



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S. C.

Programa de Estudios de Posgrado

**“GENERACIÓN, SELECCIÓN Y
CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y
CINÉTICA DE CEPAS MUTANTES DE
Phaeodactylum tricornutum (Bohlin)”**

T E S I S

Que para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

**Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales
(Orientación en Biotecnología)**

Presenta

Tania Castillo Marengo

La Paz, Baja California Sur, Septiembre del 2003.

Comité tutorial

Directora de tesis

Co-Director

Co-tutor

Co-tutor

Dra. Bertha O. Arredondo Vega
Dr. Francisco X. Arredondo Vega
Dra. Norma Y. Hernández Saavedra
Dr. Zvi Cohen

Comité revisor de tesis

Directora de tesis

Co-Director

Co-tutor

Dra. Bertha O. Arredondo Vega
Dr. Francisco X. Arredondo Vega
Dra. Norma Y. Hernández Saavedra

Sinodales

Directora de tesis

Co-Director

Co-tutor

Suplente

Dra. Bertha O. Arredondo Vega
Dr. Francisco X. Arredondo Vega
Dra. Norma Y. Hernández Saavedra
Dr. Adolfo García González

RESUMEN

Palabras clave: *P. triornutum*, EPA, mutagenesis

Los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs, por sus siglas en inglés), tales como el ácido eicosapentaenoico 20:5 ω -3 (EPA), se han reconocido por sus usos potenciales en la prevención y el tratamiento de diversas enfermedades. Las algas marinas, tales como la diatomea *Phaeodactylum triornutum* son la principal fuente de estos compuestos. El empleo de las mutaciones como sistema de mejoramiento genético tiene un gran potencial para incrementar la producción de ácidos grasos y otros metabolitos en algas. El objetivo del presente trabajo fue la obtención de una cepa mutante de *P. triornutum*, sobreproductora de EPA, por mutagenesis química, y su caracterización.

Mediante exposición de un cultivo de *P. triornutum* al mutágeno etil metano sulfonato (EMS), se generaron cepas mutantes de *P. triornutum* con una frecuencia de mutación que osciló entre 13 y 29%.

De forma paralela se realizaron pruebas con la cepa silvestre, para establecer parámetros físicos de selección de cepas mutantes con posibles modificaciones en su contenido de ácidos grasos. Se establecieron cambios de temperaturas e intensidad luminosa de incubación como factores de selección de cepas mutantes. El intervalo de temperatura propuesto para este fin fue 4 a 14°C con una intensidad luminosa de 87 $\mu\text{mol quanta m}^{-2}\text{s}^{-1}$, ya que bajo estas condiciones disminuye la tasa de crecimiento de la cepa silvestre sin que se afecte el contenido de EPA.

Como resultado de la mutagénesis, se aislaron aleatoriamente 66 colonias, las cuales fueron crecidas bajo las condiciones de estrés ambiental elegidas previamente. En esta etapa se seleccionaron 19 colonias que presentaron resistencia a los cambios en los parámetros de incubación e incrementaron su tasa máxima de crecimiento con respecto a la cepa silvestre. Cinco meses después de la primera selección sólo 8 cepas conservaron su resistencia al estrés ambiental, mostrando tasas de crecimiento 4 a 9 veces más altas que la cepa silvestre.

Las 8 cepas seleccionadas no mostraron diferencias significativas al ser caracterizadas bajo condiciones estándares (20°C y 60 $\mu\text{mol quanta m}^{-2}\text{s}^{-1}$), en las tasas máximas de crecimiento y la biomasa total respecto a la cepa silvestre. Sin embargo, se encontraron diferencias significativas en el contenido de ácidos grasos, principalmente el EPA y sus precursores metabólicos. Esto sugiere que en las cepas seleccionadas el mutágeno afectó parte de las regiones genéticas involucradas en la síntesis de las enzimas participantes en la biosíntesis del EPA. También se propone que la resistencia observada bajo estrés ambiental fue conferida, aparentemente, por un incremento en el contenido de EPA y el ácido 16:3, que son los PUFAs más abundantes en las membranas de *P. triornutum*.

ABSTRACT

Key words: *P. tricorntutum*, mutagenesis, EPA

The polyunsaturated fatty acids (PUFAs), as the eicosapentaenoic acid 20:5 ω -3 (EPA), have been recognized as potential therapeutic agents in the treatment and prevention of several ailments. The main source of PUFAs are marine algae, among these the *Phaeodactylum tricorntutum* is one of the most productive PUFAs generator. Induced mutagenesis has been proposed to be used in algae in an attempt to generate stable genetic changes that increase the production of fatty acids and other metabolites.

The principal scope of this work was to generate –by chemical mutagenesis—an EPA over producer clone of *P. tricorntutum*, employing ethyl-methane-sulphonate (EMS).

A *P. tricorntutum* culture was exposed to different EMS concentrations. At the same time another series of experiments were performed with the *P. tricorntutum* wild type to establish physical parameters as selection factors for mutant clones. In these experiments incubation temperature was dropped from 20°C to a 4-14°C range and light intensity was increased from 60 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ to 87 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. These conditions were called “environmental stress” (ES). Under these conditions the wild type growth rate was affected without effects on the EPA content.

After treatment of *P. tricorntutum* with EMS, clones with a 13–29% mutation rate were obtained. 66 randomly selected EMS induced (possible) mutants were grown under ES conditions. From this group only 19 potentially mutant clones were selected because of their resistance to the ES conditions compared to the wild type. After a 5 month period only 8 mutant candidates were established and their growth rate, under ES conditions, was 4 to 9 fold higher than the wild type.

When these 8 clones and the wild type were grown under normal temperature and luminosity conditions, no statistical difference was observed in their growth rate nor in their total biomass. However significant differences were found in their fatty acid content, including EPA and its precursors, when comparing these parameters to the ones obtained from the wild type, suggesting that most likely, permanent changes at the molecular level may have occurred.

Moreover, the most interesting change was the EPA and 16:3 increase in the putative mutant clones, which suggested us, that is one of the cell mechanisms that allowed their survival under ES conditions.

A Juan mi compañero, a ratos virtual, pero siempre presente
en esta aventura y
porque sé que todo lo que de esto
aprendimos nos va servir.
Con todo mi amor

A mamá, papá, Beto y Dunia
por ser la mejor familia que me pudo haber tocado

Al resto de la familia (por supuesto), empezando por las abuelas
(que sin ellas no estaríamos aquí).

A mi otra familia, los de aquella inefable ciudad,
siempre presentes a pesar de la distancia y
a los de esta ciudad que me aligeraron
la distancia, las nostalgias
y me dieron un nuevo hogar.

A La Paz, ciudad de los sueños

Este trabajo de tesis se desarrolló en el Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, La Paz, Baja California Sur, en el laboratorio de Biotecnología de Microalgas, bajo la dirección de la Dra. Bertha O. Arredondo Vega. Con el apoyo económico del Consejo Nacional para la Ciencia y Tecnología (CONACyT), como parte del programa de becas-crédito (No. de Registro 159001)

Las entidades que financiaron y permitieron el desarrollo de este proyecto fueron: Proyectos CONACyT 31958 y AC3.4

CONACyT.

Dirección de Estudios de Posgrado, CIBNOR, S.C.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi directora de tesis, Dra. Bertha O. Arredondo Vega, Kitty, su apoyo económico, académico y personal que permitió el desarrollo de este trabajo de tesis.

De la misma forma agradezco a la Dra. Norma Hernández S. y al Dr. Francisco Arredondo V. por haber participado en la elaboración de este proyecto, agradezco su apoyo, enseñanzas, sugerencias y el tiempo que dedicaron a este trabajo.

Un agradecimiento especial al Dr. Zvi Cohen, por haber aceptado fungir como sinodal en este trabajo a pesar de la distancia y las diferencias en el lenguaje, por el tiempo que dedico en leer cada uno de los informes y por todas las sugerencias que aportó, enriqueciendo esta tesis y mi formación como profesionista.

Un reconocimiento y sincero agradecimiento a mis compañeros de laboratorio, técnicos y estudiantes: M. en C. Laura Carreón, Biol. Minerva Cerro, c a Dr. Jorge del Angel y Biól Alejandra Tapia Heredia por todo el apoyo técnico, profesional y personal que me brindaron.

También agradezco a todo el personal técnico que de forma directa o indirecta hizo posible el desarrollo de este proyecto: Norma Ochoa, Sofía Álvarez, Pablo Monsalvo, Ariel Cruz, Olivia Arjona, Francisco Hernández, Jesús N. Gutiérrez y Patricia Hinojosa.

Un reconocimiento y enorme agradecimiento a los Ingenieros Juan Mandujano y Francisco Aguillón y a todo el personal de Mantenimiento por el apoyo que brindaron en todas las instalaciones que se requirieron a lo largo de este proyecto.

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN. Ácido Desoxirribonucleico

ARN. Ácido Ribonucleico

ARA. Siglas en inglés de ácido araquidónico

DGDG. Digalactosildiacylglicerol

DHA. Siglas en inglés del ácido Docosaheptaenoico

EMS. Etil metano sulfonato

EPA. Siglas en inglés del ácido eicosapentaenoico.

MGDG. Monogalactosildiacylglicerol

PC. Siglas en inglés de fosfatidilcolina

PCR. Siglas en inglés de la Reacción en cadena de la Polimerasa

PG. Siglas en inglés de fosfatidilglicerol

PI. Siglas en inglés de fosfatidilinositol

PUFAs. Siglas en inglés de ácidos grasos poliinsaturados

RFLP. Siglas en inglés de análisis de fragmentos de restricción de longitud variable

SSCP. Siglas en inglés de análisis de polimorfismos en la conformación de una sola cadena

SQDG. sulfoquinovisildiacylglicerol

TG. Triacylglicerol

CONTENIDO

RESUMEN	i
ABSTRACT	ii
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
LISTA DE ABREVIATURAS	v
1. INTRODUCCION	1
1.1 Ácidos grasos poliinsaturados	1
1.2 Los ácidos grasos poliinsaturados y su obtención	4
1.3 Clase Bacillariophyceae	6
1.3.1 <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	8
2. ANTECEDENTES	10
2.1 Biotecnología de microalgas	10
2.2 Producción de PUFAs en microalgas	10
2.3 Biosíntesis de PUFAs en microalgas	11
2.3.1 Ruta metabólica ω -3	12
2.3.2 Ruta metabólica ω -6	14
2.3.3 La síntesis de EPA en <i>P. tricornutum</i>	14
2.4 Mejoramiento genético en microalgas	16
2.4.1 Ingeniería genética	16
2.4.2 Mutaciones	17
2.4.3 Mutagénesis dirigida y aleatoria	19
3. JUSTIFICACIÓN	22
4. HIPÓTESIS	23
5. OBJETIVOS	24
5.1 Objetivos generales	24
5.2 Objetivos específicos	24
6. MATERIAL Y MÉTODOS	25

6.1 Cepa	25
6.2 Determinación del crecimiento celular	25
6.3 Determinación del contenido de ácidos grasos	25
6.4 Análisis estadístico	26
6.5 Condiciones óptimas de cultivo	26
6.6 Caracterización cinética y bioquímica de la cepa silvestre en el medio de cultivo seleccionado.	27
6.7 Generación y selección de clonas mutantes	27
6.7.1 <i>Protocolo de mutagénesis química con EMS y determinación de dosis no letales</i>	27
6.7.2 <i>Frecuencia de mutación y dosis óptimas de EMS.</i>	28
6.8 Factores ambientales de selección: temperatura e intensidad luminosa	29
6.8.1 <i>Selección preliminar del intervalo de temperatura</i>	29
6.8.2 <i>Caracterización cinética y bioquímica de la cepa silvestre de P. tricornutum bajo condiciones de estrés ambiental</i>	30
6.9 Selección de clonas mutantes por estrés ambiental (temperatura e intensidad luminosa)	31
6.10 Caracterización de cepas mutadas	32
6.10.1 <i>Caracterización cinética</i>	32
6.10.2 <i>Evaluación del contenido de ácidos grasos.</i>	32
7. RESULTADOS	33
7.1 Condiciones óptimas de cultivo	33
7.2 Caracterización cinética de la cepa silvestre de <i>P. tricornutum</i>	33
7.3 Dosis óptimas de EMS	34
7.4 Factores de selección ambiental: temperatura e intensidad luminosa	37
7.4.1 <i>Selección preliminar del intervalo de temperatura</i>	37
7.4.2 <i>Caracterización cinética y bioquímica de la cepa silvestre de P. tricornutum bajo condiciones de estrés ambiental</i>	37
7.5 Selección de clonas mutantes por estrés ambiental: temperatura e	42

intensidad luminosa	
7.6 Caracterización cinética y bioquímica de las cepas mutantes seleccionadas.	45
7.6.1 Caracterización cinética	45
7.6.2 Caracterización bioquímica	46
7.6.2.1. Contenido ácido tetradecanoico (14:0)	50
7.6.2.2. Contenido ácido hexadecanoico (16:0)	50
7.6.2.3. Contenido ácido hexadecaenoico: isómeros 16:1(ω -9) y 16:1 (ω -3)	50
7.6.2.4. Contenido ácido hexadecadienoico (16:2)	51
7.6.2.5. Contenido ácido hexadecatrienoico (16:3)	51
7.6.2.6. Contenido ácido octadecanoico (18:0)	51
7.6.2.7. Contenido ácido octadecaenoico: isómeros 18:1(ω -9) y 18:1(ω -3)	52
7.6.2.8. Contenido ácido octadecadienoico (18:2 ω -6)	52
7.6.2.9. Contenido ácido octadecatrienoico (18:3 ω -3)	53
7.6.2.10. Contenido ácido octadecatetraenoico (18:4 ω -3)	53
7.6.2.11. Contenido ácido eicosapentaenoico (20:5 ω -3)	53
7.6.2.12. Contenido ácido docosahexaenoico (22:6 ω -3)	54
8. DISCUSIÓN	56
8.1 Protocolo de mutagénesis en <i>P. tricornutum</i>	56
8.2 Disminución en la temperatura de incubación como un factor de selección de cepas mutantes	58
8.3 Selección, análisis y caracterización de cepas mutantes de <i>P. tricornutum</i>	62
9. CONCLUSIONES	74
10. LITERATURA CONSULTADA	75
ANEXO I	86
ANEXO II	87
ANEXO III	88
ANEXO IV	97

ANEXO V	111
ANEXO VI	115
ANEXO VII	116
ANEXO VIII	117
ANEXO IX	118
ANEXO X	120
ANEXO XI	123

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Rutas sugeridas para la biosíntesis de EPA en <i>Porphyridium cruentum</i>	13
Figura 2. Rutas sugeridas para la biosíntesis de EPA en <i>P. tricornutum</i>	15
Figura 3. Cinética de crecimiento de un cultivo en lote de la cepa silvestre de <i>P. tricornutum</i> en el medio algal. Determinación gráfica de la tasa específica de crecimiento en la fase exponencial	34
Figura 4. Células resistentes a zeocina después del tratamiento con EMS	35
Figura 5. Frecuencia de mutación después del tratamiento con EMS	35
Figura 6. Curvas de crecimiento de la cepa silvestre de <i>P. tricornutum</i> , sin aireación. En condiciones de estrés ambiental	38
Figura 7. Curvas de crecimiento de la cepa silvestre de <i>P. tricornutum</i> con aireación/CO ₂ . En condiciones de estrés ambiental	39
Figura 8. Cinéticas de crecimiento de las cepas mutantes seleccionadas. Determinación gráfica de la tasa de crecimiento	43
Figura 9. Cinéticas de crecimiento de las cepas mutantes seleccionadas. Determinación gráfica de la tasa de crecimiento	44
Figura 10. Curva de crecimiento de las 8 cepas seleccionadas	46
Figura 11. Comparación del contenido del ácido graso 20:5 (ω -3)	54

LISTA DE TABLAS

Tabla I. Efectos fisiológicos de los eicosanoides derivados de los ácidos grasos ARA y EPA	3
Tabla II. Morfología y composición bioquímica de la clase Bacillariophyceae	7
Tabla III. Clasificación taxonómica de <i>P. tricorutum</i>	9
Tabla IV. Agentes alquilantes	20
Tabla V. Peso final de <i>P. tricorutum</i> en dos diferentes medios de cultivo	33
Tabla VI. Supervivencia en presencia de zeocina después de 15 días de incubación	36
Tabla VII. Relación de colonias mutantes seleccionadas y los tratamientos con EMS.	36
Tabla VIII. Efecto de la temperatura de incubación en la biomasa total de <i>P. tricorutum</i>	39
Tabla IX. Efecto del cambio en la temperatura de incubación en el contenido de ácidos grasos (mg g^{-1} biomasa peso seco)	41
Tabla X. Efecto del cambio en la temperatura de incubación en el contenido de ácidos grasos (% del total de ácidos grasos)	41
Tabla XI. Relación entre los tratamientos con el mutágeno y la selección de colonias resistentes	42
Tabla XII. Comparación de los parámetros cinéticos de las cepas mutantes y la cepa silvestre.	45
Tabla XIII. Comparación de la biomasa total (peso seco) de las cepas mutantes con respecto a la silvestre.	46
Tabla XIV. Contenido de ácidos grasos en las cepas 3, 6, 11 y 13	47
Tabla XV. Contenido de ácidos grasos en las cepas 17, 18, 19 y 20	47
Tabla XVI. Porcentaje relativo de ácidos grasos en las cepas 3,6,11 y 13	48
Tabla XVII. Porcentaje relativo de ácidos grasos en las cepas 17, 18, 19 y 20	48

1. INTRODUCCION

1.1 Ácidos grasos poliinsaturados

En años recientes se han reconocido algunas propiedades terapéuticas importantes en los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs, por sus siglas en inglés) de la familia omega-3 (ω -3): octadecatrienoico, α -linolénico, eicosapentaenoico (EPA, 20:5), docosahexaenoico (DHA, 22:6), y omega-6 (ω -6): octadecadienoico o linoleico (18:2), octadecatrienoico o γ -linolénico (18:3) y el eicosatetraenoico o araquidónico (ARA, 20:4). De acuerdo a la FAO, los ácidos α -linolénico, linoleico, γ -linolénico y el ARA, son considerados como esenciales para la nutrición y deben ser suministrados en la dieta (López-Alonso y Segura del Castillo, 1999; FAO, 1997). Dichos ácidos grasos se consideran esenciales ya que los mamíferos, incluyendo los seres humanos, carecen de las enzimas Δ 12 y Δ 15 desaturasas necesarias para la síntesis de estos ácidos grasos (Domergue et al., 2002).

Según la FAO (1997), las necesidades de estos ácidos grasos varían con la edad y la condición de los individuos sin embargo, en los adultos, la proporción recomendada para el consumo de los ácidos linoleico (ω -6) y α -linolénico (ω -3) debe ser entre 5:1 y 10:1. Así mismo, se recomienda que la ingestión del ácido linoléico en la dieta debe proporcionar entre 4 y 10% de los requerimientos calóricos por individuo.

En los seres humanos, los ácidos linoleico 18:2 (ω -6) y α -linolénico 18:3 (ω -3) pueden transformarse metabólicamente en los ácidos EPA (20:5) o DHA (22:6), pero los cambios dietéticos en las últimas décadas (incremento en el consumo de grasas saturadas de origen animal, consumo insuficiente aceites de origen vegetal o bien, una elevada proporción de los ácidos ω -6 y ω -3, mayor de 10:1) han generado deficiencias en el

contenido y la proporción de éstos, repercutiendo negativamente en la salud y en el desarrollo de los seres humanos (Domergue et al., 2002; FAO, 1997).

Estos ácidos grasos tienen usos potenciales en la prevención y el tratamiento de enfermedades, la acción de los ácidos ω -3 y ω -6 está relacionada con el metabolismo de las membranas celulares, la β -oxidación, la biosíntesis de ácidos grasos, la expresión genética de algunas enzimas, la síntesis de compuestos eicosanoides y la regulación del colesterol (Gill y Valverty, 1997).

El EPA (20:5 ω -3) y el ARA (20:4 ω -6), son precursores de metabolitos denominados eicosanoides, los cuales presentan funciones análogas a las hormonas, (Lenhinger, 1985). Los compuestos eicosanoides son cruciales en el desarrollo y la regulación fisiológica. La regulación de estos ácidos grasos como precursores y mediadores de los eicosanoides es fundamental para mantener la homeostasis y de esta forma, prevenir y controlar diversos desórdenes fisiológicos y patofisiológicos (Gill y Valverty, 1997). Los principales compuestos eicosanoides derivados de estos ácidos grasos son las prostanglandinas, tromboxanos, prostaciclina, lipoxinas y leucotrienos (Gill y Valverty, 1997). Cabe mencionar que los eicosanoides derivados de cada ácido graso difieren estructural y funcionalmente e incluso llegan a ser antagónicos (Yongmanitchai y Ward, 1991b). En la Tabla I se presentan algunas de las principales funciones de los eicosanoides derivados de los ácidos EPA (20:5 ω -3) y ARA (20:4 ω -6).

Un adecuado equilibrio de estos ácidos grasos y sus respectivos compuestos eicosanoides permiten la prevención y tratamiento de enfermedades como el asma, la artritis, la migraña, la psoriasis y la nefritis (Yongmanitchai y Ward, 1991b; Belarbi, et al

2000). En el tratamiento del cáncer de seno, próstata y colon, estos ácidos grasos son empleados para minimizar o detener el crecimiento tumoral (Yongmanitchai y Ward, 1991b; Belarbi et al., 2000).

Tabla I. Efectos fisiológicos de los eicosanoides derivados de los ácidos grasos ARA (20:4 ω -6) y EPA (20:5 ω -3) (Gill y Valverty, 1997).

Sistema	20:4 (ω-6)	20:5 (ω-3)	Función biológica que regula
Cardiovascular	PGI ₂ , TXA ₂	PGI ₃ , TXA ₃	Adhesión y agregación de plaquetas, lípidos de suero, fibrinógeno, permeabilidad endotelial, vasodilatación, vasoconstricción, deformación de eritrocitos, presión sanguínea.
Respiratorio	PGE ₂ , PGF ₂ , TXA ₂ , LTC ₄ , LTD ₄	PGI ₃ , TXA ₃	Broncodilatación, bronquioconstricción, respuestas inflamatorias.
Gastrointestinal	PGE ₂ , PGI ₂ , PGF ₂ , TXA ₂ , LTB ₄ , LTC ₄ , LTD ₄	PGI ₃ , LTB ₅	Secreción gástrica, citoprotección gástrica, peristalsis, insulina y secreción de amilasa pancreática.
Renal	PGD ₂ , PGE ₂ , PGF ₂ , PGH ₂ , PGI ₂ , TXA ₂ , LTB ₄	PGE ₃ , PGI ₃ , TXA ₃ , LTB ₅	Permeabilidad y filtración glomerular, vasodilatación renal, secreción de renina, excreción de sodio.
Inmunológico	5-HPETE, 12-HPETE, 15-HPETE, PGE ₂ , PGI ₂ , LTB ₄ , LTC ₄ , LTD ₄	LTB ₅	Permeabilidad vascular, respuesta citocina, expresión de receptores de leucocitos, desgranulación de leucocitos, agregación de macrófagos y neutrófilos, quimiostasis, proliferación epidérmica.

PGE y PGF: Prostaglandinas E y F.

PGI: Prostaciclina

TXA: Tromboxano A

LTB, LTC y LTD: Leucotrienos B, C y D.

5, 12 y 15-HPETE: Ácido 5, 12 y 15-hidroperoxieicosatetraenoico.

El EPA (20:5 ω -3), está relacionado directamente con el control del colesterol y, por lo tanto, es ampliamente empleado en el tratamiento y prevención de enfermedades del corazón y circulatorias debidas a niveles elevados de colesterol, como la aterosclerosis, la trombosis, la hipertrigliceridemia y la hipertensión arterial (Yongmanitchai y Ward, 1991b; Belarbi et al., 2000).

Además de las propiedades descritas anteriormente, los ácidos DHA (22:6 ω -3) y ARA (20:4 ω -6) se encuentran en cantidades considerables en la leche materna, y participan en el desarrollo del tejido cerebral y ocular en los bebés (Yongmanitchai y Ward, 1991b; FAO, 1997).

1.2 Los ácidos grasos poliinsaturados y su obtención

Los PUFAs se encuentran comúnmente en los organismos marinos, y para consumo humano, se obtienen principalmente del aceite de pescado. Sin embargo, en éste, la obtención y purificación de PUFAs presenta problemas relacionados con la acumulación de metales pesados y otros contaminantes presentes en el agua de mar (López-Alonso y Segura del Castillo 1999; Belarbi et al., 2000), así como, las fluctuaciones en las pesquerías y las variaciones no controladas en el contenido de ácidos grasos entre capturas (López-Alonso y Segura del Castillo, 1999). Otros problemas que tiene el uso del aceite de pescado están relacionados con el sabor, olor y estabilidad de los ácidos grasos, además de que se requiere un complejo proceso de extracción para la obtención de compuestos puros (López-Alonso y Segura del Castillo, 1999). Los aceites de pescado refinados, empleados

para concentrar los PUFAs contienen únicamente 20% de ácidos grasos ω -3 (López-Alonso y Segura del Castillo, 1999).

En el año 2000 el costo en el mercado mundial del etil ester de EPA con 95% de pureza obtenido a partir del aceite de pescado, era de 650dlls kg^{-1} . En ese mismo año, la demanda de EPA en Japón ascendió a 125 toneladas anuales, con una demanda creciente debido al reconocimiento de la eficiencia de este compuesto (Belarbi et al., 2000).

Las algas son la principal fuente de estos compuestos para los organismos marinos, y se ha demostrado la similitud que existe entre la composición de ácidos grasos presentes en el fitoplancton y los peces de una misma región (López-Alonso y Segura del Castillo, 1999). En micro y macroalgas, se han detectado grandes cantidades de DHA y EPA, por lo que se han propuesto como una fuente alternativa para su obtención.

El empleo de microalgas para la obtención de estos ácidos grasos tiene entre otras ventajas, el uso de procesos de purificación más sencillos, en comparación con los empleados para la extracción de ácidos grasos puros a partir del aceite de pescado; además, los ácidos provenientes de estos organismos tienen una mayor estabilidad oxidativa y se ha demostrado la factibilidad para incrementar su productividad (López-Alonso y Segura del Castillo, 1999).

Entre las especies de microalgas que contienen una proporción importante de ácidos grasos ω -3 y ω -6, se encuentran algunas pertenecientes a las clases Chrysophyceae, Bacillariophyceae y a los phyla Dinophyta, Rodophyta, y en menor cantidad, en algunas algas de agua dulce como las pertenecientes al phylum Chlorophyta (Yongmanitchai y Ward, 1991b).

La presencia de esta clase de ácidos grasos en las microalgas, está relacionada con la composición de sus membranas celulares. En los organismos fotosintéticos, los glucolípidos son la especie lipídica más importante de las membranas plasmática, plastídicas y tilacoidales (90 %) (Hiroyuki et al., 2000). Las especies de glucolípidos más abundantes son el monogalactosildiacilglicerol (MGDG), el digalactosildiacilglicerol (DGDG) y el sulfoquinovisildiacilglicerol (SQDG). En algunos casos el MGDG contribuye hasta con el 50 % de los lípidos totales presentes en membrana y generalmente contiene ácidos grasos poliinsaturados (Hiroyuki et al., 2000). En plantas superiores, las especies 18:3 y 16:3 son las más abundantes (Hiroyuki et al., 2000). En el caso de las microalgas hay especies como *Phaeodactylum tricoratum*, en los que los PUFAs como el EPA son los principales componentes de los glucolípidos y fosfolípidos (Arao y Yamada, 1994; Arao, et al 1987), dado que, la insaturación de los lípidos de membrana es esencial para la protección de los mecanismos fotosintéticos a bajas temperaturas (Nishida y Murata, 1996; Somerville, 1995; Miquel et al., 1993; Gombos et al., 1992).

1.3 Clase Bacillariophyceae

Las diatomeas o clase Bacillariophyceae, constituyen un amplio y diverso grupo de microalgas, que pertenecen al phylum Heterokophyta (Lee, 1999). Estas se encuentran tanto en ambientes marinos, como de agua dulce y terrestres. Son organismos unicelulares, autótrofos y se pueden encontrar en forma aislada o formando colonias (Lee, 1999). Esta clase incluye a más de 250 géneros y casi 100 000 especies (Scala et al., 2002) que se caracterizan por presentar una pared celular formada por dos capas de sílice denominadas frústulas (Lee, 1999).

Las diatomeas, como parte del fitoplancton, tienen un papel fundamental como productores primarios en los ecosistemas marinos al ser responsables del 25% de la productividad primaria global (Domergue et al., 2002). Constituyen el componente más importante de la flora marina a mar abierto y son parte significativa de la flora de agua dulce. Además, son capaces de alcanzar tasas máximas de crecimiento en un amplio espectro de intensidades luminosas, y algunas especies pueden presentar fotosíntesis tipo C4 (Scala et al., 2002).

Las diatomeas, en su estado vegetativo son organismos diploides y se reproducen regularmente de forma asexual por división mitótica (Scala et al., 2002; Apt et al., 1996); la reproducción sexual en las diatomeas se presenta de forma esporádica por breves periodos de tiempo y se induce cuando las células son expuestas a condiciones de crecimiento desfavorables (Scala et al., 2002). La reproducción sexual en las diatomeas es diversa e incluye oogamia, anisogamia, isogamia, automixis y apomixis (Scala et al., 2002).

Tabla II. Morfología y composición química de la clase Bacillariophyceae (Lee, 1999)

Forma	Céntricas, penadas Unicelulares o en cadenas
Talla	2 – 200 μm
Pigmentos principales	Clorofilas: <i>a</i> , <i>c₂</i> , <i>b</i> , <i>c₁</i> y <i>c₃</i> (sólo en pocas especies), β - caroteno, fucoxantina, diatoxantina, diadinoxantina
Material de reserva	crisolaminarina (carbohidratos) y ácidos grasos
Cubierta celular	Sílice
Locomoción	Secreción de mucílago. Flagelos únicamente en gametos masculinos

La importancia de estos microorganismos radica no sólo en su papel como productores primarios en los ambientes marinos, sino también por su valor comercial como fuentes de PUFAs, biofármacos y combustibles, así como de materia prima para la industria acuícola (Domergue et al., 2002, Apt, et al., 1996). En la Tabla II se presentan algunas de las características predominantes de la clase Bacillariophyceae.

1.3.1 Phaeodactylum tricornutum

Phaeodactylum tricornutum es una de las especies de diatomeas más estudiadas como modelo biológico en ecología, bioquímica y biología molecular (Apt et al., 1996), debido a que presenta características bioquímicas y fisiológicas diferentes a otras especies de diatomeas (Gükpınar, 1983). Es una microalga que alcanza altas tasas de crecimiento en amplios intervalos de temperatura, salinidad e intensidad luminosa (Gükpınar, 1983). Además, tiene la capacidad de producir EPA en altas proporciones, alcanzando más del 30% del contenido total de PUFAs (Domergue et al., 2002), con una elevada heredabilidad (López-Alonso et al., 1994).

Esta diatomea, ha sido empleada para la producción industrial de EPA, obteniéndose las más altas productividades de biomasa ($2.57\text{g l}^{-1}\text{ día}^{-1}$) y de EPA ($47.8\text{mg g}^{-1}\text{ día}^{-1}$) en fotobiorreactores tubulares al aire libre (Molina-Grima et al., 1994).

P. tricornutum es una microalga perteneciente a la clase Bacillariophyceae, fue descrita por primera vez por Bohlin (1897). En la Tabla III se indica su clasificación taxonómica propuesta por Lewin (1958).

Tabla III. Clasificación taxonómica de *P. tricornutum* (Lewin, 1958).

Phylum	Heterokophyta (Chrysophyta)
Clase	Bacillariophyceae
Orden	Bacillariales
Suborden	Phaeodactylinae
Familia	Phaeodactylaceae
Género	Phaeodactylum
Especie	<i>P. tricornutum</i>

P. tricornutum es un organismo unicelular que no forma colonias. Su pared celular, puede adoptar tres formas diferentes: penada o fusiforme (25-35 μ m de longitud, sin motilidad), ovalada (8 μ m de longitud, poca motilidad por la presencia de mucílago) e incluso trirradiada (Gükpınar, 1983; Lewin, 1958). Es la única especie de diatomea cuya pared celular contiene poco (o nada) sílice por lo que es menos sensible a la ausencia de este elemento en su hábitat (Lee, 1999). Además, se caracteriza por contener un cromatóforo amarillo-café en la región central (Lewin, 1958).

2. ANTECEDENTES

2.1 Biotecnología de microalgas

Las microalgas han sido empleadas para su consumo como una fuente importante de proteínas (Soeder, 1986) y lípidos (Cohen, 1986). Otras aplicaciones incluyen el tratamiento de aguas residuales (Soeder, 1986; Abeliovich, 1986) y la producción de compuestos químicos (Cohen, 1986; Apt y Behrens, 1999).

El aprovechamiento de las microalgas para la producción de bienes y servicios ha crecido en las últimas décadas, debido al mejoramiento de procesos y el desarrollo de nuevos productos (Apt y Behrens, 1999), tales como: complementos alimenticios destinados al mercado de los nutraceúticos los cuales incluyen a los ácidos grasos DHA y EPA, en el desarrollo de alimentos para la acuicultura con mejores rendimientos y composición, para la producción de ficobilisomas como pigmentos fluorescentes (utilizados en análisis bioquímicos e inmunológicos), para la producción de isótopos bioquímicos empleados en estudios bioquímicos y fisiológicos (aprovechando la fijación de $^{13}\text{CO}_2$ en la síntesis de ^{13}C -glucosa, ^{13}C -glicerol, y ácidos grasos como el ^{13}C -DHA), así como en la síntesis de compuestos bioactivos con actividad anticancerígena, antimicrobiana y antiviral (Apt y Behrens, 1999; Cohen, 1986).

2.2 Producción de PUFAs en microalgas

En las últimas décadas, las microalgas se han propuesto y empleado como una fuente alternativa para la producción industrial de PUFAs (Martek, 2000), sin embargo, es necesaria su manipulación para incrementar su productividad. El contenido de PUFAs en microalgas puede ser modificado manipulando factores ambientales como la luz,

temperatura y nutrientes. Yongmanitchai y Ward (1991a), variaron la composición del medio de cultivo propuesto por Mann y Myers (1968) incrementando 10 veces la productividad de EPA en *P. tricornutum* UTEX 640 sustituyendo la fuente de nitrógeno con urea. Chrismadha y Borowitzka (1994) midieron el efecto de la densidad celular, la intensidad luminosa y la adición de CO₂ en la productividad de EPA en *P. tricornutum* MUR 136, observando un incremento de 4 veces con una irradiación de 1712 μmol fotones m⁻²s⁻¹ y 5% de CO₂.

Otro mecanismo empleado para incrementar la productividad de ácidos grasos en microalgas es la manipulación genética (López-Alonso et al., 1996; López-Alonso y Segura del Castillo, 1999); López-Alonso et al., (1996) reportaron el aislamiento de cepas mutantes de *P. tricornutum* con incrementos en su productividad entre 15 y 43%. Los mecanismos empleados con mayor frecuencia para el mejoramiento genético son la ingeniería genética, la hibridación y la mutación (Cohen, 1999; López-Alonso et al., 1996; Yongmanitchai y Ward, 1991b).

2.3 Biosíntesis de PUFAs en microalgas

En plantas superiores y algas las enzimas que sintetizan los ácidos grasos saturados se localizan en los plastidios (Cohen, 1999), sin embargo, las rutas metabólicas para la obtención de ácidos grasos ω-3 y ω-6 se llevan a cabo tanto en los cloroplastos como en el citoplasma (Cohen, 1999; Khozin-Golberg et al., 1997) (Figura 1). Los PUFAs se sintetizan a partir de un ácido graso monoinsaturado, el ácido oleico 18:1(ω-9); esta síntesis involucra dos reacciones enzimáticas principalmente: la elongación y la desaturación. Durante la elongación de la cadena, dos átomos de carbono de un donador (acetil CoA o malonil CoA)

se introducen para incrementar la longitud de la cadena, mientras que la desaturación de los ácidos grasos puede llevarse a cabo por dos rutas metabólicas diferentes: la ω -3 y la ω -6 (Yongmanitchai y Ward, 1991b). Aún no se conocen con precisión cuantas enzimas participan en estas rutas metabólicas, sin embargo, en plantas superiores se ha reportado que la biosíntesis de PUFAs involucra un gran número de enzimas que incluyen: desaturasas, acilasas, trans-acilasas, proteínas acil-acarreadoras, elongasas y el complejo ácido graso sintetasa (López-Alonso y Segura del Castillo, 1999).

2.3.1 Ruta metabólica ω -3

La primera desaturación da lugar a la formación del ácido linoléico 18:2(ω -6), por la introducción de un primer doble enlace en la posición 12-13 de la cadena del ácido oleico. Una segunda desaturación en los carbonos 15-16 de la cadena, da origen al ácido α -linolénico 18:3(ω -3). Posteriormente, se presenta una elongación de la cadena y dos desaturaciones adicionales que dan origen al ácido cis-5,8,11,14,17 eicosapentaenoico 20:5(ω -3). Por la adición de dos carbonos se origina el ácido docosapentaenoico 22:5 (ω -3) que es desaturado y da lugar al ácido cis-4,7,10,13,16,19-docosahexaenoico 22:6(ω -3). Esta ruta biosintética fue reportada en las especies microalgales *Porphyridium yezoensis narawaensis*, *Chaetoceros gracilis*, *Chlorella stigmatophora*, *Nannochloropsis salina* y *Crythecodinium cohnii* (Yongmanitchai y Ward, 1991b).

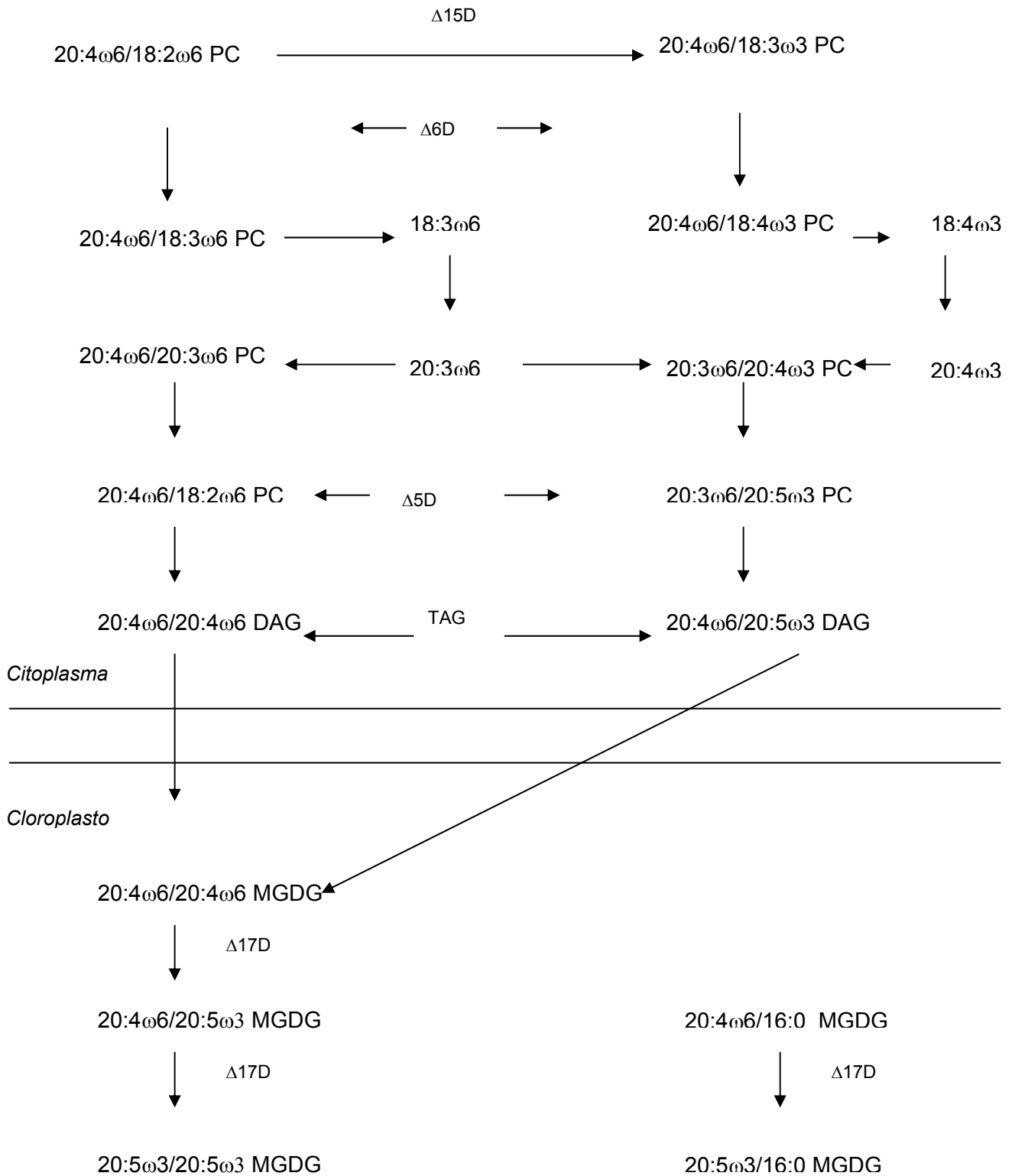


Figura 1. Ruta sugerida para la biosíntesis de EPA en *Porphyridium cruentum* (Khozin-Goldberg et al., 1997)

2.3.2 Ruta metabólica ω -6

La ruta de los ácidos ω -6 también se basa en estas dos reacciones (elongación y desaturación), sin embargo, la desaturación tiene lugar en los carbonos próximos al grupo carboxilo. Esta ruta produce el ácido araquidónico 20:4(ω -6). La primera desaturación da lugar al ácido linoléico 18:2 (ω -6), mientras que la segunda da lugar al ácido γ - linolénico 18:3(ω -6). Por la elongación de la cadena se forma el ácido dihomo γ - linolénico 20:3(ω -6), el cual se transforma en el ácido araquidónico 20:4(ω -6) por la introducción de un cuarto doble enlace. Esta ruta se reportó en las especies *Euglena gracillis* y *Astaria longa* (Yongmanitchai y Ward, 1991b).

2.3.3 La síntesis de EPA en *P. tricornutum*

El porcentaje de EPA en *P. tricornutum* puede ser mayor del 30 % con respecto al contenido total de ácidos grasos (Domergue et al., 2002), alcanzando sus proporciones más altas durante la fase estacionaria (Arao et al., 1987).

La composición lipídica de *P. tricornutum* está dada principalmente por los glucolípidos: MGDG, DGDG y SQDG; los fosfolípidos: fosfatidilglicerol (PG), fosfatidilcolina (PC), fosfatidilinositol (PI) y triacilglicerol (TG) (Arao et al., 1987). El contenido de EPA está distribuido principalmente entre los lípidos de membrana MGDG, PG, PC y DGDG, en donde ocupa del 20 al 30% de los ácidos grasos totales, sin embargo, la proporción de EPA es considerablemente menor en las especies SQDG y TG (4-5 %), (Arao et al., 1987).

En *P. tricornutum*, se han identificado cuatro diferentes rutas metabólicas (Arao y Yamada, 1994) por adición de precursores exógenos (Figura 2)..

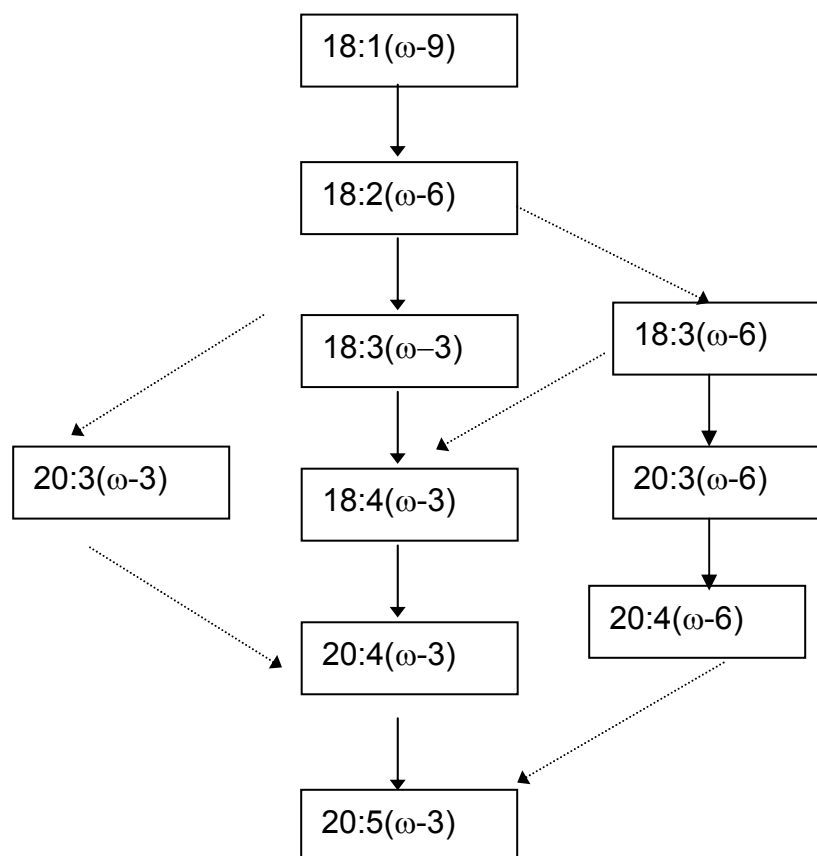


Figura 2. Ruta sugerida para la biosíntesis de EPA en *P. tricornutum* (Arao y Yamada, 1994)

La clonación de las enzimas $\Delta 5$ y $\Delta 6$ desaturasas de *P. tricornutum* y su co-expresión en *Saccharomyces cerevisiae* (Domergue et al., 2002) demostraron, que estas enzimas no presentan preferencia por los sustratos provenientes de las rutas ω -3 (18:3 ω -3 y 20:4 ω -3) y ω -6 (18:2 ω -6 y 20:3 ω -6), sugiriendo que durante la biosíntesis de EPA estas enzimas tienen la capacidad de participar en ambas rutas de forma simultánea en función de los

precursores presentes. La eficiencia de este proceso permite el aprovechamiento de todos los precursores metabólicos para la síntesis y acumulación de EPA como producto final (Domergue et al., 2002).

2.4 Mejoramiento genético en microalgas

2.4.1 Ingeniería genética

La tecnología de ADN recombinante es una herramienta importante para la ingeniería genética y sus aplicaciones en la industria. El empleo de organismos recombinantes ha permitido el reconocimiento de rutas metabólicas, la modificación de procesos fisiológicos y bioquímicos, así como la inactivación o introducción de nuevos genes que promueven la modificación de las rutas biosintéticas y que permiten, en algunos casos, la superproducción de compuestos de interés (Apt et al., 1996). Esta tecnología se ha utilizado en años recientes para la producción de proteínas de uso terapéutico, como la insulina, la hormona de crecimiento y los interferones (López-Alonso y Segura del Castillo, 1999).

Para la aplicación de la ingeniería genética se necesita la identificación y aislamiento del gen o genes involucrados en la biosíntesis del producto de interés para su posterior clonación (López-Alonso y Segura del Castillo., 1999). Además, es necesario contar con un vector apropiado para la expresión del gen o genes en un huésped procarionte o bien eucarionte (López-Alonso y Segura del Castillo, 1999).

Las microalgas tienen un gran potencial para ser empleadas como organismos transgénicos, para la producción y estudio de la biosíntesis de compuestos como PUFAs, pigmentos y polisacáridos (Apt et al., 1996; Scala et al., 2001). En trabajos recientes, se ha

reportado la transformación exitosa de microalgas de los géneros *Synechococcus*, con la introducción de la toxina Bt, mientras que el género *Chlamydomonas* ha sido empleado como modelo de estudio en los fenómenos fotosintéticos (Apt y Behrens 1999). *P. tricornutum* fue transformado de forma estable por bombardeo con micropartículas, logrando la inserción de genes reporteros que expresan proteínas que le confieren resistencia a antibióticos, como la zeocina y phleomicina, o bien proteínas como la proteína verde fluorescente (GFP) o el gen Glut I que codifica para un transportador de glucosa, favoreciendo su crecimiento en un sistema heterótrofo en ausencia de luz (Apt y Behrens, 1999; Apt et al., 1996; Zalavskaia et al., 2000; Zalavskaia et al., 2001).

Debido a la complejidad de las rutas metabólicas involucradas en la síntesis de ácidos grasos en microalgas (López-Alonso y Segura del Castillo, 1999), es necesario identificar los genes y los sistemas de regulación participantes. Recientemente, se ha reportado la clonación de algunos genes involucrados en la desaturación y elongación de ácidos grasos en plantas, cianobacterias y hongos, como *Mortierella alpina* y recientemente en *P. tricornutum* (Knutzon et al., 1998; López - Alonso y Segura, 1999; Parker-Barnes et al., 2000; Domergue et al., 2002).

2.4.2 Mutaciones

Las mutaciones son eventos aleatorios que repercuten en la estructura y secuencia de los genes y una vez que éstas ocurren son heredadas. Las mutaciones tienen la capacidad de dañar e incluso abolir la función génica. Algunos cambios son determinados por genes únicos, en tanto que otros se rigen por gran cantidad de genes. La expresión fenotípica de

estos cambios reflejará el gen o genes mutados, por lo que, las mutaciones son una herramienta útil para la identificación de genes (Lewin, 1997).

Existen tanto mutaciones *puntuales* como mutaciones denominadas por *rearrreglo*, las primeras, son mutaciones que afectan la secuencia normal de una base en el ADN y se reflejan, generalmente, en cambios en la proteína que produce el gen. Las mutaciones por *rearrreglo* afectan regiones más amplias de los genes ya sea por inserción de material adicional, deleción de una región del gen, o la inversión del gen original (Lewin, 1997).

El descubrimiento de que la exposición de organismos a radiaciones (rayos X o luz UV), o a algunos compuestos químicos, incrementaba la frecuencia de mutación en los organismos, revolucionó los experimentos en genética (Botstein y Shortle, 1985). De esta forma, la inducción de mutagénesis se emplea para el estudio de la relación entre la estructura y actividad de las proteínas (Botstein y Shortle, 1985) y/o como una técnica de mejoramiento genético.

El uso de mutaciones para mejoramiento genético se ha empleado con éxito en la producción de antibióticos y otros metabolitos (López-Alonso y Segura del Castillo, 1999). Es un proceso iterativo que consta de tres etapas: la inducción de la variabilidad genética en una población de organismos por mutación, el cultivo a pequeña escala de los individuos mutados y finalmente, la selección de aquellos individuos que representen una mejoría en la cepa.

Las mutaciones como sistema de mejoramiento genético tienen como ventajas su sencillez y bajo costo. Este método no ha sido empleado extensivamente en algas, sin embargo, tiene un gran potencial no sólo para incrementar la producción de ácidos grasos y otros metabolitos, sino además porque se pueden generar cepas con características

aberrantes que proporcionen claves para el estudio de las rutas metabólicas involucradas en la producción de éstos. Entre los trabajos reportados de mutación de microalgas se encuentra la manipulación de cianobacterias para la obtención de amonio extracelular, la fotoproducción de aminoácidos y la obtención de cepas de *Dunaliella* sobreproductoras de β -caroteno (López-Alonso y Segura del Castillo), 1999). Entre los trabajos relacionados con mutaciones inducidas para incrementar la producción de ácidos grasos se reporta el aislamiento de una cepa mutante de *Nannochloropsis sp* sobreproductora de ARA y deficiente en EPA (Schneider et al., 1995; López-Alonso y Segura del Castillo, 1999); además de la inducción de mutagénesis por exposición a luz UV y el aislamiento de una cepa de *P. tricornutum* sobreproductora de EPA (López-Alonso et al., 1996; López-Alonso y Segura del Castillo, 1999).

2.4.3 Mutagénesis dirigida y aleatoria

Las mutaciones se pueden inducir *in vivo* y de forma aleatoria por exposición de los organismos a agentes mutagénicos. De esta forma se han obtenido avances importantes en el estudio de la genética de organismos eucariontes como *Drosophila melanogaster* y procariontes como *Escherichia coli* (Botstein y Shortle, 1985). En este tipo de mutagenesis es necesario distinguir un fenotipo específico que permita detectar mutaciones especiales de las cepas silvestres de aquellas mutaciones irrelevantes (Botstein y Shortle, 1985).

Los agentes mutagénicos se dividen en agentes físicos y químicos. Los agentes físicos más comunes son las radiaciones de luz UV, de rayos X y las radiaciones ionizantes. Los

agentes químicos se clasifican como análogos de bases, hidroxilantes, alquilantes, intercalantes y bloqueadores (Mateos-González, 2003).

Los agentes análogos de bases, son aquellos que tienen estructura similar a las bases naturales, y es posible su incorporación durante el proceso de replicación; 5-bromouracilo y la 2- amino purina son ejemplos de este tipo de mutágenos. Los agentes desaminantes o hidroxilantes, modifican a las bases nitrogenadas generando errores durante la replicación, ejemplos de este tipo son el ácido nitroso y la hidroxilamina. Los agentes alquilantes introducen grupos alquilo en las bases nitrogenadas, induciendo la transición de las bases de guanidina-citosina a adenina-timina. Los agentes alquilantes más comunes son: di-(2-cloroetil)-sulfuro, etil etano sulfonato (EES), etil metano sulfonato (EMS) y la nitrosoguanidina (NTG). En la Tabla IV se presenta la estructura química de los agentes alquilantes.

Tabla IV. Agentes alquilantes

Compuesto	Fórmula química
di-(2-cloroetil)-sulfuro	Cl-CH ₂ -CH ₂ -S-CH ₂ -CH ₂ -Cl
etil-etano-sulfonato (EES)	CH ₃ -CH ₂ -SO ₂ -O-CH ₂ -CH ₃
etil-metano-sulfonato (EMS)	CH ₃ -SO ₂ -O-CH ₂ -CH ₃

Los agentes intercalantes se introducen entre los pares de bases de ADN, generando la pérdida o ganancia de nucleótidos, modificando así el marco de lectura. Estos compuestos se caracterizan por ser moléculas con anillos conjugados semejantes a las bases

nitrogenadas, que no pueden incorporarse covalentemente al esqueleto, ejemplos de este tipo de compuestos son los derivados de acridina, flavina y el bromuro de etidio.

Finalmente, los compuestos que bloquean completamente el emparejamiento entre bases son compuestos que modifican las bases purinas, tales como el benzo- α -pireno y la aflatoxina-B₁ (Mateos-González, 2003).

Las mutaciones *in vitro* están dirigidas a generar cambios específicos de genes previamente identificados, y son una herramienta de gran utilidad para el estudio de la relación estructura-actividad de las proteínas. En este tipo de mutaciones, un gen específico es aislado, clonado y modificado. Las mutaciones *in vitro* se dividen en tres categorías: métodos de reestructuración de segmentos de ADN, mutagénesis aleatoria localizada y mutaciones dirigida por oligonucleótidos (Botstein y Shortle, 1985).

3. JUSTIFICACIÓN

El presente proyecto se propone en respuesta a la importancia que tienen los PUFAs en la salud de los seres humanos y su creciente empleo en las industrias farmacéuticas y de alimentos.

Las microalgas son una fuente alternativa de producción de PUFAs, cuyo uso e importancia están en aumento por las ventajas que éstas tienen frente a las fuentes convencionales de obtención de estos ácidos. De aquí surge la necesidad de continuar con las investigaciones destinadas al mejoramiento de los procesos y sistemas empleados para la producción y productividad de las microalgas como fuente de PUFAs.

Son diversos los estudios referentes al mejoramiento de los procesos de producción de microalgas, y han abarcado desde el diseño de fotobiorreactores hasta el desarrollo de microalgas transformadas por ingeniería genética. En este sentido, una línea de investigación ampliamente desarrollada y aún no concluida, ha sido la búsqueda del mejoramiento de la producción de estos ácidos grasos en las microalgas ya sea por variaciones en las condiciones de cultivo o bien por modificaciones genéticas en los organismos. En el presente trabajo se propone la inducción de mutaciones aleatorias en *P. tricornutum* UTEX 646, como una herramienta para el mejoramiento de la productividad de EPA y el estudio la biosíntesis de PUFAs.

4. HIPÓTESIS

Las mutaciones inducidas en *P. tricornutum* UTEX 646 por exposición al mutágeno etil metano sulfonato (EMS), afectarán los genes relacionados con la síntesis de PUFAs, principalmente de EPA.

Las modificaciones en los genes involucrados en la síntesis de PUFAs se detectarán fenotípicamente por variaciones en el contenido de ácidos grasos.

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVOS GENERALES

Obtención y caracterización de una cepa mutante de *P. tricornutum* UTEX 646 sobreproductora de EPA.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Optimización y estandarización de las condiciones de cultivo y crecimiento de *P. tricornutum*.

Determinación de las dosis letal y mutagénica de EMS en la cepa nativa de *P. tricornutum*.

Establecimiento de factores ambientales para la selección de cepas mutantes de *P. tricornutum* sobreproductoras de EPA.

Aislamiento, caracterización bioquímica y selección de cepas mutantes de *P. tricornutum*.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Cepa

P. tricornutum (Bohlin) UTEX 646 fue adquirida de la colección de la Universidad de Texas, la cepa fue aislada en 1951 por M.R. Droop en Segelskär, Finlandia (www.utex.com).

6.2 Determinación del crecimiento celular

La densidad celular se determinó por espectrofotometría a 625 nm, para lo cual fue necesaria la elaboración de una curva de calibración de número de células ml⁻¹ vs absorbencia. Anexo I.

6.3 Determinación del contenido de ácidos grasos

El protocolo para la determinación de ácidos grasos se siguió en diferentes etapas del trabajo experimental para la caracterización bioquímica de las cepas que se trabajaron. A partir de la biomasa liofilizada, se realizó la extracción de lípidos totales por el método de Bligh y Dyer (1959), con las consideraciones propuestas por Nyberg (1986) para tejidos vegetales. Del extracto de lípidos totales, los ácidos grasos fueron metil esterificados (Sato y Murata, 1988) y la identificación y cuantificación de los mismos se realizó por cromatografía de gases-espectrometría de masas (GCMS) HP1800B con una columna capilar Omegawax (30m X 0.25mm X 0.25µm). La identificación de los ácidos grasos se basó en la comparación de los espectros de masa obtenidos con espectros de masa predeterminados por 29 estándares comerciales (Sigma). Los ácidos grasos se cuantificaron por factores de corrección calculados a partir de curvas de calibración elaboradas con estándares comerciales (Sigma) de concentraciones conocidas (Anexo II).

6.4 Análisis estadístico

Los análisis estadísticos que se aplicaron en las diferentes etapas del proyecto fueron: Estadísticos descriptivos: en todas las variables analizadas (biomasa, crecimiento celular y contenido de ácidos grasos) para el cálculo de medias y desviaciones estándar.

Regresión lineal múltiple: para el cálculo de las tasas de crecimiento.

Análisis de varianza (ANOVA): para comparar crecimiento, biomasa total y el contenido de ácidos grasos entre los diferentes tratamientos a los que se sometieron las cepas de *P. tricornutum*. Además, el contenido de ácidos grasos de las cepas mutantes generadas se analizó por la prueba LSD y el análisis de componentes principales, STATISTICA (Anexos III-V).

6.5 Condiciones óptimas de cultivo

P. tricornutum UTEX 646, se creció en tres diferentes medios de cultivo: Mann y Myers (1968), Mann y Myers (1968) modificado por Yongmanitchai y Ward (1991), y el medio algal (Fábregas et al, 1984).

Con los tres medios propuestos se creció la cepa en 50ml de medio, en condiciones controladas, a una temperatura de $20 \pm 2^\circ\text{C}$, con inyección de aire de 450ml min^{-1} , intensidad luminosa de $60\mu\text{mol quanta m}^{-2}\text{s}^{-1}$ y un fotoperiodo 12:12.

El crecimiento celular se midió por conteos diarios en una cámara de Neubauer. Después de 190h la biomasa se recuperó por filtración y se determinó el peso seco gravimétricamente (Zhu y Lee, 1997). Los criterios de selección del medio de cultivo fueron el crecimiento y la densidad celular.

6.6 Caracterización cinética y bioquímica de la cepa silvestre en el medio de cultivo seleccionado

Una vez que el medio de cultivo fue seleccionado, se caracterizó cinéticamente el comportamiento de la cepa en este medio de cultivo. Los experimentos de caracterización cinética y bioquímica de la cepa silvestre se realizaron por triplicado con tres repeticiones.

Para la caracterización cinética se creció la cepa silvestre en 50 ml de medio a $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ con inyección de aire (450ml min^{-1}) y CO_2 (1.6%), intensidad luminosa de $60\mu\text{mol quanta m}^{-2}\text{s}^{-1}$ y fotoperiodo 12:12. Se midió el crecimiento celular hasta la fase estacionaria (144h) por espectrofotometría a una longitud de onda de 625nm (Molina-Grima et al., 1994).

Para la caracterización bioquímica, el cultivo en fase exponencial tardía (96h de crecimiento), se cosechó por centrifugación a 3500r.p.m. durante 5min, (centrífuga clínica Mod IEC HN-SII, USA) y se liofilizó (liofilizadora Virtis 5L, USA). Se determinó el contenido de ácidos grasos en la biomasa liofilizada de acuerdo al protocolo descrito previamente. La biomasa total en peso seco se determinó gravimétricamente (Zhu y Lee, 1997).

6.7 Generación y selección de clones mutantes

6.7.1 Protocolo de mutagenesis química con EMS y determinación de dosis no letales

Para la obtención de clones mutantes de *P. tricornutum*, se utilizó como mutágeno el EMS (Sigma, No Cat. M0800), empleando el protocolo de mutagenesis descrito por Ibrahim y Sullivan (2000). Se probaron 10 concentraciones de EMS, dentro de un intervalo

de 6 μ M a 50mM, en solución amortiguadora de fosfatos a pH 7.4 (Sambrook et al., 1989). Las células de *P. tricornutum* (27.25×10^6), fueron expuestas a las diferentes soluciones de EMS en un volumen final de 5ml por un periodo de 90 minutos.

Cada 30 minutos se tomaron alícuotas de 1ml. Las células recuperadas en cada tiempo se concentraron por centrifugación (5000r.p.m. por 1 minuto a temperatura ambiente), en una microcentrífuga (Biofuge Mod. Heraus fresco No. cat 75005515) y se lavaron dos veces, la primera, con solución amortiguadora de fosfatos a pH 7.4 y la segunda, con medio algal (Fábregas et al, 1984). Después del segundo lavado las células se resuspendieron en medio algal (Fábregas et al, 1984) y se incubaron a $20 \pm 2^\circ\text{C}$ en oscuridad durante 24h para evitar la fotorreactivación (López-Alonso et al., 1996). Posteriormente, las células sobrevivientes se inocularon en placas de medio algal-agar (Fábregas et al, 1984) con alícuotas de 500 y 100 μ l. Las placas se incubaron a $20 \pm 2^\circ\text{C}$ y $60 \mu\text{mol quanta m}^{-2}\text{s}^{-1}$ durante un periodo de 190h.

6.7.2 Frecuencia de mutación y dosis óptimas de EMS.

Se midió la frecuencia de mutación de la cepa silvestre de *P. tricornutum* después de haber sido expuesta a concentraciones no letales de EMS a diferentes tiempos de exposición. La frecuencia de mutación se determinó por resistencia a zeocina (Cayla, No. cat ZEOCP001). La zeocina es un antibiótico glicoproteico con grupos funcionales cúpricos que se une al ADN y lo degrada (www.cayla.com). *P. tricornutum*, tiene un amplio espectro de resistencia a antibióticos y herbicidas convencionales, y la zeocina es un antibiótico al cual es sensible a bajas concentraciones ($50 \mu\text{g ml}^{-1}$) (Apt et al., 1996). Debido

a esto se ha empleado en la selección de células transformadas de *P. tricornutum* (Apt et al., 1996; Zalavskaia A. et al., 2000), y en nuestro caso particular, se empleó como un marcador en las células mutantes para determinar la frecuencia de mutación.

Después de que las células recuperadas de los ciclos de mutación se dejaron crecer en medio algal sólido, se transfirieron a placas con medio algal-agar (Fábregas et al, 1984) en presencia de zeocina ($150\mu\text{gml}^{-1}$). El comportamiento y crecimiento celular se siguieron por observación durante 190h. Posteriormente, las células se cosecharon y resuspendieron en medio algal (Fábregas et al, 1984) y se determinó la concentración celular final por conteo celular en cámara de Neubauer.

6.8 Factores ambientales de selección: Temperatura e intensidad luminosa

6.8.1 Selección preliminar del intervalo de temperatura

El crecimiento celular y la síntesis de ácidos grasos en la cepa silvestre de *P. tricornutum* fueron evaluados a bajas temperaturas y elevadas intensidades luminosas, con la finalidad de ser empleados como referencia para la selección de cepas sobreproductoras de EPA. Se evaluó el crecimiento y el contenido de ácidos grasos de la cepa silvestre de *P. tricornutum* en dos diferentes intervalos de temperatura inferiores a la temperatura de incubación óptima; el primero de 4–14°C y el segundo de 0–5°C, con una intensidad luminosa de $87\mu\text{mol quanta m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Esta primera evaluación se realizó únicamente con tres réplicas para cada condición analizada.

Los cultivos de la cepa silvestre se crecieron en 50ml de medio algal (Fábregas et al, 1984), y se incubaron a $20\pm 2^\circ\text{C}$, intensidad luminosa de $60\mu\text{mol quanta m}^{-2}\text{s}^{-1}$ y

fotoperiodo 12:12 durante 72h (hasta alcanzar la fase exponencial). Después de este periodo, los cultivos fueron transferidos a las condiciones de incubación propuestas. Durante todo el experimento los cultivos se mantuvieron sin aireación.

El crecimiento celular se midió por conteo directo en cámara de Neubauer en intervalos de 24h. Después de 190h la biomasa se cosechó y cuantificó por gravimetría. El contenido de ácidos grasos en la biomasa liofilizada se determinó de acuerdo al protocolo de extracción de lípidos y ácidos grasos descrito anteriormente. En esta etapa se seleccionó aquel intervalo de temperatura en el que se observó una disminución en la tasa de crecimiento sin diferencias significativas en el contenido de EPA.

6.8.2 Caracterización cinética y bioquímica de la cepa silvestre de *P. tricornutum* bajo condiciones de estrés ambiental.

Se evaluó nuevamente el crecimiento celular y el contenido de ácidos grasos de la cepa silvestre de *P. tricornutum*, al ser transferida a 4-14°C y 87 μ mol quanta m⁻²s⁻¹. También se analizó el comportamiento de la cepa con y sin inyección de la mezcla aire/CO₂. Cada evaluación se realizó por triplicado con tres repeticiones.

Los cultivos sin mezcla de aire/CO₂, se crecieron bajo las condiciones descritas anteriormente, evaluándose el crecimiento celular por espectrofotometría a 625 nm. El contenido de ácidos grasos de la biomasa liofilizada se analizó de acuerdo a los protocolos ya descritos y la biomasa total se determinó gravimétricamente por peso seco (Zhu y Lee, 1997).

Por otra parte se caracterizó el comportamiento de la cepa, cinética y bioquímicamente, con inyección de aire (450ml/min) y CO₂ (1.6%). Al igual que en el experimento anterior, el crecimiento se midió por espectrofotometría a 625nm. La biomasa total en peso seco se determinó gravimétricamente (Zhu y Lee, 1997) y el contenido de ácidos grasos se cuantificó en la biomasa liofilizada siguiendo la metodología descrita previamente.

6.9 Selección de clones mutantes por estrés ambiental (temperatura e intensidad luminosa)

Una vez que se seleccionaron las mejores condiciones de mutación (concentración de EMS y tiempo de exposición) las colonias que crecieron fueron evaluadas por estrés ambiental (temperatura e intensidad luminosa).

Se seleccionaron colonias sobrevivientes de los tratamientos de exposición a 6.25 y 12.5μM de EMS, y se sembraron en medio algal sólido (Fábregas et al, 1984). Las colonias seleccionadas, se cultivaron en placas multiorificios con 1ml de medio algal (Fábregas et al, 1984) y se incubaron a 20±2°C y 60μmol quanta m⁻²s⁻¹ durante 72h. Después de este periodo las placas se incubaron a 4–14°C y 87μmol quanta m⁻²s⁻¹. El crecimiento celular se siguió por conteo directo en cámara de Neubauer.

En esta etapa, se seleccionaron aquellas colonias que presentaron un incremento en su tasa de crecimiento entre las 72 y las 96h de cultivo, que es el periodo en el que se refleja el efecto del cambio en la temperatura de incubación en la cepa silvestre.

Las colonias seleccionadas se crecieron para su mantenimiento en tubos de ensaye con 3ml de medio algal (Fábregas et al, 1984), y en matraces en 50ml de medio algal (Fábregas et al, 1984) para su análisis cinético y bioquímico. Las colonias resultantes del primer proceso de selección fueron reanalizadas bajo las mismas condiciones de cultivo por triplicado con dos réplicas.

6.10 Caracterización de cepas mutadas

Las cepas seleccionadas por su resistencia al estrés ambiental se caracterizaron cinética y bioquímicamente. Cada cepa se analizó por triplicado con tres réplicas en cada ocasión.

6.10.1 Caracterización cinética

Las colonias seleccionadas se crecieron en 50ml de medio algal (Fábregas et al, 1984), y se incubaron a $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ a una intensidad luminosa de $60\mu\text{mol quanta m}^{-2}\text{s}^{-1}$ y un fotoperiodo 12:12. El sistema se inyectó con aire (450ml min^{-1}) y CO_2 (1.6%). El crecimiento celular se midió por espectrofotometría a 625 nm. La biomasa final en peso seco se determinó por gravimetría (Zhu y Lee, 1997).

6.10.2 Evaluación del contenido de ácidos grasos.

Una vez caracterizado el crecimiento celular, se evaluó el contenido de ácidos grasos en los cultivos en fase exponencial (96h de crecimiento). La biomasa se cosechó por centrifugación (3500r.p.m. durante 5min) y se liofilizó. El análisis de ácidos grasos se realizó de acuerdo al protocolo descrito previamente.

7. RESULTADOS

7.1 Condiciones óptimas de cultivo

El medio de cultivo en el que la cepa silvestre de *P. tricornutum* presentó el mejor crecimiento fue el medio algal (Fábregas et al., 1984). En el medio descrito por Mann y Myers (1968) el rendimiento fue inferior lo cual se reflejó en un menor contenido de biomasa final. En el medio descrito por Yongmanitchai y Ward (1991) no se logró el crecimiento de la cepa nativa de *P. tricornutum* (Tabla V).

Tabla V. Peso seco final de *P. tricornutum* en dos diferentes medios de cultivo

Medio	Peso seco (g l ⁻¹) (n=4)
Medio algal (1984)	1.35 ± 0.24
Mann y Myers (1968)	0.23 ± 0.1

7.2 Caracterización cinética de la cepa silvestre de *P. tricornutum*.

En la Figura 3, se presenta la curva de crecimiento de la cepa silvestre de *P. tricornutum* crecida en medio algal (Fábregas et al, 1984) en cultivos en lote durante 96h de crecimiento. Los parámetros cinéticos durante la fase exponencial, bajo las condiciones de cultivo empleadas fueron: velocidad específica de crecimiento (μ_{max}) de 0.0226h⁻¹ y tiempo de duplicación (td) de 30.67h.

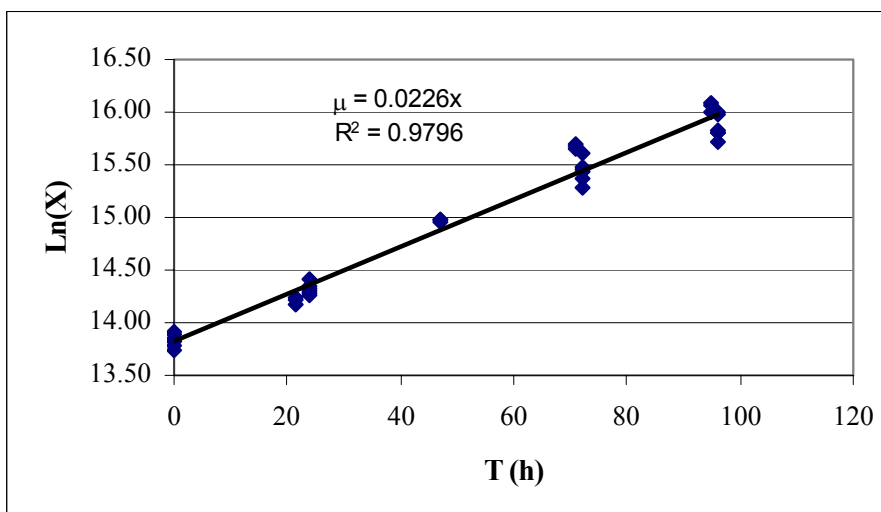
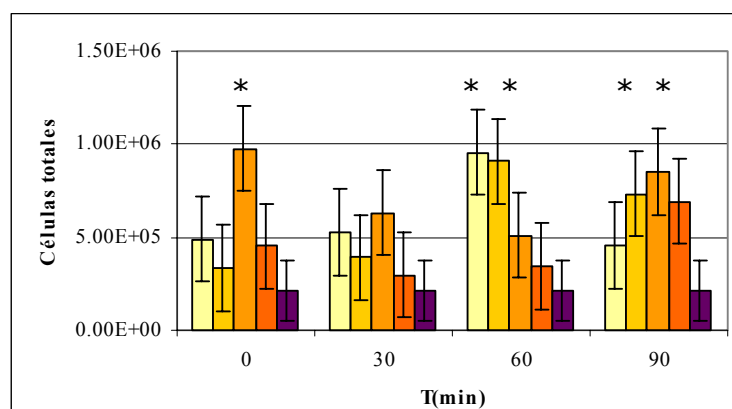


Figura 3. Cinética de crecimiento de un cultivo en lote de la cepa silvestre de *P. tricor nutum* en el medio algal (96h). Determinación gráfica de la tasa específica de crecimiento en la fase exponencial.

7.3 Dosis óptimas de EMS.

Después de la exposición de la cepa silvestre de *P. tricor nutum* a concentraciones superiores a $50\mu\text{M}$ de EMS no se observó supervivencia de las células. Las colonias sobrevivientes de los tratamientos con concentraciones menores de EMS se crecieron en presencia de zeocina para determinar la frecuencia de mutación. En la Figura 4 se presenta el comportamiento de las cepas sobrevivientes a la exposición a EMS en presencia de zeocina; mediante el análisis de estos datos no es posible determinar una correlación directa entre los tratamientos con el mutágeno (concentración y tiempos de exposición) y la generación de resistencia a zeocina.

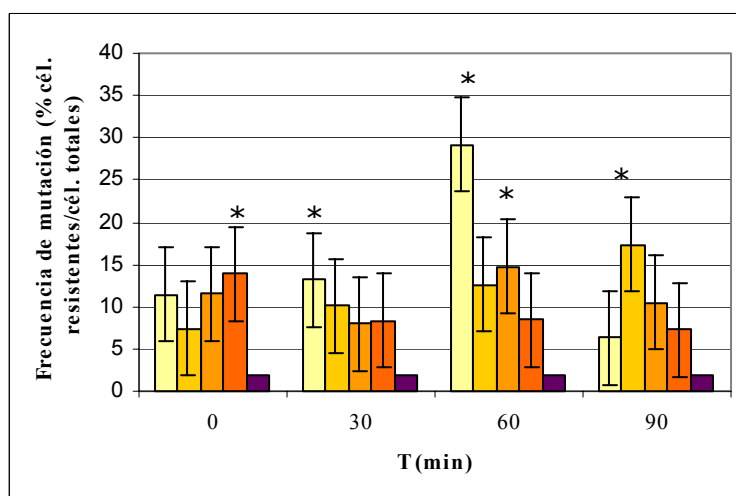
El mayor número de células resistentes a zeocina se alcanzó en las concentraciones de EMS inferiores a 50 μ M (6.25, 12.5 y 25 μ M); por otra parte, la mayor frecuencia mutación, fue de 29.2% y se observó en la menor concentración de EMS (6.25 μ M) (Figura 5).



□ 6.25 μ M □ 12.5 μ M □ 25 μ M □ 50 μ M ■ Sol. amortiguadora de fosfatos s/EMS

*Tratamientos que presentan el mayor número de células resistentes a zeocina

Figura 4. Células resistentes a zeocina después del tratamiento con EMS.



□ 6.25 μ M □ 12.5 μ M □ 25 μ M □ 50 μ M ■ Sol. amortiguadora de fosfatos s/EMS

*Tratamientos que presentan la mayor frecuencia de mutación

Figura 5. Frecuencia de mutación después de los tratamientos con EMS.

Se debe enfatizar que en un periodo corto de tiempo (8 a 15 días), las células tratadas con EMS pierden la resistencia a zeocina, sin embargo, las células expuestas a una concentración de 12.5 μM de EMS fueron más estables en el tiempo (Tabla VI).

Tabla VI. Supervivencia en presencia de zeocina después de 15 días de incubación

EMS Concentración (μM)	Crecimiento celular			
	Tiempo (min)			
	0	30	60	90
6.25	+	+	+	+
12.5	-	+	+++	++
25	-	-	++	-
50	-	-	-	++

Considerando como parámetros de selección la generación total de colonias mutantes, la frecuencia de mutación y la estabilidad en el tiempo, las colonias de *P. tricornutum* que se seleccionaron fueron aquellas expuestas a las concentraciones de EMS 6.25 (30 y 60 min) y 12.5 μM (60 y 90min). La Tabla VII presenta la relación de colonias recuperadas de los tratamientos con EMS.

Tabla VII. Relación de colonias mutantes seleccionadas y los tratamientos con EMS de los cuales provienen.

Tratamiento con el mutágeno	Concentración de EMS (μM)	Tiempo de exposición (min)	No. de colonias analizadas
1	6.25	30	8
		60	-
	12.5	60	7
		90	6
2	6.25	30	-
		60	-
	12.5	60	10
		90	6
3	6.25	30	8
		60	8
	12.5	60	7
		90	6

7.4 Factores de selección ambiental: temperatura e intensidad luminosa

7.4.1 Selección preliminar del intervalo de temperatura

En las cinéticas de crecimiento preliminares de la cepa silvestre de *P. tricornutum*, sometida a cambios en las condiciones de incubación, temperatura e intensidad luminosa, se observó una disminución en la tasa de crecimiento después del cambio en las condiciones de incubación, así mismo, se vio que los cultivos tienden a recuperarse después de 24h bajo estas condiciones. Este comportamiento se presenta para las dos condiciones probadas pero fue más marcado cuando el decremento en la temperatura es mayor (0-5°C).

En el análisis preliminar del contenido de ácidos grasos, se observó que cuando el cultivo es incubado en temperaturas inferiores, hay una disminución en la concentración de ácidos grasos, proporcional al cambio en la temperatura, pero también hubo un incremento en el porcentaje relativo del 20:5 (ω -3), sin embargo, este cambio no fue estadísticamente significativo con respecto al cultivo control (datos no incluidos).

7.4.2 Caracterización cinética y bioquímica de la cepa silvestre de P. tricornutum bajo condiciones de estrés ambiental.

Dado que no hubo cambios significativos en el contenido de ácidos grasos totales y principalmente de 20:5 (ω -3), en el intervalo de incubación, 4–14°C, se procedió a realizar dos experimentos diferentes en estas condiciones de incubación: en el primero, se repitieron las condiciones de cultivo empleadas anteriormente (sin aireación) y en el segundo el cultivo se creció con inyección de aire y CO₂.

La Figura 6 presenta el comportamiento de la cepa silvestre de *P. tricornutum*, en condiciones de incubación normal y en estrés ambiental (4-14°C), en un cultivo crecido sin

aireación. Bajo estas condiciones se observa, como previamente se había descrito, que cuando la cepa silvestre es transferida al intervalo de temperatura inferior hay una disminución en la tasa de crecimiento de 0.0053h^{-1} a 0.0034h^{-1} , equivalente a una reducción del 36%. En el caso de los cultivos crecidos en presencia de aire y CO_2 , el efecto en el crecimiento debido al cambio en la temperatura de incubación es menos evidente (Figura 7), sin embargo, también hay una reducción significativa en la tasa de crecimiento de 0.0132h^{-1} a 0.0093h^{-1} , lo cual representa una disminución del 30%.

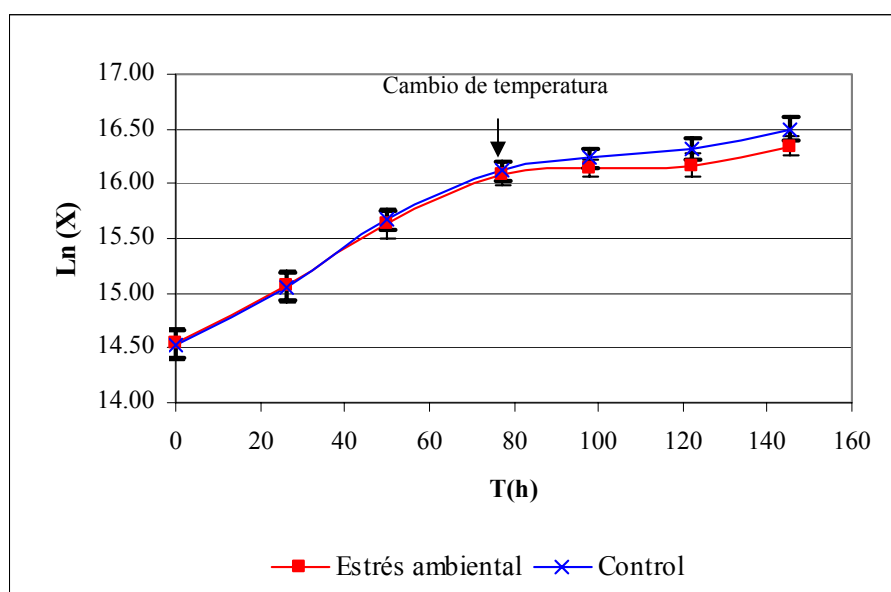


Figura 6. Curvas de crecimiento de la cepa silvestre de *P. tricornutum* sin aireación.

Estrés ambiental. Temperatura inicial $20\pm 2^\circ\text{C}$. Después de 72h cambio a $4-14^\circ\text{C}$

Control. Temperatura de incubación $20\pm 2^\circ\text{C}$

La biomasa total en peso seco (Tabla VIII) es inferior en los cultivos sin aireación ($p < 0.05$), pero el efecto del cambio en la temperatura de incubación no es significativo en la biomasa total, entre los cultivos control y los cultivos bajo estrés ambiental.

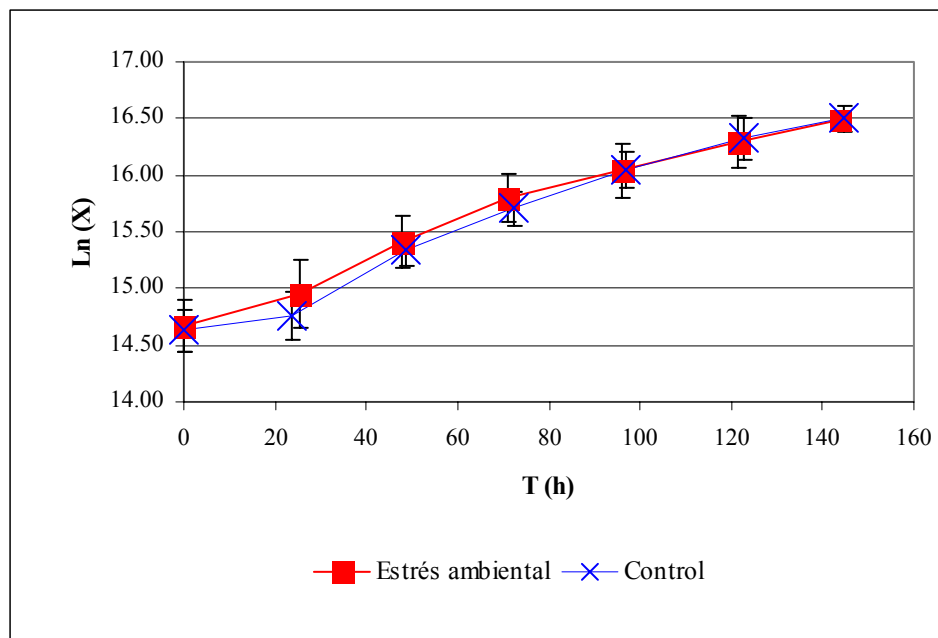


Figura 7. Curvas de crecimiento de la cepa silvestre de *P. tricornutum* con aireación/CO₂.
Estrés ambiental. Temperatura inicial 20±2°C. Después de 72h cambio a 4-14°C
Control. Temperatura de incubación 20±2°C

Tabla VIII. Efecto del cambio de temperatura de incubación en la biomasa total de la cepa silvestre de *P. tricornutum* (g l⁻¹)

Muestra	Promedio (g l ⁻¹)
C s/aireación (n=6)	1.05 ± 0.23
EA s/aireación (n=9)	1.35 ± 0.3
C c/aireación (n= 4)	1.53 ± 0.13
EA c/aireación (n= 6)	1.39 ± 0.24

C. Control a 20±2°C

EA. Cultivos bajo estrés ambiental. Cambio de temperatura de incubación a las 72h.

El contenido de ácidos grasos en condiciones de estrés ambiental (Tablas IX y X) varía en presencia y ausencia de la fuente adicional de CO₂ de forma significativa (p<0.05). En los cultivos bajo estrés ambiental, del sistema con aireación, hay un incremento significativo (p<0.05), en la concentración (mg g⁻¹ peso seco) de los ácidos grasos saturados, (14:0, 16:0 y 18:0), los isómeros (18:1) y los ácidos 16:1(ω-9), 18:2 (ω-6), 18:4

(ω -3) y 22:6(ω -3). En el caso del isómero 16:1 (ω -3) y el 16:3, se observa una disminución significativa ($p < 0.05$) en su concentración (mg g^{-1} peso seco) con respecto al cultivo control. El porcentaje relativo de los ácidos 16:0, 16:1 (ω -9), 18:0, 18:4 (ω -3) y 22:6 (ω -3), se incrementó de forma significativa ($p < 0.05$), mientras que el porcentaje relativo de los ácidos 16:1 (ω -3), 16:2, 16:3 y 20:5 (ω -3) disminuyó significativamente bajo las condiciones de estrés.

En los cultivos crecidos sin fuente adicional de CO_2 que fueron incubados a una menor temperatura, hubo una disminución significativa ($p < 0.05$) en el contenido y en el porcentaje relativo (%) de los ácidos 16:1(ω -9), 16:3 y 18:1(ω -9). Bajo estas condiciones de cultivo los ácidos que se vieron afectados de forma positiva ($p < 0.05$), en concentración y porcentaje relativo fueron el 18:3 (ω -3) y el 22:6 (ω -3). El 18:2 (ω -6) únicamente aumentó de forma significativa ($p < 0.05$) en relación con el porcentaje relativo.

En ambos casos el contenido de 20:5 (ω -3) no varía de forma significativa con respecto a la cepa crecida en condiciones de incubación normales, sin embargo, con inyección de la mezcla aire/ CO_2 , el porcentaje relativo del 20:5 (ω -3) con respecto al total de ácidos grasos se ve afectado negativamente ($p < 0.05$).

Una vez determinada que la disminución en la temperatura de incubación a 4-14°C, en un cultivo de *P. tricornutum* sin inyección de aire/ CO_2 , afectaba la tasa de crecimiento celular sin afectar de forma significativa el contenido de 20:5 (ω -3), se eligió este parámetro como factor de selección de cepas mutantes sobreproductoras de 20:5 (ω -3).

Tabla IX. Efecto del cambio de temperatura de incubación en el contenido de ácidos grasos (mg g^{-1} biomasa peso seco) de la cepa silvestre de *P. tricornutum*.

Ac. graso	Cultivo control	Estrés ambiental	Cultivo control	Estrés ambiental
	s/aireación Promedio (mg g^{-1}) (n=8)	s/aireación Promedio (mg g^{-1}) (n=9)	c/aireación Promedio (mg g^{-1}) (n=6)	c/aireación Promedio (mg g^{-1}) (n=9)
14:0	2.86 ± 0.29	2.76 ± 0.39	3.62 ± 0.87	5.44 ± 1.85*
16:0	7.03 ± 0.58	6.51 ± 1.03	8.67 ± 1.38	15.30 ± 5.01*
16:1 ω-9	10.21 ± 0.65	8.96 ± 1.05*	12.07 ± 3.04	22.16 ± 7.67*
16:1 ω-3	0.80 ± 0.08	0.77 ± 0.09	1.06 ± 0.25	0.76 ± 0.11*
16:2	0.26 ± 0.04	0.23 ± 0.03	0.42 ± 0.13	0.30 ± 0.09
16:2	4.12 ± 0.39	4.04 ± 0.51	5.26 ± 1.08	5.24 ± 0.78
16:3	3.43 ± 0.42	2.94 ± 0.38*	5.31 ± 1.27	4.02 ± 0.90*
18:0	0.19 ± 0.02	0.19 ± 0.04	0.25 ± 0.07	0.59 ± 0.37*
18:1 ω-9	0.53 ± 0.07	0.41 ± 0.06*	0.82 ± 0.35	1.66 ± 0.97*
18:1 ω-11	0.21 ± 0.03	0.18 ± 0.04	0.28 ± 0.04	0.40 ± 0.13*
18:2 ω-6	1.13 ± 0.09	1.25 ± 0.17	1.54 ± 0.23	2.24 ± 0.76*
18:3 ω-3	0.25 ± 0.03	0.38 ± 0.07*	0.36 ± 0.06	0.41 ± 0.09
18:4 ω-3	0.24 ± 0.03	0.26 ± 0.05	0.47 ± 0.14	0.99 ± 0.35*
20:5 ω-3	25.21 ± 2.11	23.68 ± 2.62	30.96 ± 6.63	35.09 ± 7.16
24:0	0.54 ± 0.07	0.68 ± 0.13	0.54 ± 0.13	1.00 ± 0.25
22:6 ω-3	1.10 ± 0.12	1.58 ± 0.25*	1.32 ± 0.18	2.91 ± 0.62*

Tabla X. Efecto del cambio de temperatura de incubación en el contenido de ácidos grasos (% del total de ácidos grasos) en la cepa silvestre de *P. tricornutum*.

Ac. graso	Cultivo control	Estrés ambiental	Cultivo control	Estrés ambiental
	s/aireación Promedio (% total de ácidos grasos) (n=8)	s/aireación Promedio (% total de ácidos grasos) (n=9)	c/aireación Promedio (% total de ácidos grasos) (n=6)	c/aireación Promedio (% total de ácidos grasos) (n=9)
14:0	4.91 ± 0.19	5.03 ± 0.37	4.93 ± 0.46	5.41 ± 0.60
16:0	12.10 ± 0.53	11.86 ± 1.34	12.05 ± 1.60	15.22 ± 1.39*
16:1 ω-9	17.60 ± 0.39	16.34 ± 0.41*	16.44 ± 1.10	21.90 ± 3.07*
16:1 ω-3	1.37 ± 0.10	1.40 ± 0.13	1.45 ± 0.12	0.81 ± 0.20*
16:2	0.45 ± 0.08	0.43 ± 0.05	0.56 ± 0.08	0.31 ± 0.08
16:2	7.09 ± 0.49	7.37 ± 0.55	7.22 ± 0.52	5.54 ± 1.04*
16:3	5.89 ± 0.40	5.38 ± 0.45*	7.25 ± 0.61	4.22 ± 0.86*
18:0	0.33 ± 0.03	0.36 ± 0.06	0.35 ± 0.13	0.58 ± 0.26*
18:1 ω-9	0.91 ± 0.10	0.75 ± 0.06*	1.09 ± 0.30	1.54 ± 0.68
18:1 ω-11	0.36 ± 0.03	0.32 ± 0.06	0.39 ± 0.05	0.40 ± 0.07
18:2 ω-6	1.95 ± 0.10	2.28 ± 0.18*	2.13 ± 0.19	2.26 ± 0.34
18:3 ω-3	0.44 ± 0.04	0.69 ± 0.11*	0.51 ± 0.11	0.44 ± 0.17
18:4 ω-3	0.41 ± 0.03	0.47 ± 0.07	0.64 ± 0.08	0.97 ± 0.15*
20:5 ω-3	43.36 ± 0.67	43.21 ± 1.23	42.37 ± 1.67	36.32 ± 3.32*
24:0	0.93 ± 0.07	1.24 ± 0.17	0.75 ± 0.22	1.03 ± 0.15
22:6 ω-3	1.90 ± 0.10	2.87 ± 0.23*	1.86 ± 0.42	3.05 ± 0.58*

* Variaciones significativas ($p < 0.05$)

7.5 Selección de clonas mutantes por estrés ambiental: temperatura e intensidad luminosa.

Se realizaron tres tratamientos con el EMS en las concentraciones y tiempos de exposición descritos anteriormente. De éstos, se seleccionaron 66 colonias, que se analizaron bajo las condiciones de estrés ambiental propuestas (4-14°C y 87 μ mol quanta m⁻²s⁻¹), con el fin de identificar posibles cepas sobreproductoras de 20:5 (ω -3).

De este análisis, 19 colonias mostraron resistencia a bajas temperaturas. Al mismo tiempo, se seleccionó una colonia no resistente, identificada como 16. En la Tabla XI, se presenta la relación entre las cepas resistentes a estrés ambiental y los tratamientos con EMS de los cuales fueron seleccionadas.

Tabla XI. Relación entre los tratamientos con el mutágeno y la selección de colonias resistentes

Concentración de EMS (μ M)	Tiempo de exposición (min)	No. de colonias analizadas	No. de colonias seleccionadas (R)	% R/T
6.25	30	14	5	35
	60	8	2	25
12.5	60	24	9	37.5
	90	18	3	16.6

R. Colonias resistentes

T. Total de colonias analizadas

Las 20 colonias fueron reanalizadas para determinar si el comportamiento descrito anteriormente se conservaba a lo largo del tiempo, este análisis se realizó 5 meses después de la selección inicial y solo 8 colonias mantuvieron su comportamiento en condiciones de estrés ambiental (Figuras 8 y 9).

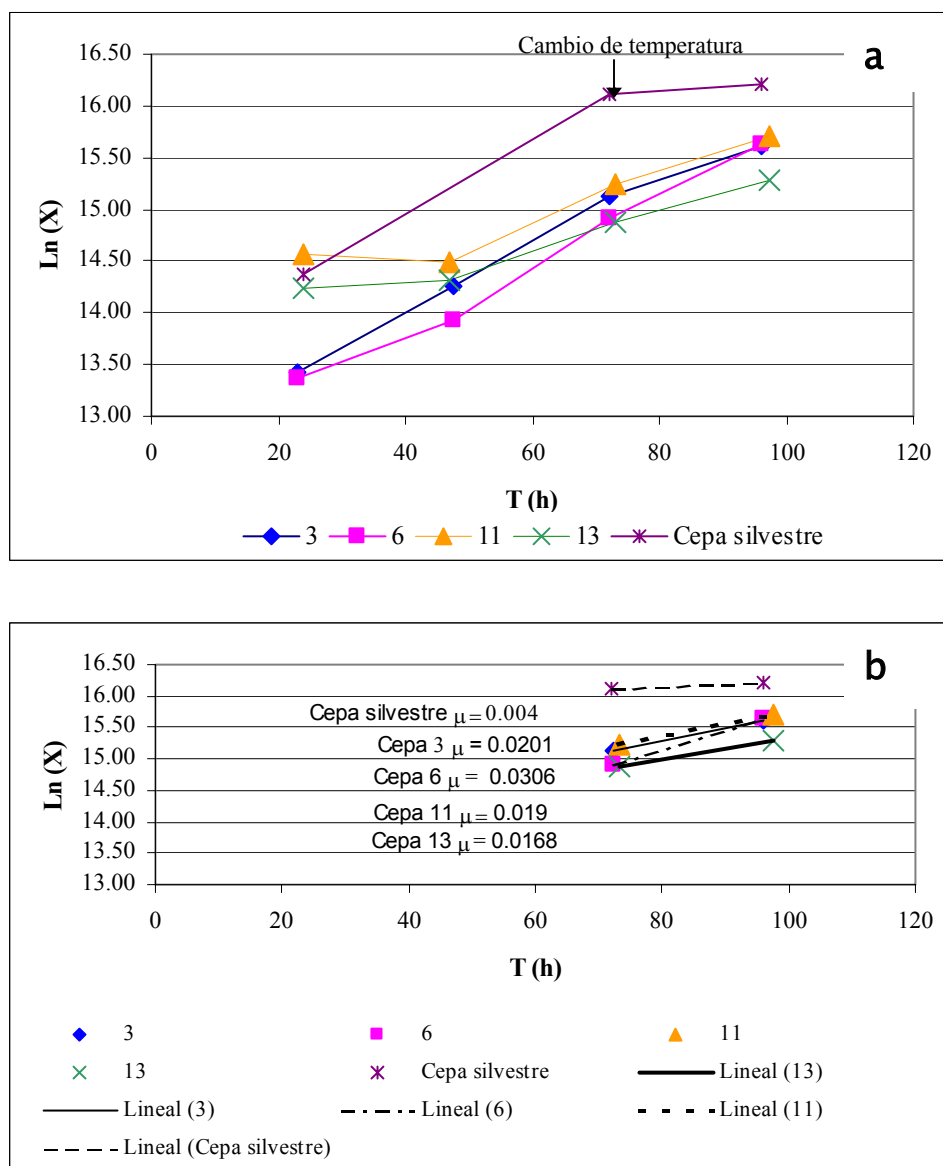


Figura 8. a) Cinéticas de crecimiento de las cepas mutantes seleccionadas. Temperatura inicial de crecimiento $20 \pm 2^\circ\text{C}$, temperatura final $4-14^\circ\text{C}$.

b) Cinéticas de crecimiento de las cepas mutantes seleccionadas. Determinación gráfica de la tasa de crecimiento después del cambio de temperatura. Temperatura inicial de crecimiento $20 \pm 2^\circ\text{C}$, temperatura final $4-14^\circ\text{C}$.

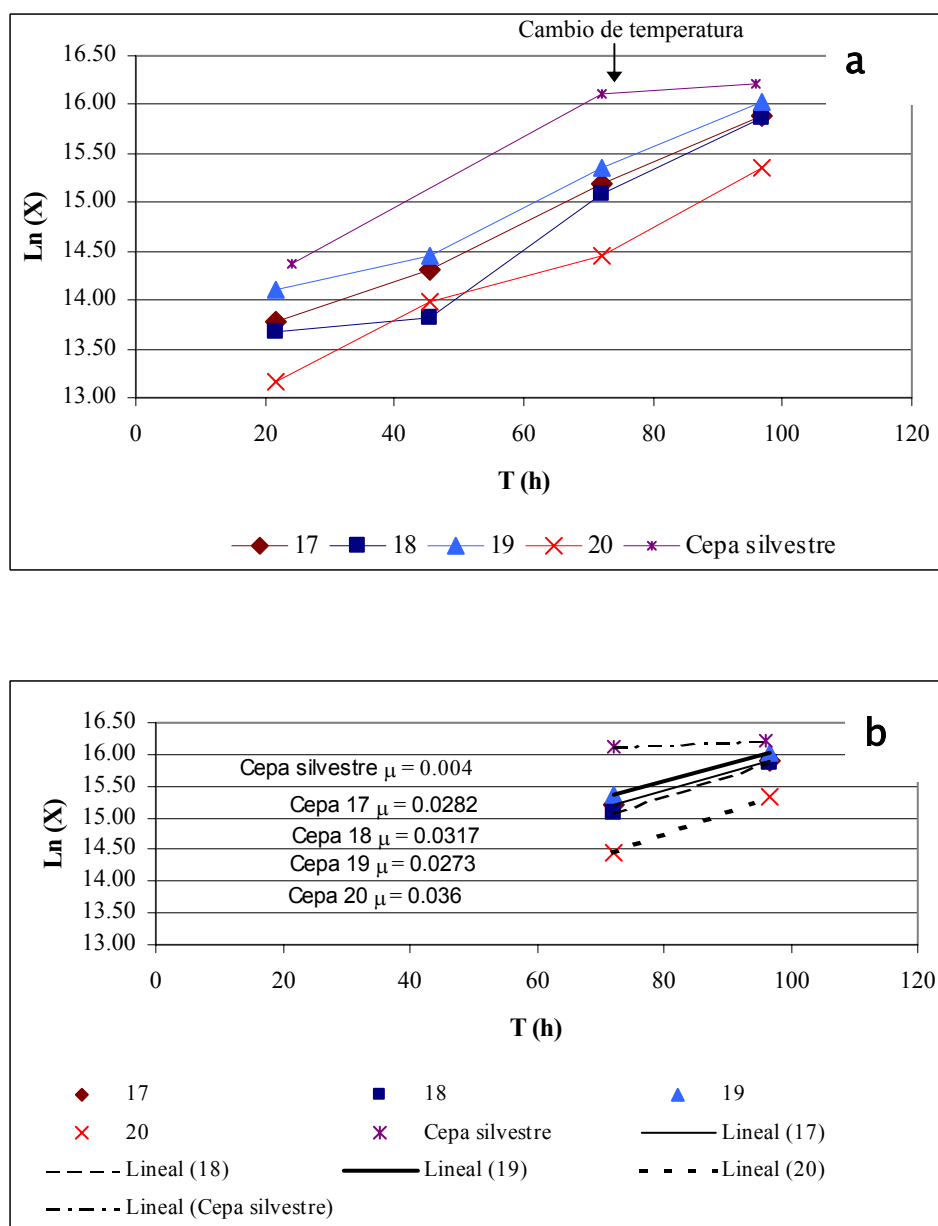


Figura 9. a) Cinéticas de crecimiento de las cepas mutantes seleccionadas. Temperatura inicial de crecimiento $20 \pm 2^\circ\text{C}$, temperatura final $4-14^\circ\text{C}$.

b) Cinéticas de crecimiento de las cepas mutantes seleccionadas. Determinación gráfica de la tasa de crecimiento después del cambio de temperatura. Temperatura inicial de crecimiento $20 \pm 2^\circ\text{C}$, temperatura final $4-14^\circ\text{C}$.

7.6 Caracterización cinética y bioquímica de las cepas mutantes seleccionadas.

7.6.1 Caracterización cinética

En la Figura 10, se presentan las cinéticas de crecimiento de las 8 cepas mutantes y la cepa silvestre de *P. tricornutum*. En la Tabla XII se observa que las tasas de crecimiento oscilan desde 0.013h^{-1} en las cepas 19 y 20 hasta 0.022h^{-1} en la cepa silvestre. Se observó un incremento en la densidad celular final con respecto a la cepa silvestre en los cultivos de las cepas 6, 11, 17 y 18; sin embargo, este cambio no se explica por un incremento en la tasa de crecimiento con respecto a la cepa silvestre, en estas cepas, la tasa es mayor comparada con las otras 4 cepas mutantes, pero no en comparación con la cepa silvestre. En estos casos la mayor densidad celular se debe a que la densidad celular inicial fue mayor con respecto al inóculo de los cultivos de la cepa silvestre, tal y como se observa al comparar los incrementos relativos de la densidad final con respecto a la densidad inicial, en donde la cepa silvestre tuvo un incremento relativo de 8.14 mientras que en las cepas mutantes los incrementos relativos más altos fueron de 4.6 y 4.8 en las cepas 3 y 11 (Tabla XII).

Tabla XII. Comparación de los parámetros cinéticos de las cepas mutantes y la cepa silvestre.

Cepa	Tasa de crecimiento μ (h^{-1})	Densidad celular inicial promedio (cel/ml)	Densidad celular final promedio (cel/ml)	Incrementos relativos
Silvestre (n=9)	0.022	$1.01\text{E}+06 \pm 5.1\text{E}+04$	$8.25\text{E}+06 \pm 1.0\text{E}+06$	8.14
3 (n=12)	0.0162	$1.97\text{E}+06 \pm 3.1\text{E}+05$	$9.07\text{E}+06 \pm 1.4\text{E}+06$	4.61
6 (n=15)	0.0158	$2.21\text{E}+06 \pm 3.1\text{E}+05$	$9.88\text{E}+06 \pm 7.6\text{E}+05^*$	4.47
11 (n=9)	0.0168	$2.24\text{E}+06 \pm 3.4\text{E}+05$	$1.08\text{E}+07 \pm 1.3\text{E}+06^*$	4.80
13 (n=12)	0.0138	$2.21\text{E}+06 \pm 4.5\text{E}+05$	$8.33\text{E}+06 \pm 5.1\text{E}+04$	3.75
17 (n=12)	0.0158	$2.71\text{E}+06 \pm 4.2\text{E}+05$	$1.00\text{E}+07 \pm 1.7\text{E}+06^*$	3.70
18 (n=8)	0.0158	$2.91\text{E}+06 \pm 2.0\text{E}+05$	$1.13\text{E}+07 \pm 1.4\text{E}+06^*$	3.89
19 (n=13)	0.013	$2.47\text{E}+06 \pm 4.8\text{E}+05$	$8.52\text{E}+06 \pm 1.9\text{E}+06$	3.45
20 (n=9)	0.0129	$2.85\text{E}+06 \pm 4.3\text{E}+05$	$9.89\text{E}+06 \pm 2.7\text{E}+06$	3.47

*Diferencias significativas ($p < 0.05$)

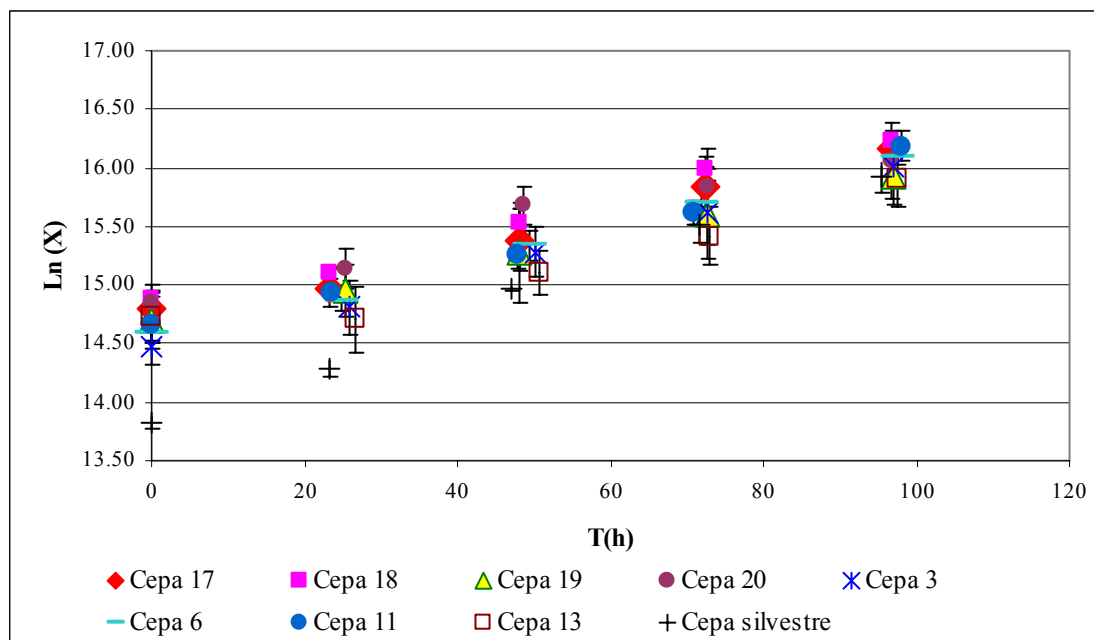


Figura 10. Curvas de crecimiento de las 8 cepas seleccionadas y la cepa silvestre de *P. tricornutum*

La biomasa total de los diferentes cultivos únicamente presentó un incremento significativo ($p < 0.05$), comparado con el control, en las colonias 11 y 18 (Tabla XIII).

Tabla XIII. Comparación de la biomasa total (peso seco), de las cepas mutantes con respecto a la cepa silvestre.

Cepa	Peso seco promedio (g l)
Silvestre (n=9)	1.01± 0.47
3 (n=12)	0.86± 0.11
6 (n=15)	1.09± 0.29
11 (n=9)	1.46± 0.79*
13 (n=12)	1.27± 0.44
17 (n=12)	1.32± 0.64
18 (n=8)	1.56± 0.76*
19 (n= 13)	1.40± 0.78
20 (n=12)	1.40± 0.61

*Diferencias significativas ($p < 0.05$)

7.6.2 Caracterización bioquímica

En las Tablas XIV y XV se presenta la concentración de ácidos grasos en mg g^{-1} peso seco, de las cepas mutantes seleccionadas, así como de la cepa silvestre de *P. tricornutum*.

Tabla XIV. Concentración de ácidos grasos de las cepas mutantes 3, 6, 11 y 13

Ac. Graso	Cepa 3 Promedio (mg g ⁻¹) (n=8)	Cepa 6 Promedio (mg g ⁻¹) (n=7)	Cepa 11 Promedio (mg g ⁻¹) (n=9)	Cepa 13 Promedio (mg g ⁻¹) (n=7)	Cepa silvestre Promedio (mg g ⁻¹) (n=12)
14:0 *	4.47 ± 0.94	4.79 ± 0.50	3.82 ± 1.05	4.77 ± 0.57	3.67 ± 0.96
16:0	9.33 ± 2.89	9.35 ± 1.14	7.63 ± 1.14	6.96 ± 1.71	8.44 ± 2.10
16:1 ω-9	10.95 ± 1.67	11.6 ± 1.13	9.86 ± 1.66	9.37 ± 1.11	10.42 ± 1.75
16:1 ω-3*	1.25 ± 0.27	1.18 ± 0.22	1.02 ± 0.16	1.07 ± 0.16	1.15 ± 0.19
16:2	0.3 ± 0.15	0.38 ± 0.04	0.32 ± 0.04	0.42 ± 0.10	0.3 ± 0.11
16:2	5.5 ± 1.16	5.69 ± 0.64	5.02 ± 0.82	4.46 ± 0.70	4.8 ± 0.92
16:3	4.75 ± 0.95	5.09 ± 0.66	4.74 ± 0.84	4.93 ± 0.84	4.07 ± 0.77
18:0*	0.38 ± 0.13	0.36 ± 0.08	0.29 ± 0.07	0.22 ± 0.07	0.56 ± 0.24
18:1 ω-9	0.54 ± 0.15	0.58 ± 0.26	0.36 ± 0.09	0.6 ± 0.19	0.42 ± 0.09
18:1 ω-11*	0.22 ± 0.06	0.25 ± 0.04	0.21 ± 0.06	0.18 ± 0.03	0.22 ± 0.06
18:2 ω-6	1.4 ± 0.18	1.55 ± 0.31	1.31 ± 0.23	1.19 ± 0.14	1.3 ± 0.39
18:3 ω-3	0.25 ± 0.06	0.3 ± 0.10	0.26 ± 0.06	0.16 ± 0.03	0.29 ± 0.14
18:4 ω-3*	0.31 ± 0.04	0.43 ± 0.10	0.42 ± 0.13	0.57 ± 0.12	0.39 ± 0.16
20:5 ω-3	25.5 ± 3.62	29.05 ± 3.21	25.98 ± 4.16	27.23 ± 3.80	23.95 ± 5.16
24:0	0.6 ± 0.32	0.72 ± 0.18	0.61 ± 0.28	0.56 ± 0.13	0.73 ± 0.35
22:6 ω-3	1.43 ± 0.28	1.91 ± 0.25	1.58 ± 0.33	1.5 ± 0.16	1.27 ± 0.48

* Diferencias significativas (p<0.05)

Tabla XV. Concentración de ácidos grasos de las clonas mutantes 17, 18, 19 y 20

Ac. Graso	Cepa 17 Promedio (mg g ⁻¹) (n=10)	Cepa 18 Promedio (mg g ⁻¹) (n=8)	Cepa 19 Promedio (mg g ⁻¹) (n=10)	Cepa 20 Promedio (mg g ⁻¹) (n=8)	Cepa silvestre Promedio (mg g ⁻¹) (n=12)
14:0*	4.59 ± 0.81	4.27 ± 0.81	4.44 ± 0.94	3.77 ± 0.73	3.67 ± 0.96
16:0	8.56 ± 1.28	7.49 ± 1.47	8.63 ± 1.80	7.97 ± 1.55	8.44 ± 2.10
16:1 ω-9	11.69 ± 2.75	10.81 ± 2.38	11.06 ± 2.29	10.54 ± 2.39	10.42 ± 1.75
16:1 ω-3*	1.22 ± 0.30	1.11 ± 0.21	1.12 ± 0.27	0.84 ± 0.11	1.15 ± 0.19
16:2	0.41 ± 0.11	0.38 ± 0.08	0.35 ± 0.11	0.33 ± 0.08	0.3 ± 0.11
16:2	5.83 ± 1.80	5.32 ± 1.12	5.27 ± 1.28	4.50 ± 0.81	4.8 ± 0.92
16:3	5.36 ± 1.54	5.09 ± 1.10	5.01 ± 1.24	4.41 ± 0.85	4.07 ± 0.77
18:0*	0.38 ± 0.16	0.3 ± 0.11	0.38 ± 0.11	0.37 ± 0.11	0.56 ± 0.24
18:1 ω-9	0.45 ± 0.21	0.45 ± 0.16	0.56 ± 0.17	0.63 ± 0.32	0.42 ± 0.09
18:1 ω-11*	0.27 ± 0.06	0.25 ± 0.06	0.29 ± 0.06	0.26 ± 0.12	0.22 ± 0.06
18:2 ω-6	1.43 ± 0.52	1.32 ± 0.33	1.36 ± 0.38	1.53 ± 0.49	1.3 ± 0.39
18:3 ω-3	0.26 ± 0.12	0.22 ± 0.05	0.29 ± 0.10	0.32 ± 0.14	0.29 ± 0.14
18:4 ω-3*	0.39 ± 0.13	0.39 ± 0.15	0.35 ± 0.09	0.46 ± 0.13	0.39 ± 0.16
20:5 ω-3	29.03 ± 7.82	27.69 ± 5.80	27.13 ± 6.48	27.11 ± 5.38	23.95 ± 5.16
24:0	0.78 ± 0.16	0.73 ± 0.24	0.85 ± 0.27	0.76 ± 0.22	0.73 ± 0.35
22:6 ω-3	1.59 ± 0.39	1.53 ± 0.40	1.68 ± 0.38	1.75 ± 0.62	1.27 ± 0.48

* Diferencias significativas (p<0.05)

Tabla XVI. Porcentaje relativo de ácidos grasos en las cepas 3 , 6, 11 y 13

Ac. Graso	Cepa 3	Cepa 6	Cepa 11	Cepa 13	Cepa silvestre
	Promedio % total ácidos grasos (n=8)	Promedio % total ácidos grasos (n=7)	Promedio % total ácidos grasos (n=9)	Promedio % total ácidos grasos (n=7)	Promedio % total ácidos grasos (n=12)
14:0	6.70 ± 1.36	6.58 ± 0.67	6.11 ± 1.20	7.46 ± 0.83	5.97 ± 1.52
16:0	13.74 ± 2.56	12.82 ± 0.97	12.00 ± 0.87	10.93 ± 2.85	13.69 ± 3.22
16:1 ω-9*	16.30 ± 0.86	15.90 ± 0.68	15.63 ± 0.37	14.59 ± 0.55	16.88 ± 1.42
16:1 ω-3*	1.86 ± 0.25	1.62 ± 0.30	1.59 ± 0.10	1.67 ± 0.16	1.87 ± 0.20
16:2	0.53 ± 0.09	0.55 ± 0.08	0.50 ± 0.04	0.65 ± 0.12	0.48 ± 0.19
16:2*	8.16 ± 0.95	7.81 ± 0.76	7.97 ± 0.28	6.94 ± 0.75	7.74 ± 0.41
16:3*	7.06 ± 0.82	6.99 ± 0.80	7.41 ± 0.42	7.65 ± 0.77	6.61 ± 1.03
18:0*	0.56 ± 0.14	0.49 ± 0.10	0.44 ± 0.14	0.34 ± 0.11	0.93 ± 0.50
18:1 ω-9*	0.81 ± 0.21	0.79 ± 0.30	0.57 ± 0.11	0.94 ± 0.29	0.69 ± 0.15
18:1 ω-11*	0.33 ± 0.05	0.34 ± 0.04	0.35 ± 0.04	0.28 ± 0.05	0.35 ± 0.07
18:2 ω-6	2.09 ± 0.14	2.11 ± 0.29	2.08 ± 0.12	1.85 ± 0.18	2.07 ± 0.35
18:3 ω-3*	0.38 ± 0.08	0.40 ± 0.10	0.42 ± 0.08	0.25 ± 0.03	0.46 ± 0.17
18:4 ω-3*	0.47 ± 0.07	0.58 ± 0.10	0.67 ± 0.14	0.89 ± 0.12	0.61 ± 0.16
20:5 ω-3*	38.06 ± 3.13	39.76 ± 1.13	40.77 ± 1.46	42.34 ± 2.41	38.51 ± 4.07
24:0	0.89 ± 0.54	0.99 ± 0.25	1.00 ± 0.36	0.88 ± 0.19	1.16 ± 0.52
22:6 ω-3*	2.13 ± 0.34	2.20 ± 0.25	2.49 ± 0.15	2.35 ± 0.24	1.99 ± 0.49

* Diferencias significativas (p<0.05)

Tabla XVII. Porcentaje relativo de ácidos grasos en las cepas 17, 18, 19 y 20

Ac. Graso	Cepa 17	Cepa 18	Cepa 19	Cepa 20	Cepa silvestre
	Promedio % total ácidos grasos (n=10)	Promedio % total ácidos grasos (n=8)	Promedio % total ácidos grasos (n=10)	Promedio % total ácidos grasos (n=7)	Promedio % total ácidos grasos (n=12)
14:0	6.44 ± 0.80	6.41 ± 1.01	6.48 ± 0.72	5.79 ± 0.85	5.97 ± 1.52
16:0	12.19 ± 2.46	11.32 ± 2.48	12.74 ± 2.67	12.24 ± 1.38	13.69 ± 3.22
16:1 ω-9*	16.22 ± 1.48	15.97 ± 0.91	16.11 ± 1.24	16.05 ± 1.17	16.88 ± 1.42
16:1 ω-3*	1.70 ± 0.26	1.66 ± 0.25	1.63 ± 0.27	1.30 ± 0.16	1.87 ± 0.20
16:2	0.56 ± 0.09	0.56 ± 0.05	0.50 ± 0.08	0.51 ± 0.09	0.48 ± 0.19
16:2*	7.96 ± 0.65	7.87 ± 0.33	7.62 ± 0.72	6.89 ± 0.37	7.74 ± 0.41
16:3*	7.36 ± 0.69	7.52 ± 0.49	7.22 ± 0.64	6.75 ± 0.47	6.61 ± 1.03
18:0*	0.52 ± 0.12	0.45 ± 0.11	0.59 ± 0.26	0.56 ± 0.10	0.93 ± 0.50
18:1 ω-9*	0.63 ± 0.27	0.66 ± 0.15	0.83 ± 0.29	0.93 ± 0.34	0.69 ± 0.15
18:1 ω-11*	0.38 ± 0.06	0.37 ± 0.04	0.43 ± 0.08	0.39 ± 0.10	0.35 ± 0.07
18:2 ω-6	1.95 ± 0.34	1.95 ± 0.20	1.98 ± 0.39	2.30 ± 0.37	2.07 ± 0.35
18:3 ω-3*	0.35 ± 0.12	0.32 ± 0.04	0.43 ± 0.17	0.46 ± 0.14	0.46 ± 0.17
18:4 ω-3*	0.54 ± 0.08	0.56 ± 0.14	0.52 ± 0.08	0.71 ± 0.14	0.61 ± 0.16
20:5 ω-3*	39.87 ± 1.68	41.01 ± 2.69	39.22 ± 2.58	41.36 ± 1.72	38.51 ± 4.07
24:0	1.13 ± 0.34	1.10 ± 0.41	1.25 ± 0.38	1.15 ± 0.21	1.16 ± 0.52
22:6 ω-3*	2.20 ± 0.33	2.27 ± 0.42	2.46 ± 0.41	2.62 ± 0.51	1.99 ± 0.49

* Diferencias significativas (p<0.05)

La concentración de ácidos grasos en las cepas mutantes presentó diferencias significativas ($p < 0.05$) con respecto a la cepa silvestre, en los ácidos 14:0, 16:1(ω -3), 18:0, 18:1(ω -11) y 18:4 (ω -3). Por otra parte, el porcentaje relativo de todos los ácidos grasos (Tablas XVI y XVII), mostró diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las cepas seleccionadas y la silvestre, excepto en los ácidos 14:0, 16:0 y 18:2 (ω -6).

Para definir si era posible la separación de las cepas mutantes y silvestre, por diferencias en su contenido y porcentaje relativo de ácidos grasos, se realizó el análisis de componentes principales.

Del análisis de componentes principales por contenido de ácidos grasos se obtiene que los ácidos grasos que contribuyen en un 78% de la varianza total son el 18:4 (factor 1, 53.5%), 16:1 (ω -3), 16:2, 16:3 y 20:5 (ω -3) (factor 2, 13.4%) y el 18:0 (factor 3, 11.3%) (Anexo 4). Con respecto a estos ácidos grasos, es posible agrupar a los elementos de las cepas 3, 6, 13, 19, 20 y la cepa silvestre. La distribución de las cepas 13, 11, 20 y silvestre, es debida principalmente al factor 2, en tanto que las colonias 3, 6 y 19 tienen una mayor ponderación con respecto al factor 1.

Cuando se realiza el análisis de componentes principales con respecto al porcentaje relativo, los ácidos grasos que contribuyen en mayor proporción con la varianza (66%), son los ácidos 14:0 y 20:5(ω -3) (factor 1, 28.7%), 18:3(ω -3) (factor 2, 23.1%) y el 16:2 (factor 3, 14.4%). En este análisis se agrupan las cepas 17, 18, 19, 20, 11, 6, 3 y la cepa silvestre.

Las variaciones observadas en concentración y porcentaje relativo de los diferentes ácidos grasos entre las cepas mutantes y la cepa silvestre se describen a continuación, en el Anexo XI se incluyen las gráficas comparativas.

7.6.2.1. Contenido del ácido tetradecanoico (14:0)

La concentración (mg g^{-1} peso seco) del 14:0 presentó diferencias significativas entre las colonias seleccionadas y la cepa silvestre. Se observó un incremento en el contenido promedio de este ácido en las cepas mutantes 3, 6, 13, 17, 18 y 19 comparadas con la cepa silvestre, pero únicamente las cepas 6 y 13 mostraron un aumento significativo ($p < 0.05$). En cuanto al porcentaje relativo (%) de este ácido, únicamente la cepa 13 tuvo un incremento significativo ($p > 0.05$).

7.6.2.2. Contenido del ácido hexadecanoico (16:0)

En el contenido (mg g^{-1} peso seco) del 16:0, la cepa 6 fue la única que mostró un incremento significativo comparada con la cepa silvestre, no se observaron diferencias significativas en el porcentaje relativo (%) de este ácido entre las cepas analizadas.

7.6.2.3. Contenido del ácido hexadecaenoico (16:1 ω -9 y 16:1 ω -3)

P. tricornutum contiene dos isómeros del ácido hexadecaenoico, el isómero 16:1 (ω -9) el más abundante, mostró una disminución significativa en su concentración (mg g^{-1} peso seco) en la cepa 13 al ser comparada con las cepas 6 y 17. En cuanto al porcentaje relativo (%) de este ácido graso, hay una disminución significativa en la cepa 13 en comparación con el resto de las cepas analizadas.

En el isómero menos abundante, 16:1 (ω -3), hubo una disminución significativa en su concentración en las colonias 11 y 20, en comparación con las otras cepas analizadas. Esta variación también se vio reflejada en su porcentaje relativo (%).

7.6.2.4. Contenido del ácido hexadecadienoico (16:2)

El ácido 16:2, sólo presentó cambios significativos en la cepa 17, en donde alcanzó una mayor concentración (mg g^{-1} peso seco) en comparación con las otras cepas, sin embargo, este incremento no se observó en el porcentaje relativo (%). La cepa 13, fue la que mostró un menos porcentaje relativo (%) del ácido 16:2.

7.6.2.5. Contenido del ácido hexadecatrienoico (16:3)

La concentración promedio (mg g^{-1} peso seco) del ácido hexadecatrienoico es mayor en las cepas mutantes en comparación con la cepa silvestre, principalmente en las cepas 6, 13, 17, 18 y 19, en donde el incremento fue significativo ($p < 0.05$). Sin embargo, el contenido medido en porcentaje relativo (%) solo es significativamente mayor ($p < 0.05$) en las cepas 11, 13, 17, 18 y 19.

7.6.2.6. Contenido del ácido octadecanoico (18:0)

De los cuatro ácidos grasos saturados presentes en *P. tricornutum*, en el 18:0 se observó una mayor diferencia entre las cepas mutantes y la cepa silvestre. En esta última, el contenido promedio es mucho mayor con respecto a las cepas mutantes seleccionadas, tanto en concentración (mg g^{-1} peso seco) como porcentaje relativo (%). De las cepas mutantes,

en la cepa 13, el contenido y porcentaje relativo de este ácido graso fue inferior con respecto a las otras cepas analizadas.

7.6.2.7. Contenido del ácido octadecaenoico: isómeros 18:1(ω -9) y 18:1(ω -11)

La concentración promedio (mg g^{-1} peso seco) del isómero 18:1(ω -9), fue mayor con respecto a la cepa silvestre en las cepas 3, 6, 13, 19 y 20, pero esta diferencia fue significativa ($p < 0.05$) únicamente en la cepa 20. La mayor diferencia en el porcentaje relativo (%) de este ácido, se observó en la cepa 13.

El isómero 18:1 (ω -11), se encuentra en menor proporción en comparación con el isómero (ω -9). En el contenido (mg g^{-1} peso seco) de este ácido graso se observaron cambios significativos en la cepa 13, con una disminución con respecto a las cepas 6, 17, 18, 19 y 20. En la cepa 19 presentó un incremento significativo ($p < 0.05$) en comparación con las otras cepas, incluyendo la silvestre. Este comportamiento también se reflejó en el porcentaje relativo (%) de este ácido graso.

7.6.2.8. Contenido del ácido octadecadienoico (18:2 ω -6)

El contenido promedio del 18:2 (ω -6) osciló entre 1.2 y 1.5 mg g^{-1} de biomasa. No hubo diferencias significativas en el contenido de este ácido graso entre las cepas mutantes y la cepa silvestre. Cuando se analizó el porcentaje relativo (%) de este ácido graso, se observó un incremento significativo en la cepa 20, en comparación con las otras cepas seleccionadas.

7.6.2.9. Contenido del ácido octadecatrienoico (18:3 ω -3)

La concentración promedio del ácido graso 18:3 (ω -3), tiende a ser menor en las cepas mutantes con respecto a la cepa silvestre, y es la colonia 13 la que presentó diferencias significativas ($p < 0.05$) en concentración (mg g^{-1} peso seco) y porcentaje relativo (%). Por otra parte, solamente en la cepa 20 la proporción del ácido 18:3 (ω -3) tuvo un aumento significativo con respecto a las otras cepas mutantes, pero no en comparación con la silvestre.

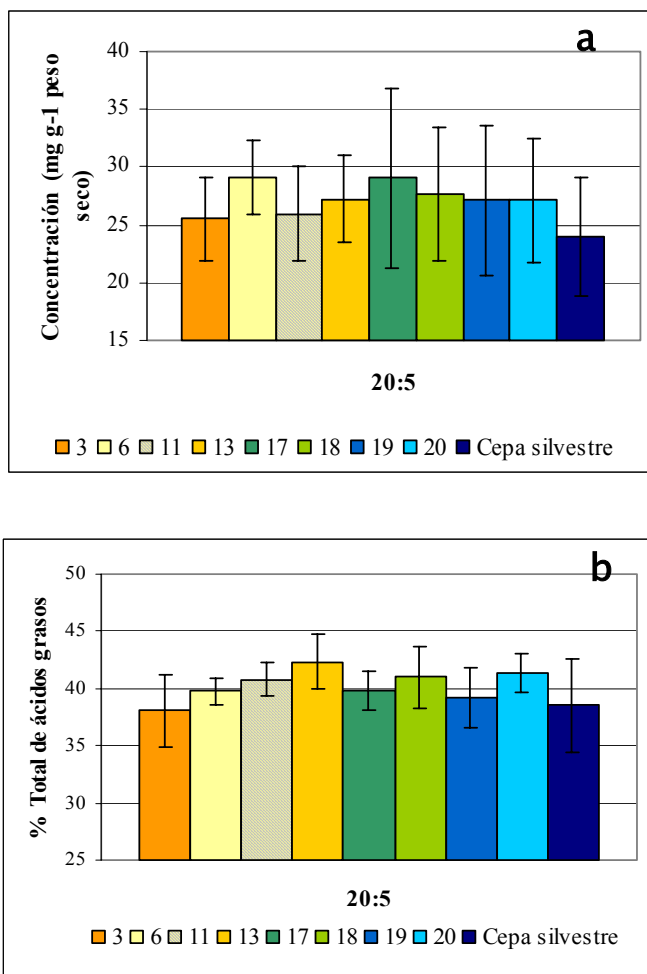
7.6.2.10. Contenido del ácido octadecatetraenoico (18:4 ω -3)

La concentración promedio (mg g^{-1} peso seco) del 18:4 (ω -3) mostró diferencias significativas principalmente en las cepas 3 y 13. En la primera, la concentración promedio fue inferior con respecto a la cepa silvestre, y en la segunda, hubo un incremento considerable en el contenido promedio (mg g^{-1} peso seco) y porcentaje relativo (%). En la cepa 13 se observa una relación inversa del ácido 18:4 (ω -3) con respecto al 18:3(ω -3); además es la cepa con mayor abundancia de la especie 18:4 (ω -3) y menor abundancia de la especie 18:3 (ω -3).

7.6.2.11. Contenido del ácido eicosapentaenoico (20:5 ω -3)

El 20:5 (ω -3) es el ácido graso más abundante en *P. tricornutum*, tanto en las cepas mutantes como en la cepa silvestre (>30%). En las cepas mutantes, se observó un incremento no significativo en la concentración (mg g^{-1} peso seco) con respecto a la cepa silvestre, a excepción de la cepa 17 en la cual, el incremento sí fue significativo ($p < 0.05$).

En el porcentaje relativo del 20:5 (ω -3), hubo un incremento significativo con respecto a la cepa silvestre en las cepas 11, 13, 18 y 20, alcanzando hasta un 42% del total de ácidos grasos en la cepa 13 (Figura 11).



Figuras 11. Comparación del contenido del ácido 20:5 (ω -3) en *P. tricornutum*, (a) concentración y b) % del total de ácidos grasos) en las 8 diferentes cepas analizadas

7.6.2.12. Contenido del ácido docosahexaenoico (22:6 ω -3)

Al igual que el ácido 20:5 (ω -3), la tendencia de las cepas mutantes, fue un incremento en el porcentaje relativo (%) y concentración (mg g⁻¹ peso seco) con respecto a

la cepa silvestre, pero este incremento fue significativo únicamente en las cepas 11, 13, 19 y 20.

8. DISCUSIÓN

8.1 Protocolo de mutagénesis en *P. tricornutum* (Bohlin)

El EMS es un agente químico que favorece la transición de bases de G-C a A-T. Este proceso incrementa la tasa de mutación espontánea dentro de las células la cual es de alrededor de un gen mutado por cada 10^6 generaciones (Alberts et al., 1994). Sin embargo, la obtención de mutantes viables con un fenotipo especial requiere de una extensa búsqueda (Botstein y Shortle et al, 1985).

El uso de mutágenos tiene como principal barrera la obtención de organismos viables después de la exposición, ya que las mutaciones generalmente son deletéreas y originan organismos con características que impiden su supervivencia dentro una población, y son eliminados por selección natural (Alberts et al., 1994).

P. tricornutum presentó una baja resistencia al EMS, con una mortalidad del 100% en concentraciones de EMS superiores a $50\mu\text{M}$. Esta concentración es muy inferior en comparación a las dosis reportadas en otros trabajos de mutagénesis, particularmente en *Streptococcus termophilus* (Ibrahim y O'Sullivan., 2000), *Spirulina platensis* (Ruengjitchachawalya et al., 2002), y *Nannochloropsis sp.* (Schneider et al., 1995), en donde las concentraciones de EMS empleadas oscilaron entre 235mM y 1.13M.

Por otra parte, de acuerdo con la Figura 4, la exposición al EMS incrementó la resistencia de la cepa de *P. tricornutum* al antibiótico zeocina de 1.6 a 4.6 veces. En las células de *P. tricornutum*, la frecuencia de mutación medida como porcentaje de células resistentes al antibiótico con respecto al total de células sobrevivientes después de la exposición a EMS, fue de 4 a 27%. La generación de células resistentes al antibiótico zeocina no presentó una relación directa con la concentración de EMS ni con el tiempo de

exposición al mismo. Contrario a lo que se esperaba, la mayor frecuencia de mutación se presentó en aquellas células de *P. tricornutum* expuestas a las concentraciones más bajas de EMS: 6.25 y 12.5 μ M. Esto coincide con la elevada sensibilidad de la cepa silvestre al mutágeno, lo que sugiere que a menores concentraciones de éste, las mutaciones generadas no afectan genes esenciales para la cepa, lo que se refleja en una mayor supervivencia, incrementando la probabilidad de que las mutaciones expresadas le confieran a la cepa características especiales, como la resistencia a la zeocina.

La resistencia generada e interpretada como resultado de las posibles mutaciones, no fue estable y se perdieron las células resistentes entre los 8 y los 15 días de incubación en presencia de zeocina. La supervivencia en presencia de zeocina fue mayor en aquellas células resultantes de los tratamientos a bajas concentraciones de EMS.

La pérdida de viabilidad en las células resistentes se puede explicar como parte del proceso de reparación del ADN, presente en todas las células, en donde los cambios generados por el mutágeno se revierten. En el caso particular de las células resistentes a zeocina, éstas perdieron la viabilidad en presencia del antibiótico.

Cabe enfatizar que la zeocina es un antibiótico glicoproteico derivado del complejo phleomicina/ D1 que se une y degrada al ADN (www.cayla.com), lo cual puede sugerir que en aquellas células que inicialmente generaron resistencia a la zeocina, la exposición a este compuesto generó nuevas mutaciones no viables. En el caso de las células transformadas de *P. tricornutum* y otros organismos, en las cuales se ha empleado la zeocina como factor de selección, se inserta el gen *sh ble* de *Streptoalloteichus hindustanus* (Apt et al., 1996), que codifica para una proteína que se une e inactiva a la zeocina (www.cayla.com). Además de

la zeocina, la cepa silvestre de *P. tricornutum* también es sensible a phleomicina (Apt et al., 1996), antibiótico de la familia phleomicina/bleomicina (www.cayla.com); cloranfenicol (200µg/ml) y eritromicina (100µg/ml) (Apt et al., 1996), que actúan durante la síntesis de ARN al nivel de ribosomas (Alberts et al., 1994). Estos dos últimos antibióticos podrían ser empleados en análisis futuros para medir la frecuencia de mutación en *P. tricornutum* descartando la posible influencia que el antibiótico pueda tener sobre el ADN.

De acuerdo a lo descrito anteriormente, aparentemente en las concentraciones óptimas de EMS 6.25 y 12.5 µM (aquellas en donde se generó mayor resistencia a la zeocina), se observaron las frecuencias de mutación más altas y los cultivos más estables en presencia de zeocina. Para los análisis posteriores se seleccionaron colonias supervivientes de estos tratamientos.

8.2 Disminución en la temperatura de incubación como un factor de selección de cepas mutantes

Una vez que se determinaron las condiciones de mutagénesis óptimas, se identificaron las características fenotípicas idóneas para la discriminación de las mutantes, con características importantes para su estudio, de la cepa silvestre o bien de mutantes con cambios irrelevantes.

Para la selección de posibles cepas de *P. tricornutum* con variaciones en su contenido de ácidos grasos es necesario definir la función que estos desempeñan dentro de las células de microalgas para facilitar el reconocimiento de aquellas que aprovechan estas modificaciones para su supervivencia. Trabajos en plantas superiores y cianobacterias, han

demostrado que la insaturación de los ácidos grasos presentes en las membranas glucolípídicas de cloroplastos y tilacoides, están relacionadas con la protección de los sistemas fotosintéticos a bajas temperaturas (Nishida y Murata, 1996; Somerville, 1995; Miquel et al., 1993; Gombos et al., 1992).

En *P. tricornutum*, aún no se han descrito las funciones de los PUFAs, sin embargo, como un posible factor de selección de cepas mutantes de *P. tricornutum* con modificaciones en su contenido de PUFAs, se analizó el comportamiento de la cepa silvestre a dos intervalos de temperatura inferiores a los 20°C (0–5°C y 4–14°C), sin inyección de la mezcla aire/CO₂.

El crecimiento de la cepa silvestre de *P. tricornutum* se vio afectado en las primeras 24h después del cambio en la temperatura de incubación, siendo el efecto de la temperatura más pronunciado conforme la temperatura de incubación disminuye. Sin embargo, después de 72h de incubación a 4-14°C se observó una recuperación de casi el 100% con respecto al cultivo control incubado a 20°C. El contenido de ácidos grasos también se vio afectado en forma negativa conforme la temperatura de incubación disminuyó, no así la proporción de los PUFAs, principalmente EPA (20:5 ω -3), la cual aumentó al disminuir la temperatura. Este comportamiento ya ha sido descrito en plantas superiores (briofitas) y cianobacterias, como parte de la aclimatación de los organismos a los cambios de temperatura, además de otros cambios metabólicos que permiten su sobrevivencia a bajas temperaturas (Sarawaturi et al., 1999; Wada et al., 1994; Gombos et al., 1992). En este primer análisis, de los dos intervalos de temperatura empleados, a 4-14°C, los cambios en el crecimiento de *P.*

tricornutum fueron pronunciados, no así las modificaciones en el contenido de PUFAs, en donde las variaciones con respecto al cultivo control no fueron significativas.

En experimentos posteriores, dentro de este intervalo de temperatura, se analizó el comportamiento de la cepa silvestre de *P. tricornutum* con y sin inyección de una mezcla aire/CO₂. Al repetir el análisis de la cepa silvestre en ausencia de la mezcla aire/CO₂, el comportamiento del cultivo se mantiene, y una vez que la temperatura de incubación disminuye, hay una reducción del 36% en la tasa de crecimiento en las siguientes 24h en comparación con la tasa de crecimiento en el cultivo control a 20°C.

En el caso de los cultivos crecidos en presencia de aire/CO₂, cuando la temperatura de incubación cambia, la tasa de crecimiento se ve afectada en un 30% con respecto a los cultivos control, lo cual sugiere que la disponibilidad de CO₂ disminuye los efectos del cambio de temperatura sobre el cultivo. En un estudio realizado con plantas de maíz (*Zea mays*), Fryer et al (1998) propusieron que entre los posibles mecanismos celulares que se ven afectados por la exposición a bajas temperaturas, es la reducción en la asimilación de CO₂, lo cual da lugar a un exceso de electrones reductores. El exceso de electrones no asimilados por el CO₂ genera especies oxidantes altamente reactivas y nocivas para las biomoléculas. Para el caso de las plantas superiores, los autores sugieren que la disminución en la asimilación de CO₂ se debe, entre otros factores, a la ineficiencia de los mecanismos de concentración de CO₂ en las hojas a bajas temperaturas.

Para los cultivos de *P. tricornutum*, la adición de CO₂ al medio favorece su disponibilidad reduciendo los efectos que la disminución de la temperatura tiene sobre las células por la posible generación de especies oxidantes altamente reactivas. Sin embargo, como se observó en el experimento preliminar, el efecto del cambio de temperatura no es

completamente nocivo para las células de *P. tricornutum*, ya que presentan una recuperación en su tasa de crecimiento 48h después del tratamiento, no observándose cambios significativos entre la biomasa final de los cultivos tratados y aquellos que se crecieron bajo condiciones óptimas. Lo anterior sugiere que las células de *P. tricornutum* tienen los mecanismos celulares necesarios para adaptarse a bajas temperaturas, ya que dicha microalga procede de Segelskär, Finlandia (www.utex.com), donde la temperatura del agua durante primavera-verano, oscila entre los 2 y los 20°C (Hietala y Backer, 2002) épocas del año donde se presenta la mayor ocurrencia de florecimientos algales (Finnish Institute of Marine Research, 2000).

En cuanto al contenido de ácidos grasos, éste varió con respecto a la experiencia preliminar. En el segundo experimento, los ácidos grasos más afectados por el cambio de temperatura en los cultivos sin aireación fueron 16:1(ω -9), 16:3 y 18:1(ω -9), los cuales disminuyeron en concentración y porcentaje relativo con respecto al total de ácidos grasos. En contraste, los ácidos 18:3 (ω -3) y 22:6 (ω -3) presentaron un incremento significativo a bajas temperaturas en comparación con los cultivos a 20°C. El contenido de EPA (20:5 ω -3) bajo estas condiciones de cultivo no se vio afectado en concentración o en porcentaje relativo con respecto al total de ácidos grasos. En los cultivos crecidos con la mezcla aire/CO₂, hubo un incremento en los ácidos grasos 14:0, 16:0, 18:0, los isómeros 18:1(ω -9) y 18:1(ω -11), 16:1 (ω -9), 18:2 (ω -6), 18:4 (ω -3) y 22:6 (ω -3). Por otra parte, los ácidos grasos 16:1 (ω -3) y 16:3 mostraron una disminución significativa en concentración y porcentaje relativo con respecto al cultivo control a 20°C. Al igual que en los cultivos sin aireación, la concentración (mg g⁻¹) de EPA (20:5 ω -3) no se afectó de forma significativa,

sin embargo, su porcentaje relativo disminuyó significativamente en los cultivos a bajas temperaturas.

Comparando los perfiles de ácidos grasos de los cultivos crecidos a bajas temperaturas en presencia/ausencia de CO₂ se puede destacar que a pesar de que aparentemente hay ácidos grasos precursores del EPA que se comportan de forma opuesta (como es el caso de los isómeros 18:1(ω-9) y 18:1(ω-11)), la concentración final de éste no se ve afectada de forma significativa bajo ninguna de las condiciones de cultivo analizadas. Cabe resaltar el incremento que presenta el 22:6 (ω-3) en los cultivos crecidos a bajas temperaturas con y sin CO₂, lo que sugiere que este ácido graso es un elemento regulador importante a pesar de que se presenta en concentraciones muy pequeñas en comparación con el EPA (2–3% de los ácidos grasos totales).

A pesar de que la disminución al intervalo de temperatura propuesto no afectó de igual forma a los cultivos con y sin inyección de CO₂, se consideró el hecho de que dentro de este intervalo, los cultivos sin aireación presentaban una disminución en su tasa de crecimiento a las 24h siguientes al cambio en las condiciones de incubación, y que el contenido de PUFAs, principalmente el 20:5 (ω-3) no era afectado de forma significativa. De esta forma, se propuso la disminución en la temperatura de incubación a 4-14°C, como un parámetro para la selección de posibles cepas mutantes de *P. tricornutum*.

8.3 Selección, análisis y caracterización de cepas mutantes de *P. tricornutum*

Se seleccionaron 66 colonias tratadas con EMS, de éstas, en 19 colonias no se observó disminución en su tasa de crecimiento al ser expuestas al intervalo de temperatura

4–14°C. De acuerdo con esto, el porcentaje de posibles colonias mutantes con respecto al total de células analizadas fue del 29%. Este porcentaje coincide con la frecuencia de mutación más elevada calculada con respecto a la resistencia con zeocina, sin embargo, esta relación no fue estable y después de cinco meses, únicamente 8 colonias conservaron su presunta resistencia a cambios a bajas temperaturas de incubación, reduciendo así el porcentaje de posibles cepas mutantes a 12%.

En los análisis de selección de cepas mutantes, al ser sometidas las 8 cepas al cambio de temperatura, presentaron tasas de crecimiento más altas (de 4 a 9 veces) en comparación con la cepa silvestre, sin embargo, cuando se crecieron a 20°C las diferencias entre las tasas de crecimiento no fueron tan relevantes e incluso se debe resaltar que bajo estas condiciones, la cepa silvestre presenta una tasa de crecimiento más elevada (de 1.3 a 1.7 veces) en comparación con las cepas seleccionadas.

En cuanto a la biomasa total en peso seco entre las cepas seleccionadas y la cepa silvestre, no hubo cambios significativos lo cual coincide con las pocas diferencias encontradas en las tasas de crecimiento. Sin embargo, el análisis del contenido de ácidos grasos de las posibles 8 cepas mutantes comparado con la cepa silvestre, reflejan cambios importantes a nivel metabólico. Los cambios más importantes en el contenido y proporción de ácidos grasos saturados se observó en el 18:0, primer precursor de los ácidos grasos poliinsaturados de 18 y 20 carbonos. El contenido de este ácido graso en las cepas mutantes seleccionadas, disminuyó significativamente con respecto a la cepa silvestre, lo cual indica que en las cepas mutantes este ácido graso es asimilado con mayor eficiencia en la síntesis de los PUFAs. De forma opuesta, el 16:0, el cual es el ácido graso saturado más abundante en *P. tricornutum*, no presentó variaciones significativas entre las cepas mutantes y la cepa

silvestre. Este ácido graso en la cepa silvestre se encuentra presente tanto en los triacilglicéridos como en los lípidos de membrana (Arao et al., 1987).

El ácido graso monoinsaturado más abundante en *P. tricornutum*, es el 16:1 (ω -9) (Arao et al., 1987). El comportamiento de éste sólo presentó diferencias significativas entre la cepa 13 y el resto de las cepas analizadas. El segundo isómero de 16 carbonos, el 16:1 (ω -3), el cuál se encuentra en una menor proporción, fue menos abundante en las posibles cepas mutantes con respecto a la cepa silvestre; esta tendencia solo presentó diferencias significativas en las cepas 11 y 20. Según Arao et al., (1987), el 16:1 (ω -9) en la cepa silvestre se localiza tanto en los glicerolípidos de membrana como en los triacilglicéridos, mientras que el 16:1 (ω -3), se distribuye principalmente en los lípidos de membrana PG.

La variación en los ácidos grasos monoinsaturados de 18 carbonos, 18:1 (ω -9) y 18:1 (ω -11), no mostró ningún patrón entre las posibles cepas mutadas con respecto a la cepa silvestre. El contenido de 18:1 (ω -9) se incrementó en comparación con la cepa silvestre en cinco (3, 6, 13, 19 y 20) de las 8 cepas analizadas. En el caso del 18:1 (ω -11), se observó un incremento en cuatro (17, 18, 19 y 20) de las 8 cepas seleccionadas. Se debe destacar que el comportamiento de estos dos ácidos grasos fue opuesto en algunas de las cepas analizadas (cepas 17 y 18). De los dos ácidos grasos monoinsaturados de 18 carbonos, sólo el ácido graso 18:1 (ω -9) es precursor de PUFAs en *P. tricornutum* (Arao y Yamada, 1994). A pesar de la uniformidad en el comportamiento del 18:0, las diferencias observadas en el contenido de los ácidos monoinsaturados entre las cepas, sugieren que la síntesis y aprovechamiento de estos dos ácidos grasos difiere entre cepas, lo cual como se describirá posteriormente se vió reflejado en la síntesis de los PUFAs de 18 y 20 carbonos.

En cuanto al contenido de PUFAs, los dos ácidos grasos con dobles insaturaciones, tanto de 16 como de 18 carbonos no presentaron diferencias significativas entre las cepas mutadas y la cepa silvestre, excepto en las cepas 13 y 17 para el ácido 16:2, y la cepa 20 para el 18:2 (ω -6).

En el caso de los ácidos grasos con tres insaturaciones, se observó un incremento, con respecto a la cepa silvestre en el contenido del 16:3 de las cepas mutantes. Éste es, en porcentaje relativo, el tercer ácido graso poliinsaturado más abundante en *P. tricornutum* de acuerdo a Arao et al.,(1987), además se encuentra en mayor proporción en la fracción lipídica MGDG.

El 18:3 (ω -3) al igual que los isómeros 18:1(ω -9) y (ω -11), no presentó un comportamiento específico entre las posibles cepas mutantes y la cepa silvestre, este ácido graso a su vez es precursor del 18:4 (ω -3). En el 18:4 (ω -3), tampoco se observó un patrón entre las cepas mutantes. Se observaron diferencias en la transformación del ácido 18:3 (ω -3) al 18:4 (ω -3) entre cepas, ya que en algunas cepas mutantes, se ve una relación inversa entre la proporción de estos ácidos grasos. Por ejemplo, en la cepa 13, en donde la reducción en el contenido del 18:3 (ω -3), se refleja en un incremento significativo en el contenido del 18:4 (ω -3), mientras que en las cepas 6, 11, 17, 19 y 20, la relación entre estos dos ácidos es directamente proporcional; esto podría indicar que la eficiencia en la transformación es diferente para cada cepa.

De acuerdo a las rutas de biosíntesis de EPA propuestas por Arao y Yamada (1994), el 18:4 (ω -3) es precursor del 20:4 (ω -3), el cual es desaturado para sintetizar el 20:5 (ω -

3). En las cepas analizadas, tanto mutantes como silvestre no fue posible detectar al ácido 20:4 (ω -3) a diferencia de lo reportado por Arao et al., (1987).

El 20:5 (ω -3), a pesar de las diferencias observadas en sus precursores, presenta un patrón definido entre las 8 cepas mutantes y la cepa silvestre; esto es, hubo un incremento en el contenido de este ácido graso en todas las cepas seleccionadas en comparación con la cepa silvestre, y este incremento fue significativo únicamente en la cepa 17. En el porcentaje relativo de este ácido graso también se observó un incremento que fue significativo sólo para cuatro (11, 13, 18 y 20) de las 8 cepas analizadas. Se debe resaltar que no coinciden las cepas con un mayor contenido de 20:5 (ω -3) con aquellas que presentan un porcentaje relativo mayor. De la misma forma, no se encontró una relación directa entre la acumulación de los precursores del 20:5 (ω -3) y la síntesis de éste; así, en la cepa 17 en la cual no hay acumulación del 18:4 (ω -3) (0.39mg g^{-1} y 0.54%), se alcanza la mayor concentración de 20:5 (ω -3) (29mg g^{-1}) pero no el mayor porcentaje relativo (39.8%). Por otra parte, en la cepa 13, se observa una mayor acumulación del 18:4 (ω -3), en concentración y porcentaje relativo (0.57mg g^{-1} y 0.89%). En esta misma cepa, el porcentaje relativo del 20:5 (ω -3) es el más alto en comparación con las otras cepas (27.2mg g^{-1} y 42.3%). Según Arao et al., (1987) el 20:5 (ω -3) es el ácido graso más abundante en los glicerolípidos MGDG, PG y PC.

Otro ácido graso poliinsaturado presente en los cultivos de *P. tricornutum*, es el ácido 22:6 (ω -3) que se encuentra a bajas concentraciones en comparación con el 20:5 (ω -3). Sin embargo, en las cepas mutantes éste también se presenta en una mayor concentración

(1.43mg g⁻¹–1.91mg g⁻¹) y porcentaje relativo (2.13%-2.49%) en comparación con la cepa silvestre (1.27mg g⁻¹ y 1.99%).

Con la finalidad de separar y agrupar estadísticamente a las cepas mutantes seleccionadas de acuerdo a los cambios que éstas mostraron en el contenido y porcentaje relativo de los ácidos grasos, se realizó el análisis de componentes principales. De este análisis se obtuvo que en función del porcentaje, es posible distinguir 7 de las 8 cepas analizadas. Sin embargo, cuando el agrupamiento se realizó en función de la concentración sólo 5 de las 8 colonias se agruparon; en ambos casos los grupos se traslapan y se concentran en torno a la media.

De las cepas mutantes analizadas, las cepas 13 y 20 presentaron una mayor variación en su contenido de ácidos grasos con respecto a las otras cepas, incluyendo la cepa silvestre. En la cepa 13, hay un incremento significativo en la concentración del 14:0 y 18:4 (ω -3) y, en términos de porcentaje relativo, presenta un incremento significativo en los ácidos grasos 14:0, 18:1 (ω -9), 18:4 (ω -3), 20:5 (ω -3) y 22:6 (ω -3). En contraste, en esta misma cepa los ácidos grasos 16:0, 18:0, 16:1 (ω -9), 18:1 (ω -11) y 18:3 (ω -3) presentaron una reducción significativa tanto en concentración como en porcentaje relativo.

En la cepa 20, se observó un incremento significativo en el porcentaje de 16:3, 18:2 (ω -6), 18:3 (ω -3), 20:5 (ω -3) y 22:6 (ω -3). Contrariamente el 16:1 (ω -3) y el 18:0, se redujeron significativamente en términos de concentración y porcentaje relativo.

En ambas cepas, se observan diferencias en la asimilación y acumulación de los diferentes precursores del 20:5 (ω -3), por ejemplo en el 18:3 (ω -3), sin que estos cambios

afecten su concentración final (27.2mg g^{-1} y 27.11mg g^{-1}) ni el porcentaje relativo (42.3% y 41.3%).

Como ya se describió anteriormente, todas las cepas mutantes presentaron un incremento en su contenido promedio del 20:5 (ω -3), el cual osciló entre los 25.5 y los 29mg g^{-1} . La concentración promedio del 20:5 (ω -3) en la cepa silvestre fue de 23.9mg g^{-1} de biomasa en peso seco, el incremento en las cepas mutadas osciló entre el 6.6 y el 21%. Las cepas 6 y 17, tuvieron un mayor contenido de 20:5 (ω -3), ambas con 29mg g^{-1} . López-Alonso et al., (1996), reportaron que el contenido promedio de 20:5 (ω -3) en la cepa silvestre de *P. tricornutum* UTEX 640 era de 17.3mg g^{-1} , y en ese mismo trabajo se reportó la generación de cepas mutantes de *P. tricornutum* por exposición a luz UV: la cepa denominada I14 con una concentración de 20:5 (ω -3) de 31.5mg g^{-1} y la I1242 con una concentración de 38.6mg g^{-1} . Estos valores correspondieron a un incremento del 37 y 44% respectivamente. La productividad reportada para estas cepas fue de 3.48, 4.01 y $4.98\text{mg l}^{-1}\text{d}^{-1}$.

Las concentraciones de 20:5 (ω -3) reportadas para las cepas I14 y I1242 son 7 y 31% más elevadas que las concentraciones de este ácido alcanzadas en las cepas 6 y 17 obtenidas en este trabajo. Sin embargo, las productividades reportadas por López-Alonso et al., (1996) son menores que las productividades obtenidas y calculadas en este trabajo, incluso para la cepa silvestre, ya que bajo las condiciones de cultivo empleadas y a una densidad celular promedio de 1.19g l^{-1} , el rendimiento de la cepa silvestre y las cepas 6 y 17 es de 7.11 y $8.64\text{mg l}^{-1}\text{d}^{-1}$ respectivamente. Cuando se consideran las densidades celulares calculadas individualmente por cepa (Tabla XIII), la productividad más alta la

presentó la cepa 18 con $10.8\text{mg l}^{-1}\text{d}^{-1}$, frente a una productividad en la cepa silvestre de $6.05\text{mg l}^{-1}\text{d}^{-1}$.

A diferencia de lo que reporta López-Alonso et al., (1996) se encontraron diferencias significativas en el porcentaje relativo de 20:5 (ω -3), el cual se incrementó de 5.7 a 9.8% en las cepas 11, 13, 18 y 20.

Por otra parte, de acuerdo a los resultados obtenidos para la cepa silvestre en fase estacionaria (con o sin cambios de temperatura), se obtuvo una mayor concentración ($30\text{--}35\text{mg g}^{-1}$) y porcentaje (43%) de 20:5 (ω -3), con respecto a las cepas mutantes analizadas en fase exponencial. La productividad de la cepa silvestre en fase estacionaria fue de $7.6\text{mg l}^{-1}\text{d}^{-1}$ en condiciones normales y $8.1\text{mg l}^{-1}\text{d}^{-1}$ a bajas temperaturas; esto coincide con lo reportado por Arao et al., (1987) para *P. tricornutum*, en el sentido de que las mayores concentraciones de EPA se obtienen al alcanzar la fase estacionaria.

De los ácidos grasos detectados, se sugiere que la ruta de biosíntesis que siguieron los PUFAs en las cepas de *P. tricornutum* bajo las condiciones de cultivo, de este trabajo, fue: $18:0 \rightarrow 18:1(\omega-9) \rightarrow 18:2(\omega-6) \rightarrow 18:3(\omega-3) \rightarrow 18:4(\omega-3) \rightarrow 20:4(\omega-3)$ (no detectado) $\rightarrow 20:5(\omega-3)$. Las enzimas participantes según la ruta sugerida son: $\Delta 7$ -desaturasa, $\Delta 9$ -desaturasa, $\Delta 12$ -desaturasa, $\Delta 6$ -desaturasa, $\omega 3$ -desaturasa, $\Delta 6$ -elongasa y $\Delta 5$ -desaturasa (Domergue et al, 2002).

De acuerdo a los resultados obtenidos, se sugiere que es en los genes de estas enzimas donde el mutágeno podría haber afectado, por modificaciones directas de sustitución de bases, que a su vez se reflejaron en cambios favorables en la secuencia de aminoácidos. En otros trabajos se ha intentado evaluar la probabilidad de que este tipo de cambios sean

factibles. Lee y Levitt (1991) describen de un total de 125 posibles mutantes (del represor A, diseñados por síntesis de oligonucleótidos por permutación de cinco diferentes aminoácidos dentro de la secuencia) sólo 10 (8%) con elevada actividad y estabilidad semejante a la conformación original.

Además de las modificaciones directas sobre los genes que codifican para las enzimas, el efecto del mutágeno también pudo haberse presentado en las regiones que participan en la regulación de la expresión de dichas enzimas, por alteraciones directas (cis) en un sitio de control dentro de la región codificante de los genes de estas enzimas, o indirectas (trans) por alteraciones en los genes que codifican para las proteínas reguladoras (Lewin, 1997). La regulación de la expresión de las enzimas $\Delta 9$ -desaturasa, $\Delta 12$ -desaturasa, $\Delta 6$ -desaturasa, $\omega 3$ -desaturasa, en la cianobacteria *Synechocystis* PCC6803, fue reportada por Kis et al (1998) y Los et al (1998), ambos trabajos describen que la expresión y estabilidad del ARNm de las enzimas $\Delta 12$ -desaturasa, $\omega 3$ -desaturasa y $\Delta 6$ -desaturasa, es inducida a bajas temperaturas y en presencia de luz. Los factores transcripcionales propuestos para la regulación son factores generados durante el transporte de electrones en la fotosíntesis (Kis et al, 1998) o bien factores dependientes de bajas temperaturas (Los et al., 1998). Lo anterior sugiere que las rutas biosintéticas de PUFAs en *P. tricornutum* pueden ser reguladas de forma análoga, y que la exposición al EMS pudo haber generado alteraciones a nivel transcripcional.

Cabe mencionar que los ácidos grasos poliinsaturados que presentaron un incremento en su contenido en las cepas mutadas comparadas con la cepa silvestre fueron: 16:3, 20:5 (ω -3) y 22:6 (ω -3); los dos primeros tal y como lo describió Arao et al., (1987) son las

especies más abundantes en el glicerolípido de membrana MGDG, por lo que se puede deducir que la acumulación de estos ácidos grasos en las posibles cepas mutantes es el mecanismo empleado para sobrevivir a los cambios de temperatura a los que fueron expuestas.

Se desconocen los mecanismos mediante los cuales los ácidos grasos poliinsaturados protegen a las células fotosintéticas crecidas a bajas temperaturas y en presencia de luz. Una primera aproximación fue el considerar que su importancia radicaba en la regulación de la fluidez de las membranas lipídicas a bajas temperaturas, conocida como adaptación homeoviscosa, sin embargo, la primera insaturación es la que más contribuye con la fluidez de la membrana (Nishisawa-Ishizaki et al, 1996; Los et al, 1997; Kis et al, 1998). En otros trabajos se resalta la importancia de los PUFAs, como el 20:5 (ω -3) en la supervivencia de plantas superiores y microalgas (Miquel et al., 1993; Sakamoto et al., 1998; Kis et al., 1998; Tasaka et al., 1996, Gombos et al., 1992; Saruwatari et al., 1999). Gombos et al., (1992) y Tasaka et al, (1996) proponen que la participación de los PUFAs de las membranas tilacoidales está relacionada con la inserción y acoplamiento de las proteínas de membrana involucradas en la fotosíntesis, como es el caso de la proteína D1 del complejo PII. También se ha propuesto que la presencia de PUFAs en las membranas plasmáticas favorecen la asimilación de nutrientes, principalmente nitrógeno (Sakamoto et al, 1998).

En este trabajo, los resultados obtenidos sugieren que la resistencia a bajas temperaturas observada en las 8 posibles cepas mutantes se pudo deber al incremento en la proporción y concentración del 20:5 (ω -3) y 16:3, que son PUFAs más abundantes en los MGDG (Arao et al., 1987), glicolípido más abundante en las membranas celulares

(Hiroyuki et al., 2000; Arao et al., 1987). Esta sugerencia se propone aún a pesar de que los incrementos obtenidos en las cepas mutantes no hayan sido estadísticamente significativos en todas las cepas analizadas, pero se parte del hecho de que en las diferentes cepas mutantes, no importando el comportamiento de los ácidos grasos precursores, la tendencia de estos PUFAs se mantuvo. Sin embargo, para saber cual sería el incremento máximo que se puede obtener en las presuntas cepas mutantes de *P. tricornutum* de dichos ácidos grasos, será necesario evaluar su contenido en la fase estacionaria y bajo condiciones de estrés (bajas temperaturas).

También es importante considerar que paralelamente a los cambios observados en el contenido de ácidos grasos en las cepas mutantes (considerando que estos no fueron significativos con respecto a la cepa silvestre), dentro de las células existen otros mecanismos de protección a bajas temperaturas que pudieron haber sido afectados por la exposición al mutágeno.

La exposición a bajas temperaturas en presencia de luz genera un exceso de electrones provenientes de la fotosíntesis y de la cadena respiratoria que dan lugar a la formación de superóxidos a partir de la reducción del oxígeno (Thomas et al., 1999; Herbert et al., 1992; Tjus et al., 1998). Dichas moléculas actúan sobre los componentes celulares, originando peroxidación de lípidos, desnaturalización de proteínas y cambios en el ADN (Herbert et al., 1992). Los mecanismos celulares reportados en plantas superiores y cianobacterias, destinados a prevenir estos daños mediante la regulación del estado redox, incluyen la síntesis de antioxidantes no proteicos, como el β -caroteno y el α -tocoferol (Thomas et al., 1999), la síntesis de enzimas antioxidantes de la familia SOD (Thomas et al., 1999; Herbert

et al., 1992), o de moléculas reguladoras como el glutatión, y la enzima glutatión reductasa (Kocsy et al., 2001). Otro mecanismo celular empleado para la prevención de daños por bajas temperaturas en algunas especies vegetales, como el tomate (*Lycopersicon esculentum*) es la síntesis de proteínas de choque térmico (HSP) (Sabehat et al., 1998).

A pesar de lo aquí expuesto en cuanto a los cambios detectados en las 8 cepas mutantes de *P. tricornutum*, únicamente mediante análisis moleculares se podrán confirmar las modificaciones que dentro del genoma se sospecha existieron.

Una primera aproximación sería la comparación directa de las secuencias de las diferentes enzimas participantes de las cepas mutantes contra la silvestre. Además de la secuenciación existen otras técnicas paralelas y complementarias de biología molecular que permiten detectar mutaciones entre dos individuos o poblaciones diferentes, como el análisis simultáneo de polimorfismos en la conformación de una sola cadena acoplado a la reacción en cadena de la ADN polimerasa (PCR-SSCP), método por el cual es posible detectar mutaciones en fragmentos de hasta 300 pb (Susuki et al., 2003) así como el análisis de fragmentos de restricción de longitud variable acoplado a la reacción en cadena de la ADN polimerasa (PCR-RFLP) (Guerrero et al., 2002; Lewin B., 1997).

9. CONCLUSIONES

El protocolo de mutagénesis empleado para el mejoramiento genético de la cepa de *P. tricornutum* fue adecuado, ya que permitió la generación de cepas con aparentes modificaciones genéticas en un elevado porcentaje (30%). Sin embargo este protocolo todavía puede ser mejorado midiendo la frecuencia de mutación con otros parámetros.

El empleo de cambios en la temperatura de incubación y la intensidad luminosa para la detección de colonias mutantes con modificaciones en el contenido de ácidos grasos, es un sistema rápido y aparentemente eficiente, que en este trabajo, permitió la selección de 8 colonias con cambios en la concentración de ácidos grasos.

Los cambios observados en las 8 colonias analizadas, de ser confirmados por técnicas de biología molecular, serán una herramienta importante para el estudio del metabolismo y función de los PUFAs, principalmente del EPA, en *P. tricornutum*. Esto a su vez permitirá en un futuro, realizar trabajos de mejoramiento genético con mayor eficiencia. En este sentido, se propone la indagación de otras funciones de los PUFAs dentro de las células de *P. tricornutum*, que puedan ser empleadas como selectores de cepas con un elevado contenido de estos compuestos.

En cuanto al incremento del contenido de EPA en las cepas mutantes analizadas, aunque el contenido en mg g^{-1} es inferior al reportado por (López-Alonso et al., 1996), para las cepas de *P. tricornutum* modificadas por luz UV, las productividades y el porcentaje total de EPA observado en nuestras cepas, son mayores incluyendo la cepa silvestre. Sin embargo, no es posible afirmar nada en este sentido, ya que estas cepas se analizaron únicamente en fase exponencial, y no en fase estacionaria, donde se ha reportado que se alcanzan las mayores concentraciones y productividades.

10. LITERATURA CITADA

Abeliovich A., 1986, Algae in wastewater oxidation ponds, En: Handbook of microalgal mass culture, editado por Richmond A., CRC Press Inc., Florida USA, 331-338.

Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K. y Watson J. D., 1994, Molecular Biology of the Cell, Garland Publishing, New York, 1294.

Apt K. E., Kroth-Pancic P. G. y Grossman A. R., 1996, Stable Nuclear Transformation of the diatom *Phaeodactylum tricornutum*, *Molecular Gen Genetics*, 252, 572-579.

Apt K. E. y Behrens P. W., 1999, Comercial developments in microalgal biotechnology, *Journal of Phycol*, 35:215-226.

Arao T, y Yamada M., 1994, Biosynthesis of polyunsaturated fatty acids in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*, *Phytochem*, 35, (5), 1177-1181.

Arao T, Yamada M. y Kawaguchi A., 1987, Positional distribution of fatty acids in lipids of the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*, *Phytochem*, 26, 9, 2573-2576.

Belarbi E-H, Molina E y Chisti Y., 2000, A process for high yield and scalable recovery of high purity eicosapentaenoic acid esters from microalgae and fish oil, *Process Biochem*, 2000, 35, 951-969.

Bligh E. G. y Dyer W. J., 1959, A rapid method of total lipid extraction and purification.

Can J. of Biochem and Physiol., 37, 911–917

Botstein y Shorthle D., 1985, Strategies and applications of *in vitro* mutagenesis,

Science, 229, 4719, 1193-1201

Cayla, 2002, www.cayla.com.

Cohen Z., 1986, Products from microalgae, En: An historical outline of applied algology

En: Handbook of microalgal mass culture editado por Richmond A. CRC Press Inc.,

Florida USA, 421-454.

Cohen Z., 1999, *Porphyridium cruentum* En: Chemicals from microalgae editado por

Cohen Z, 1^a ed., Taylor and Francis, 1-21.

Chrismadha T and Borowitzca M., 1994, Effect of the cell density and irradiance on

growth, proximate composition and eicosapentaenoic acid production of *Phaeodactylum*

tricornutum grown in a tubular photobioreactor, *J of App. Phycol.* 6:67-74

Domergue F., Lerchi J., Zähringer U. y Heinz E., 2002, Cloning and functional

characterization of *Phaeodactylum tricornutum* front-end desaturases involved in

eicosapentaenoic acid biosynthesis, *European J Biochem*, 269, 4105-4113.

Fábregas J., Abalde J., Herrero C., Cabezas B. y Veiga M., 1984, Growth of the marine microalga *Tetraselmis suecica* in batch cultures with different salinities and nutrient concentrations, *Aquaculture*, 42, 207-215.

FAO, 1997, Grasas y aceites en la nutrición humana. Consulta FAO/OMS de expertos. (Estudio FAO Alimentación y Nutrición-57, disponible en: www.fao.org/docrep/V4700S00.htm)

Finnish Institute of Marine Research, 2000, meri.fimr.fi/Algaline/Eng/EnPublicAlgaline

Fryer M. J., Andrews J. R., Oxborough K., Blowers D.A. y Baker N. R., 1998, Relationship between CO₂ assimilation, photosynthetic electron transport, and active O₂ metabolism in leaves of maize in the field during periods of low temperature, *Plant Physiol*, 116, 571-580.

Gill I. y Valiverty R., 1997, Polyunsaturated fatty acids, part 1: occurrence, biological activities and applications, *TIBTECH*, 15, 401-409.

Gombos Z., Wada H. y Murata N., 1992, Unsaturation of fatty acids in membrane lipids enhances tolerance of the cyanobacterium *Synechocystis* PCC6803 to low-temperature photoinhibition, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 9959-9963.

Guerrero D., García-Delgado M., Larumbe R., Vizmanos J. L., Novo F. J. y Viñes J.J., 2002, Prevalence of CYPD6 mutations in sporadic Parkinson's disease: case-control study, *ANALES Sis San Navarra*, 25, 2,147-154.

Gükpınar S., 1983, Observations on the culture of a marine diatom *P. tricornutum* (Bohlin) in different nutrient and salinity concentrations, *EU Faculty of Science J, Series B*, Vol VI: 77-86.

Herbert S. K., Samsom G., Fork D. C. y Laudenbach D. E., 1992, Characterization of damage to photosystems I and II in a cyanobacterium lacking detectable iron superoxide dismutase activity, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 8716-8720.

Hietala R. y Backer H., 2002, Hydrography of the Baltic Sea, Finnish Institute of Marine Research, www2.fimr.fi/en/itamerikanta/bsds/559.html.

Hiroyuki O., Koichiro A. y Ken-ichiro T., 2000, Glyceroglycolipids of photosynthetic organisms –their biosynthesis and evolutionary origin-, *Trends in Glycoscience and Glycotechnology*, 12, (66), 241-253.

Ibrahim S. A., y D. J. O'Sullivan, 2000, Use of chemical mutagenesis for the isolation of food grade β -galactosidase overproducing mutants of *Bifidobacteria*, *Lactobacilli* and *Streptococcus thermophilus*, *J. of Dairy Sciences*, 83, 923-930.

Ishizaki-Nishizawa O., Fujii T., Azuma M., Sekiguchi K., Murata N., Ohtani T. y Toguri T., 1996, Low-temperature resistance of higher plants is significantly enhanced by a nonspecific cyanobacterial desaturase, *Nat biotechnology*, 14, (8),1003-1006.

Kis M., Zsiros O., Farkas T., Wada H., Naoy F. y Gombos Z., 1998, Light-induced expression of fatty acid desaturase genes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 4209-4214.

Khozin Goldberg I., Adlerstein D., Bigongo C., Heimer Y. M y Cohen Z., 1997, Elucidation of the Biosynthesis of Eicosapentaenoic Acid in the Microalga *Porphyridium cruentum* (II. Studies with Radiolabeled Precursors), *Plant physiol* , 114, 1, 223-230.

Khozin Goldberg I., Bigogno C., y Cohen Z., 1999, Salicylhydroxamic acid inhibits $\Delta 6$ desaturation in the microalga *Porphyridium cruentum*, *Biochim Biophys Acta*, 1439, 384-394.

Knutzon D.S., Thurmond J.M., Huang Y-S, Chaudary S., Bobyk E., Chan G. M., Kirschner S y Mukerj P., 1998, Identification of $\Delta 5$ -desaturase from *Mortierella alpina* by heterologous expression in bakers' yeast and canola, *J. of Biol Chem*, 273, 45, 29360-29366.

Kocsy G., Galiba G. y Brunold C., 2001, Role of glutation in adaptation and signaling during chilling and cold acclimation in plants, *Physiol plantarum*, 113,158-164.

Lee C. y Levitt M., 1991, Accurate prediction of the stability and activity effects of site-directed mutagenesis on a protein core, *Nature*, 352, 448-451.

Lewin J. C., 1958, The taxonomic position of *P. tricornutum*, *J. gen. Microbiol*, 18, 427-432.

Lewin B., 1997, Genes VI, Oxford University Press, New York, 1260 pp.

López – Alonso D., Segura del Castillo I. , García J.L., Sánchez J. A., y Camacho F., 1994, Quantitative genetics of fatty acid variation in *Isochrysis galbana* (prymnesiophyceae) and *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae), *J of Phycol*, 30, 553-558.

López-Alonso D., Segura del Castillo C.I., Molina-Grima E.y Cohen Z., 1996, First insights into improvement of eicosapentaenoic acid content in *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae) by induced mutagenesis, *J. of Phycol*, 32, 339-345.

López–Alonso D. y Segura del Castillo I., 1999, Genetic improvement of EPA content in microalgae En: *Chemicals from microalgae*, 1st ed., editado por Cohen Z., Taylor and Francis, 93-103.

Los D. A., Ray K. M. y Murata N., 1997, Differences in the control of the temperature-dependent expression of four genes for desaturases in *Synechocystis sp.* PCC 6803 25, *Mol. Microbiol.*, 6:1167-1175.

Mann J. E. y Myers, 1968, On pigments, growth and photosynthesis of *Phaeodactylum tricornutum*, *J. of Phycol.*, 4, 349-355.

Martek, 2000, www.martek.com

Mateos-González P. F., 2003, <http://edicion-micro.usal.es/web/SEFIN/MI/tema09MI.html>

Molina-Grima E., García-Camacho F., Sánchez-Pérez J. A., Urda-Cardona J., Ación-Fernández y Fernández-Sevilla J. M., 1994, *Biotech. Appl. Biochem.*, 20, 279-290.

Miquel M., James D. Jr., Dooner H. y Browse J., 1993, *Arabidopsis* requires polyunsaturated lipids for low temperature survival, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 6208-6212.

Nishida I., y Murata N., 1996, Chilling sensitivity in plants and cyanobacteria: The crucial contribution of membrane lipids, *Ann Rev of Plant Physiol.*, 47: 541-568.

Nyberg H., 1986, GC-MS Methods for lower plant glycolipid fatty acids En: Modern methods of plant analysis. New series Vol. 3 Gas chromatography/mass spectrometry.

Ruengjitchatchawalya M., Chirasuwan N., Chaiklahan R., Bunnang B., Deshniun P. y Tanticharoen M., 2002, Photosynthetic characterization of a mutant of *Spirulina platensis*, *J of Appl Phycol*, 14, 71-76.

Sabehat A., Lurie S. y Weiss D., 1998, Expression of small heat-shock proteins at low temperatures, a possible role in protecting against chilling injuries, *Plant Physiol*, 117, 651-658.

Sakamoto T., Shen G., Higashi S., Murata N. y Bryant D. A., 1998, *Archives of Microbiol*, 169, 20-28.

Sambrook J., Fritsch E. F. y Maniatis T., 1989, *Molecular Cloning Manual*, Second edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. Vol I.

Saruwatari M., Takio S. y Ono K., 1999, Low temperature-induced accumulation of eicosapentaenoic acids in *Marchantia polymorpha* cells, *Phytochem*, 52, 367-372.

Sato N. y Murata N., 1980, Temperature shift induced responses in lipids in the green alga *Anabaena variabilis*. The central role of monogalactosyldiacylglycerol in thermo adaptation. *Biochem and Biophys Acta*, 619, 349-355.

Scala S. y Bowler C., 2001, Molecular insights into the novel aspects of diatom biology, *CMLS Cell. Mol. Life Sci.* 58, 1666-1673.

Scala S., Carels N., Falciatore A., Chiusano M. y Bowler C., 2002, Genome properties of the diatom *P. tricornutum*, *Plant Physiol*, 129, 993-1002.

Schneider J. C., Livne A., Sukenik A. y Roessler P. G., 1995, A mutant of *Nannochloropsis* deficient in eicosapentaenoic acid production, *Phytochem*, 40, (3), 807-814.

Soeder C., 1986, An historical outline of applied algology En: Handbook of microalgal mass culture, editado por Richmond A., CRC Press Inc., Florida USA, 25-44.

Somerville C., 1995, Direct tests of the role of membrane lipid composition in low temperature-induced photoinhibition and chilling sensitivity in plants and cyanobacteria, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92:6215-6218.

Susuki T., Miyamura Y., Inagaki K. y Tomita Y., 2003, Characterization of the human RAB38 and RAB7 genes: exclusion of new major pathological loci for Japanese OCA, *J of Dermatological Sci.*, 32:131-136.

Tasaka Y., Gombos Z., Nishiyama Y., Mohanty P., Ohba T., Ohki K. y Murata N., 1996, Targeted mutagenesis of acyl –lipid desaturases in *Synechocystis*: evidence for the

important roles of polyunsaturated membrane lipids in growth, respiration and photosynthesis, *The EMBO J.*, 15, 23:6416-6425.

Thomas D. J., Thomas J. B., Prier S. D., Nasso N. E. y Herbert S. K., 1999, Iron superoxide dismutase protects against chilling damage in the cyanobacterium *Synechococcus* species PCC7942., *Plant Physiol*, 120, 1:275-282.

Tjus S. E., Muller B. L. y Scheller H. V., 1998, Photosystem I is early target of photoinhibition in barley illuminated at chilling temperatures, *Plant Physiol*, 116:755-764.

Yongmanitchai W. y O.P. Ward, 1991a, Growth of and omega-3 fatty acid production by *Phaeodactylum tricornutum* under different culture conditions, *Appl. and Env. Microbiol.* 57:2, 419-425.

Yongmanitchai W. y O.P. Ward, 1991b, Omega-3 fatty acids: alternative sources of production, *Process Biochem*, 117-125.

UTEX, 2000, www.utex.com

Zaslavskaja L.A., Lippmeier C.J., Kroth P.G., Grossman A. R. y Apt E.K., 2000, Transformation of the diatom *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae) with a variety of selectable marker and reporter genes, *J. of Phycol.*, 36, 379-386.

Zaslavskaja L.A., Lippmeier C.J., Kroth P.G., Grossman A. R. y Apt E.K., 2001, Trophic Conversion of an obligate photoautotrophic organism through metabolic engineering, *Science*, 292: 2073-2075.

Zhu C. J. y Lee K., 1997, Determination of biomass dry weight of marine microalgae, *J. of Appl. Phycol.*, 9, 189-194.

Wada H., Gombos Z. y Murata N., 1994, Contribution of membrane lipids to the ability of the photosynthetic machinery to tolerate temperature stress, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91:4273-4277.

ANEXO I

Curva de calibración y regresión lineal para la medición de No. de células de *P. tricornutum* por absorbencia a 625nm.

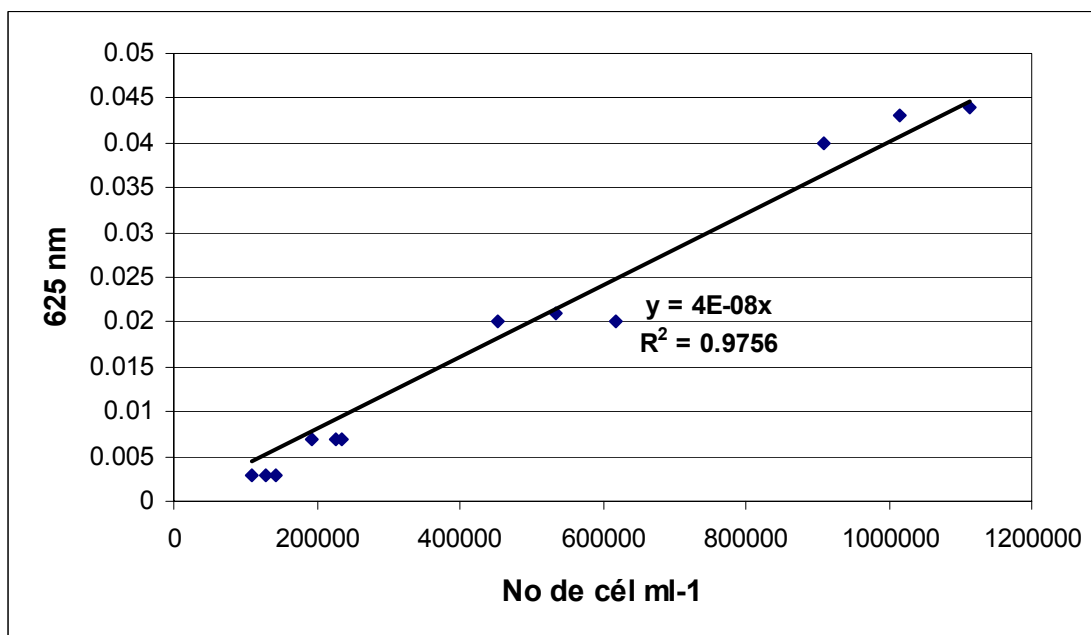


Figura 1. Curva de calibración de absorbencia vs No. de células totales

ANEXO II

Factores de corrección y tiempos de retención de los 29 estándares obtenidos por el método PUFAC29 para la cuantificación e identificación de los ácidos grasos por cromatografía de gases-espectrometría de masas.

Coefficiente de corrección para la curva de calibración con 29 estándares (C20:1 cis 11 y cis 13)

Concentración ($\mu\text{g/ml}$) = Area/FC

$A = \text{F.C.} * \text{Conc.}$

Concentración ($\mu\text{g/mg ps}$) = $(\text{Area}/(\text{FC} * \text{PS})) * 0.25$

Acido graso	Tiempo de Retención	Factor de Corrección	Coeficiente de Regresión	Peso			
				Molecular	M-31	M-43	M-59
13:0	9.263	116762	0.990	228	197	185	169
14:0	11.058	118762	0.99	242	211	199	183
15:0	13.340	119788	0.99	256	225	213	197
16:0	16.145	101404	0.99	270	239	227	211
16:1	17.023	88917	0.99	268	237	225	209
16:2*	18.800	112275	calculado	266	235	223	207
17:0	19.478	118093	0.99	284	253	241	225
16:3*	20.000	120975	calculado	264	233	221	205
18:0	23.395	116021	0.99	298	267	255	239
18:1n9	23.920	105673	0.99	296	265	253	237
18:1 n7***	24.200	105673		296	265	253	237
18:2	26.040	97644	0.99	294	263	251	235
19:0	27.493	97094	0.99	312	281	269	253
18:3	28.821	91275	0.99	292	261	249	233
18:4	30.039	104836	0.99	290	259	247	231
20:0	32.006	104563	0.99	326	295	283	267
20:1 cis-11	32.948	92276	0.99	324	293	281	265
20:1 cis-13	33.335	87561	0.99	324	293	281	265
20:2	34.971	86925	0.98	322	291	279	263
20:3**	35.500	80486	calculado	320	289	277	261
21:0	36.725	102185	0.99	340	309	297	281
20:4	37.204	77795	0.99	318	287	275	259
20:5	40.309	65988	0.99	316	285	273	257
22:0	41.400	100264	0.99	354	323	311	295
22:1	42.418	84792	0.99	352	321	309	293
22:2	44.536	70338	0.98	350	319	307	291
23:0	46.210	106947	0.99	368	337	325	309
22:3	46.900	41331	0.98	348	317	305	289
22:4	47.743	80946	0.98	346	315	303	287
22:5	50.181	45482	0.8	344	313	301	285
24:0	51.381	102718	0.98	382	351	339	323
22:6	51.986	51490	0.980	342	311	299	283
24:1	52.607	141531	0.98	380	349	337	321

* Factores de corrección calculados por extrapolación de preferencia no utilizar

** Factores de corrección calculados por interpolación de preferencia no utilizar

*** Identificado con estándares marinos Pufamar

ANEXO III

Resultados de los análisis de varianza obtenidos por el programa STATISTICA

III. Análisis de varianza para las cinéticas de estrés ambiental

III.I Análisis de varianza del contenido de ácidos grasos (mg g^{-1}) en los análisis con cambios de temperatura (cultivos con aireación/ CO_2)

14:0

Summary of all Effects; design: (recpan~1.sta)

1-VAR1

	df Effect	MS Effect	df Error	MS Error	F	p-level
1	1	12.19864273	16	2.186371565	5.579400539	0.03118128

16:0

Summary of all Effects; design: (recpan~1.sta)

1-VAR1

	df Effect	MS Effect	df Error	MS Error	F	p-level
1	1	166.8024292	16	14.70884895	11.34027767	0.00391965

16:1 ω -9

Summary of all Effects; design: (recpan~1.sta)

1-VAR1

	df Effect	MS Effect	df Error	MS Error	F	p-level
1	1	385.1729431	16	36.60340118	10.52287388	0.00508589

16:1 ω -3

Summary of all Effects; design: (recpan~1.sta)

1-VAR1

	df Effect	MS Effect	df Error	MS Error	F	p-level
1	1	0.546820641	16	0.044021595	12.42164516	0.00281441

16:3

Summary of all Effects; design: (recpan~1.sta)

1-VAR1

	df Effect	MS Effect	df Error	MS Error	F	p-level
1	1	10.96443558	16	1.430054188	7.667146683	0.01368954

18:0

Summary of all Effects; design: (recpan~1.sta)

1-VAR1

	df	MS	df	MS		
	Effect	Effect	Error	Error	F	p-level
1		1	0.471790731	16	0.072819948	6.478866577 0.02160486

18:1 ω-9

Summary of all Effects; design: (recpan~1.sta)

1-VAR1

	df	MS	df	MS		
	Effect	Effect	Error	Error	F	p-level
1		1	2.611400604	16	0.550239384	4.74593544 0.04466623

18:1 ω-11

Summary of all Effects; design: (recpan~1.sta)

1-VAR1

	df	MS	df	MS		
	Effect	Effect	Error	Error	F	p-level
1		1	0.049730159	16	0.009466266	5.253407955 0.03580172

18:2

Summary of all Effects; design: (recpan~1.sta)

1-VAR1

	df	MS	df	MS		
	Effect	Effect	Error	Error	F	p-level
1		1	1.779625893	16	0.331926823	5.36150074 0.03418720

18:4

Summary of all Effects; design: (recpan~1.sta)

1-VAR1

	df	MS	df	MS		
	Effect	Effect	Error	Error	F	p-level
1		1	1.02590692	16	0.076782964	13.3611269 0.0021347

20:5

Summary of all Effects; design: (recpan~1.sta)

1-VAR1

	df	MS	df	MS		
	Effect	Effect	Error	Error	F	p-level
1		1	29.1919117	16	56.07052994	0.520628452 0.4809859

22:6

Summary of all Effects; design: (recpan~1.sta)

1-VAR1

	df	MS	df	MS		
	Effect	Effect	Error	Error	F	p-level
1		1	10.45692635	16	0.221004158	47.31551743 3.7101E-06

III.II Análisis de varianza del contenido de ácidos grasos (% total de ácidos grasos) en los análisis con cambios de temperatura (cultivos con aireación/CO₂)

14:0

ANOVA tempc/aireacion porcentajes

Summary of all Effects; design: (recpan~1.sta)

1-VAR1

	df Effect	MS Effect	df Error	MS Error	F	p-level
1	1	0.038182806	16	0.010686215	3.573089838	0.07697711

16:0

Summary of all Effects; design: (recpan~1.sta)

1-VAR1

	df Effect	MS Effect	df Error	MS Error	F	p-level
1	1	0.243308648	16	0.0116987	20.79792213	0.0003208

16:1 ω-9

Summary of all Effects; design: (recpan~1.sta)

1-VAR1

	df Effect	MS Effect	df Error	MS Error	F	p-level
1	1	0.32508406	16	0.013618778	23.87028313	0.00016491

16:1 ω-3

Summary of all Effects; design: (recpan~1.sta)

1-VAR1

	df Effect	MS Effect	df Error	MS Error	F	p-level
1	1	1.603516936	16	0.03567284	44.95064163	5.0596E-06

16:2

Summary of all Effects; design: (recpan~1.sta)

1-VAR1

	df Effect	MS Effect	df Error	MS Error	F	p-level
1	1	0.321952224	16	0.019802216	16.25839233	0.00096455

16:3

Summary of all Effects; design: (recpan~1.sta)

1-VAR1

	df Effect	MS Effect	df Error	MS Error	F	p-level
1	1	1.397204518	16	0.028486105	49.04863358	2.977E-06

18:0

Summary of all Effects; design: (recpan~1.sta)

1-VAR1

	df Effect	MS Effect	df Error	MS Error	F	p-level
1	1	0.98912555	16	0.112459108	8.795423508	0.00910776

18:1 ω-9

Summary of all Effects; design: (recpan~1.sta)

1-VAR1

	df Effect	MS Effect	df Error	MS Error	F	p-level
1	1	0.247779608	16	0.197995573	1.251440048	0.27979227

18:1 ω-11

Summary of all Effects; design: (recpan~1.sta)

1-VAR1

	df Effect	MS Effect	df Error	MS Error	F	p-level
1	1	0.000896354	16	0.028102413	0.031895977	0.86049795

18:2

Summary of all Effects; design: (recpan~1.sta)

1-VAR1

	df Effect	MS Effect	df Error	MS Error	F	p-level
1	1	0.013366672	16	0.014785774	0.904022515	0.35584813

18:3

Summary of all Effects; design: (recpan~1.sta)

1-VAR1

	df Effect	MS Effect	df Error	MS Error	F	p-level
1	1	0.085280105	16	0.070414647	1.211113095	0.28739383

18:4

Summary of all Effects; design: (recpan~1.sta)

1-VAR1

	df Effect	MS Effect	df Error	MS Error	F	p-level
1	1	0.734813452	16	0.022099882	33.24965286	2.8916E-05

20:5

Summary of all Effects; design: (recpan~1.sta)

1-VAR1

	df Effect	MS Effect	df Error	MS Error	F	p-level
1	1	0.107579447	16	0.004664071	23.06556702	0.00019526

22:6

Summary of all Effects; design: (recpan~1.sta)

1-VAR1

	df Effect	MS Effect	df Error	MS Error	F	p-level
1	1	1.139916182	16	0.037526146	30.37658501	4.7377E-05

III.III Análisis de varianza del contenido de ácidos grasos (mg g⁻¹) en los análisis con cambios de temperatura (cultivos sin aireación)

14:0

Summary of all Effects; design: (recpan~2.sta)

1-VAR1

	df Effect	MS Effect	df Error	MS Error	F	p-level
1	1	0.033984549	13	0.124278419	0.273454964	0.6098

16:0

Summary of all Effects; design: (recpan~2.sta)

1-VAR1

	df Effect	MS Effect	df Error	MS Error	F	p-level
1	1	0.97490865	13	0.778464735	1.252347946	0.2833

16:1 ω-9

Summary of all Effects; design: (recpan~2.sta)

1-VAR1

	df Effect	MS Effect	df Error	MS Error	F	p-level
1	1	5.616412163	13	0.842106998	6.669475555	0.0227

16:1 ω-3

Summary of all Effects; design: (recpan~2.sta)

1-VAR1

	df Effect	MS Effect	df Error	MS Error	F	p-level
1	1	0.002959985	13	0.007885044	0.375392377	0.55064

16:2

Summary of all Effects; design: (recpan~2.sta)

1-VAR1

	df Effect	MS Effect	df Error	MS Error	F	p-level
1	1	0.023142258	13	0.22023949	0.105077691	0.75097

16:3

Summary of all Effects; design: (recpan~2.sta)

1-VAR1

	df Effect	MS Effect	df Error	MS Error	F	p-level
1	1	0.855500102	13	0.155840144	5.489600182	0.0356

18:0

Summary of all Effects; design: (recpan~2.sta)

1-VAR1

	df Effect	MS Effect	df Error	MS Error	F	p-level
1	1	4.80422E-05	13	0.00104493	0.045976512	0.8335

18:1 ω-9

Summary of all Effects; design: (recpan~2.sta)

1-VAR1

	df Effect	MS Effect	df Error	MS Error	F	p-level
1	1	0.047180817	13	0.004101979	11.50196552	0.0048

18:1 ω-3

Summary of all Effects; design: (recpan~2.sta)

1-VAR1

	df Effect	MS Effect	df Error	MS Error	F	p-level
1	1	0.003696154	13	0.001274023	2.901166916	0.1122

18:2

Summary of all Effects; design: (recpan~2.sta)

1-VAR1

	df Effect	MS Effect	df Error	MS Error	F	p-level
1	1	0.047247123	13	0.020905461	2.260037422	0.1566

18:3

Summary of all Effects; design: (recpan~2.sta)

1-VAR1

	df Effect	MS Effect	df Error	MS Error	F	p-level
1	1	0.056444936	13	0.003509758	16.08228683	0.00148

18:4

Summary of all Effects; design: (recpan~2.sta)

1-VAR1

	df Effect	MS Effect	df Error	MS Error	F	p-level
1	1	0.001189246	13	0.001717972	0.692238152	0.42042

20:5

Summary of all Effects; design: (recpan~2.sta)

	df Effect	MS Effect	df Error	MS Error	F	p-level
1	1	8.397891998	13	5.920872688	1.418353915	0.2549

22:6

Summary of all Effects; design: (recpan~2.sta)

	df Effect	MS Effect	df Error	MS Error	F	p-level
1	1	0.819365025	13	0.044589959	18.37555122	0.0008

III.IV Análisis de varianza del contenido de ácidos grasos (% total de ácidos grasos) en los análisis con cambios de temperatura (cultivos sin aireación)

14:0

Summary of all Effects; design: (recpan~2.sta)

1-VAR1

	df Effect	MS Effect	df Error	MS Error	F	p-level
1	1	0.001739212	13	0.003997513	0.435073555	0.5210

16:0

Summary of all Effects; design: (recpan~2.sta)

1-VAR1

	df Effect	MS Effect	df Error	MS Error	F	p-level
1	1	0.00225971	13	0.008601388	0.262714595	0.6168

16:1 ω-9

Summary of all Effects; design: (recpan~2.sta)

1-VAR1

	df Effect	MS Effect	df Error	MS Error	F	p-level
1	1	0.019833345	13	0.000585512	33.87352753	5.97E-05

16:1ω-3

Summary of all Effects; design: (recpan~2.sta)

1-VAR1

	df Effect	MS Effect	df Error	MS Error	F	p-level
1	1	0.001979063	13	0.007185566	0.275421977	0.60855150

16:2

Summary of all Effects; design: (recpan~2.sta)

	df Effect	MS Effect	df Error	MS Error	F	p-level
1	1	0.005291871	13	0.00523054	1.011725426	0.33284565

16:3

Summary of all Effects; design: (recpan~2.sta)

1-VAR1

	df	MS	df	MS	F	p-level
	Effect	Effect	Error	Error		
1		1	0.030754933	13	0.005877075	5.233034134 0.03955934

18:0

Summary of all Effects; design: (recpan~2.sta)

1-VAR1

	df	MS	df	MS	F	p-level
	Effect	Effect	Error	Error		
1		1	0.018079588	13	0.023740398	0.761553705 0.39867496

18:1 ω -9

Summary of all Effects; design: (recpan~2.sta)

1-VAR1

	df	MS	df	MS	F	p-level
	Effect	Effect	Error	Error		
1		1	0.123087749	13	0.00844467	14.57579231 0.00213387

18:1 ω -3

Summary of all Effects; design: (recpan~2.sta)

1-VAR1

	df	MS	df	MS	F	p-level
	Effect	Effect	Error	Error		
1		1	0.055283275	13	0.02379014	2.323789358 0.1513615

18:2

Summary of all Effects; design: (recpan~2.sta)

1-VAR1

	df	MS	df	MS	F	p-level
	Effect	Effect	Error	Error		
1		1	0.082309254	13	0.004783065	17.20847511 0.00114483

18:3

Summary of all Effects; design: (recpan~2.sta)

1-VAR1

	df	MS	df	MS	F	p-level
	Effect	Effect	Error	Error		
1		1	0.73146677	13	0.022200588	32.94807816 6.8218E-05

18:4

Summary of all Effects; design: (recpan~2.sta)

1-VAR1

	df	MS	df	MS	F	p-level
	Effect	Effect	Error	Error		
1		1	0.056807112	13	0.017516008	3.243154287 0.09495462

20:5

Summary of all Effects; design: (recpan~2.sta)

1-VAR1

	df	MS	df	MS	F	p-level
	Effect	Effect	Error	Error		
1		1	5.42053E-05	13	0.000589375	0.091970921 0.7664850

22:6

Summary of all Effects; design: (recpan~2.sta)

1-VAR1

	df	MS	df	MS	F	p-level
	Effect	Effect	Error	Error		
1		1	0.610834658	13	0.005286276	115.551033 7.730E-08

ANEXO IV

IV. Análisis de varianza y test LSD del contenido de ácidos grasos en las cepas mutantes

IV.I Análisis de varianza del contenido de ácidos grasos (mg g⁻¹) en las cepas mutantes

14:0

Summary of all Effects; design: (compon~3.sta)

1-VAR1

	df Effect	MS Effect	df Error	MS Error	F	p-level
1	8.000	1.618	69.000	0.734	2.204	0.037

LSD test; variable A14_0 (compon~3.sta)

Probabilities for Post Hoc Tests

MAIN EFFECT: VAR1

	17	18	19	20	3	6	11	13 Ceba silvestre	
	4.58952	4.272345	4.440384	3.76618	4.47195	4.785969	3.81942	4.76882	3.66898
17		0.435	0.706	0.052	0.779	0.651	0.061	0.679	0.020
18	0.435		0.671	0.228	0.633	0.238	0.266	0.254	0.122
19	0.706	0.671		0.102	0.938	0.416	0.119	0.439	0.043
20	0.052	0.228	0.102		0.104	0.025	0.899	0.027	0.808
3	0.779	0.633	0.938	0.104		0.481	0.122	0.506	0.048
6	0.651	0.238	0.416	0.025	0.481		0.028	0.970	0.009
11	0.061	0.266	0.119	0.899	0.122	0.028		0.031	0.697
13	0.679	0.254	0.439	0.027	0.506	0.970	0.031		0.010
Cepa silvestre	0.020	0.122	0.043	0.808	0.048	0.009	0.697	0.010	

16:0

Summary of all Effects; design: (compon~3.sta)

1-VAR1

	df Effect	MS Effect	df Error	MS Error	F	p-level
1	8.000	5.204	69.000	3.160	1.647	0.128

LSD test; variable A16_0 (compon~3.sta)

Probabilities for Post Hoc Tests

MAIN EFFECT:

VAR1

	17	18	19	20	3	6	11	13 Ceba silvestre	
	8.55802	7.486823	8.629922	7.965627	9.32940	9.354690	7.62692	6.95557	8.43573
17		0.205	0.930	0.495	0.375	0.377	0.270	0.078	0.879
18	0.205		0.166	0.581	0.036	0.041	0.868	0.555	0.239
19	0.930	0.166		0.433	0.410	0.411	0.224	0.060	0.803
20	0.495	0.581	0.433		0.129	0.136	0.696	0.276	0.571
3	0.375	0.036	0.410	0.129		0.978	0.053	0.012	0.283
6	0.377	0.041	0.411	0.136	0.978		0.058	0.014	0.289
11	0.270	0.868	0.224	0.696	0.053	0.058		0.456	0.315
13	0.078	0.555	0.060	0.276	0.012	0.014	0.456		0.089
Cepa silvestre	0.879	0.239	0.803	0.571	0.283	0.289	0.315	0.089	

16:1ω-9

Summary of all Effects; design: (compon~3.sta)

1-VAR1

	df	MS	df	MS	F	p-level
	Effect	Effect	Error	Error		
1	8.000	4.535	69.000	4.137	1.096	0.376

LSD test; variable A16_1 (compon~3.sta)

Probabilities for Post Hoc Tests

MAIN EFFECT: VAR1

	17	18	19	20	3	6	11	13 Ceps silvestre	
	11.6942	10.81258	11.05600	10.54393	10.95205	11.5996	9.861971	9.367455	10.41584
9									
17		0.361	0.497	0.248	0.455	0.927	0.060	0.026	0.166
18	0.361		0.795	0.787	0.888	0.445	0.325	0.163	0.666
19	0.497	0.795		0.597	0.915	0.589	0.206	0.097	0.474
20	0.248	0.787	0.597		0.689	0.319	0.492	0.268	0.893
3	0.455	0.888	0.915	0.689		0.540	0.274	0.137	0.572
6	0.927	0.445	0.589	0.319	0.540		0.095	0.044	0.233
11	0.060	0.325	0.206	0.492	0.274	0.095		0.631	0.547
13	0.026	0.163	0.097	0.268	0.137	0.044	0.631		0.290
Ceps silvestre	0.166	0.666	0.474	0.893	0.572	0.233	0.547	0.290	

16:1ω-3

Summary of all Effects; design: (compon~3.sta)

1-VAR1

	df	MS	df	MS	F	p-level
	Effect	Effect	Error	Error		
1	8.000	0.125	69.000	0.049	2.544	0.017

LSD test; variable A16_1 (compon~3.sta)

Probabilities for Post Hoc Tests

MAIN EFFECT: VAR1

	17	18	19	20	3	6	11	13 Ceps silvestre	
	1.22209	1.107917	1.121916	.8363183	1.250391	1.17836	1.022504	1.073414	1.151553
1									
17		0.279	0.329	0.001	0.794	0.697	0.060	0.188	0.482
18	0.279		0.891	0.014	0.191	0.531	0.417	0.759	0.663
19	0.329	0.891		0.008	0.226	0.607	0.333	0.659	0.761
20	0.001	0.014	0.008		0.000	0.004	0.089	0.043	0.003
3	0.794	0.191	0.226	0.000		0.532	0.038	0.128	0.341
6	0.697	0.531	0.607	0.004	0.532		0.168	0.379	0.803
11	0.060	0.417	0.333	0.089	0.038	0.168		0.650	0.200
13	0.188	0.759	0.659	0.043	0.128	0.379	0.650		0.469
Ceps silvestre	0.482	0.663	0.761	0.003	0.341	0.803	0.200	0.469	

16:2

Summary of all Effects; design: (compon~3.sta)

1-VAR1

	df	MS	df	MS	F	p-level
	Effect	Effect	Error	Error		
1	8.000	1.966	69.000	1.242	1.583	0.146

LSD test; variable A16_2 (compon~3.sta)

Probabilities for Post Hoc Tests

MAIN EFFECT: VAR1

	17	18	19	20	3	6	11	13	Cepa silvestre
	5.82624	5.319643	5.272048	4.500003	5.50056	5.685367	5.022269	4.45531	4.80420
	4				3			6	6
17		0.338	0.283	0.017	0.550	0.803	0.130	0.017	0.045
18	0.338		0.926	0.135	0.739	0.517	0.573	0.128	0.307
19	0.283	0.926		0.149	0.667	0.454	0.627	0.142	0.340
20	0.017	0.135	0.149		0.077	0.044	0.338	0.938	0.559
3	0.550	0.739	0.667	0.077		0.750	0.380	0.074	0.183
6	0.803	0.517	0.454	0.044	0.750		0.242	0.043	0.107
11	0.130	0.573	0.627	0.338	0.380	0.242		0.316	0.665
13	0.017	0.128	0.142	0.938	0.074	0.043	0.316		0.519
Cepa silvestre	0.045	0.307	0.340	0.559	0.183	0.107	0.665	0.519	

16:3

Summary of all Effects; design: (compon~3.sta)

1-VAR1

	df	MS	df	MS	F	p-level
	Effect	Effect	Error	Error		
1	8.000	1.486	69.000	1.069	1.391	0.216

LSD test; variable A16_3 (compon~3.sta)

Probabilities for Post Hoc Tests

MAIN EFFECT: VAR1

	17	18	19	20	3	6	11	13	Cepa silvestre
	5.36458	5.090846	5.005002	4.410072	4.75380	5.091199	4.738022	4.92848	4.06957
17		0.576	0.452	0.062	0.228	0.601	0.203	0.405	0.007
18	0.576		0.857	0.180	0.505	0.999	0.472	0.756	0.031
19	0.452	0.857		0.229	0.610	0.866	0.576	0.881	0.042
20	0.062	0.180	0.229		0.508	0.207	0.516	0.336	0.481
3	0.228	0.505	0.610	0.508		0.530	0.975	0.745	0.159
6	0.601	0.999	0.866	0.207	0.530		0.500	0.769	0.045
11	0.203	0.472	0.576	0.516	0.975	0.500		0.716	0.155
13	0.405	0.756	0.881	0.336	0.745	0.769	0.716		0.090
Cepa silvestre	0.007	0.031	0.042	0.481	0.159	0.045	0.155	0.090	

18:0

Summary of all Effects; design:
(compon~3.sta)
1-VAR1

	df	MS	df	MS	F	p-level
	Effect	Effect	Error	Error		
1	8.000	0.080	69.000	0.019	4.230	0.000

LSD test; variable A18_0 (compon~3.sta)

Probabilities for Post Hoc Tests

MAIN EFFECT: VAR1

	17	18	19	20	3	6	11	13	Cepa silvestre
	.3818296	.303211	.384801	.3698160	.3792405	.357908	.290346	.216750	.5550258
17		0.231	0.963	0.858	0.969	0.732	0.164	0.020	0.007
18	0.231		0.202	0.324	0.260	0.434	0.844	0.218	0.000
19	0.963	0.202		0.819	0.932	0.693	0.140	0.016	0.006
20	0.858	0.324	0.819		0.892	0.868	0.240	0.035	0.005
3	0.969	0.260	0.932	0.892		0.766	0.189	0.026	0.008
6	0.732	0.434	0.693	0.868	0.766		0.334	0.060	0.004
11	0.164	0.844	0.140	0.240	0.189	0.334		0.293	0.000
13	0.020	0.218	0.016	0.035	0.026	0.060	0.293		0.000
Cepa silvestre	0.007	0.000	0.006	0.005	0.008	0.004	0.000	0.000	

18:1 0-9

Summary of all Effects; design:
(compon~3.sta)
1-VAR1

	df	MS	df	MS	F	p-level
	Effect	Effect	Error	Error		
1	8.000	0.074	69.000	0.036	2.047	0.053

LSD test; variable A18_1 (compon~3.sta)

Probabilities for Post Hoc Tests

MAIN EFFECT: VAR1

	17	18	19	20	3	6	11	13	Cepa silvestre
	.4544331	.452264	.560128	.6268463	.5434504	.5840092	.3556872	.600607	.421704
17		0.981	0.231	0.067	0.339	0.181	0.275	0.132	0.703
18	0.981		0.222	0.063	0.328	0.174	0.286	0.127	0.722
19	0.231	0.222		0.463	0.854	0.800	0.022	0.667	0.101
20	0.067	0.063	0.463		0.384	0.665	0.005	0.791	0.023
3	0.339	0.328	0.854	0.384		0.682	0.046	0.564	0.173
6	0.181	0.174	0.800	0.665	0.682		0.020	0.871	0.082
11	0.275	0.286	0.022	0.005	0.046	0.020		0.013	0.443
13	0.132	0.127	0.667	0.791	0.564	0.871	0.013		0.056
Cepa silvestre	0.703	0.722	0.101	0.023	0.173	0.082	0.443	0.056	

18:1 ω-11

Summary of all Effects; design:
(compon~3.sta)
1-VAR1

	df	MS	df	MS	F	p-level
	Effect	Effect	Error	Error		
1	8.000	0.010	69.000	0.004	2.400	0.024

LSD test; variable A18_1 (compon~3.sta)

Probabilities for Post Hoc Tests

MAIN EFFECT: VAR1

	17	18	19	20	3	6	11	13 Cepsa silvestre
	.2694236	.248356	.291997	.2625178	.2222361	.2514363	.2105524	.175649 .220548
17		0.501	0.460	0.830	0.146	0.591	0.063	0.006 0.104
18	0.501		0.155	0.661	0.419	0.927	0.229	0.032 0.352
19	0.460	0.155		0.350	0.029	0.217	0.009	0.001 0.016
20	0.830	0.661	0.350		0.227	0.747	0.110	0.013 0.176
3	0.146	0.419	0.029	0.227		0.396	0.717	0.178 0.956
6	0.591	0.927	0.217	0.747	0.396		0.224	0.035 0.337
11	0.063	0.229	0.009	0.110	0.717	0.224		0.298 0.738
13	0.006	0.032	0.001	0.013	0.178	0.035	0.298	0.164
Cepsa silvestre	0.104	0.352	0.016	0.176	0.956	0.337	0.738	0.164

18:2

Summary of all Effects; design:
(compon~3.sta)
1-VAR1

	df	MS	df	MS	F	p-level
	Effect	Effect	Error	Error		
1	8.000	0.103	69.000	0.130	0.794	0.610

LSD test; variable A18_2 (compon~3.sta)

Probabilities for Post Hoc Tests

MAIN EFFECT: VAR1

	17	18	19	20	3	6	11	13 Cepsa silvestre
	1.433441	1.32368	1.36439	1.532822	1.399022	1.548203	1.306797	1.18691 1.29566
17		0.521	0.679	0.573	0.845	0.530	0.459	0.180 0.399
18	0.521		0.807	0.237	0.669	0.221	0.921	0.455 0.863
19	0.679	0.807		0.329	0.840	0.305	0.729	0.322 0.664
20	0.573	0.237	0.329		0.461	0.935	0.202	0.068 0.162
3	0.845	0.669	0.840	0.461		0.427	0.601	0.260 0.540
6	0.530	0.221	0.305	0.935	0.427		0.189	0.065 0.152
11	0.459	0.921	0.729	0.202	0.601	0.189		0.512 0.945
13	0.180	0.455	0.322	0.068	0.260	0.065	0.512	0.535
Cepsa silvestre	0.399	0.863	0.664	0.162	0.540	0.152	0.945	0.535

18:3

Summary of all Effects; design:

(compon~3.sta)

1-VAR1

	df Effect	MS Effect	df Error	MS Error	F	p-level
1	8.000	0.017	69.000	0.010	1.782	0.096

LSD test; variable A18_3 (compon~3.sta)

Probabilities for Post Hoc Tests

MAIN EFFECT: VAR1

	17	18	19	20	3	6	11	13	Cepa silvestre
	.2576387 0	.215872 8	.289065	.3156514	.2508175	.2978046	.2576879 4	.162789 6	.290331
17		0.370	0.489	0.228	0.887	0.420	0.999	0.059	0.462
18	0.370		0.109	0.040	0.467	0.102	0.370	0.287	0.096
19	0.489	0.109		0.570	0.415	0.857	0.489	0.011	0.977
20	0.228	0.040	0.570		0.191	0.727	0.229	0.004	0.581
3	0.887	0.467	0.415	0.191		0.359	0.886	0.088	0.390
6	0.420	0.102	0.857	0.727	0.359		0.420	0.012	0.875
11	0.999	0.370	0.489	0.229	0.886	0.420		0.059	0.462
13	0.059	0.287	0.011	0.004	0.088	0.012	0.059		0.009
Cepa silvestre	0.462	0.096	0.977	0.581	0.390	0.875	0.462	0.009	

18:4

Summary of all Effects; design:

(compon~3.sta)

1-VAR1

	df Effect	MS Effect	df Error	MS Error	F	p-level
1	8.000	0.041	69.000	0.015	2.748	0.011

LSD test; variable A18_4 (compon~3.sta)

Probabilities for Post Hoc Tests

MAIN EFFECT: VAR1

	17	18	19	20	3	6	11	13	Cepa silvestre
	.3949287	.386903	.354902	.4643278	.3136976	.4303787	.4204729	.572715	.391407
17		0.890	0.478	0.246	0.176	0.567	0.659	0.005	0.949
18	0.890		0.570	0.196	0.222	0.482	0.562	0.004	0.935
19	0.478	0.570		0.063	0.479	0.214	0.247	0.001	0.496
20	0.246	0.196	0.063		0.016	0.593	0.462	0.091	0.203
3	0.176	0.222	0.479	0.016		0.069	0.076	0.000	0.175
6	0.567	0.482	0.214	0.593	0.069		0.873	0.033	0.511
11	0.659	0.562	0.247	0.462	0.076	0.873		0.016	0.598
13	0.005	0.004	0.001	0.091	0.000	0.033	0.016		0.003
Cepa silvestre	0.949	0.935	0.496	0.203	0.175	0.511	0.598	0.003	

20:5

Summary of all Effects; design:

(compon~3.sta)

1-VAR1

	df	MS	df	MS	F	p-level
	Effect	Effect	Error	Error		
1	8.000	24.970	69.000	29.363	0.850	0.562

LSD test; variable A20_5 (compon~3.sta)

Probabilities for Post Hoc Tests

MAIN EFFECT: VAR1

	17	18	19	20	3	6	11	13	Cepa silvestre
	29.03287	27.6923	27.12808	27.1064	25.49887	29.05368	25.97560	27.2323	23.9472
17		0.601	0.447	0.467	0.184	0.994	0.235	0.512	0.040
18	0.601		0.821	0.825	0.408	0.620	0.504	0.867	0.129
19	0.447	0.821		0.993	0.528	0.473	0.645	0.969	0.184
20	0.467	0.825	0.993		0.555	0.490	0.669	0.964	0.214
3	0.184	0.408	0.528	0.555		0.209	0.857	0.539	0.540
6	0.994	0.620	0.473	0.490	0.209		0.264	0.532	0.055
11	0.235	0.504	0.645	0.669	0.857	0.264		0.647	0.408
13	0.512	0.867	0.969	0.964	0.539	0.532	0.647		0.214
Cepa silvestre	0.040	0.129	0.184	0.214	0.540	0.055	0.408	0.214	

22:6

Summary of all Effects; design:

(compon~3.sta)

1-VAR1

	df	MS	df	MS	F	p-level
	Effect	Effect	Error	Error		
1	8.000	0.192	69.000	0.158	1.221	0.300

LSD test; variable A22_6 (compon~3.sta)

Probabilities for Post Hoc Tests

MAIN EFFECT:

VAR1

	17	18	19	20	3	6	11	13	Cepa silvestre
	1.585939	1.527398	1.683372	1.75346	1.431385	1.612451	1.575409	1.49832	1.27140
17		0.755	0.595	0.388	0.426	0.895	0.955	0.663	0.082
18	0.755		0.395	0.245	0.620	0.672	0.798	0.885	0.156
19	0.595	0.395		0.711	0.185	0.718	0.556	0.347	0.020
20	0.388	0.245	0.711		0.109	0.495	0.359	0.218	0.011
3	0.426	0.620	0.185	0.109		0.381	0.458	0.746	0.389
6	0.895	0.672	0.718	0.495	0.381		0.854	0.592	0.080
11	0.955	0.798	0.556	0.359	0.458	0.854		0.701	0.093
13	0.663	0.885	0.347	0.218	0.746	0.592	0.701		0.241
Cepa silvestre	0.082	0.156	0.020	0.011	0.389	0.080	0.093	0.241	

IV. II Análisis de varianza del contenido de ácidos grasos (% total de ácidos grasos) en las cepas mutantes

14:0

Summary of all Effects; design: (compon~3.sta)

1-VAR1

	df	MS	df	MS	F	p-level
	Effect	Effect	Error	Error		
1	8	0.00973	69	0.005	1.806	0.091

LSD test; variable A14_0 (compon~3.sta)

Probabilities for Post Hoc Tests

MAIN EFFECT: VAR1

	17	18	19	20	3	6	11	13 Ceba silvestre	
	.8059278	.8025512	.8088293	.7588495	.8180807	.8166019	.7699095	.8707216	.7623704
17		0.923	0.932	0.191	0.734	0.774	0.302	0.084	0.191
18	0.923		0.853	0.225	0.665	0.705	0.349	0.070	0.228
19	0.932	0.853		0.156	0.791	0.831	0.253	0.092	0.152
20	0.191	0.225	0.156		0.111	0.133	0.757	0.004	0.918
3	0.734	0.665	0.791	0.111		0.969	0.181	0.170	0.107
6	0.774	0.705	0.831	0.133	0.969		0.211	0.172	0.131
11	0.302	0.349	0.253	0.757	0.181	0.211		0.008	0.820
13	0.084	0.070	0.092	0.004	0.170	0.172	0.008		0.003
Ceba silvestre	0.191	0.228	0.152	0.918	0.107	0.131	0.820	0.003	

16:0

Summary of all Effects; design: (compon~3.sta)

1-VAR1

	df	MS	df	MS	F	p-level
	Effect	Effect	Error	Error		
1	8	0.00963	69	0.006	1.554	0.155

LSD test; variable A16_0 (compon~3.sta)

Probabilities for Post Hoc Tests

MAIN EFFECT: VAR1

	17	18	19	20	3	6	11	13 Ceba silvestre	
	1.078370	1.045736	1.097298	1.085506	1.131086	1.106919	1.080713	1.027113	1.125480
17		0.382	0.602	0.853	0.173	0.474	0.950	0.201	0.187
18	0.382		0.159	0.302	0.029	0.128	0.349	0.640	0.027
19	0.602	0.159		0.753	0.369	0.805	0.648	0.075	0.415
20	0.853	0.302	0.753		0.251	0.601	0.901	0.156	0.278
3	0.173	0.029	0.369	0.251		0.555	0.192	0.013	0.879
6	0.474	0.128	0.805	0.601	0.555		0.511	0.062	0.627
11	0.950	0.349	0.648	0.901	0.192	0.511		0.181	0.210
13	0.201	0.640	0.075	0.156	0.013	0.062	0.181		0.012
Ceba silvestre	0.187	0.027	0.415	0.278	0.879	0.627	0.210	0.012	

16:1 ω-9

Summary of all Effects; design: (compon~3.sta)

1-VAR1

	df	MS	df	MS	F	p-level
Effect	Effect	Error	Error			
1	8	0.00235	69	0.001	2.850	0.009

Means (compon~3.sta)

F(8,69)=2.85; p<.0085

LSD test; variable A16_1 (compon~3.sta)

Probabilities for Post Hoc Tests

MAIN EFFECT: VAR1

	17	18	19	20	3	6	11	13 Cepsa silvestre
	1.208424	1.202580	1.205885	1.204407	1.211426	1.201096	1.191108	1.163671
17		0.667	0.848	0.774	0.830	0.614	0.205	0.003
18	0.667		0.803	0.896	0.528	0.919	0.400	0.009
19	0.848	0.803		0.914	0.685	0.736	0.267	0.004
20	0.774	0.896	0.914		0.626	0.824	0.344	0.008
3	0.830	0.528	0.685	0.626		0.489	0.150	0.002
6	0.614	0.919	0.736	0.824	0.489		0.492	0.017
11	0.205	0.400	0.267	0.344	0.150	0.492		0.062
13	0.003	0.009	0.004	0.008	0.002	0.017	0.062	0.009
Cepsa silvestre	0.182	0.076	0.116	0.113	0.284	0.079	0.009	0.000

16:1 ω-3

Summary of all Effects; design: (compon~3.sta)

1-VAR1

	df	MS	df	MS	F	p-level
Effect	Effect	Error	Error			
1	8	0.01815	69	0.004	4.604	0.000

LSD test; variable A16_1 (compon~3.sta)

Probabilities for Post Hoc Tests

MAIN EFFECT: VAR1

	17	18	19	20	3	6	11	13 Cepsa silvestre
	.2263450	.2159559	.2067125	.1098873	.2648650	.2019203	.2077872	.2213777
17		0.727	0.498	0.000	0.211	0.443	0.533	0.876
18	0.727		0.750	0.001	0.113	0.659	0.783	0.864
19	0.498	0.750		0.002	0.055	0.877	0.970	0.637
20	0.000	0.001	0.002		0.000	0.006	0.002	0.001
3	0.211	0.113	0.055	0.000		0.057	0.066	0.185
6	0.443	0.659	0.877	0.006	0.057		0.853	0.564
11	0.533	0.783	0.970	0.002	0.066	0.853		0.669
13	0.876	0.864	0.637	0.001	0.185	0.564	0.669	0.114
Cepsa silvestre	0.127	0.060	0.024	0.000	0.863	0.028	0.031	0.114

16:2

Summary of all Effects; design: (compon~3.sta)

1-VAR1

	df	MS	df	MS	F	p-level
	Effect	Effect	Error	Error		
1		8 0.00522	69	0.001	4.226	0.000

LSD test; variable A16_2 (compon~3.sta)

Probabilities for Post Hoc Tests

MAIN EFFECT: VAR1

	17	18	19	20	3	6	11	13 Cepsa silvestre
	.8994808	.8954217	.8801532	.8379055	.9086760	.8908418	.8982439	.8390813 .8882996
17		0.807	0.236	0.001	0.592	0.627	0.941	0.001 0.482
18	0.807		0.348	0.001	0.440	0.797	0.865	0.002 0.654
19	0.236	0.348		0.014	0.092	0.539	0.267	0.021 0.598
20	0.001	0.001	0.014		0.000	0.005	0.001	0.949 0.003
3	0.592	0.440	0.092	0.000		0.330	0.543	0.000 0.216
6	0.627	0.797	0.539	0.005	0.330		0.677	0.008 0.882
11	0.941	0.865	0.267	0.001	0.543	0.677		0.001 0.531
13	0.001	0.002	0.021	0.949	0.000	0.008	0.001	0.005 0.005
Cepsa silvestre	0.482	0.654	0.598	0.003	0.216	0.882	0.531	

16:3

Summary of all Effects; design: (compon~3.sta)

1-VAR1

	df	MS	df	MS	F	p-level
	Effect	Effect	Error	Error		
1		8 0.00456	69	0.002	2.335	0.028

LSD test; variable A16_3 (compon~3.sta)

Probabilities for Post Hoc Tests

MAIN EFFECT: VAR1

	17	18	19	20	3	6	11	13 Cepsa silvestre
	.8652224	.8756400	.8572029	.8282588	.8460087	.8420584	.8728131	.8815390 .8160601
17		0.619	0.694	0.090	0.374	0.302	0.717	0.466 0.016
18	0.619		0.367	0.031	0.172	0.136	0.892	0.792 0.004
19	0.694	0.367		0.172	0.595	0.489	0.445	0.268 0.037
20	0.090	0.031	0.172		0.425	0.548	0.042	0.023 0.555
3	0.374	0.172	0.595	0.425		0.863	0.216	0.125 0.149
6	0.302	0.136	0.489	0.548	0.863		0.172	0.099 0.228
11	0.717	0.892	0.445	0.042	0.216	0.172		0.696 0.006
13	0.466	0.792	0.268	0.023	0.125	0.099	0.696	0.003 0.003
Cepsa silvestre	0.016	0.004	0.037	0.555	0.149	0.228	0.006	

18:0

Summary of all Effects; design: (compon~3.sta)

1-VAR1

	df	MS	df	MS	F	p-level
	Effect	Effect	Error	Error		
1	8	0.10914	69	0.018	5.968	0.000

LSD test; variable A18_0 (compon~3.sta)

Probabilities for Post Hoc Tests

MAIN EFFECT: VAR1

	17	18	19	20	3	6	11	13 Ceba silvestre	
	-.292325	-.363683	-.263794	-.257636	-.264026	-.315785	-.344550	-.484490	-.074852
17		0.267	0.648	0.599	0.668	0.732	0.415	0.006	0.001
18	0.267		0.112	0.111	0.134	0.485	0.765	0.081	0.000
19	0.648	0.112		0.924	0.997	0.438	0.198	0.001	0.002
20	0.599	0.111	0.924		0.925	0.409	0.190	0.002	0.005
3	0.668	0.134	0.997	0.925		0.462	0.225	0.002	0.004
6	0.732	0.485	0.438	0.409	0.462		0.674	0.023	0.000
11	0.415	0.765	0.198	0.190	0.225	0.674		0.044	0.000
13	0.006	0.081	0.001	0.002	0.002	0.023	0.044		0.000
Ceba silvestre	0.001	0.000	0.002	0.005	0.004	0.000	0.000	0.000	

18:1 0-9

Summary of all Effects; design: (compon~3.sta)

1-VAR1

	df	MS	df	MS	F	p-level
	Effect	Effect	Error	Error		
1	8	0.04806	69	0.015	3.248	0.003

LSD test; variable A18_1 (compon~3.sta)

Probabilities for Post Hoc Tests

MAIN EFFECT: VAR1

	17	18	19	20	3	6	11	13 Ceba silvestre	
	-.231374	-.189374	-.100292	-.054164	-.103177	-.121735	-.261119	-.046777	-.170546
17		0.466	0.022	0.004	0.034	0.078	0.606	0.004	0.270
18	0.466		0.116	0.025	0.149	0.274	0.215	0.023	0.732
19	0.022	0.116		0.427	0.960	0.722	0.005	0.375	0.191
20	0.004	0.025	0.427		0.423	0.287	0.001	0.907	0.043
3	0.034	0.149	0.960	0.423		0.769	0.009	0.373	0.237
6	0.078	0.274	0.722	0.287	0.769		0.026	0.253	0.409
11	0.606	0.215	0.005	0.001	0.009	0.026		0.001	0.102
13	0.004	0.023	0.375	0.907	0.373	0.253	0.001		0.039
Ceba silvestre	0.270	0.732	0.191	0.043	0.237	0.409	0.102	0.039	

18:10-11

Summary of all Effects; design: (compon~3.sta)

1-VAR1

	df	MS	df	MS	F	p-level
	Effect	Effect	Error	Error		
1	8	0.02378	69	0.007	3.642	0.001

LSD test; variable A18_1 (compon~3.sta)

Probabilities for Post Hoc Tests

MAIN EFFECT: VAR1

	17	18	19	20	3	6	11	13 Ceba silvestre
	-0.429802	-0.439462	-0.374494	-0.424805	-0.489694	-0.466370	-0.496864	-0.564492
17		0.801	0.141	0.899	0.132	0.372	0.083	0.001
18	0.801		0.085	0.710	0.205	0.511	0.136	0.003
19	0.141	0.085		0.194	0.004	0.024	0.002	0.000
20	0.899	0.710	0.194		0.113	0.324	0.071	0.001
3	0.132	0.205	0.004	0.113		0.579	0.856	0.078
6	0.372	0.511	0.024	0.324	0.579		0.456	0.026
11	0.083	0.136	0.002	0.071	0.856	0.456		0.101
13	0.001	0.003	0.000	0.001	0.078	0.026	0.101	
Ceba silvestre	0.416	0.582	0.019	0.358	0.424	0.862	0.308	0.009

18:2

Summary of all Effects; design: (compon~3.sta)

1-VAR1

	df	MS	df	MS	F	p-level
	Effect	Effect	Error	Error		
1	8	0.00564	69	0.004	1.480	0.180

LSD test; variable A18_2 (compon~3.sta)

Probabilities for Post Hoc Tests

MAIN EFFECT: VAR1

	17	18	19	20	3	6	11	13 Ceba silvestre
	.2832730	.2879180	.2894569	.3565660	.3190110	.3219505	.3123100	.2666201
17		0.874	0.828	0.017	0.238	0.218	0.322	0.594
18	0.874		0.957	0.025	0.304	0.278	0.405	0.496
19	0.828	0.957		0.025	0.317	0.289	0.423	0.456
20	0.017	0.025	0.025		0.228	0.283	0.145	0.006
3	0.238	0.304	0.317	0.228		0.927	0.824	0.106
6	0.218	0.278	0.289	0.283	0.927		0.758	0.098
11	0.322	0.405	0.423	0.145	0.824	0.758		0.147
13	0.594	0.496	0.456	0.006	0.106	0.098	0.147	
Ceba silvestre	0.348	0.440	0.461	0.105	0.741	0.677	0.919	0.156

18:3

Summary of all Effects; design: (compon~3.sta)

1-VAR1

	df	MS	df	MS	F	p-level
	Effect	Effect	Error	Error		
1	8	0.04791	69	0.015	3.211	0.004

LSD test; variable A18_3 (compon~3.sta)

Probabilities for Post Hoc Tests

MAIN EFFECT: VAR1

	17	18	19	20	3	6	11	13 Cepsa silvestre
	-0.482448	-0.498867	-0.391524	-0.352654	-0.435484	-0.405219	-0.399727	-0.598350
17		0.776	0.110	0.032	0.432	0.214	0.155	0.064
18	0.776		0.060	0.016	0.289	0.133	0.090	0.111
19	0.110	0.060		0.505	0.451	0.821	0.884	0.001
20	0.032	0.016	0.505		0.179	0.409	0.430	0.000
3	0.432	0.289	0.451	0.179		0.634	0.549	0.012
6	0.214	0.133	0.821	0.409	0.634		0.929	0.004
11	0.155	0.090	0.884	0.430	0.549	0.929		0.002
13	0.064	0.111	0.001	0.000	0.012	0.004	0.002	0.000
Cepsa silvestre	0.041	0.020	0.659	0.789	0.238	0.529	0.564	0.000

18:4

Summary of all Effects; design: (compon~3.sta)

1-VAR1

	df	MS	df	MS	F	p-level
	Effect	Effect	Error	Error		
1	8	0.05125	69	0.007	7.059	0.000

LSD test; variable A18_4 (compon~3.sta)

Probabilities for Post Hoc Tests

MAIN EFFECT: VAR1

	17	18	19	20	3	6	11	13 Cepsa silvestre
	-0.269817	-0.263012	-0.290933	-0.158415	-0.329920	-0.236470	-0.191755	-0.054972
17		0.866	0.591	0.009	0.151	0.440	0.056	0.000
18	0.866		0.478	0.014	0.111	0.539	0.080	0.000
19	0.591	0.478		0.002	0.338	0.199	0.014	0.000
20	0.009	0.014	0.002		0.000	0.081	0.423	0.022
3	0.151	0.111	0.338	0.000		0.038	0.001	0.000
6	0.440	0.539	0.199	0.081	0.038		0.301	0.000
11	0.056	0.080	0.014	0.423	0.001	0.301		0.002
13	0.000	0.000	0.000	0.022	0.000	0.000	0.002	0.000
Cepsa silvestre	0.265	0.347	0.089	0.089	0.011	0.814	0.364	0.000

20:5

Summary of all Effects; design: (compon~3.sta)

1-VAR1

	df	MS	df	MS	F	p-level
Effect	Effect	Error	Error			
1	8	0.00208	69	0.001	2.540	0.017

LSD test; variable A20_5 (compon~3.sta)

Probabilities for Post Hoc Tests

MAIN EFFECT: VAR1

	17	18	19	20	3	6	11	13 Cepsa silvestre	
	1.600302	1.612022	1.592658	1.616255	1.578823	1.599378	1.612541	1.626129	1.583334
17		0.388	0.563	0.255	0.127	0.949	0.368	0.078	0.192
18	0.388		0.145	0.762	0.020	0.384	0.969	0.331	0.029
19	0.563	0.145		0.087	0.312	0.635	0.135	0.020	0.458
20	0.255	0.762	0.087		0.011	0.259	0.790	0.507	0.016
3	0.127	0.020	0.312	0.011		0.170	0.018	0.002	0.735
6	0.949	0.384	0.635	0.259	0.170		0.365	0.085	0.250
11	0.368	0.969	0.135	0.790	0.018	0.365		0.349	0.026
13	0.078	0.331	0.020	0.507	0.002	0.085	0.349		0.003
Cepsa silvestre	0.192	0.029	0.458	0.016	0.735	0.250	0.026	0.003	

22:6

Summary of all Effects; design: (compon~3.sta)

1-VAR1

	df	MS	df	MS	F	p-level
Effect	Effect	Error	Error			
1	8	0.01425	69	0.006	2.411	0.023

LSD test; variable A22_6 (compon~3.sta)

Probabilities for Post Hoc Tests

MAIN EFFECT: VAR1

	17	18	19	20	3	6	11	13 Cepsa silvestre	
	.3374960	.3481446	.3855626	.4101206	.3240881	.3415841	.3915866	.3685555	.2840817
17		0.770	0.178	0.056	0.721	0.916	0.140	0.425	0.127
18	0.770		0.293	0.102	0.522	0.866	0.235	0.600	0.068
19	0.178	0.293		0.503	0.096	0.250	0.865	0.655	0.004
20	0.056	0.102	0.503		0.028	0.089	0.621	0.300	0.001
3	0.721	0.522	0.096	0.028		0.662	0.075	0.268	0.267
6	0.916	0.866	0.250	0.089	0.662		0.201	0.514	0.126
11	0.140	0.235	0.865	0.621	0.075	0.201		0.554	0.003
13	0.425	0.600	0.655	0.300	0.268	0.514	0.554		0.026
Cepsa silvestre	0.127	0.068	0.004	0.001	0.267	0.126	0.003	0.026	

ANEXO V

V. Análisis de componentes principales entre las cepas mutantes

V.I Análisis de componentes principales (mg g⁻¹ peso seco)

Factor Loadings (Varimax normalized) (compon~3.sta)

Extraction: Principal components

(Marked loadings are > .700000)

	Factor 1	Factor 2	Factor 3	Factor 4	Factor 5
A14_0	0.112222466	0.359986204	-0.025127641	0.341029714	0.097998324
A16_0	0.025862613	0.173623053	0.237616107	0.885589843	0.053873279
A16_1	0.144046285	0.678139485	0.165890598	0.185229255	0.222580368
A16_1	0.037086562	0.713433504	0.164275736	0.405904877	-0.016167215
A16_2	0.07906055	0.909333988	0.093257398	0.193485276	0.122556434
A16_3	0.185305729	0.926521154	-0.065641211	0.014635137	0.178654319
A18_0	-0.057782841	0.039912773	0.964681942	0.183990999	-0.044047398
A18_1	0.219864511	0.085764908	0.069243099	0.07289783	0.09840029
A18_1	0.018383857	0.359234188	0.165056549	0.318553206	0.33132048
A18_2	0.283980756	0.522640414	0.152479482	0.107026374	0.187657005
A18_3	0.187201791	0.20418193	0.172633759	0.114580574	0.191639266
A18_4	0.887487877	0.265196156	-0.073882222	0.026288124	0.170720546
A20_5	0.340450733	0.75367709	-0.039678322	0.031455573	0.363893506
A22_6	0.246092337	0.401764399	-0.087942582	0.062059149	0.787786434
Expl.Var	1.207785964	4.066539208	1.155073508	1.308048156	1.084755111
Prp.Totl	0.086270426	0.290467086	0.082505251	0.093432011	0.077482508

Eigenvalues (compon~3.sta)

Extraction: Principal components

	Eigenval	% total Variance	Cumul. Eigenval	Cumul. %
1	7.491805881	53.51289915	7.491805881	53.51289915
2	1.883745351	13.45532394	9.375551233	66.96822309
3	1.587212577	11.3372327	10.96276381	78.30545579
4	0.898696064	6.4192576	11.86145987	84.72471339
5	0.636442954	4.546021097	12.49790283	89.27073448
6	0.470629274	3.361637671	12.9685321	92.63237216
7	0.342523259	2.446594707	13.31105536	95.07896686
8	0.199732337	1.426659554	13.5107877	96.50562642
9	0.155341285	1.10958061	13.66612898	97.61520703
10	0.111725984	0.798042744	13.77785497	98.41324977
11	0.103210292	0.737216374	13.88106526	99.15046614
12	0.068256291	0.487544934	13.94932155	99.63801108
13	0.031854226	0.227530189	13.98117578	99.86554127
14	0.018824223	0.134458733	14	100

Código de colores para las figuras

rojo	17	oro	3
naranja	18	agua	6
verde	19	rosa	11
azul	20	rojo ladrillo	13
azul marino	Cepa silvestre		

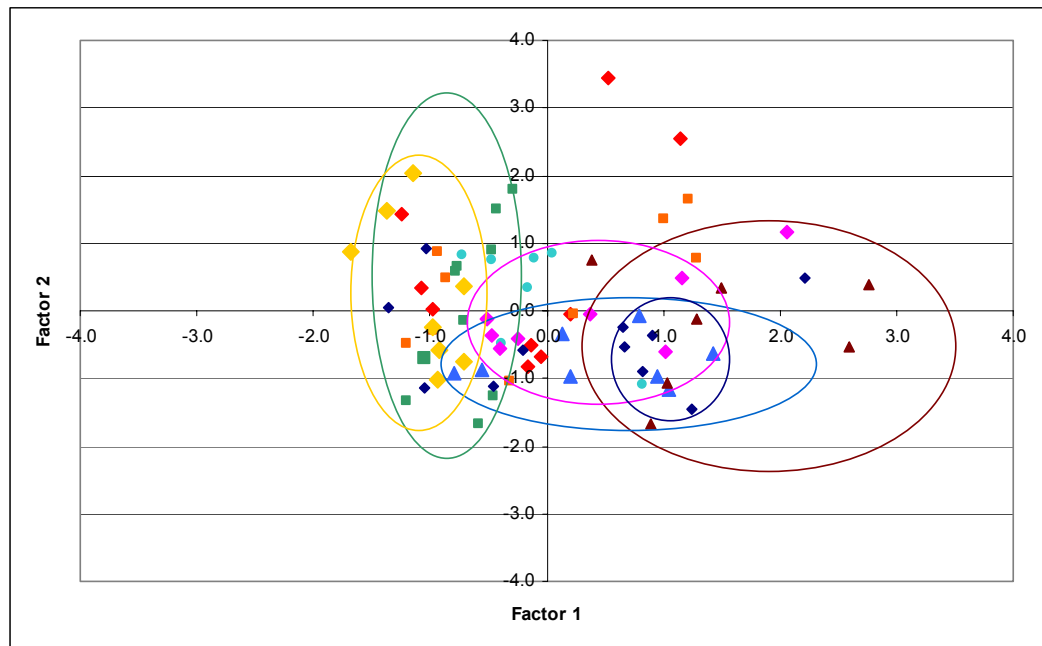


Figura 1. Gráfica de Factor 1 Vs Factor 2, del análisis de componentes principales con respecto a la concentración de ácidos grasos

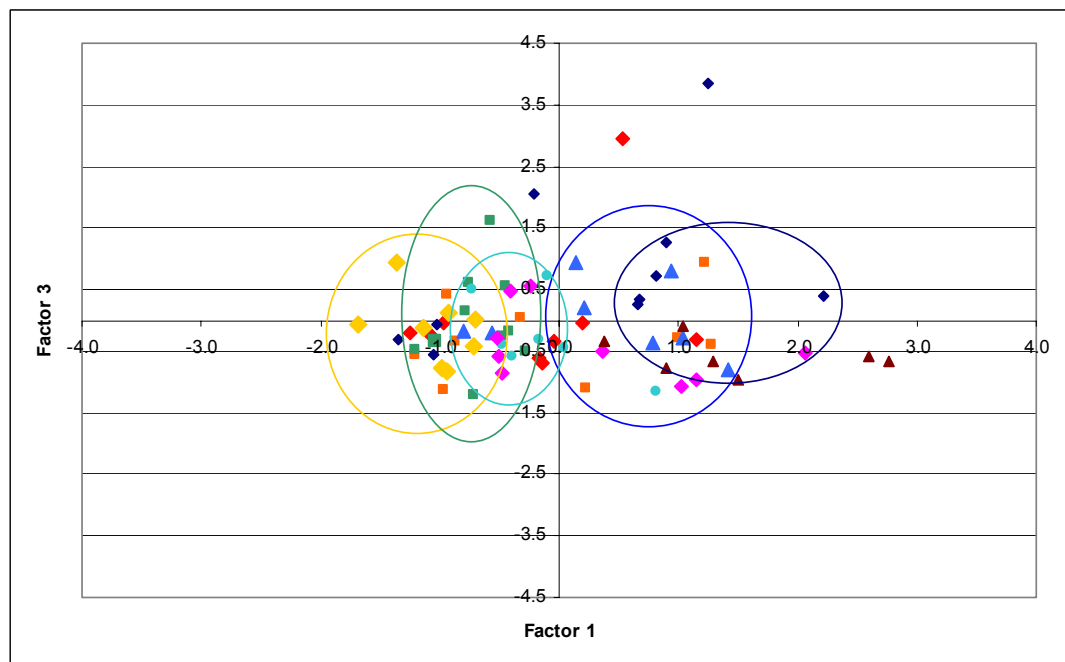


Figura 2. Gráfica de Factor 1 Vs Factor 3, del análisis de componentes principales con respecto a la concentración de ácidos grasos

V.II Análisis de componentes principales (% total de ácidos grasos)

Factor Loadings (Varimax normalized) (compon~3.sta)

Extraction: Principal components

(Marked loadings are > .700000)

	Factor 1	Factor 2	Factor 3	Factor 4	Factor 5	
A14_0		0.278	-0.260	0.129	0.034	0.064
A16_0		0.915	-0.017	0.144	0.134	0.096
A16_1		0.029	0.039	-0.058	0.178	-0.943
A16_1		0.203	-0.234	-0.306	-0.134	0.086
A16_2		-0.138	-0.016	-0.897	-0.031	-0.085
A16_3		-0.562	-0.149	-0.405	-0.141	0.173
A18_0		0.341	0.123	0.023	0.062	-0.153
A18_1		-0.030	0.127	0.245	0.072	-0.178
A18_1		0.234	0.098	0.042	0.929	-0.185
A18_2		-0.127	0.343	-0.029	0.037	-0.075
A18_3		0.010	0.876	0.037	0.113	-0.041
A18_4		-0.145	0.036	0.205	-0.114	0.130
A20_5		-0.751	0.046	0.068	-0.256	0.217
A22_6		-0.247	0.114	0.127	0.102	0.111
Expl.Var		2.125	1.089	1.230	1.065	1.120
Prp.Totl		0.152	0.078	0.088	0.076	0.080

Eigenvalues (compon~3.sta)

Extraction: Principal components

	Eigenval	% total Variance	Cumul. Eigenval	Cumul. %
1	4.022	28.731	4.022	28.731
2	3.235	23.109	7.258	51.840
3	2.019	14.425	9.277	66.265
4	1.133	8.095	10.410	74.360
5	1.061	7.576	11.471	81.936
6	0.555	3.964	12.026	85.901
7	0.478	3.415	12.504	89.316
8	0.421	3.006	12.925	92.322
9	0.308	2.200	13.233	94.521
10	0.277	1.978	13.510	96.499
11	0.205	1.465	13.715	97.964
12	0.170	1.215	13.885	99.179
13	0.104	0.745	13.989	99.924

Código de colores para las figuras

rojo	17	oro	3
naranja	18	agua	6
verde	19	rosa	11
azul	20	rojo ladrillo	13
azul marino	Cepa silvestre		

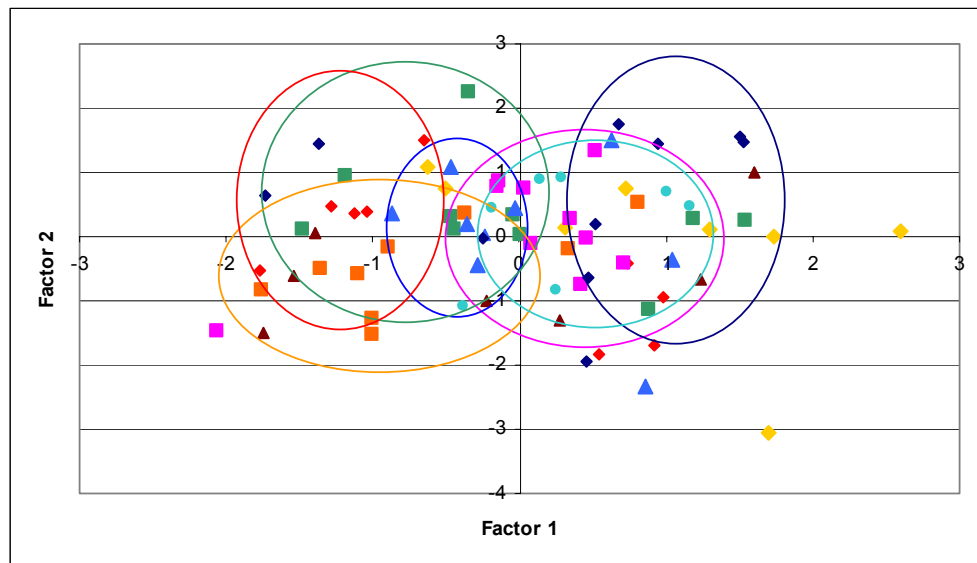


Figura 3. Gráfica de Factor 1 Vs Factor 2, del análisis de componentes principales con respecto al porcentaje relativo de ácidos grasos

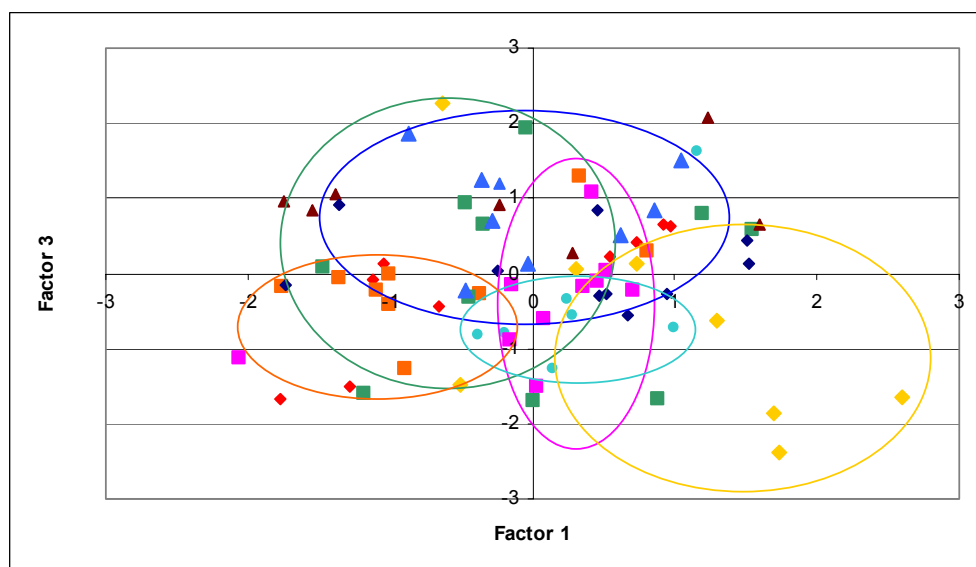


Figura 4. Gráfica de Factor 1 Vs Factor 3, del análisis de componentes principales con respecto al porcentaje relativo de ácidos grasos

ANEXO VI

Cinéticas de crecimiento de la cepa silvestre crecida en condiciones estándar en el medio descrito por Fábregas et al. (1984).

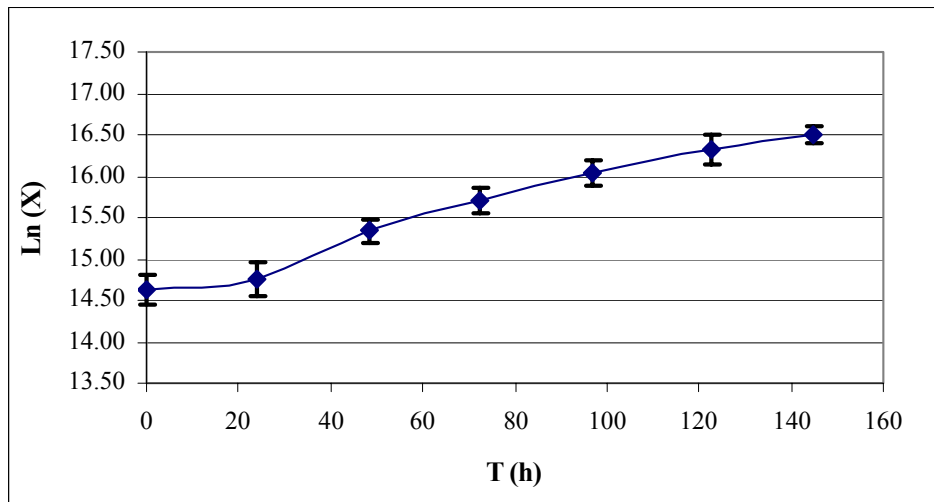


Figura 1. Cinética de crecimiento de un cultivo en lote de la cepa silvestre de *P. tricornutum* en el medio algal (144h).

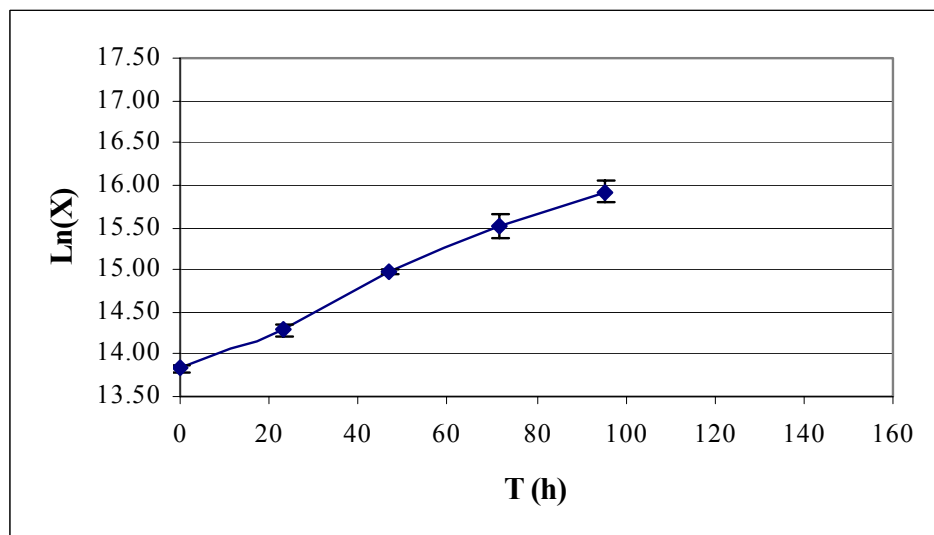


Figura 2. Cinética de crecimiento de un cultivo en lote de la cepa silvestre de *P. tricornutum* en el medio algal (96h).

ANEXO VII

Tablas comparativas de los tratamientos de la cepa silvestre de *P. tricornutum* con EMS.

Tabla I. Relación de las células resistentes a zeocina (150 µg ml⁻¹) y los diferentes tratamientos en presencia del mutágeno.

EMS Concentración (µM)	Células resistentes (10 ⁵)			
	Tiempo de exposición (min)			
	0	30	60	90
0	2.09	2.09	2.09	2.09
6.25	4.91	5.26	9.56*	4.55
12.5	3.35	3.92	9.07*	7.33*
25	9.76*	6.32	5.10	8.53*
50	4.52	2.97	3.43	6.92

*Tratamientos que presentan el mayor número de células resistentes a zeocina

Tabla II. Frecuencia de mutación de *P. tricornutum* después de los tratamientos con EMS.

Concentración de EMS (µM)	% Células resistentes/ Células totales			
	Tiempo (min)			
	0	30	60	90
0	1.84	1.84	1.84	1.84
6.25	11.47	13.15*	29.21*	6.32
12.5	7.45	10.08	12.65	17.35*
25	11.54	7.95	14.77*	10.53
50	13.92*	8.31	8.43	7.29

*Tratamientos que presentan la mayor frecuencia de mutación

ANEXO VIII

Gráficas comparativas de las tasas de crecimiento de los cultivos crecidos en condiciones óptimas y cultivos crecidos bajo estrés ambiental

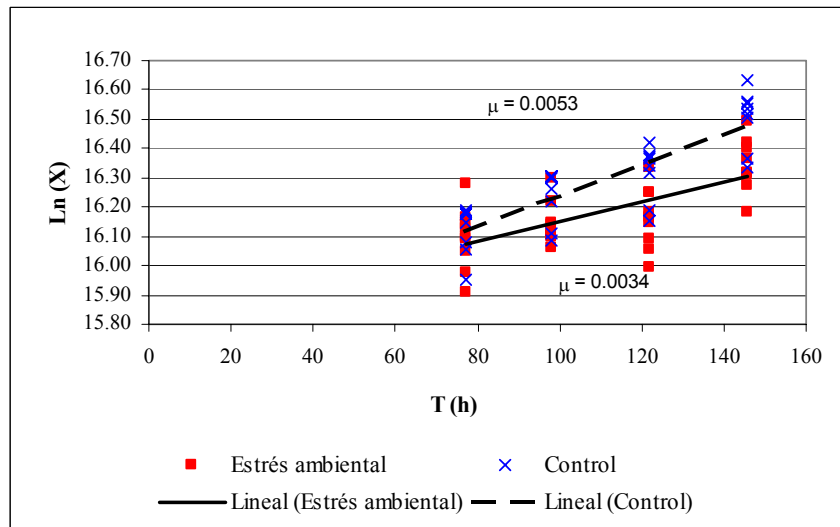


Figura 1. Determinación gráfica de la tasa de crecimiento en las 24h siguientes al cambio en la temperatura de incubación. Cultivos sin aireación

Estrés ambiental. Temperatura inicial $20 \pm 2^\circ\text{C}$. Después de 72h cambio a $4-14^\circ\text{C}$
 Control. Temperatura de incubación $20 \pm 2^\circ\text{C}$

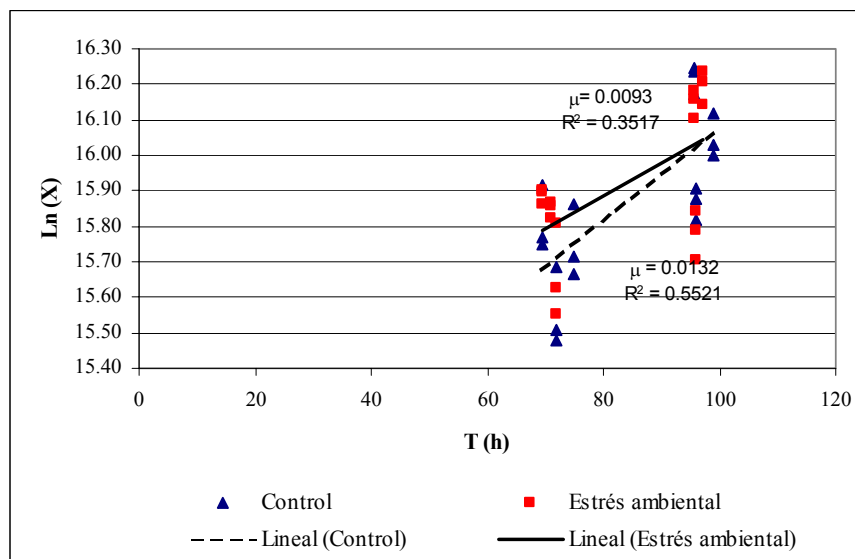


Figura 2. Determinación gráfica de la tasa de crecimiento en las 24h siguientes al cambio en la temperatura de incubación. Cultivos con inyección de aire/CO₂

Estrés ambiental. Temperatura inicial $20 \pm 2^\circ\text{C}$. Después de 72h cambio a $4-14^\circ\text{C}$
 Control. Temperatura de incubación $20 \pm 2^\circ\text{C}$

ANEXO IX

Curvas de crecimiento de las 20 cepas seleccionadas por su resistencia al estrés ambiental.

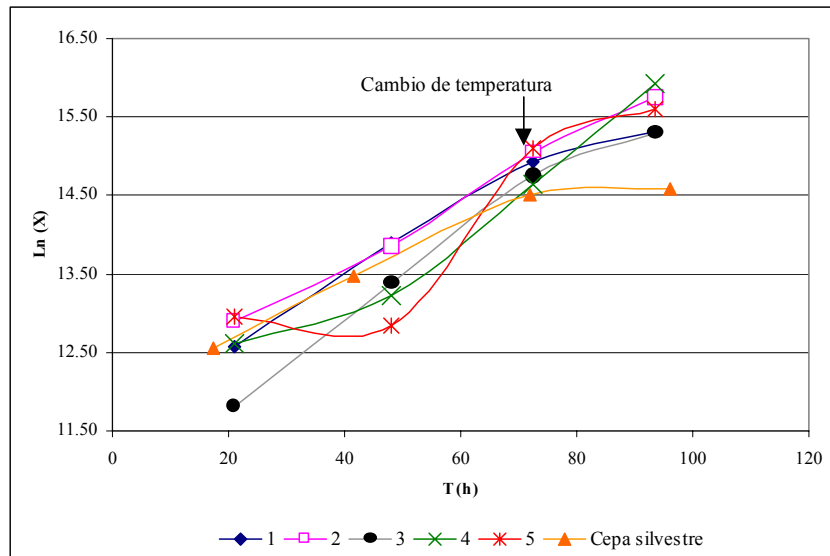


Figura 1. Cinéticas de crecimiento de las cepas mutantes seleccionadas., cepas 1-5. Temperatura inicial de crecimiento $20 \pm 2^\circ\text{C}$, temperatura final $4-14^\circ\text{C}$.

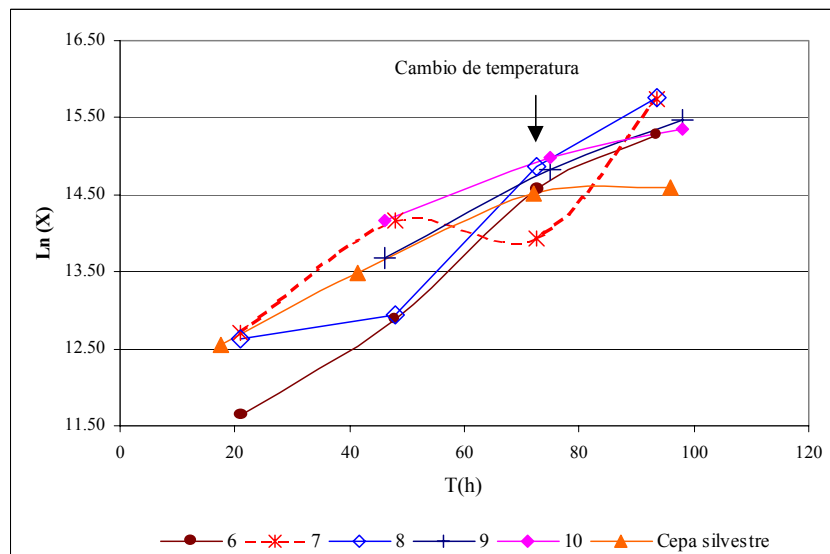


Figura 2. Cinéticas de crecimiento de las cepas mutantes seleccionadas, cepas 6-10. Temperatura inicial de crecimiento $20 \pm 2^\circ\text{C}$, temperatura final $4-14^\circ\text{C}$.

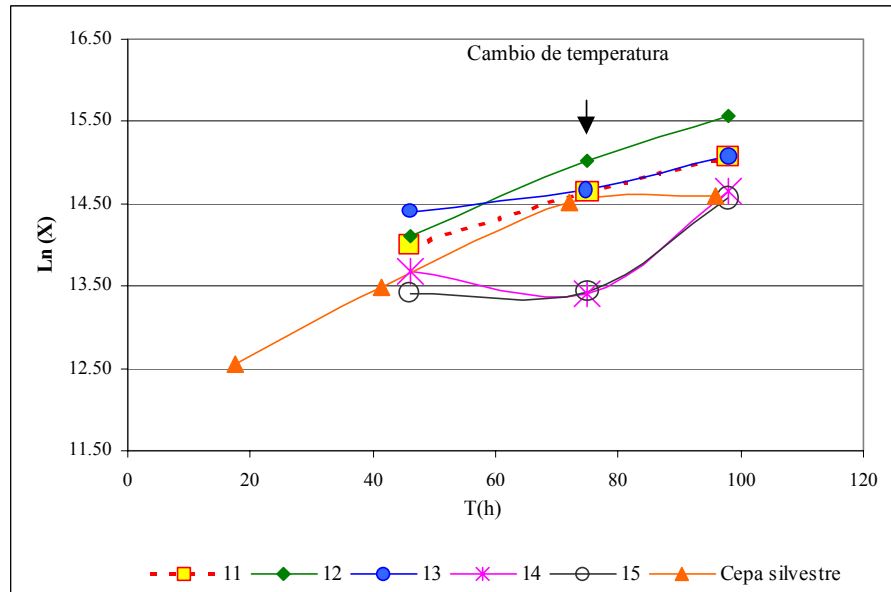


Figura 3. Cinéticas de crecimiento de las cepas mutantes seleccionadas, cepas 11-15. Temperatura inicial de crecimiento 20 ± 2 °C, temperatura final 4-14°C.

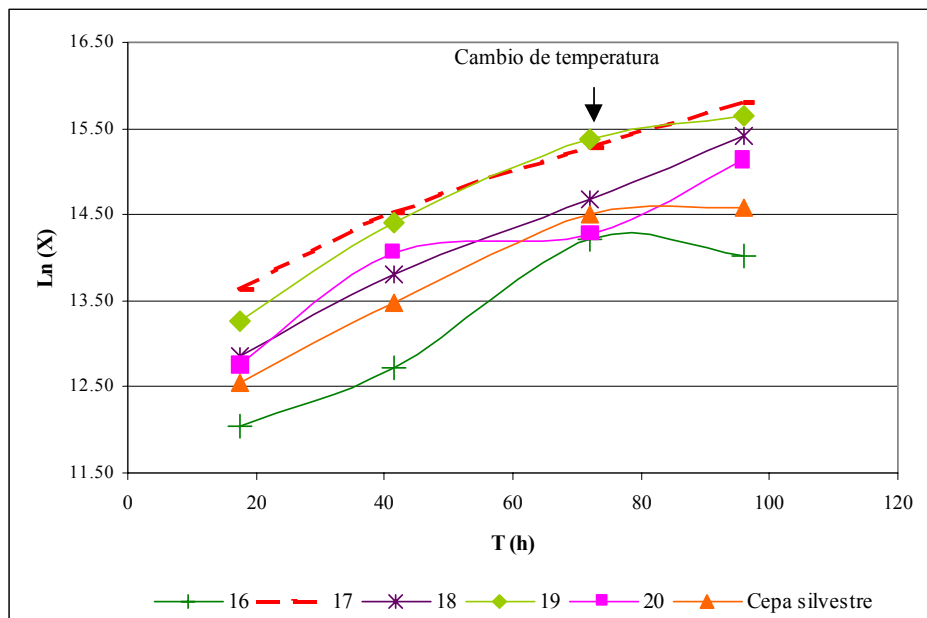


Figura 4. Cinéticas de crecimiento de las cepas mutantes seleccionadas, cepas 16-20. Temperatura inicial de crecimiento 20 ± 2 °C, temperatura final 4-14°C

ANEXO X

Curvas de crecimiento de las 8 cepas mutantes seleccionadas para ser caracterizadas bioquímica y cinéticamente.

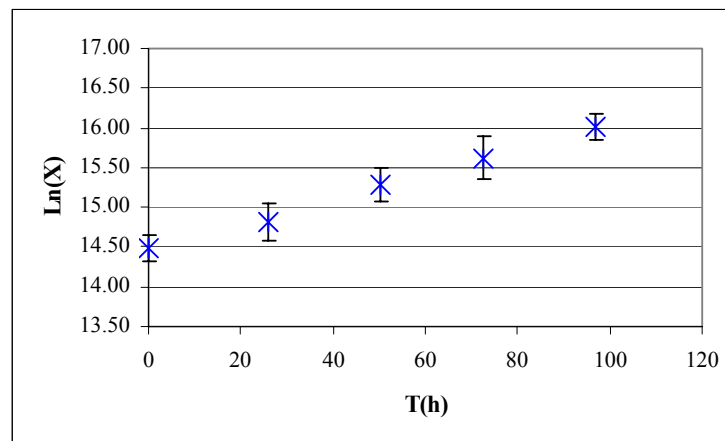


Figura 1. Curva de crecimiento de la cepa 3.

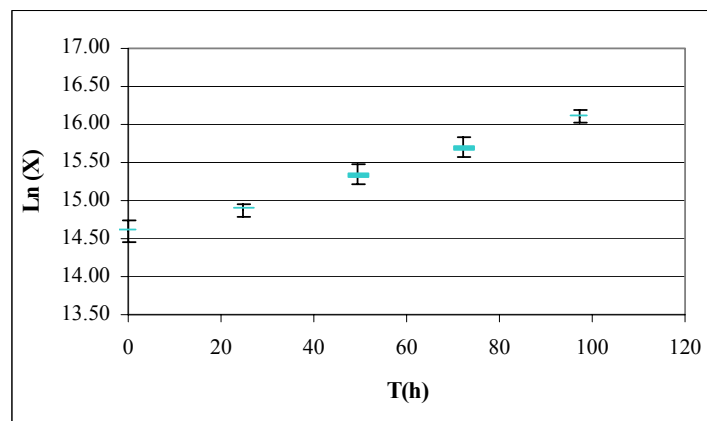


Figura 2. Curva de crecimiento de la cepa 6.

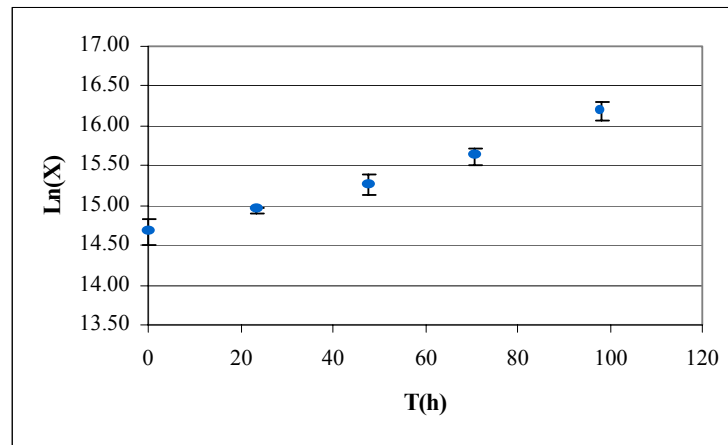


Figura 3. Curva de crecimiento de la cepa 11.

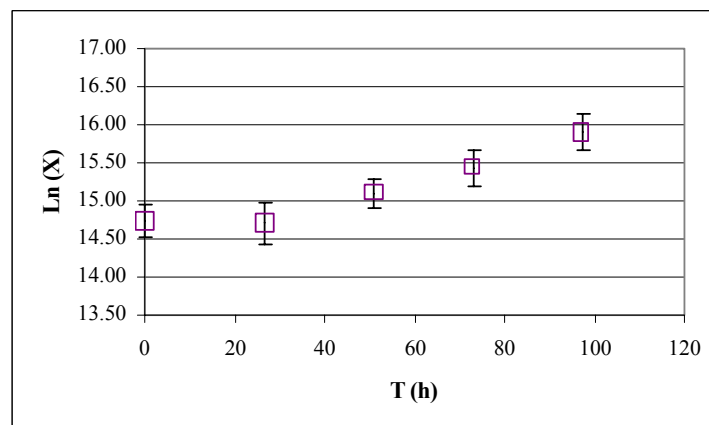


Figura 4. Curva de crecimiento de la cepa 13.

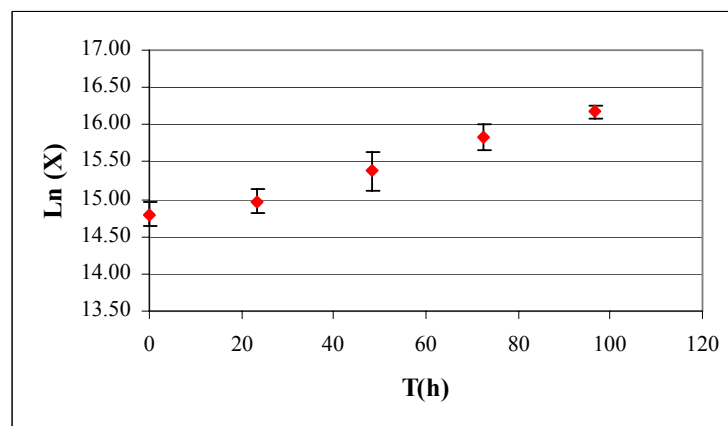


Figura 5. Curva de crecimiento de la cepa 17.

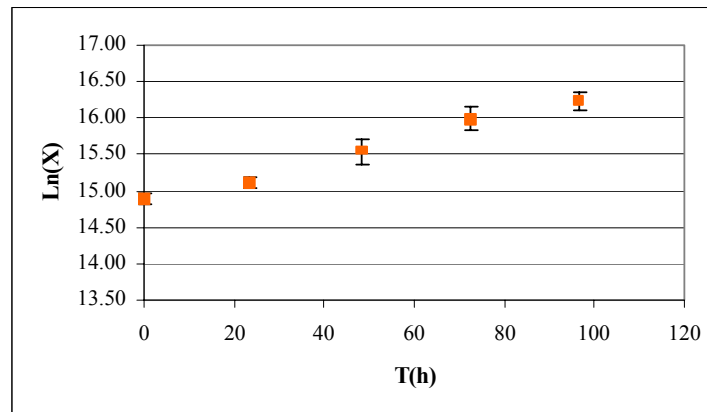


Figura 6. Curva de crecimiento de la cepa 18.

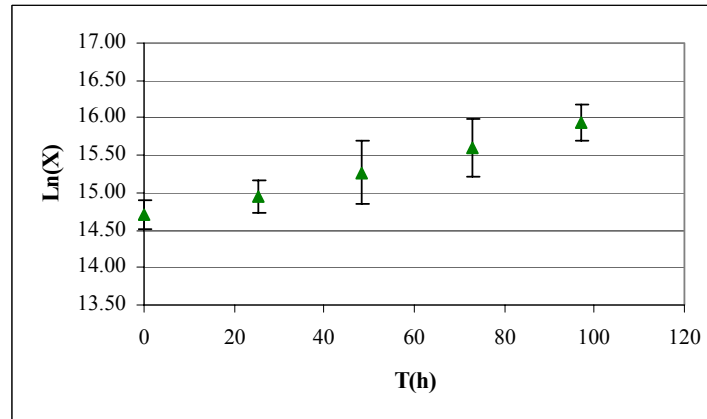


Figura 7. Curva de crecimiento de la cepa 19.

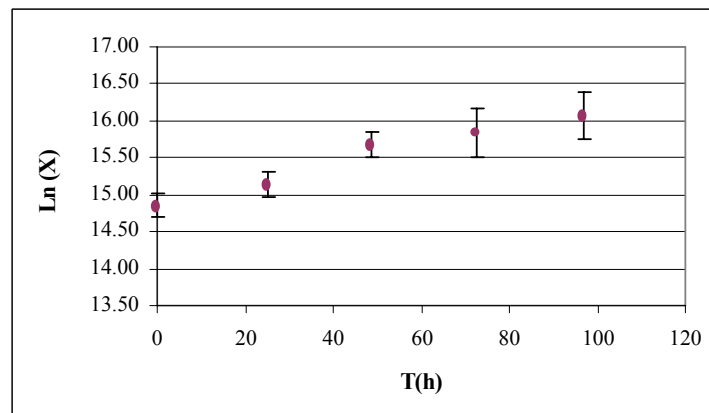


Figura 8. Curva de crecimiento de la cepa 20

ANEXO XI

Gráficas comparativas del comportamiento de los ácidos grasos más importantes, en las 8 cepas mutantes en concentración (mg g^{-1} peso seco) y porcentaje relativo.

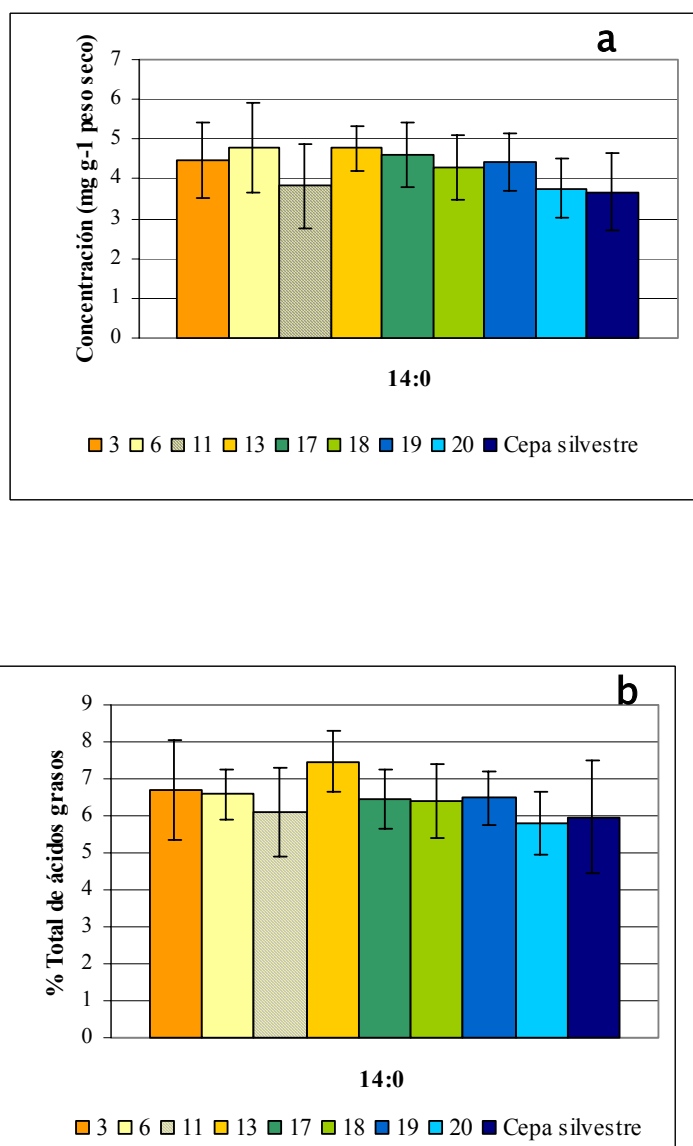


Figura 1. Comparación del 14:0 en *P. tricornutum*, (a) concentración y b) % del total de ácidos grasos) en las 8 diferentes cepas seleccionadas.

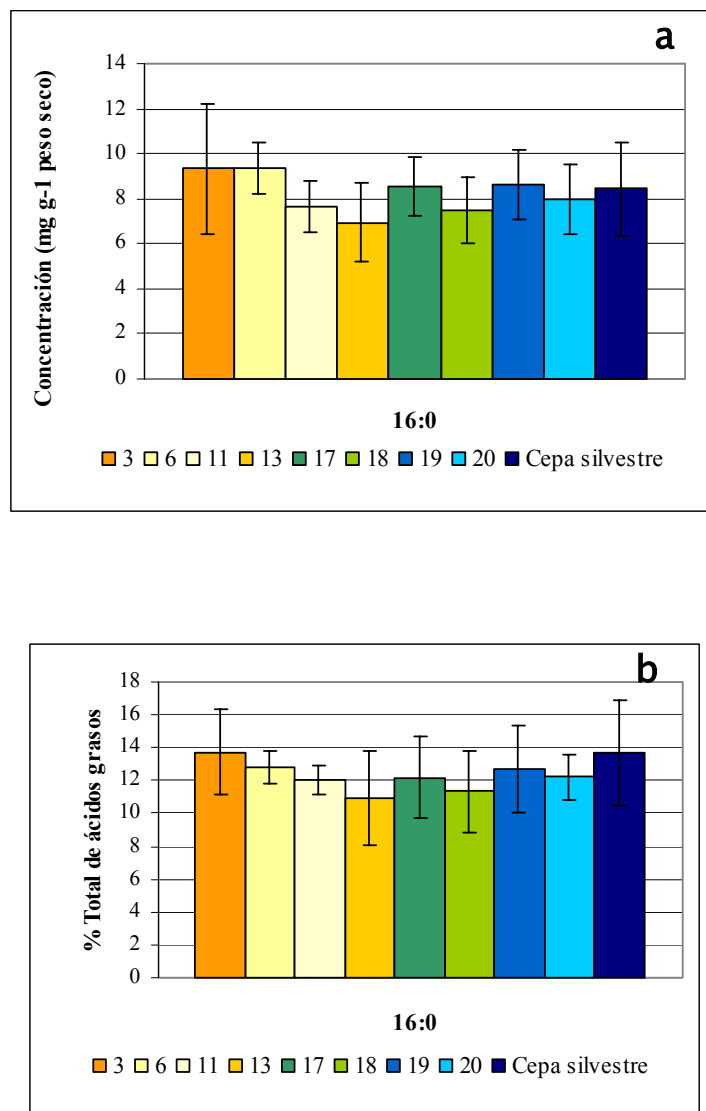


Figura 2. Comparación del ácido 16:0 en *P. tricornutum*, (a) concentración y b) % del total de ácidos grasos) en las 8 diferentes cepas seleccionadas.

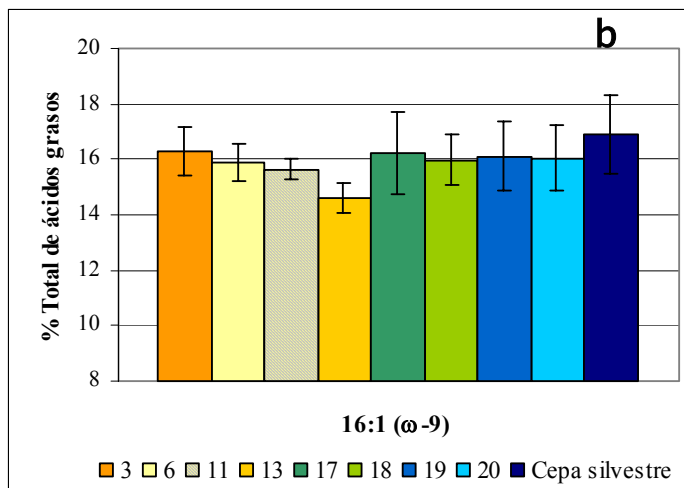
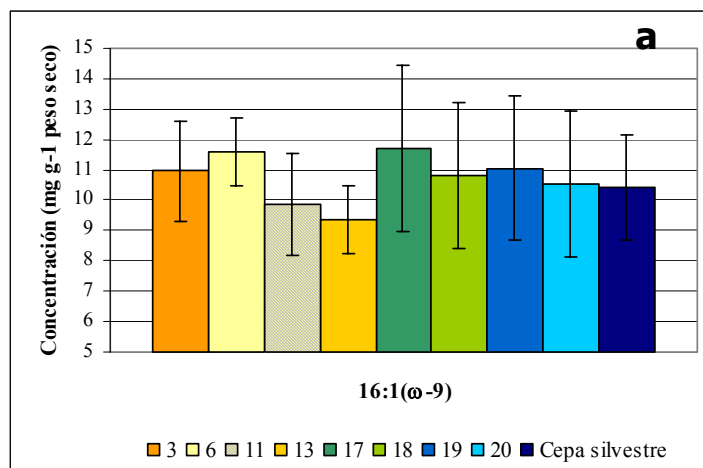


Figura 3. Comparación del ácido 16:1 (ω -9), en *P. tricornutum*, (a) concentración y b) % del total de ácidos grasos) en las 8 diferentes cepas seleccionadas.

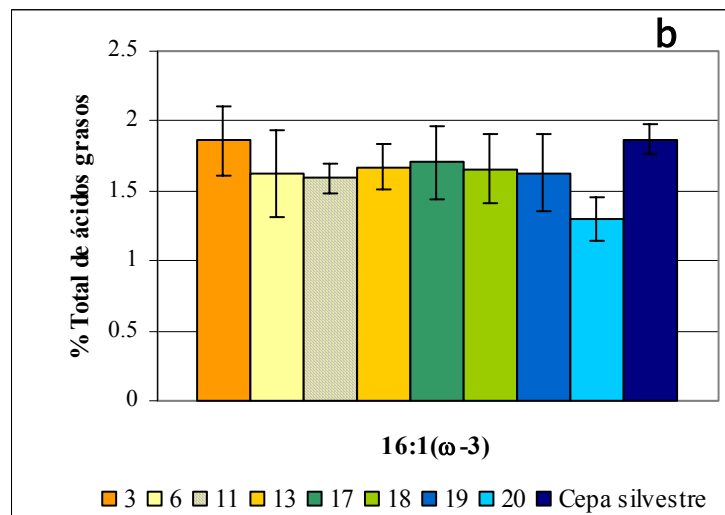
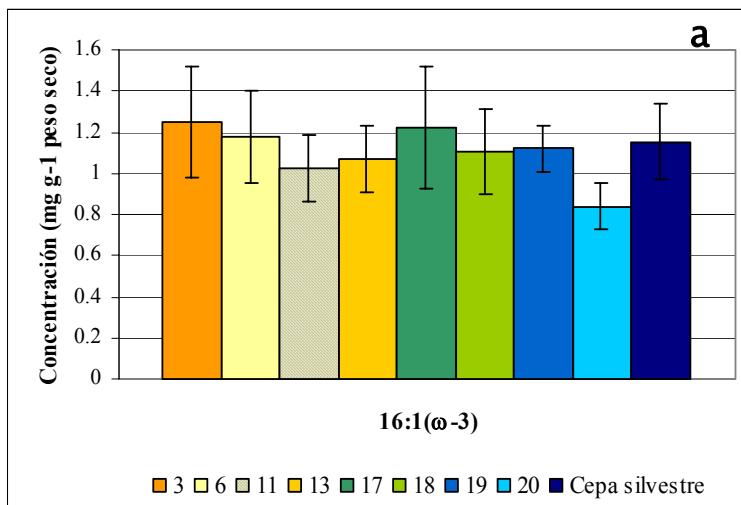


Figura 4. Comparación del 16:1 (ω-3), en *P. tricornutum*, (a) concentración y b) % del total de ácidos grasos) en las 8 diferentes cepas seleccionadas.

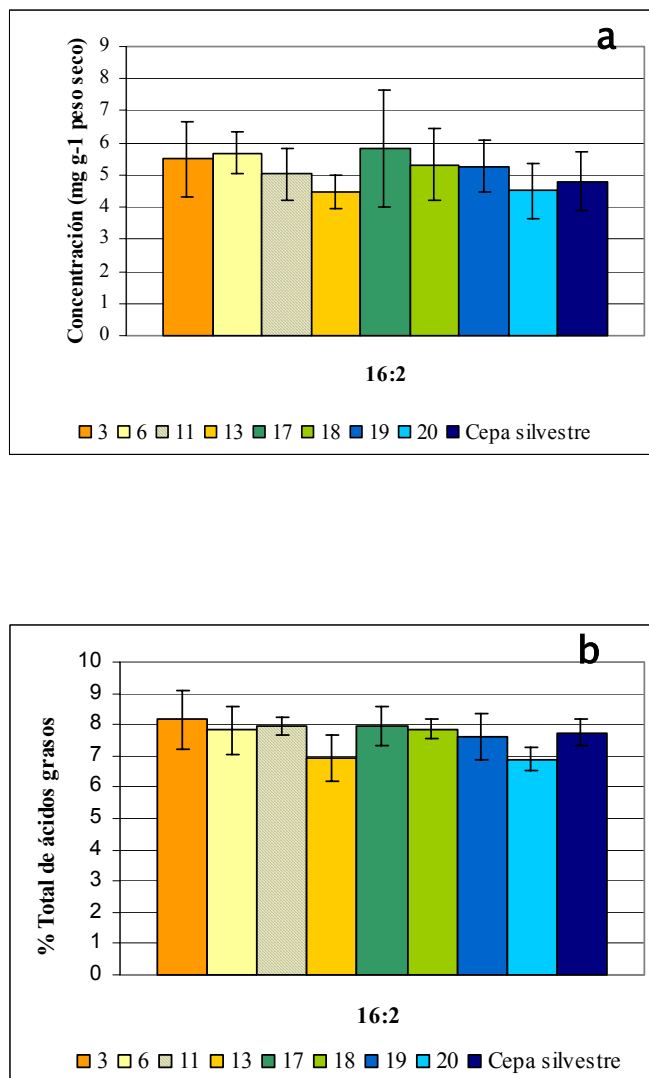


Figura 5. Comparación del 16:2, en *P. tricornutum*, (a) concentración y b) % del total de ácidos grasos) en las 8 diferentes cepas seleccionadas

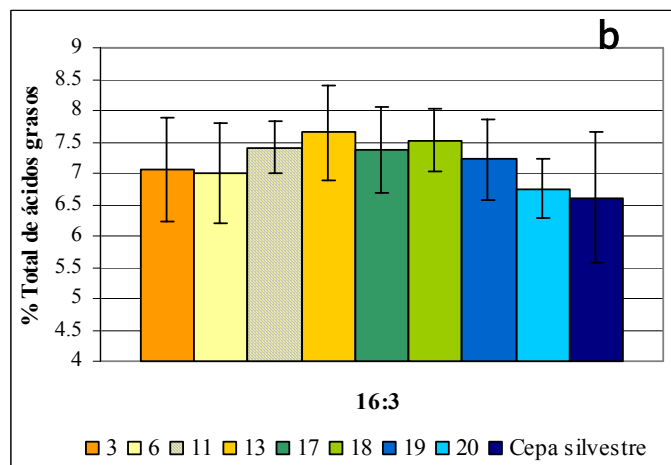
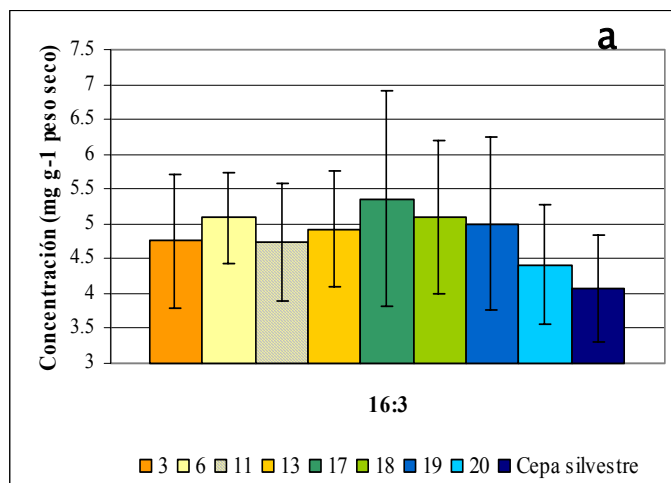


Figura 6. Comparación del 16:3 en *P. tricornutum*, (a) concentración y b) % del total de ácidos grasos) en las 8 diferentes cepas seleccionadas.

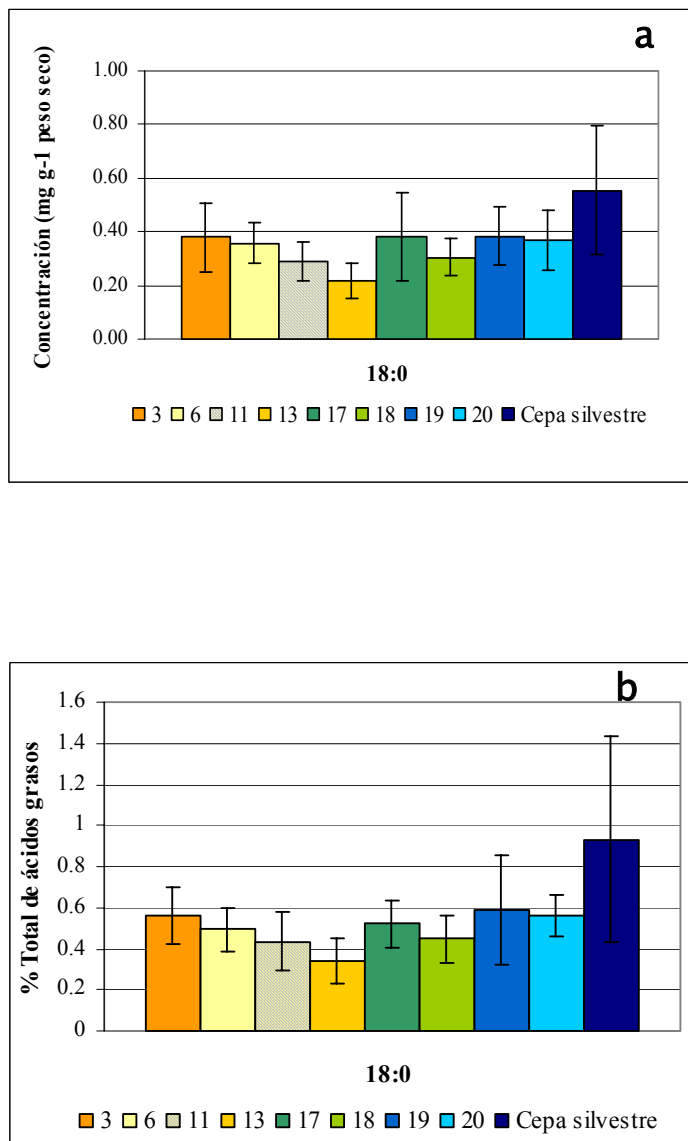


Figura 7. Comparación del 18:0 en *P. tricornutum*, (a) concentración y b) % del total de ácidos grasos) en las 8 diferentes cepas seleccionadas.

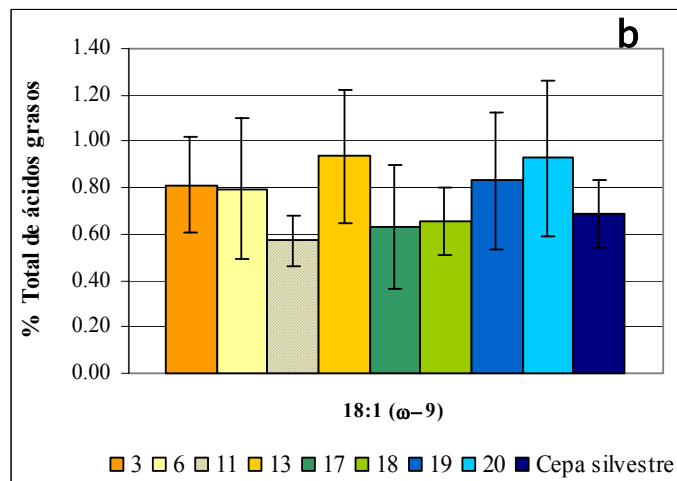
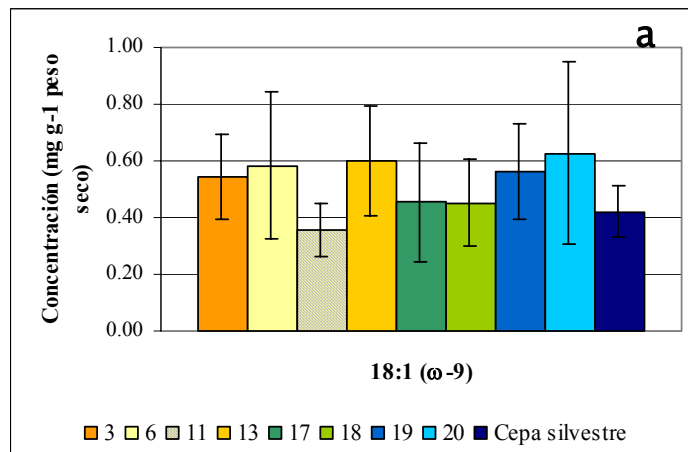


Figura 8. Comparación del 18:1(ω-9) en *P. tricornutum*, (a) concentración y b) % del total de ácidos grasos) en las 8 diferentes cepas seleccionadas.

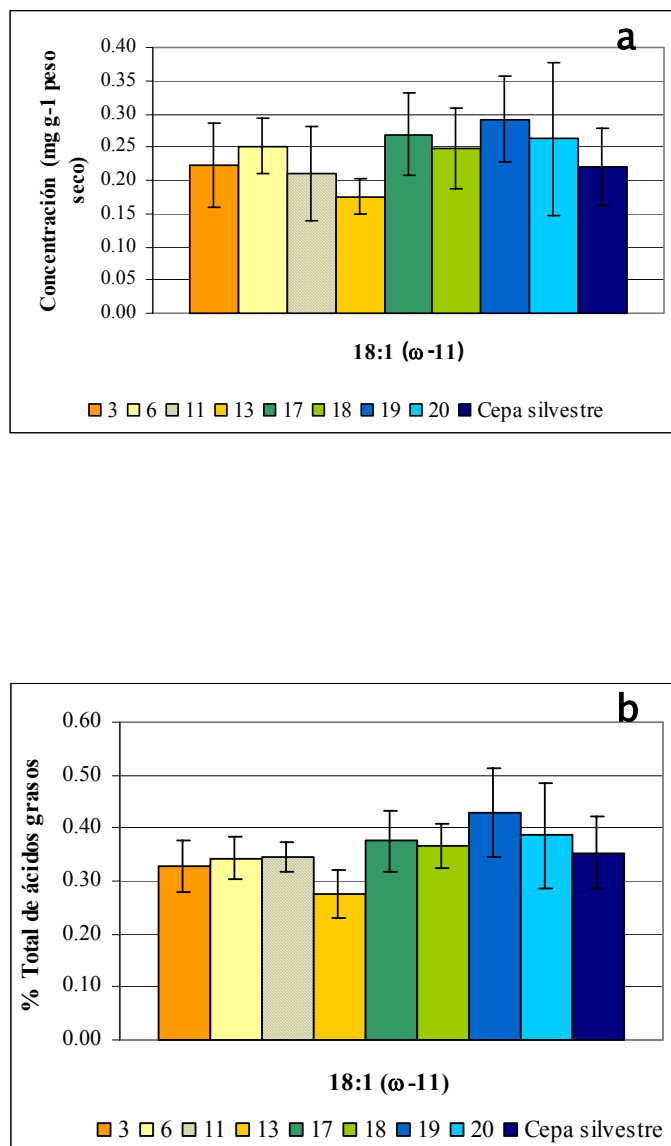


Figura 9. Comparación del 18:1(ω-11) en *P. tricornutum*, (a) concentración y b) % del total de ácidos grasos) en las 8 diferentes cepas analizadas

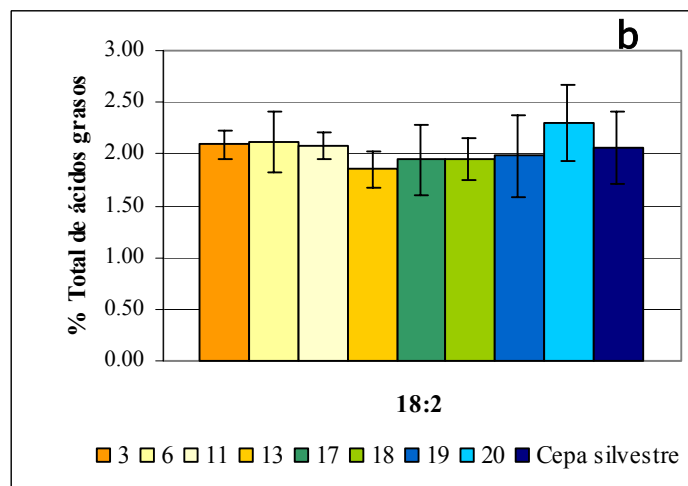
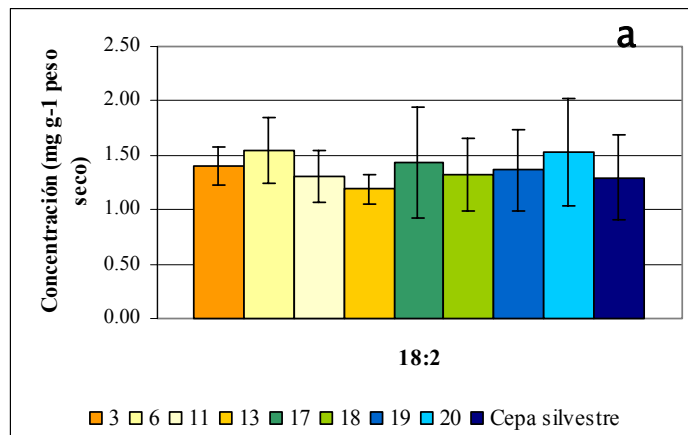
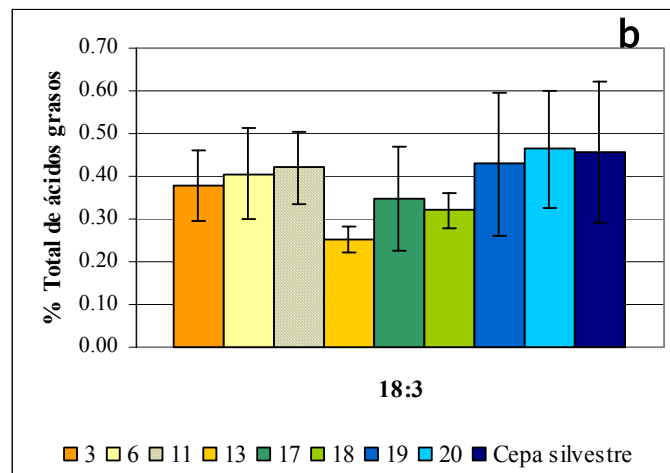
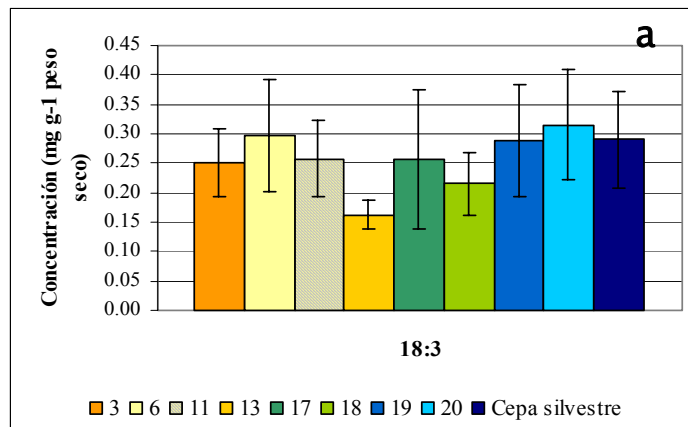


Figura 10. Comparación del 18:2 (ω -6) en *P. tricornutum*, (a) concentración y b) % del total de ácidos grasos) en las 8 diferentes cepas seleccionadas.



Figuras 11. Comparación del 18:3 (ω -3) en *P. tricornutum*, (a) concentración y b) % del total de ácidos grasos) en las 8 diferentes cepas analizadas

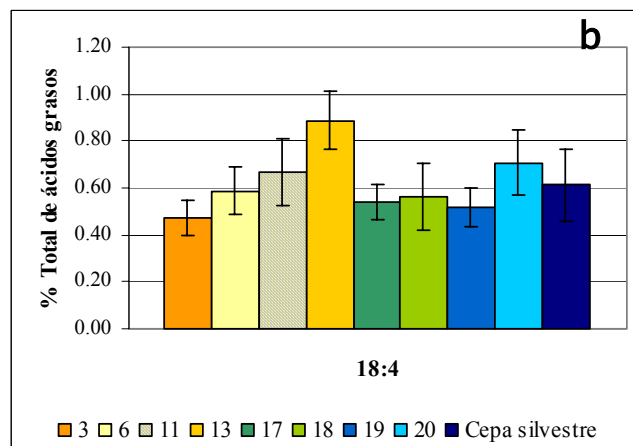
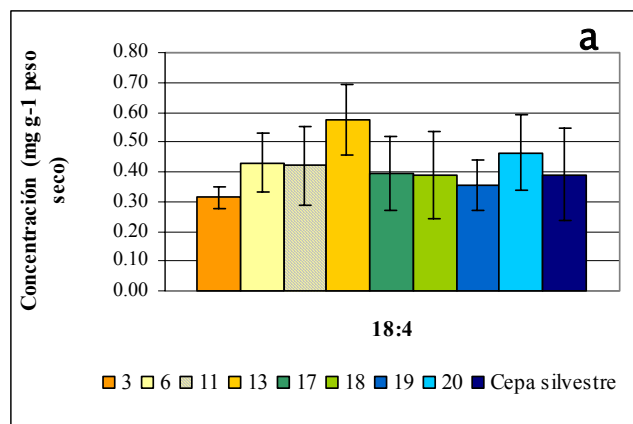


Figura 12. Comparación del 18:4 (ω-3) en *P. tricornutum*, (a) concentración y b) % del total de ácidos grasos) en las 8 diferentes cepas seleccionadas.

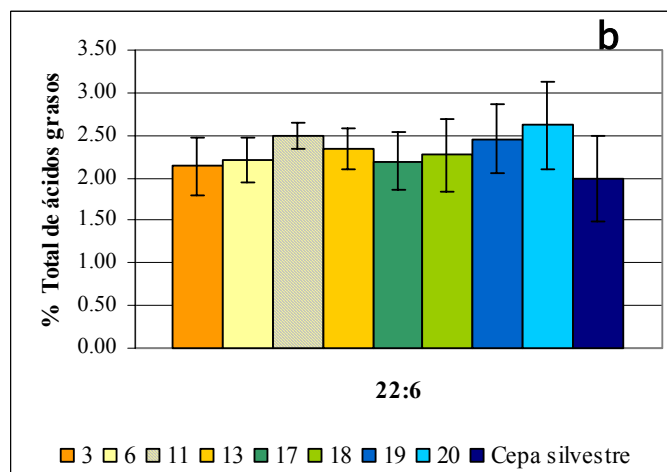
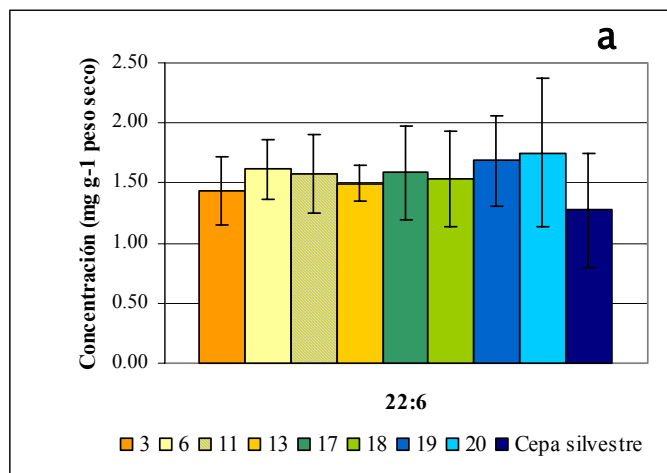


Figura 13. Comparación del 22:6 (ω -3) en *P. tricornutum*, (a) concentración y b) % del total de ácidos grasos) en las 8 diferentes cepas seleccionadas