



UNIVERSIDAD DE ORIENTE
NÚCLEO DE SUCRE
INSTITUTO OCEANOGRÁFICO DE VENEZUELA
POSTGRADO EN CIENCIAS MARINAS

EVALUACIÓN DE UN PROGRAMA DE MUTACIÓN-SELECCIÓN, COMO
TÉCNICA DE MEJORAMIENTO GENÉTICO, PARA INCREMENTAR EL
CONTENIDO LIPÍDICO DE UNA CEPA DE *Tetraselmis tetraathele* (WEST, G.S)
BUTCHER, 1959

Lcda. RORAYSI JOSÉ CORTEZ MAGO

TRABAJO DE GRADO PRESENTADO COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OPTAR AL TÍTULO DE MAGISTER SCIENTIARUM EN CIENCIAS MARINAS
MENCIÓN BIOLOGÍA MARINA

CUMANÁ, 2012



CEPCM/TG-09-2012

UNIVERSIDAD DE ORIENTE
CONSEJO DE ESTUDIOS DE POSTGRADO
NÚCLEO DE SUCRE
POSTGRADO EN CIENCIAS MARINAS

ACTA DE DEFENSA DE TRABAJO DE GRADO

Nosotros, Prof. Miguel Guevara, Profa. Sonia Subero y Profa. Carmen Alfonsi, integrantes del jurado designado por la Comisión Coordinadora del Programa de Postgrado en Ciencias Marinas, para examinar el Trabajo de Grado intitulado: "EVALUACIÓN DE UN PROGRAMA DE MUTACIÓN-SELECCIÓN, COMO TÉCNICA DE MEJORAMIENTO GENÉTICO, PARA INCREMENTAR EL CONTENIDO LIPÍDICO DE UNA CEPA DE *Tetraselmis tetraathele* (WEST, G.S) BUTCHER, 1959", presentado por la Leda. Roraysi Cortéz, C.I: 12.660.815, a los fines de cumplir con el requisito legal para optar al grado de *Magister Scientiarum* en Ciencias Marinas, Mención Biología Marina.

Hacemos constar que hemos examinado el mismo e interrogado a la postulante en sesión pública celebrada hoy, a las 9:00 a.m., en la Sala de Reuniones "Dr. Pedro Roa Morales", del Instituto Oceanográfico de Venezuela.

Finalizada la defensa del trabajo por parte del postulante, el jurado decidió Aprobarla por considerar, sin hacerse solidario de las ideas expuestas por el autor, que el mismo, se ajusta a lo dispuesto y exigido en el Reglamento de Estudios de Postgrado de la institución.

En fe de lo anterior, se levanta la presente acta, que firmamos conjuntamente con la Coordinadora del Postgrado en Ciencias Marinas en la ciudad de Cumaná, a los dos días del mes de agosto de dos mil doce.

Jurado Examinador:

Prof. Miguel Guevara (Tutor).....

Profa. Sonia Subero

Profa. Carmen Alfonsi

Coordinadora Programa de Postgrado:

Dra. Mary Isabel Segnini de Bravo

Firma y Sello



ÍNDICE

DEDICATORIA.....	I
AGRADECIMIENTOS.....	III
LISTA DE TABLAS	VI
LISTA DE FIGURAS.....	V
RESUMEN.....	VI
INTRODUCCIÓN.....	1
METODOLOGÍA.....	6
CEPA DE MICROALGA.....	6
PROGRAMA DE MUTAGÉNESIS-SELECCIÓN.....	6
SENSIBILIDAD DE <i>T. TETRATHELE</i> AL HERBICIDA QUIZALOFOP.....	6
MUTAGÉNESIS.....	7
SELECCIÓN DE LOS MUTANTES.....	7
PARÁMETROS DE CRECIMIENTO, CONTENIDO DE LÍPIDOS TOTALES, Y ÁCIDOS GRASOS DE LOS MUTANTES Y DE LA CEPA SILVESTRE CULTIVADA BAJO CONDICIONES DE CULTIVO ESTÁNDAR.....	8
CRECIMIENTO.....	8
LÍPIDOS TOTALES.....	9
ÁCIDOS GRASOS.....	10
ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....	11
RESULTADOS.....	12
SENSIBILIDAD DE <i>TETRAELEMIS TETRATHELE</i> AL QUIZALOFOP	12
MUTAGÉNESIS	13
SELECCIÓN DE LOS MUTANTES	15
PARÁMETROS DE CRECIMIENTO, CONTENIDO DE LÍPIDOS TOTALES, Y ÁCIDOS GRASOS DE LOS MUTANTES Y DE LA CEPA SILVESTRE CULTIVADA BAJO CONDICIONES DE CULTIVO ESTÁNDAR	16
CRECIMIENTO	16
LÍPIDOS TOTALES Y ÁCIDOS GRASOS.....	17
DISCUSIÓN.....	19
CONCLUSIONES.....	21
RECOMENDACIONES	22
BIBLIOGRAFÍA.....	23
APÉNDICE	60

DEDICATORIA

A Dios por demostrarme tantas veces su existencia y con ello darme las fuerzas necesarias para salir adelante en cada tropiezo.

A mis padres Hernán y Ana Victoria, que gracias a su determinación, entrega y humildad me han enseñado tanto, y siempre alimentan mi alma. Me han enseñado a encarar las adversidades sin perder nunca la dignidad ni desfallecer en el intento. Todo lo que soy como persona, mis valores, mis principios, mi perseverancia y mi empeño, y todo ello con una gran dosis de amor y sin pedir nunca nada a cambio se los debo. Los amo con el alma!!!

A mi hermano Hernán por siempre brindarme apoyo y por todo su cariño. Te quiero mano!!!

A mi gran y querido amigo Miguel Guevara, porque ha sido más que un extraordinario profesor de quien he aprendido infinidad de cosas. Gracias profe, por estar allí cuando más lo necesité y por creer en mí.

A mis amigos, los que han pasado y los que han quedado, porque todos ustedes han sido tantas veces parte aguas de mi vida, la que han marcado de alguna forma y me han abierto los ojos al mundo. Gracias Richard, definición de amigo; Leandro (Tito), incondicional; Marbelis, siempre al pendiente; Reny, tu alegría y optimismo contagian; Iliana, corazón transparente; Lolymar, por hacerme sonreír a pesar de las adversidades, Bladimir, por todo tu apoyo; Luz Mary, porque en todo momento estás conmigo; Alexander, gracias por enseñarme a sonreírle a la vida...Amigos como ustedes pocos!!!....Los quiero muchísimo, no lo olviden!!

A mi querida Universidad de Oriente, por todos los momentos vividos, por los amigos y por la formación que recibí en su campus.

AGRADECIMIENTOS

Primero me gustaría agradecer sinceramente al Dr. Miguel Guevara, mi asesor, mi profesor, mi amigo; por su esfuerzo y dedicación. Sus conocimientos, sus orientaciones, su manera de trabajar, su persistencia, su paciencia y su motivación han sido fundamentales para mi formación como investigador. Él ha inculcado en mí un sentido de seriedad y responsabilidad sin los cuales no podría tener una formación completa como investigador. A su manera (única por demás), ha sido capaz de ganarse mi lealtad y admiración, así como sentirme en deuda con él por todo lo recibido durante el tiempo que lo conozco (7 años). Sus enseñanzas serán para toda la vida.

También me gustaría agradecer los consejos y ayuda recibidos a lo largo de los últimos años por otros profesores del IOV-UDO, que de una manera u otra han aportado su granito de arena a mi formación. Destacar al Dr. César Lodeiros, al Dr. Luis Freites, al Dr. Luis Troccoli y a la MSc. Ivis Fermín, excelentes profesores y quienes me han brindado más que conocimientos una bella amistad.

Mención especial merecen en mi vida tanto personal como profesional Nohemí Mujica y sus hijos Jessica, María Laura y Asdrúbal, quienes aparecieron en mi vida para quedarse atrapados por siempre en mi corazón. Ustedes saben cuánto los quiero!!!

A Jesús Rojas y Victor Jiménez, sin ustedes el postgrado no sería igual. Gracias por todas las sonrisas que dibujaron y siguen dibujando en mi rostro con sus ocurrencias. Son especiales!!

A la familia Mendoza Patiño, porque sin ellos no hubiese llegado hasta acá. Gracias a todos!!!

Y por último, pero no menos importante, estaré eternamente agradecida a mis amigos y a mis compañeros de laboratorio Nancy, María Eugenia, Ruth, Roger, Miguel, Yanna, Jeannelis, Maira, Karla, Ana (Carolina), Enmary, Aleikar, Adrián, Jeny, Paulino y por supuesto, Nathalie y Berenice. He sido afortunada de contar con ustedes en mi vida.

LISTA DE TABLAS

TABLA 1. PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS DE LAS CEPAS SILVESTRE Y MUTANTES (15C Y 30A) DE <i>TETRASELMIS TETRATHELE</i>	18
---	----

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. COLONIAS DE <i>TETRASELMIS TETRATHELE</i> (CCPUDO-19) EN MEDIO F/2 SÓLIDO, DESPUÉS DE 22 DÍAS DE SIEMBRA	12
FIGURA 2. EFECTO DEL QUIZALOFOP SOBRE LA TASA DE SUPERVIVENCIA (PROMEDIO ± DESVIACIÓN ESTÁNDAR) DE CÉLULAS DE <i>TETRASELMIS TETRATHELE</i> . ¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.....	
FIGURA 3. EFECTO DEL TIEMPO DE EXPOSICIÓN A 0,1M DE EMS SOBRE LA TASA SUPERVIVENCIA (PROMEDIO ± DESVIACIÓN ESTÁNDAR) DE <i>TETRASELMIS TETRATHELE</i>	14
FIGURA 4. DENSIDADES CELULARES (CÉL/ML) DE LOS MUTANTES SELECCIONADOS DESPUÉS DE 15 DÍAS DE CULTIVO EN MEDIO F/2, BAJO UNA IRRADIANCIA DE 50 μMOLES/M ² /S Y A 23 °C.....	15
FIGURA 5. CRECIMIENTO DE MUTANTES (15C, 30A Y 45C) Y LA CEPA SILVESTRE DE <i>TETRASELMIS TETRATHELE</i> EN MEDIO F/2 CON QUIZALOFOP (100 μM).....	16
FIGURA 6. CURVAS DE CRECIMIENTO DE MUTANTES (15C Y 30A) Y CEPA SILVESTRE (CONTROL) DE <i>TETRASELMIS TETRATHELE</i> EN MEDIO F/2 BAJO CONDICIONES ESTÁNDAR DE CULTIVO.	17

RESUMEN

La biomasa microalgal con altos contenidos de lípidos y de ácidos grasos poliinsaturados, PUFAs, para ser usada como alimento en la acuicultura, suele obtenerse mediante la aplicación de condiciones de cultivo extremas (deficiencia de nutrientes, altas irradiancias y bajas temperaturas), las cuales limitan el crecimiento de las microalgas y encarecen los costos de producción. Una alternativa a esta problemática es la aplicación de la mutación-selección como estrategia de mejoramiento genético. Con la finalidad de evaluar esta técnica, en la presente investigación se sometió a la microalga *Tetraselmis tetrathele* a diferentes tiempos de exposición (0- 105 min) con el mutágeno EMS (0,1M). Los posibles mutantes con una incrementada acumulación de lípidos y PUFAs fueron seleccionados utilizando Quizalofop (100 μ M), un inhibidor de la síntesis de lípidos. Dos cepas mutantes (15C y 30A) fueron seleccionadas, cultivadas bajo condiciones de cultivo estándar (temperatura 23 ± 1 °C, iluminación 50 μ moles/m²/s y fotoperiodo 12:12) y comparadas con la cepa silvestre en cuanto su crecimiento, contenido de lípidos totales y PUFAs. El crecimiento de las cepas mutantes 15C y 30A fue similar ($P > 0,05$) al mostrado por la cepa silvestre, con densidades celulares máximas de $1,5 \times 10^6$ cél/ml, $1,3 \times 10^6$ cél/ml y $1,5 \times 10^6$ cél/ml, respectivamente. Los lípidos totales de los mutantes 15C y 30A fueron 85% y 62%, respectivamente, más altos que los de la cepa silvestre. Los contenidos de ARA de las cepas 15C y 30A fueron 92% y 90%, respectivamente, más altos que los de la cepa silvestre. Los valores de EPA y DHA cuantificados en los dos mutantes superaron en más de un 25% a los obtenidos en la cepa silvestre. Los resultados obtenidos en esta investigación demuestran la utilidad de la mutación-selección como estrategia para mejorar genéticamente a *T. tetrathele*, ya que esta técnica posee ventajas cuando se desconocen los mecanismos de regulación de los genes que participan en la ruta de biosíntesis del compuesto de interés o en que las metodologías de mutagénesis sitio dirigida y transgenia están poco desarrolladas, como es el caso de la mayoría de las microalgas.

INTRODUCCIÓN

Las microalgas son organismos unicelulares muy variados en tamaño y forma, que existen en casi todos los hábitats conocidos, desde ambientes acuáticos, tanto marinos como dulceacuícolas, hasta suelos húmedos. Los mares y océanos contienen enormes cantidades de algas planctónicas, estimándose que el 90% de la fotosíntesis total de la tierra es realizada por estos vegetales acuáticos (ABALDE *et al.*, 1995).

Las microalgas han pasado a ser organismos de interés industrial debido a la posibilidad de realizar cultivos masivos para alimentar organismos acuáticos y obtener productos específicos como vitaminas, proteínas, ácidos grasos poliinsaturados y pigmentos (CABRERA & MONTECINO, 1987; BARSANTI & GUALTIERI, 2006).

En la acuicultura, las microalgas son esenciales ya que son utilizadas como alimento vivo de moluscos y de estados larvarios de algunos crustáceos y peces, así como de especies zooplanctónicas intermedias (rotíferos, artemias y copépodos), formando parte de la cadena alimentaria de cualquier criadero convencional (CAÑIZARES *et al.*, 1995; SÁNCHEZ *et al.*, 2008). El uso de estos microorganismos en acuicultura está relacionado con el valor nutricional que poseen, especialmente referido al contenido de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs, por sus siglas en inglés), entre éstos los ácidos eicosapentanoico (EPA, 20: 5n-3), docosahexaenoico (DHA, 22: 6n-3) y araquidónico (ARA, 20: 4n-6), dado que se ha demostrado que estos compuestos incrementan la tasa de sobrevivencia de los organismos sometidos a cultivo (IZQUIERDO, 1996).

En los últimos años, los desarrollos tecnológicos para la producción de sustancias de interés biotecnológico y acuícola, a partir de las microalgas, han sido significativos en todo el mundo (RICHMOND, 2004). Estos desarrollos se inician con la selección adecuada de una determinada cepa de microalga, la cual debe satisfacer las exigencias de los demandantes, es decir, que sintetice los metabolitos de

interés industrial o que supla las exigencias energéticas de los consumidores, en el caso de la acuicultura específicamente (NAPOLITANO *et al.*, 1990; COHEN & RATLEDGE, 2005).

Además de las variaciones propias de cada especie, en las microalgas ocurren variaciones de su composición bioquímica como consecuencia de las fluctuaciones de algunos parámetros físico-químicos que condicionan sus cultivos (TONON *et al.*, 2002). Diversas investigaciones han determinado que las bajas concentraciones de nitrógeno producen un incremento en la proporción de lípidos totales y de ácidos grasos poliinsaturados en las microalgas, conjuntamente con una disminución del contenido proteico (HU & GAO, 2006; CHOI *et al.*, 2010); mientras que las bajas temperaturas pueden incrementar la acumulación de PUFAs (RENAUD *et al.*, 2002; TEOH *et al.*, 2004). Por otro lado, se ha demostrado que altos valores de la irradiancia (sin llegar a ser fotoinhibidores), así como altas concentraciones de nitrógeno y fósforo, favorecen la acumulación de proteínas y disminuyen la de los ácidos grasos (ABALDE *et al.*, 1995).

La modificación de la composición bioquímica de las microalgas, además de realizarse a través de la variación de las condiciones de cultivo, también puede lograrse mediante el mejoramiento genético de cepas a través de mutagénesis inducida y posterior selección (LÓPEZ-ALONSO *et al.*, 1996). La mutagénesis inducida comenzó a hacerse popular a principios de los años cuarenta y, desde entonces, se ha utilizado principalmente en bacterias, hongos y microalgas (ALIKHANIAN, 1962; QUEENER & LIVELY, 1986; CHATUVERDI & FUJITA, 2006; LIAN *et al.*, 2009).

Las microalgas son candidatas idóneas para ser manipuladas genéticamente, debido a la ausencia de diferenciación celular y a la naturaleza haploide de la mayoría de sus estados vegetativos (LEÓN *et al.*, 2003). Esta característica ha permitido desarrollar programas de ingeniería metabólica para obtener a partir de estos microorganismos compuestos tradicionales y nuevos productos bioactivos para aplicaciones industriales y farmacéuticas (HARRIS, 2001).

El mejoramiento genético de organismos mediante mutagénesis al azar puede ser optimizado en términos del tipo y dosis del mutágeno a emplear, así como en el método de selección de los mutantes generados (ERTOLA *et al.*, 1994). Los métodos empleados para inducir mutaciones incluyen agentes físicos y químicos. Entre los agentes físicos destacan la radiación UV, rayos X y gamma. En lo que respecta a los mutágenos químicos, los más utilizados son etilmetanosulfato (EMS), metilmetanosulfato (MMS), nitrosoguanidina (NTG) y etilnitrosourea (ENU) (GRIFFITHS *et al.*, 2000). De todos estos agentes mutagénicos, la radiación UV es la más utilizada debido a su eficacia y a que no acumula residuos peligrosos, como ocurre con los mutágenos químicos (CALAM, 1970).

En lo concerniente a los métodos de selección, estos varían de acuerdo al tipo de mutantes que se desea aislar, teniendo en común el cultivo de mutantes en una condición inhibitoria respecto al atributo que se pretende mejorar (GÓMEZ & GONZÁLEZ, 2001). Así por ejemplo, para el aislamiento de mutantes con una incrementada capacidad de síntesis de PUFAs puede utilizarse inhibidores de la síntesis de ácidos grasos (cerulenina, quizalofop, entre otros) (CHATUVERDI *et al.*, 2004).

A pesar de los pocos reportes, respecto al uso de las técnicas de mutagénesis y selección de microalgas, su utilización es una práctica habitual en empresas dedicadas a la biotecnología microalgal. Así por ejemplo, la empresa Microbio Resources INC. En San Diego, California (www.alacrastore.com) ha utilizado métodos de mutagénesis-selección para desarrollar nuevas cepas carotenogénicas de *Dunaliella*; este tipo de estrategias les permitió seleccionar una cepa que produce hasta un 20% del peso seco del alga en forma de β -caroteno (BURRASCANO & SPENCER, 1988).

La mutación-selección, como medio para mejorar genéticamente la producción de pigmentos, ha sido probada con éxito en diferentes microalgas Chlorophyceae como *Dunaliella bardawil* (SHAISH *et al.*, 1991), *Chlorococcum* sp. (ZHANG *et al.*, 1997) y *Haematococcus pluvialis* (YONG *et al.*, 2003). En relación al incremento en la producción de PUFAs, LÓPEZ-ALONSO *et al.* (1996) indujeron mutaciones con

luz UV en la diatomea *Phaeodactylum tricornutum*, logrando mutantes con una capacidad de síntesis de EPA superior al 137% comparado con el control no mutado. MEIRELES *et al.* (2003) al aplicar un programa de mutación con luz UV en la Haptophyceae *Pavlova lutheri* lograron una cepa mutante con un incremento del 32% en la producción de EPA y DHA, en relación con el control. Más recientemente, CHATUVERDI *et al.* (2004) y CHATUVERDI & FUJITA (2006) utilizando N-metil-N-nitrosourea como agente mutagénico y quizalofop (un inhibidor de la actividad de la ACCasa) como método de selección, aislaron mutantes de *Nannochloropsis oculata* con una incrementada capacidad de síntesis de PUFAs.

El incremento del contenido de EPA en cepas de microalgas, ya sea por ingeniería genética o mutagénesis inducida serviría no sólo para incorporarlas como suplemento alimenticio para humanos, sino también para aumentar la calidad de los productos de la acuicultura. En la actualidad, la mutagénesis inducida presenta una ventaja considerable en comparación con la ingeniería genética, ya que esta técnica no requiere de conocimientos amplios de la genética del organismo en estudio (YEN DOAN & OBBARD, 2012), lo cual actualmente no está disponible para la mayoría de las especies de microalgas (ALONSO *et al.*, 1996).

Una de las especies de microalgas ampliamente utilizada en la acuicultura es *Tetraselmis tetrahele* (GODINEZ *et al.*, 2004). Es un fitoflagelado de color verde, de alto valor nutricional, su tamaño va desde 12 a 16 µm. Consta de 1 a 8 flagelos móviles y de un cloroplasto en forma de copa. Posee escamas orgánicas. Es cosmopolita, y su crecimiento óptimo está dentro de un rango de temperatura de 16 a 20 °C. Ha sido ampliamente utilizada en estudios de bioquímica (RONQUILLO *et al.*, 1997) y en acuicultura como alimento para adultos y estadíos larvarios de moluscos, ya que es fácilmente digerible (ABALDE *et al.*, 1995). La composición química de *Tetraselmis tetrahele* varía con la edad del cultivo; presentando, por lo general, un contenido proteico de 42%; 12% de carbohidratos, 16% de lípidos, 5% de ARA, 8% de EPA y 4% de DHA (FARHADIAN *et al.*, 2009).

Basados en el fácil manejo en el laboratorio, en la capacidad que posee *Tetraselmis tetrathele* de formar colonias en medio de cultivo sólido, en su uso como alimento en la acuicultura y a la escasa información bibliográfica relacionada con su mejoramiento genético, esta investigación planteó la evaluación de un programa de mutación-selección para incrementar su contenido de lípidos totales y ácidos grasos poliinsaturados.

METODOLOGIA

CEPA DE MICROALGA

La microalga utilizada corresponde a una cepa de *Tetraselmis tetrathele* (West, G.S) Butcher, 1959 (CCPUDO-19), proveniente de la Universidad de Kagoshima, Japón y mantenida en la colección de cultivos planctónicos de la Universidad de oriente (CCPUDO).

La cepa antes mencionada fue sembrada en medio f/2 sólido (GUILLARD, 1975) con una concentración de nitrato de 3,6 mM y se expuso a 22 °C, 40 $\mu\text{moles/m}^2/\text{s}$ de irradiancia y un fotoperíodo 12:12, con la finalidad de aislar un clon e iniciar cultivos clonales, los cuales fueron utilizados durante el desarrollo de toda la investigación.

PROGRAMA DE MUTAGÉNESIS-SELECCIÓN

Cultivos de *Tetraselmis tetrathele*, en fase de crecimiento exponencial, se sometieron a un programa de mejoramiento genético utilizando un mutágeno químico etilenmetanosulfonato (EMS), siguiendo las recomendaciones de CHATUVERDI *et al.* (2004).

Sensibilidad de *t. tetrathele* al herbicida quizalofop

Se tomaron 5 ml, por triplicado, de un cultivo de *T. tetrathele* con una densidad celular de 50000 cel/ml y fueron centrifugados (1000 rpm durante 10 minutos). El “pellet” resultante fue resuspendido en 5 ml de medio f/2 conteniendo diferentes concentraciones de Quizalofop (0 - control, 50, 100, 150, 200, 400, 600, 800 y 1000 μM) e incubó a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 24 horas. A continuación, se evaluó la densidad celular a través del conteo con una cámara Neubäuer y se determinó el porcentaje de supervivencia, con respecto al control, en cada concentración de Quizalofop. La concentración de Quizalofop que causó un porcentaje de supervivencia inferior al

15% fue escogida para usarla en la selección de los mutantes potencialmente mejorados en su contenido lipídico. Prueba presuntiva

Se sembró, por triplicado, 1 ml de cada dilución en tubos con caldo lactosado (BBL), provistos de una campana de Durham invertida para verificar la formación de gas, posteriormente los tubos se incubaron por 24-48 horas a 35°C. Los tubos con producción de gas se consideraron positivos, confirmándose la utilización de la lactosa por los microorganismos.

Mutagénesis

Para los ensayos de mutación, se colocaron 10 ml del cultivo de *T. tetrahele* ($7,5 \times 10^5$ células/ml, DO 750nm = 0,158) en un matraz Erlenmeyer de 125 ml de capacidad con 0,1 M de EMS y se agitaron suavemente, de acuerdo a CHATUVERDI *et al.* (2004). Cada 15 minutos, hasta completar 105 minutos, se retiró 1 ml del cultivo, se le agregó 1 ml de tiosulfato de sodio (0,16 M) para neutralizar el EMS y se centrifugó a 1000 rpm/s durante 10 minutos. El "pellet" resultante fue resuspendido en 1,5 ml de medio f/2, luego, 100 µl fueron colocados en placas de Petri, por triplicado y, con la ayuda de un asa de siembra se dispersaron en la superficie del agar. Posteriormente, las placas fueron colocadas en una cámara de crecimiento durante 20 días a 22 °C y a una irradiancia continua de 50 µmoles/m²/s. A continuación, se determinó el porcentaje de supervivencia para cada tiempo de exposición al EMS, con respecto a un cultivo control (no expuesto al EMS) por conteo de colonias, usando una lupa estereoscópica. De los tiempos de exposición al EMS, donde se observaron los menores porcentajes de supervivencia, se aislaron colonias y se cultivaron separadamente en 5 ml de medio f/2 durante 15 días, aplicando irradiancia continua de 50 µmoles/m²/s y 23 °C.

Selección de los mutantes

Transcurridos los 15 días de cultivo, los clones que mostraron una densidad celular similar al control se seleccionaron y se cultivaron durante 20 días a 25°C bajo

una irradiancia continua de 100 $\mu\text{moles}/\text{m}^2/\text{s}$ en medio f/2 que contenía la concentración de Quizalofop previamente seleccionada (apartado de sensibilidad de *T. tetrahele* al herbicida Quizalofop) con la finalidad de aislar clones potencialmente mejoradas en su contenido de lípidos. Los clones que mostraron mayor crecimiento poblacional se seleccionaron, cultivaron bajo condiciones de cultivo estándar y se les determinaron los parámetros de crecimiento, contenido de lípidos y de ácidos grasos.

PARÁMETROS DE CRECIMIENTO, CONTENIDO DE LÍPIDOS TOTALES, Y DE ÁCIDOS GRASOS DE LOS MUTATES Y DE LA CEPA SILVESTRE CULTIVADA BAJO CONDICIONES DE CULTIVO ESTÁNDAR

Los cultivos de los mutantes obtenidos y de la cepa silvestre se realizaron, por triplicado, de forma discontinua, durante 15 días, utilizando matraces de vidrio de 500 ml de capacidad, los cuales contenían 250 ml de agua de mar (37 PSU) filtrada (papel Whatman GF/C 0,45 μm), esterilizada en autoclave y fertilizada con el medio f/2 (GUILLARD, 1975). Los cultivos fueron agitados manualmente dos veces al día y fueron mantenidos bajo condiciones controladas de temperatura (23 ± 1 °C) e iluminación (50 $\mu\text{moles}/\text{m}^2/\text{s}$, fotoperiodo 12:12).

Crecimiento

El recuento celular fue realizado diariamente en muestras fijadas con lugol al 1%, con la ayuda de una cámara de Neubäuer (hematocitómetro) de 0,1 mm de profundidad y un microscopio binocular, no contabilizándose las células sin pigmentación por considerarse muertas. Para calcular la densidad celular, se utilizó la siguiente relación:

$$D = C \cdot 10^4 \cdot Fd$$

Donde:

D= Número de células/ml

C=Promedio de células contadas en cuatro cuadrantes de la cámara.

Fd= Factor de dilución.

Con los valores del recuento celular, fue calculada la tasa de crecimiento K tomando en cuenta el valor inicial y final de la densidad de la microalga siguiendo las recomendaciones hechas en MADIGAN *et al.* (1999), utilizando la siguiente relación:

$$K = \frac{\log_{10} X_f - \log_{10} X_0}{0,301(t_f - t_0)}$$

Donde:

K= Tasa instantánea de crecimiento, div/día

tf-t0 = Tiempo final e inicial de cultivo.

Xf, X0 = Densidad celular final e inicial

Cuando los cultivos alcanzaron la fase de crecimiento exponencial, se tomaron por triplicado, 5 ml, se centrifugaron y a los “pellets” obtenidos se les realizaron siguientes análisis:

Lípidos totales

Se realizó un ensayo cuantitativo basado en la carbonización (MARSH & WEINSTEIN, 1966), mientras que la extracción se hizo con la metodología descrita por BLIGH & DYER (1959), para lo cual se resuspendió el precipitado de microalgas en 7,5 ml de CHCl₃:CH₃OH (1:2 v/v), las muestras se homogeneizaron para facilitar la extracción. Seguidamente se les añadió 1,5 ml de CHCl₃ (cloroformo) y 1,5 ml de agua destilada para separar la fase polar de la apolar. Los tubos se agitaron y dejaron en reposo durante 24 horas a 4°C. Posteriormente, éstos se centrifugaron por 10 min a 3000 rpm para facilitar la separación de las fases antes mencionadas. La fase polar se descartó y la fase apolar se vertió en un tubo limpio adicionándosele 0,5 ml de acetona de alta pureza. El extracto lipídico de cada tubo, se sometió a desecación mediante la evaporación del CHCl₃ en una estufa a 37°C y luego se resuspendió

nuevamente en 1 ml de CHCl_3 , el cual se repartió por triplicado, en alícuotas de 200 μl de cada uno de estos extractos en tubos con tapa de rosca.

Paralelamente se preparó una solución de tripalmitina en CHCl_3 (0,03–0,27 mg/ml) para ser utilizada como patrón. Una vez que las muestras de las microalgas, curva patrón y blanco (CHCl_3) se evaporaron a 37 °C; todos los tubos se dejaron enfriar para añadirles seguidamente 2 ml de H_2SO_4 concentrado. Luego, los tubos fueron colocados dentro de la estufa a 200 °C durante 15 min, para la carbonización del extracto lipídico. A continuación, los tubos se dejaron a temperatura ambiente durante unos 20 s e inmediatamente se colocaron a 4 °C durante 5 min. Seguidamente, se les añadieron 3 ml de agua destilada a cada tubo, mezclándose bien para colocarlos nuevamente a 4°C. Una vez fríos, se colocaron a temperatura ambiente durante unos 10 min, hasta que desaparecieron todas las burbujas para leer la absorbancia de las muestras a 375 nm en un espectrofotómetro Jenway 6405 UV/Vis.

Los valores de absorbancia de tripalmitina se usaron para elaborar la curva patrón mediante ajuste lineal por mínimos cuadrados, y los valores de lípidos en las muestras problema se calcularon por interpolación utilizando dicha curva. El contenido de lípidos totales se expresó en % con base a la masa seca, correspondiendo al promedio de todas las réplicas.

Ácidos grasos

Extractos lipídicos obtenidos de acuerdo a la metodología previamente descrita (BLIGH & DYER, 1959), se utilizaron para la esterificación de los ácidos grasos, de acuerdo a SATO & MURATA (1988), para lo cual, los tubos con las muestras se sometieron a metanólisis durante 2,5 h a 85 °C, mediante la adición de 2,5 ml de ácido clorhídrico (5%) en metanol.

Los ésteres metílicos de ácidos grasos obtenidos se separaron de la fase polar mediante una doble extracción con hexano grado HPLC (0,75 ml). El volumen final del hexano fue reducido a 100 μl mediante la concentración con nitrógeno. El

volumen obtenido de cada una de las muestras se analizó a través de un cromatógrafo de gases-espectrómetro de masas (HP 1800B), utilizándose una columna omegawax TM 250 fused sílica (Supelco) de 0,25 mm x 25 m de largo.

Los ácidos grasos se identificaron mediante la comparación de los tiempos de retención de un patrón comercial de ésteres metílicos de ácidos grasos PUFA-3 (Sigma) y por comparación de los espectros de masa que generaron las muestras, con respecto al espectro de masas contenido en las bibliotecas NIST2000. Los resultados se expresaron en porcentaje con base al total de los ácidos grasos encontrados.

ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

La cepa silvestre de *Tetraselmis tetrathele* y los mutantes obtenidos a partir de ella se compararon en cuanto a sus parámetros de crecimiento, contenido de lípidos totales y de los ácidos grasos poliinsaturados través de análisis de varianza de un factor (cepas: mutadas y silvestre) (SOKAL & ROLF, 1995).

RESULTADOS

Las colonias de la cepa de *Tetraselmis tetrathele* (CCPUDO-19) se hicieron visibles en el medio f/2 sólido después de 22 días de su siembra. La aparición de colonias aisladas (Figura 1) permitió seleccionar una e iniciar cultivos clonales, los cuales se utilizaron durante el desarrollo de esta investigación.



Figura 1. Colonias de *Tetraselmis tetrathele* (CCPUDO-19) en medio f/2 sólido, después de 20 días de siembra

SENSIBILIDAD DE *TETRASELMIS TETRATHELE* AL QUIZALOFOP

La cepa de *Tetraselmis tetrathele* mostró alta sensibilidad al Quizalofop. Concentraciones de este herbicida superiores a 100 μM ocasionaron mortalidades masivas de las células de esta microalga. Tomando en consideración que 100 μM de Quizalofop produjo una tasa de supervivencia del 10% en *T. tetrathele* (Figura 2), se escogió esta concentración para seleccionar los mutantes con una posible capacidad de incremento de lípidos y ácidos grasos.

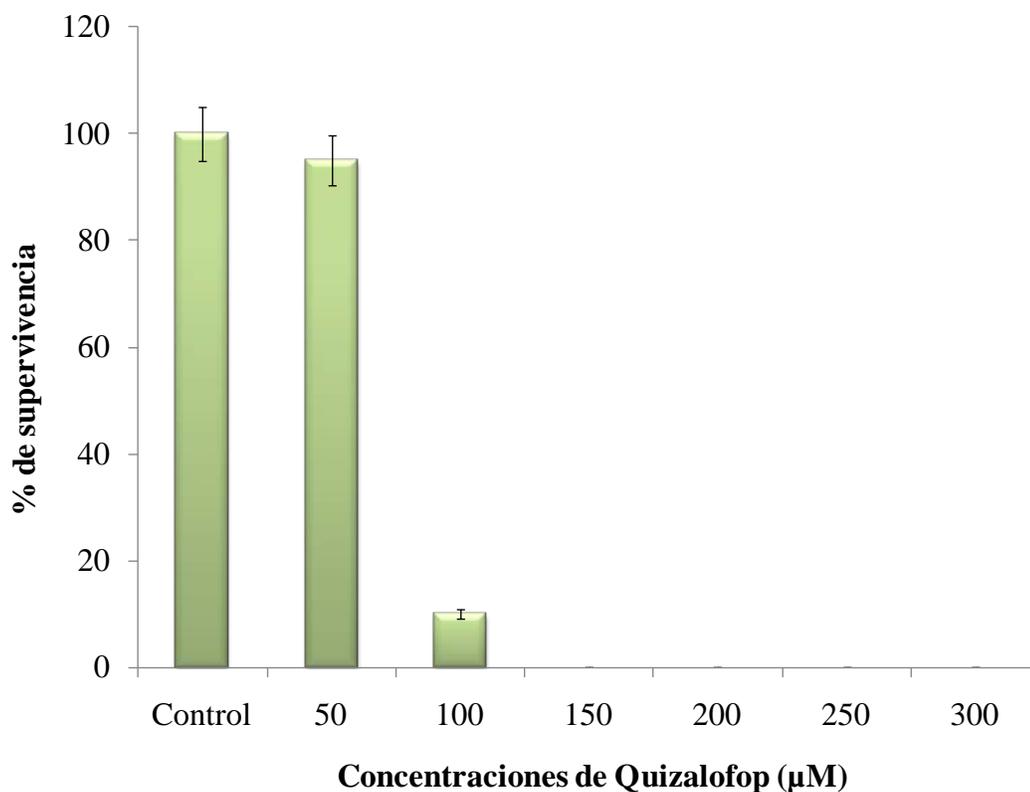


Figura 2. Efecto del Quizalofop sobre la tasa de supervivencia (promedio \pm desviación estándar) de células de *T. tetrahele*.

Mutagénesis

La supervivencia de las células de *Tetraselmis tetrahele* expuestas a 0,1 M de EMS disminuyó drásticamente a medida que aumentó el tiempo de exposición a este mutágeno. Después de 45 minutos de exposición, se observó una mortalidad total de las células. Los tiempos de exposición de 15, 30 y 45 minutos ocasionaron porcentajes de supervivencia de 26, 22 y 21%, respectivamente (Figura 3). Cinco mutantes pertenecientes a cada uno de estos tiempos de exposición fueron aislados y cultivados separadamente en 5 ml de medio f/2 durante 15 días, aplicando irradiancia continua de 50 $\mu\text{moles}/\text{m}^2/\text{s}$ y $23 \pm 1^\circ\text{C}$. Después de 15 días de cultivo, la densidad celular de cada uno de los mutantes se comparó con la obtenida por la cepa silvestre. En la figura 4 se observa que los mutantes 15c (células expuestas durante 15 minutos

a 0,1 M de EMS), 30a (células expuestas durante 30 minutos a 0,1 M de EMS) y 45c (células expuestas durante 45 minutos a 0,1 M de EMS) fueron los que mostraron las mayores densidades celulares, con valores de $2,8 \times 10^6$ cél/ml; $2,9 \times 10^6$ cél/ml y $1,7 \times 10^6$ cél/ml, respectivamente. Estos mutantes se eligieron para ser sometidos al tratamiento de selección con Quizalofop.

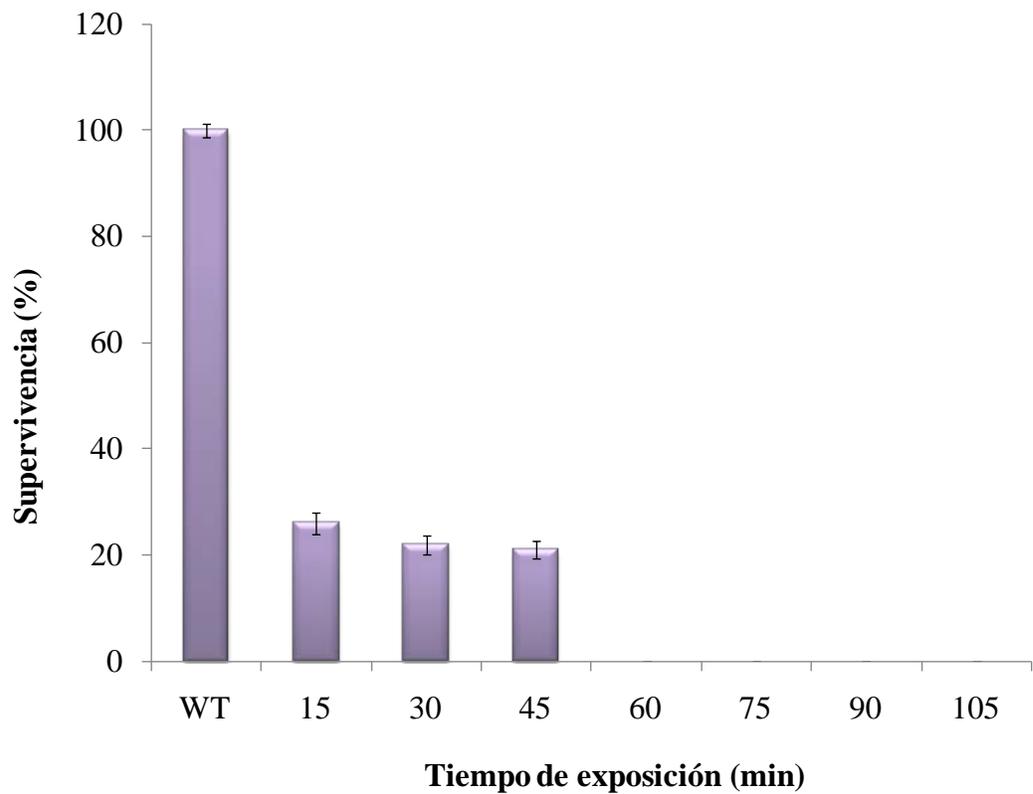


Figura 3. Efecto del tiempo de exposición a 0,1M de EMS sobre la tasa supervivencia (promedio \pm desviación estándar) de *Tetraselmis tetrathele*.

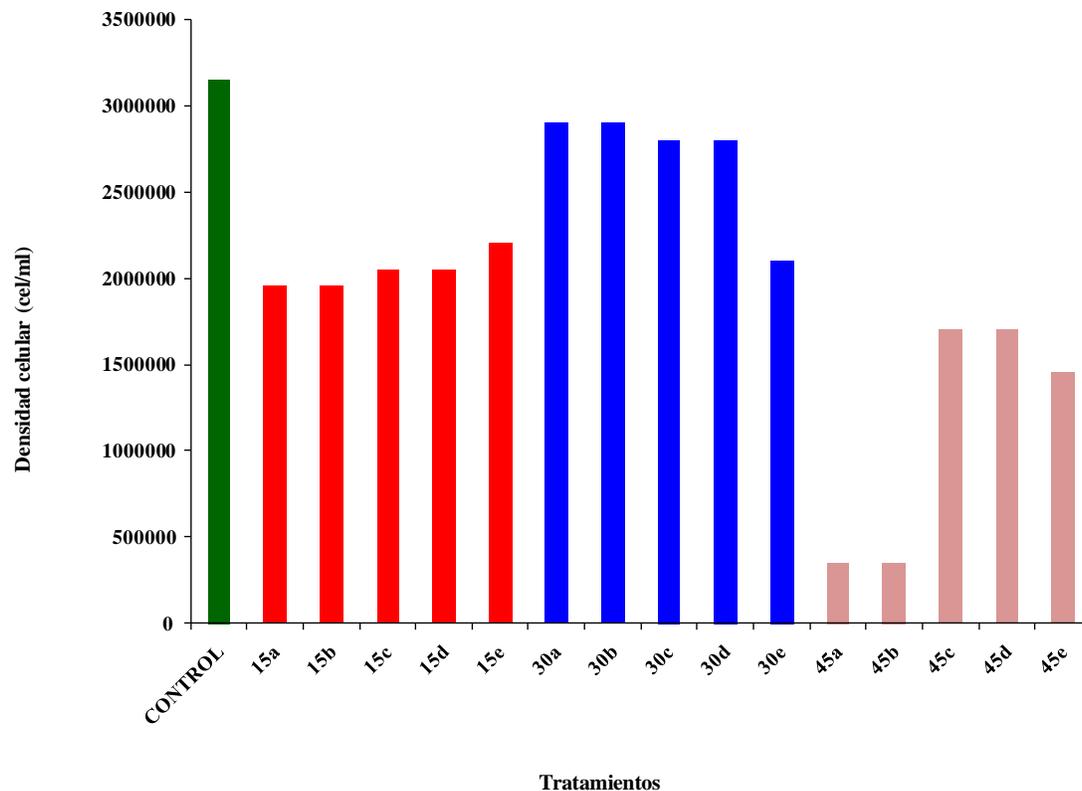


Figura 4. Densidades celulares (cél/ml) de los mutantes seleccionados después de 15 días de cultivo en medio f/2, bajo una irradiancia de $50 \mu\text{moles}/\text{m}^2/\text{s}$ y a $23 \text{ }^\circ\text{C}$

Selección de los mutantes

Los tres mutantes seleccionados (15c, 30a y 45c) fueron cultivados, durante 20 días, en medio f/2 conteniendo $100 \mu\text{M}$ de Quizalofop. La figura 5 muestra las curvas de crecimiento obtenidas por estos mutantes y la cepa silvestre en presencia del Quizalofop. Todas las cepas mutantes y muy especialmente la cepa silvestre (murió a los 14 días de cultivo) fueron afectadas por la presencia del Quizalofop; sin embargo, las cepas 15c y 30a fueron las que más crecieron, lo cual demuestra su alta resistencia a este herbicida y, por esta razón se seleccionaron para los análisis de lípidos y ácidos grasos.

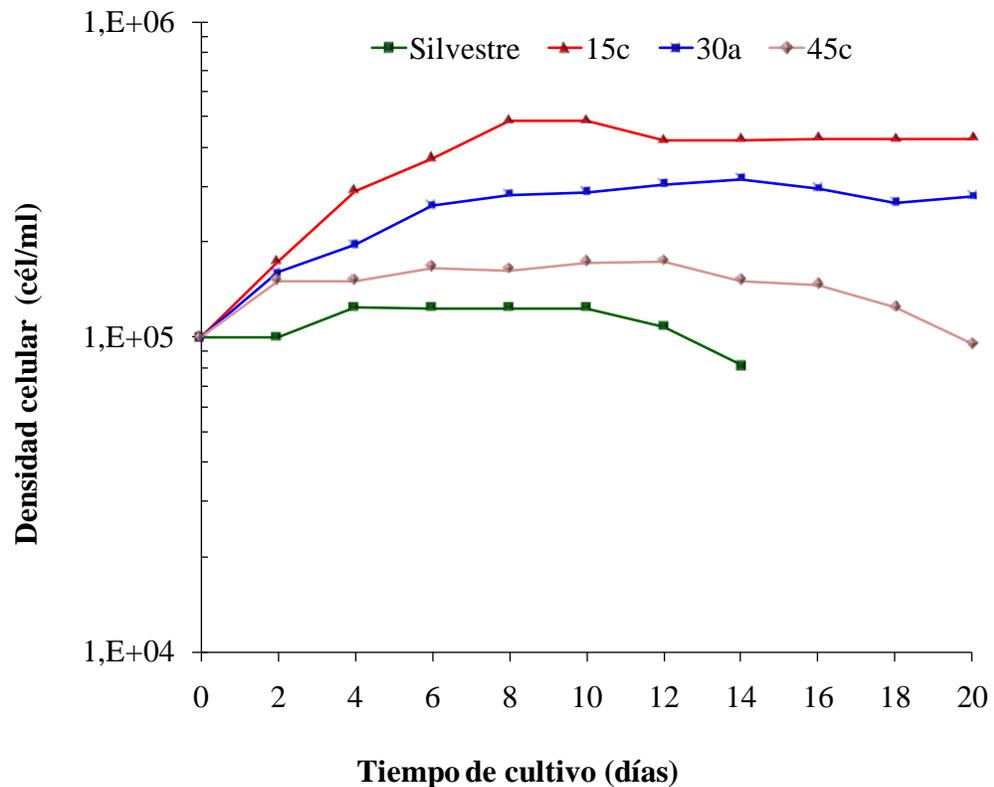


Figura 5. Crecimiento de mutantes (15C, 30A y 45C) y la cepa silvestre de *Tetrastelmis tetrathele* en medio f/2 con Quizalofop (100 μ M).

PARÁMETROS DE CRECIMIENTO, CONTENIDO DE LÍPIDOS TOTALES, Y ÁCIDOS GRASOS DE LOS MUTANTES Y DE LA CEPA SILVESTRE CULTIVADA BAJO CONDICIONES DE CULTIVO ESTÁNDAR

Crecimiento

El crecimiento, medido como máximas densidades celulares y tasas de crecimiento instantáneo de las cepas mutantes (15c y 30a) y silvestre (Figura 6) mostró diferencias no significativas ($p > 0,05$). Las mayores densidades celulares alcanzadas por estas cepas fueron $1,5 \times 10^6$ cél/ml; $1,3 \times 10^6$ cél/ml y $1,5 \times 10^6$ cél/ml,

respectivamente. Por su parte, la tasa de crecimiento instantánea (K) fue de $0,5 \pm 0,08$ div/día.

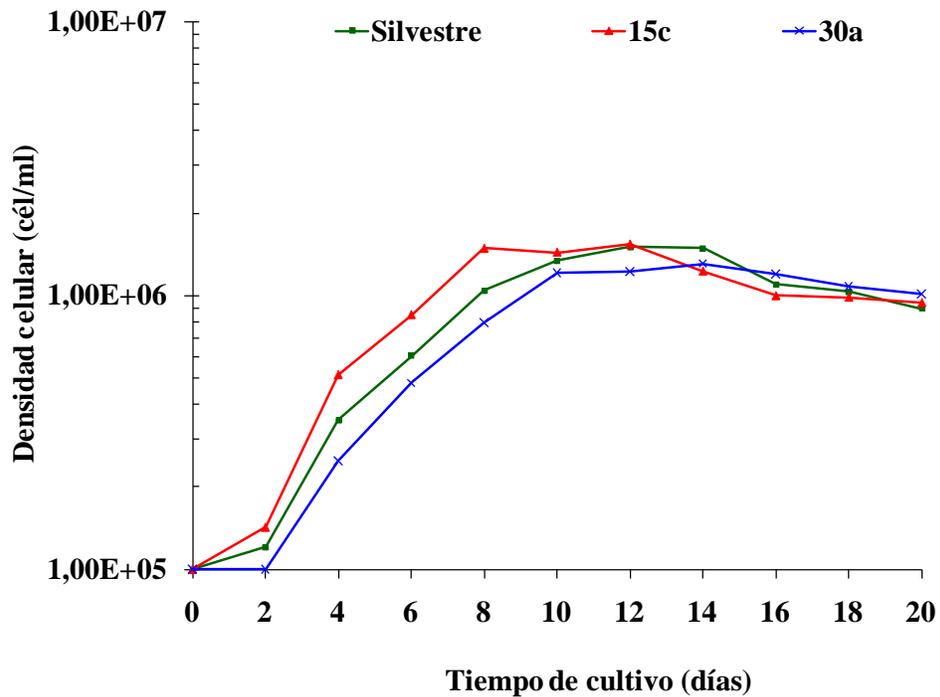


Figura 6. Curvas de crecimiento de mutantes (15c y 30a) y cepa silvestre (control) de *Tetraselmis tetraethele* en medio f/2 bajo condiciones estándar de cultivo.

Lípidos totales y ácidos grasos.

Los contenidos de lípidos totales y ácidos grasos de la cepa silvestre y los mutantes seleccionados, al ser sometidos a condiciones de cultivo estándar, se muestran en la Tabla 1. Los lípidos totales de los mutantes 15c y 30a fueron 85% y 62%, respectivamente, más altos que los de la cepa silvestre ($p < 0,05$) ($P = 0,000$; $F_s = 149,08$).

Las cepas mutantes también presentaron mayores ($p < 0,05$) contenidos de ARA ($P = 0,0003$; $F_s = 39,77$), EPA ($P = 0,0115$; $F_s = 10,31$) y DHA ($P = 0,0208$; $F_s = 7,90$) que la cepa silvestre. Los contenidos de ARA de las cepas 15c y 30a fueron 92% y 90%, respectivamente, más altos que los de la cepa silvestre. Los valores de EPA y

DHA cuantificados en los dos mutantes superaron en más de un 25% a los obtenidos en la cepa silvestre (Tabla 1).

Tabla 1. Perfil de ácidos grasos de las cepas silvestre y mutantes (15c y 30a) de *Tetraselmis tetraathele*. EMAG: ésteres metílicos de ácidos grasos.

EMAG	Silvestre	15c	30a
14:00	12,1	11,4	11,0
15:00	6,5	5,7	5,9
16:00	12,0	11,2	11,1
18:00	5,7	6,4	6,2
20:00	3,1	2,6	2,7
ΣSaturados	39,4	37,3	36,9
16:1n-9	15,3	13,1	13,7
18:1n-9	3,7	2,9	3,4
20:1n-11	0,4	0,3	0,4
22:1n-9	0,2	0,2	0,2
ΣMonoinsaturados	19,6	16,5	17,7
18:2n-6	6,5	5,8	6,0
18:3n-3	6,6	10,3	9,2
20:3n-3	1,6	1,2	1,4
20:4n-6 ARA	4,0	7,7	7,6
20:5n-3 EPA	7,6	10,0	10,2
22:2n-6	1,8	1,8	1,5
22:5n-3	8,0	3,3	3,3
22:6n-3 DHA	4,7	5,9	6,1
ΣPoliinsaturados	40,8	46,0	45,3
n-3	28,5	30,7	30,2
n-6	10,5	13,5	13,6
DHA/EPA	0,61	0,6	0,6
Lípidos totales	8,8±0,32	16,3±0,81	14,3±0,39

DISCUSIÓN

El programa de mutación-selección, como técnica de mejoramiento genético de *Tetraselmis tetrathele*, permitió obtener dos mutantes de esta cepa con un incrementado contenido de lípidos totales y de PUFAs. Dichos mutantes han mantenido esta condición durante ocho meses, en medios carentes de Quizalofop, lo cual es indicativo de que no se han producido reversiones espontáneas que pudieran restaurar el fenotipo silvestre (VAN DER MEER & ZHANG, 1988).

La mutación inducida con mutágenos químicos, como estrategia para incrementar el contenido de lípidos y PUFAs no ha sido documentada en *T. tetrathele*, por lo cual es un aporte novedoso de la presente investigación. Al igual que con *T. tetrathele*, esta metodología también permitió mejorar genéticamente a otras microalgas. Así por ejemplo, CHATURVEDI *et al.* (2004) y CHATURVEDI & FUJITA (2006) en *Nannochloropsis oculata* y GUEVARA (2011) en *Rhodomonas salina*, lograron incrementar significativamente el contenido de lípidos y PUFAS.

La efectividad del EMS como mutágeno se debe a que este compuesto actúa como agente alquilante, es decir agrega un grupo etilo a la guanina, produciendo O-6-etilguanina, el cual se aparea con la timina, en lugar de la citosina. Por lo tanto, produce una transición C:G a T:A. De igual manera, puede agregar un grupo etilo a la timina y produce 4-etilamina, que luego se aparea con la guanina, lo que conduce a la transición T:A a C:G (PIERCE, 2006). Estudios en diversos organismos, incluyendo microalgas, han demostrado que el EMS es un mutágeno eficiente que causa principalmente transiciones G:C a A:T, lo que indica que la O-6-etilguanina es la primera causa de mutaciones *in vivo* (EISENSTADT, 1987, CHATURVEDI *et al.*, 2004).

Los contenidos de PUFAs (ARA, EPA y DHA) mostrados por las cepas mutantes en la presente investigación, superan a los referidos para la cepa silvestre de *T. tetrathele* por DE LA PEÑA & VILLEGAS (2005) y FARHADIAN *et al.* (2009). La ventaja que poseen los cultivos de las cepas mutantes sobre las cepas silvestres es que

éstas no necesitan de condiciones de cultivo extremas (altas o muy bajas temperaturas e irradiancias, deficiencia de nutrientes, entre otros) para acumular altos contenidos de PUFAs.

Los altos contenidos de PUFAs (DHA: 6%, ARA: 8% y EPA: 10%) en los mutantes de *Tetraselmis tetrathele* los catalogan como idóneos para la acuicultura. Numerosos estudios han demostrado que larvas de peces y crustáceos requieren de 1% de DHA en la dieta para su normal desarrollo (SARGENT *et al.*, 1989; TAKEUCHI *et al.*, 1996; FARHADIAN *et al.*, 2009). Además, varios investigadores han señalado la importancia del ARA y el EPA en la nutrición de las larvas de peces, dado que fortifican el sistema inmune y disminuyen la tasa de mortalidad, producto del estrés de las labores de cultivo (BELL & SARGENT, 2003; CHÁVEZ *et al.*, 2005).

Otro criterio considerado en la acuicultura para la selección de dietas es la relación DHA/EPA. A juicio de NAESSENS *et al.* (1995), las dietas que poseen una relación DHA/EPA entre 0,5-1,5 producen un mayor crecimiento y supervivencia de larvas de camarones. En esta investigación, la relación DHA/EPA fue de 0,6, lo que podría sugerir la efectividad que tendrían los mutantes de *T. tetrathele* como posibles alimentos de camarones.

Los resultados obtenidos en esta investigación demuestran la utilidad de la mutación-selección como estrategia para mejorar genéticamente a *T. tetrathele*, ya que esta técnica posee ventajas cuando se desconocen los mecanismos de regulación de los genes que participan en la ruta de biosíntesis del compuesto de interés o en que las metodologías de mutagénesis sitio dirigida y transgenia están poco desarrolladas, como es el caso de la mayoría de las microalgas

CONCLUSIONES

La mutación-selección aplicada a la microalga *Tetraselmis tetrathele* permitió obtener dos cepas mutantes con un incrementado contenido de lípidos y ácidos grasos poliinsaturados.

Concentraciones mayores de 0,1 M de EMS producen la mortalidad total de las células de *T. tetrathele*.

Concentraciones mayores de 100 μ M de Quizalofop ocasionan la mortalidad total de células de *T. tetrathele*.

Los lípidos totales de los mutantes 15c y 30a fueron 85% y 62%, respectivamente, más altos que los de la cepa silvestre.

Los contenidos de ARA de las cepas 15c y 30a fueron 92% y 90%, respectivamente, más altos que los de la cepa silvestre. Los valores de EPA y DHA superaron en más de un 25% a los obtenidos en la cepa silvestre.

RECOMENDACIONES

Estudios moleculares que incluyan análisis de genes involucrados en la síntesis de lípidos son necesarios para elucidar el o los genes mutados, lo cual aportaría información relevante en el área de la fisiología y genética microalgal, áreas de estudios que actualmente deficientes.

Se recomienda comparar el crecimiento y supervivencia de organismos zooplanctónicos (rotíferos, copépodos y artemia), larvas de moluscos, crustáceo y peces alimentados tanto con las mutantes 15c y 30a como con la cepa silvestre.

BIBLIOGRAFÍA

ABALDE, J.; CID, A.; FIDALGO, P.; TORRES, E. & HERRERO, C. 1995. *Microalgas: Cultivo y Aplicaciones. Monografía N° 26*. Universidad de La Coruña, España 210 pp.

ALIKHANIAN, S. 1962. Induced mutagenesis in the selection of microorganisms. *Adv. Appl. Microbiol.*, 4: 1-50.

ALONSO, D.; CASTILLO, C.; GRIMA, E. & COHEN, Z. 1996. First insights into improvement of eicosapentaenoic acid content in *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae) by induced mutagenesis. *J Phycol* 32: 339–345.

BARSANTI, L. & GUALTIERI, P. 2006. *Algae. Anatomy, biochemistry, and biotechnology*. Taylor & Francis group. 301 pp.

BELL, J. & SARGENT, J. 2003. Arachidonic acid in aquaculture feeds: current status and future opportunities. *Aquaculture*, 218: 491-499.

BLIGH, E. & DYER, W. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.*, 37: 911-917.

BUTCHER R. 1959. An introductory account of the smaller algae of the British coastal waters. Part I: Introduction of Chlorophyceae *Fish. Invest. Lon.*, 4: 1-74.

BURRASCANO, C. & SPENCER, K. 1988. *Dunaliella salina* strain selection for beta-carotene production. *J. Phycol.*, 24: 18.

CABRERA, S. & MONTECINO, V. 1987. Fotosíntesis y cultivo masivo de microalgas. *Invest. Pesq.*, 23: 455-463.

CALAM, C. 1970. Improvement of micro-organisms by mutation, hibridization and selection. En *Methods in Microbiology* Norris, J. & Ribbons, D (eds.). Academic Press, Inc. New York. USA. 435-459 pp.

CAÑIZARES, R.; MOLINA, G. & DOMÍNGUEZ, A. 1995. Composición química de dos microalgas marinas utilizadas como alimento en maricultura. *Crypt. Algol.* 15 (2): 121-133.

CHATUVERDI, R.; RAO, S.; AMIN, M. & FUJITA, Y. 2004. Isolation of quizalofop-resistant mutants of *Nannochloropsis oculata* (Eustimagnetophyceae) with

high eicosapentanoic acid following N-methyl-Nnitrosourea-induced random mutagenesis. *J. Appl. Phycol.*, 16: 135-144.

CHATUVERDI, R. & FUJITA, Y. 2006. Isolation of enhanced eicosapentaenoic acid producing mutants of *Nannochloropsis oculata* ST-6 using ethyl methane sulfonate induced mutagenesis techniques and their characterization at mRNA transcript level. *J. Res.*, 54: 208-219.

CHAVEZ, D.; OGATA, H.; GARIBAY, E.; SOLLESTA, H.; TIBUBOS, K. & FURUITA, H. 2005. Improved diets by arachidonic acid supplementation and squid meal in fry production of tropical fish. In: *Studies on Sustainable Production Systems of Aquatic Animals in Brackish Mangrove Areas. Book of Abstract*. Japan International Research Center for Agriculture Science (JIRCAS), Owashi, Tsukuba, Ibaraki, Japan. 21pp. 7–8.

CHOI, Y.; CHOI, J.; HAN, D.; KIM, H.; LEE, M.; KIM, H.; LEE, J.; CHUNG, H. & KIM, C. 2010. Optimization of replacing pork back fat with grape seed oil and rice bran fiber for reduced-fat meat emulsion systems. *Meat. Science.*, 84 (1): 212-218.

COHEN, Z. & RATLEDGE, C. 2005. *Single cell oils*. Champaign, III. AOCS press. 1-20 pp.

DE LA PEÑA, M. R & VILLEGAS, C. 2005. Cell growth, effect of filtrate and nutritive value of the tropical Prasinophyte *Tetraselmis tetrathele* (Butcher) at different phases of culture. *Aquacult. Res.*, 36, 1500-1508.

EISENSTADT, E. 1987. Analysis of mutagenesis. In Neidhardt FC(eds), *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. Cellular and Molecular Biology. American Society for Microbiology, Washington, DC, 1016–1033 pp.

ERTOLA, R.; YANTORNO, O. y MIGNONE, C. -1994 - *Microbiología Industrial. Secretaría General de la O.E.A. Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico*. Washington, D.C. 103 pp.

FARHADIAN, O.; Md YUSO, F. & MOHAMED, S. 2009. Nutritional values of *Apocyclops dengizicus* (Copepoda: Cyclopoida) fed *Chaetoceros calcitrans* and *Tetraselmis tetrathele*. *Aquacult. Res.*, 40: 74-82

GODÍNEZ, D GALLO, M.; GELABERT, R.; DÍAZ, A.; GAMBOA, J.; LANDA, V. & GODÍNEZ, E. 2004. Crecimiento larvario de *Artemia franciscana* (Kellog, 1906) alimentada con dos especies de microalgas vivas. *Zootec. Trop.*, 22 (3): 265-276.

GÓMEZ, P. & GONZÁLEZ, M. 2001. Genetic polymorphism in eight Chilean strain of the carotenogenic microalga *Dunaliella salina* Teodoresco (Chlorophyta). *Biol. Res.*, 3: 423-430.

GRIFFITHS, A.; GELBART, W.; MILLER, J. & LEWOTIN, R. 2000. *Genética moderna*. McGraw-Hill. Interamericana, Madrid. 676 pp.

GUEVARA, M. 2011. *Optimización de las condiciones de cultivo y mejoramiento genético como estrategias para incrementar el valor nutricional de Rhodomonas salina (Wislouch) Hill & Wetherbee (1989) (Cryptophyta) como alimento para la acuicultura*. Tesis Doctorado. Universidad de Concepción, Chile.

GUILLARD, R. 1975. Culture of Phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: *Culture of marine invertebrate animals* (Eds. W.L. Smith and M. H. Chanley), Plenum Book Publ. Corp., New York, 29-60 pp.

HARRIS, E. 2001. *Chlamydomonas* as a model organism. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant. Mol. Biol.*, 52: 363-406.

HU, H. & GAO, K. 2006. Response of growth and fatty acid compositions of *Nannochloropsis* sp. to environmental factors under elevated CO₂ concentration. *Biotechnol. Lett.*, 28 (13): 987-992.

http://www.alacrastore.com/storecontent/Thomson_Venture_Economics/Micro_bio_Resources_Inc-Y6232. Visitada el 20 de febrero de 2010.

IZQUIERDO, M. 1996. Essential fatty acid requirements of cultured marine fish larvae. *Aquacult. Nutr.*, 2: 183-191.

LEÓN, R.; VILA, M.M QUIJANO, E.; González, D.; Galván, A. & Fernández, E. 2003. *Manipulación genética para la utilización en la alimentación de especies de interés acuícola*. CIVA. 2003. 504-511.

LIAN, M.; HUANG, H.; REN, L.; JI, X.; ZHU, J. & JIN, L. 2009. Increase of docosahexaenoic acid production by *Schizochytrium* sp. through mutagenesis and enzyme assay. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 159 (3): 547-556

LÓPEZ-ALONSO, D.; SEGURA DEL CASTILLO, C.; MOLINA, E. & COHEN, Z. 1996. First insights into improvement of eicosapentanoic acid content in *Phaeodactylum tricorutum* (Bacillariophyceae) by induced mutagenesis. *J. Phycol.*, 18: 339-345.

LORA-VILCHIS, M.; ROBLES-MUNGARAY, M. y DOKTOR, N. 2004. Food value

of four microalgae for juveniles of the Lion's Paw Scallop *Lyropecten subnodosus* (Sowerby, 1833). *J. World Aquacult. Soc.*, 35: 297–303.

MADIGAN, M., MARTINKO, J. & PARKER, J. 1999. *Brock. Biología de los Microorganismos. 8va edición revisada*. Prentice Hall, Madrid. 1064 pp.

MARSH, J. & WEINSTEIN, D. 1966. Simple charring method for determination of lipids. *J. Lipids. Res.*, 7: 574-592.

MEIRELES, L.; GUEDES, A. & MALCATA, F. 2003. Increase of eicosapentanoic and docosahexaenoic acids by the microalga *Pavlova lutheri* following random mutagenesis. *Biotech. Bioeng.*, 81 (1): 50-55.

NAPOLITANO, E.; ACKMAN, R. & RATNAYAKE, W. 1990. Fatty acid composition of three cultured algal species (*Isochrysis galbana*, *Chaetoceros gracilis* and *Chaetoceros calcitrans*) used as food for bivalve larvae. *J. World Aquacul. Soc.*, 37: 22-30.

NAESSENS, E.; WOUTERS, M.; COBO, M.; VARGAS, A.; PEDRAZZOLI, A.; VAN HAUWAERT, A. & LAVENS, P. 1995. Effect n-e HUFA and DHA/EPA ratio enriched live feed on fatty acid composition and culture performance of *Penaeus vannamei* larvae. En: *Fish & Shellfish larviculture symposium. European Aquaculture Society, Special Publication N° 24*. Belgium.

PIERCE, B. 2006. *Genética. Un enfoque conceptual. 2^{da} edición*. Editorial médica Panamericana. 720 pp.

QUEENER, S. & LIVELY, D. 1986. Screening and selection for strain improvement. En *Manual of microbiology and biotechnology* Demain, L. & Solomon, N (eds). American Society for Microbiology. Washington, D. C. USA. 155-159 pp.

RENAUD, S.; LUONG-VAN, T.; LAMBRINIDIS, G. & PARRY, D. 2002. Effect of temperature on growth, chemical composition and fatty acid composition of tropical microalgae grown in batch cultures. *Aquaculture*, 211: 195-214.

RICHMOND, A. 2004. *Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology*. Oxford: Blackwell Science. Oxford, UK. 566 pp.

RONQUILLO, J.; MATIAS, J.; SAISHO, T & YAMASAKI, S. 1997. Culture of *Tetraselmis tetrathele* and its utilization in the hatchery production of different penaeid shrimps in Asia. *Hidrobiology*, 358: 237-244.

SÁNCHEZ, H.; MORALES, J.; VARGAS, J. & OLIVEROS, R. 2008. Producción de la microalga *Nannochloropsis oculata* (Droop) hibberd en medios enriquecidos con ensilado biológico de pescado. *Ecol. Aplic.*, 7(1,2): 149-158.

SARGENT, J.; HENDERSON, R. & TOCHER, D. 1989. *The lipids in fish nutrition*. Academic press. New York, USA.153-218.

SATO, N. & MURATA, N. 1988. Membrane Lipids. *Meth. Enzimol.*, 167: 251-259.

SOKAL, R. & ROHLF, F. 1995. *Biometry*. Ed. W. Freeman, New York, 887 pp.

SHAISH, A.; BEN-AMOTZ, A. & AVRON, M. 1991. Production and selection of high β -carotene mutants of *Dunaliella bardawil* (Chlorophyta). *J. Phycol.*, 27: 652-656.

TAKEUCHI, T.; MASUDA, R.; ISHIZAKI, Y.; WATANABE, T.; KANEMATSU, M.; IMAIZUMI, K. & TSUKAMOTO, K. 1996. Determination of the requirement of larval striped jack for eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid using enriched *Artemia nauplii*. *Fish. Sci.*, 62: 760-765.

TEOH, M.; CHU, W.; MARCHANT, H & PHANG, S. 2004. Influence of culture temperature on the growth, biochemical composition and fatty acid profiles of six Antarctic microalgae. *J. Appl Phycol.*, 16: 421-430.

TONON, T.; HARVEY, D.; LARSON, T. & GRAHAM, A. 2002. Long chainpolyunsaturated fatty acid production and partitioning to triacylglycerols in fourmicroalgae. *Phytochem.*, 61: 15-24.

VAN DER MEER, J. & ZHANG, X. 1988. Similar unstable mutations in there species of *Gracilaria* (Rhodophyta). *J. Phycol.*, 24: 198-202.

YEN DOAN, T. & OBBARD, J. 2012. Enhanced intracellular lipid in *Nannochloropsis* sp. via random mutagenesis and flow cytometric cell sorting. *Alg. Res.*, 1: 17-21.

YONG, C., DEFA, L., WENQING, L., JIANJUN, X., BODI, H. & YASHAN, H. 2003. Screening and characterization of astaxanthin-hyperproducing mutants of *Haematococcus pluvialis*. *Biotechnol. Lett.*, 25: 527-529.

ZHANG, D., Lee, Y., Ng, M. & Phang, S. 1997. Composition and accumulation of secondary carotenoids in *Chlorococcum* sp. *J. Appl. Phycol.*, 9: 147-155.

ANEXOS

1. Descripción de la microalga

Tetraselmis tetrathele (Butcher) es una microalga con forma ovoide que posee cuatro flagelos y mide entre 14 y 16,0 μm de longitud y de 8,0 a 11,0 μm de ancho (BUTCHER, 1959). Su clasificación taxonómica es:

Dominio: Eukaryota

Reino: Viridiplantae

División: Chlorophyta

Clase: Prasinophyceae

Orden: Chlorodendrales

Familia: Chlorodendraceae

Género: *Tetraselmis*

Especie: *Tetraselmis tetrathele*



2. Medio de cultivo

Medio F/2 Guillard

DISOLUCIÓN DE MACRONUTRIENTES

1)	NaNO ₃	7,5 g/100 ml de agua destilada
2)	NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	0,5 g/100 ml de agua destilada
3)	Na ₂ SiO ₃ .9H ₂ O	3 g/100 ml de agua destilada. Sólo para diatomeas

Esterilizar por separado las soluciones 1,2,3 a 120°C y 15 lb/in² durante 15 minutos.

DISOLUCIÓN DE METALES TRAZAS

4)	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,49 g/50 ml de agua destilada
5)	ZnSO ₄ .7H ₂ O	1,10 g/50 ml de agua destilada
6)	CoCl ₂ .6H ₂ O	0,5 g/50 ml de agua destilada
7)	MnCl ₂ .4H ₂ O	1,8 g/50 ml de agua destilada
8)	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,31g/50 ml de agua destilada
9)	Na ₂ EDTA	4,36 g
9)	FeCl ₃ .6H ₂ O	3,15 g
9)	Agua destilada	Hasta 800 ml

Dilución: 1 ml de (4), (5), (6), (7) y (8) en la disolución (9) y completar hasta un litro con agua destilada. Esterilizar a 120°C y 15 lb/in² durante 15 minutos.

Nota: el pH de esta solución es de aproximadamente 2,0 y permanecerá clara si es mantenida a ése pH. Puede ser elevado a pH 4,5 agregando 7 ml de NaOH 1N, pero se formará un precipitado. El efecto del pH 2 en la formulación final del medio es mínimo.

Disolución de vitaminas

10)	Biotina	1,09 mg/10,5 ml de agua destilada
11)	Cianocobalamina	1,18 mg/10.5 ml

Dilución: 1 ml de (10), 1 ml de (11), 20 mg de Tiamina- HCl hasta 100 ml de agua destilada.

Medio de cultivo: 1 ml de (1), 1 ml de (2), 1 ml (3, si es diatomea), 1 ml de la disolución de metales trazas y 0,5 ml de la disolución de vitaminas en 1 litro de agua de mar filtrada y esterilizada

HOJA DE METADATOS

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 1/6

Título	Evaluación de un programa de mutación-selección, como técnica de mejoramiento genético, para incrementar el contenido lipídico de una cepa de <i>Tetraselmis tetrathele</i> (West, G.S) Butcher, 1959.
Subtítulo	

Autor(es)

Apellidos y Nombres	Código CVLAC / e-mail	
Roraysi José Cortez Mago	CVLAC	12660815
	e-mail	roraysi@yahoo.com
	e-mail	

Palabras o frases claves:

<i>Tetraselmis tetrathele</i> , mutantes, EMS, Quizalofop, ácidos grasos poliinsaturados.

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 2/6

Líneas y sublíneas de investigación:

Área	Subárea
Ciencias	Biología

Resumen (abstract):

La biomasa microalgal con altos contenidos de lípidos y de ácidos grasos poliinsaturados, PUFAs, para ser usada como alimento en la acuicultura, suele obtenerse mediante la aplicación de condiciones de cultivo extremas (deficiencia de nutrientes, altas irradiancias y bajas temperaturas), las cuales limitan el crecimiento de las microalgas y encarecen los costos de producción. Una alternativa a esta problemática es la aplicación de la mutación-selección como estrategia de mejoramiento genético. Con la finalidad de evaluar esta técnica, en la presente investigación se sometió a la microalga *Tetraselmis tetraele* a diferentes tiempos de exposición (0- 105 min) con el mutágeno EMS (0,1M). Los posibles mutantes con una incrementada acumulación de lípidos y PUFAs fueron seleccionados utilizando Quizalofop (100 μ M), un inhibidor de la síntesis de lípidos. Dos cepas mutantes (15C y 30A) fueron seleccionadas, cultivadas bajo condiciones de cultivo estándar (temperatura 23 ± 1 °C, iluminación 50 μ moles/m²/s y fotoperiodo 12:12) y comparadas con la cepa silvestre en cuanto su crecimiento, contenido de lípidos totales y PUFAs. El crecimiento de las cepas mutantes 15C y 30A fue similar ($P > 0,05$) al mostrado por la cepa silvestre, con densidades celulares máximas de $1,5 \times 10^6$ cél/ml, $1,3 \times 10^6$ cél/ml y $1,5 \times 10^6$ cél/ml, respectivamente. Los lípidos totales de los mutantes 15C y 30A fueron 85% y 62%, respectivamente, más altos que los de la cepa silvestre. Los contenidos de ARA de las cepas 15C y 30A fueron 92% y 90%, respectivamente, más altos que los de la cepa silvestre. Los valores de EPA y DHA cuantificados en los dos mutantes superaron en más de un 25% a los obtenidos en la cepa silvestre. Los resultados obtenidos en esta investigación demuestran la utilidad de la mutación-selección como estrategia para mejorar genéticamente a *T. tetraele*, ya que esta técnica posee ventajas cuando se desconocen los mecanismos de regulación de los genes que participan en la ruta de biosíntesis del compuesto de interés o en que las metodologías de mutagénesis sitio dirigida y transgenia están poco desarrolladas, como es el caso de la mayoría de las microalgas.

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 3/6

Contribuidores:

Apellidos y Nombres	ROL / Código CVLAC / e-mail	
Miguel Guevara	ROL	CA <input type="checkbox"/> A <input checked="" type="checkbox"/> T <input type="checkbox"/> JU <input type="checkbox"/>
	CVLAC	9284641
	e-mail	
	e-mail	
Carmen Alfonsi	ROL	CA <input type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> T <input type="checkbox"/> JU <input checked="" type="checkbox"/>
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	
Sonia Subero	ROL	CA <input type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> T <input type="checkbox"/> JU <input checked="" type="checkbox"/>
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	

Fecha de discusión y aprobación:

Año Mes Día

2012	08	02
------	----	----

Lenguaje: spa

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 4/6

Archivo(s):

Nombre de archivo	Tipo MIME
PG-Cortez.Doc	Aplication/Word

Alcance:

Espacial : **Nacional** (Opcional)

Temporal: **Temporal** (Opcional)

Título o Grado asociado con el trabajo: MAGISTER SCIENTIARUM EN CIENCIAS MARINAS MENCIÓN BIOLOGÍA MARINA

Nivel Asociado con el Trabajo: MAGISTER SCIENTIARUM

Área de Estudio: Biología

Institución(es) que garantiza(n) el Título o grado:

Universidad de Oriente

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 5/6



UNIVERSIDAD DE ORIENTE
CONSEJO UNIVERSITARIO
RECTORADO

CUN°0975

Cumaná, 04 AGO 2009

Ciudadano
Prof. JESÚS MARTÍNEZ YÉPEZ
Vicerrector Académico
Universidad de Oriente
Su Despacho

Estimado Profesor Martínez:

Cumplo en notificarle que el Consejo Universitario, en Reunión Ordinaria celebrada en Centro de Convenciones de Cantaura, los días 28 y 29 de julio de 2009, conoció el punto de agenda **"SOLICITUD DE AUTORIZACIÓN PARA PUBLICAR TODA LA PRODUCCIÓN INTELECTUAL DE LA UNIVERSIDAD DE ORIENTE EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL DE LA UDO, SEGÚN VRAC N° 696/2009"**.

Leído el oficio SIBI – 139/2009 de fecha 09-07-2009, suscrita por el Dr. Abul K. Bashirullah, Director de Bibliotecas, este Cuerpo Colegiado decidió, por unanimidad, autorizar la publicación de toda la producción intelectual de la Universidad de Oriente en el Repositorio en cuestión.

UNIVERSIDAD DE ORIENTE
SISTEMA DE BIBLIOTECA
RECIBIDO POR *[Firma]*
FECHA 05/08/09 HORA 5:30

Comunicación que hago a usted a los fines consiguientes.

Cordialmente,

[Firma]
JUAN A. BOLANOS CUNTELE
Secretario



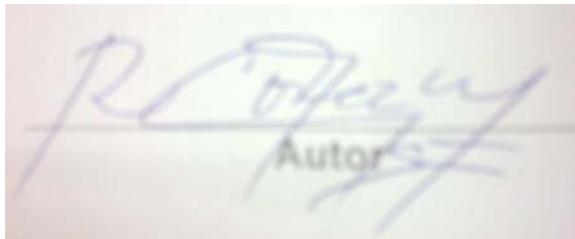
C.C: Rectora, Vicerrectora Administrativa, Decanos de los Núcleos, Coordinador General de Administración, Director de Personal, Dirección de Finanzas, Dirección de Presupuesto, Contraloría Interna, Consultoría Jurídica, Director de Bibliotecas, Dirección de Publicaciones, Dirección de Computación, Coordinación de Teleinformática, Coordinación General de Postgrado.

JABC/YGC/manuja

Apartado Correos 094 / Teléf: 4008042 - 4008044 / 8008045 Telefax: 4008043 / Cumaná - Venezuela

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 6/6

Artículo 41 del REGLAMENTO DE TRABAJO DE PREGRADO (vigente a partir del II Semestre 2009, según comunicación CU-034-2009): “Los trabajos de grados son de la exclusiva propiedad de la Universidad de Oriente, y solo podrá ser utilizados para otros fines con el consentimiento del Concejo de Núcleo respectivo, quien deberá participarlo previamente al Concejo Universitario, para su autorización”.



A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'R. Guevara', is written over a horizontal line. Below the line, the word 'Autor' is printed in a light blue font.

Jurado Examinador:

Prof. Miguel Guevara

(Tutor).....



A handwritten signature in blue ink is written over a horizontal line, positioned to the right of the text '(Tutor).....'.