

ANÁLISIS DEL GENOMA DE *PYCNOPORUS CINNABARINUS* MEDIANTE ELECTROFORESIS DE CAMPO PULSADO.

Victor Cifuentes & Claudio Martínez

Laboratorio de Genética. Departamento de Ciencias Ecológicas.

Facultad de Ciencias. Universidad de Chile.

Las Palmeras 3425. Casilla 653. Santiago. Chile.

Palabras claves: Electroforesis de campo pulsado. DNA cromosómico intacto. *Saccharomyces cerevisiae*, *Schwanniomyces occidentalis*, *Pycnoporus cinnabarinus*.

Key words: Pulse field electrophoresis. Intact chromosomal DNA, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schwanniomyces occidentalis*. *Pycnoporus cinnabarinus*.

RESUMEN

En el presente trabajo se describe la separación óptima de moléculas de DNA cromosómico intacto del hongo filamentoso *Pycnoporus cinnabarinus*, mediante electroforesis de campo pulsado usando un sistema de contorno de campo eléctrico homogéneo (CHEF), con un electrodo hexagonal.

Se estudió una serie de condiciones experimentales en las cuales se hizo variar la duración del intervalo de tiempo en cada dirección del campo y el tiempo total de la corrida.

De esta manera fue posible separar el DNA cromosómico de *P. cinnabarinus* en cuatro bandas que, dependiendo de las condiciones de electroforesis, pueden ser resueltas por lo menos en siete bandas. Utilizando los patrones de migración del DNA cromosómico de *Saccharomyces cerevisiae* y *Schwanniomyces occidentalis* como estándar, estimamos que los tamaños moleculares del DNA cromosómico de *P. cinnabarinus* oscilan entre 1.9 y 2.5 megabases (Mb).

INTRODUCCION

La separación de moléculas de DNA por electroforesis en geles de agarosa convencionales, ha sido muy utilizada con una resolución práctica que está limitada a un rango de tamaño de las moléculas de DNA entre 40 y 50 kb. Cuando es necesario separar moléculas de mayor tamaño, surgen una serie de problemas, muchos derivados de las características de migración de dichas moléculas a través de la matriz del gel agarosa. Recientemente, se han desarrollado varios métodos de

SUMMARY

[Genome analysis of *Pycnoporus cinnabarinus* by pulse field gel electrophoresis]

In the present work we describe the separation of intact chromosomal DNA of the filamentous fungus *Pycnoporus cinnabarinus* by pulse field gel electrophoresis using a contour-clamped homogeneous electric field system with an hexagonal electrode.

A series of experimental conditions were, studiedd changing pulse, time duration and/or voltage, or pulse time intervals of electric field and total running time.

It was possible to separate *P. cinnabarinus* chromosomal DNA in four bands and these bands could be further resolved in at least seven, changing the electrophoretic conditions. Using intact chromosomal DNA from *Saccharomyces cerevisiae* and *Schwanniomyces occidentalis* as molecular size standards, we were able to estimate that the molecular sizes of *P. cinnabarinus* chromosomal DNA molecules were between 1.9 to 2.5 Mb.

electroforesis que utilizan campos eléctricos que varían de acuerdo a ciertos intervalos de tiempo (pulsos). Estos métodos de electroforesis de campo pulsado (PFGE) que han sido desarrollados por Schwartz et al, 1984; Chu et al, 1986 y Carle et al, 1984, utilizan campos invertidos (FIGE), ortogonales (OFAGE), homogéneos (CHEF), o bien usan sistemas de geles rotatorios (Gekeler et al, 1989), lográndose con ellos una mejor resolución de las moléculas.

Dicha técnica ha permitido obtener información respecto de la organización genómica de muchos eu-

cariontes inferiores tales como *Saccharomyces cerevisiae* (Carle et al, 1985), *Schizosaccharomyces pombe* (Smith et al. 1987) *Aspergillus nidulans* (Brody et al, 1989), *Kluyveromyces lactis* (Sor et al, 1989) *Candida albicans* (Vollrath et al, 1987), *Neurospora crassa* (Orbach et al. 1988) y *Phytophthora megasperma* (Howlet, 1989), permitiendo además obtener una forma alternativa al cariotipo clásico, el cual es difícil de realizar en estos organismos.

La eficiencia de separación de las moléculas de DNA cromosómico de gran tamaño mediante electroforesis de campo pulsado en geles de agarosa, depende de varios factores, uno de los cuales es la duración de los pulsos en cada dirección del campo eléctrico.

En el presente trabajo, presentamos resultados de experimentos de electroforesis de campo pulsado de contorno homogéneo (CHEF), utilizando DNA cromosómico intacto de *S. cerevisiae*, *Schw.occidentalis* y *P. cinnabarinus*, que permiten obtener alta resolución en la separación de dichas moléculas, a través de cambios en la duración de los pulsos y en el voltaje de corrida de la electroforesis.

MATERIALES Y METODOS

Cepas:

En este estudio se utilizó *P.cinnabarinus* cepa Pc 58, aislado de carpóforos colectados en bosques de *Notofagus dombeyi* de Chile Austral. Dicha cepa está ingresada en la colección de hongos del laboratorio de Genética de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile. *S.cerevisiae* cepa AB 1380 (Carle et al, 1986), proporcionada por el Dr. M.V. Olson, St. Louis, M.O. U.S.A. *Schw. occidentalis* (ATCC 26077) obtenida del American Type Culture Collection, Washington D.C., U.S.A.

Condiciones de cultivo:

P. cinnabarinus fue cultivado a 30°C en medio Vogel (Vogel, 1956), que ha sido modificado bajando la concentración de nitrógeno a 1/3 de la composición estándar y suplementado con 0,2% de extracto de malta, 0,1% de extracto de levadura, 10 mg/ml de tiamina, 0,4% de glucosa (Cifuentes et al, 1990). Cuando fué necesario, el medio se solidificó agregándole, agar al 2%. Para obtener esporas, la cepa Pc58 fue sembrada en placas Petri con medio PC sólido e incubadas durante 8 días a 30°C. Para recolectar las esporas se añadió 5 ml de agua destilada estéril a la superficie del cultivo y luego se las resuspendió utilizando un rastrillo de vidrio. Los restos de micelio fueron removidos pasando la suspensión de esporas por un filtro de tres capas de gasa estéril.

S. cerevisiae y *Schw.occidentalis*, fueron cultivadas a 30°C en medio YEP (Extracto de levadura 1%, bacto-

peptona 2% glucosa 2%) con agitación constante.

Preparación de DNA cromosómico intacto:

DNA cromosómico intacto de *S.cerevisiae* y *Schw. occidentalis* fue preparado por el método descrito por Schwartz et al, 1984. DNA cromosómico intacto de *P.cinnabarinus* fue preparado por un método de molde de agarosa (Schwartz et al, 1984) a 37°C, modificado según Cifuentes et al, 1990. Para ello 10¹⁰ esporas fueron germinadas en medio PC durante 4 horas en un agitador rotatorio a 120 rpm. Luego fueron lavadas dos veces con EDTA 50 mM, pH 7.5, resuspendidas en 500 ul de EDTA 50 mM, pH 7.5. resuspendidas en 500 ul de EDTA 50 mM pH 7.5. DNA cromosómico fue preparado en los moldes de agarosa (Schwartz et al 1985; Cifuentes et al 1990).

Electroforesis de campo pulsado:

La electroforesis de campo pulsado fue realizada en un equipo de electroforesis Pulsaphor plus LKB, usando un electrodo hexagonal (LKB cat. 2015-203). Los geles fueron preparados con 130 ml de agarosa al 0.8% en tampón TBE 0.1 M pH 7.5, en placas cuadradas de 15 x 15 cm (LKB). Para la corrida electroforética se utilizó tampón TBE 0.1 M pH 7.5, el cual fue reemplazado cada 48 horas para las electroforesis de largo tiempo de duración. La temperatura del gel y del tampón de electroforesis fue mantenida a 14°C y con circulación constante del tampón. Para cargar las muestras de DNA, los moldes de agarosa portadores del DNA cromosómico fueron ajustadas en los pocillos del gel con ayuda de espátulas estériles. Las condiciones de voltaje, tiempo de cada pulso y tiempo de corrida de las electroforesis son descritas en los resultados. Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio (1 ug/ml) durante 60 minutos y luego desteñidos con agua destilada durante 10 minutos.

RESULTADOS Y DISCUSION

La Figura 1 muestra los resultados de electroforesis de campo pulsado del DNA cromosómico intacto de las levaduras *S. cerevisiae* y *Schw.occidentalis*, en los cuales se utilizó tres condiciones diferentes. La Figura 1A muestra los resultados donde el DNA fue sujeto a electroforesis a 150 volts durante 40 horas utilizando un pulso de 45 segundos en cada dirección del campo eléctrico (Condición 1). Claramente se observa separación de los cuatro cromosomas más pequeños (I, VI, III y IX) de *S. cerevisiae*, cuyos tamaños corresponden a 245, 290, 370 y 460 kb respectivamente. El resto de los cromosomas de mayor tamaño aparecen como una sola banda que migra lentamente. El DNA cromosómico

de *Schw. occidentalis*, es de alto peso molecular y en tales condiciones migra como una sola banda cuya posición es similar a los cromosomas más grandes de *S. cerevisiae*. La Figura 1B corresponde a un experimento donde las muestras fueron sujetas a electroforesis a 180 volts durante 40 horas con pulsos de 60 segundos (Condición 2). En esta condición, se logró además separar una banda adicional que no aparece en el caso anterior y corresponde a un doblete en el que se ubican los cromosomas VIII y V de *S. cerevisiae*, cuyos tamaños moleculares son 580 y 630 kb respectivamente. La Figura 1C muestra los resultados de un experimento donde las muestras fueron sujetas a una electroforesis a 200 volts durante 40 horas con pulsos que cambiaban la dirección del campo eléctrico cada 80 segundos (Condición 3). En estas condiciones se aumentó la resolución de las muestras de DNA cromosómico de *S. cerevisiae*, observándose cuatro bandas extras que corresponden a los cromosomas XI, X, XIV y II de *S. cerevisiae* cuyos tamaños son de 700, 770, 800 y 850 kb respectivamente. Además, es claramente discernible el comienzo de la separación de los cromosomas de *Schw. occidentalis*, donde se visualizan al menos cuatro bandas cuyos tamaños oscilan entre 1.3 y 2.8 Megabases (Mb) (1300 y 2800 kb). De esta manera podemos observar que con sólo aumentar la duración del pulso que cambia la dirección del campo eléctrico, se pueden separar moléculas de DNA de tamaño entre 245 y 850 kb.

La figura 2 muestra los resultados de experimentos de electroforesis de campo pulsado donde se cambian los pulsos o los tiempos totales de corrida. La figura 2A corresponde a una electroforesis a 150 volts con pulsos de 100 segundos del DNA de *S. cerevisiae*, corrida durante 40 horas (Condición 4). Se observa un patrón de resolución del DNA cromosómico de *S. cerevisiae* similar al mostrado en la figura 1 C. Sin embargo, se puede ver claramente la aparición de una banda extra que corresponde a un doblete, donde se ubican los cromosomas XIII y XVI de la levadura, cuyos tamaños son de 945 kb y 1020 kb (1.02 Mb.). La Figura 2 B corresponde a una electroforesis a 150 volts con pulsos de 100 segundos corrida durante 62 horas (Condición 5). En dicha condición se puede observar que el DNA cromosómico de *S. cerevisiae* se resuelve en 13 bandas, de las cuales 3 corresponden a dobletes, y constituyen el cariotipo electroforético de *S. cerevisiae* (16 cromosomas). Además se puede observar que los cromosomas de *Schw. occidentalis* se separan al menos en 5 bandas donde se ubican sus 8 cromosomas. La Figura 2 C, corresponde a una electroforesis a 150 volts con pulsos de 120 segundos durante una corrida de 64 horas. Claramente se observa la separación de los cromosomas de mayor tamaño de *S. cerevisiae*. Sin embargo se han perdido los 4 cromosomas más pequeños que han

salido del gel de agarosa. En estas condiciones se pueden resolver moléculas de DNA cuyos tamaños varían entre 580 y 2.500 kb.

En una serie de experimentos adicionales, examinamos la influencia del largo de los intervalos de tiempo de la dirección del campo eléctrico o duración del pulso, en relación al tamaño molecular del DNA. Para ello se realizaron experimentos de separación del DNA de alto peso molecular mediante electroforesis de campo pulsado, realizados cambiando la duración del pulso, voltaje, o el tiempo total de corrida. Los resultados fueron analizados mediante un gráfico de la distancia de migración versus el tamaño molecular. Para tales experimentos se utilizó DNA cromosómico intacto de *S. cerevisiae* como estándar. Posteriormente se estudió el comportamiento de DNA de gran tamaño para lo cual se utilizó DNA cromosómico de *Schw. occidentalis* y *P. cinnabarinus*. Los resultados de tales experiencias se muestran en la Figura 3. La Figura 3 A, representa los resultados de la separación de los cromosomas de *S. cerevisiae* (migración en mm) en relación a su tamaño molecular (megabases) en función de la duración del pulso. Claramente puede ser observado que a medida que aumenta la duración del pulso de dirección del campo eléctrico, se logra una mejor resolución de los cromosomas de mayor tamaño. Las curvas 1,2,3 y 4 de la figura 3 A corresponden a pulsos de 45,60,80 y 100 segundos respectivamente, corridas a un promedio de 170 volts. La Figura 3 B, muestra resultados de experimentos de electroforesis de campo pulsado donde se aumentó la duración de los pulsos y la duración del tiempo total de electroforesis. La curva 1 corresponde a pulsos de 100 segundos durante 62 horas de electroforesis. La curva 2 a pulsos de 120 segundos durante 64 horas de electroforesis. La curva 3 a pulsos de 120 segundos durante 90 horas de electroforesis y la curva 4 a pulsos de 120 segundos durante 120 horas de electroforesis. Los resultados indican que a medida que aumenta la duración del pulso y la duración total de la electroforesis, se logra una mejor separación de las moléculas de mayor tamaño. Posteriormente se diseñó un experimento donde se realizó una combinación de las condiciones anteriores sometiendo al DNA a electroforesis con una gradiente de pulsos y voltajes. Estos resultados se muestran en la curva 5 de la Figura 3 B. Las condiciones de electroforesis fueron: pulsos de 150 segundos durante 80 horas a 180 volts, luego pulsos de 180 segundos durante 30 horas a 150 volts y finalmente pulsos de 210 segundos durante 40 horas a 120 volts, correspondiendo a un tiempo total de electroforesis de 150 horas. Se observa buena resolución de las bandas que corresponden a DNA de gran tamaño, como lo son los cromosomas de *P. cinnabarinus*, mostrados como puntas de flechas en la Figura 3 B. En la curva 5 de la

Figura 3 B se logró separar al menos 7 bandas cuyos tamaños corresponden a 2.5, 2.3, 2.2, 1.9, 1.8, 1.7 y 1.6 Mb (bandas I,II,III,IV,V,VI y VII) respectivamente. Las bandas I,II,IV, corresponden a dobletes, de acuerdo a análisis densitométricos de la intensidad de fluorescencia de negativos de fotografías de los geles después de su tinción con bromuro de etidio. Experimentos posteriores que utilizan condiciones similares en las cuales se han aumentado los pulsos, nos han permitido elaborar un cariotipo electroforético de este basidiomicete y nos sugieren que su genoma está constituido por al menos 10 cromosomas cuyos tamaños han sido mejor precisados y varían entre 1.9 y 2.5 Mb. Estos últimos valores corresponden a aquellos que son más confiables de acuerdo a la cantidad de veces en que se realizó dichos experimentos y a las condiciones de corrida de la electroforesis que dan variaciones tal como se ha descrito para otros organismos (Vollrath et al, 1987).

Los resultados mostrados en el presente trabajo entregan información clara y precisa que permite, mediante experimentos de electroforesis de campo pulsado, separar moléculas de DNA de gran tamaño. Se ha utilizado el DNA cromosómico intacto de *S. cerevisiae* para establecer las condiciones óptimas de separación de las moléculas de DNA con un rango de tamaño entre 245 y 2500 kb, correspondiente a los cromosomas I y XII respectivamente. *S. cerevisiae* posee 16 cromosomas que son separados en 13 bandas claramente definidas según las condiciones de electroforesis utilizadas. Tres de estas bandas corresponden a dobletes, esto es, dos cromosomas tienen la misma migración y dan origen a bandas más gruesas. De esta manera, los cromosomas VII y V co-migran, dando origen a un doblete cuya posición corresponde a tamaños moleculares de 580 y 630 kb. Los cromosomas VII y XV co-migran dando origen a un doblete que corresponde a tamaños moleculares de 1.12 y 1.2 Mb. Por otro lado, mediante estos procedimientos, fué posible separar los cromosomas de *Schwanniomyces* en 6 bandas, 2 de las cuales aparecen como dobletes, indicando que dicha levadura tiene al menos 8 cromosomas, Cromosoma VIII con un tamaño de 2.5 Mb, cromosomas VI y VII (doblete) con tamaño de 2.1 Mb, cromosoma V con tamaño de 1.7 Mb, cromosoma IV y III (doblete con tamaños de 1.55 Mb, cromosoma II con tamaño de 1.45 Mb y cromosoma I con un tamaño de 1.1 Mb.

Se ha logrado además, estudiar la composición genómica del basidiomicete *P. cinnabarinus*, del cual se tiene escaso o nulo conocimiento genético, permitiendo tener una estimación de su número de cromosomas, que de acuerdo a nuestros resultados correspondería aproximadamente a 10 cromosomas. Las estimaciones de sus tamaños moleculares descritos anteriormente,

deben ser considerados como tentativas, puesto que no se dispone de marcadores de peso molecular para el rango completo de tamaños de los cromosomas de este hongo. Sin embargo, el uso de cromosomas de *Schw. occidentalis* (8 cromosomas) y *S. cerevisiae* (16 cromosomas), soluciona en parte dicho problema. De acuerdo a nuestros resultados, los cromosomas de mayor tamaño de *Schw. occidentalis* se estima sean de 2.5 Mb (cromosoma VIII), 2.1 Mb (cromosomas VI y VII) y 1.7 Mb (cromosoma V). Las moléculas de DNA de *P. cinnabarinus* migran en posiciones equivalentes a los cromosomas VIII y V de *Schwanniomyces* y en posiciones que corresponden a los cromosomas XII y IV de *S. cerevisiae*. Esto indica que los 10 cromosomas de *P. cinnabarinus* pueden contener DNA en un rango de tamaño entre 2.5 y 1.9 Mb. En base a estos datos, y de acuerdo a las movilidades electroforéticas del DNA cromosómico de *P. cinnabarinus*, se puede estimar que el tamaño de su genoma podría fluctuar entre 25 a 30 Mb. Dicho valor cae dentro del rango de tamaño genómico esperado para un hongo basidiomicete.

PROYECCIONES

La separación de moléculas de DNA de tamaños superiores a los 100 kb, mediante la electroforesis de campo pulsado, ha permitido elaborar cariotipos electroforéticos de diferentes organismos, principalmente hongos.

La aplicación de esta técnica al análisis taxonómico de hongos, permitirá resolver problemas que aún se mantienen. De hecho en *Kluyveromyces*, se ha logrado aclarar algunos de tales aspectos, llegándose a establecer que *Candida macedoniensis*, considerada un anamorfó de *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus*, y este último, muestran patrones cromosómicos y de DNA mitocondrial similares en ambas especies (Sor et al. 1989).

Por otro lado, la electroforesis de campo pulsado tiene enormes aplicaciones en la caracterización de hongos y levaduras industriales. De tal manera, dichos procedimientos han sido utilizados en el análisis de los cromosomas de levaduras industriales, tanto cerviceras, de panificación, de producción de vinos y otras (Pedersen, 1988; Tuite et al. 1991; Bidden et al. 1992; Ono et al. 1988), permitiendo detectar polimorfismos cromosómicos en tales cepas.

La utilización de la electroforesis de campo pulsado en el análisis cromosómico de hongos nativos, cuya posición taxonómica esté en discusión, permitirá un avance rápido y significativo en el conocimiento de la biología de tales organismos.

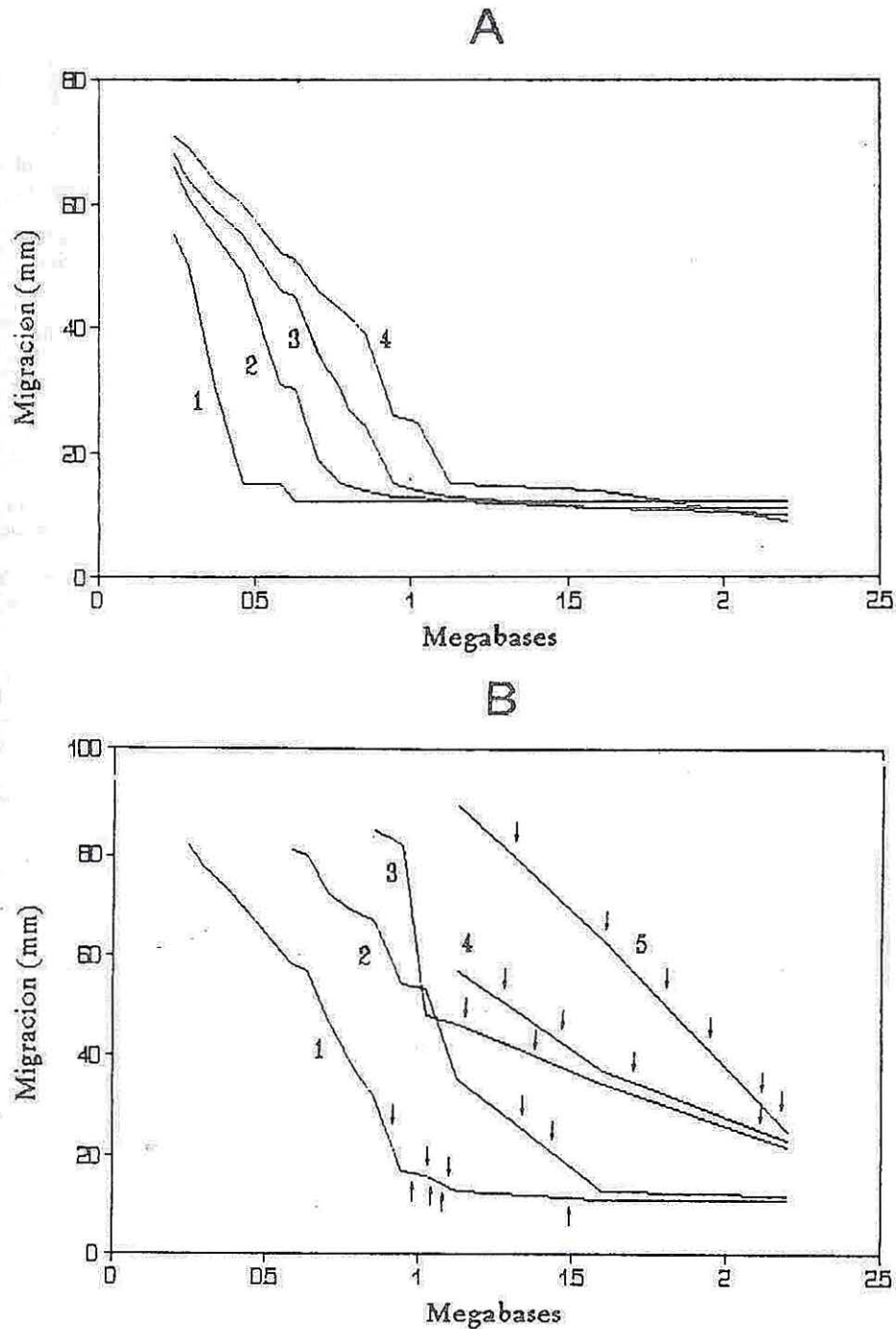


Figura 3. Distancia de migración como una función del tamaño cromosómico y el efecto del largo del pulso de tiempo de la dirección del campo eléctrico. A) Las curvas 1, 2, 3 y 4 corresponden a pulsos de 45, 60, 80 y 100 segundos respectivamente, corridas a 170 volts durante 48 horas a 10°C . B) Los pulsos han sido aumentados: Curva 1. Pulsos de 100 segundos a 180 volts durante 62 horas; Curva 2: Pulsos de 120 segundos a 150 volts durante 64 horas; Curva 3: Pulso de 120 segundos a 150 volts durante 90 horas; Curva 4: Pulsos de 120 segundos a 150 volts durante 80 horas; Curva 5: Condición mixta, pulso de 150 segundos a 180 volts durante 80 horas, luego pulsos de 180 segundos a 150 volts durante 48 horas y finalmente pulsos de 210 segundos a 120 volts durante 40 horas. Las flechas bajo las curvas representan la posición de las bandas de DNA cromosómico de *P. cinnabarinus* en cada experimento. Las curvas fueron construidas en base a los cromosomas de *S. cerevisiae* y *Schw. occidentalis*, utilizados como marcadores de tamaño molecular (en Megabases)

REFERENCIAS

- Adams, J., Puskas-Rozsa, S., Simlar, J. and Wilke, C.M. (1992) Adaptation and major chromosomal changes in populations of *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* 22 : 13-19
- Bakalinsky, A.T. & Snow, R. (1990). The chromosomal constitution of wine strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 6 : 367-382
- Bidenne, C., Blondin, B., Dequim, S. & Vezinhet, F. (1992). Analysis of the chromosomal DNA polymorphism of wine strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* 22 : 1-7
- Brody, H. & Carbon, J. (1989). Electrophoretic karyotype of *Aspergillus nidulans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 : 6260-6263
- Carle, G. F.; Frank, M. & Olson, M. V. (1986). Electrophoretic separation of large DNA molecules by periodic inversion electric field. *Science* 232 : 65-68
- Carle, G.F. & Olson, M.V. (1984). Separation of chromosomal DNA molecules from yeast by orthogonal-field-alternation gel electrophoresis. *Nucl. Acids. Res.* 12 : 5647-5664
- _____ (1985). An electrophoretic karyotype for yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82 : 3756-3760
- Cifuentes, V.; Martínez, C. & Pincheira, G. (1990). A method for the preparation of intact chromosomal DNA of *Pycnoporus cinnabarinus*. *Fungal Genet. Newslet.* 37: 12-13.
- Chu, G.; Vollrath, D. & Davis, R.W. (1986). Separations of large DNA molecules by contour-clamped homogeneous electric fields. *Science* 234 : 1582-1585
- Gekeler, V., Weger, S., Eichele, E. & Probst, H. (1989). Computer-controlled discontinuous rotating gel electrophoresis for separation of very large DNA molecules. *Anal. Biochem.* 181 : 227-233
- Howlett, B. J. (1989). An electrophoretic karyotype for *Phytophthora megasperma*. *Experimental Mycol.* 13 : 199-202
- Ono, B. & Ishino-Arao, Y. (1988). Inheritance of chromosome length polymorphisms in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* 14 : 413-418
- Orbach, M., Vollrath, D. P., David, R. & Yanofsky, C. (1988). An electrophoretic karyotype of *Neurospora crassa*. *Mol. Cell. Biol.* 8 : 1469-1479
- Pedersen, M. B. (1988). The use of nucleotide sequence polymorphisms and DNA karyotyping in the identification of brewer's yeast strains and in microbiological control. In *Beer Analysis*. Eds. H.F. Linskens and J. F. Jackson. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. New York. pp. 180-194
- Rank, G. H., Casey, G.P., Xiao, W. & Pringle, A. T. (1991). Polymorphism within the nuclear and 2 μ m genomes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* 20 : 189-194
- Schwartz, D.C. & Cantor, C.R. (1984). Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulse field gradient gel electrophoresis. *Cell* 37 : 67-75
- Smith, C. L.; Matsumoto, T.; Niwa, O. Klco, S.; Fan, J.; Yanagida, M. & Cantor, C.R. (1987). An electrophoretic karyotype for *Schwanniomyces pombe* by pulsed field gel electrophoresis. *Nucl. Acids Res.* 15 : 4481-4489
- Sor, F. & Fukahara, H. (1989). Analysis of chromosomal DNA patterns of the genus *Kluyveromyces*. *Yeast* 5 : 1-10
- Tuite, M. F. & Oliver, S. G. (1991). *Biochemical techniques. In Saccharomyces*. Eds. M. F. Tuite and S. G. Oliver. Plenum Press. N.Y. pp. 283-320
- Vollrath, D. & Davis, R. W. (1987). Resolution of DNA molecules greater than 5 Megabases by contour-clamped homogeneous electric fields. *Nucl. Acids Res.* 15 : 7865-7875
- Vogel, H. J. (1956). A convenient growth medium for *Neurospora*. *Microbiol. Genet. Bull.* 13 : 42-43

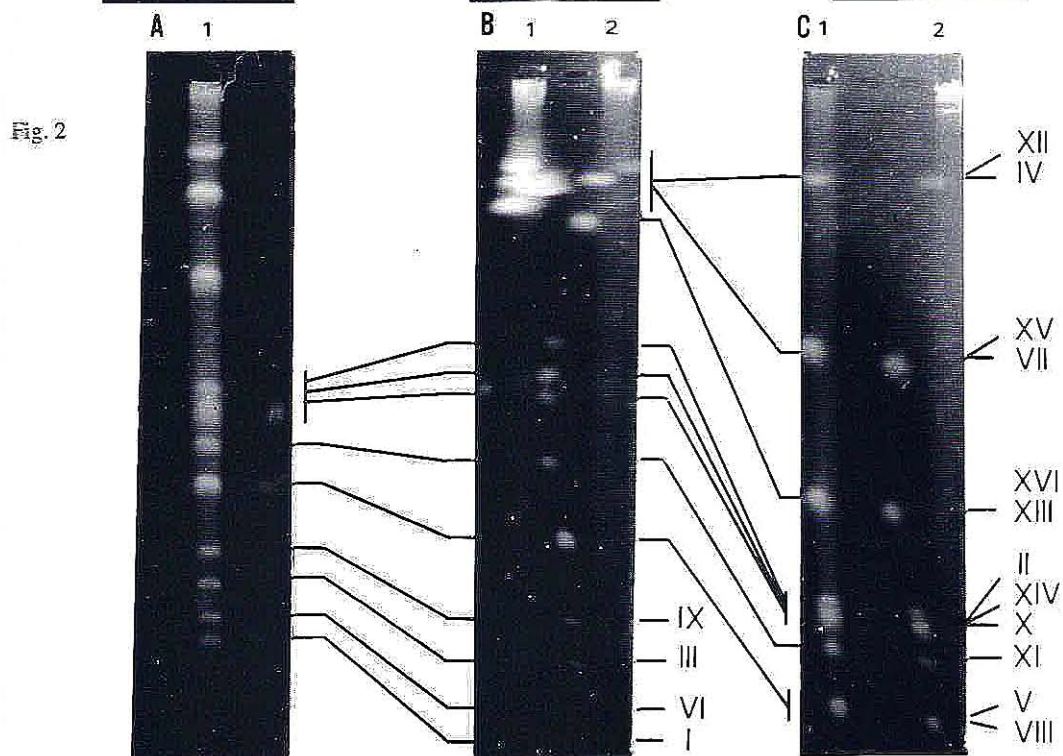
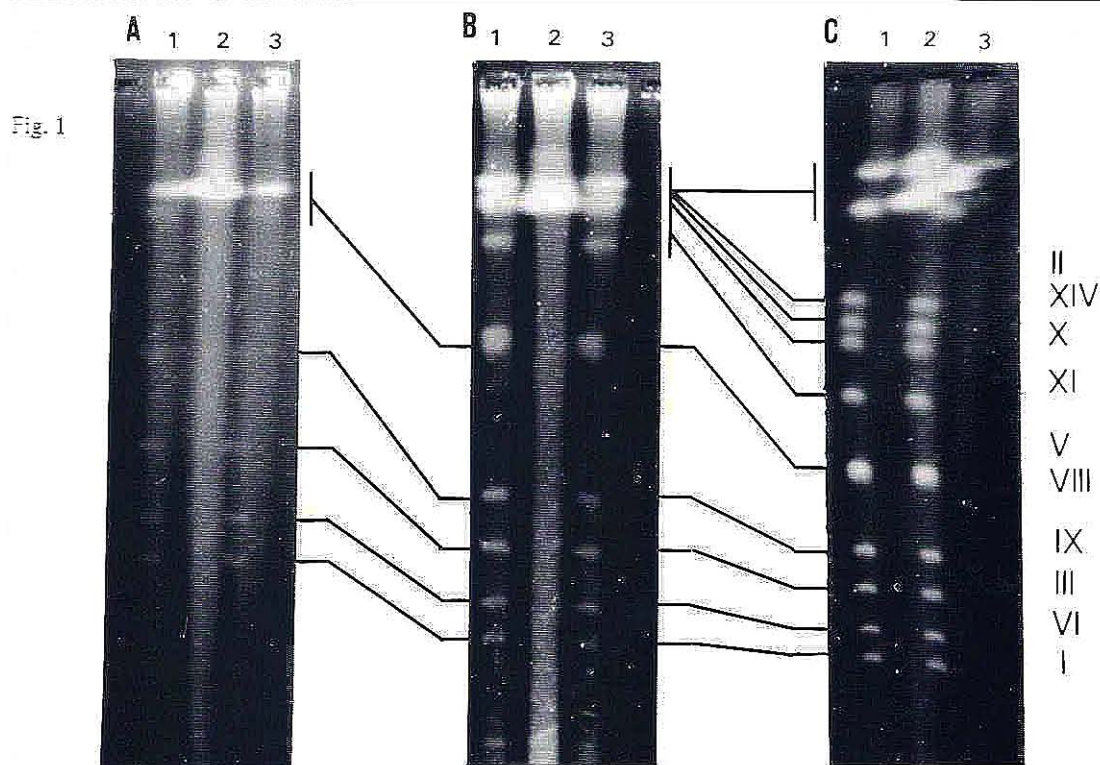


Figura 1. Electroforesis de campo pulsado del DNA cromosómico de *S. cerevisiae* y *Schw. occidentalis* en varias condiciones. A. Pulso de 45 segundos, 170 volts durante 40 horas. B. Pulso de 60 segundos, 180 volts durante 40 horas. C. Pulso de 80 segundos, 200 volts durante 40 horas. La electroforesis fue realizada en gels de agarosa al 0,8% en TBE 0.1 M de dimensiones de 15 x 15 cm, como se describe en materiales y métodos, usando un aparato Pulsaphor plus LKB

Figura 2. Separación del DNA cromosómico intacto de gran tamaño de *S. cerevisiae* y *Schw. occidentalis*, mediante electroforesis de campo pulsado. A. Pulso de 100 segundos, 150 volts durante 40 horas. B. Pulso de 100 segundos, 150 volts durante 62 horas. C. Pulsos de 120 segundos, 150 volts durante 64 horas. Las electroforesis fueron realizadas como se describen en Materiales y Método y en Figura 1.