

# INCREMENTO DEL CONTENIDO DE LÍPIDOS Y DE ÁCIDOS GRASOS POLIINSATURADOS DE UNA CEPA DE *Tetraselmis tetrathele* A TRAVÉS DE MUTACIÓN-SELECCIÓN

Roraysi Cortez, Miguel Guevara, Richard Bauza, Luis Freites, Diagnora Brito, Néstor Rosales y César Lodeiros

## RESUMEN

Con la finalidad de evaluar la mutación-selección como estrategia de mejoramiento genético, se sometió a la microalga *Tetraselmis tetrathele* a diferentes tiempos de exposición con el mutágeno etil metano sulfonato (EMS). Los posibles mutantes con acumulación incrementada de lípidos y ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) fueron seleccionados utilizando Quizalofop (100 µM), un inhibidor de la síntesis de lípidos. Dos cepas mutantes del alga (15c y 30a) fueron seleccionadas y comparadas con la cepa silvestre en cuanto a crecimiento, contenido de lípidos totales y PUFAs. El crecimiento de las cepas 15c y 30a fue similar ( $P > 0,05$ ) al de la cepa silvestre, con densidades celulares máximas de  $1,5 \times 10^6$ ,  $1,3 \times 10^6$  y  $1,5 \times 10^6$  células/ml, respectivamente. Los lípidos totales de las dos mutantes fueron 85

y 62%, respectivamente, superiores que los de la cepa silvestre ( $8,8 \pm 0,32\%$ ). Los contenidos de ácido araquidónico de las cepas 15c y 30a fueron 92 y 90%, respectivamente, más altos que los de la cepa silvestre (4,0%). Los valores de los ácidos eicosapentanoico y docosahexaenoico en los dos mutantes superaron en más de 25% a los obtenidos en la cepa silvestre. Los resultados demuestran la utilidad de la mutación-selección como estrategia para mejorar genéticamente a *T. tetrathele*, por ser una técnica ventajosa cuando se desconocen los mecanismos de regulación de los genes que participan en la biosíntesis del compuesto de interés o cuando las metodologías de mutagénesis sitio-dirigida y transgenia están poco desarrolladas, como es el caso de la mayoría de las microalgas.

## Introducción

En la acuicultura, las microalgas son esenciales por ser utilizadas como alimento vivo de moluscos y de estados larvarios de algunos crustáceos y peces, así como de especies zooplanctónicas intermedias, tipo rotíferos, artemias y copépodos (Cañizares *et al.*, 1995; Sánchez *et al.*, 2008). El uso de estos microorganismos en acuicultura está relacionado con el valor nutricional que poseen, especialmente referido al contenido de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA), entre éstos

los ácidos eicosapentanoico (EPA; 20:5n-3), docosahexaenoico (DHA; 22:6n-3) y araquidónico (ARA; 20:4n-6), los cuales incrementan la tasa de sobrevivencia de los organismos sometidos a cultivo (Izquierdo, 1996).

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

las exigencias de los demandantes, es decir, que sintetice los metabolitos de interés industrial o que supla las exigencias energéticas de los consumidores, en el caso de la acuicultura específicamente (Napolitano *et al.*, 1990; Cohen y Ratledge, 2005).

Además de las variaciones propias de cada especie, en las microalgas tienen lugar variaciones de su composición bioquímica como consecuencia de las fluctuaciones de algunos parámetros físico-químicos que condicionan sus cultivos (Tonon *et al.*, 2002). Diversos estudios han determinado que

las bajas concentraciones de nitrógeno producen un incremento en la proporción de lípidos totales y de ácidos grasos poliinsaturados en las microalgas, conjuntamente con una disminución del contenido proteico (Hu y Gao, 2006), mientras que las bajas temperaturas pueden incrementar la acumulación de PUFA (Renaud *et al.*, 2002; Teoh *et al.*, 2004). Por otro lado, se ha demostrado que altos valores de irradiancias (sin llegar a ser fotoinhibidores), así como altas concentraciones de nitrógeno y fósforo, favorecen la acumulación de proteínas y disminuyen la

## PALABRAS CLAVE / Ácidos Grasos / Lípidos / Mutación-Selección / *Tetraselmis tetrathele* /

Recibido: 25/02/2014. Modificado: 19/02/2015. Aceptado: 21/02/2014.

**Roraysi Cortez.** Master en Ciencias Marinas, Universidad de Oriente (UDO), Venezuela. Investigadora, Instituto Oceanográfico de Venezuela (IOV-UDO). e-mail: roraysi@yahoo.com

**Miguel Guevara.** Doctor en Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción, Chile. Profesor, IOV-UDO, Venezuela. Dirección: Instituto Oceanográfico de

Venezuela, Cumaná 6101, Venezuela. e-mail: miguevara2003@yahoo.es

**Richard Bauza.** Master en Ciencias Marinas, UDO, Venezuela. Investigador, Fundación para la Investigación y Desarrollo de la Acuicultura del Estado Sucre, Venezuela. e-mail: richardbauza@yahoo.es

**Luis Freites.** Doctor en Ciencias Biológicas, Universidad de

Santiago de Compostela, España. Profesor, IOV-UDO, Venezuela. e-mail: lfritesv@yahoo.es

**Diagnora Brito.** Doctora en Ciencias, Universidad Central de Venezuela. Profesora, UDO, Venezuela. e-mail: diagnorajb@yahoo.es

**Néstor Rosales.** Licenciado en Biología, M.Sc. en Microbiología y Estudiante de

Doctorado en Ingeniería, La Universidad del Zulia (LUZ), Venezuela. Profesor, LUZ, Venezuela. e-mail: nestoralgae@yahoo.com

**César Lodeiros.** Ph.D. en Ecología Aplicada, Université Laval, Canadá. Profesor, IOV-UDO, Venezuela. e-mail: clodeiro@sucre.udo.edu.ve

## INCREASE OF THE CONTENT OF LIPIDS AND POLYUNSATURATED FATTY ACIDS OF A STRAIN OF *Tetraselmis tetrathele* THROUGH MUTATION-SELECTION

Roraysi Cortez, Miguel Guevara, Richard Bauza, Luis Freites, Diagnora Brito, Néstor Rosales and César Lodeiros

### SUMMARY

The microalga *Tetraselmis tetrathele* was exposed to the mutagen ethyl methane sulfonate (EMS) in order to evaluate the mutation-selection as a strategy of genetic improvement. The possible mutants with increased accumulation of lipids and polyunsaturated fatty acids (PUFAs) were selected using Quizalofop (100 $\mu$ M), an inhibitor of lipid synthesis. Two mutant strains (15c and 30a) were selected and compared with the wild strain in its growth, contents of total lipids and PUFAs. Growth of the 15c and 30a mutants was similar ( $P > 0.05$ ) to that shown by the wild strain, with maximum cell density of  $1.5 \times 10^6$ ;  $1.3 \times 10^6$  y  $1.5 \times 10^6$  cells/ml, respectively. The total lipids of mutants 15c and 30a were 85 and 62%, respectively, higher

than the wild strain ( $8.8 \pm 0.32\%$ ). The contents of arachidonic acid for 15c and 30a strains were 92 and 90%, respectively, higher than the wild strain (4.0%). Eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid values measured in the two mutants exceeded by more than 25% to those obtained in the wild strain. The results demonstrate the usefulness of the mutation-selection as a strategy to genetically improve *T. tetrathele*, being an advantageous technique when unknown mechanisms of regulation of the genes involved in the biosynthesis of the compound of interest or when site-directed mutagenesis and transgenic methodologies are poorly developed, as it is the case with the majority of microalgae.

## AUMENTO DO TEOR LIPÍDICO E ÁCIDOS GRAXOS POLI-INSATURADOS DE UMA CEPA DE *Tetraselmis tetrathele* ATRAVÉS DE MUTAÇÃO-SELEÇÃO

Roraysi Cortez, Miguel Guevara, Richard Bauza, Luis Freites, Diagnora Brito, Néstor Rosales e César Lodeiros

### RESUMO

A fim de avaliar a mutação-seleção como a melhor estratégia de melhoramento genético, uma cepa da microalga *Tetraselmis tetrathele* foi submetida a diferentes tempos de exposição ao agente mutagênico etil metano sulfonato (EMS). Mutantes potenciais com aumento da acumulação de lipídeos e ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs) foram selecionadas utilizando Quizalofop (100 $\mu$ M), um inibidor da síntese de lipídios. Duas cepas mutantes da alga (15c e 30a) foram selecionadas e comparadas com a cepa selvagem em quanto seu crescimento, teor de lipídios totais e ácidos graxos poliinsaturados. O crescimento das mutantes 15c e 30a foi semelhante ( $P > 0,05$ ) ao mostrado pela cepa selvagem, com densidades máximas de células de  $1,5 \times 10^6$ ;  $1,3 \times 10^6$  y  $1,5 \times 10^6$  células/ml, respectivamente. Lipídeos totais das

mutantes foram 85 e 62%, respectivamente, maior do que na estirpe selvagem ( $8,8 \pm 0,32\%$ ). O conteúdo de ácido araquidônico das estirpes 15c e 30a foram de 92 e 90%, respectivamente, mais elevados que os da estirpe selvagem (4,0%). Os valores dos ácidos eicosapentaenóico e docosahexaenóico nos dois mutantes excedeu mais do que 25% de aqueles obtidos na estirpe selvagem. Os resultados demonstram a utilidade de mutação-seleção, como uma estratégia para melhorar geneticamente *T. tetrathele*, por ser uma técnica vantajosa quando os mecanismos de regulação dos genes envolvidos na via de biossíntese do composto de interesse são desconhecidos ou quando as metodologias por mutagênese dirigida y transgenia são pouco desenvolvidas, como é o caso para a maior parte das microalgas.

de los ácidos grasos (Abalde *et al.*, 1995).

La modificación de la composición bioquímica de las microalgas, además de realizarse a través de la variación de las condiciones de cultivo, también puede lograrse mediante el mejoramiento genético de cepas a través de mutagénesis inducida y posterior selección (López *et al.*, 1996). La mutagénesis inducida comenzó a hacerse popular a principios de los años 40 y, desde entonces, se ha utilizado principalmente en bacterias, hongos y microalgas (Alikhanian, 1962; Lian *et al.*, 2009; Cordero *et al.*, 2011; Zayadan *et al.*, 2014). Esta técnica es experimentalmente muy

simple, dado que no se requiere conocimiento previo de los genes involucrados en la biosíntesis del producto de interés (Gómez, 2002). Los métodos más empleados para inducir mutaciones incluyen agentes físicos (radiación UV, rayos X y gamma) y químicos (etilmetanosulfonato, EMS; metil metano sulfonato, MMS; nitrosoguanidina, NTG y etilnitrosourea, ENU) (Griffiths *et al.*, 2000).

En lo concerniente a los métodos de selección, éstos varían de acuerdo al tipo de mutantes que se desea aislar, teniendo en común el cultivo de mutantes en una condición inhibitoria respecto al atributo que se

pretende mejorar (Gómez, 2002). Así por ejemplo, para el aislamiento de mutantes con una incrementada capacidad de síntesis de PUFA se puede utilizar inhibidores de la síntesis de ácidos grasos como los herbicidas Cerulenina, Sethoxidim y Quizalofop, entre otros (Chatuverdi *et al.*, 2004).

Una de las especies de microalgas ampliamente utilizada en la acuicultura es *Tetraselmis tetrathele* (Godínez *et al.*, 2004). Es un fitoflagelado de 12-16 $\mu$ m, de color verde y alto valor nutricional, que consta de 1-8 flagelos móviles y de un cloroplasto en forma de copa. Es cosmopolita y su crecimiento óptimo está dentro de un

intervalo de temperatura de 16-20°C. Ha sido ampliamente utilizada en estudios bioquímicos (Ronquillo *et al.*, 1997) y en acuicultura como alimento para adultos y estadios larvarios de moluscos (Abalde *et al.*, 1995).

La composición química de *T. tetrathele* varía con la edad del cultivo y para obtener biomasa con altos contenidos de lipídios y de ácidos grasos poliinsaturados es necesario realizar cultivos bajo condiciones ambientales especiales, como lo son bajas temperaturas, altas irradiancias y/o limitación de nutrientes, lo cual ocasiona incremento en los costos de producción y disminución del

crecimiento poblacional de la especie. Basados en que *T. tetrathele* es de fácil manejo en el laboratorio, es usada como alimento en la acuicultura y aún no se conocen reportes de su mejoramiento genético, esta investigación planteó la evaluación de un programa de mutación-selección para incrementar su contenido de lípidos totales y ácidos grasos poliinsaturados.

## Materiales y Métodos

### *Cepa algal y condiciones de cultivo*

La microalga utilizada corresponde a una cepa de *Tetraselmis tetrathele* (West, G.S) Butcher, 1959 (BGAUDO-19), proveniente de la Universidad de Kagoshima, Japón, y mantenida en el Banco de Germoplasma Algal, Universidad de Oriente (BGAUDO), Venezuela, la cual fue sembrada en medio f/2 sólido (Guillard, 1975) con una concentración de nitrato de 3,6mM y se expuso a 22°C, 40µmoles·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup> de irradiancia y un fotoperíodo 12:12, con la finalidad de aislar un clon e iniciar cultivos clonales, los cuales fueron utilizados durante el desarrollo de toda la investigación. Estos cultivos, usados como el tipo silvestre (WT), se hicieron en volúmenes de 250ml en medio f/2 y agitación manual dos veces al día.

### *Sensibilidad de T. tetrathele al Quizalofop*

Se tomaron 5ml, por triplicado, del cultivo silvestre (WT) de *T. tetrathele* en fase de crecimiento exponencial, con una densidad celular de 50000 células/ml y fueron centrifugados (1000rpm, durante 10min). Los *pellets* resultantes fueron resuspendidos, separadamente, en 5ml de medio f/2 conteniendo diferentes concentraciones de Quizalofop (control (0), 50, 100, 150, 200, 400, 600, 800 y 1000µM) e incubados durante 24h a 25 ±1°C y una irradiancia continua de 100µmoles·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>. A continuación se evaluó la densidad celular a través del

conteo en cámara de Neubauer y se determinó el porcentaje de supervivencia con respecto al control, en cada concentración de Quizalofop. La concentración de Quizalofop que causó el menor porcentaje de supervivencia fue escogida para ser usada en la selección de los mutantes potencialmente mejorados en su contenido lipídico.

### *Mutagénesis y selección*

El etil metano sulfonato (EMS) fue utilizado como agente mutagénico, siguiendo recomendaciones de Chatuverdi *et al.* (2004). La metodología consistió en exponer 10ml del cultivo de la cepa WT en fase de crecimiento exponencial (7,5×10<sup>5</sup> células/ml, DO<sub>750</sub>=0,158) a diferentes concentraciones de EMS (0,1-0,3M) durante diferentes periodos de tiempo (15-105min) con la finalidad de seleccionar aquellas que produjeran menor tasa de supervivencia, lo cual garantiza un mejoramiento genético exitoso. Cada 15min, hasta completar 105min, se retiró 1ml del cultivo, se le agregó 1ml de tiosulfato de sodio (0,16M) para neutralizar el EMS y se centrifugó a 1000rpm, durante 10min.

El *pellet* resultante fue resuspendido en 1,5ml de medio f/2; luego, con la ayuda de un asa de siembra se dispersaron 100µl, por triplicado, en medio f/2 sólido servido en placas de Petri. Posteriormente las placas fueron colocadas en una cámara de crecimiento durante 20 días, a 22 ±1°C y una irradiancia continua de 50µmoles·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>. A continuación, se determinó el porcentaje de supervivencia para cada tiempo de exposición y concentración de EMS, con respecto a un cultivo control (no expuesto al EMS) por conteo de colonias, usando una lupa estereoscópica. De los tiempos de exposición y concentraciones de EMS que presentaron los menores porcentajes de supervivencia, se aislaron colonias y se cultivaron separadamente en 5ml de medio f/2, durante 15 días, a 25±1°C y una irradiancia continua de 50µmoles·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>.

Transcurridos los 15 días de cultivo, los clones con densidad celular similar al control fueron seleccionados y cultivados durante 20 días, a 25°C y una irradiancia continua de 100µmoles·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>, en medio f/2 que contenía la concentración de Quizalofop previamente seleccionada, con la finalidad de seleccionar mutantes potencialmente mejorados en su contenido de lípidos.

### *Crecimiento, lípidos totales, y ácidos grasos*

La cepa WT y los mutantes con mayor crecimiento poblacional en Quizalofop se cultivaron, por triplicado, de forma discontinua, con agitación manual dos veces al día, durante 20 días, a 23±1°C e irradiancia de 50µmoles·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>, fotoperíodo 12:12, utilizando matraces de vidrio de 500ml, los cuales contenían 250ml de agua de mar (37PSU) filtrada (papel Whatman GF/C 0,45µm), esterilizada en autoclave y fertilizada con el medio f/2 Guillard.

El recuento celular fue realizado diariamente en muestras fijadas con lugol al 1%, con la ayuda de una cámara de Neubauer de 0,1mm de profundidad y un microscopio binocular. Al final del ensayo se realizó la cosecha total, para lo cual se centrifugaron a 1000rpm, durante 10min, 10ml, por triplicado, de cada cultivo, por separado. Los *pellets* resultantes se mantuvieron a -80°C hasta la realización de los análisis de lípidos y ácidos grasos.

Los lípidos totales se determinaron mediante un ensayo cuantitativo basado en la carbonización (Marsh y Weinstein, 1966), previa extracción con la metodología descrita por Bligh y Dyer (1959). La esterificación de los ácidos grasos se realizó de acuerdo al método de Sato y Murata (1988), y los esteres metílicos resultantes fueron analizados por cromatografía de gases. Se utilizó un cromatógrafo de gases-espectrómetro de masas (HP 1800B) equipado con una columna omegawax TM 250 fused sílica (Supelco)

de 0,25mm×25m de largo. Los ésteres metílicos se identificaron mediante la comparación de los tiempos de retención de un patrón comercial de ésteres metílicos de ácidos grasos PUFA-3 (Sigma) y por comparación de los espectros de masa que generaron las muestras, con respecto a los espectros de masas contenidos en las bibliotecas NIST2000. Los resultados se expresaron en porcentaje con base al total de los ácidos grasos encontrados.

### *Análisis de los resultados*

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

## Resultados

La cepa de *Tetraselmis tetrathele* mostró alta sensibilidad al Quizalofop. Concentraciones de este herbicida superiores a 100µM ocasionaron mortalidades masivas de las células de esta microalga. Tomando en consideración que 100µM de Quizalofop produjo una tasa de supervivencia del 10% en *T. tetrathele* (Figura 1), se escogió esta concentración para seleccionar los mutantes con una posible capacidad de incremento de lípidos y ácidos grasos.

Concentraciones de EMS >0,1M fueron letales para las células de *T. tetrathele*. La supervivencia de las células de esta microalga expuestas a 0,1M de EMS disminuyó drásticamente a medida que aumentó el tiempo de exposición a este mutágeno (Figura 2). Después de 45min de exposición se observó una mortalidad total de las células. Los tiempos de exposición de 15, 30 y 45min ocasionaron porcentajes de supervivencia de 26, 22 y 21%, respectivamente. Cinco mutantes pertenecientes a cada uno de estos tiempos de exposición fueron aislados y

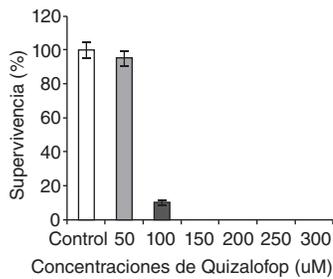


Figura 1. Efecto del Quizalofop sobre la tasa de supervivencia (promedio  $\pm$  desviación estándar) de *Tetraselmis tetrathele*.

cultivados como se indicó previamente. Después de 15 días de cultivo, la densidad celular de cada uno de los mutantes se comparó con la obtenida por la cepa WT. En la Figura 3 se observa que los mutantes 15c (células expuestas durante 15min a 0,1M de EMS), 30a (células expuestas durante 30min a 0,1M de EMS) y 45c (células expuestas durante 45min a 0,1M de EMS) mostraron las mayores densidades celulares, con valores de  $2,8 \times 10^6$ ;  $2,9 \times 10^6$  y  $1,7 \times 10^6$  células/ml, respectivamente, por lo cual fueron seleccionados para ser sometidos al tratamiento con Quizalofop.

Los tres mutantes seleccionados (15c, 30a y 45c) se cultivaron, como se indicó en la metodología, en medio f/2 conteniendo  $100 \mu\text{M}$  de Quizalofop. Todas las cepas mutantes y especialmente la cepa WT (murió a los 14 días de cultivo) fueron afectadas por la presencia del Quizalofop (Figura 4); sin embargo, las cepas 15c y 30a presentaron un mayor crecimiento,

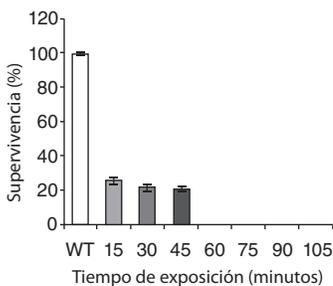


Figura 2. Efecto del tiempo de exposición a  $0,1\text{M}$  de EMS sobre la tasa supervivencia (promedio  $\pm$  desviación estándar) de *Tetraselmis tetrathele*.

lo cual demuestra su alta resistencia a este herbicida y, por esta razón fueron escogidas-seleccionadas para los análisis de lípidos y ácidos grasos.

El crecimiento, medido como máximas densidades celulares y tasas de crecimiento instantáneo de las cepas mutantes 15c y 30a, y la WT (Figura 5) no mostró diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre ellas. Las mayores densidades celulares alcanzadas por estas cepas fueron  $1,5 \times 10^6$ ;  $1,3 \times 10^6$  y  $1,5 \times 10^6$  células/ml, respectivamente. La tasa de crecimiento instantánea (K) fue de  $0,5 \pm 0,08$  div/día.

El pH de los cultivos se mantuvo entre 7,5 y 8,8.

Los contenidos de lípidos totales y ácidos grasos de la cepa WT y los mutantes seleccionados se muestran en la Tabla I. Los lípidos totales de los mutantes 15c y 30a fueron 85 y 62%, respectivamente, más altos ( $p < 0,05$ ) en comparación con la cepa WT ( $P = 0,000$ ;  $F_s = 149,08$ ).

Las cepas mutantes también presentaron mayores ( $p < 0,05$ ) contenidos de ARA ( $P = 0,0003$ ;  $F_s = 39,77$ ), EPA ( $P = 0,0115$ ;  $F_s = 10,31$ ) y DHA ( $P = 0,0208$ ;  $F_s = 7,90$ ) que la cepa

WT. Los contenidos de ARA de las cepas 15c y 30a fueron 92 y 90%, respectivamente, superiores a los de la cepa WT. Los valores de EPA y DHA cuantificados en los dos mutantes superaron en más de un 25% a los obtenidos en la cepa WT.

## Discusión

El programa de mutación-selección, como técnica de mejoramiento genético de *Tetraselmis tetrathele*, permitió obtener dos mutantes de esta cepa con un contenido incrementado de lípidos totales y de PUFA. Dichos mutantes han mantenido esta condición durante dos años en medios carentes de Quizalofop, lo cual es indicativo de la ausencia de reversiones espontáneas capaces de restaurar el fenotipo silvestre (Van Der Meer y Zhang, 1988).

La mutación inducida con mutágenos químicos, como estrategia para incrementar el contenido de lípidos y PUFA no ha sido documentada en *T. tetrathele*, por lo cual la presente investigación es un aporte novedoso.

Al igual que con *T. tetrathele*, esta metodología también ha permitido mejorar genéticamente a otras microalgas. Así, el contenido de lípidos y PUFA pudo ser incrementado significativamente, por ejemplo, en *Nannochloropsis* por Chatuverdi *et al.* (2004), Doan y Obbard (2012) y Anandarajah *et al.* (2012), en *Rhodomonas salina* por Guevara (2011), en *Chlorella pyrenoidosa* por Zayadan *et al.* (2014).

La efectividad del EMS como mutágeno se debe a la actuación de este compuesto como agente alquilante; es decir, agrega un grupo etilo a la guanina, produciendo O-6-etilguanina, el cual se aparee con la timina, en lugar de la citosina. Por lo tanto, produce una transición C:G a T:A. De igual manera, puede agregar un grupo etilo a la timina y se produce 4-etilamina, para luego aparearse con la guanina, lo cual conduce a la transición T:A a C:G (Pierce,

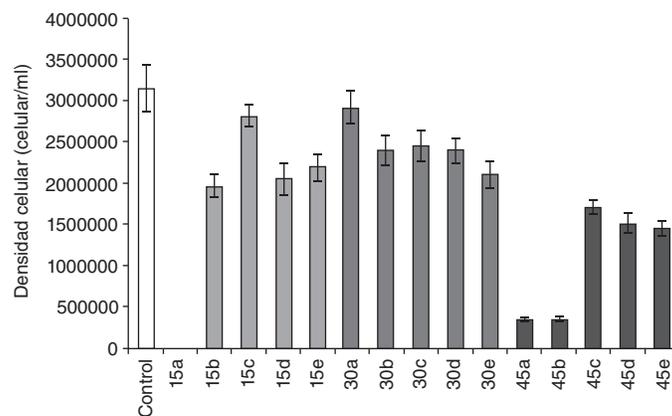


Figura 3. Densidades celulares (promedio  $\pm$  desviación estándar) de los mutantes seleccionados después de 15 días de cultivo en medio f/2, bajo una irradiación continua de  $50 \mu\text{moles} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  y a  $23^\circ\text{C}$ .

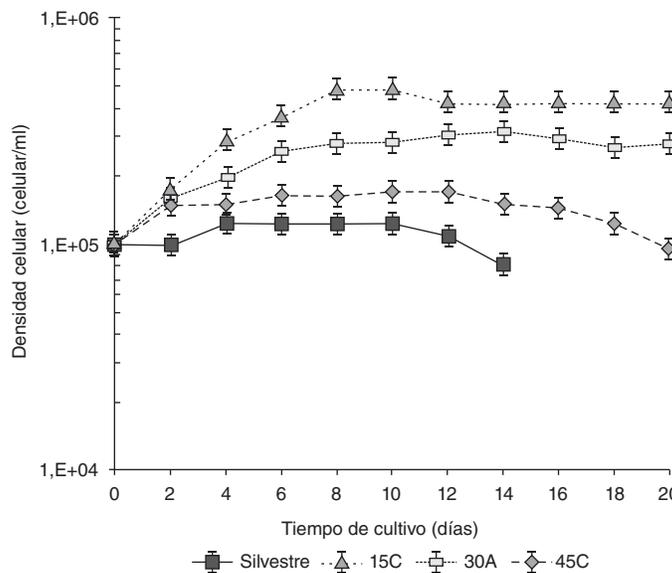


Figura 4. Crecimiento (promedio  $\pm$  desviación estándar) de los mutantes (15c, 30a y 45c) y la cepa WT (silvestre) de *Tetraselmis tetrathele* en medio f/2 con Quizalofop ( $100 \mu\text{M}$ ).

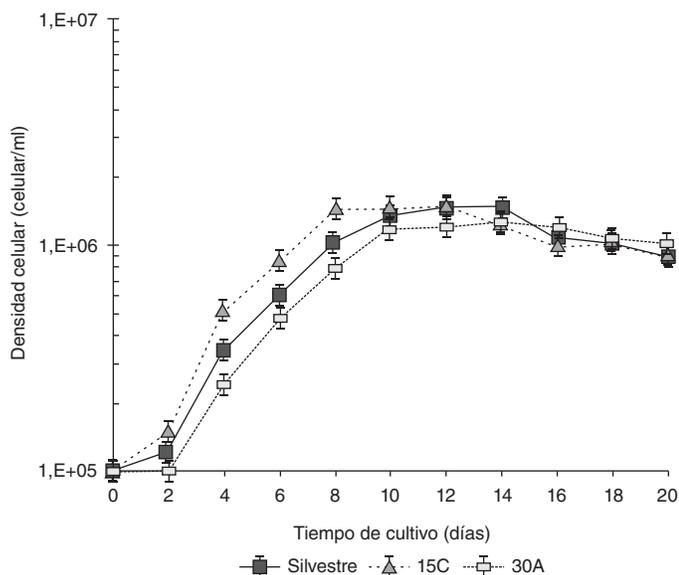


Figura 5. Crecimiento (promedio  $\pm$  desviación estándar) de los mutantes (15c y 30a) y WT (silvestre) de *Tetrastelmis tetrahele* en medio f/2 durante 20 días a  $23 \pm 1^\circ\text{C}$  e irradiancia de  $50 \mu\text{moles}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  con fotoperiodo 12:12.

TABLA I  
PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS  
(% DEL TOTAL DE LOS ÁCIDOS GRASOS)  
DE LAS CEPAS WT Y MUTANTES (15C Y 30A)  
DE *Tetrastelmis tetrahele*

EMAG	Silvestre	15c	30a
14:00	12,1 $\pm$ 0,85	11,4 $\pm$ 0,91	11,0 $\pm$ 0,88
15:00	6,5 $\pm$ 0,59	5,7 $\pm$ 0,39	5,9 $\pm$ 0,35
16:00	12,0 $\pm$ 0,84	11,2 $\pm$ 0,67	11,1 $\pm$ 0,82
18:00	5,7 $\pm$ 0,34	6,4 $\pm$ 0,51	6,2 $\pm$ 0,42
20:00	3,1 $\pm$ 0,15	2,6 $\pm$ 0,18	2,7 $\pm$ 0,15
$\Sigma$ Saturados	39,4	37,3	36,9
16:1n-9	15,3 $\pm$ 1,37	13,1 $\pm$ 0,75	13,7 $\pm$ 0,69
18:1n-9	3,7 $\pm$ 0,12	2,9 $\pm$ 0,14	3,4 $\pm$ 0,11
20:1n-11	0,4 $\pm$ 0,02	0,3 $\pm$ 0,01	0,4 $\pm$ 0,02
22:1n-9	0,2 $\pm$ 0,01	0,2 $\pm$ 0,01	0,2 $\pm$ 0,01
$\Sigma$ Monoinsaturados	19,6	16,5	17,7
18:2n-6	6,5 $\pm$ 0,48	5,8 $\pm$ 0,40	6,0 $\pm$ 0,61
18:3n-3	6,6 $\pm$ 0,72	10,3 $\pm$ 0,90	9,2 $\pm$ 0,83
20:3n-3	1,6 $\pm$ 0,11	1,2 $\pm$ 0,072	1,4 $\pm$ 0,05
20:4n-6 ARA	4,0 $\pm$ 0,36 <sup>a</sup>	7,7 $\pm$ 0,62 <sup>b</sup>	7,6 $\pm$ 0,59 <sup>c</sup>
20:5n-3 EPA	7,6 $\pm$ 0,65 A	10,0 $\pm$ 0,94 B	10,2 $\pm$ 0,89 C
22:2n-6	1,8 $\pm$ 0,11	1,8 $\pm$ 0,13	1,5 $\pm$ 0,16
22:5n-3	8,0 $\pm$ 0,73	3,3 $\pm$ 0,13	3,3 $\pm$ 0,14
22:6n-3 DHA	4,7 $\pm$ 0,42 A	5,9 $\pm$ 0,47 B	6,1 $\pm$ 0,36 C
$\Sigma$ Poliinsaturados	40,8	46,0	45,3
n-3	28,5	30,7	30,2
n-6	10,5	13,5	13,6
DHA/EPA	0,61	0,6	0,6
Lípidos totales	8,8 $\pm$ 0,32 A	16,3 $\pm$ 0,81 B	14,3 $\pm$ 0,39 C

EMAG: ésteres metílicos de ácidos grasos; A, B, C: letras diferentes en una misma fila indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ).

2006). Estudios en diversos organismos, incluyendo microalgas han demostrado la eficiencia del EMS como un

mutágeno, principalmente por las transiciones de G:C a A:T, lo cual indica que la O-6-etilguanina es la primera

causa de mutaciones *in vivo* (Eisenstadt, 1987; Chatuverdi *et al.*, 2004).

Los contenidos de PUFA (ARA, EPA y DHA) mostrados por las cepas mutantes en el presente estudio superan a los referidos para la cepa silvestre de *T. tetrahele* por De la Peña y Villegas (2005) y Farhadian *et al.* (2009). La ventaja de los cultivos de las cepas mutantes sobre las cepas silvestres es que no necesitan de condiciones de cultivo extremas (altas o muy bajas temperaturas e irradiancias, deficiencia de nutrientes, entre otros) para acumular altos contenidos de PUFA.

Los altos contenidos de PUFA (DHA: 6%, ARA: 8% y EPA: 10%) en los mutantes de *T. tetrahele* los catalogan como idóneos para la acuicultura. Numerosos estudios han demostrado el requerimiento de 1% de DHA en la dieta para el normal desarrollo de larvas de peces y crustáceos (Sargent *et al.*, 1989; Takeuchi *et al.*, 1996; Farhadian *et al.*, 2009). Además, varios investigadores han señalado la importancia del ARA y el EPA en la nutrición de larvas de peces, dado que fortifican el sistema inmune y disminuyen la tasa de mortalidad producto del estrés de las labores de cultivo (Bell y Sargent, 2003; Chávez *et al.*, 2005).

Otro criterio considerado en la acuicultura para la selección de dietas es la relación DHA/EPA. A juicio de Naessens *et al.* (1995), las dietas con una relación DHA/EPA entre 0,5-1,5 producen un mayor crecimiento y supervivencia de larvas de camarones. En el presente estudio la relación DHA/EPA fue de 0,6; lo cual puede sugerir la efectividad de los mutantes de *T. tetrahele* como posibles alimentos de camarones.

Los resultados obtenidos en esta investigación demostraron la utilidad de la mutación-selección como estrategia para mejorar genéticamente a *T. tetrahele*. Esta técnica posee ventajas cuando se desconocen los mecanismos de regulación de los genes que participan en la ruta de biosíntesis del

compuesto de interés o cuando las metodologías de mutagénesis sitio-dirigida y transgenia están poco desarrolladas, como es el caso de la mayoría de las microalgas.

#### AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Consejo de Investigación de la Universidad de Oriente, Venezuela, por el financiamiento del Proyecto 'Caracterización del Crecimiento Poblacional y Composición Bioquímica de Ocho Microalgas Marinas como Alimento para Larvas de la Ostra Perla *Pinctada imbricata*, Röding 1798 (Mollusca: Pteridae), CI. 02-030603-178512.

#### REFERENCIAS

- Abalde J, Cid A, Fidalgo P, Torres E, Herrero C (1995) *Microalgas: Cultivo y Aplicaciones*. Universidad de la Coruña. España. 210 pp.
- Alikhanian S (1962) Induced mutagenesis in the selection of microorganisms. *Adv. Appl. Microbiol.* 4: 1-50.
- Anandarajah K, Mahendrapuram G, Sommerfeld M, Hua Q (2012) Characterization of microalga *Nannochloropsis* sp. mutants for improved production of biofuels. *Appl. Energ.* 96: 371-377.
- Bell J, Sargent J (2003) Arachidonic acid in aquaculture feeds: current status and future opportunities. *Aquaculture*, 218: 491-499.
- Bligh E, Dyer W (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37: 911-917.
- Cañizares R, Molina G, Domínguez A (1995) Composición química de dos microalgas marinas utilizadas como alimento en maricultura. *Cryptogam. Algal.* 15: 121-133.
- Chatuverdi R, Rao S, Amin M, Fujita Y (2004) Isolation of quinoxalofop-resistant mutants of *Nannochloropsis oculata* (Eustigmatophyceae) with high eicosapentanoic acid following N-methyl-Nnitrosourea-induced random mutagenesis. *J. Appl. Phycol.* 16: 135-144.
- Chávez D, Ogata H, Garibay E, Sollesta H, Tibubos K, Furuita H (2005) Improved diets by arachidonic acid supplementation and squid meal in fry production of tropical fish. En *Studies on Sustainable Production Systems of Aquatic*

- Animals in Brackish Mangrove Areas*. Abstracts Book. JIRCAS. Japan. 21: 7-8.
- Cohen Z, Ratledge C (2005) *Single Cell Oils*. AOCS Press. Urbana, IL, EEUU. 248 pp.
- Cordero B, Obraztsova I, Couso I, Leon R, Vargas M, Rodriguez H (2011) Enhancement of lutein production in *Chlorella sorokiniana* (Chlorophyta) by improvement of culture conditions and random mutagenesis. *Mar. Drugs* 9: 1607-1624.
- De la Peña M, Villegas C (2005) Cell growth, effect of filtrate and nutritive value of the tropical Prasinophyte *Tetraselmis tetrahele* (Butcher) at different phases of culture. *Aquacult. Res.* 36: 1500-1508.
- Doan T, Obbard J (2012) Enhanced intracellular lipid in *Nannochloropsis* sp. via random mutagenesis and flow cytometric cell sorting. *Alg. Res.* 1: 17-21.
- Eisenstadt E (1987) Analysis of mutagenesis. En Neidhardt FC (Ed.) *Escherichia coli and Salmonella typhimurium. Cellular and Molecular Biology*. American Society for Microbiology. Washington, DC, EEUU. pp. 1016-1033.
- Farhadian O, Yuso F, Mohamed S (2009) Nutritional values of *Apocyclops dengizicus* (Copepoda: Cyclopoida) fed *Chaetoceros calcitrans* and *Tetraselmis tetrahele*. *Aquacult. Res.* 40: 74-82.
- Godínez D, Gallo M, Gelabert R, Díaz A, Gamboa J, Landa V, Godínez E (2004) Crecimiento larvario de *Artemia franciscana* (Kellogg, 1906) alimentada con dos especies de microalgas vivas. *Zootec. Trop.* 22: 265-276.
- Gómez P (2002) *Carotenogénesis y Polimorfismo Genético en Cepas Chilenas y Extranjeras de la Microalga Dunaliella salina Teodoresco (Chlorophyta). Aproximaciones a su Mejoramiento Genético*. Tesis Universidad de Concepción, Chile. 103 pp.
- Griffiths A, Gelbart W, Millar J, Lewoting R (2000) *Genética Moderna*. McGraw-Hill Interamericana. Madrid, España. 676 pp.
- Guevara M (2011) *Optimización de las Condiciones de Cultivo y Mejoramiento Genético como Estrategias para Incrementar el Valor Nutricional de Rhodomonas salina (Wislouch) Hill y Wetherbee (1989) (Cryptophyta) como Alimento para la Acuicultura*. Tesis. Universidad de Concepción. Chile. 94 pp.
- Guillard R (1975) Culture of Phytoplankton for feeding marine invertebrates. En Smith WL, Chanley MH (Eds.) *Culture of marine invertebrate animals*. Plenum. Nueva York, EEUU. pp. 29-60.
- Hu H, Gao K (2006) Response of growth and fatty acid compositions of *Nannochloropsis* sp. to environmental factors under elevated CO<sub>2</sub> concentration. *Biotechnol. Lett.* 28: 987-992.
- Izquierdo M (1996) Essential fatty acid requirements of cultured marine fish larvae. *Aquacult. Nutr.* 2: 183-191.
- Lian M, Huang H, Ren L, Ji X, Zhu J, Jin L (2009) Increase of docosahexaenoic acid production by *Schizochytrium* sp. through mutagenesis and enzyme assay. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 159: 547-556.
- López D, Castillo C, Grima E, Cohen Z (1996) First insights into improvement of eicosapentaenoic acid content in *Phaeodactylum tricornerutum* (Bacillariophyceae) by induced mutagenesis. *J. Phycol.* 32: 339-345.
- Marsh J, Weinstein D (1966) Simple charring method for determination of lipids. *J. Lip. Res.* 7: 574-592.
- Naessens E, Wouters R, Cobo M, Vargas V, Pedrazzoli A, Van Hauwaert A, Lavens P (1995) Effect of n-3 HUFA and DHA/EPA ratio in enriched live feed on fatty acid composition and culture performance of *Penaeus vannamei* larvae. En *Fish and Shellfish Larviculture Symposium. Spec. Publ. Eur. Aquacult. Soc.* 24: 213-216.
- Napolitano E, Ackman R, Ratnayake W (1990) Fatty acid composition of three cultured algal species (*Isochrysis galbana*, *Chaetoceros gracilis* and *Chaetoceros calcitrans*) used as food for bivalve larvae. *J. World Aquacult. Soc.* 37: 22-30.
- Pierce B (2006) *Genética. Un Enfoque Conceptual*. 2ª ed. Médica Panamericana. México. 720 pp.
- Renaud S, Luong-Van T, Lambrinidis G, Parry D (2002) Effect of temperature on growth, chemical composition and fatty acid composition of tropical microalgae grown in batch cultures. *Aquaculture* 211: 195-214.
- Richmond A (2004) *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*. Blackwell. Oxford, UK. 566 pp.
- Ronquillo J, Matias J, Saisho T, Yamasaki S (1997) Culture of *Tetraselmis tetrahele* and its utilization in the hatchery production of different penaeid shrimps in Asia. *Hidrobiology* 358: 237-244.
- Sánchez H, Morales J, Vargas J, Oliveros R (2008) Producción de la microalga *Nannochloropsis oculata* (Droop) Hibberd en medios enriquecidos con ensilado biológico de pescado. *Ecol. Aplic.* 149-158.
- Sargent J, Henderson R, Tocher D (1989) *The Lipids in Fish Nutrition*. Academic Press. Nueva York, EEUU. pp. 153-218.
- Sato N, Murata N (1988) Membrane lipids. *Meth. Enzimol.* 167: 251-259.
- Sokal R, Rohlf F (1995) *Biometry*. Freeman. Nueva York, EEUU. 887 pp.
- Takeuchi T, Masuda R, Ishizaki Y, Watanabe T, Kanematsu M, Imaizumi K, Tsukamoto K (1996) Determination of the requirement of larval striped jack for eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid using enriched *Artemia* nauplii. *Fish. Sci.* 62: 760-765.
- Teoh M, Chu W, Marchant H, Phang S (2004) Influence of culture temperature on the growth, biochemical composition and fatty acid profiles of six Antarctic microalgae. *J. Appl. Phycol.* 16: 421-430.
- Tonon T, Harvey D, Larson T, Graham A (2002) Long chain polyunsaturated fatty acid production and partitioning to triacylglycerols in four microalgae. *Phytochemistry* 61: 15-24.
- Van Der Meer J, Zhang X (1988) Similar unstable mutations in three species of *Gracilaria* (Rhodophyta). *J. Phycol.* 24: 198-202.
- Zayadan B, Purton S, Sadvakasova A, Userbaeva A, Bolatkhan K (2014) Isolation, mutagenesis, and optimization of cultivation conditions of microalgal strains for biodiesel production. *Russ. J. Plant Physiol.* 61: 124-130.