno) y por análisis en HPLC a distintas longitudes de onda.

Tabla 7

Patrón cromatográfico en capa fina de cepas silvestres y de mutantes obtenidos por mutagénesis con radiación ultravioleta o nitrosoguanidina.

Cepa	Método de obtención	Cepa parental	R_f						
			0.00	0.15	0.21	0.38	0.54	0.69	0.85
UCD 67-385	---	---	-	+	+	+	+	+	-
UCD 67-383	---	---	+ ^d	+	+	+	+	+	-
pal-1	UV	UCD 67-385	-	+	+	+	+	+	-
atxS1	UV	UCD 67-385	-	+	+	+	-	-	+
am-2	UV	UCD 67-385	-	+	+	+	+	-	+
am-6	UV	UCD 67-385	-	+	+	+	-	+	+
atx1	NTG ^c	UCD 67-385	-	-	-	-	-	-	-
UVa11	UV	UCD 67-383	-	-	-	-	-	-	-
UVam3	UV	UCD 67-383	+	-	-	-	-	-	-
UVam5	UV	UCD 67-383	-	-	-	-	-	-	+
atx3	UV	pal-1	-	-	-	-	-	-	-
atx4	UV	atxS1	-	-	-	-	-	-	+
atx5	NTG	NTG8 ^b	-	-	-	-	-	-	+
atx6	NTG	atxS1	-	-	+	+	+	-	+
atx7	UV	atxS1	-	-	+	+	+	-	+
atxS2	UV y NTG	LG1 ^b	-	+	+	+	+	+	-
atx2	NTG ^c	UCD 67-385	-	-	+ ^a	-	-	-	-

Las cepas se crecieron durante 6 días en 10 mL de medio YM y los pigmentos fueron extraídos y separados mediante cromatografía en capa fina sobre placas de sílica Eastman Chromagram Sheet 6060.

Los signos + y - denotan la presencia o ausencia de señal, respectivamente. Astaxantina ($R_f=0.15$), β -caroteno ($R_f=0.85$). (a), señal muy débil. (b), mutantes de carotenogénesis derivados de la cepa silvestre UCD 67-385. (c), mutagénesis doble con nitrosoguanidina. (d), señal de color rojo e intensidad equivalente a $R_f=0.15$.

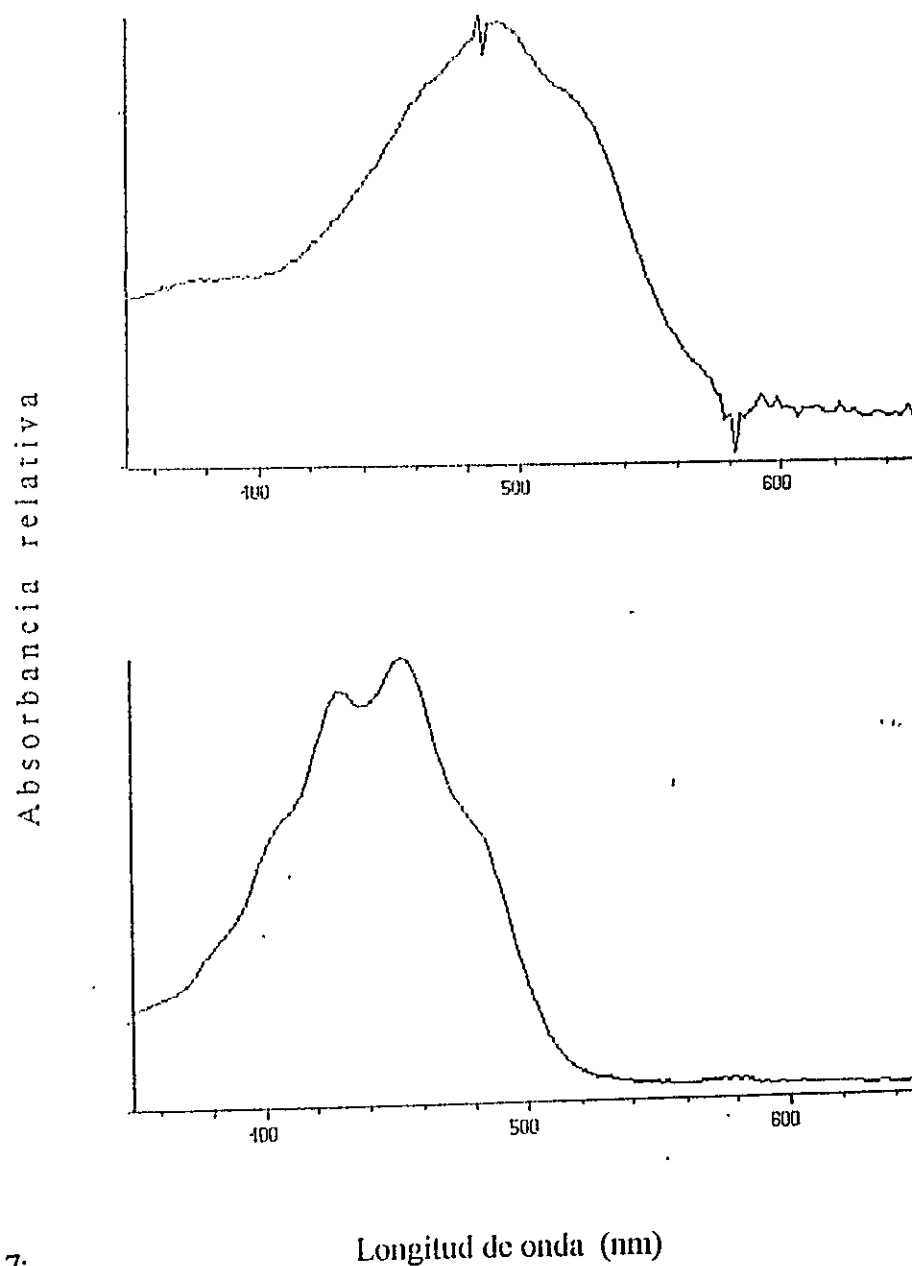


Figura 7:

Espectro de absorbancia en el rango de luz visible de pigmentos purificados de dos cepas de *Phaffia rhodozyma*. Superior, pigmento con $R_f=0.15$ que corresponde a astaxantina en la cepa UCD 67-385. Inferior, pigmento con $R_f=0.85$ que corresponde a β -caroteno en el mutante amarillo atx5.

Tabla 8

Comparación de fenotipos de crecimiento y pigmentación entre cepas silvestres y mutantes en pigmentación.

Cepa	Velocidad de crecimiento ^a (Células por hora)	Concentración (ppm)	
		Astaxantina	β-caroteno
UCD 67-383	0.105±0.003	120	30
UCD 67-385	0.060±0.010	300	18
pal-1	nd	30	2
atx2	nd	7	0
atx3	0.130±0.003	0	0
atx5	0.060±0.003	0	1203
atx6	0.060±0.003	15	432
atxS1	0.050±0.002	1286	102
atxS2	0.036±0.002	1683	25

(a), la velocidad de crecimiento del cultivo se determinó a partir de curvas de crecimiento en medio YM (n=3). nd, no determinado.

Tabla 9

Análisis mediante HPLC de los pigmentos presentes en la cepa silvestre UCD 67-385 y mutantes derivados de ella

Tiempo de retención ^a (min)	Presencia de señal a 450 nm				
	Silvestre (%) ^b	atx3	atxS1	atx5	atx6
1.2	0.8	-	-	-	+
2.1	46.4	-	+	-	+
3.4	13.0	-	+	-	+
5.3	13.4	-	-	-	-
7.2	4.0	-	+	-	+
8.5	4.4	-	+	-	+
9.4	3.0	-	+	-	+
11.5	1.6	-	+	-	+
12.7	1.6	-	+	-	+
30.5	12.0	-	+	+	+

(a), los tiempos de retención corresponden a los encontrados para la cepa silvestre y se determinaron a partir de 5 experimentos independientes. (b), los valores corresponden a la fracción absorbida por cada pigmento en relación al total. (+ y -), presencia o ausencia de señal. Tiempos de retención de: astaxantina (2.1 min). HDCO (5.3 min). fenicoxantina (7.2 min). 3-hidroxi-equinenona (8.5 min). equinenona (9.4 min) y β -caroteno (30.5 min).

En la figura 8 se presenta un análisis por HPLC de la cepa silvestre UCD 67-385 y de dos mutantes nulimórficos derivados de ella. En el perfil cromatográfico es posible observar que la cepa atx5 no produce astaxantina y acumula β -caroteno, en cambio la cepa atx3 no sintetiza compuestos que absorban a 450 nm. Sin embargo, análisis de este mismo tipo realizados a 287 nm indican que la cepa atx1, atx2 y atx3 acumulan un compuesto que posee un tiempo de retención de 22 min. Este pigmento, de acuerdo a nuestros análisis, correspondería a fitoeno.

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

Con el objeto de obtener cepas que permitieran establecer un sistema de selección eficiente para experimentos de análisis parasexual, se procedió a buscar mutantes auxótrofos. En primer lugar se establecieron las condiciones óptimas para un sistema de enriquecimiento de dichos mutantes utilizando nistatina. En la figura 9, se muestran los resultados obtenidos luego del tratamiento con nistatina de la cepa silvestre UCD 67-385 de *P. rhodozyma*, realizado en condiciones que simulan el comportamiento de células auxótrofas y protótrofas (Snow, 1966). Se puede apreciar que el tiempo óptimo para mantener una alta sobrevida de células auxótrofas sería de 2 hr en presencia de nistatina a 0.01 mg/ml. Mayores tiempos de incubación en presencia del antibiótico disminuyen la población de células

auxótrofas. Algunos resultados representativos de los experimentos realizados para obtener mutantes auxótrofos de *P. rhodozyma* se muestran en la tabla 10. Independientemente del método mutagénico utilizado no se obtuvieron mutantes incapaces de crecer en medio MM.

Debido a que el número de colonias analizadas representa menos de un 0.005% de todas las colonias sometidas a mutagénesis y aproximadamente un 0.5% de las colonias sobrevivientes, se utilizó un método de selección directa de mutantes auxótrofos. En la tabla 11 se indican los resultados obtenidos luego de sembrar las células mutagenizadas sobre placas con medio 5-FOA (Apéndice N°1). De las colonias que crecieron en presencia del agente selectivo ácido-5-fluoro-orótico, 10 mantuvieron su capacidad de crecer en medio mínimo y 2 demostraron ser auxótrofas. Sin embargo, una de estas colonias presenta un lento crecimiento en medio mínimo luego de ser incubada por 8 días, por lo que podría corresponder a un mutante "leaky". Ninguna de las dos colonias auxótrofas creció en medio mínimo suplementado con uracilo, por lo que su auxotrofia no correspondería a la síntesis de uracilo como se esperaba.

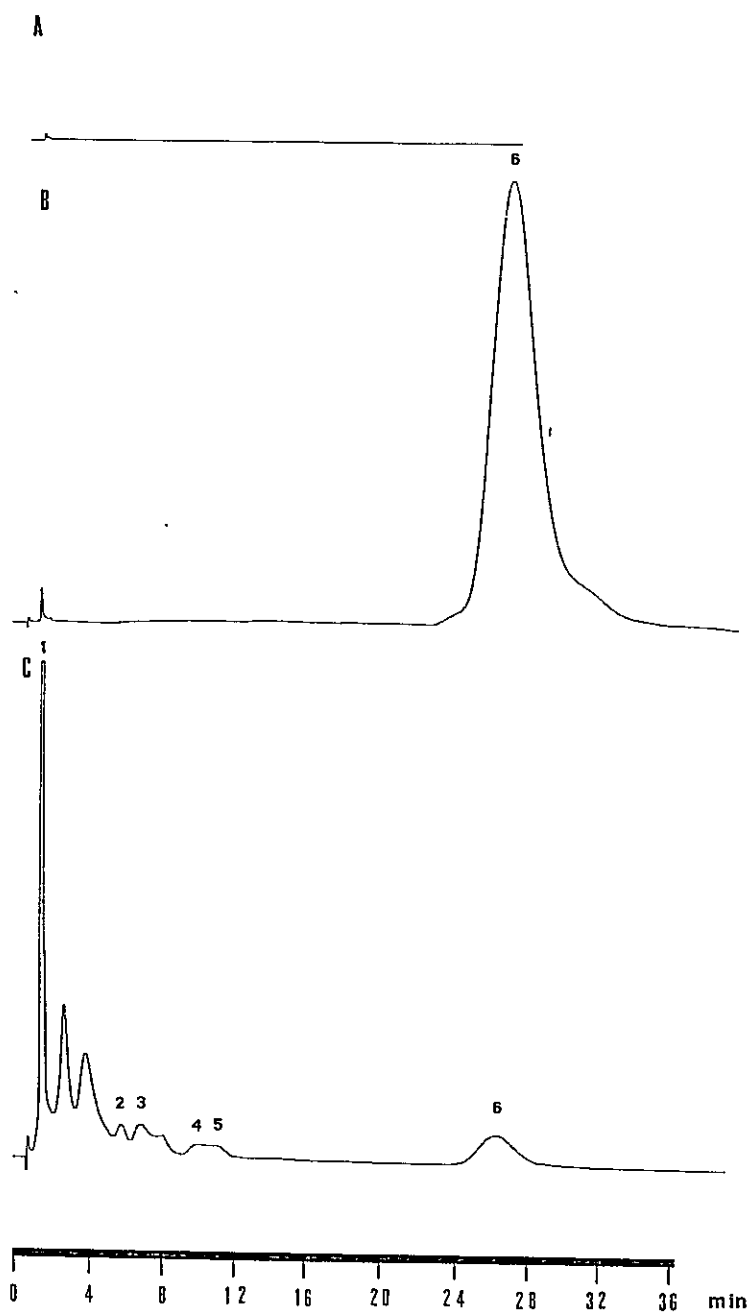


Figura 8:

Perfil HPLC de la cepa silvestre UCD 67-385 y dos mutantes nulimórficos derivados de ella. El registro se realizó a 450 nm. A: mutante albino atx3; B: mutante amarillo atx5; C: cepa silvestre UCD 67-385. 1, astaxantina; 2, HDCO; 3, fenicoxantina; 4, 3-hidroxi-équinenóna; 5, equinenona y 6, β -caroteno.

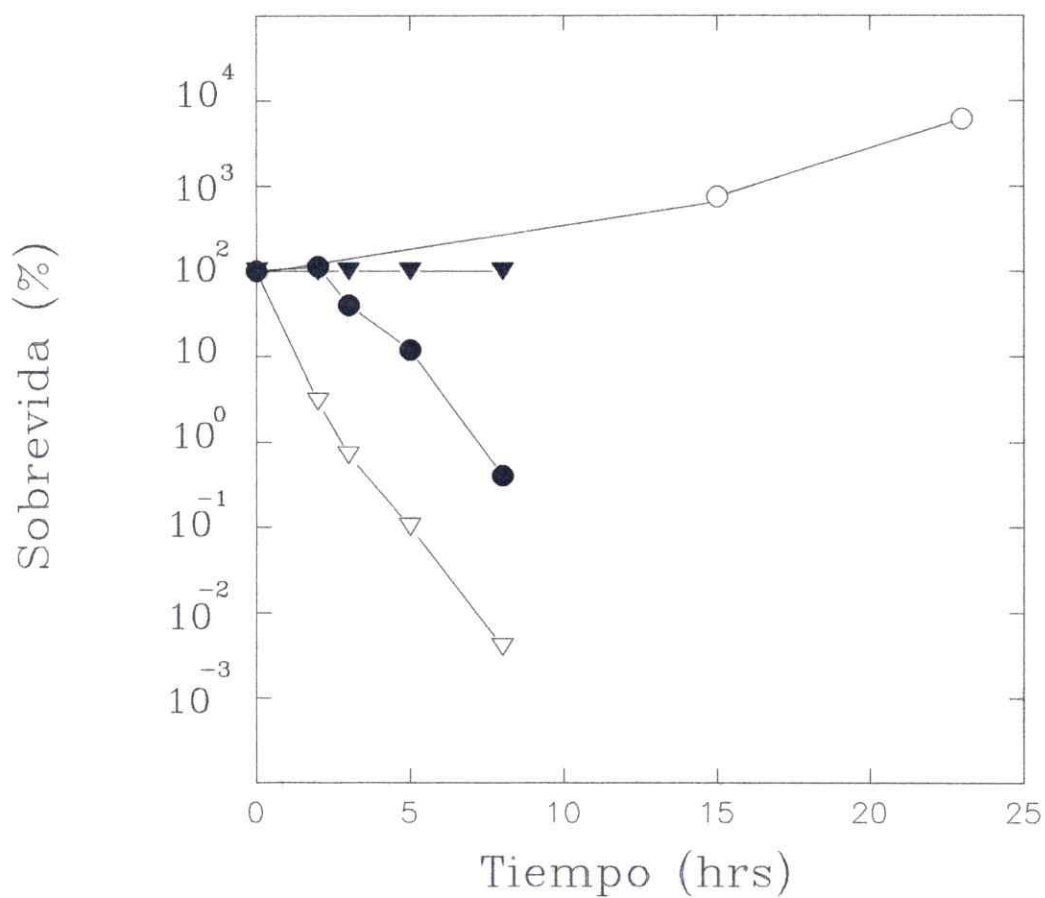


Figura 9:

Efecto de nistatina sobre *Phaffia rhodozyma*. Cultivos de la cepa silvestre UCD 67-385 fueron crecidos en medio MM hasta 3×10^5 células/ml. Luego las células se lavaron dos veces en agua estéril, se depositaron en 20 ml de medio mínimo sin fuente de amonio y se incubaron a 22 °C por 2 hrs. Posteriormente, las células fueron depositadas en 20 ml de: medio MM (○); medio MM + nistatina (▽); medio mínimo sin fuente de amonio (▼) y medio mínimo sin fuente de amonio + nistatina (●). La concentración de nistatina utilizada fue de 10 µg/ml. A distintos tiempos de incubación, se tomaron alícuotas y se determinó el porcentaje de sobrevivida.

Tabla 10

Selección de mutantes auxótrofos de *P. rhodozyma* mediante enriquecimiento de mutantes con nistatina

Método mutagénico	Colonias analizadas	Frecuencia de auxótrofos
NTG	10000	$< 10^{-4}$
UV	9000	$< 9 \times 10^{-3}$
NTG ^a	10000	$< 10^{-4}$

El cultivo, luego de ser mutagenizado, fue sometido a tratamiento con nistatina (0.01 mg/mL) durante 2 hrs. Las colonias sobrevivientes fueron traspasadas ordenadamente a placas con medio YM y medio MM.

(a), el cultivo fue sometido a dos períodos iguales de incubación con el mutágeno separados por un periodo de incubación por 24 hrs en medio YM.

Tabla 11

Selección mediante ácido-5-fluoro-orótico de mutantes auxótrofos para uracilo en *P. rhodozyma*.

Medio de cultivo	Colonias formadas
Medio 5-FOA ^a	12
Medio mínimo	10
Medio mínimo + uracilo ^b	0

Cultivos de la cepa UCD 67-385, fueron mutagenizados y sometidos a enriquecimiento con nistatina. Posteriormente, las células fueron sembradas en los medios de cultivos indicados en la tabla y se determinó el número de colonias que crecieron.

(a), se analizaron por experimento entre 10^5 a 10^7 potenciales unidades formadoras de colonias. (b), solo se analizaron las dos colonias que demostraron ser auxótrofas.

4.- Análisis de complementación.

Con el objeto de determinar relaciones de dominancia y complementación entre los mutantes obtenidos en este trabajo y la cepa silvestre UCD 67-385, se realizaron análisis de complementación mediante fisión de protoplastos. Los resultados obtenidos al fusionar protoplastos de mutantes afectados en pigmentación y entre algunos de tales mutantes con la cepa silvestre UCD 67-385 se resumen en la tabla 12. Como se observa, en todos los experimentos aparecen colonias sectorizadas como el evento más frecuente de la fusión. Además, la fusión entre cepas sobreproductoras de pigmentos, originó colonias con un fenotipo de producción de pigmentos equivalentes a la cepa silvestre, lo cual implicaría recesividad del carácter sobreproductor.

La fusión entre las cepas atx6 y atx5 también originó colonias con un fenotipo silvestre. El análisis mediante cromatografía en capa fina de los pigmentos presentes en una colonia fusante, denominada cepa fs-1, indica que ella posee todos los pigmentos sintetizados por ambos parentales. Además, el análisis por HPLC apoya el carácter fusante de dicha cepa, debido a que su patrón cromatográfico se explicaría al considerar su origen a partir de un evento de fusión y complementación (tabla 13). La cepa fusante fs-1 resultó ser muy estable, siendo su frecuencia de reversión menor a 10^{-5} . Por otra parte, el análisis del número de núcleos por célula mediante tinción con DAPI, indica que esta cepa es uninucleada a diferencia de células obtenidas

Tabla 12

Fusión de cepas mutantes y silvestre de *P. rhodozyma*

Fusión		Fenotipos (%)			
		Tipo parental		Tipo recombinante	
Parental 1	Parental 2	Parental 1	Parental 2	Sectorizada	Silvestre
Silvestre	atx6	38.5	61.2	0.3	-
Silvestre	atx5	42.2	57.0	0.8	-
atx6	atx5	38.5	60.7	0.6	0.2
atx3	atx6	48	50.6	1.4	-
atx3	atx5	77	21.6	1.4	-
atxS1	atxS2	53.8	41.2	0.6	4.4
Silvestre		100	-	-	-
atx3		100	-	-	-
atx5		100	-	-	-
atx6		100	-	-	-
atxs1		100	-	-	-
atx5 ^a	atx6	50	50	-	-
atxs1 ^a	atxs2	50	50	-	-

Los experimentos de fusión de protoplastos fueron realizados como se describe en Métodos, punto 4.1. La cepa UCD 67-385 fue utilizada como silvestre. En el caso de los controles de fusión se mezclaron, en igual proporción, protoplastos de las cepas indicadas y se fusionaron en ausencia de PEG.

(a), controles de fusión.

Tabla 13

Características de la cepa fusante fs-1

HPLC (R_t) ^a	1.2, 2.1, 3.4, 5.3, 7.2, 8.5, 30.5
TLC (R_f)	0.21, 0.38, 0.54, 0.69, 0.85
Velocidad de crecimiento ^b	0.04 ± 0.01
Pigmentos	Astaxantina: 285 ppm β -caroteno: 270 ppm

(a), tiempo de retención (min). (b), células por hora (n=3).

desde colonias sectorizadas, las que presentan más de un núcleo (G. Hermosilla, comunicación personal).

Por otra parte, al realizar un análisis de descendencia a partir de las colonias sectorizadas, se determinó la aparición de clones con los fenotipos parentales, sectorizados y recombinantes (tabla 14). En los descendientes, el sector que es de mayor tamaño en la colonia sectorizada, corresponde al fenotipo que aparece en el mayor número en las colonias no sectorizadas de fenotipo parental. Por otro lado, las colonias recombinantes no segregaron fenotipos parentales durante el período de estudio, mostrando ser estables fenotípicamente.

5.- Construcción de genoteca de DNA total de *P. rhodozyma*.

5.1.- Digestión parcial de DNA genómico de *P. rhodozyma*.

El análisis mediante electroforesis en gel de agarosa de los productos de la digestión parcial del DNA de *P. rhodozyma*, indicó que para obtener una óptima digestión parcial del DNA genómico fue necesario utilizar 0.2 unidades de la enzima BamHI por μg de DNA e incubar la reacción de digestión a 37 °C por 1 hr.

Tabla 14

Análisis de descendencia de colonias sectorizadas de la fusión atx3-atx6

Parental	Colonias en F1 (%)			Colonias en F2 (%)				
	No sectorizada		Sectorizada	No sectorizada		Sectorizada	Recombinante	
	atx3	atx6		atx3	atx6		Pálido	Rojo
1	96	4	0					
2	14	85	1	65.3 20	33.1 79.2	1.6 ^a 0.8 ^b	0 0	
3	nd	nd	nd	90.8 87.5	6.6 11.7	0 0	2.6 0.4	0.4
4	nd	nd	nd	51.1 82.5	47.4 16.6	0 0.6 ^a	0.75	0.75 0.3

Se analizó la descendencia en dos generaciones de cuatro colonias sectorizadas producto de la fusión de las cepas atx3-atx6 (parentales 1 a 4). Para la formación de la F1, se tomaron las colonias fusantes y se disgregaron en medio YM. Luego, las células fueron plaqueadas sobre placas con medio YM. Para la formación de la F2, se repitió el procedimiento anterior sobre las colonias sectorizadas que aparecieron en F1. Se analizaron dos colonias fusantes por línea de descendencia. Se analizó un promedio de 500 colonias por generación. Las colonias sectorizadas poseen sectores con fenotipo mayoritario para atx3 (a) o atx6 (b). n/d, no determinado.

Los productos de la digestión parcial fueron separados mediante electroforesis en gel de agarosa, seleccionados por tamaño y purificados mediante electroelución a partir de geles de agarosa o centrifugación en gradiente de sacarosa. Los fragmentos purificados se utilizaron para la construcción de genotecas en los plásmidos YCp50 y pBluescript.

5.2.- Genoteca en YCp50.

Se construyó una genoteca parcial de *P. rhodozyma* en el sitio BamHI del plásmido YCp50 siguiendo el protocolo descrito en la figura 3. El análisis de 50 colonias elegidas al azar, determinó que el tamaño de inserto promedio para este vector fue de 5 kb. Dos mil colonias Amp^r y Tc^s fueron agrupadas como se indica en Métodos (sección 7.5), luego se purificó el DNA plasmidial el cual fue utilizado en los experimentos de transformación de *P. rhodozyma*.

5.3.- Genoteca en pBluescript.

La genoteca en el sitio BamHI del vector pBluescript se construyó siguiendo el protocolo descrito en la figura 4. La figura 10 muestra el resultado de un análisis del DNA plasmidial proveniente de algunas colonias seleccionadas como portadoras de inserto según el método X-gal (Sambrook *et al*, 1989).

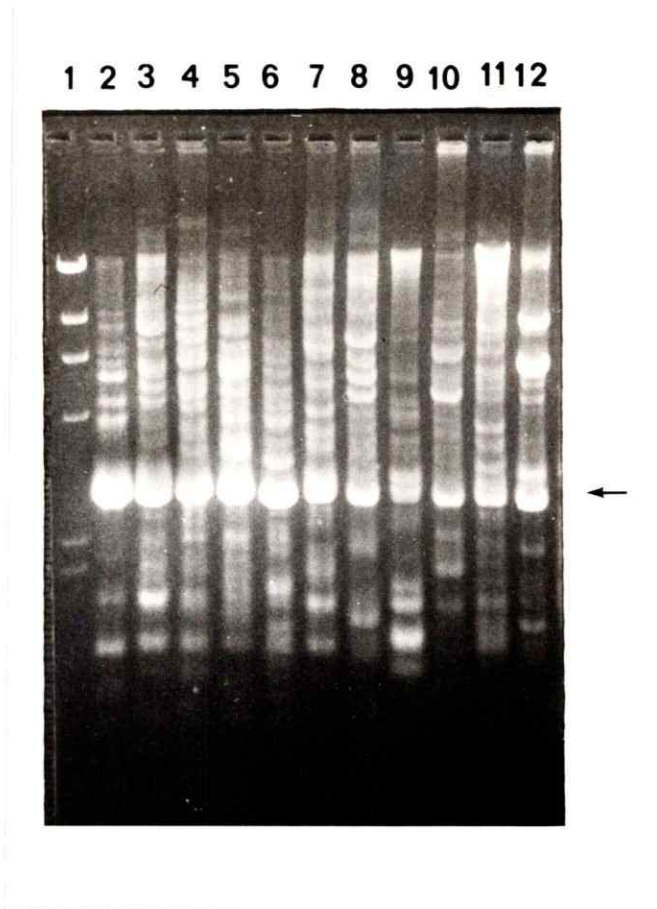


Figura 10:

Electroforesis en gel de agarosa de DNA plasmidial de la genoteca en pBluescript. Análisis de DNA plasmidial de grupos de 150 a 200 clones recombinantes de la genoteca, digeridos con BamHI. 1, DNA del fago lambda digerido con HindIII; 2 al 12, DNA plasmidial de grupos de clones recombinantes digeridos con BamHI. La flecha indica la banda correspondiente al vector pBluescript.

El análisis de DNA plasmidial realizado para determinar el tamaño de inserto promedio, indicó que en 300 de las cerca de 18.000 colonias que componen la genoteca, el tamaño de inserto promedio fue de 6.5 kb. El número de colonias obtenido, permite suponer que se tiene representado todo el DNA de *P. rhodozyma*, ya que, a partir de la ecuación de Clarke y Carbon (1976), el número de colonias necesarias para tener representado todo el DNA de la levadura con una probabilidad de un 99% es de 17.711. El cálculo anterior considera un tamaño de inserto de 6.5 Kb y un tamaño genómico total de 25 Mb (Cifuentes *et al*, 1995).

6.- Transformación de *P. rhodozyma*.

Se sometieron a transformación dos mutantes de pigmentación de *P. rhodozyma*, un mutante albino (atx3) y un mutante amarillo (atx5). La identificación de las colonias transformantes fue mediante el análisis visual de las colonias generadas a partir de las células sometidas a transformación.

6.1.- Transformación con DNA genómico lineal.

Con el objeto de establecer las condiciones experimentales para realizar la transformación genética de *P. rhodozyma*, se intentó obtener transformantes rojos a

partir de las cepas atx3 y atx5 utilizando DNA genómico fragmentado de la cepa silvestre UCD 67-385. El DNA fue fragmentado mecánicamente, mediante repetidas pasadas de la solución de DNA a través de una jeringa de 1 mL. De esta forma, se obtuvo una solución de DNA enriquecida en fragmentos de 9.4 a 4.4 Kb. En la tabla 15, se presentan los resultados obtenidos de experimentos de transformación de las cepas atx3 y atx5. Como se puede observar, ninguno de los métodos de transformación utilizados permitió detectar colonias transformantes en las colonias analizadas. De esta forma, bajo las condiciones ensayadas la frecuencia de transformación sería menor a 9×10^{-5} transformantes por colonia analizada.

6.2.- Transformación con DNA de genotecas.

Se realizaron experimentos de transformación de las cepas atx3 y atx5, utilizando DNA proveniente de las genotecas en YCp50 y pBluescript. Cada transformación fue realizada utilizando mezclas de DNA plasmidial provenientes de grupos de 150 a 200 clones bacterianos diferentes portadores de inserto de DNA genómico de la levadura.

Tabla 15

Experimentos de transformación de cepas mutantes en pigmentación con DNA genómico de la cepa silvestre

Método	Cepa	DNA ^a (μ g)	Colonias analizadas	Frecuencia de Transformación ^b
Protoplastos	atx5	30	1000	$<1 \times 10^{-3}$
		100	1200	$<8 \times 10^{-4}$
	atx3	100	1200	$<8 \times 10^{-4}$
Ac. de litio	atx5	1,2	1100	$<9 \times 10^{-4}$
		50	2000	$<5 \times 10^{-4}$
	atx3	1,2	2100	$<5 \times 10^{-4}$
		50	27500	$<4 \times 10^{-5}$
		50	40000	$<3 \times 10^{-5}$
	300	11000	$<9 \times 10^{-5}$	

En la transformación de protoplastos, las colonias que crecieron en agar sumergido fueron replicadas individualmente sobre placas con medio YM, para permitir el desarrollo de color.

(a), Además, se agregó 20 μ g de DNA de esperma de salmón. (b), transformantes por colonia analizada.

El análisis de los resultados obtenidos al transformar con toda la genoteca parcial en YCp50, indica que no fue posible obtener colonias que presentaran un fenotipo distinto a las cepas utilizadas en la transformación. Esto indicaría que probablemente en estos clones no están presentes secuencias que puedan complementar las mutaciones *atx3* o *atx5*.

Por otra parte, los resultados obtenidos de los experimentos de transformación con parte de la genoteca en pBluescript se muestran en las tablas 16 y 17, e indican que es posible la transformación de *P. rhodozyma*. Al utilizar como receptor la cepa amarilla *atx5*, que acumula β -caroteno, se logró obtener transformantes rojos que sintetizan astaxantina. Los eventos de transformación ocurrieron con frecuencias de 3.7×10^{-5} a 4.1×10^{-4} transformantes por colonia analizada o 0.3 a 3.7 transformantes por μg de DNA (tabla 16).

Por otra parte, la tabla 17 muestra los resultados de los experimentos de transformación de la cepa *atx3*, de fenotipo blanco. Como se puede observar, se logró obtener transformantes rojos con capacidad de sintetizar astaxantina, sin embargo su frecuencia fue menor que para la cepa *atx5*. En la cepa *atx3*, la frecuencia de transformación fue de 1×10^{-5} transformantes por colonia analizada (0.1 transformantes por μg de DNA).

Tabla 16

Transformación de la cepa amarilla atx5, con DNA plasmidial de la genoteca en pBluescript

Set de DNA ^a	Colonias rojas	Frecuencia de transformación (transf. / μ g DNA)
1 al 10	0	0
11	8	0.9
12	0	0
13	3	0.3
14	12	1.3
15	33	3.7
16	15	1.7
17	3	0.3
18 al 25	0	0

La cepa atx5 fue transformada con 9 μ g de DNA plasmidial, por el método de protoplastos y se analizaron cerca de 80000 colonias por experimento de transformación.

(a), cada set de DNA se compone de DNA plasmidial aislado a grupos de 150 a 200 clones de la genoteca en el plásmido pBluescript.

Tabla 17

Transformación de la cepa albina atx3, con DNA de la genoteca en pBluescript

Set de DNA ^a	Colonias rojas	Frecuencia de transformación (transformantes / μ g DNA)
1 al 11	0	0
12	1	0.1
13	0	0
14	1	0.1
15 a 17	0	0

La cepa atx3 fue transformada con 9 μ g de DNA plasmidial, por el método de protoplastos y se analizaron cerca de 90000 colonias por experimento de transformación.

(a), cada set de DNA se compone de DNA plasmidial aislado a grupos de 150 a 200 clones de la genoteca en el plásmido pBluescript.

7.- Análisis de los transformantes.

7.1.- Identidad de las colonias transformantes.

Con el objeto de determinar si las colonias transformantes eran producto de la transformación de las cepas atx3 y atx5, se les analizó su morfología celular y colonial, presencia de dsRNA y sus características de pigmentación mediante HPLC (tabla 18 y figura 11). Todos los parámetros analizados, permiten suponer que las colonias obtenidas mediante transformación son efectivamente transformantes de *P. rhodozyma* que provienen de las cepas mutantes utilizadas en los experimentos de transformación.

7.2.- Hibridación del DNA de los transformantes con pBluescript.

Con el objeto de detectar la presencia de secuencias del vector utilizado en la construcción de la genoteca, se realizaron experimentos de hibridación entre el plásmido pBluescript y el DNA genómico de las colonias transformantes rojas de *P. rhodozyma*. La figura 12 muestra el resultado de los experimentos de hibridación cuando se utilizó como sonda el plásmido pBluescript.

La sonda permitió detectar un fragmento BamHI, de aproximadamente 3.0 kb, en el DNA de las colonias transformantes rojas provenientes de la cepa atx5. Esta

Tabla 18

Características de las colonias obtenidas por transformación de las cepas atx3 y atx5 de *P. rhodozyma*

Fenotipo	Observado
Morfología celular	Células de tamaño y morfología equivalentes a la cepa silvestre.
Morfología colonial	Colonias de forma y textura equivalentes a la cepa silvestre.
dsRNA	Presencia de cuatro plásmidos de dsRNA
Pigmentación por TLC	Presencia de todos los pigmentos presentes en la cepa silvestre
Protoplastos	Todas los transformantes pueden formar protoplastos.

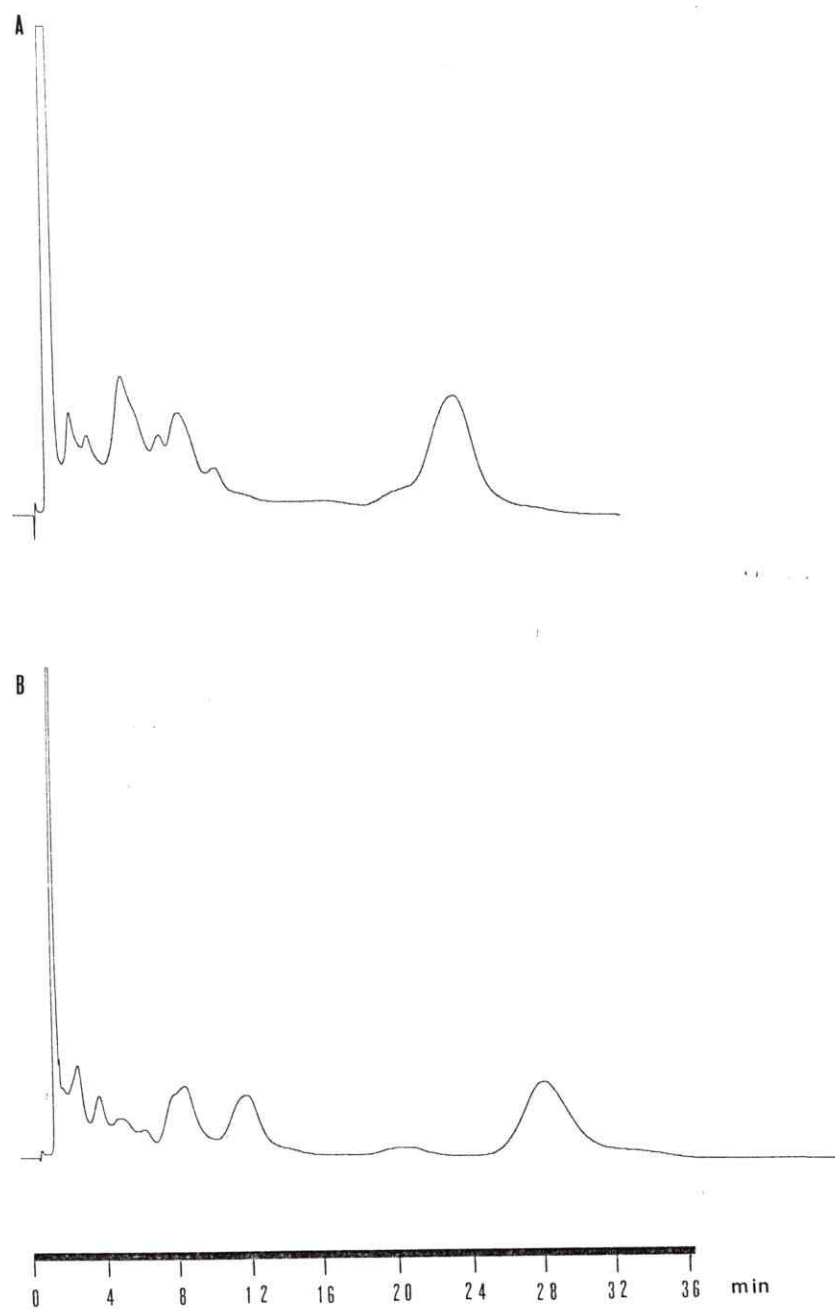


Figura 11:

Cromatograma HPLC de dos cepas transformantes rojas. El registro se realizó a 450 nm. A, transformante am10-14-2, derivado del mutante amarillo atx5; B, transformante al1-14, derivado del mutante albino atx3. Para tiempos de retención ver tabla 9.



Figura 12:

Hibridación del plásmido pBluescript contra DNA de cepas transformadas. Se analizó el DNA aislado de cepas obtenidas por transformación con la genoteca en pBluescript mediante hibridación con el plásmido marcado con α - 32 P-dCTP. El experimento se realizó en condiciones de alta estrictés. 1, DNA fago lambda digerido con HindIII. 2, pBluescript digerido con BamHI. 3, 4 y 7, DNA transformantes obtenidos de atx5, digeridos con BamHI. 5 y 6, DNA transformantes obtenidos de atx3, digerido con BamHI. 3, am10-11. 4, am10-15. 5, al1-12. 6, al1-14. 7, am10-14.4. 8, atx3 digerido con BamHI. 9, DNA *Saccharomyces cerevisiae* AB1380 digerido con BamHI.

señal de hibridación coincide con la movilidad electroforética del plásmido pBluescript linearizado con la misma enzima (2.96 Kb).

Un resultado similar se obtuvo al analizar por este método, el DNA aislado desde las colonias transformantes rojas provenientes de la cepa albina atx3. Al utilizar como controles DNA de las cepas silvestres de *P. rhodozyma* y *S. cerevisiae* no se obtuvo señal de hibridación.

7.3.- Recuperación a partir de los transformantes de *P. rhodozyma*, del vector utilizado en la construcción de la genoteca.

Con el objeto de verificar la presencia de secuencias del vector pBluescript en el genoma de los transformantes de *P. rhodozyma*, se realizaron experimentos para recuperar dicho vector. Ello se realizó mediante transformación de *E. coli* con DNA obtenido a partir de 10 transformantes rojos de *P. rhodozyma*. La tabla 19 muestra estos resultados, observándose que se obtuvieron 13 colonias bacterianas resistentes a ampicilina con el DNA proveniente de 6 de los transformantes analizados. Sin embargo, de los 13 clones, sólo dos mostraron un fenotipo incoloro que correspondería a la presencia de un inserto de DNA en el plásmido pBluescript. Todos los clones bacterianos restantes, manifiestan la presencia del plásmido pBluescript, pero el color azul desarrollado por la colonia indicaría la carencia de inserto (Sambrook *et al*, 1989).

Tabla 19

Recuperación del plásmido pBluescript a partir de los transformantes rojos de la levadura *Phaffia rhodozyma*

Transformante	Colonias Amp ^r	Fenotipo de las colonias recuperadas	Inserto (Kb)
am10-11	2	Azul	
am10-15	3	Azul	
am10-16	0		
am10-17	1	Azul	
am10-14-1	0		
am10-14-2	3	2 Azules , 1 Blanca	2.6
am10-14-3	1	Blanca	1.3
am10-14-4	3	Azul	0.12
al1-12	0		
al1-14	0		

E.coli fue transformada con el DNA genómico del transformante rojo indicado, digerido con EcoRI y ligado y luego sembrada sobre placas con medio LB suplementado con ampicilina, IPTG y X-gal. Los plásmidos obtenidos fueron sujetos a análisis de restricción para determinar la identidad del vector y el tamaño de los insertos

La presencia de plásmidos en las colonias bacterianas, se determinó mediante purificación de DNA plasmidial y su análisis mediante electroforesis en gel de agarosa. Se observó que todas las colonias poseían DNA plasmidial (figura 13). Además, este análisis demostró que el DNA plasmidial de las dos colonias blancas poseen un patrón de migración en el gel que permite suponer la presencia de un inserto. Por el contrario, el DNA plasmidial aislado desde las colonias azules, presentó una movilidad electroforética similar a la del plásmido pBluescript.

Para confirmar la identidad de los plásmidos recuperados, se procedió a realizar un análisis de restricción de los plásmidos obtenidos. En todos ellos, el mapa de restricción construido corresponde al mapa esperado para pBluescript. Además, el análisis de restricción realizado a plásmidos aislados desde las colonias bacterianas que presentaban un fenotipo azul, permitió determinar en una de ellas la presencia de un inserto pequeño. En la figura 14, se muestra el análisis de digestión realizado al DNA plasmidial aislado de la colonia bacteriana 14.4L1. Al comparar la migración del fragmento PvuII de 445 pb del plásmido pBluescript con el fragmento equivalente en el plásmido recuperado pPR14.4L1, se observa que existe una diferencia de migración en el gel que correspondería a un inserto de aproximadamente 120 pb presente en el plásmido recuperado.

El análisis de restricción realizado sobre los plásmidos recuperados desde las colonias bacterianas blancas indicó que, en ambos casos, los plásmidos rescatados corresponderían al vector pBluescript con un inserto. Los dos plásmidos

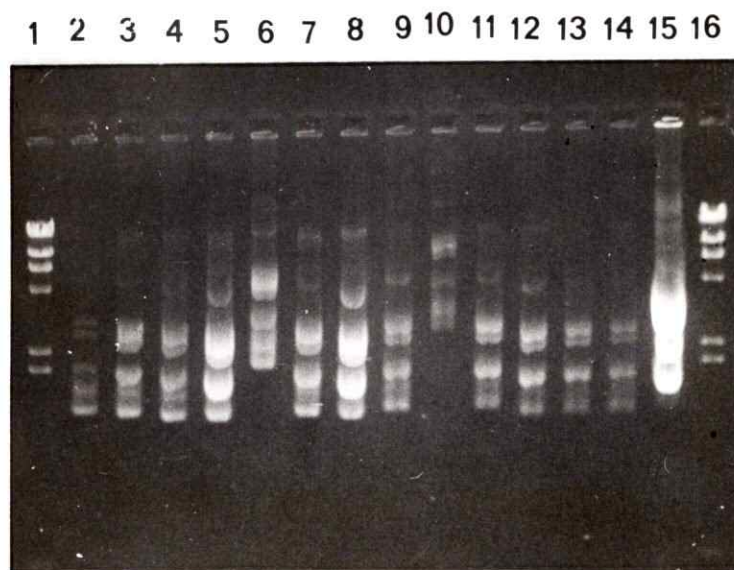


Figura 13:

Electroforesis en gel de agarosa de DNA aislado desde colonias de *Escherichia coli* transformadas con ácidos nucleicos obtenidos de transformantes rojos de *Phaffia rhodozyma*. 1 y 16, DNA del fago lambda digerido con HindIII. 2 al 14, clones recombinantes. 2, 144H2. 3, 144L1. 4, 11H1. 5, 11H2. 6, 143L1. 7, 144H1. 8, 17L1. 9, 142H1. 10, 142H2. 11, 15H1. 12, 15L3. 13, 15H2. 14, 15L1. 15, pBluescript.

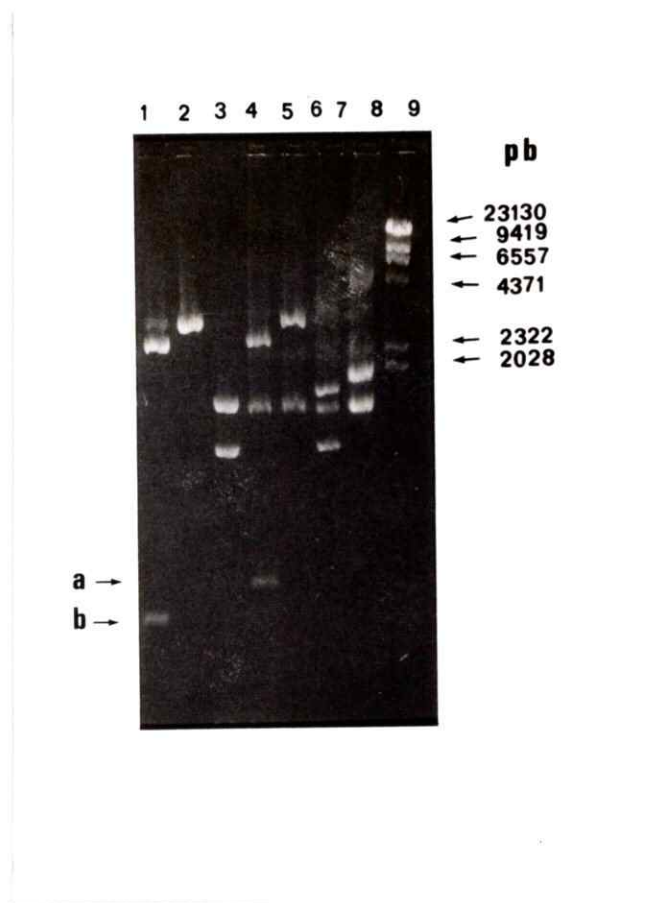


Figura 14:

Electroforesis en gel de agarosa de los productos de digestión con enzimas de restricción de los plásmidos pBluescript y pPR144L1. 1 al 3, pBluescript digerido con PvuII, BamHI y BglI respectivamente. 4 al 7, pPR144L1 digerido con PvuII, BamHI y BglI respectivamente. 8, pPR144L1 sin digerir. 9, DNA del fago lambda digerido con HindIII. a y b indican la diferencia de migración del fragmento PvuII que contiene el fragmento de múltiples sitios de clonamiento de pBluescript.

recuperados, pPR14.2H2 y pPR14.3L1, tienen un inserto de 2.6 y 1.3 kb respectivamente (tabla 20 y figuras 15 y 16).

7.4.- Hibridación de DNA desde colonias rojas transformantes con el fragmento BamHI de 2.6 Kb del plásmido pPR14.2H2.

Se realizaron experimentos de hibridación para determinar el origen del fragmento de 2.6 Kb presente en el plásmido pPR14.2H2. La figura 17 muestra los resultados de la hibridación del DNA genómico de los transformantes de *P. rhodozyma* con el fragmento BamHI de 2.6 Kb del plásmido pPR14.2H2 utilizado como sonda. Para ello, se digirió con BamHI el DNA genómico de los transformantes am10-14-2 y am10-14-3 de la cepa atx5 y de la cepa silvestre UCD 67-385. Como se aprecia en la figura, la sonda utilizada reconoce un fragmento de 2.5 a 3.0 Kb en todas las cepas examinadas. El resultado permite suponer que el inserto recuperado desde la cepa transformante roja corresponde a un fragmento presente en el genoma de *P. rhodozyma*.

8.- Hibridación heteróloga con genes de carotenogénesis de *Neurospora crassa*

En la tabla 21, se presenta un resumen de los experimentos de hibridación realizados para determinar la presencia de secuencias homólogas a los genes *al-1*

y *al-3* de *N. crassa* en *P. rhodozyma*. Según estos resultados, existiría homología molecular entre el gen *al-3* que cataliza la formación de fitoeno en *N. crassa* y DNA genómico de *P. rhodozyma*. Por el contrario, el gen que codifica para la enzima fitoeno deshidrogenasa en *N. crassa* (*al-1*) no reconoce fragmentos homólogos en el genoma de la levadura.

Tabla 20

Análisis de restricción de plásmidos recuperados desde las colonias transformantes rojas

A) Plásmido pPR14.3L1

Enzima	Fragmentos (Kb)	Enzima	Fragmentos (Kb)
EcoRI	n/c	EcoRV	4.2
PstI	n/c	XbaI	4.2
SmaI	n/c	AvaI	1.0, 3.2
HindIII	4.2	EcoRV + BglII	0.1, 4.1
SalI	4.2	EcoRV + AvaI	1.0, 3.2
HincII	4.2	KpnI + AvaI	1.0, 3.2
BamHI	4.2	XbaI + BglII	1.1, 3.1
BglII	4.2	XbaI + AvaI	0.2, 1.0, 3.0
KpnI	4.2	BglII + AvaI	0.1, 0.9, 3.2

B) Plásmido pPR14.2H2

Enzima	Fragmentos (Kb)	Enzima	Fragmentos (Kb)
EcoRI	5.6	BglII + HincII	0.3, 0.37, 0.4, 0.5, 0.93, 3.0, 0.07 ^a
AvaI	5.6	BamHI + BglII	1.0, 1.6, 3.0
BglII	5.6	BamHI + XbaI	2.6, 3.0
KpnI	5.6	AvaI + EcoRI	5.6
XbaI	5.6	BglII + KpnI	1.6, 4.0
BamHI	2.6, 3.0	BglII + XbaI	1.0, 4.6
SalI	0.3, 0.4, 4.9	KpnI + XbaI	2.6, 3.0
HincII	0.3, 0.37, 0.5, 1.3, 3.0, 0.07 ^a		

1 a 5 µg de DNA plasmidial fueron digeridos con las enzimas de restricción indicadas y los fragmentos generados fueron separados mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.7 a 1.0%. (a), fragmento determinado por análisis de secuenciación (León, R. comunicación personal). n/c, no digiere.

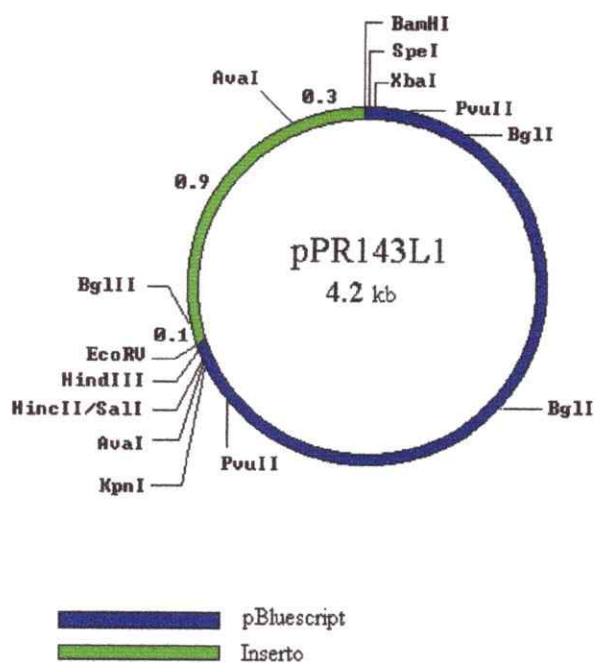


Figura 15:

Mapa de restricción del plásmido pPR14.3L1. Las distancias entre los sitios de restricción del inserto están en kb. Los sitios de restricción del fragmento correspondiente al plásmido pBluescript no están a escala.

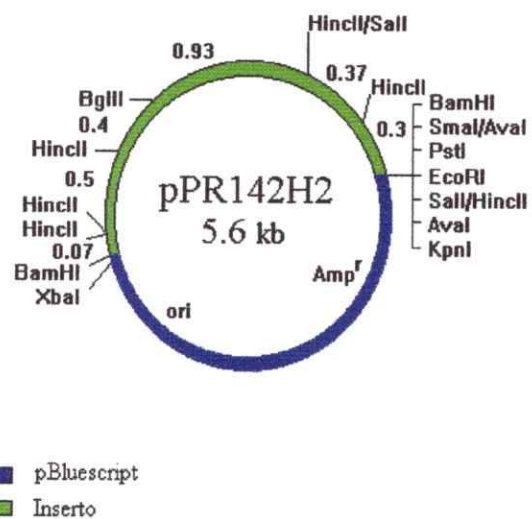


Figura 16:

Mapa de restricción del plásmido pPR14.2H2. Las distancias entre los sitios de restricción del inserto están en kb. Los sitios de restricción del fragmento correspondiente al plásmido pBluescript no están a escala.

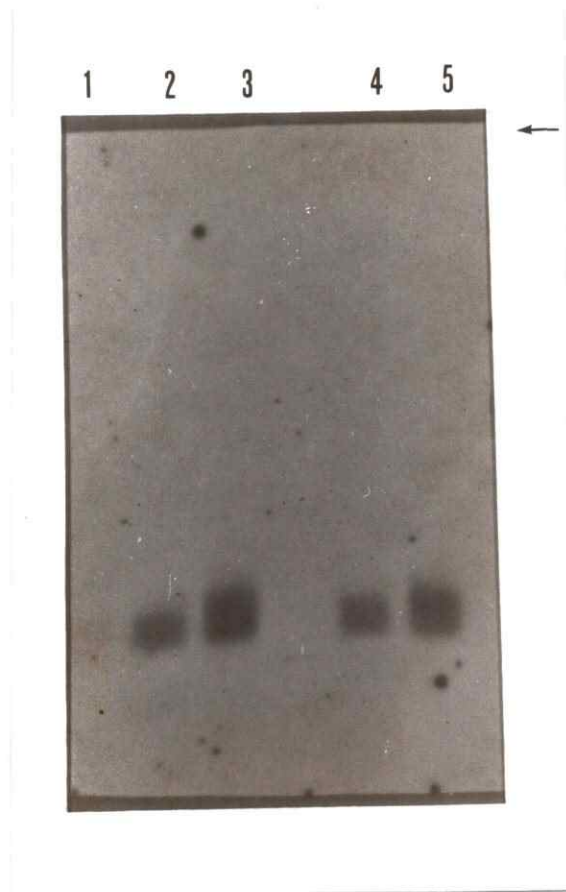


Figura 17:

Hibridación de DNA de transformantes rojos de *Phaffia rhodozyma* con el fragmento BamHI de 2.6 kb del plásmido pPR142H2. Todas las muestras de DNA están digeridas con BamHI. 1, pBluescript. 2, Transformante am10-14-3. 3, Transformante am10-14-2. 4, atx5. 5, UCD 67-385. La flecha indica el origen de migración.

Tabla 21

Hibridación de genes de carotenogénesis de *Neurospora crassa* con *Phaffia rhodozyma*

Fitoeno deshidrogenasa (<i>al-1</i>)		geranil geranil pirofosfato sintetasa (<i>al-3</i>)	
DNA Blanco	Hibridación	DNA Blanco	Hibridación
pBSal-1 (10 ng)	+	pBSal-3 (10 ng)	+
<i>P. rhodozyma</i> (12 µg)	-	<i>P. rhodozyma</i> (10 µg)	+
<i>N. crassa</i> (12 µg)	+	<i>N. crassa</i> (12 µg)	+
fago lambda (80 ng)	-	fago lambda (80 ng)	-
		pNC39 (15 ng)	+

Las hibridaciones fueron realizadas en condiciones medias de estrictez¹. Los plásmidos pBSal-1 y pBSal-3 corresponden a los plásmidos generados al subclonar los genes albino *al-1* y *al-3* de *N. crassa* en pBluescript. Los números entre paréntesis indican la cantidad de DNA utilizada en la electroforesis.

¹ Según Boletín Técnico para membranas de nylon, Gibco-BRL.

DISCUSION

Mutagénesis en *Phaffia rhodozyma*.

La frecuencia de aparición de mutantes alterados en pigmentación inducidos por tratamiento con NTG y radiación UV fue similar en las dos cepas silvestres analizadas (Tabla 4). Sin embargo, la frecuencia de obtención de mutantes que no producen astaxantina fue considerablemente mayor en la cepa silvestre UCD 67-383 que en la cepa silvestre UCD 67-385 (Tabla 5). Al comparar el número de este tipo de mutantes, se observa que la cepa silvestre UCD 67-383 produce, en promedio, 5 a 6 mutantes albinos y 4 a 5 mutantes amarillos por experimento de mutagénesis realizado. Por el contrario, la cepa silvestre UCD 67-385 produce, en promedio, menos de 1 mutante de ambos tipos por experimento de mutagénesis. Además, a partir de esta última cepa no fue posible obtener mutantes nulimórficos para la síntesis de astaxantina mediante experimentos de mutagénesis en un paso (tabla 7). Para obtener mutantes de este tipo fue necesario someter a la cepa UCD 67-385 a tratamientos mutagénicos más severos, mutagenizando varias veces el mismo cultivo o bien, mutagenizando cepas alteradas en pigmentación obtenidas en tratamientos mutagénicos anteriores (tabla 7).

La diferencia entre ambas cepas silvestres en relación a su respuesta al tratamiento mutagénico, puede significar diferencias a nivel del control genético de la síntesis de pigmentos, en los mecanismos de reparación al daño producido por la radiación UV o en diferencias a nivel de la organización genética de ambas. En este sentido, la no obtención de mutantes auxótrofos a partir de la cepa UCD 67-385 permite suponer que dicha cepa posee una ploidía mayor a uno, lo cual implicaría que el número de colonias que se analizaron para auxotrofia fueron menor a la frecuencia de obtención de mutantes de ese tipo.

Desde el punto de vista de su pigmentación, la cepa silvestre UCD 67-383 posee un patrón de pigmentos en TLC más complejo que la cepa UCD 67-385 debido a la presencia de un pigmento rojo más polar que astaxantina. Este pigmento posee un R_f de 0.0 y representa cerca del 40% del total de pigmentos presentes en dicha cepa (tabla 7). Su movilidad cromatográfica permite suponer que dicho pigmento puede corresponder a un paso posterior a la síntesis de astaxantina o a un producto modificado de ella.

El análisis de otras características fenotípicas en estas dos cepas silvestres indica que ellas poseen diferencias en varios otros aspectos. La cepa UCD 67-383 posee una mayor sobrevivencia al tratamiento con radiación UV y NTG (León *et al*, 1995) y posee una velocidad de crecimiento significativamente mayor que la cepa UCD 67-385 (tabla 8). Además, observaciones realizadas al microscopio electrónico en ambas cepas indican que la cepa UCD 67-383 posee una pared celular más gruesa (Castillo, A. comunicación personal). Esto puede ser la principal razón de la imposibilidad de formar protoplastos en

esta cepa mediante tratamiento con Novozyma 234, Bio-glucanasa, Bio-xylanasa, Bio-celulasa, β -glucoronidasa, lisozima o Zimoliasa (Hermosilla *et al*, 1995). Por otra parte, ambas cepas difieren en parámetros tales como sensibilidad a antibióticos (Cifuentes *et al*, 1993), morfología celular y colonial.

En atención a lo anteriormente expuesto, es posible suponer que las diferencias fenotípicas entre las dos cepas analizadas sean producto de diferencias a nivel de su organización genética. En *P. rhodozyma*, el polimorfismo cromosómico encontrado (Nagy *et al*, 1994., Adrio *et al*, 1995., Cifuentes *et al*, 1995) asociado a un polimorfismo en RAPD (Varga *et al*, 1995), permite suponer que las diferentes respuestas a la radiación UV, entre las cepas silvestres analizadas, puede ser resultado de diferentes grados de ploidía entre ellas.

Mutantes en pigmentación de *Phaffia rhodozyma*.

Los experimentos de mutagénesis con radiación UV y NTG permitieron obtener sobre 150 cepas que presentaron una coloración distinta a la cepa silvestre (tabla 2). Todas las cepas analizadas presentaron una alta estabilidad fenotípica sin producir revertantes en varias generaciones (Resultados, sección 2.1). Lo anterior, permite suponer que el origen de la variación fenotípica en las cepas obtenidas, se debe a una alteración genética heredable y no a cambios a nivel fisiológico, ya que los últimos procesos ocurren en una escala de tiempo corto, menor o comparable al tiempo generacional, y no son heredables.

El análisis mediante TLC de los mutantes obtenidos permitió determinar la presencia de al menos seis clases fenotípicas (tabla 3). Los análisis realizados en algunos mutantes de cada clase, mediante HPLC y cuantificación de pigmentos, apoyan la existencia de estas clases fenotípicas, las que podrían ser el resultado de mutaciones en genes que controlan la carotenogénesis en *P. rhodozyma* (figura 8 y tablas 8 y 9). El análisis de pigmentos presentes en mutantes de carotenogénesis obtenidos por Girard *et al*, 1994, coincide con estas clases.

Además de los mutantes descritos, se obtuvieron mutantes que presentaron una leve variación de color en relación a la cepa parental y colonias sectorizadas (tabla 2). El análisis de los pigmentos presentes en las variantes de coloración, indicó que contenían todos los pigmentos presentes en la cepa parental, pero en distintas proporciones. Estas

cepas podrían originarse por variación en el número de copias de genes estructurales responsables de la síntesis de pigmentos o mutaciones en genes que poseen un efecto indirecto en la carotenogénesis, como por ejemplo aquellos relacionados con la ubicación intracelular de los pigmentos o la unión de las enzimas biosintéticas a membranas.

Por otra parte, las cepas sectorizadas mantuvieron establemente el color de cada sector luego de replicar dichos sectores. La naturaleza de la mutación que origina este fenotipo no ha sido determinada. Es posible suponer que en dichas colonias han ocurrido alteraciones en la mitosis, producidas por ejemplo por fenómenos de no-disyunción o por pérdida aleatoria de cromosomas, las que generarían células con núcleos diferentes, los cuales al segregarse producen el fenotipo sectorizado (Finchan & Day, 1971). Además, las colonias sectorizadas pueden haberse originado mediante eventos de recombinación mitótica y posterior segregación de cromosomas (Griffiths *et al*, 1993). De esta forma, la aparición de colonias sectorizadas apoyaría la hipótesis de un grado de ploidía mayor a uno en la cepa UCD 67-385.

Los mutantes obtenidos que no producen astaxantina en *P. rhodozyma* fueron de dos clases, albinos o amarillos (tabla 3). El análisis de pigmentos indica que estas clases acumulan fitoeno o β -caroteno, respectivamente. Este resultado permite suponer que estas cepas estarían alteradas en genes estructurales que codifican por enzimas necesarias para la modificación de dichos compuestos.

Por otra parte, aquellas clases de mutantes que poseen una concentración total de pigmentos que es significativamente distinta a la cepa parental, se diferencian entre sí en

la concentración y proporción de los pigmentos que se encuentran en mayor cantidad (tablas 3 y 8). Debido a que estas cepas no acumulan pigmentos, es posible que ellas se encuentren alteradas a nivel de genes regulatorios que controlan el flujo de parte, o toda, la vía de síntesis de pigmentos en esta levadura.

Análisis genético parasexual.

La imposibilidad de realizar un análisis genético clásico mediante cruzamientos en esta especie debido a que no se conocía su ciclo sexual que permitiera dicho análisis, hizo necesario la implementación de técnicas parasexuales de estudio. Este tipo de herramientas ha sido fundamental para el análisis de especies de difícil estudio en las cuales no se conoce su fase perfecta, como es el caso de *Candida*, en la cual se han establecido aspectos básicos de su biología, genética y patogenicidad. (Shepherd *et al*, 1995). De esta forma, el análisis parasexual realizado en *P. rhodozyma* permitió conocer aspectos relevantes de su carotenogénesis, al facilitar la recombinación entre genomas de distintas cepas mutantes mediante fusión de protoplastos, y la inserción de fragmentos de DNA de la cepa silvestre en el genoma de cepas mutantes mediante transformación. El análisis de los resultados de dichos experimentos pueden ser interpretados en términos genéticos como homólogos a una recombinación mediante sexualidad.

Los análisis genético parasexual realizados en el presente trabajo, fusión de protoplastos y transformación genética, se realizaron a partir de mutantes derivados de la cepa silvestre UCD 67-385 de *P. rhodozyma*. Esto se debió principalmente a que la cepa silvestre UCD 67-383 no forma protoplastos bajo las condiciones ensayadas y su patrón de pigmentos es más complejo que la cepa UCD 67-385.

- Fusión de protoplastos.

El análisis de pigmentación de colonias obtenidas a partir de experimentos de fusión de protoplastos, permite reconocer la aparición de fenotipos de tipo parental y recombinante. El fenotipo de pigmentación de las colonias de tipo recombinante fueron de dos tipos: sectorizadas o de fenotipo silvestre (tablas 12 y 13). Ambos tipos de fusantes pueden ser explicados como heterocariones, que en el caso de las colonias que se sectorizan corresponderían a eventos de segregación nuclear. Sin embargo, los recombinantes de fenotipo silvestre presentaron una alta estabilidad fenotípica, sin producir colonias revertantes o sectorizadas en varias generaciones de cultivo.

El análisis de los pigmentos presentes en la cepa fusante fs-1 indica que en ella se encuentran funcionales todos los genes necesarios para la síntesis de astaxantina lo cual permite el reestablecimiento de la condición silvestre para dicho fenotipo. Sin embargo, debido a que la cantidad de pigmentos en la cepa fusante fs-1 es mayor que en la cepa silvestre, dicho fusante mantendría parte de la condición sobreproductora presente en sus parentales atx5 y atx6, y en el progenitor de ellos (atxS1).

La alta estabilidad fenotípica de las colonias fusantes con fenotipo silvestre podría indicar que dichas cepas son producto de un evento de recombinación entre los genomas de ambos parentales. De esta forma las colonias que se generaron al fusionar las cepas atx5 y atx6 o las cepas atxS1 y atxS2, tendrían un sólo núcleo por célula y no podrían generar colonias con fenotipo parental. Esto ha sido confirmado al realizar análisis de número de

núcleos en ambos tipos de fusantes (Hermosilla, G., comunicación personal). Por ejemplo, según dichos estudios, el análisis citológico de la cepa fs-1 indica que ella posee un sólo núcleo por célula, a diferencia de los fusantes que se sectorizan los cuales presentan dos a más núcleos por célula (Hermosilla, G., comunicación personal).

Por otra parte, tanto al fusionar cepas entre si mismas como al intentar fusión entre cepas distintas pero sin PEG, no se obtuvo colonias con un fenotipo distinto a los parentales. Esto permite concluir que la aparición de colonias con fenotipos nuevos, son producto de la fusión de protoplastos (tabla 12).

Experimentos de este mismo tipo realizados entre distintas cepas albinas no permitieron obtener colonias con fenotipo pigmentado. Sin embargo, la falta de marcadores genéticos, tal como auxotrofias o resistencia a antibióticos en las cepas sometidas a fusión, no permiten asegurar fusión entre ellas.

La aparición del fenotipo silvestre en las colonias fusantes apoya la hipótesis de que los alelos definidos por los mutantes atx3, atx5, atx6, atxS1 y atxS2, poseen un comportamiento recesivo en relación a sus respectivos alelos silvestres (tablas 12 y 14).

- Transformación de *Phaffia rhodozyma*.

Con el objeto de establecer un sistema eficiente para el clonado de genes de carotenogénesis en esta levadura, se intentó establecer las condiciones óptimas para la

transformación genética de mutantes en pigmentación. Para ello, se ensayaron los dos métodos de transformación más utilizados para tal objetivo en hongos, transformación de protoplastos (Hinnen et al, 1978) y transformación por el método del acetato de litio (Ito et al, 1983). Estos métodos poseen frecuencias de transformación en *S. cerevisiae* de 2×10^5 y 1×10^4 transformantes por μg de DNA, respectivamente (Gietz & Woods, 1994).

Debido a que no se obtuvieron mutantes auxótrofos no fue posible el desarrollo de un sistema de selección directa de transformantes por complementación de genes para requerimientos nutricionales. Por dicho motivo, el establecimiento de las condiciones para los experimentos de transformación se realizó utilizando cepas nulimórficas para la síntesis de astaxantina y selección de transformantes por cambio de color.

En *P. rhodozyma*, el método del acetato de litio permite el análisis visual de un mayor número de colonias que en el caso de transformación de protoplastos, debido a que este último método requiere del sembrado de los protoplastos en agar sumergido para mantener las condiciones osmóticas (Gietz & Woods, 1994). Sin embargo, en *P. rhodozyma* ello impide la coloración de las colonias por la falta de oxígeno, por lo cual todas las colonias que crecieron en tales condiciones debieron ser traspasadas a superficie para permitir el desarrollo de color (tabla 15). Con el objeto de poder analizar un número mayor de células sometidas a transformación por el método de los protoplastos, se introdujeron modificaciones al protocolo original. De esta forma, los protoplastos fueron sembrados utilizando un volumen mínimo de agar fundido, lo cual permitió el paso de oxígeno a las células y por lo tanto, el desarrollo de color sin alterar la viabilidad de los protoplastos.

Sin embargo, a pesar de lo simple que resulta ser el método para reconocer las colonias transformadas, por la falta de un método de selección directa que impida la multiplicación de aquellas células que no fueron transformadas y considerando que el número potencial de unidades formadoras de colonias que fueron sometidas a transformación es del orden de 10^6 a 10^7 , no fue posible analizar todos los potenciales transformantes. De esta forma, el número máximo de colonias que se analizaron por transformación representa un pequeño porcentaje de las potenciales unidades formadoras de colonias sometidas a transformación. Estos porcentajes se sitúan entre 1.5%¹ en el caso de transformación de protoplastos, y un 0.25% en el caso de transformación por el método del acetato de litio.

Al intentar transformar con DNA lineal proveniente de la cepa silvestre cepas bloqueadas en la síntesis de pigmentos, ya sean albinas o amarillas, no fue posible detectar colonias rojas transformantes con ninguno de los dos métodos ensayados y en los rangos de cantidad de DNA utilizados (tabla 15). Sin embargo, como se indicó anteriormente, no es teóricamente posible descartar la ocurrencia de transformación debido al bajo porcentaje de colonias analizadas que fueron sometidas a transformación. Además, se debe considerar que la frecuencia de transformación mediante integración en levaduras es baja, siendo del orden de 1 a 10 transformantes por μg de DNA (Cifuentes, 1991) y este valor es menor aún al transformar con DNA genómico linearizado.

Por otra parte, al intentar transformar las cepas mutantes *atx3* y *atx5* con agrupaciones de plásmidos recombinantes provenientes de la genoteca de la cepa silvestre UCD 67-385,

¹ De los protoplastos que regeneran.

construida en el plásmido pBluescript, se demostró la aparición de colonias rojas en frecuencias de 0.1 a 3.7 transformantes por ug de DNA (tablas 16 y 17).

El análisis fenotípico de las colonias rojas permitió determinar que ellas corresponden a variantes en pigmentación de las cepas sometidas a transformación (tabla 18 y figura 11). Además, el análisis molecular mediante hibridación de DNA, demostró la presencia del vector pBluescript en el genoma de varias de las colonias rojas transformantes (figura 12).

Debido a que el vector utilizado para la construcción de la genoteca no posee secuencias que permitan su replicación autónoma en hongos, el evento de transformación más probable en *P. rhodozyma* debió ser por integración homóloga. En 6 de 10 transformantes rojos, se logró recuperar el plásmido pBluescript utilizado en la construcción de la genoteca (tabla 19 y figuras 12 y 13). La recuperación del vector de clonado (pBluescript) en *E. coli* indica que es muy probable que la transformación en *P. rhodozyma* ocurriera por integración del plásmido recombinante en el genoma de la levadura.

El análisis de restricción realizado en los plásmidos rescatados confirma dicha hipótesis y además, permitió identificar en tres clones la presencia de insertos de tamaños de 0.12, 1.3 y 2.6 kb (tabla 20). El análisis del mapa de restricción de dos plásmidos rescatados con inserto, pPR14.2H2 y pPR14.3L1, permite suponer la ocurrencia de eventos de integración múltiple en el genoma de esta levadura. La figura 15, presenta el mapa de restricción del plásmido pPR14.3L1. Este plásmido no presenta sitios de restricción para la enzima EcoRI, lo cual implicaría que dicho sitio se habría perdido durante el proceso de recuperación del plásmido desde la colonia roja transformante. Además, presenta un

sólo sitio para la enzima BamHI, lo cual corresponde a lo esperado para un evento de integración del plásmido transformante en el genoma de la levadura (figura 18).

El mapa de restricción del plásmido pPR14.2H2 se presenta en la figura 16 y posee varias características relevantes. A diferencia del plásmido anterior, éste presenta el sitio EcoRI esperado de acuerdo al protocolo seguido para su recuperación a partir de la colonia roja transformante, sin embargo, dicho plásmido presenta dos sitios para la enzima BamHI y además, muy cercanos a uno de ellos sitios para las enzimas SmaI, AvaI y PstI, lo cual sugiere que ocurrió un evento de integración múltiple o co-integración durante el proceso de transformación de la cepa atx5 (figura 19). En relación a esto, existe evidencia en eucariontes que cuando la transformación ocurre por integración, una co-integración de vectores en el genoma puede alcanzar altas frecuencias (Riggs & Bates, 1986).

El alto número de vectores de clonado sin inserto, recuperados desde las cepas transformadas, y la falta de homología entre los mapas de restricción de los plásmidos que poseen inserto, permiten suponer la ocurrencia de rearrreglos en el genoma de *P. rhodozyma*. Estos pueden ser producto del evento de integración, o bien, que las secuencias del vector integradas en el genoma de la levadura pudieran servir como región de homología para la integración de plásmidos sin inserto presentes en el conjunto de plásmidos recombinantes que se utilizó para la transformación. Este tipo de fenómenos ha sido ampliamente estudiado en hongos, en donde se ha determinado que ambos procesos pueden ocurrir en frecuencias de hasta un 95% (Aleksenko, 1994., Bükner *et al*, 1992).

La presencia del vector utilizado para la construcción de la genoteca en los transformantes rojos de *P. rhodozyma*, su posterior recuperación y la homología detectada entre el inserto BamHI de 2.6 kb y el DNA genómico de la levadura (figura 17), son pruebas concluyentes de que dichas cepas corresponden a transformantes y por lo tanto permiten descartar un evento del tipo reversión.

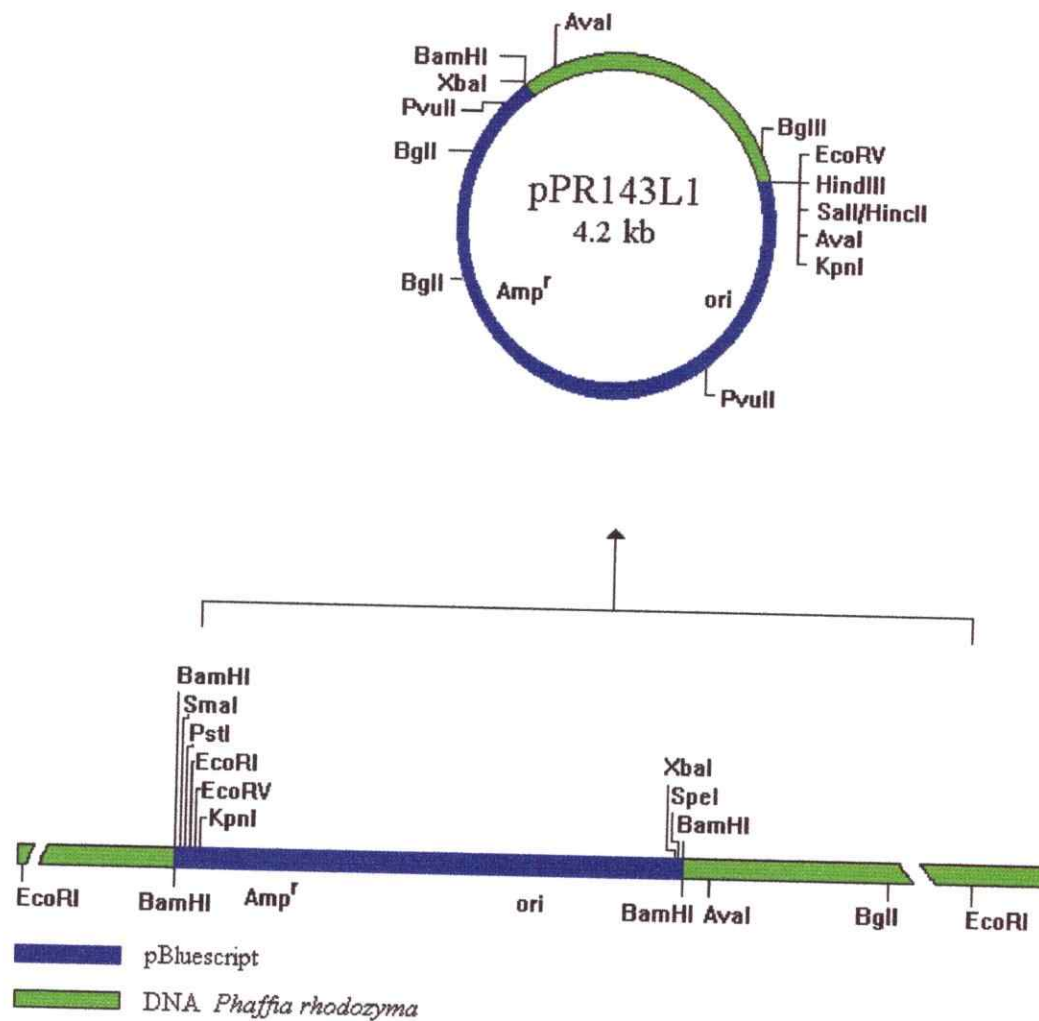


Figura 18:

Esquema de recuperación del plásmido pPR14.3L1 a partir del genoma de la cepa transformante roja am10-14-3. Se indica la distribución relativa de los sitios de restricción del vector pBluescript y del fragmento clonado de 1.3 kb.

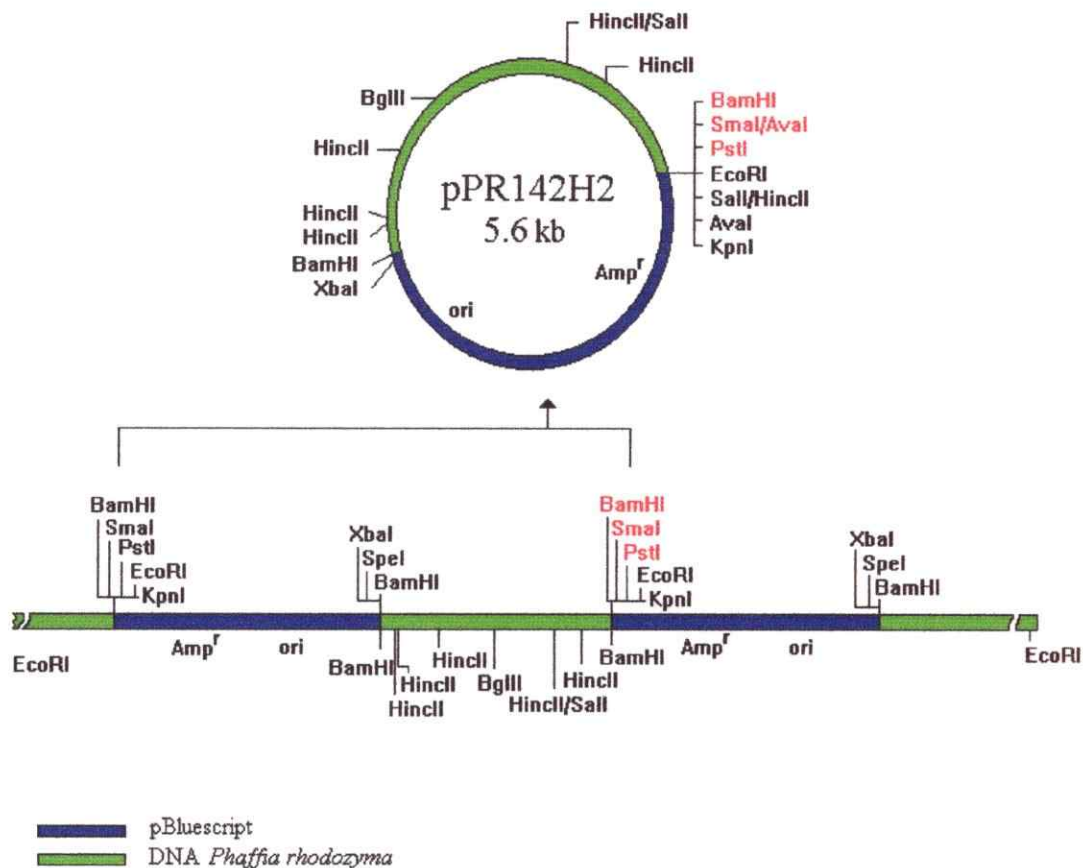


Figura 19:

Esquema de recuperación del plásmido pPR14.2H2 a partir del genoma de la cepa transformante roja am10-14-2. Se indica la distribución relativa de los sitios de restricción del vector pBluescript y del inserto de 2.6 kb. En rojo, se destacan los sitios de restricción pertenecientes al fragmento de múltiples sitios de clonamiento que pertenecen al plásmido pBluescript integrado a una distancia de 2.6 kb del replicón recuperado.

Carotenogénesis en *Phaffia rhodozyma*.

Como parte de su metabolismo secundario, los carotenoides en *P. rhodozyma* son metabolitos no indispensable para la viabilidad de la levadura a pesar del papel que ellos tendrían como agentes protectores al daño oxidativo (Schroeder & Johnson, 1993). Evidencia de ello es la obtención de mutantes albinos en esta levadura (tablas 2, 3, 7, 8 y 9., Girard *et al*, 1994). Desde el punto de vista de su biosíntesis, los resultados obtenidos a partir de experimentos de hibridación con genes de carotenogénesis de *N. crassa* (tabla 21) permiten suponer que, al igual que en otros sistemas carotenogénicos, *P. rhodozyma* posee similitud en algunos de los pasos iniciales de dicha vía.

Los mutantes en carotenogénesis obtenidos en el presente estudio pueden ser definidos en tres tipos, según la función del gen que ellos tendrían afectado: mutantes en genes que participan en procesos que no están directamente relacionados con la formación de los carotenoides, mutantes en genes estructurales y mutantes en genes regulatorios (Luckner, 1990).

Algunos de los procesos celulares que podrían tener una participación indirecta en la carotenogénesis son aquellos relacionados con la ubicación intracelular de los pigmentos, la unión y arreglo espacial de las enzimas de la ruta biosintética y el transporte de metabolitos necesarios para la síntesis de carotenoides. Dichos procesos poseen un componente genético que hace posible suponer que alteraciones en genes que los controlan, deben también afectar la carotenogénesis. Por lo tanto, mutaciones en estos

genes podrían ser una explicación del alto porcentaje de mutantes observados que presenta un fenotipo de pigmentación levemente distinto a la cepa parental (tabla 2).

Los mutantes en genes estructurales corresponderían a aquellas cepas que no sintetizan astaxantina y presentan acumulación de pigmentos intermediarios de la ruta de síntesis. En esta categoría se deben clasificar aquellos mutantes pertenecientes a las clases fenotípicas I (albino), II y III (amarillos) (tabla 3). De esta forma, el mutante albino *atx3*, derivado de la cepa silvestre UCD 67-385 y que acumula fitoeno, correspondería a un alelo del gen que codifica para la enzima fitoeno deshidrogenasa en *P. rhodozyma* el cual ha sido denominado gen *atx3*. Otros alelos del gen *atx3*, estarían definidos por los mutantes albinos *atx1* y *atx2* (tablas 7 y 8). El mutante *atx2* correspondería a un mutante 'leaky', ya que si bien su fenotipo de colonia es albino, los análisis de pigmentación por TLC indican que dicho mutante sintetiza pequeñas cantidades de astaxantina (tabla 7).

Por otra parte, el mutante amarillo *atx5* que acumula β -caroteno, correspondería a un alelo del gen, denominado gen *atx5*, que codifica por una oxidasa. La enzima producto del gen *atx5* transforma β -caroteno en xantófilas. Otros alelos que pertenecerían al gen *atx5* serían definidos por los mutantes amarillos *atx4*, *atx6* y *atx7*. En este caso, también algunos mutantes son del tipo 'leaky' (*atx6* y *atx7*) que son capaces de producir xantófilas en menor proporción que la cepa silvestre (tabla 8).

Las clases fenotípicas V y VI corresponderían a mutantes en genes regulatorios. Debido a que tales mutantes se caracterizan porque el pigmento mayoritario corresponde a β -caroteno y astaxantina (*atxS2*) o astaxantina (*atxS1*) (tabla 3), es posible suponer

que dichos mutantes están afectados en genes que controlan la formación de β -caroteno (clase fenotípica V) y la formación de astaxantina (clase fenotípica VI). La presencia de un gen regulador que actuaría en las etapas iniciales de la síntesis de astaxantina, estaría definida por el mutante sobreproductor *atxS1*. El producto de dicho gen (*atxS1*), en su forma mutada, permitiría un mayor flujo de la vía de síntesis lo cual se traduce en un aumento de los niveles de β -caroteno y, como consecuencia de esto, un aumento en los niveles de astaxantina. Por otra parte, el mutante sobreproductor *atxS2*, definiría la presencia de otro gen regulador de la ruta de síntesis de astaxantina (*atxS2*), que actuaría a un nivel posterior a la etapa de formación de β -caroteno (tabla 8). El modo de regulación de la síntesis de astaxantina por el gen *atxS2* no está definido, sin embargo, a partir del fenotipo de la cepa *atxS2*, es posible suponer que el producto del gen regulador interactúe con el pigmento y reprima su síntesis. Dicho mecanismo "feedback" fue recientemente propuesto para este sistema por Schroeder y Johnson (1995), por lo cual, el mutante *atxS2* puede ser una prueba genética de la existencia de este mecanismo en la regulación de la síntesis de astaxantina en *P. rhodozyma*.

El análisis mediante fusión de protoplastos de las cepas sobreproductoras *atxS1* y *atxS2* apoya la hipótesis de la presencia de dos genes independientes que regularían la vía de síntesis de pigmentos en *P. rhodozyma*. Las colonias del tipo recombinante obtenidas mediante fusión de protoplastos complementan sus mutaciones y producen un fenotipo de pigmentación equivalente al de la cepa silvestre (tabla 12).

Por otra parte, el análisis de complementación realizados por fusión de cepas mutantes en genes estructurales evidencian complementación entre los mutantes *atx3* - *atx6* y entre los mutantes *atx5* - *atx6* (tablas 12, 13 y 14). Dichos experimentos sugieren la posibilidad de que estos mutantes correspondan a genes independientes como es esperado para la fusión entre cepas albinas y amarillas, las que estarían mutadas en el gen fitoeno deshidrogenasa (*atx3*) y la oxidasa (*atx5*). Sin embargo, debido a que no hay evidencias que permitan suponer la presencia de más de un gen en la síntesis de astaxantina a partir de β -caroteno, no es esperado la aparición de nuevos fenotipos al fusionar los mutantes que acumulan β -caroteno (*atx5* y *atx6*). Por lo tanto, no se puede descartar que la aparición de colonias fusantes con fenotipo silvestre (por ejemplo *fs-1*) se deba a un evento de complementación intragénica o, por el contrario a una recombinación intragénica, y que ambos mutantes sean alelos de un mismo gen. Además, experimentos preliminares de complementación entre extractos celulares de estas dos cepas, no muestran variación en el patrón de pigmentos producidos, medido por HPLC, lo cual permite suponer que ambas cepas estarían alteradas a nivel del mismo gen.

Los datos obtenidos hasta ahora, permiten proponer que la oxidasa que transforma β -caroteno en astaxantina sería una enzima con dos subunidades idénticas ya que el fenotipo de la cepa *fs-1* puede mejor ser interpretado como un evento de complementación a nivel de los productos de alelos del gen *atx5* que como producto de recombinación entre alelos distintos para dicho gen. Si suponemos que el genotipo de ambos parentales de dicha cepa fusante es homogéneo, excepto para el gen *atx5*, el

fenotipo de concentración de pigmentos en el fusante debiera ser equivalente a ellos o a la cepa parental de la cual provienen ambos (*atxS1*). Sin embargo, se observa que la cepa fusante posee una concentración de pigmentos que es menor a lo esperado si hubiera ocurrido recombinación intragénica entre los alelos *atx5* y *atx6*. Además, si consideramos que la enzima está formada por dos subunidades idénticas y la probabilidad de formar parte del complejo enzimático de cada una de estas subunidades es equivalente, la complementación intragénica predice la formación de un tercio de enzima activa en el fusante. La validez de esta hipótesis debe ser confirmada mediante el análisis de otros fusantes entre cepas alteradas a nivel del gen *atx5*.

En la figura 20 se propone un modelo esquemático de la ruta de síntesis de astaxantina y su relación con los genes definidos en este estudio para la levadura *P. rhodozyma*. A partir del análisis de los datos obtenidos en el presente estudio es posible proponer que la etapa de la vía que transforma β -caroteno en astaxantina estaría controlada por el producto de un solo gen, definido como *atx5*. Este gen complejo poseería ambas actividades enzimáticas necesarias para la transformación de β -caroteno en astaxantina.

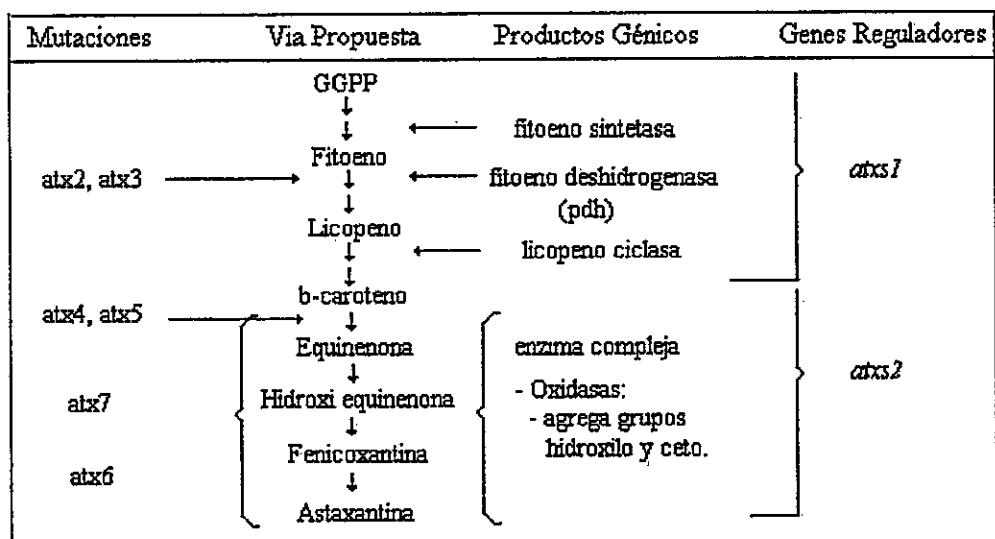


Figura 20:

Esquema del control genético de la vía de síntesis de astaxantina en *Phaffia rhodozyma*.

Proyecciones.

El análisis genético de la carotenogénesis en eucariontes y particularmente en hongos se ha desarrollado principalmente en organismos de fácil manejo experimental y con reproducción sexual, lo cual permite la utilización de técnicas clásicas de análisis. Dichos estudios han permitido conocer las etapas involucradas en la síntesis de carotenos. Sin embargo, debido a que las rutas biosintéticas presentes en dichas especies se componen principalmente de carotenoides no oxigenados, el conocimiento de la síntesis de xantófilas es aún escaso (Bramley & Mackenzie, 1988). En este sentido, la levadura *P. rhodozyma* puede ser un buen modelo de estudio ya que su sistema carotenogénico se compone mayoritariamente de xantófilas (Andrewes *et al*, 1976).

El estudio del control genético de la síntesis de carotenoides en *P. rhodozyma*, realizado en el presente trabajo, ha permitido la implementación de técnicas de análisis que conducen al desarrollo del conocimiento genético en esta especie, a pesar de la falta de la fase perfecta o sexual que facilite dicho tipo de estudios. Los mutantes obtenidos y el desarrollo de un método de transformación en esta levadura, permitirán el clonamiento de genes involucrados en carotenogénesis. La utilización como sondas de genes de carotenogénesis de otros hongos para la ubicación de genes homólogos en *P. rhodozyma*, también parece una aproximación válida para el logro de dicho objetivo, sobre todo a nivel de las primeras etapas de la vía de síntesis de carotenos.

El modelo de control genético de la carotenogénesis en *P. rhodozyma*, propuesto en este trabajo, permite orientar futuras aproximaciones experimentales al análisis de los genes que parecen ser los más relevantes en dicho proceso. En términos de la regulación de la ruta biosintética, los genes *atxS1* y *atxS2* son los primeros genes con este tipo de función, descritos en esta especie y su posterior estudio puede aportar información sobre la regulación de esta vía.

Por otro lado, el clonamiento y análisis del gen *atx5* permitirá conocer los mecanismos que regulan la expresión de genes relacionados con la síntesis de xantófilas en eucariontes inferiores. El análisis del inserto de DNA genómico de *P. rhodozyma*, presente en los vectores recuperados a partir de los transformantes de la cepa *atx5*, debería entregar información importante en tal sentido. Además, el análisis molecular de dicho gen podría aportar pruebas para determinar su complejidad e intentar predecir la función de su producto génico. Además, en términos de disponer de un sistema de análisis molecular mediante transformación genética de *P. rhodozyma*, el gen *atx5*, junto a marcadores de resistencia, puede proyectarse hacia la construcción de vectores de clonado que permitirán un fácil reconocimiento de los transformantes, debido al cambio de color de amarillo a rojo que se produce al transformar la cepa *atx5*.

Por último, el estudio realizado tiene una aplicabilidad tecnológica inmediata hacia la elaboración de nuevas estrategias de producción del pigmento astaxantina para la industria.

Conclusiones.

- 1.- El análisis y caracterización de los mutantes en pigmentación obtenidos permite postular, al menos, seis clases fenotípicas distintas. De estas, dos corresponderían a mutaciones en genes reguladores y tres a mutaciones en genes estructurales.
- 2.- Los mutantes *atx1*, *atx2* y *atx3* corresponderían a una alteración del gen definido como gen *atx3*, que codifica para la enzima fitoeno deshidrogenasa en *Phaffia rhodozyma*.
- 3.- El análisis de fusión de protoplastos indica la presencia de al menos dos genes reguladores que controlan la síntesis de astaxantina, *atxS1* y *atxS2*.
- 4.- El mutante *atxS1*, correspondería a una alteración en el gen *atxS1*. Dicho gen poseería carácter regulatorio de la vía de síntesis de astaxantina y tendría su acción en etapas anteriores a la modificación de β -caroteno. Por otra parte, el mutante *atxS2* define al gen regulatorio *atxS2*, que tendría su acción en etapas posteriores a la síntesis de β -caroteno.
- 5.- Es posible la transformación genética de *Phaffia rhodozyma*.

- 6.- La transformación genética de *Phaffia rhodozyma* habría ocurrido por integración del DNA transformante en el genoma de la levadura.
- 7.- El análisis de complementación de mutantes por medio de fusión de protoplastos, indica relaciones de dominancia de los alelos silvestres sobre los alelos mutantes generados en el presente estudio.
- 8.- Las mutaciones *atx4*, *atx5*, *atx6* y *atx7*, se habrían producido en el gen definido como gen *atx5*, que codifica por una enzima compleja la cual cataliza las reacciones que transforman β -caroteno en astaxantina.

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	
	Glucosa	2.0%
	Vogel	1X
f)	Medio mínimo MM-agar	
	Medio mínimo MM	
	Agar	2.0%

g)	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.

h)	Medio completo para <i>Neurospora crassa</i>	
	Glucosa	1%
	Extracto de levadura	2%
	Extracto de malta	0.25%
	Vogel 50X	1X
	Agar	2%
i)	Medio YEP	
	Extracto de levaduras	1%
	Peptona	2%
	Glucosa	2%
j)	Medio 5-FOA	
	Base nitrogenada de levadura sin aminoácidos	0.67%
	Glucosa	2%
	Uracilo	0.05 mg/ml
	ácido 5 fluoro orótico	0.1%
	Agar	2%

APENDICE N° 2

Soluciones.

1.- Transformación de *E.coli*:

a) Solución TfβI.

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 TfβII.

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 µg/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/ug
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	3mM
	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 ₂ EDTA, 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

5.- Soluciones para medios de cultivo

a) Vogel 25X

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

APENDICE N° 3

Marcador de tamaño molecular.

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

N° fragmento	Tamaño Molecular (kb)	Peso Molecular Megadalton
1	23.130	15.00
2	9.419	6.12
3	6.557	4.26
4	4.371	2.84
5	2.322	1.51
6	2.028	1.32
7	0.564	0.37
8	0.125	0.08

BIBLIOGRAFIA

- Adrio, J., López, M., Casqueiro, J., Fernández, C. & Veiga, M. 1995.** Electrophoretic karyotype of astaxanthin-producing yeast *Phaffia rhodozyma*. *Curr. Genet.* 27:447-450.
- Aleksenko, A. 1994.** Cointegration at transforming DNAs in *Aspergillus nidulans*: a model using autonomously-replicating plasmids. *Curr. Genet.* 26:352-358.
- An, G. & 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. & 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. & Johnson, E. 1989.** Isolation of *Phaffia rhodozyma* mutants with increased astaxanthin content. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 116-124.
- Andrewes, A., Phaff, H. & Starr, M. 1976.** Carotenoids of *Phaffia rhodozyma*, a red pigmented fermenting yeast. *Phytochem.* 15: 1003-1007.
- Armstrong, G. 1994a.** Genetic analysis and regulation of carotenoid biosynthesis. En: Anoxygenic photosynthesis bacteria: advances in photosynthesis. Ed. R. E. Blankenship, M. T. Madigan & C. E. Bauer. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Armstrong, G. 1994b.** Eubacteria show their true colors: genetics of carotenoid pigment biosynthesis from microbes to plants. *J. Bacteriol.* 176: 4795-4802.
- Armstrong, G. Alberti, M & Hearst, J. 1990.** Conserved enzymes mediate the early reactions of carotenoid biosynthesis in nonphotosynthetic and photosynthetic prokaryotes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 9975-9979.

- Avalos, J. & Cerdá-Olmedo, E. 1987. Carotenoid mutants of *Gibberella fujikuroi*. *Curr. Genet.* 11:505-511.
- Bartley, G., Schmidhauser, T., Yanofsky, C. & Scolnik, P. 1990. Carotenoid desaturases from *Rhodobacter capsulatus* and *Neurospora crassa* are structurally and functionally conserved and contain domains homologous to flavoprotein disulfide oxidoreductases. *J. Biol. Chem.* 265: 16020-16024.
- Becker, D. & Guarente, L. 1991. High-efficiency transformation of yeast by electroporation. *Methods Enzymol.* 194:182-187.
- Bejarano, E. & Cerdá-Olmedo, E. 1992. Independence of the carotene and sterol pathways of *Phycomyces*. *FEBS* 306:209-212.
- Birnboim, H. & Doly, J. 1979. A rapid alkaline procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic. Acids Res.* 3:2303-2308.
- Boeke, J., LaCrute, F. & Fink, G. 1984. A positive selection for mutants lacking orotidine-5'-phosphate decarboxylase activity in the yeast: 5-fluoro-orotic acid resistance. *Mol. Gen. Genet.* 197:345-346.
- Bramley, P. & Mackenzie, A. 1988. Regulation of carotenoid biosynthesis. En: Current Topics in Cellular Regulation. De. B. Horecker & E. Stadtman. Academic press, Inc.
- Braus, G. 1991. Aromatic amino acid biosynthesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: a model system for the regulation of a eukaryotic biosynthetic pathway. *Microbiol. Rev.* 55:349-370.
- Brückner, B., Unkles, S., Weltring, K. & Kinghorn, J. 1992. Transformation of *Gibberella fujikuroi*: effect of the *Aspergillus nidulans* AMA1 sequence on frequency and integration. *Curr. Genet.* 22:313-316.
- Calo, P., Velázquez, J., Sieiro, C., Blanco, P., Longo, E & Villa, T. 1995. Analysis of astaxanthin and other carotenoids from several *Phaffia rhodozyma* mutants. *J. Agric. Food Chem.* 43:1396-1399

- Castillo, A. & Cifuentes, V. 1994.** Presence of double-stranded RNA and virus-like particles in *Phaffia rhodozyma*. *Curr. Genet.* 26:364-368.
- Cerdá-Olmedo, E. & Torres-Martínez, S. 1979.** Genetics and regulation of carotene biosynthesis. *Pure & Appl. Chem.* 51:631-637.
- Cerdá-Olmedo, E., Fernández-Martín, R. & Avalos, J. 1994.** Genetics and gibberellin production in *Gibberella fujikuroi*. *Antonie van Leeuwenhoek* 65:217-225.
- Cifuentes, V. 1991.** Construcción de vectores de integración de *Saccharomyces cerevisiae* y su aplicación en el genoma de *Neurospora crassa*. *Bol. Micol.* 6:1-11.
- Cifuentes, V., Hermosilla, G., Martínez, C., León, R., Pincheira, G. and Jiménez, A. 1995.** Genetics and electrophoretic karyotyping of wild type and astaxanthin mutant strains from *Phaffia rhodozyma*. Enviado a *Curr. Genet.*
- Cifuentes, V., León, R. & Gómez, C. 1993.** Efecto de ketoconazol, clotrimazol, nistatina y cicloheximida sobre el crecimiento de *Phaffia rhodozyma*. *Bol. Micol.* 8:13-17.
- Cifuentes, V., Martínez, C. & Pincheira, G. 1990.** Presence of double stranded RNA in natural isolates of *Picnoporus cinnabarinus*. *Fung. Genet. Newslet.* 37:12
- Clarke, L. & Carbon, J. 1976.** A colony bank containing synthetic ColE1 hybrid plasmids representative at the entire *E. coli* genome. *Cell* 9:91
- Craft, N.E. 1992.** Carotenoid reverse-phase high-performance liquid chromatography methods: reference compendium. *Methods Enzymol.* 213:185-205.
- Chun, S., Chin, J., Bai, S. & An, G. 1992.** Strain improvement of *Phaffia rhodozyma* by protoplast fusion. *FEMS* 93: 221-226.
- De Luca, L., Adamo, S., Bhat, P., Sasak, W., Silverman-Jones, C., Akalovsky, Y., Frot-Coutaz, J., Fletcher, T. & Chader, G. 1979.** Recent development in studies on biological functions of vitamin A in normal and transformed tissues. *Pure & appl. Chem.* 51:581-591.

- Deeming-Adams, B. 1990.** Carotenoids and photoprotection in plants: A role for the xanthophyll zeaxanthin. *Biochem. Biophys. Acta* 1020: 1-24.
- Dogbo, O., Laferrière, A., D'Harlingue, A. & Camara, B. 1988.** Carotenoid biosynthesis: Isolation and characterization of a bifunctional enzyme catalyzing the synthesis of phytoene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 7054-7058.
- Fincham, J. & Day, P. 1971.** Genetic analysis based on mitosis. En: *Fungal Genetics*. Ed. J. Burnett. Blackwell Scientific Publications, Oxford. England.
- Fray, R. & Grierson, D. 1993.** Molecular genetics of tomato fruit ripening. *TIG* 9: 438-443.
- Gietz, R. & Woors, R. 1994.** High efficiency transformation with lithium acetate. En: *Molecular Genetics of Yeast* Ed. J. Johnson Oxford University Press. Oxford U.S.A. pp. 121-134.
- Girard, P., Falconnier, B., Bricout, J. & 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.
- Goodwin, T. (ed.). 1979.** Carotenoids. International Union of Pure and Applied Chemistry (Organic Chemistry Division). Contributed papers presented at the fifth International Symposium on Carotenoids. Madison. Wisconsin, USA. Pergamon Press.
- Griffiths, A., Miller, J., Suzuk, D., Lewontin, R. & Gelbart, W. 1993.** *An Introduction to Genetic Analysis*. Fifth 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.
- Harrison, D. 1986.** The biosynthesis of carotenoids. *Natural Product Reports* 7:205-215
- Hermosilla, G., León, R., Martínez, C. & Cifuentes, V. 1995.** Formación y regeneración de protoplastos en *Phaffia rhodozyma*. *Bol. Micol.* 10: En prensa.

- Hermosilla, G.** Caracterización molecular y genética del genoma de *Phaffia rhodozyma*. Tesis doctoral en desarrollo. 1995.
- Hinnen, A., Hicks, J. & Fink, G.** 1978. Transformation of yeast. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75:1929-1933.
- Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K. & Kimura, A.** 1983. Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. J. Bacteriol. 153:163-168.
- Johnson, E. & Lewis, M.** 1979. Astaxanthin formation by the yeast *Phaffia rhodozyma*. J. General Microbiol. 115: 173-183.
- Johnson, E.** 1992. New advances in astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma*. En: Profiles of Biotechnology. Ed. T. G. Villa & J. Abalde. Servicio de publicaciones Universidad de Santiago. España. pp. 289-299.
- Karnaukhov, V.** 1990. Carotenoids: recent progress, problems and prospects. Comp. Biochem. Physiol. 95b: 1-20.
- Krinsky, N.** 1979. Carotenoid protection against oxidation. Pure & Appl. Chem. 51:649-660.
- León, R., Hermosilla, G., Martínez, C. & Cifuentes, V.** 1995. Mutagénesis en *Phaffia rhodozyma*. Acta microbiol. 5:93-101.
- Lewis, M., Ragor, N., Berlant, M. & Miranda, M.** 1990. Selection of astaxanthin-overproducing mutants of *Phaffia rhodozyma* with *B*-Ionone. App. Environ. Microbiol. 56:2944-2945.
- Liaaen-Jensen, S.** 1979. Carotenoids - A chemosystematic approach. Pure & appl. Chem. 51:661-675.
- Lukner, M.** 1990. Secondary metabolism in microorganisms, plants and animals. Third revised and enlarged edition. Springer-Verlag, Berlin, Alemania.
- Martínez, C., Hermosilla, G., León, R., Urzúa, B. y Cifuentes, V.** 1995. Presencia de plásmidos de DNA de doble hebra en *Phaffia rhodozyma*. Bol. Micol. 9:25-30.

- Meyer, P. & Du Preez, J. 1994.** Photo-regulated astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* mutants. *Syst. Appl. Microbiol.* 17:24-31.
- Middleton, E. & Teramura, A. 1993.** The role of flavonol glycosides and carotenoids in protecting soybean from ultraviolet-B damage. *Plant Physiol.* 103:741-752.
- Miller, M., Yoneyama, M. and Soneda, M. 1976.** *Phaffia*, a new yeast genus in the Deuteromycotina (Blastomycetes). *Int. J. Syst. Bacteriol.* 26: 286-291.
- Moore, M., Breedveld, M. & Autor, A. 1989.** The role of carotenoids in preventing oxidative damage in the pigmented yeast, *Rhodotorula mucilaginosa*. *Arch. Biochem. Biophys.* 270:419-431.
- Nagy, A., Garamszegi, N., Vágvölgyi, C. & Ferenczy, L. 1994.** Electrophoretic karyotypes of *Phaffia rhodozyma*. *FEMS Microbiol. Lett.* 123:315-318.
- Nelson, M., Morelli, G., Carattoli, A., Romano, N. & Macino, G. 1989.** Molecular cloning of a *Neurospora crassa* carotenoid biosynthetic gene (Albino-3) regulated by blue light and the products of the white collar genes. *Molecular and Cellular Biology* 9: 1271-1276.
- Porter, J. & Spurgeon, S. 1979.** Enzymatic synthesis of carotenes. *Pure & appl. Chem.* 51:609-622.
- Pouwels, P., Engervalk, B. & Brammar, W. 1988.** Cloning vectors. En A laboratory manual (supplementary update). Elsevier, Amsterdam, Netherlands.
- Randerat, K. 1965.** Cromatografía en capa fina. Segunda edición. Ediciones Urmo, S.A. Bilbao, España.
- Riggs, C. & Bates, G. 1986.** Stable transformation of Tobacco by electroporation: evidence for plasmid concatenation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83:5602-5606.
- Rose, M., Winston, F. & Heiter, P. 1990.** Techniques and protocols. En Methods in yeast genetics: A laboratory course manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, U.S.A.

- Salgado, L. & Cerdá-Olmedo, E. 1992.** Genetic interactions in the regulation of carotenogenesis in *Phycomyces*. *Current Genetics* 21:67-71.
- Sambrook, J., Fritsch, E. & Maniatis, T. 1989.** *Molecular cloning: A laboratory manual*. Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory.
- Schroeder, W & Johnson, E. 1995.** Singlet oxygen and peroxy radicals regulate carotenoid biosynthesis in *Phaffia rhodozyma*. *J. Biol. Chem.* 270:18374-18379.
- Schaffer, H. & Sederoff, R. 1981.** *Anal. Biochem.* 115:113-122.
- Schmidhauser, T., Lauter, F., Russo, V. & 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. & Johnson, E. 1993.** Antioxidant role of carotenoids in *Phaffia rhodozyma*. *J. Gen. Microbiol.* 139:907-912.
- Shepherd, M., Poulter, R. & Sullivan, P. 1985.** *Candida albicans*: biology, genetics and pathogenicity. *Ann. Rev. Microbiol.* 39:579-614.
- Snow, R. 1966.** An enrichment method for auxotrophic yeast mutants using the antibiotic "nistatin". *Nature* 2:206-207.
- 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., Vágvolgyi, C., Nagy, Á., Pfeiffer, Y. & 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.
- Zechmeister, L. & Chohnoky, L. 1941.** *Principles and practice of chromatography*. John Wiley and Sons, Inc. (ed). Chapman and Jall, Lim. London.