

FORMACION Y REGENERACION DE PROTOPLASTOS DE *Phaffia rhodozyma*

Formation and regeneration of *Phaffia rhodozyma* protoplasts

Germán Hermosilla, Rubén León, Claudio Martínez & Victor Cifuentes

#Laboratorio de Genética, Depto de Ciencias Ecológicas, Facultad de Ciencias,
Universidad de Chile. Las Palmeras 3425, Santiago Chile

Palabras clave: *Phaffia rhodozyma*, protoplastos, astaxantina.

Key words: *Phaffia rhodozyma*, protoplasts, astaxanthin.

RESUMEN

En este trabajo se describe la preparación y regeneración de protoplastos a partir de cultivos frescos de la levadura carotenogénica *Phaffia rhodozyma*, en forma eficiente y con un alto grado de rendimiento en la sobrevivencia de las células tratadas. Para ello se han realizado una serie de experimentos para formar protoplastos de *P. rhodozyma*, utilizando tres cepas silvestres y cinco cepas afectadas en carotenogénesis. Se probó las enzimas bioglucanasa, biocelulasa, bioxilanasas, glucuronidasa, zimoliasa 100T, lisozima y novozima 234, encontrándose que novozima 234, es la que tiene mayor eficiencia. En las cepas silvestres UCD 67-210 y UCD 67-385 y las cinco cepas de color, se logra un 100% de protoplastos entre 60 a 90 minutos de tratamiento con novozima a 37°C. Sin embargo, no fue posible formar protoplastos en ninguna de las condiciones estudiadas con la cepa silvestre UCD 67-383. Tales resultados pueden ser debidos a diferencias en la pared celular entre dichas cepas. Además, se ha observado que la incubación a 37°C reduce notablemente la sobrevivencia de las células tratadas. Para la formación y regeneración de protoplastos se utilizó una serie de condiciones, encontrando que en sorbitol 0.2 M la destrucción de las células es menor que a concentraciones de sorbitol 0.8 y 1 M. Sin embargo, el medio más adecuado para la formación y regeneración de los protoplastos debe contener KCl 0.8 M como agente osmolar, manteniendo la isotonicidad del medio y logrando que la destrucción celular sea menor.

INTRODUCCION

Phaffia rhodozyma es una levadura aislada de exudados de árboles en regiones montañosas y frías de Alaska, Japón y de Rusia (Phaff y Starmer, 1989) que tiene las características

SUMMARY

In this paper we describe the preparation and regeneration of protoplasts from fresh cultures of the carotenogenic yeast *Phaffia rhodozyma*. The method is efficient and has a high protoplast survival. Several experiments were performed to obtain protoplasts from three wild type strains and five carotenogenesis mutants. The enzymes tested were bioglucanase, biocellulase, bioxyulanase, glucuronidase, zymolyase 100T, lysozyme and novozyme 234. Novozyme 234 is the enzyme with the highest yield. In wild type strains UCD 67-210 and UCD 67-385 we achieved 100% of protoplasts by incubation with novozyme 234 for 60 to 90 minutes at 37°C. However, in the wild type strain UCD 67-383 it was not possible to obtain protoplasts in either condition tested. In addition, incubation at 37°C reduces the survival of *P. rhodozyma* cells. In 0.2 M sorbitol the cellular lysis is lesser than at 0.8 and 1 M sorbitol. However, the optimal condition for protoplast formation and regeneration was an isotonic medium of 0.8 M KCl

para ser clasificada dentro de los *Basidiomycetes* (Miller, 1976). Posee la capacidad de fermentar glucosa y sintetizar carotenoides, entre éstos se observa la presencia de fitoeno, neurosporeno, licopeno, beta caroteno, equinenona, 3-hidroxi equinenona, fenicoxantina, astaxantina (3,3-didehidroB, Bcaroten-4,4-diona) y otros, siendo la astaxantina su pigmento principal (Johnson y Lewis, 1979; Johnson, 1992; Johnson et al., 1977). *P. rhodozyma* es considerada una levadura imperfecta, debido a que se desconoce su ciclo reproductivo sexual (Miller et al, 1976; Kregervan Rij, 1989). Desde el punto de vista taxonómico, *P. rhodozyma*, es una especie única que pertenece a la clase *Deuteromycotina* y al género *Phaffia* (Miller et al., 1976). Este género, se caracteriza

*: Financiado por el proyecto Fondecyt 1930886.#: A quien dirigir la correspondencia.

por la formación de pigmentos caretonoides, la producción de compuestos amiloides, la presencia del sistema Q10 y la facultad de fermentar azúcares (Yamada & Kawasaki, 1989). Además, presenta características tales como pared celular multicapa y capacidad de utilizar urea, que indican su afinidad con los *Basidiomicetes* (Miller et al., 1976). Estas propiedades la convierten en un organismo interesante y poco común entre las levaduras pigmentadas, dado que son pocas las que fermentan glucosa (y otros azúcares) y que sintetizan carotenoides (Miller, 1976; An et al., 1989). De hecho, todas las levaduras que sintetizan carotenoides, conocidas en la actualidad, son estrictamente aerobias. La imposibilidad de realizar análisis genéticos que involucren cruzamientos y el subsecuente análisis de los productos meióticos, ha impedido el desarrollo de la genética de *P. rhodozyma*. Esto representa un enorme obstáculo para resolver problemas fundamentales acerca de la ausencia del ciclo sexual, la mantención de la diversidad genética y otros aspectos de su biología, tales como el control genético de la carotenogénesis. Como alternativa para sobrepasar dichas dificultades, en nuestro laboratorio estamos desarrollando sistemas que permitan realizar análisis genético parasexual mediante la formación y regeneración de protoplastos de *P. rhodozyma* que puedan ser utilizados en el futuro como una herramienta de análisis genético de dicha levadura.

MATERIALES Y METODOS-

Cepas. En este trabajo se utilizaron las cepas silvestres UCD 67-210, UCD 67-383 y UCD 67-385 de *P. rhodozyma*, cuyos números corresponden al American Type Culture Collection (ATCC) 24202, 24203 y 24230 respectivamente. También se utilizaron cinco cepas mutantes afectadas en la producción de carotenoides, denominadas am1, am10, al 1, orange 2 y red 2, derivadas de la cepa silvestre UCD 67-385. Todas las cepas de *P. rhodozyma*, fueron cultivadas en medio YM con agitación a 22°C, según la técnica descrita por An & et al., (1989). Cuando fue necesario, el medio de cultivo se solidificó agregando agar al 2%. Dos cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, AH22 y AB1380, fueron obtenidas del doctor Antonio Jiménez (Centro de Biología Molecular, U. Autónoma de Madrid) y del doctor Maynard Olson (Saint Louis Missouri).

Formación de protoplastos. La formación de protoplastos fue realizada basándose en los métodos diseñados para otros hongos (Cifuentes et al., 1993). Para ello, células provenientes de cultivos frescos en fase exponencial (1×10^7 células/ml) fueron colectadas por centrifugación a 7.000 rpm durante 10 min. en una centrifuga Sorvall RC 5-B, utilizando un rotor SS34. Luego las células fueron lavadas dos veces con una solución osmoreguladora (Sorbitol o KCl) y finalmente resuspendidas en la misma solución. Posteriormente se trató con las enzimas biocelulasa, bioglucanasa, bioxilana, b-

glucuronidasa, zimoliasa 100T, lisozima y novozima 234, a una concentración final que varió según la enzima (y la duración de la reacción). La formación de protoplastos fue controlada mediante observación microscópica y por lisis celular con SDS al 1%. Posteriormente, la optimización de la técnica se logró utilizando KCl 0.8 M como agente osmótico y tratamiento con 2 mg/ml de novozima 234 a 22°C, durante 60 a 120 minutos. Una vez formados los protoplastos, fueron lavados tres veces con KCl 0.8 M. Los protoplastos se mantienen durante 24 horas en KCl 0.8 M con una lenta disminución en su sobrevida.

Regeneración de protoplastos. La regeneración de los protoplastos fue realizada embebiéndolos en agar de regeneración (YM en KCl 0.8M, con agar al 0.7%) fundido a 45°C. Posteriormente se sembraron en placas de Petri con un fondo de agar de regeneración. Luego se incubó a 22°C durante 5 a 9 días y se determinó la sobrevida, comparando las colonias aparecidas en las placas de regeneración en relación al número de protoplastos iniciales y de células iniciales en cada experimento.

RESULTADOS Y DISCUSION

Se realizó una serie de experimentos para formar protoplastos en *P. rhodozyma*. Para ello se ha utilizado tres cepas silvestres (UCD 67-210, UCD 67-383 y UCD 67-385) y cinco cepas afectadas en la carotenogénesis (am1, am10, ylo 2, ylo 6, al 1, orange 2 y red 2) derivadas de la cepa silvestre UCD 67-385. La tabla 1 muestra los resultados, indicando claramente que novozima 234 tiene la capacidad de formar protoplastos en *P. rhodozyma*. Dos cepas silvestres (67-210 y 67-385) forman protoplastos en forma eficiente con novozima 234. Sin embargo, con la cepa silvestre 67-383 no es posible obtenerlos. Se probaron varias condiciones para lograr su formación en la cepa 67-383, previo a la incubación con novozima 234. Estas incluyen tratamiento con mercaptoetanol, ditiotreitol, cambios de temperatura, etc., sin éxito. Las cepas 67-210 y 67-385, responden a las variaciones recién mencionadas. En algunos casos se mejora la capacidad de formar protoplastos pero cae la viabilidad en las últimas cepas. También se aumentó la concentración de novozima en la reacción para degradar la pared celular de la cepa 67-383 y se utilizó mezclas de las diferentes enzimas descritas sin alterar los resultados ya observados en dicha cepa. Por otra parte, se utilizó las cepas AH22 y AB1380 de *Saccharomyces cerevisiae*, como control para la formación de protoplastos con las enzimas estudiadas. La tabla 1, muestra que éstas forman protoplastos eficientemente con zimoliasa 100T y con B glucuronidasa. Sin embargo las otras enzimas, incluyendo novozima 234, tienen poco efecto sobre esta levadura en las condiciones experimentales estudiadas. La formación de protoplastos de *P. rhodozyma* aumenta en el transcurso del tiempo de incubación con novozima 234. Sin embargo la viabilidad de las células baja, llegando a

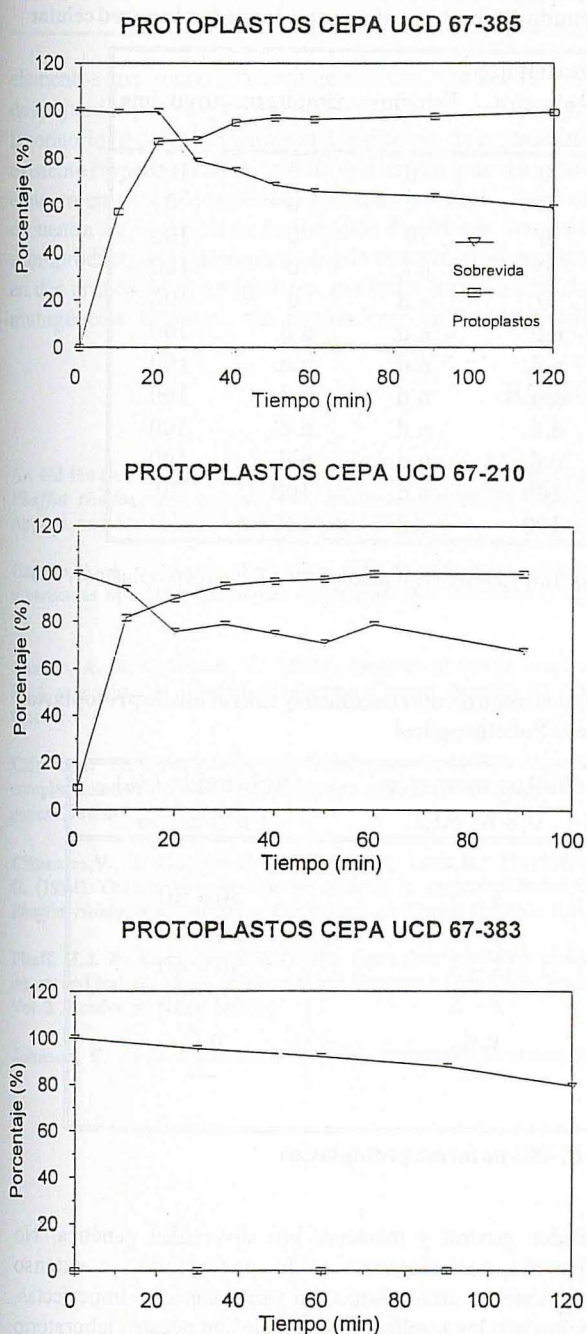


Fig.-1. Porcentaje de formación y regeneración de protoplastos en función del tiempo de tratamiento con novozima 234, en 3 cepas silvestres de *P. rhodozyma*

aproximadamente al 50 a 60 % luego de 2 horas de incubación a 37°C (Figura 1).

Parte de la disminución de la sobrevida de las células tratadas se debe a la incubación a 37°C. Hemos observado que temperaturas sobre los 25°C, afectan la capacidad de crecimiento y viabilidad de *P. rhodozyma*, esto puede observarse en parte, en la Figura 1, la cepa 67-383 no forma protoplastos durante incubación con novozima, pero

disminuye la sobrevida en aproximadamente el 20%, luego de dos horas de tratamiento. En atención a lo recién expuesto, hemos realizado un experimento adicional, en el cual hemos incubado las tres cepas silvestres (67-210, 67-383 y 67-385) de *P. rhodozyma* a 37°C durante un período prolongado de tiempo, observándose claramente que disminuye su viabilidad, medida como la capacidad de formar colonias, luego de ser sembradas en medio YM sólido e incubadas a 22°C (temperatura óptima de crecimiento) durante 5 días. En una etapa inicial, para la formación de protoplastos los experimentos se realizaron utilizando sorbitol como agente osmoregulador. Se probaron varias concentraciones que oscilaron entre 0.2 a 1.0 M de sorbitol y se determinó lisis celular mediante inspección visual a través de microscopía óptica, mediante tratamiento con SDS al 1% y por plaqueo en agar YM sorbitol de regeneración. Nuestros resultados indican que para el sorbitol, la concentración óptima es de 0.2 M.

La Tabla 2 muestra los resultados de experimentos de regeneración de protoplastos. En sorbitol 0.2 M, la regeneración en las cepas estudiadas oscila entre el 0.2 al 0.5 %. Posteriormente, al estudiar otros agentes que mantienen la osmolaridad, encontramos que al utilizar KCl como agente osmoregulador, la sobrevida de los protoplastos, medida como lisis celular, y la regeneración de los mismos aumenta considerablemente (Tabla 2). Nuestros resultados indican que KCl 0.8 M es la condición óptima para formar protoplastos de *P. rhodozyma*. Por otra parte, se realizaron experimentos para estimar el efecto en la sobrevida de los protoplastos de un tratamiento con polietilenglicol 4000 (PEG). Este compuesto es utilizado ampliamente para fusionar protoplastos en hongos filamentosos y levaduras. Luego de analizar varias concentraciones de PEG, encontramos que el 26 % es la más adecuada. En estas condiciones, la sobrevida de los protoplastos varía entre 50 al 60% (Tabla 2). Los experimentos fueron realizados utilizando la cepa silvestre UCD 67-385 y las cepas am1, am10 y al 1, que están relacionadas a dicha cepa silvestre. Con la cepa UCD 67-383 no fue posible realizar tales estudios debido a que no forma protoplastos en ninguna de las condiciones probadas.

La aplicación de los conocimientos obtenidos con la cepa UCD 67-385, han sido fácilmente transferidos a la cepa silvestre UCD 67-210, ya sea para la obtención de DNA genómico, aislamiento de plásmidos (Martínez et al., 1994) y obtención de DNA cromosómico intacto, para análisis de electroforesis de campo pulsado, lo mismo que para el aislamiento de plásmidos de la cepa 67-385 (Castillo & Cifuentes., 1993; 1994).

Los resultados presentados en este trabajo, tienen una proyección inmediata para el análisis genético de la levadura *P. rhodozyma*. De hecho, permitirán realizar en el futuro estudios de complementación genética mediante fusión y regeneración de protoplastos de diferentes mutantes, ya sea afectados en la carotenogénesis como en otros procesos importantes para dicha levadura (Cifuentes et al., 1994). También, será una herramienta que permitirá obtener DNA

Tabla 1. Formación de protoplastos de *Phaffia rhodozyma* utilizando diferentes enzimas que degradan la pared celular

Cepa	Protoplastos (Porcentaje)						
	Bio celulasa	Bioglu- canasa	Bioxilanasas	β -glucuro- nidasas	lisozima	zimoliasa	novozima
67-210	0	0	0	0	0	0	100
67.383	0	0	0	0	0	0	0
67-385	0	0	0	0	0	0	100
am1	0	0	0	0	n.d.	0	100
am10	0	0	0	0	n.d.	0	100
ylo2	0	0	0	n.d.	n.d.	n.d.	100
ylo6	0	0	0	n.d.	n.d.	n.d.	100
al1	0	0	0	n.d.	n.d.	n.d.	100
orange2	0	0	0	n.d.	n.d.	n.d.	100
red2	0	0	0	n.d.	n.d.	n.d.	100
AH22	n.d.	60	n.d.	100	n.d.	100	20
AB1380	n.d.	62	n.d.	100	n.d.	100	15

Las condiciones experimentales se describen en materiales y métodos. n.d = No determinado. 0 = no forma protoplastos. 100 = forma protoplastos en el 100% de las células tratadas.

Tabla 2.- Regeneración de protoplastos en sorbitol y KCl, utilizados como medios isotónicos y sobrevida de protoplastos después del tratamiento con Polietilenglicol

Cepas	% de Regeneración 0.2 M Sorbitol	% Regeneración 0.8 M KCl	Sobrevida (%) PEG 26 %
	67-385	0.2 - 0.5	3 - 5
al1	0.2 - 0.5	3 - 5	50 - 60
am1	0.2 - 0.5	3 - 5	50 - 60
am10	0.2 - 0.5	3 - 5	50 - 60
67-210	n.d.	n.d.	n.d.
67-383	---	---	---

n.d = no determinado ---- = La cepa 67-383 no forma protoplastos

cromosómico intacto para el análisis de la organización del genoma de dicha especie y determinar su variabilidad cromosómica, etc. Esto último es de real importancia dado que se trata de una especie que carece, hasta el momento, de reproducción sexual, de manera que se espera que exista variabilidad genética entre sus diferentes cepas silvestres aisladas desde la naturaleza.

En general, las levaduras imperfectas han sido consideradas como carentes de fase sexual y sólo capaces de reproducirse vegetativamente. En consecuencia, ha sido usual considerar a cepas haploides heterotálicas de un tipo de apareamiento, como una especie imperfecta, hasta que una cepa compatible del tipo de apareamiento opuesto sea descubierta. Por otro lado, la falta de reproducción sexual plantea interrogantes acerca de como las levaduras imperfectas

pueden generar y mantener una diversidad genética. I obstante, recientemente se ha encontrado un extenso polimorfismo cromosómico en varias especies imperfectas incluyendo los resultados observados en nuestro laboratorio que indican que en *P. rhodozyma* existe variabilidad cromosómica determinada mediante electroforesis de campo pulsado. Sin embargo, no existen evidencias que indiquen que ello sea una consecuencia de la falta de intercambio genético o recombinación entre cepas de la misma especie. Antecedentes sobre la organización general del genoma, son desconocidos en *P. rhodozyma*, de manera que no existe información sobre el tamaño del genoma, número de cromosomas y su nivel de ploidía ha sido materia de especulación. La caracterización de los cromosomas mediante electroforesis de campo pulsado y detección

elementos genéticos extracromosómicos, recién se está despejando por experimentos realizados en nuestro laboratorio (datos no mostrados). Un análisis de la literatura existente respecto al tema, revela que hay un gran desconocimiento en aspectos genéticos de dicha levadura. Sólo se encuentra información en los intentos de obtener mutantes sobreproductores, relacionados con la síntesis de astaxantina en dos grupos de investigadores, mediante experimentos de mutagénesis clásicos, sin profundizar en los aspectos

genéticos básicos de la especie (An Gill-Hwan et al., 1989; Johnson & Lewis, 1979; Johnson, 1992). Finalmente podemos predecir que la posibilidad de realizar experimentos de transformación genética en *P. rhodozyma* es factible, ya que la formación y regeneración de protoplastos es eficiente con la técnica recién descrita. Esto último abre grandes expectativas para el desarrollo y generación de conocimientos acerca de la genética de esta levadura.

REFERENCIAS

- An Gil-Hwan.; Schuman, D.B.; Johnson E. (1989). Isolation of *Phaffia rhodozyma* mutants with increased astaxanthin content. Applied and Environmental Microbiology 55:116-124.
- Castillo, A. & Cifuentes, V. (1993). RNA de doble hebra asociado a partículas tipo virus en *Phaffia rhodozyma*. Anal. Microbiol. 1: 63-66
- Castillo, A. & Cifuentes, V. (1994). Presence of double stranded RNA mycovirus in *Phaffia rhodozyma*. Current Genetics 25 (En prensa).
- Cifuentes, V.; Hermosilla, G.; Pincheira, G. (1993). Genetic complementation analysis in *Pycnoporus cinnabarinus*. Fungal Genetics Newsletter 40:28-29
- Cifuentes, V.; Hermosilla, G.; Martínez, C.; León, R.; Pincheira, G. (1994). Genetic complementation analysis by protoplast fusion in *Phaffia rhodozyma*. European Conference on Fungal Genetics 2:31
- Phaff, H.J. & Starmer, W.T. (1989). Yeast associated whit plants, insects and soil, p.123180. In Rose A. and Harrison J. (Eds.), The Yeast, Vol 2. Academic Press, London.
- Johnson, E. A. & Lewis M.J. (1979). Astaxanthin formation by the yeast *Phaffia rhodozyma*. J. Gen. Microbiol. 11:173-183
- Johnson, E.A. (1992). News advances in astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma*. Profiles on Biotechnology. Universidad de Santiago de Compostela. Cap 25. pp: 207-220
- Johnson, E.A.; Conklin, D.E.; Lewis M.J. (1977). The yeast *Phaffia rhodozyma* as a dietary pigment source for salmonids and crustaceans. J. Fish. Res. Board Can. 34:2417-2421.
- Kreger van Rij, N.J. (1989). Classification of yeast, p. 5-61. In Rose A. and Harrison J. (Eds.), The Yeast, Vol 2. Academic Press, London.
- Martínez, C.; Hermosilla, G.; León, R.; Urzúa, B.; Cifuentes, V. (1994). Presencia de plásmidos de DNA de doble hebra en *Phaffia rhodozyma*. Boletín Micológico 9:25-30
- Miller, M.W.; Yoneyama, M.; Soneda, M. (1976). *Phaffia* a new yeast genus in the *Deuteromycotina* (Blastomycetes). Int. J. Syst. Bacteriol. 26:286-291.
- Yamada, Y. & Kawasaki, H. (1989). The genus *Phaffia* is phylogenetically separate from the genus *Cryptococcus* (*Cryptococcaceae*). Agric. Biol. Chem. 53:2845-2846.