

UCH-FC
MAG-B
S678
C.I

**Análisis de actividad antimicrobiana y presencia de
elementos genéticos del tipo dsRNA en levaduras
antárticas**

Tesis

**Entregada ala
Universidad de Chile
en cumplimiento parcial de los requisitos
para optar al Grado de**

Magíster en Ciencias Biológicas

Facultad de Ciencias

Por

Gabriel Socías Esquivel

Abril, 2017

Director de Tesis: Dr. Marcelo Baeza Cancino

FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACION

TESIS DE MAGÍSTER

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Magister presentada por el candidato:

Gabriel Alejandro Socías Esquivel

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias Biológicas, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día viernes 27 de enero del 2017.

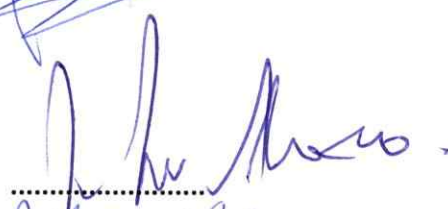
Director de Tesis:

Dr. Marcelo Baeza Cancino

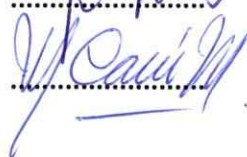


Comisión de Evaluación de la Tesis

Dra. Jennifer Alcaíno Gorman



Dra. Margarita CarúMarambio



A mi familia...

BIOGRAFÍA



Nací el 26 de Junio de 1990 en la ciudad de Santiago. Hijo de Verónica Esquivel y Francisco Socías, y hermano de Alvaro Socías. Estudié en el colegio Stella Maris en la comuna de El Bosque durante toda mi enseñanza básica y media, terminando esta última en el año 2008 con promedio 6,9. Siempre me gustó la biología y las ciencias básicas por lo que en el año 2009 ingresé a Bachillerato en Ciencias Naturales y Exactas en la Universidad de Chile, donde aclaré algunas dudas y opté por estudiar la carrera de Ingeniería en Biotecnología Molecular, en la cual fui aprobado con distinción en el año 2015. Actualmente soy parte del programa de Magíster de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile y tengo pensado dedicarme a la docencia para enseñar a otros lo bello de la biología.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a las personas que de una u otra forma me han ayudado a cerrar esta etapa académica. En primer lugar a mi familia y en especial a mi madre por el apoyo incondicional durante todo este proceso y por siempre confiar en mí.

A mi tutor Marcelo Baeza, por guiarme y apoyarme durante gran parte de esta etapa y por ser no sólo un profesor, sino también un colega y amigo. A los profesores Víctor Cifuentes y Jennifer Alcaíno, por permitirme ser parte de este hermoso grupo de trabajo. A todo el laboratorio de Genética y en especial a Dony y Salva por toda la ayuda y sobre todo por su amistad, jamás habría terminado esta tesis si no fuera por ustedes.

Finalmente, agradezco a mis amigos y compañeros Yassef, Ernesto, Claudio, JP y Pame, quienes hicieron que este proceso fuera mucho más grato y a mis amigos Matías, Diego, Emilio, Lucas, Alex, Christopher y Marcos con quienes comparto cada semana ya sea en la cancha jugando básquetbol o jugando Xbox en casa. Gracias por todo el apoyo.

ÍNDICE

ÍNDICE	v
ÍNDICE DE TABLAS.....	vii
INDICE DE FIGURAS.....	viii
RESUMEN	ix
ABSTRACT.....	xii
INTRODUCCIÓN.....	1
Toxinas Killer.....	3
Sistema killer y su asociación con virus de dsRNA.....	5
Aplicaciones de las levaduras killer y sus toxinas.....	8
HIPÓTESIS.....	11
OBJETIVOS.....	12
MATERIALES Y MÉTODOS	13
Materiales.....	13
Métodos.....	16
RESULTADOS	25
Actividad antimicrobiana.....	25
Actividad antimicótica bajo diferentes condiciones.....	27
a. Efecto del pH sobre la actividad killer.....	28
b. Efecto de la concentración salina sobre la actividad killer	30
c. Efecto de la temperatura sobre la estabilidad de la toxina killer	31
Purificación de Proteínas.....	33
Análisis de dsRNA	41
RT-PCR con partidores específicos.....	42
Primer Walking.....	47
DISCUSIÓN	51
Actividad antimicrobiana.....	51

Actividad killer bajo diferentes condiciones.....	51
Análisis de dsRNAs.....	53
CONCLUSIÓN.....	56
BIBLIOGRAFÍA.....	57
ANEXO.....	61
1. Actividad de las muestras bajo diferentes condiciones de pH sobre un césped de <i>Cr. gastricus</i>	61
2. Actividad de las muestras bajo diferentes condiciones de pH sobre un césped de <i>Rh. laryngis</i>	61
3. Actividad de las muestras bajo diferentes condiciones de concentración salina sobre un césped de <i>Rh. laryngis</i>	61
4. Actividad de las muestras bajo diferentes condiciones de temperatura sobre un césped de <i>Leuconeurospora sp1</i>	62
5. Actividad de las muestras bajo diferentes condiciones de temperatura sobre un césped de <i>Rh. laryngis</i>	62
6. Amplicones obtenidos por RT-PCR mediante el uso de partidores específicos.....	63
7. Secuencias obtenidas a partir de los dsRNAs de <i>M. psychrophila</i>	64
8. Secuencias obtenidas a partir de los dsRNAs de <i>X. dendrorhous</i> M13-3.....	65

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Ensayos cruzados de actividad antimicótica	10
Tabla 2. Bacterias y levaduras utilizadas.....	13
Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo.....	15
Tabla 4. Ensayo de actividad antimicrobiana a partir de colonias.....	25
Tabla 5. Identidad de los péptidos obtenidos por el método de huella peptídica	40
Tabla 6. Tamaño de las moléculas de dsRNA presentes en levaduras antárticas	42
Tabla 7. Tamaño de los fragmentos obtenidos mediante RT-PCR con partidores específicos. ..	43
Tabla 8. PCR en gradiente de temperatura con hexanucleótidos de secuencia aleatoria.	46
Tabla 9. Identidad de las secuencias obtenidas a partir de los dsRNAs de <i>M. psychrophila</i> , <i>X. dendrorhous</i> M13-3, <i>S. salmonicolor</i> y <i>M. gelida</i>	47
Tabla 10. Identidad de las secuencias obtenidas a partir de los dsRNAs de <i>M. psychrophila</i> mediante primer walking.....	50

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de replicación de un virus killer y de su virus "helper"	3
Figura 2. Efecto del pH sobre la actividad killer	29
Figura 3. Efecto de la concentración salina sobre la actividad killer	30
Figura 4. Efecto de la temperatura sobre la estabilidad de la toxina killer	32
Figura 5. Perfil proteico y actividad de las fracciones obtenidas mediante filtros de corte.....	34
Figura 6. Cromatograma y radio de halo de muerte	36
Figura 7. Perfil proteico de las fracciones obtenidas por cromatografía de exclusión molecular a partir de <i>W. anomalus</i> y <i>C. parapsilosis</i>	37
Figura 8. Perfil proteico y actividad de las muestras purificadas	39
Figura 9. Amplicones de PCR de las muestras de dsRNA de <i>M. psychrophila</i> y de <i>X. dendrorhous</i> M13-2 y M13-3 purificados mediante GeneClean.....	45
Figura 10. Amplificados de PCR de las muestras de <i>M. psychrophila</i> con partidores divergentes y hexanucleótidos de secuencia aleatoria, purificados por GeneClean.....	48
Figura 11. Alineamiento de las secuencias obtenidas con los virus L1A y L1B de <i>X. dendrorhous</i>	50

RESUMEN

El continente antártico es el hábitat de una gran variedad de microorganismos, entre los cuales se incluyen las levaduras. Debido a las condiciones extremas de este ecosistema, los microorganismos están sometidos a una fuerte competencia para obtener acceso a los recursos del medio, por lo que las levaduras han desarrollado estrategias que le confieren una ventaja con respecto a sus competidores. Una de las estrategias desarrolladas por estos microorganismos es la producción de proteínas antimicrobianas capaces de matar a bacterias o a otras levaduras. Este fenómeno ha sido ampliamente reportado en levaduras mesófilas pero sabemos muy poco sobre esta actividad en levaduras de origen antártico y de ambientes fríos en general. La actividad antimicótica de levaduras, conocida como actividad killer, fue descubierta en el año 1963 en una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* la cual era capaz de secretar proteínas con la capacidad de matar a células sensibles de igual o relacionado género sin un contacto directo célula-célula. Este fenómeno es muy frecuente en levaduras y representa un mecanismo de competición por interferencia. Las bases genéticas de este fenotipo son variables y la toxina puede estar codificada por genes nucleares como también por elementos genéticos extracromosómicos. Todas las toxinas killer descritas son producidas óptimamente durante la fase de crecimiento exponencial y en general tienen un perfil de actividad a pH bajo. Durante las últimas décadas, las

levaduras killer han sido de utilidad en diferentes áreas, entre las cuales destacan la industria fermentativa para la producción de pan, vino y cerveza, y en medicina, para el tratamiento de infecciones causadas por hongos en animales y humanos.

En trabajos previos, se analizó la existencia del fenotipo killer en 24 especies de levaduras antárticas, determinando que sólo nueve de ellas presentan este fenotipo, entre las cuales destacaron las levaduras *Wickerhamomyces anomalus* y *Candida parapsilosis* por su gran espectro de acción y por la generación de halos de muerte de gran tamaño, con respecto a la actividad presentada por el resto de las levaduras. En el presente trabajo, se analizó la capacidad de las levaduras antárticas para matar a algunas bacterias y levaduras de importancia médica, determinando que sólo la levadura *C. parapsilosis* presenta actividad antimicrobiana contra la bacteria *Klebsiella geyteca*. Además, se analizó la actividad de las muestras de extractos proteicos de las levaduras *W. anomalus* y *C. parapsilosis*, determinando que estas son mayormente activas en un rango de pH bajo, de entre 4,6 y 5,0, y que toleran concentraciones de sal de hasta un 0,1%, ya que concentraciones superiores a esto resultan inhibitorias. También se determinó que ambas muestras de extractos proteicos toleran un tratamiento térmico de 100°C por 1 h y mediante técnicas de purificación de proteínas se encontró que la actividad se relaciona a una sola proteína de 53 kDa para la muestra proveniente de *W. anomalus* y de 46 kDa para la muestra proveniente de *C. parapsilosis*. En paralelo a esto, se analizó la existencia de moléculas del tipo dsRNA en una colección de 41 cepas antárticas y mediante caracterización enzimática con

nucleasa S1, DNasa I y RNasa A, se identificó la presencia de este tipo de moléculas en siete cepas de levaduras. Las moléculas fueron analizadas mediante análisis bioinformático a partir de sus secuencias determinando la identidad de algunas de ellas.

ABSTRACT

The Antarctic continent is the habitat of a wide variety of microorganisms, such as the yeasts. Due to the extreme conditions in this ecosystem, microorganisms are subjected to a strong competence to have access to the environmental resources, for which the yeasts have developed strategies to have an advantage against competitors. The main strategy is the production of antimicrobial proteins which can kill bacteria or yeast. This phenomenon has been widely reported in mesophilic yeasts but very little is known about this activity in yeast from Antarctica and from other cold environments. The killer activity was discovered in 1963 in a *Saccharomyces cerevisiae* strain that was able to secrete toxic proteins, that killed sensitive cells of the same or related genus without direct cell to cell contact. This phenomenon is very frequent among yeasts and represents a mechanism of interference competition. The genetic basis for this phenomenon is variable and the toxin can be encoded by nuclear genes or by extrachromosomal genetic elements. All described toxins are produced during exponential phase of growth and in general they are more active at low pH values. In the last decades, killer yeasts have been useful in fermentation industries during the production of bread, wine and beer, and in medicine, in the treatment of human and animal fungal infection.

In previous studies, 24 Antarctic yeasts were analyzed to determine the existence of killer phenotype, found that nine yeast strains showed killer activity, among which *Wickerhamomyces anomalus* and *Candida parapsilosis* showed the best activity. In the current work, it was analyzed the capacity of Antarctic yeasts to kill some medically important bacteria and yeasts, finding that *C. parapsilosis* have antimicrobial activity against *Klebsiella geyteca*. Furthermore, the activity of extracellular protein samples of *W. anomalus* and *C. parapsilosis* was analyzed, finding that they have higher activity at low pH value and tolerate until 0,1% salt concentration. Also it was determined that the samples resist a heat treatment at 100°C for 1 h and by protein purification methods it was found that the activity would related to a single protein of 53 and 41 kDa for the samples from *W. anomalus* and *C. parapsilosis*, respectively. Furthermore, it was analyzed the existence of dsRNA molecules in 41 Antarctic yeast strains by enzymatic characterization with S1 nuclease, DNase I and RNase A. It was identified the presence of dsRNAs molecules in seven yeast strains. These molecules were partially cloned and sequenced, and by bioinformatic analysis it was suggested that these molecules correspond to totiviruses.

INTRODUCCIÓN

Las levaduras son organismos eucariontes unicelulares capaces de sobrevivir en un extenso rango de hábitats diferentes. Muchas especies de levaduras han sido aisladas desde ambientes terrestres y acuáticos tales como suelos y océanos en los cuales es posible encontrar comunidades de levaduras en asociación con frutas, plantas, animales e insectos. Sin embargo, ciertas especies de levaduras han sido aisladas desde ambientes más extremos tales como océanos profundos y regiones frías como la Antártica (Satyanarayana y col, 2009). El continente antártico está cubierto en un 99% por hielo y nieve, y además de ser muy helado, es también uno de los lugares más secos y ventosos de todo el planeta, por lo que se considera un hábitat muy extremo (Satyanarayana y col, 2009). Sin embargo, a pesar de estas condiciones, el continente antártico posee una riqueza biológica, siendo el hábitat de bacterias, levaduras, hongos, líquenes, invertebrados, aves y mamíferos (Satyanarayana y col, 2009). A los microorganismos de origen antártico y regiones frías en general, se les conoce como psicrófilos o psicotolerantes. El término psicrófilo (originalmente descrito para bacterias) hace referencia a aquellos microorganismos capaces de crecer a temperaturas cercanas a 0°C, siendo su temperatura óptima de crecimiento de 15 °C o menor y su temperatura máxima de crecimiento debe estar por debajo de 20°C. Los

microorganismos psicrotolerantes, aun cuando crecen a temperaturas cercanas a 0°C, su temperatura óptima de crecimiento es mayor a 20 °C (Castillo y cols, 2005).

Al igual que las bacterias, algunas levaduras están bien adaptadas a las bajas temperaturas por lo que no es sorprendente que levaduras de los géneros *Candida*, *Cryptococcus*, *Metschnikowia*, *Mrakia* y *Rhodotorula*, entre otros, hayan sido identificadas en varias regiones antárticas (Turkiewicz y cols, 2003). Las levaduras de origen antártico han adquirido cada vez más relevancia debido a sus adaptaciones para sobrevivir y crecer a bajas temperaturas, donde la secreción de enzimas hidrolíticas activas a bajas temperaturas, tales como lipasas, xilanasas, fitasas y proteasas, son de gran interés en el área de la biotecnología industrial (Satyanarayana y col, 2009; Liu y col, 2012).

Tal como sucede en otros ambientes, en la Antártica la competencia por los recursos del medio es alta y las levaduras han desarrollado estrategias que le confieren una ventaja con respecto a su competidor. Una de estas estrategias es la producción de proteínas antimicrobianas llamadas "toxinas killer" o micocinas. Esta actividad ha sido estudiada principalmente en levaduras mesófilas, y muy poco se sabe de ella en levaduras antárticas y de ambientes fríos en general, siendo la levadura *Mrakia frigida* el único reporte de una levadura psicrófila que presenta el fenotipo "killer" (Hua y col. 2010). A diferencia de la producción de antimicóticos por levaduras, el estudio de levaduras capaces de inhibir a bacterias patógenas está en sus primeras etapas y no es un fenómeno ampliamente reportado, donde la levadura *Debaryomyces hansenii*, la

cual produce una lisozima activa a bajas temperaturas, es el único reporte de una levadura psicrófila con actividad antibacteriana, cuyo rango de acción incluye a las bacterias *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Vibrio parahaemolyticus*, entre otras (Wang y col, 2012).

Toxinas Killer

En contraste a los antibióticos antibacteriales, bacteriófagos y bacteriocinas, que fueron descritos a comienzos del siglo pasado, un fenómeno similar fue demostrado en levaduras mucho más tarde, en 1963, cuando Bevan y Makover descubrieron una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* capaz de matar células de igual o relacionado género. (Schmitt & Breinig, 2002). El descubrimiento de esta cepa de *S. cerevisiae* capaz de secretar proteínas o glicoproteínas, llamadas toxinas killer, y su asociación fenotípica con la presencia de virus de RNA de doble hebra (dsRNA) heredados citoplasmáticamente, marcó el comienzo de las investigaciones dentro del campo de la virología en levaduras en los inicios de la década del 70 (Schmitt & Breinig, 2006). Estas toxinas pueden matar a células sensibles de igual o relacionado género sin un contacto directo célula-célula, pero son inactivas contra bacterias y protozoos (Salgado y col, 2002). Aunque las cepas killer son por si mismas inmunes a su propia toxina, permanecen susceptibles a las toxinas secretadas por otras cepas (Schmitt & Breinig, 2002). Posteriormente llegó a ser evidente que las cepas killer productoras de toxinas tienen una importante actividad antimicótica y no están restringidas sólo a *S. cerevisiae*, sino que son encontradas frecuentemente en otras especies y géneros de

levaduras (Schmitt & Breinig, 2006; Hodgson y col, 1995). Las toxinas fueron llamadas micocinas y las cepas killer, micocinogénicas, en orden de enfatizar la naturaleza general de esta interacción antagónica (El Baz & Shetaia, 2005). El fenotipo killer es muy frecuente en levaduras y puede ser encontrado tanto en cepas ambientales como en colecciones de laboratorio (Schmitt & Breinig, 2002) y la naturaleza de este fenómeno en levaduras, bacterias y protistas sugiere que este es un mecanismo natural de competición por interferencia, donde la producción de un compuesto tóxico impide al competidor tomar acceso a los recursos del medio, resultando en una disminución en el tamaño de la población de la especie menos competitiva (Starmer y col, 1987). Además, ha sido demostrado que las toxinas pueden afectar directamente la distribución de cepas sensibles a ellas, e indirectamente, la distribución de otras levaduras que interactúan con estas últimas (Ganter & Starmer, 1991). El rol ecológico del fenómeno killer en levaduras ha sido extensamente estudiado en comunidades de levaduras, principalmente en frutas y tallos en descomposición, donde se ha visto que cerca de un cuarto de las cepas de levaduras aisladas de frutas presentan el fenotipo killer, por lo que este parece ser uno de los hábitats más importantes para este fenómeno, pues son visitadas por una gran variedad de vectores de levaduras tales como insectos, especialmente por especies del género *Drosophila*. El rol del fenómeno killer es de vital importancia en este tipo de sistemas en el cual los insectos pueden llevar diferentes levaduras las cuales son capaces de colonizar los medios en que el insecto se deposita (Magliani y col, 1997). Las bases genéticas de este fenotipo son

variables y la toxina puede estar codificada por genes nucleares o por elementos genéticos extracromosómicos, tales como plásmidos lineales de dsDNA o moléculas de dsRNA encapsuladas dentro de partículas tipo-virus (VLPs; Virus Like Particles) (Magliani y col, 1997; Kurtzman & Fell, 1998; Wickner, 1996). Todas las micocinas estudiadas son de naturaleza proteica y tienen un peso molecular que varía entre 10 y 20 kDa, aunque se han encontrado micocinas cuyo peso molecular alcanza los 100 kDa (Kurtzman & Fell, 1998). Las toxinas son producidas óptimamente durante la fase de crecimiento exponencial, cuando los recursos son abundantes, y en general tienen mayor actividad a pH bajo, 3 a 6, con un rango óptimo de pH entre 4 y 5 (Kurtzman & Fell, 1998; Starmer y col, 1987), por lo que una condición importante para la detección de la actividad killer es el pH del medio de cultivo usado en los ensayos. Además, en condiciones de laboratorio, hay que tener en cuenta que las toxinas killer son más estables en medio sólido, ya que la agitación puede causar su inactivación debido a la formación de puentes disulfuro entre residuos de cisteína de la toxina (Wilson & Whittaker, 1989) y la relación entre el tamaño del inóculo de la cepa sensible y la cepa micocinogénica influye en la sensibilidad del ensayo (Lehmann y col, 1987).

Sistema killer y su asociación con virus de dsRNA

El sistema killer más estudiado hasta ahora es el de *S. cerevisiae*, el cual ha sido descrito en detalle en una extensa lista de revisiones. La mayoría de las cepas de *S. cerevisiae* poseen dos tipos de virus de dsRNA, llamados virus L-A y virus M (Figura 1) (Magliani y col, 1997).

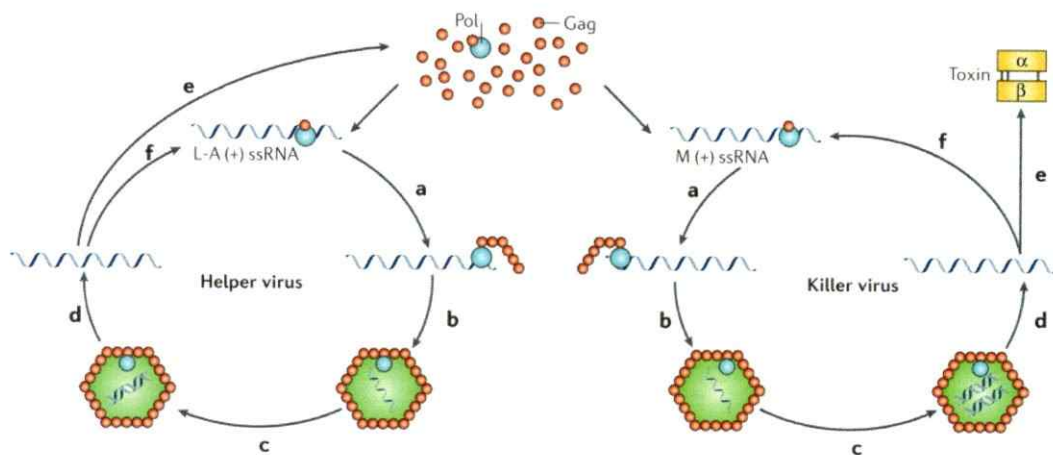


Figura 1: Ciclo de replicación de un virus killer y de su virus "helper". Tanto el virus killer (M) como el virus helper (L-A) son virus de RNA de doble hebra. Ambos compiten por las proteínas virales Gag y Gag-Pol codificadas por el virus helper, las cuales son esenciales para (a) encapsidación del RNA de hebra simple, (b) ensamblaje del virión, (c) síntesis de la hebra negativa de RNA (replicación), (d) síntesis de la hebra positiva de RNA (transcripción) y liberación de la partícula dentro del citosol, (e) traducción del RNA de hebra simple y (f) unión al RNA de hebra simple. Tomado de Schmitt y col, 2006.

En el genoma del virus L-A (ScV-L-A, 4,6 kb) hay dos marcos de lectura abiertos (ORF, Open reading frame). El ORF 5' codifica la proteína de cápside (Gag o CP, 76-81 kDa) y el ORF 3' codifica una RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRp o Pol). Ambos ORFs se superponen en 16-130 nucleótidos y la polimerasa viral es sintetizada como una proteína de fusión con Gag. El genoma del virus M (M-dsRNA, 1,6-1,8 kb) posee sólo un ORF el cual codifica la toxina killer y además le confiere autoinmunidad a la cepa. El

virus M (virus satélite) depende de las proteínas codificadas por el virus L-A para su encapsidación y replicación (helper virus) (Wickner, 1996, flores y col, 2015). Inicialmente, la toxina es sintetizada como una pre-prototoxina la cual es modificada post traduccionalmente en el retículo endoplásmico y en el aparato de Golgi, lo que termina con la secreción de una toxina madura a través de vesículas secretoras (Marquina y col, 2002). La cantidad de toxina en el medio extracelular puede disminuir debido a la presencia de proteasas y a la unión a receptores para la toxina en la propia cepa productora (Hutchins & Busset, 1983). A pesar que las cepas micocinogénicas poseen receptores para la toxina, ellas permanecen inmunes a ésta (Marquina y col, 2002).

Las principales toxinas de *S. cerevisiae* son llamadas K1 y K2 y son muy similares en su modo de acción. Estas actúan a nivel de membrana, interactuando con el receptor de la pared celular, (1-6)- β -D-glucano, de la célula sensible, y luego, a través de una reacción dependiente de energía, la toxina produce daño en la membrana plasmática, generando un poro por el que pueden transitar inicialmente protones y iones de potasio, y luego, en un estado más avanzado, moléculas de mayor masa molecular tales como glucosa y ATP, alterando la permeabilidad y el gradiente electroquímico de la membrana, lo que conlleva a la muerte celular (Bussey y col, 1982).

En general, los virus de dsRNA son considerados como elementos genéticos crípticos en función y sólo en algunos casos han sido asociados con un fenotipo detectable en el hospedero, tales como la hipovirulencia en fitopatógenos, la senescencia en hongos y la ya-mencionada actividad killer en levaduras (Baeza y col, 2012). La existencia de este

tipo de moléculas también ha sido descrita en la levadura *Xanthophyllomyces dendrorhous*. Tres totivirus llamados XdV-L1A, XdV-L1B y XdV-L2 han sido identificados en la cepa UCD 67-385 de *X. dendrorhous*, y también dos moléculas de dsRNA (XdRm-S1 y XdRm-S2) que podrían ser virus satélites (Baeza y col, 2009; Flores y col, 2015).

Aplicaciones de las levaduras killer y sus toxinas

Durante las últimas tres décadas, las levaduras killer y sus toxinas han sido de utilidad en diferentes áreas (Schmitt & Breinig, 2002). Estas levaduras se han usado como modelo de estudio para entender los mecanismos de regulación en el procesamiento, secreción e interacción de toxinas con células sensibles en eucariontes. También, el sistema killer de levaduras provee un modelo útil para el estudio del control y expresión de virus eucariontes. Además, este fenómeno tiene utilidad biotecnológica en la industria de bebidas fermentadas y en medicina, en el desarrollo de nuevos antimicóticos para el tratamiento de infecciones por hongos en humanos y animales, en la preservación de alimentos (levaduras como agentes de bio-control), en el biotipificado de levaduras patógenas de importancia médica y en el área de tecnología de DNA recombinante, en la cual el plásmido killer de *S. cerevisiae* y de *K. lactis* tienen el potencial de servir como vector de clonación para la secreción efectiva de polipéptidos (Schmitt & Breinig, 2002; Marquina y col, 2002).

En trabajos previos, se evaluó la actividad killer en 24 especies de levadura aisladas desde muestras de suelo obtenidas de la Isla Rey Jorge del territorio sub-Antártico. Los

ensayos se realizaron a partir de los extractos proteicos extracelulares obtenidos por precipitación con sulfato de amonio al 80% de saturación. Nueve especies de levaduras presentaron actividad killer entre las cuales destacaron las levaduras *Wickerhamomyces anomalus* y *Candida parapsilosis* por su gran espectro de acción y por la generación de halos de muerte de gran tamaño (Tabla 1). Las muestras obtenidas a partir de ambas levaduras fueron sometidas a fraccionamiento con 20, 40, 60 y 80% de saturación de sulfato de amonio, determinando que, en ambos casos, la actividad permanece sólo en la fracción 80 y además, ambas muestras retienen su actividad luego de un tratamiento térmico de 90°C por 10 minutos (Socias, G., 2015).

En este trabajo, se evaluó la actividad antimicrobiana de 24 especies de levaduras aisladas desde la Antártica contra algunos patógenos de interés, se caracterizaron las muestras de extractos proteicos extracelulares de las levaduras killer *W. anomalus* y *C. parapsilosis*, y se valuó la presencia de elementos genéticos del tipo dsRNA en una colección de 41 levaduras antárticas, identificando la identidad de estas moléculas en al menos dos especies de levaduras.

Tabla 1. Ensayos cruzados de actividad antimicótica

Extracto	Césped																			
	22°C							15°C							10°C					
	S.sal	Cr.gas	D.fris	L.fra	R.lar	L.cre	C.sak	Cr.vic	Cr.gil	G.ant	M.lpp1	M.lho	R.gla1	Le.sp1	Le.sp2	Cr.sp	M.psy	M.bic	R.gla2	
S.sal	-	-	ND	-	-	ND	-	ND	ND	-	ND	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Cr.gas	ND	ND	ND	ND	-	ND	ND	ND	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Cr.vic	ND	ND	ND	ND	ND	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Cr.gil	ND	ND	-	-	-	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Cr.sp	-	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
H.wat	-	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
C.sak	-	-	ND	ND	+++	ND	ND	-	-	ND	ND	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
D.fris	-	ND	ND	-	-	-	ND	ND	-	ND	ND	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
R.lar	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-	ND	ND	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
L.cre	ND	ND	ND	ND	-	ND	ND	ND	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
G.ant	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
W.ano	-	+++	ND	ND	+++	ND	ND	+++	+++	+++	+++	+++	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
M.sp1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
M.lho	ND	ND	+	-	ND	-	ND	ND	-	ND	ND	ND	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
M.psy	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
R.gla1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
R.gla2	-	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-	ND	ND	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Le.sp1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Le.sp2	ND	ND	ND	ND	ND	+++	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
M.lc	ND	-	ND	ND	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
M.ge	-	-	+++	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
R.mu	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M.rob	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C.pa	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

ND: No determinado; -: No se observó halo de muerte; +: Halo entre 0,7 y 2,1mm; ++: Halo entre 2,2 y 4,4mm; +++: Halo >4,4mm

S.sal: *Sporidiobolus salmonicolor*; Cr.gas: *Cryptococcus gastricus*; D.fris: *Dioszegia frisingensis*; L.fra: *Leucosporidiella fragaria*; R.lar: *Rhodotorula laryngis*; L.cre: *Leucosporidiella creatinivora*; C.sak: *Candida sake*; Cr.vic: *Cryptococcus victoreae*; Cr.gil: *Cryptococcus gilvescens*; G.ant: *Glaciozyma antarctica*; H.wat: *Hotermaniella waticus*; Mr.sp: *Mrakia sp.*; Mr.blo: *Mrakia billopolis*; Mr.psy: *Mrakia psychrophila*; R.gla1: *Rhodotorula glacialis 1*; R.gla2: *Rhodotorula glacialis 2*; Le.sp1: *Leuconeurospora sp1*; Le.sp2: *Leuconeurospora sp2*; W.ano: *Wickerhamomyces anomalus*; M.bic: *Metschnikowia bicuspidata*. M.ge: *Mrakia gélica*; R.mu: *Rhodotorula mucilaginosa*; M.rob: *Mrakia roberti*; C.pa: *Candida parapsilosis*. Modificado de Socías, G. 2015.

HIPÓTESIS

Debido a la competencia a la que están sujetos los microorganismos en el ambiente, algunas levaduras secretan proteínas capaces de matar a otros microorganismos, y tomando en consideración las bases genéticas descritas para este fenotipo, se sugiere que:

Las levaduras antárticas presentan actividad antimicrobiana producto de la excreción de moléculas de naturaleza proteica, las cuales podrían estar codificadas por elementos genéticos extracromosómicos del tipo dsRNA.

OBJETIVOS

Objetivo general

Identificar levaduras con actividad antimicrobiana, caracterizar e identificar antimicóticos producidos por las levaduras antárticas y analizar la presencia de elementos genéticos extracromosómicos del tipo dsRNA.

Objetivos específicos

1. Analizar la actividad antimicrobiana contra las bacterias *Klebsiella geyteca* y *Staphylococcus aureus*, y contra la levadura *Candida albicans*.
2. Analizar la actividad antimicótica de los extractos proteicos de las levaduras *W. anomalus* y *C. parapsilosis* bajo distintas condiciones de pH, temperatura y concentración salina.
3. Identificar las proteínas que poseen actividad antimicrobiana mediante métodos de purificación y posterior análisis por huella peptídica.
4. Determinar la existencia de elementos genéticos extracromosómicos del tipo dsRNA en levaduras antárticas.
5. Clonar, secuenciar e identificar moléculas del tipo dsRNA en levaduras antárticas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Cepas

Las levaduras y bacterias usadas en este trabajo listan en la Tabla 2 y forman parte del cepario del Laboratorio de Genética de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile.

Tabla 2. Bacterias y levaduras utilizadas

Cepa	Temperatura óptima de crecimiento
<i>M. psychrophila</i>	
<i>Rh. glacialis 2</i>	10°C
<i>M. bicuspidata</i>	
<i>G. antártica</i>	
<i>M. gélida</i>	
<i>M. roberti</i>	
<i>Mrakia sp1</i>	
<i>M. blollopis</i>	15°C
<i>Rh. glacialis 1</i>	
<i>Leuconeuropsora sp1</i>	
<i>Leuconeuropsora sp2</i>	
<i>Cryptococcus sp.</i>	
<i>L. creatinivora</i>	
<i>C. sake</i>	
<i>D. fristingensis</i>	
<i>S. salmonicolor</i>	
<i>Rh. laryngis</i>	22°C
<i>Cr. victoriae</i>	
<i>Cr. gastricus</i>	
<i>Cr. gilvescens</i>	

Cepa	Temperatura óptima de crecimiento
<i>H. waticus</i>	
<i>X. dendrorhous</i> Anch01	
<i>X. dendrorhous</i> Anch02	
<i>X. dendrorhous</i> Anch03	
<i>X. dendrorhous</i> Anch04	
<i>X. dendrorhous</i> Anch05	
<i>X. dendrorhous</i> Anch06	
<i>X. dendrorhous</i> Anch07	
<i>X. dendrorhous</i> Anch08	22°C
<i>X. dendrorhous</i> Anch09	
<i>X. dendrorhous</i> Anch10	
<i>X. dendrorhous</i> Anch11	
<i>X. dendrorhous</i> Anch12	
<i>X. dendrorhous</i> T15 Anch13	
<i>X. dendrorhous</i> M11-1	
<i>X. dendrorhous</i> M13-1	
<i>X. dendrorhous</i> M13-2	
<i>X. dendrorhous</i> M13-3	
<i>Rh. mucilaginosa</i>	
<i>W. anomalus</i>	30°C
<i>C. parapsilosis</i>	
<i>C. albicans</i>	
<i>K. geyteca</i>	37°C
<i>S. aureus</i>	

Ácidos Nucleicos

Los marcadores de peso molecular 1 kb plus, el DNA del bacteriófago lambda digerido con la enzima de restricción *Hind*III se adquirieron desde New England Biolabs y Thermo Scientific. El plasmidio pBluescript SK- (pBS) se obtuvo desde la colección disponible en el Laboratorio de Genética de la Facultad de Ciencias, Universidad de Chile. Los oligonucleótidos utilizados en las reacciones de PCR y RT-PCR se indican en la Tabla 3.

Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo

Nombre	Secuencia (5'-3')	Uso o especificidad
M13Fw	GTAAAACGACGGCCAGT	Específico para el plásmido pBS
M13Rv	AACAGCTATGACCATG	Específico para el plásmido pBS
Mot4F	GAGGACTTCAATAGTCAACA	Motivo conservado de la RdRp de XdV-L1A
Mot5R	AAGTCGTCAGCCTCCACCCC	Motivo conservado de la RdRp de XdV-L1A
Mot6R	AGACATCGTCTCCGTTGTGC	Motivo conservado de la RdRp de XdV-L1A
Mot4FB	GAAGATTTCAACAGTCAACATAG	Motivo conservado de la RdRp de XdV-L1B
Mot5RB	ATGTCGTTAACCTCCAGCCC	Motivo conservado de la RdRp de XdV-L1B
Mot6RB	GCACGTCGTCGCCGTTATG	Motivo conservado de la RdRp de XdV-L1B
M.psy-Fw1	TAATCCATGACAACGTTGGGC	Específico para dsRNA de <i>M. psychrophila</i>
M.psy-Rv1	GGATCGAGTCTGAAGTCCACTT	Específico para dsRNA de <i>M. psychrophila</i>
M.psy-Fw2	TGCTGTCAGGCTGGAGACTAA	Específico para dsRNA de <i>M. psychrophila</i>
M.psy-Rv2	GATTCTGAAGTCCATTCAGCA	Específico para dsRNA de <i>M. psychrophila</i>
Randmon		
Hexamer	NNNNNN	RT-PCR
Primer		

Enzimas

Las enzimas DNasa I, RNasa A, nucleasa S1, DNA Polimerasa *Taq*, T4 DNA ligasa, DNA polimerasa, T2 RNA ligasa y la endonucleasa de restricción *EcoRV* se adquirieron de las empresas Promega, New England BioLabs, Thermo Scientific y Sigma.

Reactivos químicos

Los componentes del medio de cultivo y los reactivos químicos se adquirieron de Sigma Chemical, Merk y Difco Laboratorios.

Métodos

Medio de cultivo

Las levaduras fueron crecidas en medio YM líquido conteniendo 1% de glucosa, 0,3% de extracto de levadura, 0,3% de extracto de malta y 0,5% de peptona, sometidas a una agitación de 160 rpm e incubadas a la temperatura óptima de crecimiento de cada cepa. Las bacterias fueron crecidas en medio Luria Bertani (LB) líquido conteniendo 1% de triptona, 0,5% de extracto de levadura y 0,5% de NaCl, con una agitación de 160 rpm e incubadas a la temperatura óptima de crecimiento de cada cepa.

Placas con medio YM-MB (YM conteniendo 0,003% de azul de metileno y 1,5% agar) fueron utilizadas para el ensayo de actividad killer.

Extracción de proteínas extracelulares totales

50 ml de cultivos celulares en fase estacionaria fueron centrifugados a 6.000xg durante 10 min a 4°C. El sobrenadante fue filtrado a través de una membrana de fluoruro de polivinilideno de 0,45 mm (Millipore). Al sobrenadante se le adicionó gradualmente sulfato de amonio hasta alcanzar una saturación del 80% y se incubó con agitación a 4°C por dos horas. Las muestras fueron centrifugadas a 9.000xg durante 15 min y el

pellet obtenido fue suspendido en 1,5 ml de buffer Tris-HCl 100 mM pH 7; dializado contra 1 L del mismo buffer por 24 horas a 4°C y guardadas a -20°C hasta su análisis.

Fraccionamiento de proteínas

El fraccionamiento de proteínas fue llevado a cabo a partir del protocolo de Duong-Ly y col, 2014. 500 ml de cultivo fueron centrifugados a 6.000xg durante 10 min a 4°C. El sobrenadante fue filtrado a través de una membrana de fluoruro de polivinilideno de 0,45 mm (Millipore). Al sobrenadante se le adicionó sulfato de amonio hasta alcanzar una saturación del 60% y 80%. Cada fracción fue centrifugada a 9.000xg durante 15 min. El pellet fue suspendido en 5 ml de buffer Tris-HCl 100 mM pH 7, dializadas en 1 L de Tris-HCl 100 mM pH 7 por 24 horas a 4°C con dos cambios de buffer y guardadas a -20°C hasta su análisis.

Ensayo de actividad killer a partir de extractos proteicos

El fenotipo killer fue determinado mediante la técnica MBA (methylene blue agar) de Somer y Bevan (1969). El césped sensible fue preparado mezclando 5 ml de cultivo fresco con 50 ml de medio YM-MB conteniendo azul de metileno al 0,003%, a 45°C. Una vez gelificado el agar, se perforaron pocillos de 5 o 10 mm de diámetro en el césped y se inocularon con 25 a 50 µL de cada extracto proteico. El radio del halo de muerte fue medido luego de la incubación por 2 a 5 días a 10°C, 15°C o 22°C, según corresponda (Tabla 2). La actividad killer fue reconocida por una región azul o por una zona clara alrededor de los pocillos. Si el pocillo fue rodeado por un halo azul, la

levadura de la cual fue obtenido el extracto proteico fue designada como killer y el césped como sensible.

Para evaluar el efecto de la concentración de NaCl sobre la actividad killer, placas con medio YM-MB conteniendo NaCl al 0,0, 0,1, 0,5, 1 y 2% fueron utilizadas. Para evaluar el efecto del pH del césped sobre la actividad, el medio YM-MB fue preparado sobre un buffer amortiguador de citrato fosfato a pH 4,6, 5,0, 6,0 y 7,0.

Ensayo de actividad killer a partir de colonias

El césped sensible fue preparado mezclando 5 ml de cultivo fresco con 50 ml de YM-MB conteniendo azul de metileno al 0,003%, a 45°C. Una vez gelificado el agar, se sembraron las levaduras a ensayar. El halo de muerte fue visualizado luego de la incubación por 2 a 5 días a 10°C, 15°C o 22°C, según corresponda (Tabla 2). La actividad killer fue reconocida por una región de células coloreadas de azul o por una zona clara de inhibición delimitada por células coloreadas de azul alrededor de la colonia.

Análisis de proteínas

Las muestras fueron separadas por electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE). El gel separador fue preparado a una concentración final del 10% a partir de una solución stock de acrilamida al 30%, Tris 1,5M pH 8,8 y SDS, el cual fue polimerizado químicamente por la adición de TEMED y persulfato de amonio, mientras que el gel concentrador fue preparado a una concentración final del 5% utilizando Tris 1 M pH 6,8. La composición del buffer de electroforesis fue de 1,51 g

de Tris, 7,25 g de glicina, 5 mL de SDS al 10% y 500 mL de agua. Las muestras fueron preparadas homogenizando 30 μ L de cada extracto proteico con 10 μ L de buffer de carga denaturante, y luego fueron sometidas a un tratamiento térmico de 100°C durante 10 min. Las muestras fueron cargadas en el gel y separadas a un voltaje de 120 V, y finalmente teñidas con azul de Coomassie (Blakesley y col, 1977) para observar las bandas en el gel. Para determinar el tamaño de las bandas se utilizó el marcador "PageRuler Prestained Protained Ladder" de la marca Thermo Scientific.

Cuantificación de proteínas

La concentración de proteínas fue determinada mediante el "BCA Protein Assay Kit" (Thermo Scientific).

Separación de proteínas por filtros de corte

Las proteínas fueron separadas utilizando los filtros Amicon Ultra-4 centrifugal filter devices (Millipore) de diferentes límites de peso molecular: 100, 50, 30, 10 y 3 kDa,

Cromatografía de exclusión molecular

Las proteínas fueron separadas en una columna Superdex 75 10/300 GL usando un buffer de elución Tris-HCl 100 mM a un flujo de 0,2 ml/min.

Extracción de RNA total

Las células fueron colectadas por centrifugación a 14.000xg por 1 min y lavadas con 700 μ l de buffer TE (Tris-HCl 10 mM pH 8,0, EDTA 1 mM). El pellet (0,1 g) fue resuspendido en 400 μ l de buffer de lisis (acetato de Sodio 0,02 M, pH 5,5, SDS 0,5%, EDTA 1mM) y se le adicionaron 4 g de microesferas de vidrio (0,5 mm de diámetro). La ruptura celular fue realizada en un homogeneizador durante 1 min. Se adicionaron 800 μ l de TriReagent y las muestras fueron homogeneizadas durante 2 min. Se adicionaron 400 μ l de cloroformo, se agitó manualmente por 15 s. Las muestras fueron incubadas por 10 min a temperatura ambiente y centrifugadas a 14.000xg por 15 min a 4°C. La fase acuosa (500 μ l) fue colectada en un tubo limpio y se le adicionó 300 μ l de agua libre de nucleasas y 600 μ l de isopropanol. Luego de una incubación de 15 min a temperatura ambiente, las muestras fueron centrifugadas a 14.000xg por 15 min a 4°C para precipitar el RNA. El pellet obtenido fue lavado con 1 ml de etanol 75%, centrifugado a 14.000xg por 5 min a 4°C y resuspendido en 30 μ l de agua libre de nucleasas. Las muestras fueron guardadas a -80°C hasta su análisis.

Tratamiento enzimático

Las muestras de RNA total fueron tratadas con las enzimas Nucleasa S1, DNasa I y RNasa A.

Nucleasa S1: Se utilizó 1 U de enzima por μg de ácido nucleico. La reacción fue realizada a 37°C en el buffer acetato de potasio 30 mM pH 4,5, NaCl 0,3 mM, sulfato de zinc 1 mM y glicerol 5%.

DNasa I: Se utilizó 1 U de enzima por μg de ácido nucleico. La mezcla fue incubada durante 1 h a 37°C con el buffer acetato de sodio 50 mM, MgCl_2 10 mM y CaCl_2 2 mM a pH 6,5.

RNasa A: La digestión fue llevada a cabo a 37°C durante 30 min, a una concentración de enzima de 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Análisis y purificación de ácidos nucleicos

Las muestras de ácidos nucleicos fueron mezcladas con buffer de carga 6X (azul de bromofenol 25%, ficoll 15%, glicerol 30%) y cargadas en geles de agarosa al 1% conteniendo SafeView Nucleic Acid Stain (NBS Biologicals) 1X y buffer TAE 1X. La electroforesis fue realizada a 89 V utilizando buffer TAE 1X. El gel fue expuesto a luz ultravioleta utilizando un transiluminador (UVP, High Performance UV Transiluminator, 302 nm) para observar los ácidos nucleicos. Los tamaños moleculares fueron estimados de acuerdo a los marcadores moleculares 1 kb plus y/o λ HindIII.

Los ácidos nucleicos fueron separados en un gel de agarosa al 1% y las bandas de interés fueron cortadas con un bisturí. Cada fragmento del gel conteniendo las bandas fue depositado en un tubo eppendorf de 1,5 ml al cual se le adicionaron 500 μl de KI y se incubó a durante 10 a 15 min a 60°C hasta disolver la agarosa. 700 μl de la solución

resultante fueron transferidos a un tubo Spin Column for DNA (EconoSpin), centrifugados a 14.000xg por 1 min y lavados dos veces utilizando 700 μ l de la solución NewWash (Tris-HCl 10 Mm pH 7,5, NaCl 60 mM, EDTA 2,5 mM, etanol 50%). Los ácidos nucleicos fueron suspendidos en 45 μ l de agua libre de nucleasas y colectados por centrifugación a 14.000xg por 3 min.

Clonamiento de los ácidos nucleicos

Amplificación de ácidos nucleicos por RT-PCR

10 μ l de dsRNA purificado por GeneClean fue mezclado con 2 μ l de dimetil sulfóxido (DMSO) y 1 μ l de cada partidor (25 mM). La mezcla fue incubada a 94°C por 10 min y luego enfriada en hielo por 3 min. Se adicionó 1 μ l de dNTPs (25 mM), 1 μ l de transcriptasa reversa M-MLV (Invitrogen) y 2 μ l del buffer RT. La mezcla fue incubada a 37°C por 90 min y luego a 80°C por 5 min. Para la formación de la segunda hebra, de 1 a 5 μ l del cDNA obtenido fue mezclado con 0,4 μ l de *Pfu* DNA polimerasa (Agilent), 1 μ l de cada partidor (25 mM), 0,5 μ l de dNTPs (25 mM), 2,5 μ l de buffer de PCR 10X (Tris-HCl 20 mM, pH 8,8, KCl 50 mM) 1 μ l de Mg^{2+} (50 mM) y agua libre de nucleasas hasta completar un volumen de 25 μ l. La amplificación de PCR fue realizada utilizando los siguientes parámetros: denaturación inicial de 94°C por 3 min, 35 ciclos de denaturación a 94°C por 1 min, alineamiento a 55°C por 30 s y elongación a 72°C por 3 min; y un paso de extensión final a 72°C por 10 min. Una reacción sin cDNA fue llevada a cabo de forma simultánea como control. Un termociclador con gradiente de

temperatura fue utilizado para amplificar las muestras con los partidores de hexanucleótidos aleatorios usando una temperatura de alineamiento de 38, 42, 46, 50 y 54°C.

Ligado y Transformación

Los cDNAs fueron purificados por GeneClean y ligados al vector pBS (previamente digerido con la enzima *EcoRV*) utilizando la enzima T4 DNA ligasa durante 24 h a 22°C. La muestra fue dializada en membranas de nitrocelulosa (Millipore) y utilizada para transformar a la cepa electrocompetente *E.coli* DH5 α . 80, 100 y 120 μ l de cultivo de la cepa transformada fueron plaqueados en placas LB-Amp-Xgal e incubadas a 37°C por 24 h. Los clones recombinantes fueron reconocidos por su color blanco debido a su incapacidad para degradar el sustrato X-Gal y sembrados en nuevas placas LB-Amp-Xgal.

Purificación del DNA plasmidial (Miniprep)

La existencia del fragmento de interés en el plásmido pBS fue determinada mediante PCR utilizando los oligonucleótidos M13Fw y M13Rv, y visualizados en geles de agarosa al 1%. El DNA plasmidial fue purificado mediante el kit GeneJet Plasmid Miniprep (Thermo Scientific) de acuerdo a las instrucciones del proveedor. Finalmente, el DNA plasmidial fue diluido en 50 μ l de agua libre de nucleasas. La cuantificación de ácidos nucleicos fue realizada usando el espectrofotómetro para microplacas Epoch 2 de la marca Biotek, a una longitud de onda de 250 a 400 nm.

Secuenciación y análisis bioinformático

La secuenciación de DNA fue realizada utilizando el servicio de Macrogen Inc. (Corea). La herramienta "ContigExpress" del programa Vector Suite (Invitrogen) fue utilizada para generar los ensamblajes y alineamientos. Las herramientas de búsqueda Blastn y Blastx, y la herramienta Open Reading Frame Finder, todas del National Center for Biotechnology Information (NCBI, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, <http://ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) fueron utilizadas para el análisis bioinformático de las secuencias y para la búsqueda de marcos de lectura abiertos y sus respectivas secuencias aminoacídicas.

RESULTADOS

Actividad antimicrobiana

Se determinó la presencia o ausencia de actividad antibacteriana y antimicótica de 24 levaduras antárticas contra *K. geyteca*, *S. aureus* y *C. albicans* en placa a través del método MBA. Estos microorganismos fueron seleccionados de una colección de bacterias y levaduras del Laboratorio de Genética de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile debido a que pertenecen a géneros y/o especies de microorganismos patógenos de importancia médica. Inicialmente se evaluó la actividad a partir de colonias sembradas sobre un césped microbiano, determinando así que sólo nueve levaduras antárticas poseen un fenotipo positivo para este ensayo; Las levaduras *Cr. sp*, *H. waticus*, *Le. sp1* y *Le. sp2* presentan actividad contra la levadura *C. albicans*; *L. creatinivora* y *C. parapsilosis* contra la bacteria *K. geyteca*; y *S. salmonicolor*, *C. sake* y *W. anomalus* contra la bacteria *S. aureus* (Tabla 4). Este tipo de ensayo, si bien permite determinar la existencia del fenotipo, no entrega información sobre la naturaleza del factor responsable de la actividad y tampoco si es secretado al medio externo, ya que diferentes tipos de antagonismo tales como desplazamiento por competencia, acidificación del medio y secreción de enzimas hidrolíticas podrían dar como resultado un fenotipo antimicrobiano. Para determinar si el factor responsable de la actividad antimicrobiana es de naturaleza proteica y además secretado al medio externo, las

proteínas extracelulares totales secretadas por las nueve levaduras fueron extraídas del medio mediante precipitación con sulfato de amonio. Sólo la muestra proveniente de la levadura *C. parapsilosis* retuvo la actividad observada en los ensayos a partir de colonias.

Tabla 4. Ensayo de actividad antimicrobiana a partir de colonias

		Césped		
		<i>C. albicans</i>	<i>K. geyteca</i>	<i>S. aureus</i>
Especie ensayada (Colonia)	<i>S. salmonicolor</i>	-	-	+
	<i>Cr. gastricus</i>	-	-	-
	<i>Cr. victoriae</i>	-	-	-
	<i>Cr. gilvescens</i>	-	-	-
	<i>Cr. sp</i>	+	-	-
	<i>H. waticus</i>	+	-	-
	<i>C. sake</i>	-	-	+
	<i>D. fristingensis</i>	-	-	-
	<i>Rh. laryngis</i>	-	-	-
	<i>L. creatinivora</i>	-	+	-
	<i>G. antártica</i>	-	-	-
	<i>W. anomalus</i>	-	-	+
	<i>Mrakia sp1</i>	-	-	-
	<i>M. blollopis</i>	-	-	-
	<i>M. psychrophila</i>	-	-	-
	<i>Rh. glacialis 1</i>	-	-	-
	<i>Rh. glacialis 2</i>	-	-	-
	<i>Leuconeurospora sp1</i>	+	-	-
	<i>Leuconeurospora sp2</i>	+	-	-
	<i>M. bicuspidata</i>	-	-	-
	<i>M. gélida</i>	-	-	-
	<i>Rh. musilaginososa</i>	-	-	-
	<i>M. roberti</i>	-	-	-
<i>C. parapsilosis</i>	-	+	-	

+: Presenta actividad antimicrobiana, -: No presenta actividad antimicrobiana

*: *C. parapsilosis* presentó actividad a partir de colonia y a partir de su extracto proteico

Actividad antimicótica bajo diferentes condiciones

De acuerdo a los resultados de trabajos anteriores (Socías, G., 2015), se seleccionaron las levadura *W. anomalus* y *C. parapsilosis* por presentar el mayor rango de acción y por generar los halos de muerte de mayor tamaño dentro de toda la colección (Tabla 1), y se analizó su actividad antimicótica bajo diferentes condiciones de pH, concentración salina y temperatura, ya que se ha descrito que estos parámetros son aquellos que más afectan la actividad de las toxinas killer, pudiendo incluso inhibirlas totalmente, y aunque algunas toxinas son activas en un rango de condiciones similares, otras requieren de parámetros completamente diferentes. Los ensayos fueron realizados sobre las levaduras sensibles *Cr. gastricus*, *Rh. laryngis* y *Leuconeurospora sp1*, y se seleccionaron sólo aquellas placas que permitieran una correcta medición de los radios de halos de muerte al momento de analizar los resultados. Los valores de los radios de halo de muerte corresponden al promedio de al menos dos halos generados por una muestra sobre la misma placa.

Las proteínas presentes en el medio extracelular de los cultivos de las levaduras *W. anomalus* y *C. parapsilosis* fueron separadas de acuerdo a su solubilidad bajo la presencia de una elevada concentración de sal (fraccionamiento de proteínas por "salting out") mediante precipitación con sulfato de amonio a una saturación del 60 y 80%, obteniendo así las muestras de extractos proteicos llamadas fracción 60 y fracción 80, respectivamente.

a. Efecto del pH sobre la actividad killer

Se evaluó la actividad de las muestras provenientes de las levaduras *W. anomalus* y *C. parapsilosis* sobre las levaduras sensibles *Cr. gastricus* y *Rh. laryngis* a pH 4,6; 5,0; 6,0 y 7,0. La fracción 60 de ambas levaduras no presentó ningún tipo de actividad (Anexo 1 y 2). La fracción 80, proveniente de las levaduras *W. anomalus* y *C. parapsilosis*, generan un halo de muerte de gran tamaño contra la levadura sensible *Cr. gastricus* a pH 4,6, mientras que al aumentar el pH del césped, la actividad (reflejada en el diámetro del halo de muerte) comienza a disminuir hasta desaparecer por completo a pH 7,0 (Figura 2, A). De igual forma, las muestras de *W. anomalus* y *C. parapsilosis* obtenidas con 80% de saturación de sulfato de amonio presentan su mayor actividad a pH bajo, entre 4,5 y 5,0 contra un césped sensible de *Rh. laryngis*, mientras que a pHs superiores no se observó actividad (Figura 2, B).

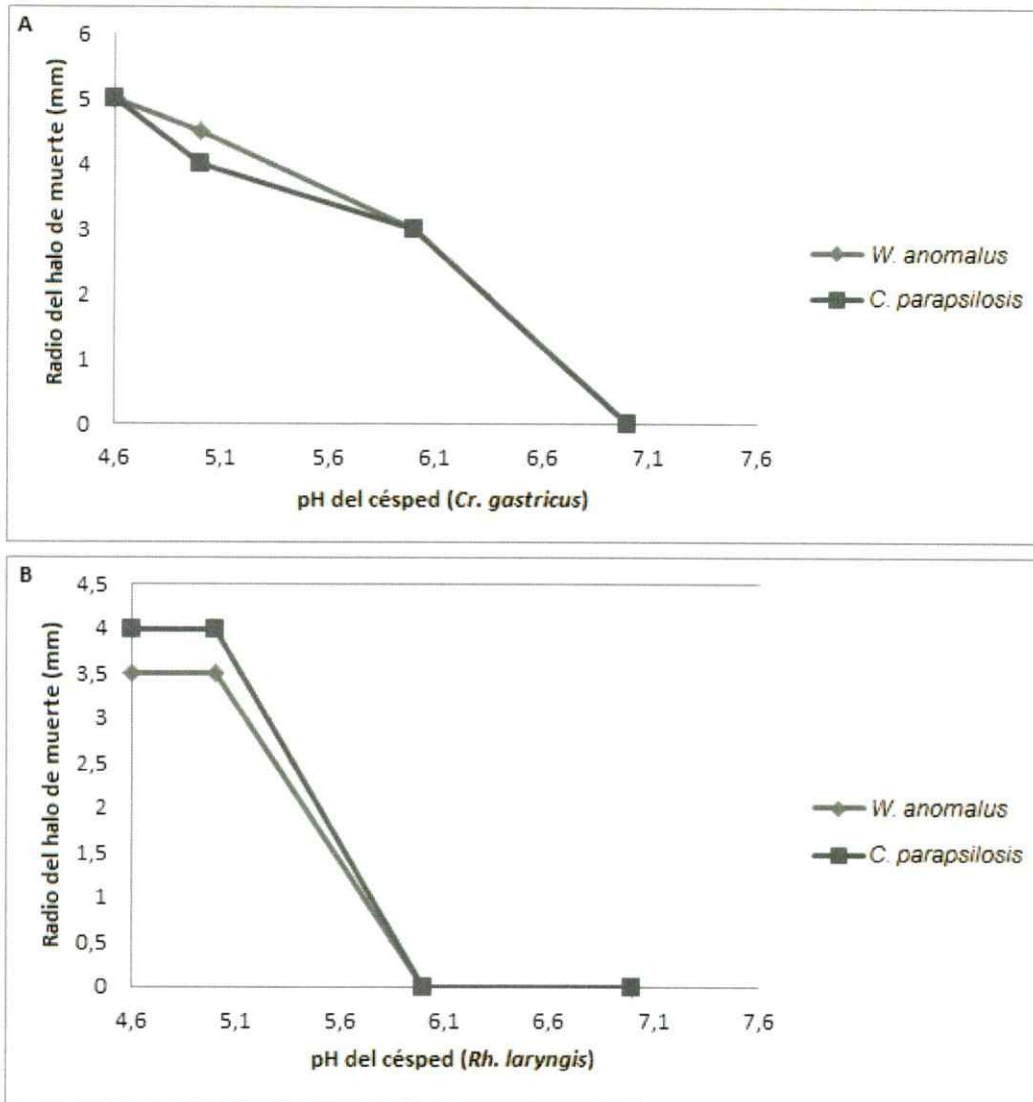


Figura 2: Efecto del pH sobre la actividad killer. Se evaluó el efecto del pH en la actividad de las muestras de extractos proteicos de *W. anomalus* y *C. parapsilosis* sobre un césped sensible de *Cr. gastricus* (A) y *Rh. laryngis* (B) ajustado a pH 4,6; 5,0; 6,0 y 7,0.

b. Efecto de la concentración salina sobre la actividad killer

Se evaluó la actividad de las fracciones 60 y 80 obtenidas a partir de las levaduras *W. anomalous* y *C. parapsilosis* contra la levadura sensible *Rh. laryngis*. La fracción 60 proveniente de ambas levaduras no presentó actividad (Anexo 3). La fracción 80 de ambas muestras presentó la mayor actividad a una concentración salina de entre 0 y 0,1%, generando halos de muerte de entre 5 y 6 cm de radio. Al aumentar la concentración salina al 0,5%, la actividad de ambas muestras disminuye en cerca de un 53% para *W. anomalous* y un 54% para *C. parapsilosis*, produciendo un halo de muerte de 2,5 mm de radio. No se observa actividad a concentraciones de NaCl del 1% o superior (Figura 3).

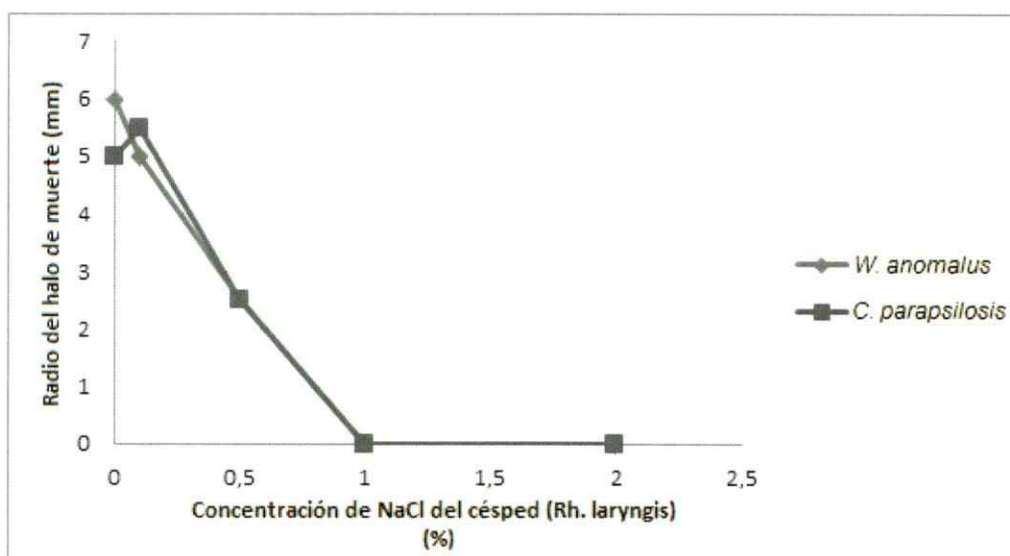


Figura 3: Efecto de la concentración salina sobre la actividad killer. Se evaluó el efecto del NaCl en la actividad de las muestras de extractos proteicos de *W. anomalous* y *C.*

parapsilosis sobre un césped sensible de *Rh. laryngis* a una concentración salina de 0; 0,1; 0,5; 1 y 2%.

c. Efecto de la temperatura sobre la estabilidad de la toxina killer

Se analizó la actividad de la fracción 80 de *W. anomalus* y *C. parapsilosis* luego de una incubación a 30, 37 y 45°C por 4 h y a 100°C por 15, 30, 45 y 60 min, sobre un césped sensible de *Leuconeuropa sp1* y *Rh. laryngis*. Ambas muestras retuvieron la actividad luego del tratamiento térmico sin presentar grandes diferencias en los radios de halos de muerte producidos (Anexo 4 y 5). La actividad killer observada luego de cada tratamiento térmico fue normalizada respecto a la actividad producida por la muestra control (no sometida a tratamiento térmico) para un mejor análisis de los resultados (Figura 4). Sólo cuando la muestra proveniente de *W. anomalus* fue ensayada sobre un césped sensible de *Rh. laryngis* es posible observar una disminución en su actividad cercana al 46 y 42% luego de un tratamiento térmico a 100°C por 45 y 60 min, respectivamente (Figura 4, B).

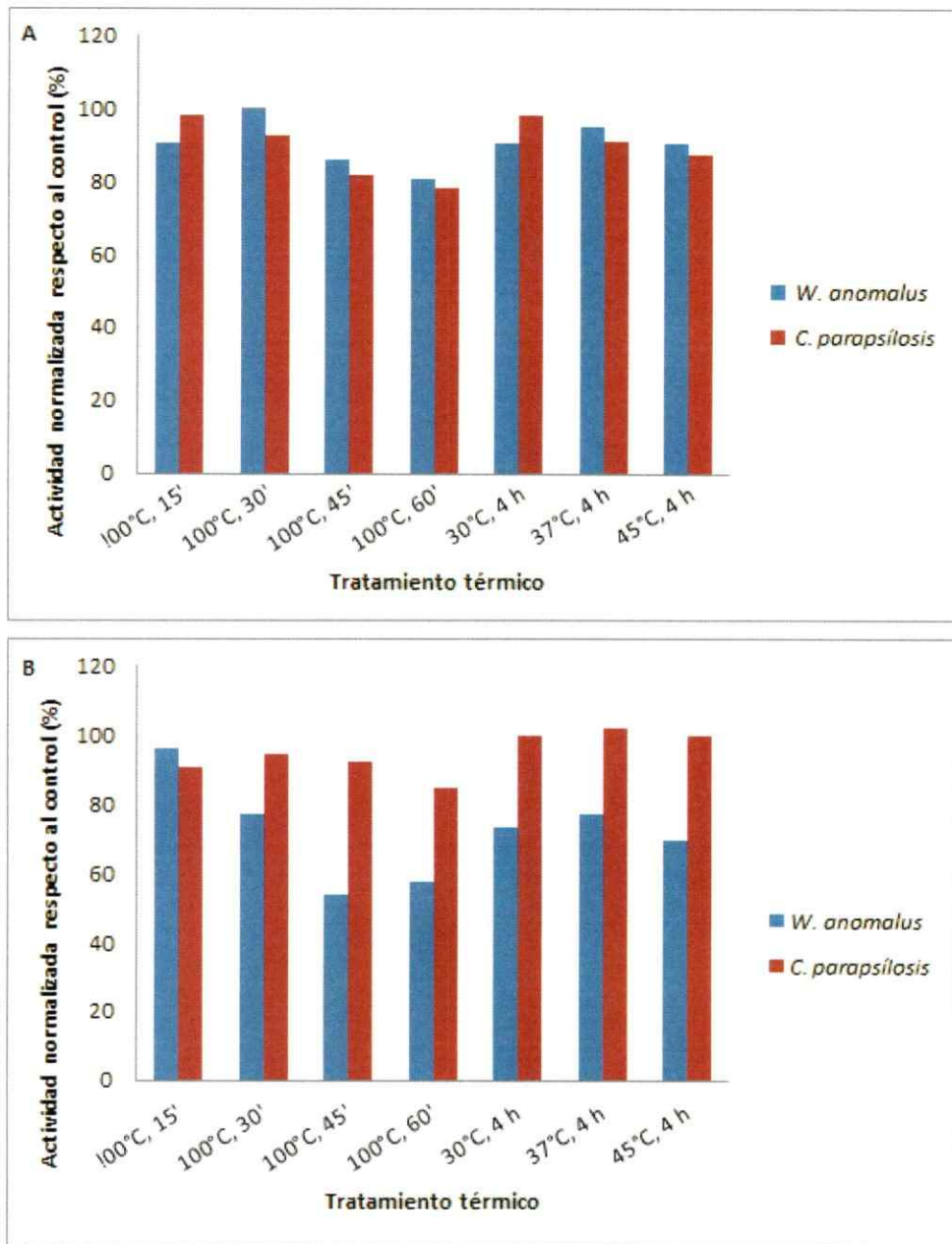


Figura 4: Efecto de la temperatura sobre la estabilidad de la toxina killer. Se midió el efecto térmico en la actividad de los extractos proteicos extracelulares de *W. anomalus* y *C. parapsilosis* sobre un césped sensible de *Leuconeuropa sp1* (A) y *Rh. laryngis* (B) luego de un tratamiento térmico de 100°C por 15, 30, 45 y 60 min y un tratamiento de 30, 37 y 45°C por 4 h.

Purificación de Proteínas

Ya caracterizadas las muestras de extractos proteicos de las levaduras *W. anomalus* y *C. parapsilosis*, se procedió a determinar la proteína responsable de la actividad killer. Debido a algunas dificultades en la medición del halo de muerte en los ensayos anteriores, los ensayos de actividad de esta sección fueron llevados a cabo sobre un césped sensible de *M. sp1* (tabla 1). Debido a la coloración blanca de esta cepa y a su crecimiento lento (un crecimiento rápido puede saturar el césped de células durante el periodo de incubación, lo cual dificulta la medición de los halos de muerte), se produce un mejor contraste entre el halo de coloración azul y el resto del césped.

Las proteínas presentes en la fracción 80 obtenida a partir de *W. anomalus* y *C. parapsilosis* por precipitación con sulfato de amonio fueron separadas utilizando los filtros Amicon Ultra-4 centrifugal filter devices (Millipore) de diferentes tamaños; 100, 50, 30, 10 y 3 kDa, para obtener así fracciones con proteínas de un peso molecular mayor a 100 kDa, entre 100 y 50 kDa, entre 50 y 30 kDa, entre 30 y 10 kDa, entre 10 y 3 kDa y menor a 3 kDa. Se determinó la actividad de las fracciones obtenidas contra un césped sensible de *M. sp1* (figura 5, A y C) y las muestras fueron analizadas por SDS-PAGE (figura 5, B y D). Aunque las proteínas no fueron separadas idealmente por tamaño, se encontró una fuerte relación entre la actividad presentada por cada muestra y su perfil proteico; en el cual la mayoría de las muestras que presentaron actividad poseen principalmente de tres a cuatro bandas de un peso molecular de 40 a

55 kDa. Además, la actividad fue observada principalmente en las fracciones entre 30 y 50 kDa.

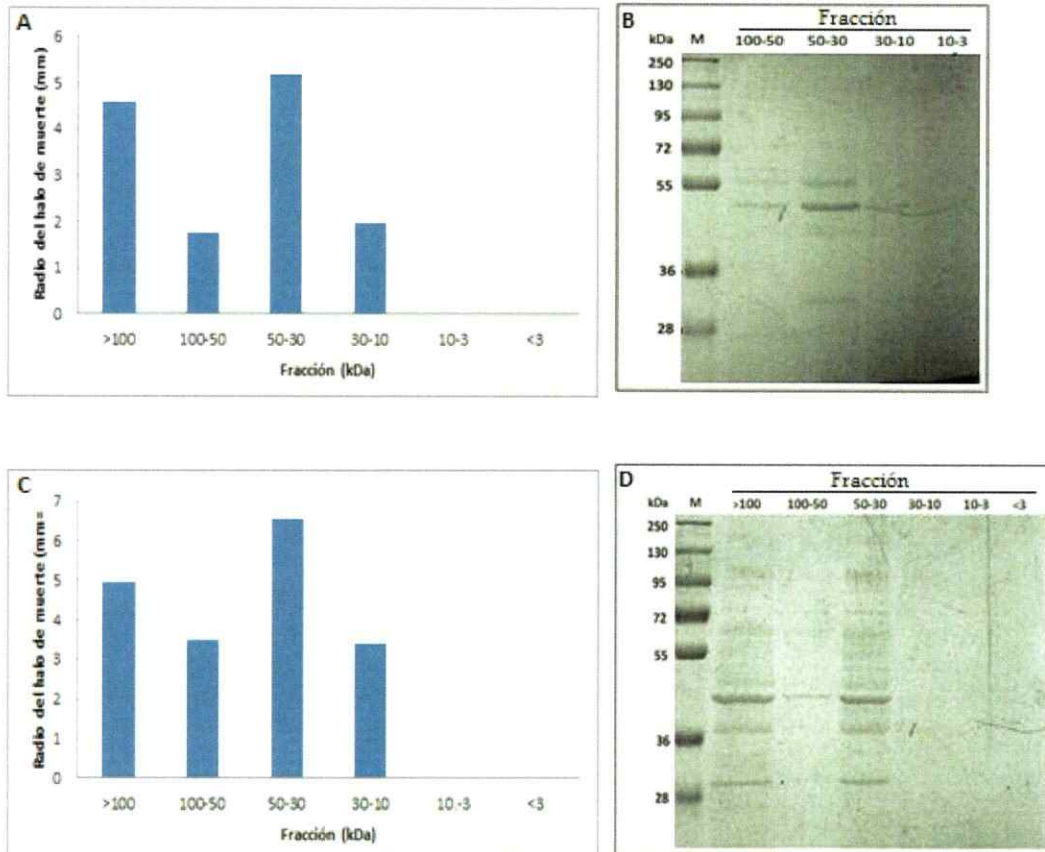


Figura 5: Actividad y perfil proteico de las fracciones obtenidas mediante filtros de corte. A, actividad de las fracciones obtenidas a partir de la muestra de *W. anomalus* sobre un césped de *M. sp1*. B, perfil proteico de las fracciones obtenidas a partir de la muestra de *W. anomalus* en un gel SDS-PAGE. C, actividad de las fracciones obtenidas a partir de la muestra de *C. parapsilosis* sobre un césped de *Mrakia sp1*. D, perfil proteico de las fracciones obtenidas a partir de la muestra de *C. parapsilosis* en un gel SDS-PAGE. M: marcador de peso molecular.

Se seleccionaron las fracciones entre 50-30 kDa de cada muestra y se sometieron a cromatografía de exclusión molecular para separar las proteínas presentes en la muestra. Se colectaron alrededor de 120 fracciones y se determinó la actividad de aquellas fracciones que dieron valores de absorbancia (280 nm) mayores a 5 mAu (Figura 6). Las muestras que presentaron actividad killer fueron analizadas por SDS-PAGE y se encontró que la actividad se relacionaba a una sola banda de 53 kDa para la muestra proveniente de *W. anomalus* (Figura 7, A) y 46 kDa para la muestra proveniente de *C. parapsilosis* (Figura 7, B).

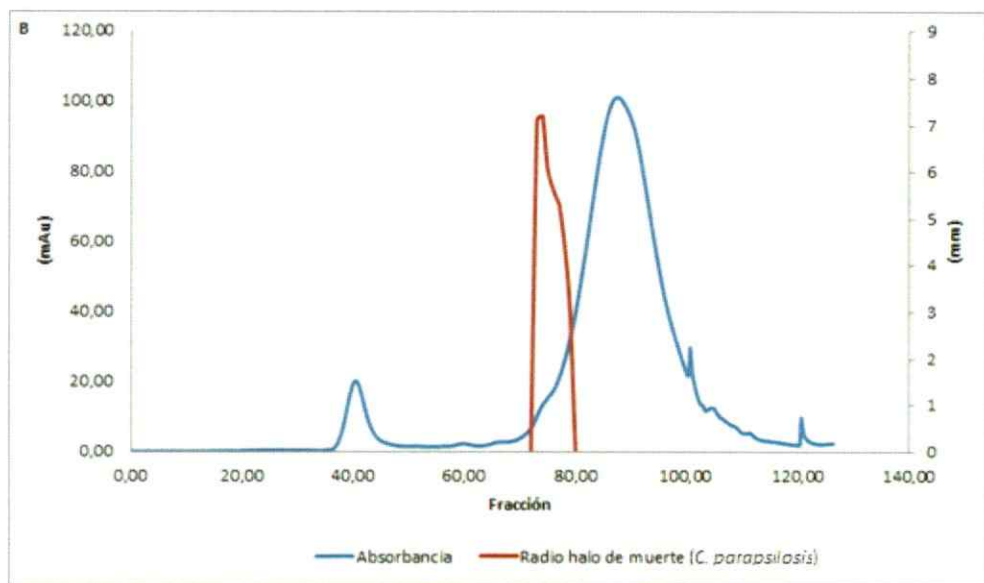
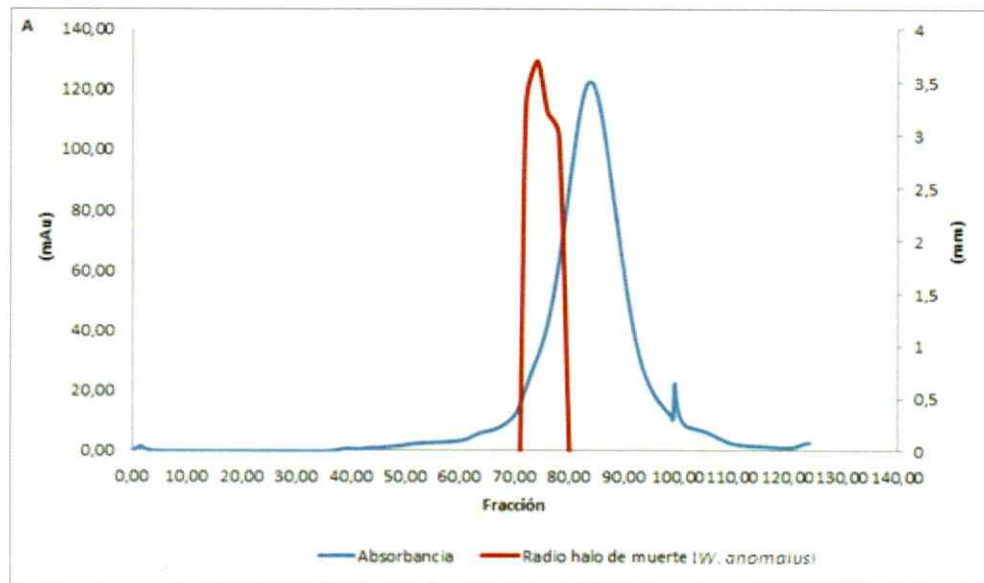


Figura 6: Cromatograma y radio de halo de muerte. Absorbancia (azul) y actividad (rojo) de las fracciones recolectadas, calculada como el radio del halo de muerte generado sobre un césped sensible de *M. sp1*, a partir de las muestras de *W. anomalus* (A) y *C. parapsilosis* (B), mediante cromatografía de exclusión molecular.

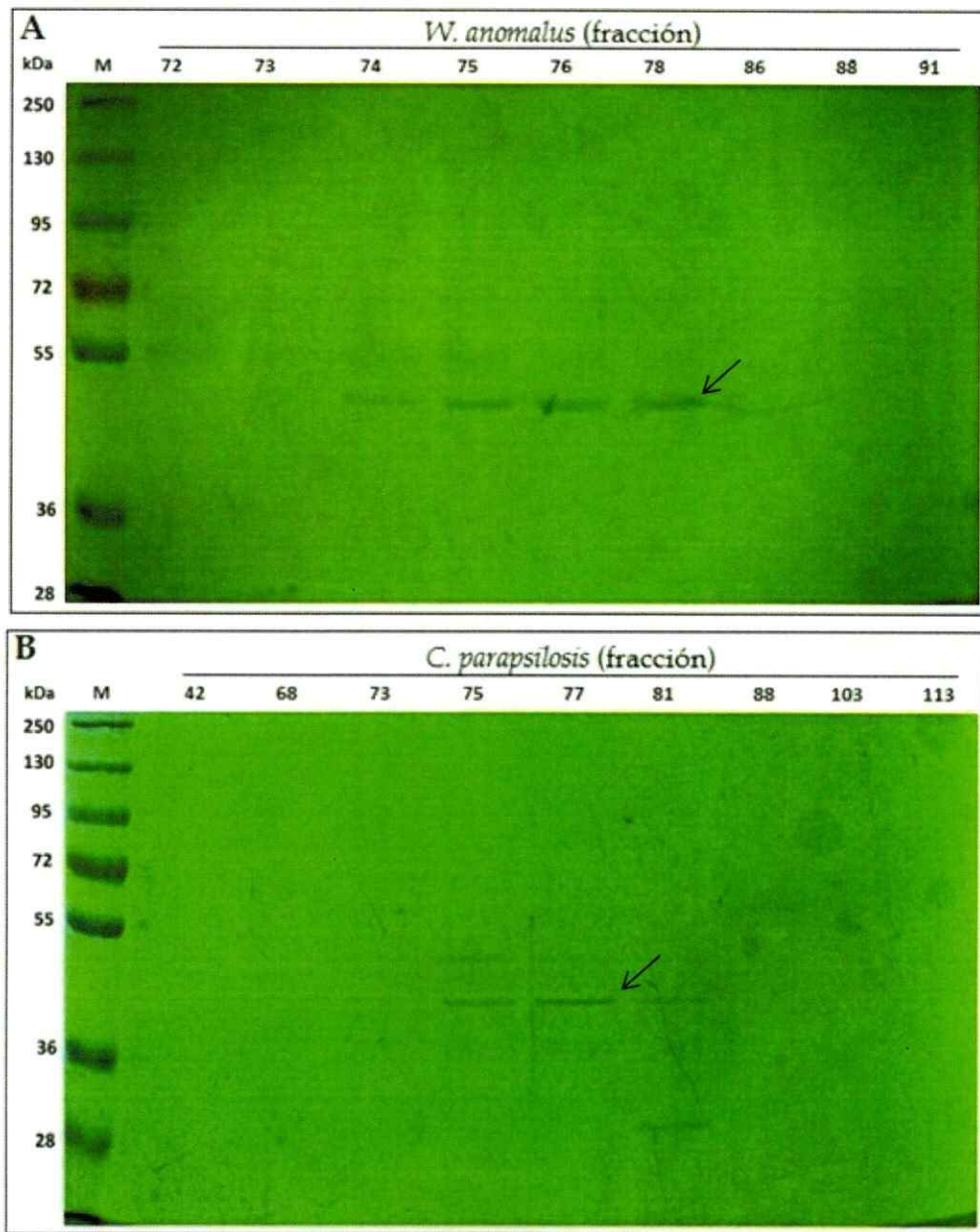


Figura 7: Electroforesis en gel SDS-PAGE de las fracciones obtenidas por cromatografía de exclusión molecular a partir de *W. anomalus* (A) y *C. parapsilosis* (B). M: marcador de peso molecular.

Las fracciones de cada muestra que presentaron actividad fueron mezcladas y se analizó su actividad sobre un césped sensible de *Mrakia. sp1* luego de un tratamiento térmico de 100°C por 15 min. La actividad disminuyó casi por completo luego del tratamiento térmico, observándose halos de un radio de muerte menor a 1 mm (Figura 8, A). Además, se confirmó la presencia de la proteínas por SDS-PAGE (figura 8, B).

Mediante análisis de las muestras por huella peptídica, se obtuvieron secuencias de fragmentos de entre seis a 33 aminoácidos. Los péptidos fueron analizados usando las herramientas BLASTp del National Center of Biotechnology Information (NCBI) con lo cual se encontró que estos presentan identidad con proteínas tales como kinasas, ligasas y algunos transportadores, entre otros (Tabla 5); sin embargo, no se encontró ninguno que presente identidad con alguna toxina killer conocida. Debido al gran número de péptidos obtenidos, en la tabla 5 sólo se muestran algunos de los péptidos con mayor porcentaje de identidad con alguna proteína de la base de datos.

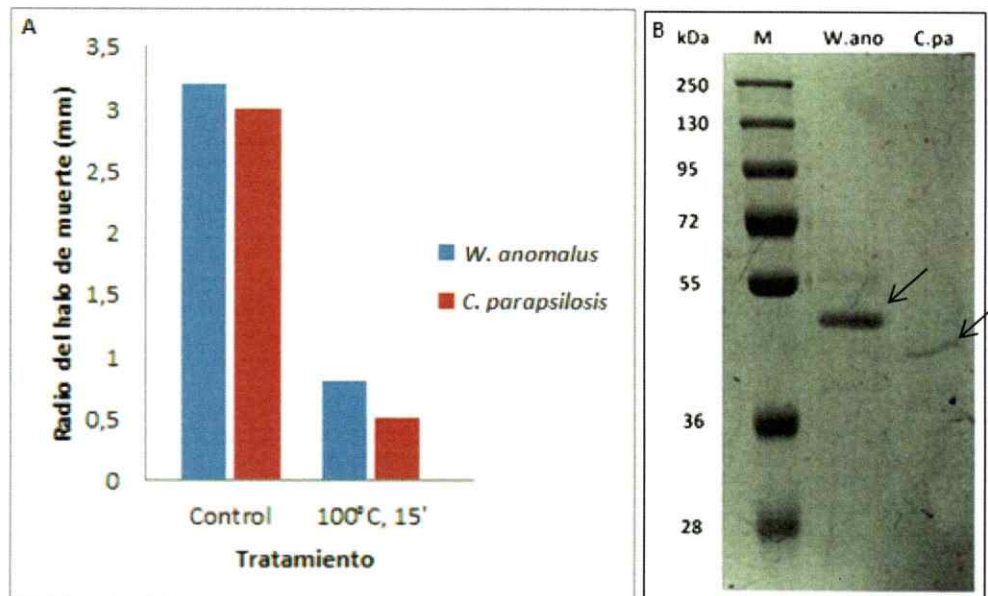


Figura 8: Perfil proteico y actividad de las muestras purificadas. Actividad de las toxinas purificadas a partir de *W. anomalus* y *C. parapsilosis*, antes y después de un tratamiento térmico de 100°C por 15 min, sobre un césped sensible de *M. sp1* (A) y su perfil proteico en un gel SDS-PAGE (B). W.ano: *W. anomalus*, C.pa: *C. parapsilosis*, M: Marcador de peso molecular.

Tabla 5. Identidad de los péptidos obtenidos por el método de huella peptídica

	Péptido	Identidad (BLASTp)	Porcentaje de identidad	Código de acceso
<i>W. anomalis</i>	RAHSSMVGFDLPQRA	Fosfoglicerato quinasa [<i>Saccharomyces cerevisiae</i> S288c]	100%	NP_009938.2
	KTIVWNGPPGVFEFEKF			
	KSSAAGNTVIIGGGDTATVAKKY			
	RLSVTLNNAWRRI	Avt1p [<i>Saccharomyces cerevisiae</i> FostersO]	93%	EGA61680.1
	KPNPKIIEKI	YGR180C [<i>Saccharomyces cerevisiae</i>]	100%	NP_011696.3
	RLQLDTNLRV	Transportador de Fe(2+) [<i>Saccharomyces cerevisiae</i> S288c]	100%	NP_012978.1
<i>C. parapsilosis</i>	KKHSSSSTIFPKN	Sut1p [<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Vin13]	92%	EGA78793.1
	KQEVSSNMGSSNMIRK	Skt5p [<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Vin13]	95%	EGA79990.1
	REVAEQSMAAKQEVSQSNMGSSNMIRK			
	RYTSTAEHAAIRS	Tah1p [<i>Saccharomyces cerevisiae</i> VL3]	92%	EGA87766.1
	MIIIVVLIPTHNRL	ESS1 [<i>Saccharomyces cerevisiae</i>]	100%	CAA60941.1

Análisis de dsRNA

Tomando en consideración las bases genéticas del fenotipo killer de levaduras, es posible que las toxinas secretadas por las levaduras *W. anomalus* y *C. parapsilosis*, así como también por el resto de las levaduras antárticas, sean codificadas por elementos genéticos extracromosómicos del tipo dsRNA. En trabajos previos, se determinó la existencia del fenotipo killer en nueve especies de levaduras a partir de una colección 24 aislados antárticos (Tabla 1), sin embargo, es posible que algunas de las 15 levaduras que no mostraron un fenotipo positivo a partir de los ensayos en placa si presenten actividad contra alguna levadura que no pertenece a nuestra colección, por lo que se analizó la presencia de este tipo de moléculas en todas ellas. Además, 17 aislados antártico de *X. dendrorhous* fueron incorporados a nuestra colección de levaduras y se ha reportado la presencia de moléculas de dsRNA en algunos aislados de esta especie, por lo que este análisis sirve como primer paso en la determinación de las bases genéticas del fenotipo killer en cada levadura y además permite tipificar cepas de levadura, debido a las diferencias en el número y tamaño de las moléculas de dsRNA que pueden presentar los aislados de una misma especie a partir de diferentes regiones geográficas.

Se analizó la existencia de moléculas de dsRNA en 41 cepas de levaduras antárticas (Tabla 2). Las extracciones de RNA total fueron realizadas a partir de pellets celulares obtenidos desde cultivo líquido y las muestras sometidas a caracterización enzimática con Nucleasa S1; degradación de ácidos nucleicos (DNA y RNA) de hebra simple, DNasa

l; degradación de DNA de hebra simple y doble, y RNasa A; degradación de RNA de hebra simple y doble. De esta forma, se encontró la presencia de moléculas de dsRNA en las levaduras *S. salmonicolor*, *M. psychrophila*, *M. gélida* y en cuatro aislados antárticos de *X. dendrorhous*: M11-1, M13-1, M13-2 y M13-3 (Tabla 6). La levadura *M. psychrophila* presenta al menos cuatro moléculas de dsRNA de diferentes tamaños, mientras que el resto de las levaduras presentan al menos entre una y dos moléculas. Los tamaños aproximados de las moléculas de dsRNA encontradas se indican en la Tabla 6.

Tabla 6. Tamaño de las moléculas de dsRNA presentes en levaduras antárticas

Levadura	Tamaño aproximado de las moléculas (pb)	Nombre de la molécula
<i>S. salmonicolor</i>	6000	S.sal-6000
	1500	S.sal-1500
<i>M. psychrophila</i>	7000	M.psy-7000
	3000	M.psy-3000
	2000	M.psy-2000
	1300	M.psy-1300
<i>M. gelida</i>	6000	M.ge-6000
	2000	M.ge-2000
<i>X. dendrorhous</i> M11-1	5000	M11-1-5000
<i>X. dendrorhous</i> M13-1	5000	M13-1-5000
<i>X. dendrorhous</i> M13-2	5000	M13-2-5000
<i>X. dendrorhous</i> M13-3	5000	M13-3-5000

RT-PCR con partidores específicos

Las muestras de RNA total provenientes de las levaduras *S. salmonicolor*, *M. psychrophila*, *M. gélida* y de los cuatro aislados antárticos de *X. dendrorhous*: M11-1,

M13-1, M13-2 y M13-3 fueron tratadas con Nucleasa S1 para degradar el ssRNA presente en la muestra. Las moléculas S.sal-6000, M.psy-7000, M.psy-3000, M.ge-6000, M11-1-5000, M13-1-5000, M13-2-5000 y M13-3-5000 (Tabla 6) fueron purificadas mediante GeneClean y utilizadas en una reacción de RT-PCR utilizando los pares de partidores indicados en la tabla 7, los cuales son específicos para motivos conservados de la RNA polimerasa viral de XdV-L1A y XdV-L1B. Se obtuvieron amplicones de un tamaño esperado a partir de las muestras de dsRNA provenientes de las levaduras *M. psychrophila*, *X. dendrorhous* M13-2 y *X. dendrorhous* M13-3 (tabla 7).

Tabla 7. Tamaño de los fragmentos obtenidos mediante RT-PCR con partidores específicos.

Levadura	dsRNA	Partidores			
		Mot4F-Mot5R	Mot4F-Mot6R	Mot4FB-Mot5RB	Mot4FB-Mot6RB
<i>S. salmonicolor</i>	S.sal-6000	-	-	-	-
<i>M. psychrophila</i>	M.psy-7000	-	300 pb	-	300 pb
	M.psy-3000	-	-	-	-
<i>M. gelida</i>	M.ge-6000	-	-	-	-
<i>X. dendrorhous</i> M11-1	M11-1-5000	-	-	-	-
<i>X. dendrorhous</i> M13-1	M13-1-5000	-	-	-	-
<i>X. dendrorhous</i> M13-2	M13-2-5000	250 pb	-	-	-
<i>X. dendrorhous</i> M13-3	M13-3-5000	-	-	200 pb	-

-: no se obtuvo producto de PCR

Se obtuvieron dos amplicones de 300 pb a partir de la muestra M.psy-7000, uno utilizando los partidores Mot4F-Mot6R y el otro utilizando los partidores Mot4FB-Mot6RB. Un amplicón de aproximadamente 250 pb fue obtenido a partir de la muestra M13-2-5000 utilizando los partidores Mot4F-Mot5R y un amplicón de 200 pb fue

obtenido a partir de la muestra M13-3-5000 utilizando los partidores Mot4FB-Mot5RB (Anexo 6).

Los amplicones fueron re-amplificados mediante PCR utilizando la enzima *Pfu* polimerasa y los fragmentos obtenidos fueron purificados mediante GeneClean (figura 9, A y B) y ligados al vector pBS utilizando la enzima T4 DNA ligasa. La bacteria electrocompetente *E. coli* DH5 α fue transformada con la mezcla de ligado y luego sembrada en placas LB-Amp-Xgal las cuales fueron incubadas a 37°C por 24 h. Se seleccionaron los clones recombinantes (reconocidos por su color blanco frente a los clones no recombinantes de color azul) y se realizó PCR colonia utilizando los partidores M13Fw y M13Rv a todos los clones blancos para verificar la presencia del vector recombinante. Se escogieron algunos clones recombinantes y se les realizó una extracción de DNA plasmidial utilizando el kit miniprep. Las muestras de DNA plasmidial fueron cuantificadas y enviadas a Macrogen Inc. Korea, para su respectiva secuenciación.

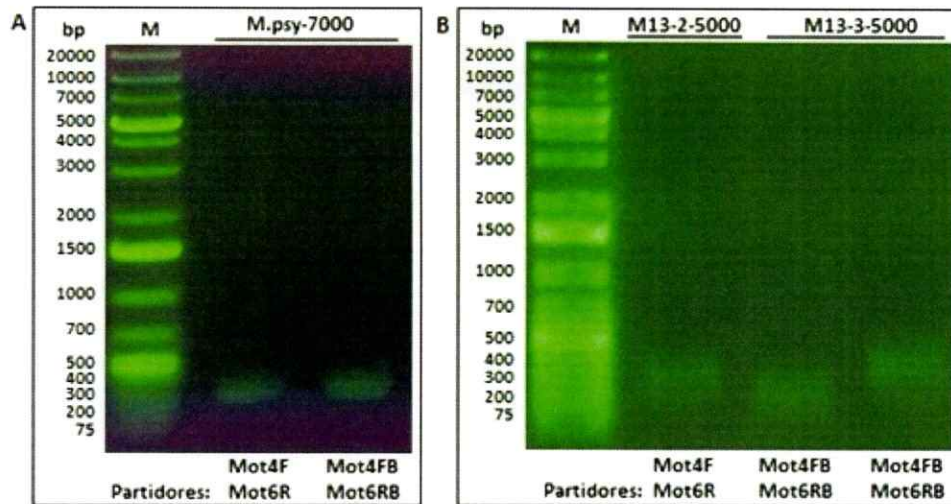


Figura 9: Amplicones de PCR de las muestras de dsRNA de *M. psychrophila* y de *X. dendrorhous* M13-2 y M13-3 purificados mediante GeneClean. Se muestran los productos de PCR obtenidos a partir de las muestras de dsRNA de *M. psychrophila* (A) y de *X. dendrorhous* M13-2 y M13-3 (B) mediante el uso de partidores específicos para regiones conservadas de la RNA polimerasa de los virus L1A y L1B de *X. dendrorhous*.

Las muestras S.sal-6000 y M.ge-6000, provenientes de *S. salmonicolor* y *M. gelida*, respectivamente, que no dieron amplicones a partir del RT-PCR con partidores específicos para motivos conservados de la RNA polimerasa viral de XdV-L1A y XdV-L1B fueron amplificadas mediante RT-PCR utilizando hexanucleótidos de secuencia aleatoria (random hexamer primers). La reacción de PCR fue llevada a cabo usando un gradiente de temperatura. Se obtuvo un amplificado a partir de la muestra S.sal-6000 en la reacción de PCR a 46, 50 y 54°C y un amplificado a partir de M.ge-6000 en la

reacción de PCR a 42 y 54°C (Tabla 8). Las muestras de dsDNA obtenidas a partir del RT-PCR fueron re-amplificadas utilizando la enzima *Pfu* polimerasa en una reacción de PCR a la temperatura a la cual fue obtenido el amplicón. Las muestras resultantes fueron purificadas por GeneClean y ligadas al vector pBS mediante la enzima T4 DNA ligasa y utilizadas para transformar a la cepa electrocompetente *E. coli* DH5 α . Los clones recombinantes fueron seleccionados por su color blanco. Se realizó PCR colonia utilizando los partidores M13Fw y M13Rv a todos los clones de color blanco y se seleccionaron los transformantes de interés. Se realizó una extracción del DNA plasmidial de los clones seleccionados mediante el kit Miniprep y las muestras de DNA plasmidial fueron cuantificadas y enviadas a Macrogen Inc. Korea, para su secuenciación.

Tabla 8. PCR en gradiente de temperatura con hexanucleótidos de secuencia aleatoria.

		PCR en gradiente de temperatura				
Levadura	dsRNA	38°C	42°C	46°C	50°C	54°C
<i>S. salmonicolor</i>	S.sal-6000	-	-	+	+	+
<i>M. gelida</i>	M.ge-6000	-	+	-	-	+

+: se obtuvo producto de PCR. -: no se obtuvo producto de PCR.

Las secuencias obtenidas fueron analizadas mediante la herramienta BLASTx y a partir de la muestra M.psy-7000 de *M. psychrophila* se obtuvieron dos secuencias diferentes, las cuales mostraron un alto porcentaje de identidad con los virus L1A y L1B de *X. dendrorhous*, mientras que a partir de la muestra M13-3-5000 de *X. dendrorhous* M13-

3, se obtuvo sólo una secuencia con un 100% de identidad con el virus L1B de *X. dendrorhous* (Tabla 9). Las muestras *S. salmonicolor* mostraron identidad con un factor de elongación de la traducción y con una deshidrogenasa, ambas de *X. dendrorhous*, mientras que las muestras de *M. gelida* sólo presentaron identidad con una quinasa de adhesión focal de *Gallus gallus*.

Tabla 9. Identidad de las secuencias obtenidas a partir de los dsRNAs de *M. psychrophila*, *X. dendrorhous* M13-3, *S. salmonicolor* y *M. gelida*.

Levadura	Identidad del dsRNA(Blastx)	Porcentaje de identidad	Código de acceso
<i>M. psychrophila</i>	RNA polimerasa dependiente de RNA (<i>X. dendrorhous</i> Virus L1B)	73%	AFH09414.1
	RNA polimerasa dependiente de RNA (<i>X. dendrorhous</i> Virus L1A)	68%	YP_007697651.1
<i>X. dendrorhous</i> M13-3	RNA polimerasa dependiente de RNA (<i>X. dendrorhous</i> Virus L1B)	100%	AFH09414.1
<i>S. salmonicolor</i>	Factor de elongación de traducción 1a (<i>X. dendrorhous</i>)	61%	CDZ96487.1
	17-beta-hidroxiesteroide deshidrogenasa 11 (<i>X. dendrorhous</i>)	100%	CDZ96201.1
<i>M. gelida</i>	Quinasa de adhesión focal (<i>G. gallus</i>)	70%	2JKK_A

Primer Walking

A partir de las secuencias obtenidas a partir de *M. psychrophila* se diseñaron dos pares de partidores divergentes M.psy-Fw1/M.psy-Rv1 y M.psy-Fw2/M.psy-Rv2 (Tabla 3). El dsRNA de *M. psychrophila* M.psy-700 se utilizó como molde en reacciones de RT-PCR con los partidores divergentes diseñados a partir de los extremos de las secuencias

obtenidas y con hexanucleótidos de secuencia aleatoria con el fin de extender la hebra por primer walking. Los amplicones obtenidos fueron re-amplificados utilizando la enzima *Pfu* polimerasa y se obtuvieron fragmentos de dsDNA de entre 300 a 1000 pb los cuales fueron purificados mediante GeneClean (Figura 10) y ligados al vector pBS utilizando la enzima T4 DNA ligasa. La bacteria electrocompetente *E. coli* DH5 α fue transformada con cada vector recombinante y la cepa fue sembrada en placas LB-Amp-Xgal las cuales fueron incubadas a 37°C por 24 h. Los clones recombinantes fueron seleccionados por su color blanco y utilizados como molde en una reacción de PCR colonia con los partidores M13Fw y M13Rv para verificar la presencia del vector recombinante. Se realizó una extracción de DNA plasmidial mediante el kit Miniprep a los clones recombinantes y las muestras fueron cuantificadas y enviadas a Macrogen Inc. Korea para su secuenciación.

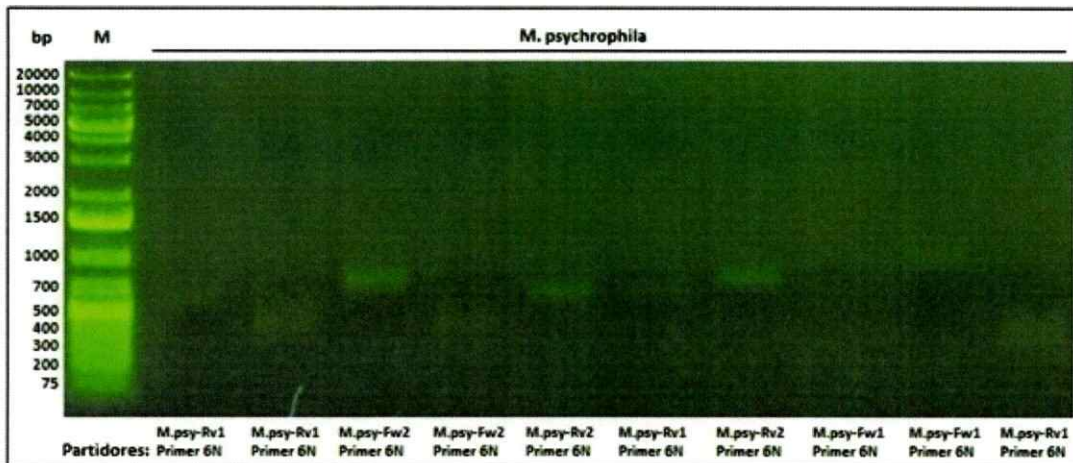


Figura 10: Productos de PCR de las muestras de *M. psychrophila* con partidores divergentes y hexanucleótidos de secuencia aleatoria, purificados por GeneClean.

Mediante PrimerWalking se obtuvieron nuevas secuencias de las moléculas de *M. psychrophila* y mediante Blastx se analizó la identidad de estas (tabla 10). No fue posible diseñar contigs para obtener la secuencia de una región consenso del dsRNA de *M. psychrophila*, sin embargo, algunas secuencias obtenidas si muestran identidad con los virus XdV-L1A y XdV-L1B. A pesar que los partidores fueron diseñados a partir de regiones con un alto porcentaje de identidad con la RNA polimerasa dependiente de RNA del virus L1A y L1B de *X. dendrorhous*, mediante Blastx se logró identificar una secuencia con un 48% de identidad con la proteína de cápside del virus XdV-L1A (Tabla 10), la cual está separada por una distancia de mas de 2.000 pb de la región que codifica para la RNA polimerasa dependiente de RNA en el virus XdV-L1A (Figura 11), por lo que es posible que los partidores diseñados correspondan a regiones que se encuentran repetidas en los dsRNAs de *M. psychrophila*.

Tabla 10: Identidad de las secuencias obtenidas a partir de los dsRNAs de *M. psychrophila* mediante primer walking.

Partidores	Identidad del dsRNA (BLASTx)	Porcentaje de identidad	Código de acceso
M.psy-Fw1/6N	Imidazol propionasa (<i>Corynebacterium tuberculostearicum</i>)	100%	WP_005327582.1
	Proteína de unión al sustrato del transportador ABC (<i>Propionibacterium acnes</i>)	99%	WP_070728157.1
M.psy-Rv1/6N	Proteína de cubierta (<i>Ustilaginoidea virens</i> RNA Virus L1)	44%	YP_009094184.1
M.psy-Fw2/6N	RNA polimerasa dependiente de RNA (<i>X. dendrorhous</i> Virus L1A)	73%	YP_007697651.1
	Proteína de la cápside (<i>X. dendrorhous</i> Virus L1A)	48%	YP_007697650.1
M.psy-Rv2/6N	RNA polimerasa dependiente de RNA (<i>X. dendrorhous</i> Virus L1B)	36%	AFH09414.1

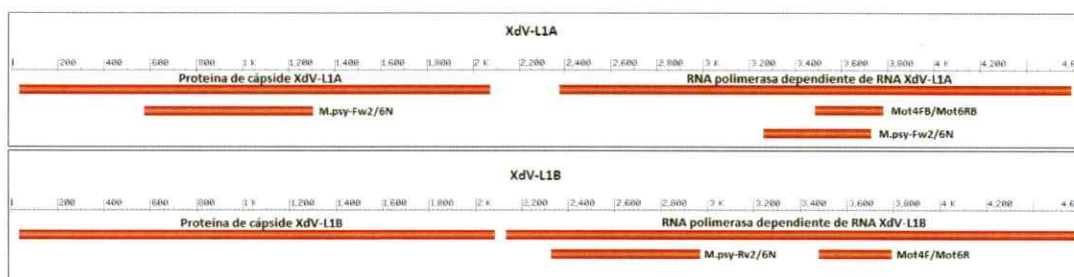


Figura 11: Alineamiento de las secuencias obtenidas con los virus L1A y L1B de *X. dendrorhous*. Las secuencias obtenidas se indican con el nombre de los partidores usados en la reacción de PCR.

DISCUSIÓN

Actividad antimicrobiana

C. albicans y *S. aureus* son patógenos comensales oportunistas que pueden llegar a causar infecciones graves en humanos y que requieren de tratamiento médico (da Silva y col, 2016; Goudarzi y col, 2016). Ninguna de las 24 levaduras antárticas analizadas presentó actividad contra cepas de laboratorio de estas especies, a partir de muestras de extractos proteicos extracelulares. La levadura *C. parapsilosis* presentó actividad antimicrobiana contra la bacteria *K. geyteca*, una cepa bacteriana de laboratorio del género *Klebsiella*, que se caracteriza por ser un grupo de bacterias Gram negativas de la familia *Enterobacteriaceae*, causantes de enfermedades infecciosas y resistentes a una amplia variedad de antimicrobianos de importancia clínica (Famiglietti y col, 2005). A pesar que sólo una levadura antártica mostró actividad en estos ensayos, este resultado indica que las levaduras antárticas también pueden presentar actividad antibacteriana y potencialmente podrían llegar a ser de utilidad para el desarrollo de tratamientos contra infecciones causadas por bacterias Gram negativas.

Actividad killer bajo diferentes condiciones

Las muestras de extractos proteicos de *W. anomalus* y *C. parapsilosis* poseen un perfil de actividad a pH bajo, lo cual se corresponde con los antecedentes, donde ha sido

descrito que el rango de pH al cual las toxinas son activas varía entre 3,0 y 6,0, con un óptimo entre 4,0 y 5,0, razón por la cual el pH del medio es una de las condiciones más importantes para detectar este tipo de actividad. La concentración salina del medio es otro factor que puede afectar la actividad de las toxinas. Las muestras analizadas mostraron actividad a concentraciones de sal menores al 1%, mientras que concentraciones iguales o superiores a esto resultaron inhibitorias. La concentración salina a la cual las toxinas son activas tiene relación directa con halotolerancia de la levadura que las produce, donde es común que especies halótolerantes tales como *M. frigida* y *Debaryomyces hansenii* secreten toxinas activas a elevadas concentraciones de sal, entre un 3 y 8%, mientras que a menores concentraciones disminuye tanto la producción de las toxinas así como también la actividad de éstas (Hua y col, 2010; Breuer y Harms, 2006). Por lo tanto, estos resultados nos sugiere que probablemente las levaduras killer *W. anomalus* y *C. parapsilosis*, aisladas desde la antártica, no son halotolerantes. En cuanto a la temperatura a la cual las toxinas siguen siendo activas, es sabido que las levaduras de origen antártico se relacionan con una mayor estabilidad proteica a bajas temperaturas y, de hecho, todas las enzimas y proteínas producidas por levaduras psicrófilas tienen su actividad a temperaturas de aproximadamente 0 a 30°C, mientras que a temperaturas superiores, ocurre una denaturación de sus enzimas y proteínas (Hua y col, 2010). Sin embargo, las muestras de extractos proteico de las levaduras psicrotolerantes *W. anomalus* y *C. parapsilosis* fueron capaces de retener su actividad luego de un tratamiento térmico de 100°C por 1 h y de 45°C por 4 h. Ya que

las toxinas purificadas no fueron capaces de retener por completo su actividad luego de un tratamiento de 100°C por 15 min, es posible que la tolerancia térmica observada en las muestras de extractos proteicos (fracción 80) se deba a una mayor concentración de proteínas en la muestra (Law & Leaver, 1997). Toxinas con actividad estable a 37°C (temperatura corporal) son de gran interés en el área de la biotecnología médica, pues podrían tener aplicaciones en el tratamiento contra infecciones causadas por levaduras patógenas en humanos (Breuer y Harms, 2006).

En la purificación de las muestras de extractos proteicos de *W. anomalus* y *C. parapsilosis* (fracción 80) mediante filtros de diferentes límites de corte, se observó que la actividad killer se vio favorecida en la fracción entre 30 y 50 kDa. Al separar esta fracción mediante cromatografía de exclusión molecular, una proteína de 53 y 46 kDa fue asociada a la actividad killer en *W. anomalus* y *C. parapsilosis*, respectivamente. Los datos obtenidos mediante el análisis de las muestras por huella peptídica no permiten identificar la identidad de las proteínas; sin embargo, es muy posible que las proteínas killer secretadas por las levaduras *W. anomalus* y *C. parapsilosis* aisladas desde la antártica difieran de las toxinas descritas hasta ahora por lo cual no es posible su identificación mediante comparación con una base de datos.

Análisis de dsRNAs

A pesar que los EGEs del tipo dsRNA en levaduras son considerados elementos críticos en función (Baeza y col, 2012), existe una fuerte relación entre la presencia de virus de

dsRNA y el fenotipo killer en levaduras, siendo *S. cerevisiae* el mejor ejemplo de ello. De las 41 cepas analizadas en este trabajo, se confirmó la presencia de este tipo de moléculas en las levaduras *S. salmonicolor*, *M. psychrophila*, *M. gelida* y en cuatro aislados antárticos de *X. dendrorhous*. En trabajos previos se confirmó la existencia del fenotipo killer en la levadura *M. gelida*, la cual presentó actividad contra nueve especies de levaduras antárticas; *D. fristingensis*, *L. fragaria*, *Rh. laryngis*, *L. creatinivora*, *C. sake*, *Cr. victoriae*, *G. antarctica*, *M. blollopis* y *Leuconeurospora sp1* (Socías, G., 2015); sin embargo, la molécula de dsRNA presente en esta cepa muestra identidad (a partir del producto de traducción *in silico*) con un factor de elongación de la traducción y con una quinasa de adhesión focal, por lo que no es posible asociar la presencia de esta molécula con el fenotipo killer en esta levadura. A partir de la levadura *M. psychrophila* se obtuvieron secuencias con una alta identidad a los virus L1A y L1B de *X. dendrorhous*. Aunque estos virus no están relacionados con la actividad killer observada en *X. dendrorhous* (Flores y col, 2015), es posible que los dsRNAs encontrados formen parte de un sistema killer propio de la levadura *M. psychrophila*. Debido a que el fenotipo killer está definido por la presencia de un virus tipo M y un virus tipo L, es necesario analizar la identidad de las otras moléculas de dsRNA presentes en la levadura *M. psychrophila* con el fin de identificar la presencia de un virus M. Aunque no se evaluó la actividad killer de las cepas de *X. dendrorhous*, se logró detectar la existencia de moléculas de dsRNA en cuatro de los 17 aislados antárticos de esta especie, confirmando además la identidad de las moléculas en el aislado M13-3, la

cual presenta un 100% de identidad con el virus XdV-L1B. A pesar que no se logró obtener un clon transformante a partir del dsRNA del aislado M13-2, se logró obtener un amplificado utilizando los partidores Mot4F-Mot5R, específicos para un motivo conservado en el virus XdV-L1A, por lo que este se sugiere como identidad de tal amplicón. *X. dendrorhous* fue aislada por primera vez desde exudados de árboles en regiones montañosas de Alaska y Japón. Luego, otros aislados fueron obtenidos desde regiones frías de Rusia y Finlandia, y más recientemente desde Italia, Alemania, Estados Unidos, Argentina y Chile (Contreras y col, 2015). *X. dendrorhous* es una levadura de gran interés comercial por su producción de carotenoides y sólo recientemente ha sido aislada desde el continente antártico, por lo que los resultados obtenidos en este trabajo sirven para una mejor caracterización de los aislados antárticos.

CONCLUSIONES

La levadura *C. parapsilosis* presenta actividad contra la bacteria *K. geyteca*, siendo la única levadura en presentar actividad antibacteriana contra alguno de los microorganismos de importancia médica estudiados.

Las muestras de extractos proteicos de las levaduras *W. anomalus* y *C. parapsilosis* presentan tolerancia al tratamiento térmico y son mayormente activas en un rango de pH bajo (4,6-5,0) y a bajas concentraciones de sal (0,0-0,1%).

M. psychrophila presenta al menos cuatro moléculas del tipo dsRNA y se requiere de nuevos estudios para determinar si alguna de ellas codifica una toxina killer, mientras que para el resto de las levaduras antárticas, el fenotipo killer no estaría codificado por elementos genéticos del tipo dsRNA.

BIBLIOGRAFÍA

- Baeza, M., Bravo, N., Sanhueza, M., Flores, O., Villarreal, P., & Cifuentes, V. (2012). Molecular characterization of totiviruses in *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Virology Journal*, 9(1), 140. <http://doi.org/10.1186/1743-422X-9-140>
- Baeza, M., Flores, O., Carrasco, M., Rozas, J., Oviedo, V., Barahona, S., & Cifuentes, V. (2010). The inter-generic fungicidal activity of *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Journal of Microbiology (Seoul, Korea)*, 48(6), 822–828. <http://doi.org/10.1007/s12275-010-0180-0>
- Baeza, M., Sanhueza, M., & Cifuentes, V. (2008). Occurrence of killer yeast strains in industrial and clinical yeast isolates. *Biological Research*, 41(2), 173–182.
- Baeza, M., Sanhueza, M., Flores, O., Oviedo, V., Libkind, D., & Cifuentes, V. (2009). Polymorphism of viral dsRNA in *Xanthophyllomyces dendrorhous* strains isolated from different geographic areas. *Virology Journal*, 6, 160. <http://doi.org/10.1186/1743-422X-6-160>
- Blakesley, R. W., & Boezi, J. A. (1977). A new staining technique for proteins in polyacrylamide gels using Coomassie brilliant blue G250. *Analytical Biochemistry*, 82(2), 580–582. [http://doi.org/10.1016/0003-2697\(77\)90197-X](http://doi.org/10.1016/0003-2697(77)90197-X)
- Breuer, U., & Harms, H. (2006). *Debaryomyces hansenii* — an extremophilic yeast with biotechnological potential. *Yeast*, 23(6), 415–437. <http://doi.org/10.1002/yea.1374>
- Bussey, H., Sacks, W., Galley, D., & Saville, D. (1982). Yeast Killer Plasmid Mutations Affecting Toxin Secretion and Activity and Toxin Immunity Function. *Molecular and Cellular Biology*, 2(4), 346–354.
- Castillo, A., & Cifuentes, V. (1994). Presence of double-stranded RNA and virus-like particles in *Phaffia rhodozyma*. *Current Genetics*, 26(4), 364–368. <http://doi.org/10.1007/BF00310502>
- Contreras, G., Barahona, S., Sepúlveda, D., Baeza, M., Cifuentes, V., & Alcaíno, J. (2015). Identification and analysis of metabolite production with biotechnological potential in *Xanthophyllomyces dendrorhous* isolates. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 31(3), 517–526. <http://doi.org/10.1007/s11274-015-1808-3>

- da Silva Dantas, A., Lee, K. K., Raziunaite, I., Schaefer, K., Wagener, J., Yadav, B., & Gow, N. A. (2016). Cell biology of *Candida albicans*–host interactions. *Current Opinion in Microbiology*, *34*, 111–118. <http://doi.org/10.1016/j.mib.2016.08.006>
- Duong-Ly, K. C., & Gabelli, S. B. (2014). Salting out of proteins using ammonium sulfate precipitation. *Methods in Enzymology* (1st ed., Vol. 541). Elsevier Inc. <http://doi.org/10.1016/B978-0-12-420119-4.00007-0>
- El Baz, A. & Shetaia, Y. (2005). Evaluation of Different Assays for the Activity of Yeast Killer Toxin. *International Journal of Agriculture and Biology*, *7*(6), 1003–1006.
- Famiglietti, A., Quinteros, M., Vázquez, M., Marín, M., Nicola, F., Radice, M., Soloaga, R. (2005). Consensus for antimicrobial susceptibility testing for Enterobacteriaceae. Subcommittee on Antimicrobials, SADEBAC (Argentinian Society of Clinical Bacteriology), Argentinian Association of Microbiology. *Revista Argentina de Microbiologia*, *37*(1), 57–66.
- Flores, O., Alcaíno, J., Fernandez-Lobato, M., Cifuentes, V., & Baeza, M. (2015). Characterization of virus-like particles and identification of capsid proteins in *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Virus Genes*, 253–259. <http://doi.org/10.1007/s11262-015-1171-3>
- Ganter, P., & Starmer, W. (1992). Killer factor as a mechanism of interference competition in yeasts associated with cacti. *Ecology*, *73*, 54–67. Retrieved from <http://www.jstor.org/stable/1938720>
- Goudarzi, M., Fazeli, M., Goudarzi, H., Azad, M., & Seyedjavadi, S. S. (2016). Spa Typing of *Staphylococcus aureus* Strains Isolated From Clinical Specimens of Patients With Nosocomial Infections in Tehran, Iran, 9(7). <http://doi.org/10.5812/ijjm.35685.Research>
- Hodgson, V. J., Button, D., & Walker, G. M. (2003). Anti-*Candida* activity of a novel killer toxin from the yeast. *MiCrObiology*, *141*(1995), 2003–2012.
- Hua, M.-X., Chi, Z., Liu, G.-L., Buzdar, M. A., & Chi, Z.-M. (2010). Production of a novel and cold-active killer toxin by *Mrakia frigida* 2E00797 isolated from sea sediment in Antarctica. *Extremophiles : Life under Extreme Conditions*, *14*(6), 515–21. <http://doi.org/10.1007/s00792-010-0331-6>
- Hutchins, K., & Bussey, H. (1983). Cell wall receptor for yeast killer toxin: involvement of (1→6)-β-d-glucan. *Journal of Bacteriology*, *154*(1), 161–169. Retrieved from <http://jb.asm.org/content/154/1/161.short>

- Kurtzman, C., & Fell, J. (1998). XX The Yeasts, A Taxonomic Study. The yeasts-a taxonomic study. Retrieved from <http://www.cabdirect.org/abstracts/19521101660.html>
- Law, A. J. R., & Leaver, J. (1997). Effect of Protein Concentration on Rates of Thermal Denaturation of Whey Proteins in Milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(42), 4255–4261.
- Lehmann, P., Lemon, M., & Ferencak, W. (1987). Antifungal compounds (“killer factors”) produced by *Kluyveromyces species* and their detection on an improved medium containing glycerol. *Mycologia*, 79(5), 790–794. Retrieved from <http://www.jstor.org/stable/3807833>
- Liu, G.-L., Wang, K., Hua, M.-X., Buzdar, M. A., & Chi, Z.-M. (2012). Purification and characterization of the cold-active killer toxin from the psychrotolerant yeast *Mrakia frigida* isolated from sea sediments in Antarctica. *Process Biochemistry*, 47(5), 822–827. <http://doi.org/10.1016/j.procbio.2012.02.016>
- Magliani, W., Conti, S., Gernoli, M., Bertolotti, D., & Polonelli, L. (1997). Yeast Killer Systems. *Clinical Microbiology Reviews*, 10(3), 369–400. Retrieved from <http://cmr.asm.org/content/10/3/369.short>
- Marquina, D., Santos, A., & Peinado, J. (2002). Biology of killer yeasts. *International Microbiology: The Official Journal of the Spanish Society for Microbiology*, 5(2), 65–71. <http://doi.org/10.1007/s10123-002-0066-z>
- Salgado, J., Abranches, J., Hagler, A. N., & Mendonça-hagler, L. C. (2002). Mycocinogenic yeasts isolated from Amazon soils of the Maracá Ecological Estation, Roraima-Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 5(33), 230–235.
- Satyanarayana, T., & Kunze, G. (Eds.). (2009). *Yeast Biotechnology: Diversity and Applications*. Dordrecht: Springer Netherlands. <http://doi.org/10.1007/978-1-4020-8292-4>
- Schmitt, M., & Breinig, F. (2002). The viral killer system in yeast: from molecular biology to application. *FEMS Microbiology Reviews*, 26. Retrieved from <http://femsre.oxfordjournals.org/content/26/3/257.abstract>
- Schmitt, M., & Breinig, F. (2006). Yeast viral killer toxins: lethality and self-protection. *Nature Reviews. Microbiology*, 4, 212–221. <http://doi.org/10.1038/nrmicro1347>

- Sociás, G. (2015). Análisis de la actividad micocida de extractos proteicos extracelulares de levaduras psicotolerantes. Seminario de título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al título de Ingeniero en Biotecnología Molecular. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
- Starmer, W., Ganter, P., & Aberdeen, V. (1987). The ecological role of killer yeasts in natural communities of yeasts. *Canadian Journal of Microbiology*, 33, 783–796. Retrieved from <http://www.nrcresearchpress.com/doi/abs/10.1139/m87-134>
- Turkiewicz, M., Pazgier, M., Kalinowska, H., & Bielecki, S. (2003). A cold-adapted extracellular serine proteinase of the yeast *Leucosporidium antarcticum*. *Extremophiles*, 7(6), 435–442. <http://doi.org/10.1007/s00792-003-0340-9>
- Wang, Q., Hou, Y., & Yan, P. (2012). Optimization of Cold-Adapted Lysozyme Production from the Psychrophilic Yeast *Debaryomyces hansenii* Using Statistical Experimental Methods. *Journal of Food Science*, 77(6), 337–342. <http://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2012.02711.x>
- Wickner, R. (1989). Yeast virology. *The FASEB Journal*, 3, 2257–2265. Retrieved from <http://www.fasebj.org/content/3/11/2257.short>
- Wickner, R. (1996). Double-Stranded RNA Viruses of *Saccharomyces cerevisiae*. *MICROBIOLOGICAL REVIEWS*, 60(1), 250–265.
- Wilson, C., & Whittaker, P. (1989). Factors Affecting Activity and Stability of the *Kluyveromyces lactis* Killer Toxin. *Applied and Environmental Microbiology*, 55(3), 695–699.

ANEXO

1. Actividad de las muestras bajo diferentes condiciones de pH sobre un césped de *Cr. gastricus*.

	Halo de muerte (mm) bajo diferentes condiciones de pH del césped			
	pH 4,6	pH 5,0	pH 6,0	pH 7,0
<i>W. anomalus</i> F80	3,5	3,5	0	0
<i>W. anomalus</i> F60	0	0	0	0
<i>C. parapsilosis</i> F80	4	4	0	0
<i>C. parapsilosis</i> F60	0	0	0	0

F80: fracción obtenida con 80% de saturación de sulfato de amonio, F60: fracción obtenida con 60% de saturación de sulfato de amonio

2. Actividad de las muestras bajo diferentes condiciones de pH sobre un césped de *Rh. laryngis*.

	Halo de muerte (mm) bajo diferentes condiciones de pH del césped			
	pH 4,6	pH 5,0	pH 6,0	pH 7,0
<i>W. anomalus</i> F80	5	4,5	3	0
<i>W. anomalus</i> F60	0	0	0	0
<i>C. parapsilosis</i> F80	5	4	3	0
<i>C. parapsilosis</i> F60	0	0	0	0

F80: fracción obtenida con 80% de saturación de sulfato de amonio, F60: fracción obtenida con 60% de saturación de sulfato de amonio

3. Actividad de las muestras bajo diferentes condiciones de concentración salina sobre un césped de *Rh. laryngis*.

	Halo de muerte (mm) bajo diferentes condiciones de concentración salina				
	0% NaCl	0,1% NaCl	0,5% NaCl	1% NaCl	2% NaCl
<i>W. anomalus</i> F80	6	5	2,5	0	0
<i>W. anomalus</i> F60	0	0	0	0	0
<i>C. parapsilosis</i> F80	5	5,5	2,5	0	0
<i>C. parapsilosis</i> F60	0	0	0	0	0

F80: fracción obtenida con 80% de saturación de sulfato de amonio, F60: fracción obtenida con 60% de saturación de sulfato de amonio

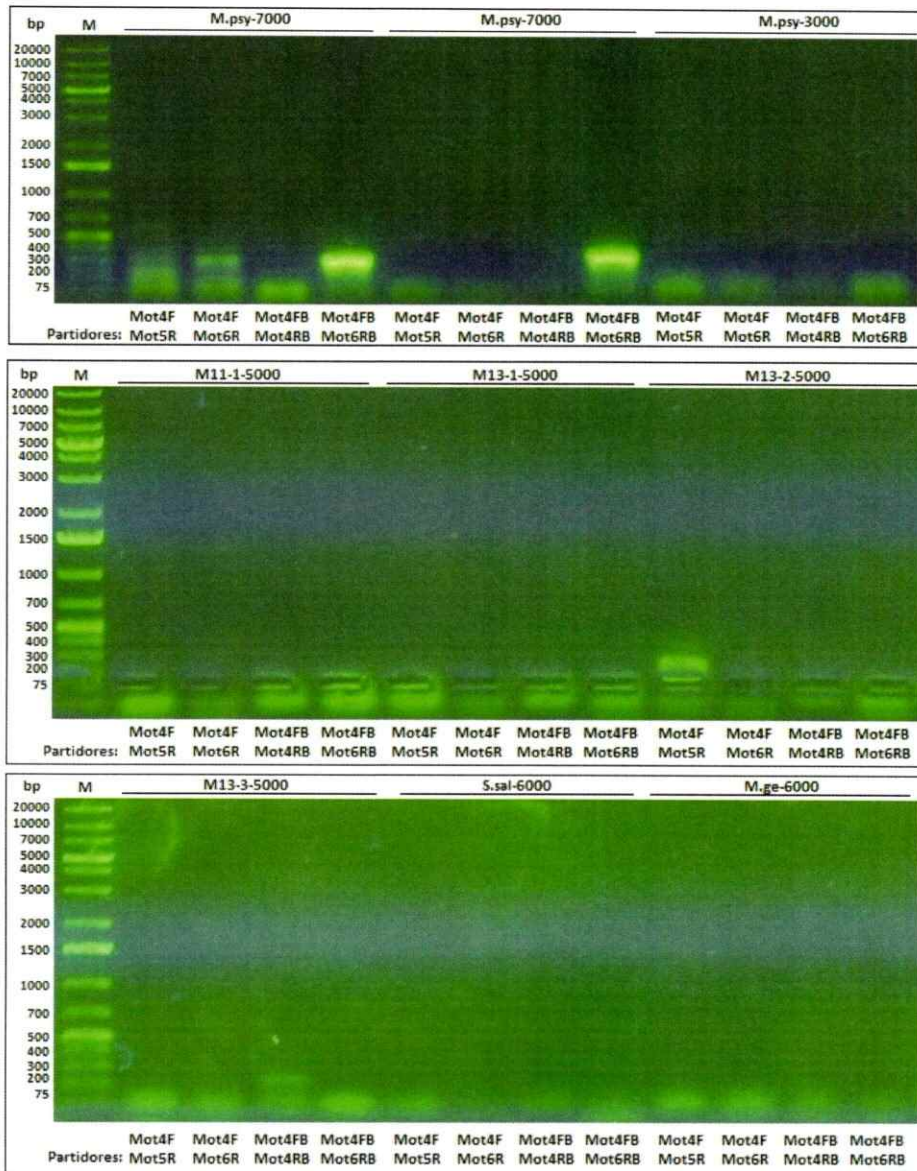
4. Actividad de las muestras bajo diferentes condiciones de temperatura sobre un césped de *Leuconeuropa sp1*.

Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Halo de muerte (mm)	
		<i>W. anomalus</i>	<i>C. parapsilosis</i>
Control	0	2,1	5,5
100	15	1,9	5,4
100	30	2,1	5,1
100	45	1,8	4,5
100	60	1,7	4,3
30	240	1,9	5,4
37	240	2	5
45	240	1,9	4,8

5. Actividad de las muestras bajo diferentes condiciones de temperatura sobre un césped de *Rh. laryngis*.

Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Halo de muerte (mm)	
		<i>W. anomalus</i>	<i>C. parapsilosis</i>
Control	0 min	2,6	5,3
100 °C	15 min	2,5	4,8
100 °C	30 min	2	5
100 °C	45 min	1,4	4,9
100 °C	60 min	1,5	4,5
30 °C	4 h	1,9	5,3
37 °C	4 h	2	5,4
45 °C	4 h	1,8	5,3

6. Amplicones obtenidos por RT-PCR mediante el uso de partidores específicos



7. Secuencias obtenidas a partir de los dsRNAs de *M. psychrophila*

GAGGACTTCAATAGTCAACATAGCATCAGCTCGATGCAAGCGGTGATCGATGCTTATGGCGAGGTTTAC
AGAGGCGTATTAGCGATGAACAGATGGAAGCGCTCAAGTGGACTTCAGACTCGATCCGCACGCAGAT
AATCCATGACAACGTTGGGCTGAAGCAGGAGTACAGGGCGAAAGGGACTGTTGTCAGGATGGAGA
TTGACGACTTTCGTA AACTCTGTGCTCAACGCAGTCTACACCGACAACTGTGTGGTGAGTCGAAGATG
CGAGATTCAAGTTTGACAACGGAGACGATGTCT

GAGGACTTCAATAGTCAACACAAAGCAGGTTCTATGAAAGCGGTGATAGATGCATACATCACCGTGTTT
AGAGGTCAGCTGTCACCGGAGCAGGTCACGGCTGCTGAATGGACTTCAGAACTGTGCGGCAAGCAAAC
GATTCATGATAACGTGGGATTGAAACAACTTACGAAGCAAAGGGGACCTTGCTGTCAGGCTGGAGAC
TAACTACTTTCATGAACAGTGTCTTGAACACTACATATACACAAGGATGATCGCACGTGATCAACTGGTTCA
TAAAGGAAGTCTGCACAACGGAGACGATGTCT

TGCTGTCAGGCTGGAGACTAAGTATGAGTGGGGAAAACAGAGGGCCATTTACGGGACCGACGTCACCA
GCTACGTTCTGTCCACTTTGCATTTTACAACGTGAAAACGTGCTGCCAAACAGTTCCAGTCGGAAG
CGACGCCTCCGAAGCGAACGTGATCAACAGGGTCTCAGTACGATAGCAGATAAATCGCCATTCTGCCT
AGACTTTGAGGATTTCAACAGCCAACATAGCGCAAGTAGCATGGCCGCCGTGATACACGCGTACATAGA
CACGTTCAAGTTAACGCTGACGGAGGAGCAAATCCAAGCAGCACTGTGGACAGCAGAATCAATAGCGA
ATCAAGTCATCCACGACAACGTCGGCCTCAAACAAGTCTACGAAGCTAGAGGAACCCTGCTCTCAGGAT
GGCGGCTCACCGTTTCATGAAAGTAGTTAGTCTCCAGCCTGACAGCA

TGCTGTCAGGCTGGAGACTAAAGGTACATTGAGGATCGCGTCCAATTATTGGAACATCCCTATGTCTT
GAGGTACAACGCCAATGACCGAGAAGCAGCCACATTCTACTACTCTCACTTGTTTGGCAGAGCGGGACA
GAGTGCCTAAATGTCGACGTCGTA TCTCCCGCTCTAGATGTTGCTCAATTATCTCTAGACCCGATCGGC
GGTATAGTCAGAGGGTTCTTAGATCCAGACGCTTTGCCATGGACTAAACCGGACCTGATCTGGATGTGG
ATCAAGGATTACGTCGAATTGAACAGGTTGGAGACAGCTTTGCGCGCTGCTTTGAAACCATGAGTGCT
ATAGCTTGCCAACCGCTGCCATCTTACCAGGAAAGCGCCACTGGGATAGAGCTTCGATCCAATTGACA
TTGACACCATCTCACCTACCAGAGCTAGGATACCCAGCAATCTGGAAGGAGAACGCTACGTTAATGAC
ACTAATGCACATGACTTCATACTGGCTGAAACGACATCCCCAGGTCGTATATGCTCACGGCGGCAGTT
ATGAATTACATGGTATGGGTGGGTCTGTACGGTCTAGTCATGAATTACACGGCTGACAAGTCAAACCTGG
CTCAACACCTTCAGAGCAGCGGACAACGAAATGTCAGTGTTGCGTGAGGTCCATGCCCGAGCAGCCATT
CTCAGCTACTTAGTCTCCAGCCTGACAGCA

GATTCTGAAGTCCATTGAGCATATATCGGGGAAACAGATCAGCGTACTACGCGGCTATGGATAACTTG
ATAGGTGGCGTAGTCAGACCGACAGCTCTGAGCTTTACTTTGCGGTTGCTGAGATACAGGATTACGAC
TACTGGTTACCTTGCTCTGAGTACTCTTAAACCGGATGCGGCGAGGAGAACCAACTCAAGGGCTTGG
AGTGCAAGTGGTGCCGGTGACAAAGGCCTTCGGGAGCGTGAAAGAGTGGGATCTGCCTGTATCTAAGGT
GACAGCTCAACACCATGTACACTACAACATTAGAGAAGTAGCATTGGCGCTGGCGTCTGTGCGGGTAG
GCGAGGTGAACATCTGCAGGAAGCTGAAAGCAATGACAGGGATGCATCAGTCGGCACTTGCTGGATTCT
TTGCTGTGGTTGAATCACTGTACACGAGTTGATGTCCTTAGTTGACAGGTTTGGCTGCTGGGACGAG
CACGACATATCGACGCTGGCTAAACACCTTAAAGCCGACGTCAGGAGGACCAAGCTCATGAAAACAAC
TACCCGACTAGCCTGCTCCCTTTGTTGAAAGCTGACGTTCTGGTTAACC GCGGTGTAGGCGGTGCTGAAT
GGACTTCAGAATC

8. Secuencias obtenidas a partir de los dsRNAs de *X. dendrorhous* M13-3

GAAGATTTCAACAGTCAACATAGCGTGTGTCGTC AATGAAGGCAGTAATCTATGCTTACGGTGATGTATAC
AGGCAGGTGTTACAGAGCAGCAACTGGAAGCTCTGGCATGGACAGCTGAATCATTAGATGACGTATC
AGTTAACGATAATGTAGGGCTCAAACAAACGTACAAATCGAACGCGACGCTATTATCGGGCTGGAGGT
TAACGACATGAAGATTTCAACAGTCAACATAGGGCTGGAGGTTAACGACATGAAGATTTCAACAGTCAA
CATAGGGCTGGAGGTTAACGACAT