

UCH-FC  
MAG-B  
C.764  
C.1

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE PROBABLES CEPAS DE  
*Xanthophyllomyces dendrorhous* AISLADAS DESDE LA  
ANTÁRTICA CHILENA Y ANÁLISIS DE LA PRODUCCIÓN DE  
METABOLITOS CON POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO

**Tesis**

Entregada A La

Universidad De Chile

En Cumplimiento Parcial De Los Requisitos

Para Optar Al Grado De

Magíster en Ciencias Biológicas

Facultad De Ciencias

Por

Gabriela Isabel Contreras Arriagada

Julio, 2014

Director de Tesis: Dra. Jennifer Alcaíno Gorman

Co-Director de Tesis: Dr. Víctor Cifuentes Guzmán



FACULTAD DE CIENCIAS  
UNIVERSIDAD DE CHILE  
INFORME DE APROBACION  
TESIS DE MAGISTER

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Magíster presentada por la candidata.

Gabriela Contreras Arriagada



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 5 de Junio de 2014.

Director de Tesis:

Dra. Jennifer Alcaíno G.

.....

Co-Director de Tesis

Dr. Víctor Cifuentes G.

.....

Comisión de Evaluación de la Tesis

Dr. Marcelo Baeza C.

.....

Dra. Claudia Stange K.

.....

A mis padres y hermanos



Nací el 15 de octubre de 1987 en Calera de Tango donde vivo hasta ahora. Estudié en el Liceo N°1 Javiera Carrera, y desde los primeros años en este liceo, siempre tuve claro estudiar una carrera relacionada con la biología, la ciencia y la educación. El gusto por estas áreas es una clara influencia de mis padres.

En tercer medio ingresé al curso de Biotecnología de la escuela de verano de la Universidad de Chile (2004), y en ese momento conocí esta entretenida área. Por estos motivos, estudié Ingeniería en Biotecnología molecular (2012). Con el objetivo de seguir estudiando la levadura *X. dendrorhous* y mejorar mi curriculum, realicé el magíster en Ciencias Biológicas en el Laboratorio de Genética de la Facultad Ciencias.

## AGRADECIMIENTOS

Estoy muy feliz por terminar esta etapa y debo agradecer a las personas que hicieron posible este logro. A mi tutora, Dra. Jennifer Alcaño, por guiarme en este proceso. Ella es una persona que admiro mucho y mi modelo a seguir. Al Dr. Víctor Cifuentes, por sus valiosos consejos.

Agradezco al Laboratorio de Genética, especialmente a Salvador y Dony, por toda su ayuda, a Soledad por las valiosas discusiones. Agradezco también a Iris, Oriana por su simpatía y a todo el equipo de genética: Prof. Marcelo, Rafael, Mario, Pablo, Natalia, Pamela, Nicole e Ignacio, por hacer del laboratorio un lugar entretenido.

Agradezco a Matías con su amor y cariño.

Agradezco a mis padres, ya que cuando niña fomentaron el desarrollo de mi curiosidad, esfuerzo, perfeccionismo, organización, entre otras características. Sin ellos, no lo hubiese logrado, muchas gracias. También agradezco a mis hermanos: Mariana, Oscar y Loreto, son los mejores. Los quiero mucho.

Agradezco a CONICYT por la Beca de Magíster Nacional (2013) y al Instituto Antártico Chileno (INACH) por el financiamiento de esta investigación: Programa de apoyo a tesis de postgrado, proyecto N°: M\_01\_11 y Proyecto Regular Gabinete, N°: RG\_07\_12.

Muchas gracias a todos.

## ÍNDICE DE MATERIAS

ÍNDICE DE MATERIAS .....	v
LISTA DE TABLAS .....	vii
LISTA DE FIGURAS .....	viii
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	3
1. INTRODUCCIÓN .....	5
1.1. Expedición Antártica Chilena.....	11
HIPÓTESIS.....	14
OBJETIVOS .....	15
Objetivo general .....	15
Objetivos específicos.....	15
2. MATERIALES Y MÉTODOS .....	16
2.1 Cepas y condiciones de cultivo .....	16
2.2 Ácidos nucleicos.....	18
2.3 Purificación de ácidos nucleicos .....	20
2.3.1 Extracción de DNA genómico de <i>X. dendrorhous</i> .....	20
2.3.2 Extracción de elementos extracromosómicos de dsRNA.....	21
2.4 Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa.....	23
2.5 Purificación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa.....	23
2.6 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	24
2.7 Secuenciación de DNA y análisis bioinformático.....	25
2.8 Extracción y análisis de carotenoides.....	25
2.9 Extracción y análisis de ergosterol .....	27
2.10 Extracción y análisis de micospoquinas.....	27
2.11 Extracción y análisis de ácidos grasos.....	28
2.12 Ensayo de tolerancia a luz UV .....	29
3. RESULTADOS.....	30
3.1 Caracterización molecular de las potenciales cepas de <i>X. dendrorhous</i> .....	30
3.1.1 Análisis de la secuencia de rDNA .....	30

3.1.2	Análisis de MSP-PCR .....	36
3.1.3	Análisis de elementos genéticos extracromosómicos (EGEs).....	38
3.1.4	Análisis de la secuencia del gen <i>COXI</i> .....	40
3.2	Estudio del crecimiento y la tolerancia a la radiación UV de las cepas de <i>X. dendrorhous</i> .....	41
3.3	Análisis de producción de carotenoides .....	47
3.4	Análisis de producción de micosporinas .....	50
3.5	Análisis de la producción de ergosterol.....	50
3.6	Análisis de producción de ácidos grasos .....	52
4.	DISCUSIÓN .....	54
4.1	Caracterización molecular de aislados antárticos de <i>X. dendrorhous</i> .....	54
4.2	Producción de carotenoides, micosporinas, ergosterol y ácidos grasos .....	55
5.	CONCLUSIÓN .....	62
6.	PROYECCIONES .....	63
7.	REFERENCIAS.....	65
8.	ANEXOS .....	72
8.1	Anexo 1. Secuencia de DNA de gen <i>COXI</i> de UCD 67-385 de <i>X. dendrorhous</i> . .72	
8.2	Anexo 2. Secuencia de aminoácidos deducida de la subunidad 1 de la citocromo oxidasa de UCD 67-385 de <i>X. dendrorhous</i> .....	73

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Cepas y aislados utilizados en este trabajo.....	17
Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados y generados en este trabajo.....	19
Tabla 3. Producción de carotenoides en los aislados ANCH01, ANCH06, ANCH08 y de las cepas AVHN2 y UCD 67-685.....	48
Tabla 4. Composición de ácidos grasos en ANCH01, ANCH06, ANCH8, AVHN2 y UCD 67-385.....	53

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Probables aislados antárticos de <i>X. dendrorhous</i> . .....	12
Figura 2. Árbol filogenético basado en la secuencia ITS del rDNA de diferentes cepas de <i>X. dendrorhous</i> . .....	32
Figura 3. Estructura sexual de <i>X. dendrorhous</i> . .....	34
Figura 4. Análisis de MSP-PCR de ANCHs, AVHN2 y UCD 67-385. ....	37
Figura 5. Análisis de elementos genéticos extracromosómicos de dsRNA en ANCHs, AVHN2 y UCD 67-385. ....	39
Figura 6. Evaluación del crecimiento a diferentes temperaturas de los aislados ANCH01, ANCH06 y ANCH08. ....	43
Figura 7. Curvas de crecimiento de los aislados ANCH01, ANCH06 y ANCH08. ....	44
Figura 8. Tolerancia a la radiación UV-B de los aislados ANCH01, ANCH06 y ANCH08. ....	46
Figura 9. Producción de carotenoides en los aislados ANCH01, ANCH06 ANCH08 y de las cepas AVHN2 y UCD 67-685. ....	49
Figura 10. Producción de ergosterol en los aislados ANCH01, ANCH06 ANCH08 y de las cepas AVHN2 y UCD 67-685. ....	51

## LISTA DE ABREVIATURAS

DO	Densidad óptica
dNTP	Desoxirribonucleótido trifosfato
dsRNA	RNA de doble hebra
EDTA	Tetra acetato disódico de etilendiamina
EGE	Elementos genéticos extracromosómicos
kb	Kilobases
FA	<i>Fatty acids</i> , Ácidos grasos.
MGG	Micosporina glutaminol glucósido
MSP-PCR	<i>Micro/Minisatellite-Primed PCR</i>
MUFA	Ácidos grasos monoinsaturados
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PUFA	Ácidos grasos poliinsaturados
rDNA	DNA ribosomal
RP-HPLC	Cromatografía líquida en fase reversa
SAFA	Ácidos grasos saturados
TAE	Tris, acetato y EDTA
TE	Tris y EDTA
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
UV	Ultravioleta
YM	Medio completo de cultivo para levadura

## RESUMEN

Los microorganismos antárticos han desarrollado diferentes mecanismos de adaptación para vivir en esta extrema región, tales como modificaciones en los componentes de la membrana como los ácidos grasos y esteroides que regulan su fluidez. Por otra parte, algunos microorganismos sintetizan metabolitos que confieren fotoprotección como los carotenoides y micosporinas. En la XLVI Expedición Científica Antártica, año 2010, se recolectaron muestras de suelo en la Isla Rey Jorge de la Península Antártica y a partir de ellas, se aislaron trece levaduras con fenotipo macromorfológico similar a la levadura *Xanthophyllomyces dendrorhous*. Esta levadura es de gran relevancia en biotecnología ya que puede sintetizar el carotenoide astaxantina, un poderoso antioxidante que es utilizado en la acuicultura para la pigmentación de salmones. Los aislados antárticos fueron llamados ANCH01 a 13, y el objetivo de este trabajo fue su caracterización molecular y la evaluación de la producción de carotenoides, micosporinas, ergosterol y ácidos grasos. Estos aislados fueron identificados como *X. dendrorhous* según análisis de su secuencia de rDNA. Los trece aislados no mostraron diferencias en las secuencias nucleotídicas de rDNA y del gen *COX1*, ni en los análisis de la presencia de elementos genéticos extra-cromosómicos o ensayos de mini/micro satélites *primed* PCR. Para la evaluación de producción de metabolitos, los aislados antárticos fueron agrupados de acuerdo a su pigmentación y se escogió ANCH01, ANCH06 y ANCH08 de color rojo, amarillo pálido y amarillo,

respectivamente, para los análisis posteriores. ANCH01 produce aproximadamente hasta ocho veces más astaxantina en comparación con la cepa silvestre de *X. dendrorhous* aislada de Japón. Por otra parte, el principal carotenoide producido por ANCH06 y ANCH08 fue el  $\beta$ -caroteno, en vez de astaxantina. A diferencia de otras cepas silvestres de *X. dendrorhous*, los aislados ANCHs no producen microsporinas. Además, ANCH06 fue más tolerante a la radiación UV-B luego de tres horas de exposición, en comparación a las otras cepas estudiadas. Por último, los tres aislados antárticos mostraron una mayor proporción de ácidos grasos poliinsaturados en comparación con las cepas silvestres analizadas. En conclusión, los aislados antárticos de *X. dendrorhous* son fenotípicamente diferentes a otras cepas silvestres, incluyendo las características que los hacen más resistente en su hábitat original, que a su vez tienen potencial biotecnológico.

## ABSTRACT

Antarctic microorganisms have developed different strategies to live in their environments, such as modifications in their membrane components including fatty acids and sterols that regulate their fluidity. Furthermore, some microorganisms synthesize photoprotective metabolites, such as carotenoids and mycosporines. In the XLVI Antarctic Scientific Expedition, in the year 2010, soil samples were collected at King George Island in the Antarctic Peninsula. From these samples, thirteen yeasts colonies were isolated that shared a similar phenotype to *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *X. dendrorhous* is a relevant yeast in biotechnology because it can synthesize the carotenoid astaxanthin, which is a powerful antioxidant used in aquaculture for salmonid fish pigmentation. The Antarctic isolates were named ANCH01 to 13 and the aim of this work was to characterize them molecularly and to evaluate the production of carotenoids, mycoporines, ergosterol and fatty acids. These isolates were identified as *X. dendrorhous* according to their rDNA sequence analysis. These isolates did not display any differences at their rDNA and *COXI* gene nucleotide sequences, neither by micro/mini satellite primed PCR nor by extra-chromosomal genetic elements analyses. For the metabolite production analyses, the Antarctic isolates were clustered according to their red, pale yellow and yellow pigmentation, choosing as representatives ANCH01, ANCH06 and ANCH08, respectively. ANCH01 produces approximately eight-fold more astaxanthin than the *X. dendrorhous* wild-type strain

isolated from Japan. Moreover, the main carotenoid produced by ANCH06 and ANCH08 was  $\beta$ -carotene instead of astaxanthin. In contrast to other *X. dendrorhous* wild-type strains, the ANCH isolates do not produce mycosporines. ANCH06 was more tolerant to UV-B radiation after three hours of exposure, compared to the other wild-type strains. Finally, the Antarctic isolates had a higher proportion of polyunsaturated fatty acids than the other analyzed strains. In conclusion, the Antarctic *X. dendrorhous* isolates are phenotypically different from other wild-type strains, including characteristics that make them more resistant to inhabit their original habitat, which also have biotechnological potential.

## 1. INTRODUCCIÓN

La península Antártica es considerada como un ambiente hostil para el desarrollo de seres vivos, pero esta región alberga a una gran diversidad de microorganismos y entre ellos, levaduras (Vishniac 2006). Esta región es uno de los hábitats más secos y fríos del planeta, está cubierta casi en su totalidad por hielo y nieve, y recibe una alta radiación solar (Robinson 2001). Por ello, los microorganismos que en ella habitan han desarrollado adaptaciones que les permiten sobrevivir en este ambiente.

Entre las adaptaciones fisiológicas a las bajas temperaturas se encuentran: el incremento intracelular de azúcares como la trehalosa que estabiliza las membranas durante la deshidratación (Goodrich y col. 1988) y de polioles, entre ellos el manitol y glicerol que participan en la osmoregulación celular (Goodrich y col. 1988); la presencia de proteínas anticongelantes; producción de enzimas activas a bajas temperaturas y adaptaciones en su membranas como un alto contenido de ácidos grasos (FA, *fatty acids*), entre otras (Robinson 2001).

La composición lipídica de la membrana determina en parte la habilidad de algunos microorganismos de crecer a diferentes temperaturas (Cooke y Whipps 1993). Se ha observado que a medida que la temperatura disminuye, el grado de insaturación de los FAs aumenta (D'Amico y col. 2006), lo que sería un factor importante para regular la fluidez de la membrana y mantener la integridad celular. De acuerdo a lo anterior, se ha encontrado en levaduras psicrófilas un mayor porcentaje de FAs insaturados en

comparación con levaduras mesófilas (Vishniac y Kurtzman 1992; Perrier y col. 1995; Robinson 2001; Zlatanov y col. 2001). Por otra parte, dentro de los FAs insaturados, se encuentran los ácidos grasos monoinsaturados (MUFA, *monounsaturated fatty acid*) y los poliinsaturados (PUFAs, *polyunsaturated fatty acids*). En relación a estos últimos, los mamíferos son incapaces de sintetizar PUFAs del tipo  $\omega$ -3 y  $\omega$ -6, como el ácido oleico (18:02, 18 átomos de carbono y dos insaturaciones a partir del carbono número 3) y ácido linolénico (18:03), respectivamente (De Caterina 2011). Estos FAs son necesarios por los mamíferos y deben ser suministrados en la dieta, por lo tanto son esenciales (De Caterina 2011). Los FAs mencionados son precursores de la síntesis de PUFAs de 20 átomos de carbono ( $C_{20}$ ), como ácido araquidónico (20:04) y el ácido eicosapentanoico (20:05). Estos últimos PUFAs son los precursores de las hormonas eicosanoides, como la prostaglandina. El ácido linoleico y linolénico se encuentran comúnmente en semillas de plantas, mientras que los PUFAs de  $C_{20}$  son extremadamente raros en semillas, pero comunes en ciertos microorganismos y el aceite de pescado (Radwan 1991).

En relación a lo anterior, se ha reportado que un mayor consumo de la relación de PUFAs  $\omega$ -3/ $\omega$ -6 favorece la prevención de enfermedades inflamatorias, autoinmunes, cardiovasculares y mentales, entre muchas otras (Simopoulos 2002). Por estos motivos, los PUFAs son utilizados como aditivos en la industria de alimentos, cosmética y farmacológica. Actualmente, estos FAs son usualmente extraídos desde aceite de pescado porque su producción es más económica. Sin embargo, el indeseable olor a pescado permanece luego de la extracción, lo que es un gran problema para su uso como

aditivo alimenticio (Okuyama y col. 1998). Debido a esto, hay mucho interés en la búsqueda de fuentes naturales de PUFAs de C<sub>20</sub>, siendo los microorganismos adaptados al frío uno de los principales candidatos (Okuyama y col. 1998).

Los esteroides también son lípidos que influyen en la estabilidad de las membranas celulares eucariotes que afectan su fluidez (Dexter y col. 1984). A bajas temperaturas, los esteroides impiden la cristalización de las cadenas de FAs y cuando la temperatura se eleva, reducen el movimiento de las cadenas, regulando así la fluidez de las membranas (Bloch 1983). El principal esteroide en levaduras es el ergosterol (Nes y col. 1978). Se ha sugerido que el ergosterol promueve la resistencia a la alta presión, baja temperatura (Abe y Minegishi 2008) y al estrés por frío (Calcott y Rose 1982) en levaduras. El ergosterol también es un metabolito con implicancias biotecnológicas, puesto que es el precursor de la vitamina D<sub>2</sub> (ergocalciferol) que regula la absorción y acumulación del calcio y el fósforo en los huesos (Wiseman 1993). Su insuficiencia en niños causa raquitismo, enfermedad que provoca retardo en el crecimiento y deformaciones óseas, mientras que en adultos provoca osteoporosis (Holick 2007).

Por otra parte, la Antártica es uno de los lugares que recibe mayor radiación solar en nuestro planeta (Madronich y col. 1998) y debido a esto, los microorganismos que en ella residen han desarrollado diferentes estrategias de fotoprotección. Entre ellas se destacan la i) reparación de los daños causados en el DNA mediante fotoreactivación o reparación por escisión de nucleótidos (Prakash y Prakash 2000; Sancar 2003) y la ii) producción de moléculas fotoprotectoras que actúan como pantallas solares, tales como las micosporinas (Roy 2000) y/o moléculas que presentan actividad antioxidante, como pigmentos carotenoides.

Las micosporinas son moléculas de bajo peso molecular (<400 Da) que absorben luz ultravioleta (UV) y originalmente fueron identificadas como metabolitos asociados a la esporulación inducida por luz en hongos (Leach 1965). Además, tienen propiedades antioxidantes (De la Coba y col. 2009; Carreto y Carignan 2011). Las micosporinas son hidrosolubles y están compuestas por un anillo de ciclohexanona o ciclohexamina conjugado con un sustituyente nitrogenado, aminoácido o imino alcohol (Sinha y col. 2007). Cuando el sustituyente de las micosporinas es un aminoácido, éstas se llaman aminoácidos tipo micosporina (MAAs). Se han encontrado MAAs en cianobacterias y algas, mientras que en hongos y levaduras se han hallado micosporinas (García-Pichel y Castenholz 1993; Oren y Gunde Cimerman 2007). En levaduras se han descrito dos tipos de micosporinas: micosporina glutamicol glucósido y micosporina glutaminol glucósido, moléculas con un máximo de absorción a 310 nm (Volkman y col. 2003; Libkind y col. 2004). Estos metabolitos han sido de gran interés de estudio (Carreto y Carignan 2011), ya que podrían ser aplicados en la formulación de bloqueadores solares para la protección de la piel (Bandaranayake 1998).

Por otra parte, otro grupo de compuestos que confieren fotoprotección a los microorganismos, son los carotenoides. Los carotenoides son un grupo diverso de pigmentos ampliamente distribuidos en la naturaleza y son los responsables del color amarillo, anaranjado o rojo de varios organismos. Comprenden una familia de más de 700 compuestos que generalmente están formados por 40 átomos de carbono y son sintetizados a partir de 8 moléculas de isopreno (C<sub>5</sub>) (Britton 1995). Estas moléculas poseen un sistema polieno de dobles enlaces conjugados que les otorga sus propiedades

cromóforas (Britton 1995). Los carotenoides se caracterizan por ser extremadamente hidrofóbicos, con baja o nula solubilidad en agua. Por esta razón, comúnmente se encuentran en regiones hidrofóbicas de las células como las membranas lipídicas (Britton 1995). Los carotenoides son sintetizados por organismos fotosintéticos tales como plantas, algas y cianobacterias; y por organismos no fotosintéticos como algunas bacterias, hongos filamentosos y levaduras (Lu y Li 2008). En organismos fotosintéticos, asisten en la fotosíntesis, disipan el exceso de energía y otorgan protección contra la foto-oxidación (Lu y Li 2008). Por otra parte, en organismos no fotosintéticos, éstos pueden secuestrar especies reactivas de oxígeno (ROS) y algunos de ellos son precursores de la vitamina A. Los animales no son capaces de sintetizar carotenoides *de novo*, por lo que los deben adquirir en su dieta (Maoka 2011).

Uno de los carotenoides con mayor capacidad antioxidante es la astaxantina, que se ha estimado que es de 10 veces mayor en relación a otros carotenoides como el  $\beta$ -caroteno y 100 veces mayor que el  $\alpha$ -tocopherol (Miki 1991). En relación a lo anterior, se ha observado que la suplementación de astaxantina contribuye a la prevención de enfermedades cardiovasculares, cataratas (Iwamoto y col. 2000), estimula al sistema inmune (Lignell y Bottiger 2001), reduce la inflamación gástrica y la carga bacteriana de *Helicobacter pylori* (Bennedsen y col. 2000), además de tener propiedades anticancerígenas (Nishino y col. 2002; Song y col. 2011). Este carotenoide es el responsable del color rojo-anaranjado de la carne de los salmones, del caparazón de camarones y langostas, y del plumaje de aves como el flamenco, entre otros (Britton 2008). La astaxantina es sintetizada por algunas bacterias, microalgas, levaduras y plantas, y es adquirida por animales marinos a través de la cadena trófica o también por

la conversión metabólica de otros carotenoides absorbidos (Maoka 2011). Debido a sus características de colorante y antioxidante, la astaxantina es de gran importancia comercial. Una de sus aplicaciones más importantes es en la salmonicultura, donde se utiliza como aditivo alimenticio necesario para la pigmentación, crecimiento y reproducción de salmones (Higuera-Ciapara y col. 2006). Ello se debe a que en cautiverio estos animales no tienen acceso a fuentes naturales de astaxantina, lo que resulta en que su carne no adquiera la coloración rojo-anaranjada característica y en consecuencia, no satisfacen los requerimientos de pigmentación necesarios para su comercialización (Schmidt y col. 2010). En relación a lo anterior, el grado de pigmentación de la carne es un factor preponderante en la determinación del precio final del producto, por lo que los productores de salmones invierten sobre el 15 % del costo total de producción en este pigmento (Mann y col. 2000). El mercado global de la astaxantina ha estado en constante crecimiento, alcanzando los US\$ 219 millones en el año 2007 y se estima que en el año 2015 alcance los US\$ 253 millones (Schmidt y col. 2010). Aproximadamente el 95 % de este mercado corresponde a astaxantina producida por síntesis química (Lorenz y Cysewski 2000). Sin embargo, cada día hay una mayor demanda por productos de origen natural, lo que ha motivado la búsqueda de fuentes naturales de astaxantina. Entre los sistemas biológicos más promisorios para una producción comercial de este pigmento se encuentran el microalga *Haematococcus pluvialis* (Lorenz y Cysewski 2000) y la levadura *Xanthophyllomyces dendrorhous* (Schmidt y col. 2010).

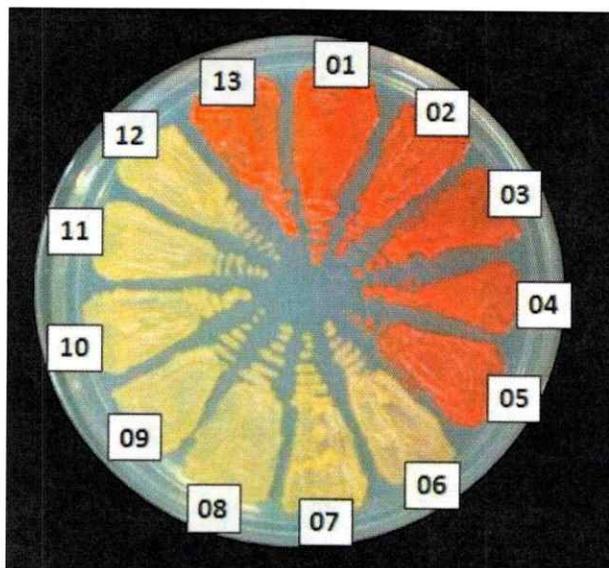
*X. dendrorhous* (estado asexual: *Phaffia rhodozyma*) es una levadura basidiomicete del orden Cistofilobasidiales. *X. dendrorhous* es pigmentada roja-

anaranjada (Golubev 1995) y el principal carotenoide producido por esta levadura es la astaxantina, representado entre el 83-87 % del total de carotenoides (Andrewes y col. 1976). Por otra parte, *X. dendrorhous* fue aislada originalmente desde exudados de árboles de zonas frías de Japón, Alaska, Finlandia y Rusia (Phaff y col. 1972; Golubev 1995). Recientemente se han aislado cepas desde Italia, Alemania, Estados Unidos (Weber y Davoli 2005; Weber y col. 2006; Fell y col. 2007), y en la Patagonia Argentina (Libkind y col. 2007 a). En Chile, se han aislado cepas desde hojas de eucalipto en Concepción (Weber y col. 2008), corteza y hojas de diferentes árboles en la VIII, IX y X región (datos no publicados). Hasta la fecha, todos los hábitats reportados de esta levadura se localizan en regiones de altas latitudes y/o altitudes, con una alta incidencia de radiación UV y/o presencia de ROS. Por este motivo, se ha sugerido que en *X. dendrorhous*, la astaxantina actuaría como un antioxidante inactivando las ROS generadas en su hábitat natural o producidas por el propio metabolismo oxidativo intracelular (Schroeder y Johnson 1995). Además, se ha planteado que la síntesis de astaxantina compensa la falta o la muy disminuida actividad de enzimas antioxidantes, como la superóxido dismutasa y la catalasa (Schroeder y Johnson 1993). Por otra parte, recientemente se ha descrito que *X. dendrorhous* también produce micosporinas, encontrándose micosporina glutaminol glucósido en cepas aisladas en la Patagonia Argentina (Libkind y col. 2010).

### **1.1. Expedición Antártica Chilena**

Como se mencionó anteriormente, la Antártica alberga una gran diversidad de microorganismos que presentan diferentes adaptaciones, y muchas de éstas tienen

potenciales aplicaciones biotecnológicas. Con el propósito de construir un catastro de la diversidad de levaduras de la Antártica Chilena y evaluar su potencial aplicación en la industria, en la XLVI Expedición Científica Antártica (Enero de 2010), se recolectó 34 muestras de suelo de la Isla Rey Jorge de la Península Antártica desde las cuales se aislaron levaduras (Proyecto INACH: T\_23-09, Investigador Responsable: Dr. Marcelo Baeza). Desde una de estas muestras, proveniente de la Península Barton ( $62^{\circ} 14.074'$  WO  $58^{\circ} 46.567'$ ), se encontraron trece aislados cuyas colonias compartían un fenotipo macromorfológico similar a *X. dendrorhous* en cuanto a su forma, color y textura (Figura 1). Estos aislados de levadura se llamaron ANCH01 a 13.



**Figura 1. Potenciales aislados antárticos de *X. dendrorhous*.**

Los aislados de levadura se obtuvieron desde muestras de suelo recolectadas en la Isla Rey Jorge de la Península Antártica. Los aislados se llamaron ANCH01 a ANCH13 (01-13).

1

Para la identificación de levaduras es frecuentemente utilizado el análisis del DNA ribosomal (rDNA) (Scorzetti y col. 2002). El rDNA está compuesto por una unidad repetida en tándem. Cada unidad está formada por el gen de la subunidad mayor (LSU, *large ribosomal subunit*), 5S; 5.8S y 18S. Franqueando el gen 5.8S (Seifert 2009) se encuentra los espaciadores internos transcritos (ITS, *Internal transcribed spacer*), ITS1 e ITS2, los cuales están localizados entre los genes 18S y LSU del rDNA, respectivamente (Kurtzman y col. 2011). La unidad del rDNA se encuentra entre las regiones ETS (*external transcribed spacer*) y IGS (*intergenic transcribed spacer*). Los análisis de la secuencia de los dominios variables de LSU, D1/D2, y los espaciadores internos transcritos del rDNA, ITS1 e ITS2, han sido utilizados como marcadores para la identificación de levaduras (White y col. 1990; Kurtzman y Robnett 1998; Fell y col. 2000). Por otra parte, se ha descrito que dos cepas pertenecen a la misma especie si difieren en menos de 6 pb (1 %) en las secuencias de los dominios D1/D2 de rDNA, mientras que las especies son diferentes si la diferencia es mayor (Kurtzman y Robnett 1998). Sin embargo, para la correcta identificación de especies en hongos y levaduras, se ha recomendado analizar la secuencia de D1/D2 y los ITS en conjunto (Scorzetti y col. 2002).

De acuerdo a los antecedentes expuestos y a las condiciones ambientales de la Península Antártica, esperamos que en respuesta adaptativa las cepas de levaduras aisladas desde esta zona tengan un alto contenido de lípidos que favorecen la fluidez y estabilidad de las membranas, como los FAs insaturados y ergosterol. Además, debido a la alta radiación UV en la Antártica, estas levaduras probablemente producen moléculas



fotoprotectoras como lo son los carotenoides y/o micosporinas. De esta manera, en esta tesis se planteó en primer lugar caracterizar molecularmente las posibles cepas de *X. dendrorhous* aisladas desde la Antártica Chilena para confirmar su identidad mediante análisis en el rDNA y analizar la producción de moléculas fotoprotectoras y de lípidos que favorezcan la fluidez de la membrana. Para ello, se planteó la siguiente hipótesis:

### **HIPÓTESIS**

Según las características macromorfológicas de las colonias, las levaduras aisladas de la Península Antártica corresponderían a *X. dendrorhous*. Considerando las extremas condiciones ambientales donde fueron aisladas, estas levaduras deberían poseer adaptaciones tales como un aumento en la producción de moléculas fotoprotectoras (como carotenoides y/o micosporinas) y diferente producción en los lípidos reguladores de la fluidez de la membrana (como ácidos grasos poliinsaturados y/o ergosterol), en comparación a levaduras aisladas de otras regiones

## OBJETIVOS

### Objetivo general

Caracterizar molecularmente las potenciales cepas de *X. dendrorhous* aisladas desde muestras de suelo proveniente de la Península Antártica y analizar la producción de carotenoides, micosporinas, ácidos grasos poliinsaturados y ergosterol.

### Objetivos específicos

1. Caracterizar molecularmente las potenciales cepas de *X. dendrorhous* mediante análisis del rDNA, MSP-PCR, polimorfismo de dsRNA y el gen *COXI*.
2. Determinar parámetros de crecimiento y tolerancia a la radiación UV-B en los aislados de *X. dendrorhous* seleccionados.
3. Evaluar la producción de carotenoides y micosporinas en los aislados de *X. dendrorhous* seleccionados.
4. Analizar la producción de ergosterol y ácidos grasos en los aislados de *X. dendrorhous* seleccionados.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 Cepas y condiciones de cultivo

Las cepas de *X. dendrorhous* utilizadas en este trabajo se encuentran detalladas en la tabla 1. Éstas se cultivaron a 22, 15 ó 10 °C en medio YM (3 g/l extracto de levadura, 3 g/l extracto de malta, 10 g/l glucosa y 5 g/l peptona). En el caso de cultivos en placas, los medios se suplementaron con agar al 1,5 % (p/v). Para evaluar el desarrollo de estructuras sexuales (holobasidios), las levaduras se cultivaron en placas durante 2 d a 22 °C en medio mínimo (MM<sub>v</sub>) con glucosa al 2 % (p/v) (Retamales y col. 2002) o medio DWR (0,5 % p/v ribitol) (Kucsera y col. 1998). Luego, las placas se incubaron a 10 °C hasta la aparición de holobasidios.

Para evaluar el crecimiento a diferentes temperaturas, las cepas se incubaron a 10, 15 y 22 °C en placas de medio YM. Se fotografió las colonias durante 8 d, por triplicado y se determinó su área expresado en píxeles<sup>2</sup> utilizando el programa IMAGEJ (Abramoff y col. 2004). Los resultados se expresaron como el incremento del área, que indica la diferencia en el área de la colonia entre los días ocho y tres de incubación.

**Tabla 1. Cepas y aislados utilizados en este trabajo.**

<b>Cepa</b>	<b>Características</b>	<b>Coloración</b>	<b>Fuente/referencia</b>
UCD 67-385	Cepa de <i>X. dendrorhous</i> aislada de Japón.	Anaranjado	ATCC 24230
AVNH2	Cepa de <i>X. dendrorhous</i> aislada de hoja de <i>Gevuina avellana</i> (avellano) de VIII Región de Chile.	Anaranjado	Laboratorio de Genética
ANCH01 a 05 y 13.	Aislados de <i>X. dendrorhous</i> desde muestras de suelo de la Isla Rey Jorge de la Península Antártica.	Rojo	Laboratorio de Genética
ANCH06	Aislados de <i>X. dendrorhous</i> desde muestras de suelo de la Isla Rey Jorge de la Península Antártica.	Amarillo-pálido	Laboratorio de Genética
ANCH07 a 12.	Aislados de <i>X. dendrorhous</i> desde muestras de suelo de la Isla Rey Jorge de la Península Antártica.	Amarillo	Laboratorio de Genética

ATCC: American Type Culture Collection, Estados Unidos.

La cinética de crecimiento de las cepas de levadura se evaluó a 22 °C en medio YM. Para ello, a partir de un cultivo en etapa exponencial de crecimiento ( $DO_{600}$  de 6-7), se inoculó un matraz con 100 ml de medio YM, hasta alcanzar una  $DO_{600}$  de 0,1. Los cultivos se realizaron por triplicado y se incubaron a 22 °C con agitación constante. Se recogió alícuotas de 1 ml cada 12 h aproximadamente, durante los 3 primeros días y luego cada 24 h hasta el quinto día. El tiempo generacional ( $g$ ) se calculó como el promedio de tres cultivos independientes a partir de la pendiente en la fase exponencial en curvas de crecimiento en una representación semilogarítmica mediante la siguiente ecuación:  $g = 0.301/\text{pendiente}$  (Madigan et al, 1997.).

## 2.2 Ácidos nucleicos

Como marcador de peso molecular se utilizó el DNA del bacteriófago lambda digerido con la enzima de restricción *Hind*III (Fermentas), 100 bp (Fermentas) y/o 1 kb (New England Biolabs). Los oligonucleótidos utilizados en las reacciones de PCR y secuenciación se indican en la tabla 2, los que fueron sintetizados por *Integrated DNA Technologies* (Estados Unidos).

**Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados y generados en este trabajo.**

Nombre	Secuencia (de 5' a 3')	Dirección
<b>Amplificación y secuenciación rDNA:</b>		
LR12	GACTTAGAGGCGTTCAG	D
5SRNA	ATCAGACGGGATGCGGT	R
ITS5	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG	D
LR6	CGCCAGTTCTGCTTACC	R
<b>Análisis de micro y minisatélites:</b>		
(GTG) <sub>5</sub>	GTGGTGGTGGTGGTG	-
(GAC) <sub>5</sub>	GACGACGACGACGAC	-
M13	GAGGGTGGCGGTTCT	-
<b>Amplificación y secuenciación del gen COX1:</b>		
COX1.3.F	CACCTGCTTCCTTTACTACAC	D
COX1.5.R	GCTGTACCAGCACCTTTTCTG	R
COX1.5.F	CAGAAAAGGTGCTGGTACAGC	D
COX1.7.R	TACTGCCTTACGGCAATCTG	R

D: Directo, R: Reverso.

## 2.3 Purificación de ácidos nucleicos

### 2.3.1 Extracción de DNA genómico de *X. dendrorhous*

La extracción de DNA genómico se realizó mediante ruptura con perlas de vidrio (Sambrook y Russell 2001) o a partir de protoplastos (Hermosilla y col. 1995). Para la extracción mediante perlas de vidrio, se cosecharon las células cultivadas en una placa o en medio líquido por centrifugación a 4.000 g, luego se suspendieron en 400 µl de buffer TE (Tris-EDTA 10:25; pH 8,0) y se mezclaron con 250 µl de perlas de vidrio de 0,5 mm de diámetro. Posteriormente, se agitó en un vórtex a máxima velocidad durante 10 min. Luego, se agregó 400 µl fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1; pH 8,0), se llevó 1 min a vórtex y se centrifugó a 10.000 g por 5 min. A la fase acuosa obtenida se le realizó una segunda extracción fenólica y para eliminar los restos de fenol, se lavó con 400 µl de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1). El DNA se precipitó con dos volúmenes de etanol absoluto y la mezcla se incubó a -20 °C por al menos 16 h. Finalmente, el DNA se colectó por centrifugación a 10.000 g por 10 min y se suspendió en buffer TE (Tris-EDTA 10:1, pH 8,0) con 34 µg/ml de RNasa A. Luego, la mezcla se incubó durante 30 min a 37 °C.

Para la extracción de DNA desde protoplastos, las células provenientes de un cultivo en fase exponencial ( $DO_{600}$  de 6-7) se cosecharon por 5 min de centrifugación a 4.000 g. Luego, las células se lavaron 2 veces con 0,8 M KCl y se suspendieron con 16 ml de esta solución. Posteriormente, la suspensión celular se separó en 4 matraces de 50 ml y a cada uno se añadió 1 ml de 20 mg/ml *Lysing Enzymes* (Sigma-Aldrich). Se agitó suavemente durante 2,5 h a 37 °C y luego las células se lavaron con 0,8M KCl. Para la

lisis, las células se suspendieron en 5 ml de buffer TE (25:10), se añadió 2 ml de 1 % SDS y 50 µl de 20 mg/ml proteinasa K (United States Biological) y se incubó a 65 °C durante 30 min. Posteriormente, se agregó 1,5 ml de 3 M acetato de potasio. El DNA se precipitó con 2 volúmenes de etanol absoluto y la mezcla se incubó a -20 °C por al menos 16 h. El DNA se colectó por centrifugación a 10.000 g por 10 min y se suspendió en buffer TE (Tris-EDTA 10:1; pH 8,0) con 34 µg/ml de RNasa A. Finalmente, la mezcla se incubó durante 30 min a 37 °C. El DNA obtenido se evaluó en un gel de agarosa según el punto 2.4 y posteriormente se almacenó a -20 °C hasta su utilización.

### **2.3.2 Extracción de elementos extracromosómicos de dsRNA**

Para la extracción de elementos extracromosómicos de dsRNA se realizó una extracción de RNA total mediante ruptura con perlas de vidrio (Baeza y col. 2009) y a partir de protoplastos (Hermosilla y col. 1995). Para la extracción mediante perlas de vidrio, se cosecharon por centrifugación a 4.000 g por 5 min las células provenientes de un cultivo líquido de 3 d de *X. dendrorhous*. Luego, se agregó 1ml de buffer TE (Tris-EDTA 1:25; pH 8,0), se llevó 1 min a vórtex y se centrifugó a 10.000 g por 5 min. El pellet resultante se suspendió en 400 µl de buffer TE, se añadió 250 µl de perlas de vidrio de 0,5 mm de diámetro y 400 µl de fenol a pH 4. Posteriormente se agitó por 3 min en un molidor Mini-Breadbeater-16 (Biospec) y se centrifugó 10 min a 10.000 g. A la fase acuosa se le realizó una segunda extracción con fenol y luego un lavado con cloroformo:alcohol isoamílico (24:1). Después, a la fase acuosa recuperada se le agregó 800 µl de isopropanol y se incubó a -20 °C durante 2 h. Finalmente, el RNA se recolectó por centrifugación a 10.000 g por 10 min y se suspendió en agua libre de nucleasas.

Para la extracción de RNA desde protoplastos, se cosecharon las células provenientes de un cultivo en fase exponencial ( $DO_{600}$  de 6-7) por 5 min a 4.000 g. Luego, se lavaron 2 veces con 0,8 M KCl y se suspendieron con 20 ml de esta solución. Posteriormente, se añadió 80 mg de *Lysing Enzymes* (Sigma-Aldrich) y se agitó a 20 rpm durante 16 h a 22 °C. Luego, las células se lavaron con 0,8 M KCl. Para la lisis, las células se suspendieron en 5 ml de buffer TE (25:10; pH 8,0), se añadió 500 µl de 10 % SDS y 25 µl de 20 mg/ml proteinasa K (*United States Biological*) y se incubó a 65 °C durante 30 min. Posteriormente, se agregó 1,5 ml de 3 M acetato de potasio. Los ácidos nucleicos se precipitaron con un volumen de isopropanol y la mezcla se incubó a -20 °C durante 2 h. Los ácidos nucleicos se colectaron por centrifugación a 10.000 g por 10 min y se suspendió en 500 µl de buffer TE (Tris-EDTA 10:1; pH 8,0). Para eliminar los restos de proteínas, se agregó 500 µl de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1; pH 4,0), se llevó 1 min a vórtex y se centrifugó a 10.000 g por 5 min. A la fase acuosa se agregó 500 µl de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) y luego a la fase acuosa recuperada, se le agregó un volumen de isopropanol y se incubó a -20 °C durante 2 h. Finalmente, el RNA se recolectó por centrifugación a 10.000 g por 10 min y se suspendió en agua libre de nucleasas.

Las muestras se analizaron en un gel de agarosa según el punto 2.4. Se identificó los elementos de dsRNA por su resistencia a los tratamientos con DNasa I (New England Biolabs) y nucleasa S1 (Fermentas), y por su sensibilidad al tratamiento con RNasa A (New England Biolabs).

## **2.4 Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa**

Los ácidos nucleicos se analizaron por electroforesis en geles de agarosa en buffer TAE 1X (40 mM Tris-acetato; 1 mM EDTA; pH 8,0) con 0,5 µg/ml bromuro de etidio. Las muestras de DNA se mezclaron con buffer de carga 1X GLD (0,3 % Ficoll; 0,04 %; azul de bromofenol; 5,8 % glicerol) y las bandas de DNA se visualizaron por la fluorescencia emitida al irradiar con luz UV.

## **2.5 Purificación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa**

Para purificar fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa se utilizó el método de perlas de sílica (Boyle y Lew 1995). La banda de DNA de interés se cortó desde un gel de agarosa con un bisturí y se transfirió a un tubo tipo Eppendorf. Se añadió 3 volúmenes de 6 M KI, de acuerdo al peso del trozo de gel, y se incubó a 55 °C hasta que la agarosa estuviese completamente disuelta. Luego, se añadió 7 µl de *glassmilk* (perlas de sílica suspendidas en 3 M KI) y se incubó durante 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se centrifugó por 30 s a 10.000 g, se eliminó el sobrenadante y se lavó dos veces con 500 µl de solución *New Wash* (10 mM Tris-HCl; 50 mM NaCl; 2,5 mM EDTA; 50 % etanol; pH 7,5), centrifugando 30 s a 10.000 g en cada lavado. Para liberar el DNA, las perlas se suspendieron en 14 µl de agua y se incubaron a 65 °C por 5 min. Luego se centrifugó a 10.000 g por 30 s y se recuperó el sobrenadante. La integridad y la concentración de DNA obtenido se evaluó en un gel de agarosa y se almacenó a -20 °C hasta su utilización.

## 2.6 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Las reacciones de amplificación para secuenciación se realizaron con *Pfu* DNA polimerasa (New England Biolabs), mientras que las otras reacciones se realizaron con *Taq* DNA polimerasa (Genlab). Cada reacción estaba compuesta por: 1X buffer (200 mM Tris-HCl; 500 mM KCl; pH 8,4); 2mM MgCl<sub>2</sub>; 0,2 mM de cada dNTP (dATP, dGTP, dCTP y dTTP), 1 µM de cada partidor; 10-20 ng de DNA y 1 unidad enzimática de DNA polimerasa en un volumen final de 25 µl. Las reacciones de PCR estándar se realizaron en un termociclador Applied Biosystems 2720 con el siguiente programa: 3 min de desnaturalización a 94 °C, seguido por 35 ciclos de: 30 s a 94 °C de desnaturalización, 30 s a 55 °C para el alineamiento de partidores y 3 min a 72 °C de extensión. Finalmente, la reacción se mantuvo 10 min a 72 °C para una elongación final y luego se almacenó a 4 °C hasta su análisis.

Para el estudio de mini/microsatélites *primed* PCR, se utilizó el siguiente programa: 5 min de desnaturalización a 94 °C, seguido por 40 ciclos de: 45 s a 94 °C de desnaturalización, 60 s a 47 °C para el alineamiento de partidores y 60 s a 72 °C de extensión. Finalmente, la reacción se mantuvo 10 min a 72 °C para una elongación final y luego se mantuvo a 4 °C hasta su análisis.

## 2.7 Secuenciación de DNA y análisis bioinformático

La secuenciación de DNA se realizó en un secuenciador automático ABI PRISM 3100 GeneticAnalyzer (Applied Biosystems) con el kit de terminadores fluorescentes BigDyeTerminator v3.1 (Applied Biosystems). Las secuencias se analizaron con Bioedit (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>) y programas disponibles en línea, como BLASTn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para comparar secuencias nucleotídicas disponibles en bases de datos y ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf>) para buscar los posibles marcos de lectura abiertos. Además, con el programa CLC Genomics Workbench se analizó las secuencias del transcriptoma y genoma de la cepa UCD 67-385 de *X. dendrorhous*, disponible en nuestro laboratorio. Las secuencias ITS del rDNA de cepas de *P. rhodozyma* y *X. dendrorhous* se obtuvieron a partir de la base de datos de GenBank. Para análisis filogenético se utilizó el programa MEGA versión 5.2 (Tamura y col. 2011) con el análisis de máxima parsimonia y 1.000 réplicas de *bootstrap*.

## 2.8 Extracción y análisis de carotenoides

La extracción de carotenoides de *X. dendrorhous* se realizó con acetona desde precipitados celulares (An y col. 1989). Para ello, se colectó por centrifugación el pellet celular de 50 ml de un cultivo de 5 d en YM a 22 °C con agitación constante. Luego, el pellet celular se suspendió en 1 ml de agua y se agregó 500 µl de perlas de vidrio de 0,5 mm de diámetro. Se llevó a molidor durante 3 min, se agregó 1 ml de acetona y

nuevamente se llevó al molidor durante otros 3 min. Se repitieron las extracciones con 2 ml de acetona llevando a molidor por 3 min, seguido por 5 min de centrifugación a 4.000 g, recolectando y juntando los sobrenadantes cada vez, hasta que el extracto celular fuese incoloro. Posteriormente, al sobrenadante final se le agregó 1/5 del volumen de éter de petróleo, se mezcló y se centrifugó por 5 min a 4.000 g. La fase superior (éter de petróleo) se transfirió a un tubo de vidrio y se determinó su absorbancia a 474 nm. La cantidad de carotenoides se calculó con la siguiente fórmula:

$$\text{Total de carotenoides} (\mu\text{g/g peso seco}) = \frac{(\text{v éter})(A)(100)}{(E_{1\%})(\text{peso seco levadura})}$$

Donde, A: Absorbancia a 474 nm, v éter: volumen de éter de petróleo recuperado (ml) y  $E_{1\%}$ : coeficiente extinción al 1 % = 2.100 (An y col. 1989). Para la determinación del peso seco de levadura, se colectó y pesó por triplicado el pellet celular de 5 ml del cultivo secado por toda la noche a 80 °C.

A continuación se dejó evaporar totalmente el éter de petróleo del extracto de carotenoides a temperatura ambiente, y luego se disolvió en 100  $\mu$ l de acetona. La composición de pigmentos se determinó mediante cromatografía líquida en fase reversa (RP-HPLC), con una columna Lichrospher RP18 125-4 (Merck) y acetonitrilo:metanol:isopropanol (85:10:5, v/v) como fase móvil con un flujo de 1 ml/min. Cada pigmento se identificó de acuerdo a su tiempo de retención y a su espectro de absorción, en comparación a estándares, usando un detector de arreglo de diodos Shimadzu SPD-M10A.



## 2.9 Extracción y análisis de ergosterol

La extracción de ergosterol se realizó según (Shang y col. 2006). Para ello, se recolectaron las células provenientes de 10 ml de un cultivo de 5 d crecido en medio YM a 22 °C con agitación constante. Posteriormente, se agregó 4 g de KOH y 16 ml de 60 % etanol. Luego de 2 h a 80 °C, los esteroides se extrajeron con 10 ml de éter de petróleo y se midió la absorbancia a 282 nm. La cuantificación de ergosterol se realizó mediante el coeficiente de extinción molar  $11.900 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Shang y col. 2006) y la absorbancia a 282 nm. Para la determinación del peso seco de levadura, se recolectó y pesó por triplicado el pellet celular de 5 ml del cultivo secado por toda la noche a 80 °C. A continuación, se dejó evaporar totalmente el éter de petróleo del extracto a temperatura ambiente y luego éste se disolvió en 100  $\mu\text{l}$  de acetona. La composición de esteroides fue evaluada mediante RP-HPLC, usando una columna Lichrospher RP18 125-4 (Merck) y como fase móvil, una solución de metanol y agua (97:3) con un flujo de 1,8 ml/min.

## 2.10 Extracción y análisis de micosporinas

La extracción de micosporinas se realizó mediante el método de Volkmann y Gorbushina (2006) modificado. Para ello, se cosecharon las células provenientes de un cultivo de 5 d crecido en medio YM sólido a 22 °C, se suspendieron en 6 ml de buffer de extracción (Agua:etanol:ácido acético, 93:5:2) y se mezclaron con 250  $\mu\text{l}$  de perlas de vidrio de 0,5 mm de diámetro. Posteriormente, se agitó en un vórtex a máxima velocidad durante 30 min. Luego, se incubó a 22 °C durante 12 h con agitación constante y se

centrifugó 10 min a 10.000 g. Se recuperó el sobrenadante y se midió su absorbancia a 310 nm. La cuantificación de micosporinas se realizó mediante el coeficiente de extinción molar de la micosporina glutaminol glucósido,  $25.000\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (Libkind y col. 2010) y el valor de la absorbancia a 310 nm. La cantidad de micosporinas se expresó como mg/g peso seco de la levadura. Para la determinación del peso seco de levadura, se recolectó y pesó por triplicado el pellet celular de 5 ml del cultivo secado por toda la noche a 80 °C. La composición de micosporinas fue evaluada mediante RP-HPLC, usando una columna Lichrospher RP18 125-4 (Merck) y como fase móvil, una mezcla de agua:etanol:ácido acético (93:5:2) con un flujo de 1 ml/min.

### **2.11 Extracción y análisis de ácidos grasos**

La biomasa para la extracción de FAs fue obtenida a partir de 1 L de un cultivo de 120 h de crecimiento (fase estacionaria de crecimiento) crecido a 22 °C con agitación constante en medio YM. Las células se cosecharon por centrifugación a 4.000 x g durante 5 min, y el pellet celular se lavó con agua destilada. Se extrajo los lípidos totales mediante el método de Bligh y Dyer (1959) y el análisis de composición de los FA fue evaluado mediante cromatografía de gas (GC). La extracción de lípidos y el análisis de composición de los FAs se realizaron por un servicio externo en GCL (Gestión Control de Laboratorios) de Fundación Chile ([http://www.gcl.cl/neo/interior\\_2.php](http://www.gcl.cl/neo/interior_2.php)).

## 2.12 Ensayo de tolerancia a luz UV

Las cepas de *X. dendrorhous* se cultivaron a 22 °C con agitación constante en medio YM hasta alcanzar la fase estacionaria de crecimiento ( $DO_{600}$  10 a 11). Luego, las células se cosecharon por centrifugación a 4.000 g por 5 min, se lavaron 2 veces con agua destilada estéril y se suspendieron en 5 ml de agua destilada, hasta alcanzar una concentración de aproximada de  $10^7$  células/ml. Luego, la suspensión se transfirió a una placa estéril y se expuso a radiación UV-B (310 nm) usando una lámpara con un tubo Phillips 20W F20T/12 UV-B a 30 cm de altura con respecto a la placa. Se tomaron alícuotas de 0,5 µl luego de 0; 0,5; 1; 2 y 3 h de exposición, las que fueron diluidas y sembradas en placas con medio YM para obtener colonias aisladas. La tolerancia a la luz UV-B se evaluó como el porcentaje de sobrevivida.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1 Caracterización molecular de las potenciales cepas de *X. dendrorhous*

##### 3.1.1 Análisis de la secuencia de rDNA

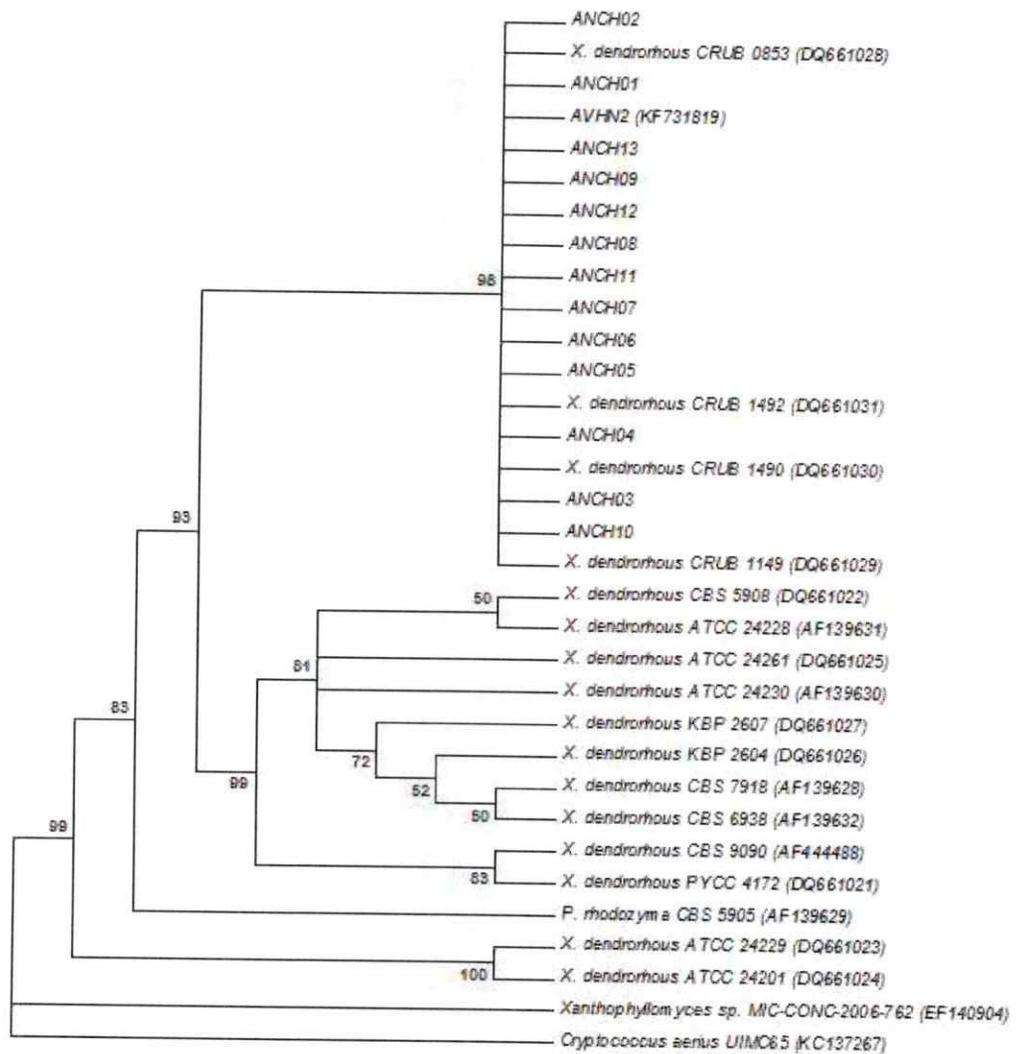
Las 13 colonias aisladas tienen una morfología similar a *X. dendrorhous* en cuanto a su forma, elevación, tamaño y textura. Sin embargo, entre ellas presentan diferencias en la pigmentación y opacidad. En relación a estas características, las levaduras se agruparon y de cada grupo se seleccionó un representante al azar: ANCH01 (rojo y brillante), ANCH06 (amarillo pálido y opaca) y ANCH08 (amarillo y brillante). Con el objetivo de determinar la especie y posteriormente evaluar si algunos de los aislados son clonales, se realizaron análisis moleculares, entre ellos se analizó el rDNA.

Para identificar la(s) especie(s) de los 13 aislados ANCHs obtenidos desde la muestra de suelo de la Península Antártica, se extrajo el DNA genómico de cada uno de ellos. Luego, se amplificó una región que comprendía los dominios D1/D2 y los ITS del rDNA utilizando los partidores universales ITS5 y LR6 (White y col. 1990). Los productos de PCR resultantes se purificaron y secuenciaron completamente. Mediante la comparación con secuencias del rDNA disponibles en la base de datos Genbank, se identificó los dominios D1/D2 del gen LSU y la región ITS que comprende la región ITS1, el gen 5,8S del rDNA e ITS2. La región parcial del gen LSU comprende 628 pb,

mientras que el ITS1 e ITS2 fue de 157 y 311 pb, respectivamente, para todos los aislados ANCHs.

Las secuencias de los dominios D1/D2 de los 13 aislados fueron idénticas entre ellas y al comparar la secuencia consenso en la base de datos GenBank, se encontró un 100 % de identidad con *P. rhodozyma* CBS5905 [GenBank: AF189871.2] seguido por un 99,8 % de identidad con *X. dendrorhous* UCD 67-202 [GenBank: DQ870194.1], ambos con un 100 % de cobertura. Por lo tanto, ya que el porcentaje entre ambas secuencias es menor al 1 %, estas levaduras corresponderían a *X. dendrorhous/P. rhodozyma*.

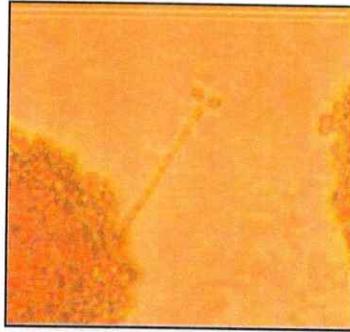
Con respecto a la región ITS, los 13 aislados tienen idéntica secuencia y al compararla con la base de datos Genbank, el máximo de identidad encontrado (99 %) fue con 3 cepas de *X. dendrorhous* aisladas desde la Patagonia Argentina (Libkind y col. 2007 a): CRUB 1492 [GenBank: DQ6610311.1], CRUB1149 [GenBank: DQ661029.1] y CRUB0853 [GenBank: DQ661028.1]. Para estudiar la relación entre las cepas de *X. dendrorhous/P. rhodozyma* aisladas desde diferentes regiones, se realizó un dendrograma basado en la región ITS (Figura 2). Este análisis reveló que los 13 aislados antárticos pertenecen al grupo de *X. dendrorhous* y *P. rhodozyma*, por lo tanto, esto confirma el resultado arrojado por el análisis de la secuencia D1/D2 y los aislados ANCHs efectivamente corresponden a esta especie. Adicionalmente, el dendrograma resultante agrupa a los aislados ANCHs junto con las cepas aisladas desde regiones geográficamente más cercanas, a excepción de la cepa MIC-CONC-2006-762, aislada desde hojas de eucalipto en Concepción (Weber y col. 2008).



**Figura 2. Dendrograma basado en la secuencia ITS del rDNA de diferentes cepas de *X. dendrorhous*.**

El árbol consenso se basó en el alineamiento de las secuencias nucleotídicas de la región ITS (ITS1, 5.8S rDNA e ITS2) y se generó con el análisis de Máxima Parsimonia. Los números en las ramas indican el porcentaje de *bootstrap* (1.000 repeticiones y solo se muestran los valores superiores al 50 %). El número de acceso de GenBank de cada secuencia se indican entre paréntesis. La secuencia ITS de *Cryptococcus aerius* fue utilizado como *outgroup*.

Con el fin de determinar si los aislados antárticos corresponden a *X. dendrorhous* (estado teleomórfico) o *P. rhodozyma* (estado anamórfico), se evaluó la habilidad de desarrollar estructuras sexuales (holobasidio con basidiosporas) en placas de medio mínimo. Para ello, los aislados se incubaron a 10 °C en placas con medio MMv (Retamales y col. 2002) y DWR (Kucsera y col. 1998). Luego de aproximadamente 1 mes de incubación en medio DWR, los aislados: ANCH01, ANCH02, ANCH03, ANCH04, ANCH05 y anch13, desarrollaron este tipo de estructuras. Por otra parte, luego de 14 d de incubación en MMv, se observaron estas estructuras en los aislados ANCH06, ANCH07, ANCH08, ANCH09, ANCH10, ANCH11 y ANCH12. Por lo tanto, todos los aislados ANCHs corresponden a *X. dendrorhous* (Figura 3).



**Figura 3. Estructura sexual de *X. dendrorhous*.**

Holobasidios con basidiosporas de ANCH8 formadas en medio mínimo MMv después de 14 d de incubación a 10 °C. El desarrollo de este tipo de estructura identifica a la cepa como *X. dendrorhous* (estado sexual o teleomórfico) en vez de *P. rhodozyma* (estado asexual o anamórfico).

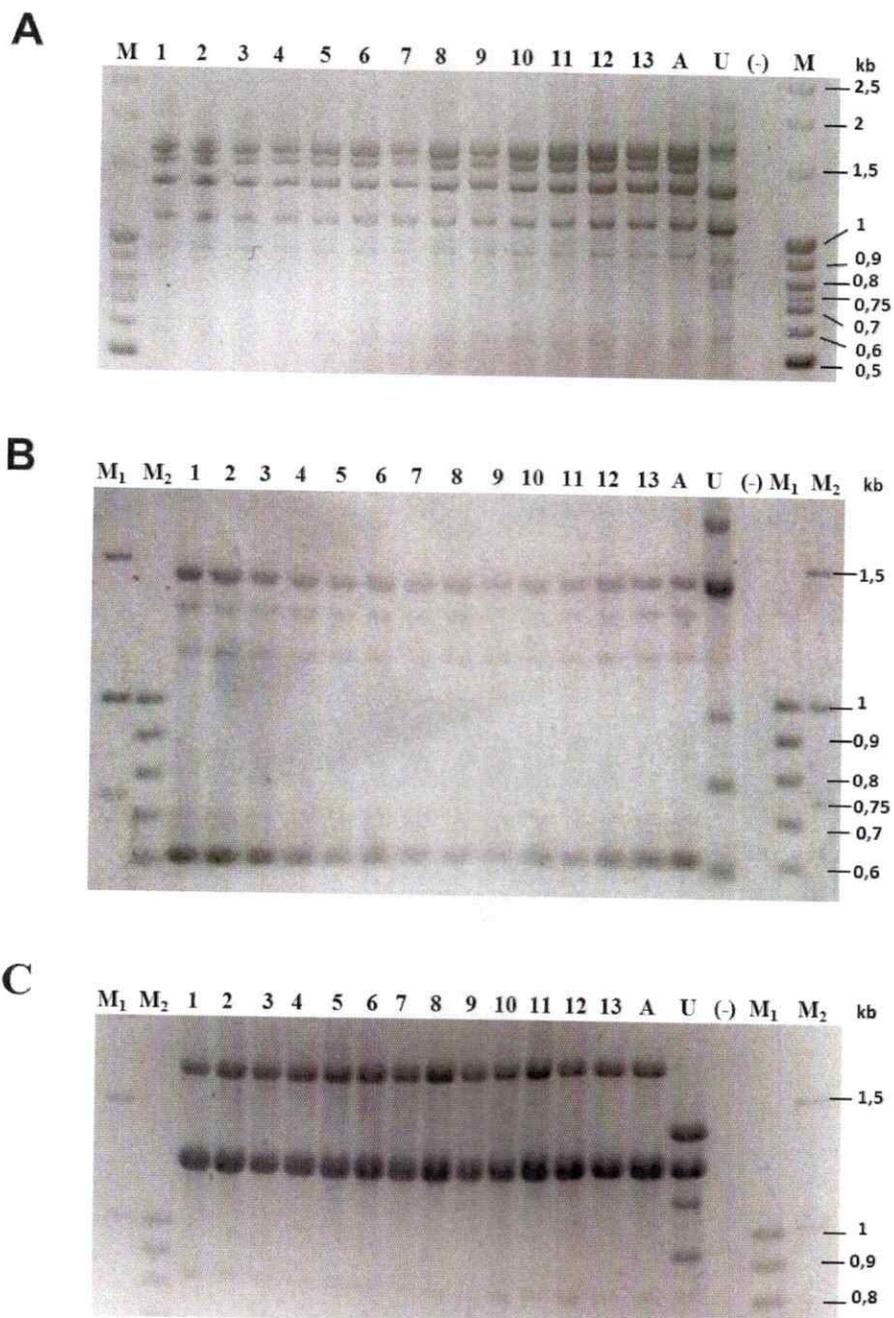
Para evaluar la variabilidad entre los aislados ANCHs, se analizó la secuencia del espaciador intergénico 1, IGS1 (*Intergenic spacer 1*), de los genes ribosómicos nucleares. Esta región se encuentra ubicada entre los genes LSU y 5S (Kurtzman y col. 2011) y ha sido utilizada para estudiar diferencias entre poblaciones y cepas en una amplia variedad de organismos eucariontes, incluyendo levaduras y entre ellas a *X. dendrorhous* (Fell y Blatt 1999).

Para analizar la región IGS1 de los aislados ANCHs, se amplificó y secuenció dicha región utilizando como molde el DNA genómico de los 13 aislados y los partidores universales LR12 y 5SRNA (Vilgalys y Gonzalez 1990). Se obtuvo fragmentos de PCR de 750 pb, los que fueron purificados y secuenciados. Las secuencias obtenidas fueron idénticas entre ellas y la secuencia consenso se comparó con la base de datos GenBank. El mayor porcentaje de identidad obtenido (100 %) fue con la cepa AVHN2 de *X. dendrorhous* [GenBank: KF731827], aislada desde la VIII Región de Chile, con un 100 % de cobertura. Seguido, por la cepa CRUB 0853 [GenBank: DQ661032.1] de *X. dendrorhous* aislada desde la Patagonia Argentina (Libkind y col. 2007 a), con un 87 % de identidad y 95 % de cobertura.

### 3.1.2 Análisis de MSP-PCR

Se evaluó un segundo método de genotipificación mediante la técnica de *fingerprinting* de MSP-PCR (*micro/minisatellite-primed PCR*). Esta técnica consiste en amplificar regiones repetidas del DNA, llamadas microsatélites (repeticiones de 2-10 pb) o minisatélites (repeticiones de 15-30 pb), las que se encuentran distribuidas en el genoma y presentan alto polimorfismo (Libkind 2007 b). La técnica de MSP-PCR ha sido utilizada para estudiar la variabilidad intraespecífica de levaduras, incluyendo a *X. dendrorhous* (Libkind y col. 2008 a, b).

Para el análisis MSP-PCR, primero se extrajo el DNA genómico de los 13 aislados ANCHs desde protoplastos. Luego, se realizó una reacción de PCR con cada DNA utilizando a los partidores M13, (GTG)<sub>5</sub> y (GAC)<sub>5</sub>, independientemente. Para los análisis comparativos se incluyó la cepa nativa AVHN2 y la cepa japonesa UCD 67-385. Posteriormente, los productos de PCR se separaron mediante electroforesis en geles de agarosa y se comparó el patrón de bandeo (Figura 4). Se encontró que los patrones de amplificación de los 13 aislados ANCHs y la cepa AVHN2 fueron similares, pero muy diferentes al de UCD 67-385. Por lo tanto, mediante esta metodología no fue posible identificar variabilidad entre ellos.

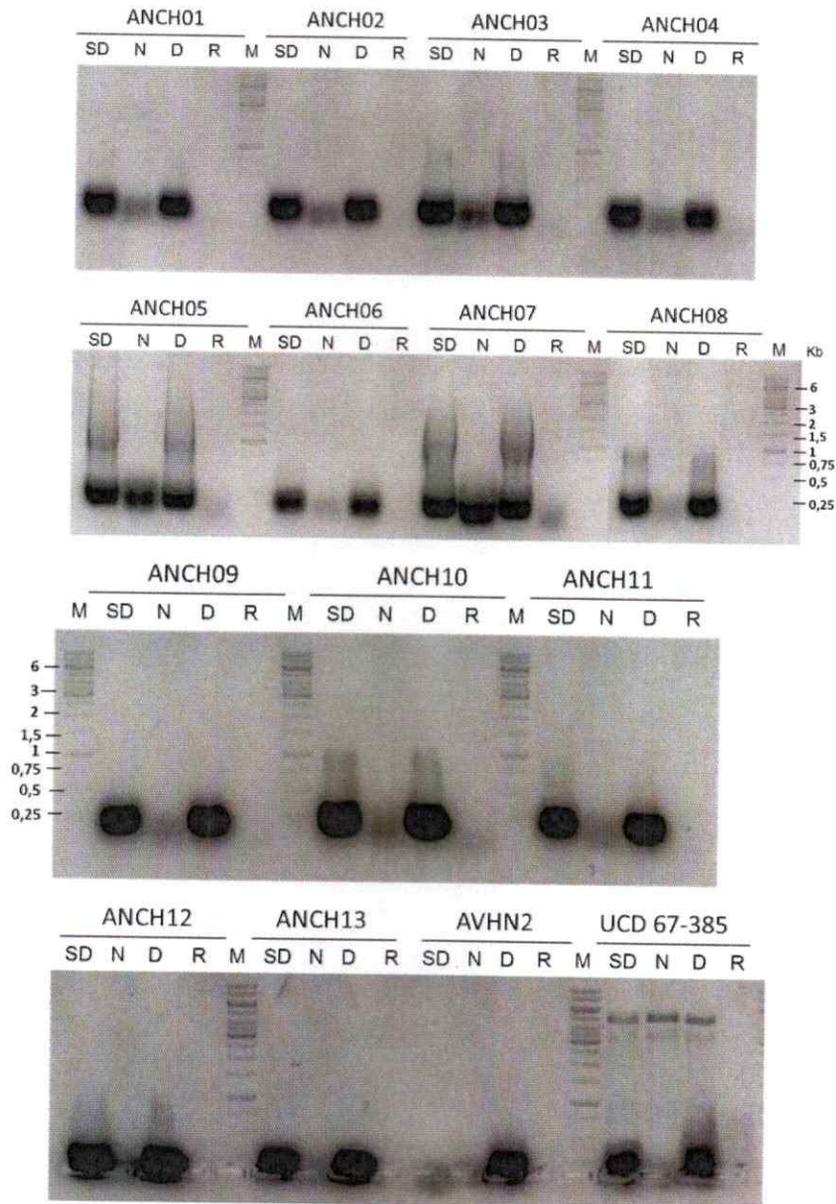


**Figura 4. Análisis de MSP-PCR de ANCHs, AVHN2 y UCD 67-385.**  
 Análisis de MSP-PCR obtenido con el partidor (GAC)<sub>5</sub> (A), (GTC)<sub>5</sub> (B) y M13 (C). Se utilizó como molde el DNA de los 13 aislados ANCH01-13 (carriles 1-13), AVHN2 (carril A) y UCD 67-385 (carril U). M: Marcador de peso molecular 100 bp y 1kb, M<sub>1</sub>: Marcador de peso molecular 100 bp y M<sub>2</sub>: Marcador de peso molecular 1kb.

### 3.1.3 Análisis de elementos genéticos extracromosómicos (EGEs)

Los elementos genéticos extracromosómicos (EGEs) del tipo RNA de doble hebra (dsRNA) son comúnmente encontrados en hongos filamentosos y levaduras. En distintas cepas de *X. dendrorhous* existe un alto polimorfismo de dsRNA en cuanto a su número y secuencia entre cepas aisladas desde distintas regiones del mundo (Baeza y col. 2009). Con el objetivo de estudiar variabilidad entre los aislados ANCHs, se analizó la posible presencia de EGEs en ellos y en la cepa AVHN2. Como control, se incluyó a la cepa UCD 67-385 la cual contiene 4 tipos de dsRNA (Baeza y col. 2009). Para analizar la presencia de estos elementos, se extrajo el RNA total de las cepas analizadas mediante ruptura con perlas de vidrio y protoplastos, luego el RNA total se sometió a distintos tratamientos enzimáticos que posteriormente fue analizado mediante electroforesis en geles de agarosa. En la figura 5 se muestra el análisis de presencia de dsRNA a partir de una extracción de RNA mediante perlas de vidrio y se obtuvo el mismo resultado cuando se extrajo RNA a partir de protoplastos. Los elementos de dsRNA se identificaron por su resistencia a los tratamientos con DNasa I y nucleasa S1, y por su sensibilidad al tratamiento con RNasa A. En esta figura 5 se observan elementos de aproximadamente 1.0 kb en los carriles correspondientes a la extracción de ANCH03, ANCH05 y ANCH07. Sin embargo, estos elementos fueron sensibles al tratamiento con nucleasa S1, por lo tanto, probablemente pueden corresponder a RNA ribosómico. En conclusión, los 13 aislados ANCHs y la cepa AVHN2 no contienen moléculas de dsRNA, mientras que UCD 67-385 sí los posee, confirmando que los métodos de





**Figura 5. Análisis de elementos genéticos extracromosómicos de dsRNA en ANCHs, AVHN2 y UCD 67-385.**

Se extrajo el RNA total de los aislados ANCHs, AVHN2 y UCD 67-385 (SD, sin digerir) y se identificó los elementos de dsRNA por su resistencia a los tratamientos con nucleasa S1 (N) y DNasa I (D), y por su sensibilidad al tratamiento con RNasa A (R). No se identificaron moléculas de dsRNA en los aislados ANCHs. M: Marcador de peso molecular 1 kb.

extracción de ácidos nucleicos fueron exitosos. Por lo tanto, esta metodología no permitió diferenciar a los aislados ANCHs.

#### 3.1.4 Análisis de la secuencia del gen *COXI*

Con el propósito de diferenciar a los aislados ANCHs mediante estrategias moleculares, se analizó la secuencia del gen mitocondrial de la subunidad 1 de la citocromo oxidasa (*COXI* o *COI*). La citocromo oxidasa cataliza la transferencia de electrones desde el citocromo c al oxígeno molecular en el proceso de respiración celular (Wikström 1989). La secuencia genómica que codifica a los aminoácidos 19-234 (645 pb) de *COXI* ha sido utilizado como metodología para la identificación de animales (*DNA barcoding*) (Hebert y col. 2003) y recientemente se ha propuesto su uso para la identificación de especies en el reino Fungi (Seifert y col. 2007). Se ha reportado variabilidad intraespecífica de esta región, en cepas del género *Penicillium* (Seifert y col. 2007) y *Leohumicola* (Nguyen y Seifert 2008). Sin embargo, esta herramienta aún no ha sido ampliamente utilizada (Seifert 2009).

A partir del genoma y transcriptoma de la cepa UCD 67-385 disponible en nuestro laboratorio, se identificó el gen *COXI* mediante análisis de BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) con el gen *COXI* de *Cryptococcus neoformans* [GenBank: AY560609.1]. Se encontró que la región codificante comprende a 1.665 pb, la cual no contiene intrones (ANEXO 1; sección 7,1) y sería traducida en una proteína de 554 aminoácidos (ANEXO 2; sección 7,2). La secuencia obtenida fue depositada en la base de datos de GeneBank [GenBank: KF731815]. A partir de su secuencia nucleotídica, se

diseñaron los partidores COX1.5F y COX1.7R que permiten amplificar la región del gen *COX1* que codifica a los aminoácidos 19-200. Se amplificó y secuenció esta región en los aislados ANCHs y en la cepa AVHN2. Las secuencias de los aislados ANCHs fueron idénticas entre ellas, y tienen 99,8 y 98,3 % de identidad con las cepas AVHN2 y UCD 67-385 (secuencia identificada en el genoma), respectivamente. A pesar que no fue posible diferenciar los aislados ANCHs mediante esta metodología, sí fue posible diferenciarlos de AVHN2.

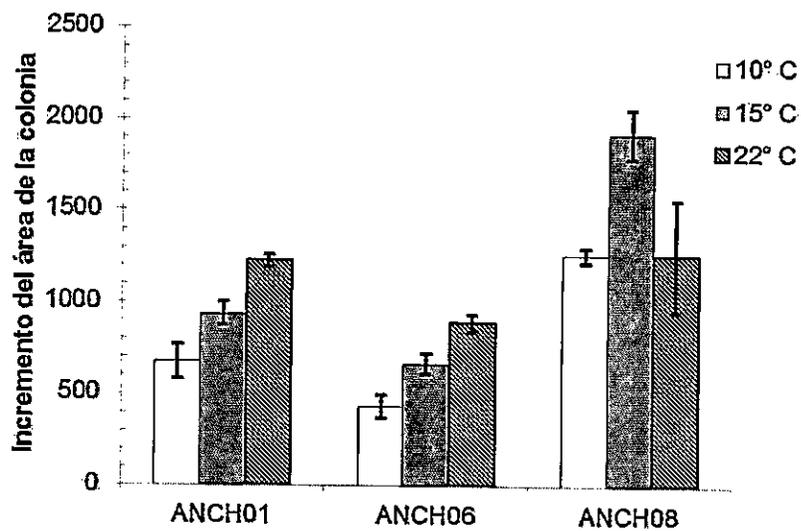
En resumen, los aislados ANCHs efectivamente corresponden a *X. dendrorhous*, pero no fue posible diferenciarlos mediante las estrategias moleculares utilizadas. Como se mencionó previamente, existen tres fenotipos de la morfología de colonia entre los 13 aislados, y entre ellos se escogieron al azar: ANCH01, ANCH06 y ANCH08, y fueron los aislados utilizados para posteriores análisis.

### **3.2 Estudio del crecimiento y la tolerancia a la radiación UV de las cepas de *X. dendrorhous*.**

*X. dendrorhous* es una levadura psicrotolerante (Johnson y col. 1979; Liu y col. 2008), es decir, es tolerante al frío y su temperatura de crecimiento es mayor a 20 °C (Gounot 1986). Se ha descrito que la temperatura óptima y máxima de crecimiento de esta levadura es 22 y 26 °C, respectivamente (Johnson y col. 1979; Liu y col. 2008). Sin embargo, considerando las bajas temperaturas de la Antártica, estos aislados podrían ser psicrófilos, es decir que su temperatura óptima y máxima de crecimiento sea 20 °C o menor. Para evaluar la tolerancia a diferentes temperaturas se midió el crecimiento de

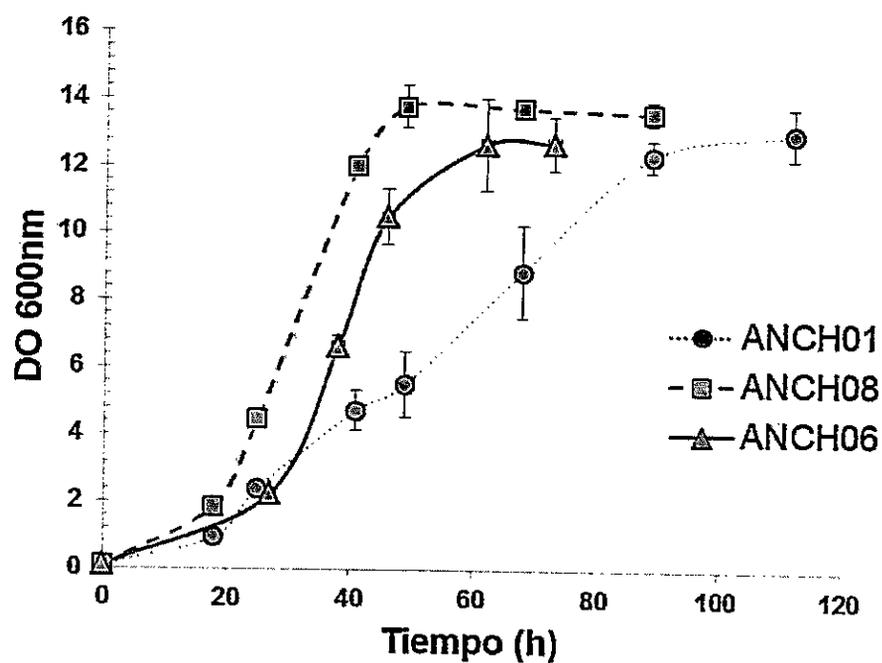
los aislados ANCH01, ANCH06 y ANCH08 a 10, 15 y 22 °C en placas con medio completo YM. Durante 8 d se fotografió las colonias de cada cepa y se determinó el área de la colonia expresado en pixeles<sup>2</sup>. Los datos indican el incremento del área de colonia del día 8 en relación al día 3, correspondiente a la diferencia entre ambas áreas (Figura 6). ANCH01 y ANCH06 crecieron óptimamente a 22 °C y la cepa ANCH08 creció mejor a 15 °C. Debido a que la temperatura máxima de crecimiento de los aislados analizados es sobre 20 °C, éstos son psicrotolerantes como lo previamente descrito en otras cepas de *X. dendrorhous* (Johnson y col. 1979; Liu y col. 2008).

La cinética de crecimiento de ANCH01, ANCH06 y ANCH08 se evaluó en cultivos en medio YM líquido con agitación constante durante 5 d a 22 °C, ya que es la temperatura de crecimiento óptima descrita para *X. dendrorhous* (Johnson y col. 1979). El aumento de la biomasa se evaluó mediante la medición de la densidad óptica a 600 nm, colectando alícuotas de cultivo en las diferentes etapas de crecimiento (Figura 7). Los tiempos generacionales en estas condiciones fueron de  $11,12 \pm 0,05$ ,  $8,44 \pm 0,71$  y  $8,94 \pm 0,28$  h para ANCH01, ANCH06 y ANCH08, respectivamente.



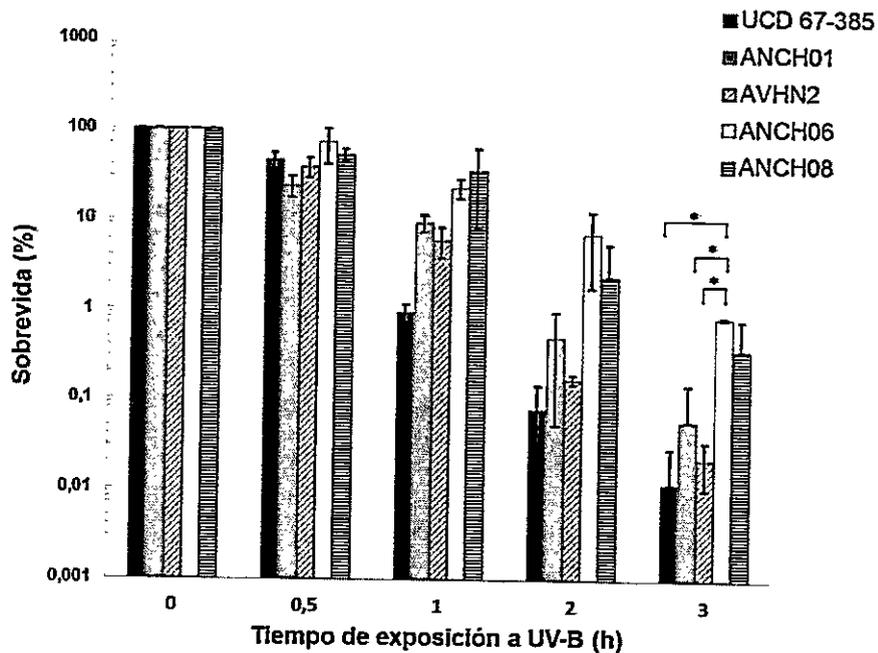
**Figura 6. Evaluación del crecimiento a diferentes temperaturas de los aislados ANCH01, ANCH06 y ANCH08.**

Evaluación del crecimiento mediante el incremento del área de la colonia de ANCH01, ANCH06 y ANCH08 incubados a 10, 15 y 22 °C cultivados en placas de medio YM. Los resultados indican el incremento del área correspondiente a la diferencia entre al área de la colonia del día 8 y el área del día 3 de incubación. Los resultados muestran el valor promedio y la desviación estándar de tres colonias de cada aislado.



**Figura 7. Curvas de crecimiento de los aislados ANCH01, ANCH06 y ANCH08.**  
 Curva de crecimiento de los aislados ANCH01, ANCH06 y ANCH08 cultivados en medio YM con agitación constante a 22 °C. Los resultados muestran el valor promedio y la desviación estándar de tres cultivos independientes de cada aislado.

Considerando la alta radiación UV del hábitat original de los aislados ANCHs, se estudió su tolerancia a radiación UV-B (310 nm) de ANCH01, ANCH06 y ANCH08, y se comparó respecto a las cepas AVHN2 y UCD 67-385. Con este propósito, las cepas fueron expuestas a la luz UV-B (310 nm) y se determinó el porcentaje de sobrevivencia luego de 0,5; 1; 2 y 3 h de exposición (Figura 8). De acuerdo a estos resultados, ANCH06 tiene un mayor porcentaje de sobrevivencia luego de 3 h de exposición, aproximadamente 1,5 veces mayor que UCD 67-385 y AVHN2, lo cual es estadísticamente significativo según la prueba t de Student ( $p < 0.05$ ).



**Figura 8. Tolerancia a la radiación UV-B de los aislados ANCH01, ANCH06 y ANCH08.**

Porcentaje de sobrevida de ANCH01, ANCH06, ANCH08, AVHN2 y UCD 67-385 luego de 0,5; 1; 2 y 3 h de exposición a radiación UV-B de 310 nm. Los cultivos fueron expuestos a luz UV-B y luego sembrados en placas con medio YM e incubados a 22 °C durante 4 d. Se muestra el valor el promedio de sobrevida de tres cultivos independientes de cada cepa. Análisis estadísticos se realizaron con la prueba t de Student, \*:p<0.05.

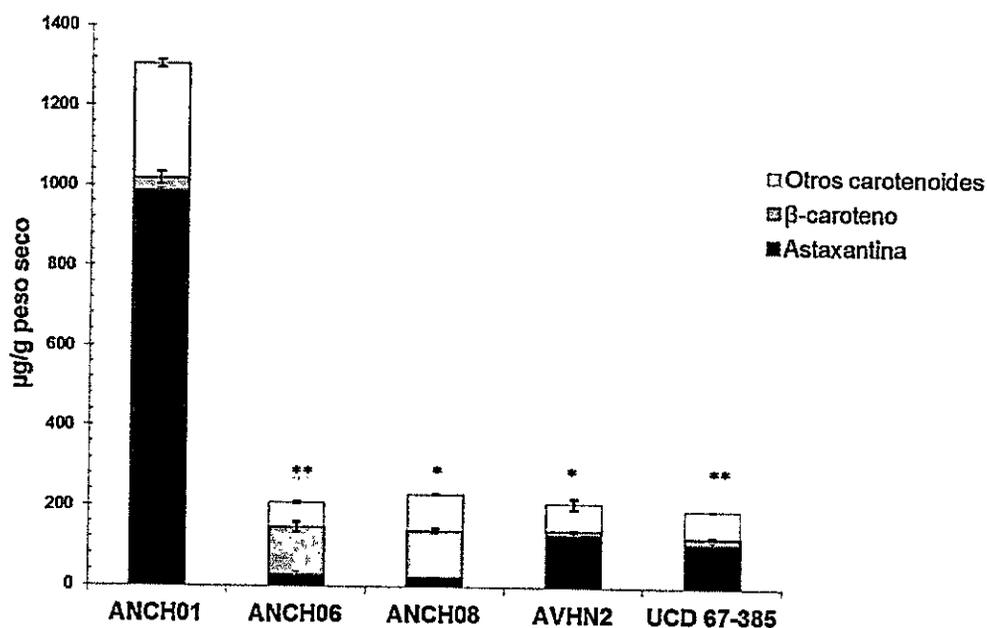
### 3.3 Análisis de producción de carotenoides

La radiación UV promueve la formación de ROS en organismos, incluyendo hongos y levaduras, y los carotenoides confieren protección contra estas especies (Moliné y col. 2009). Considerando el alto índice de radiación UV en la Antártica, probablemente las cepas de *X. dendrorhous* aisladas desde esta región tienen una mayor producción de carotenoides en comparación a cepas aisladas desde otras regiones. Por otra parte, las cepas aisladas desde la Antártica tienen pigmentación roja, amarillo pálido y amarilla, lo cual difiere de la coloración usual de otras cepas silvestres de la levadura, que por lo general es anaranjada. Esto sugiere que hay una diferencia en cuanto al contenido y composición de carotenoides en los aislados ANCHs. Para evaluar lo anterior, se analizó la producción de carotenoides en ANCH01, ANCH06 y ANCH08, y se comparó con respecto a las cepas silvestres AVHN2 y UCD 67-385. La producción y composición de carotenoides se evaluó en cultivos de 5 d (fase estacionaria tardía de crecimiento) en medio YM líquido a 22 °C con agitación constante (Tabla 3, Figura 9). De acuerdo a los resultados, ANCH01 produce la mayor cantidad de carotenoides, aproximadamente 6 veces más en relación a las otras cepas analizadas. Además, el carotenoide mayoritario es astaxantina, al igual que las otras cepas silvestres y representa el 70 % del total de carotenoides. La astaxantina alcanzó 989 ppm en las condiciones estudiadas, aproximadamente 8 veces más que en UCD 67-385. Por otra parte, ANCH06 y ANCH08 producen una similar cantidad de carotenoides que AVHN2 y UCD 67-385 (192 - 230 ppm), pero su composición es diferente. En estos aislados, el carotenoide mayoritario fue  $\beta$ -caroteno, en vez de astaxantina. A pesar de ello, estos

**Tabla 3. Producción de carotenoides en los aislados ANCH01, ANCH06 ANCH08 y de las cepas AVHN2 y UCD 67-685.**

Carotenoides (ppm)	Aislados/cepas de <i>X. dendrorhous</i>				
	ANCH01	ANCH06	ANCH08	AVHN2	UCD67-385
<b>Carotenoides totales</b>	<b>1.315,23±217,74</b>	<b>207,69±6,63</b>	<b>230,89±23,13</b>	<b>208,01±81,46</b>	<b>192,06±11,84</b>
	(100)	(100)	(100)	(100)	(100)
β-caroteno	30,17±15,21 (2,34±1,16)	118,17±12,59 (56,90±6,06)	118,12±4,93 (51,16±2,14)	10,34±0,93 (4,97±0,45)	14,30±1,49 (7,45±0,78)
Echinenona	11,69±1,87 (0,89±0,14)	19,12±3,11 (9,21±1,50)	13,92±2,22 (6,03±0,94)	5,22±0,83 (2,51±0,40)	7,70±1,38 (4,01±0,72)
OH-Echinenona	33,04±4,98 (2,51±3,38)	16,48±5,42 (7,93±2,61)	8,26±1,36 (3,58±0,59)	12,55±6,56 (6,03±3,15)	18,05±1,44 (9,40±0,75)
Fenicoxantina	134,54±7,80 (10,23±0,59)	11,31±2,73 (5,44±1,31)	8,81±0,58 (3,81±2,25)	27,36±1,91 (13,15±0,92)	26,63±2,31 (13,86±1,21)
Astaxantina	988,90±3,91 (75,19± 0,3)	29,13±6,76 (14,03±3,26)	21,69±2,30 (9,39±0,99)	130,76±3,43 (62,86±1,65)	110,33±4,11 (57,44±2,14)
Otros carotenoides <sup>a</sup>	105,45±10,01 (8,02±0,76)	12,45±6,28 (5,99±3,02)	59,78±7,60 (25,89±3,29)	17,58±4,90 (8,45±2,36)	14,63±1,59 (7,62±0,83)

Valores de la tabla son el promedio de tres cultivos independientes ± desviación estándar en ppm (µg de carotenoides por gramo de levadura seca). El porcentaje de cada carotenoide con respecto al contenido total de carotenoides se indica entre paréntesis. A: Otros carotenoides incluyen cantaxantina, OH-keto-toruleno, OH-keto- γ- caroteno, toruleno, neurosporeno y carotenoides no identificados.



**Figura 9. Producción de carotenoides en los aislados ANCH01, ANCH06 ANCH08 y de las cepas AVHN2 y UCD 67-685.**

Producción de carotenoides en los aislados antárticos ANCH01, ANCH06 y ANCH08, y las cepas AVHN2 y UCD 67-385. Los carotenoides fueron extraídos luego de 5 d de crecimiento en medio YM a 22 °C con agitación constante. Se muestra el valor promedio de tres cultivos independientes de cada cepa. Diferencias en la producción de carotenoides totales entre cada cepa en relación a ANCH01, se evaluó con prueba t de Student, \*:p<0,05, \*\*:p<0,001.

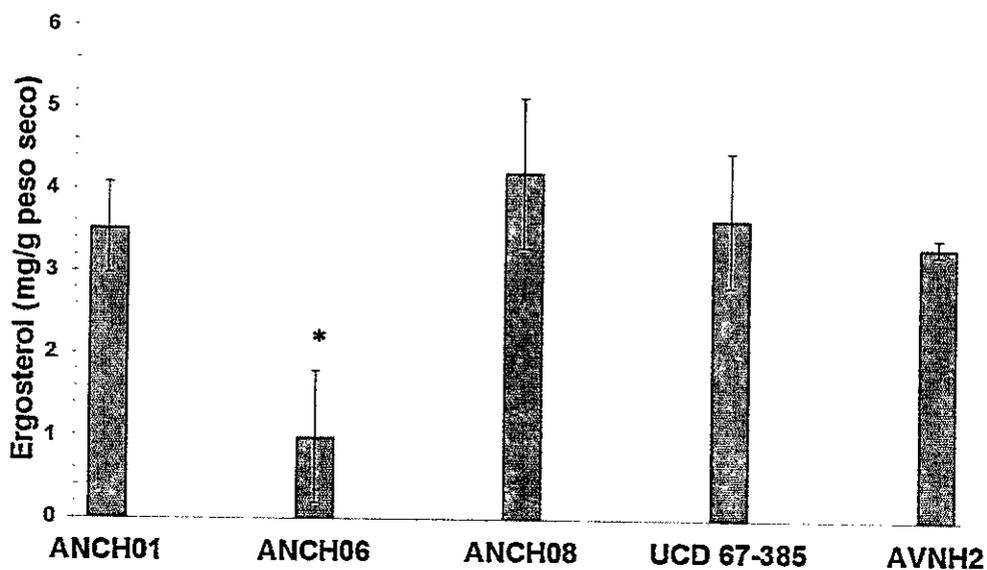
aislados si producen astaxantina, lo que es característico en cepas de *X. dendrorhous* (Tognetti y col. 2013).

### **3.4 Análisis de producción de micosporinas**

Además de los carotenoides, se ha sugerido que las micosporinas son metabolitos que confieren fotoprotección en levaduras y otros microorganismos (Bandaranayake 1998). Por estos motivos, se analizó la producción de micosporinas en los aislados ANCH01, ANCH06, ANCH08 y se comparó con las cepas AVHN2 y UCD 67-385, luego de 5 d de incubación a 22 °C en placas con medio YM. Contrario a lo esperado, no se encontró este tipo de moléculas en los aislados antárticos, mientras que si se encontraron en AVHN2 y UCD 67-385. En estas cepas, se identificó la micosporina glutaminol glucósido,  $45,59 \pm 1,87$  y  $3,67 \pm 2,51$  mg/g levadura seca, respectivamente.

### **3.5 Análisis de la producción de ergosterol**

La producción de esteroides se evaluó luego de 5 d de cultivo en medio YM a 22 °C con agitación constante de los aislados antárticos ANCH1, ANCH6 y ANCH8, y se comparó con respecto a las cepas AVHN2 y UCD 67-385. En todas las cepas analizadas el ergosterol fue el principal esteroide (94-100 % del total de esteroides) (Figura 10). Según los resultados, las cepas analizadas producen una cantidad similar de ergosterol, a excepción de ANCH06 que produce aproximadamente tres veces menos que las otras cepas.



**Figura 10. Producción de ergosterol en los aislados ANCH01, ANCH06 ANCH08 y de las cepas AVHN2 y UCD 67-685.**

Producción de ergosterol de ANCH01, ANCH06, ANCH08, AVHN2 y UCD- 67-385 de *X. dendrorhous*. Los esteroides se extrajeron luego de 5 d de cultivo a 22 °C en medio YM con agitación constante. Se muestra el valor el promedio de tres cultivos independientes de cada cepa. Las diferencias en cantidad de ergosterol entre ANCH06 y las otras cepas se analizó con prueba t de Student (\*:  $p < 0,05$ ).

### **3.6 Análisis de producción de ácidos grasos**

La instauración de los FAs es una de las principales adaptaciones en levaduras que colonizan ambientes fríos. Se ha sugerido que la presencia de FAs insaturados está relacionada con la habilidad de crecer a baja temperatura, por estos motivos se evaluó la composición de FAs en los aislados antárticos ANCH01, ANCH06 y ANCH08, y se comparó con respecto a las cepas AVHN2 y UCD 67-385. La composición de FAs fue evaluada luego de 5 d de cultivo en medio YM a 22 °C con agitación constante (Tabla 4). Los FAs predominantes fueron el ácido linoleico, oleico y palmítico, en todas las cepas analizadas. ANCH01, ANCH06, ANCH08 tienen una proporción similar de PUFAs, entre ellas, lo cual es mayor que en AVHN2 y dos veces mayor a lo observado en UCD 67-385.

Tabla 4. Composición de ácidos grasos en ANCH01, ANCH06, ANCH08, AVHN2 y UCD 67-385.

Cepa/ aislado	Porcentaje del total de ácidos grasos														
	Saturados					Monoinsaturados					Poliinsaturados				
	<C <sub>14:0</sub>	Ácido mirístico C <sub>14:0</sub>	Ácido Palmítico C <sub>16:0</sub>	Ácido estearico C <sub>18:0</sub>	>C <sub>14:0</sub> Total	Ácido palmítico C <sub>16:01</sub>	Ácido Oleico C <sub>18:01</sub>	C <sub>20:01</sub>	Total	Ácido Linoleico C <sub>18:02</sub> (ω-6)	Ácido α-linolénico C <sub>18:03</sub> (ω-3)	Total			
ANCH01	ND	0,24	14,27	1,71	7,42	0,35	23,99	0,59	ND	41,65	ND	42,17	30,49	3,35	33,84
ANCH06	0,06	0,85	23,11	0,32	6,67	1,25	32,62	0,49	0,04	29,31	0,09	29,93	35,52	1,94	37,46
ANCH08	ND	0,8	22,95	0,83	7,94	1,27	34,13	0,33	0,15	29,04	0,07	32,02	32,1	1,75	33,85
AVHN2	0,17	0,64	32,1	0,65	21,75	0,89	56,48	ND	ND	15,99	ND	16,37	23,92	3,25	27,17
UCD 67-385	0,05	0,45	10,20	0,18	6,75	1,49	19,26	0,52	ND	65,16	0,15	65,83	12,56	2,35	14,91

ND: FA no detectado; c.c.D: "C" representa el número de átomos de carbono de cada FA y "D" indica el número de dobles enlaces de cada FA a partir del carbono número 3.

## 4. DISCUSIÓN

### 4.1 Caracterización molecular de aislados antárticos de *X. dendrorhous*.

*X. dendrorhous* ha sido encontrada habitualmente en asociación con árboles de hoja caduca (desde exudados del árbol o en hongos parásitos del árbol) (Weber y col. 2006; Libkind y col. 2007 a). En escasas oportunidades también se ha aislado desde hojas de árboles y muestras de agua (Libkind y col. 2007 a; Weber y col. 2008). Es decir, no existen reportes previos sobre el aislamiento de *X. dendrorhous* desde muestras de suelo y tampoco desde la Antártica, siendo este el primer trabajo que lo describe.

Basado en las secuencias ITS del rDNA, Libkind y colaboradores (2007 a) han propuesto que existiría una relación entre las cepas de *X. dendrorhous* y su árbol hospedero. De este modo, explican la presencia de esta levadura en muestras de agua del lago Ilón, en la Patagonia Argentina, por los bosques cercanos de *Nothofagus*. El género *Nothofagus* se distribuye en el sur de Chile y Argentina, incluyendo el Cabo de Hornos (Swenson y col. 2001). Según esta hipótesis y basándose en los resultados de los análisis de la secuencia ITS, el hábitat primario de los aislados ANCHs serían bosques de *Nothofagus* de América del Sur y probablemente éstas cepas fueron llevadas a la Isla Rey Jorge por humanos y/o por masas de aire (Pearce y col. 2009; Cowan y col. 2011). El dendrograma, basado en la región ITS, agrupa a las cepas de *X. dendrorhous* aisladas de la Patagonia Argentina junto con los aislados de la Antártica. Por otra parte, a pesar de la cercanía geográfica estas cepas no agrupan con la cepa chilena aislada desde hojas

de eucalipto de Concepción. Además, basado en los análisis de ITS y D1/D2, la cepa aislada de Concepción difiere significativamente de las cepas descritas de *X. dendrorhous*, por lo que se ha propuesto que incluso podría representar una nueva especie (Weber y col. 2008; Tognetti y col. 2013).

A pesar que no se encontraron diferencias moleculares entre los aislados ANCHs, si se encontraron diferencias fenotípicas tales como: producción de carotenoides y tolerancia a la radiación UV-B. Como estrategias moleculares para diferenciar a los aislados ANCHs se utilizaron las técnicas de MSP-PCR, el análisis de secuencia de rDNA y el análisis de EGEs, ya que comprenden a metodologías que se utilizan para estudiar la variabilidad intraespecie en *X. dendrorhous*. No obstante, estas estrategias no permitieron diferenciar a los aislados ANCHs. Debido a que no existen muchas herramientas moleculares para evaluar variabilidad intraespecie, como una nueva alternativa se analizó la secuencia del gen *COXI* que no había sido estudiado previamente en *X. dendrorhous*. Sin embargo, mediante esta estrategia no se encontró diferencias entre los aislados ANCHs, pero sí fue posible diferenciarlos de AVHN2, lo cual no había sido posible mediante los otros métodos.

#### **4.2 Producción de carotenoides, micosporinas, ergosterol y ácidos grasos**

En general, las cepas silvestres de *X. dendrorhous* tienen una pigmentación anaranjada, mientras que varios de los aislados antárticos, ANCH01 a 05 y 13, son rojos. El análisis de los carotenoides de ANCH01 arrojó que en este aislado hay una elevada producción de carotenoides (1.315 ppm), lo cual representa uno de los mayores niveles

reportados en una cepa silvestre de *X. dendrorhous*, que bajo las condiciones estudiadas producen entre 200 y 400 ppm (Schmidt y col. 2011). Por otra parte, la elevada producción de astaxantina en ANCH01 lo convierte en un buen candidato para ser utilizado en estudios de optimización de las condiciones de cultivo, métodos clásicos de mutagénesis al azar y/o de ingeniería metabólica, metodologías que ya han sido utilizadas en *X. dendrorhous* para favorecer la producción de este pigmento (Schmidt y col. 2011).

Los aislados ANCH06 y ANCH08 tienen una composición de carotenoides diferente a otras cepas silvestres de *X. dendrorhous*, pero la cantidad de carotenoides totales es similar (Andrewes y col. 1976; Schmidt y col. 2011). Por lo tanto, según los resultados arrojados en este trabajo, no existiría una relación directa entre el índice de radiación UV del hábitat de la levadura y el contenido de carotenoides confirmando lo observado en estudios previos (Libkind y col. 2006). A pesar de su pigmentación amarilla, estos aislados sí producen astaxantina, aunque en bajas cantidades, lo cual ha sido considerado por otros grupos como determinante de cepas silvestres de *X. dendrorhous* (Tognetti y col. 2013). Además, también se pudo amplificar el gen *cr1S* (gen que codifica a la astaxantina sintasa en *X. dendrorhous*) desde los aislados ANCHs, lo que confirma que éstos tienen el gen que controla la síntesis de astaxantina desde  $\beta$ -caroteno (dato no mostrado). No obstante, el carotenoide mayoritario producido por dichos aislados es  $\beta$ -caroteno. Por lo tanto, este trabajo también es el primero en describir cepas silvestres de *X. dendrorhous* cuyo carotenoide principal es  $\beta$ -caroteno, en oposición a astaxantina.

Se ha sugerido que las micosporinas juegan un rol fotoprotector (Libkind y col. 2004) y son producidas por una amplia variedad de microorganismos cuando son expuestos a altas intensidades de luz (Oren y Gunde Cimerman 2007). En una amplia variedad de organismos se ha documentado que existe una relación directa entre el contenido de micosporinas y los niveles de radiación UV a los que están expuestos (Oren y Gunde Cimerman 2007). Se ha informado que *X. dendrorhous* produce estos compuestos constitutivamente (Libkind y col. 2011) y considerando la alta radiación UV de la Antártica, contrario a lo esperado, los aislados ANCHs no producen micosporinas bajo las condiciones estudiadas.

Recientemente se ha propuesto un método para una rápida identificación de *X. dendrorhous* que se basa en la detección simultánea de micosporinas y astaxantina en aislados rojos de levaduras (Tognetti y col. 2013). Según nuestros resultados de los aislados ANCHs y de la cepa silvestre CBS 6938 de *X. dendrorhous* (datos no publicados), la producción micosporinas no es determinante en cepas silvestres de *X. dendrorhous*. Además, ANCH06 y ANCH08 producen bajas cantidades de astaxantina en comparación a otras cepas silvestres, por lo que pudieron ser excluidos como *X. dendrorhous* al utilizar este método de identificación, a pesar que los métodos moleculares claramente los identifica como tal.

Por otra parte, aunque ANCH06 no produce micosporinas, este aislado mostró un mayor porcentaje de sobrevivencia luego de 3 h de exposición a radiación UV-B, en comparación a otras cepas silvestres. Por lo tanto, hay otros mecanismos fotoprotectores en la levadura, como por ejemplo estrategias de reparación al daño del DNA generado

por la radiación UV como la fotoreactivación y reparación por escisión de nucleótidos (Prakash y Prakash 2000; Sancar 2003), que podrían estar operando y/o favorecidos en ANCH06.

En respuesta de aclimatación y/o adaptación, los microorganismos pueden experimentar cambios en la composición de lípidos para regular la fluidez de las membranas celulares a bajas temperaturas. Por ejemplo, el incremento de la proporción de FAs insaturados (MUFAs y PUFAs) es una de las respuestas más estudiadas (Rossi y col. 2009). La proporción de FAs insaturados encontrados en ANCH01, ANCH06, ANCH08 es similar a lo encontrado en otras levaduras antárticas (Zlatanov y col. 2001). En estos aislados antárticos y en UCD 67-385, los FAs insaturados son los más abundantes, y representan alrededor del 65 al 80 %, mientras que en AVHN2 solo representan el 43 %. Sin embargo, solo considerando la proporción de PUFAs, esta es solo el 14 % en UCD 67-385, mientras que en ANCHs es de aproximadamente 2 veces mayor (33 a 37 %). Estos resultados son consistentes a reportes previos que indican que las levaduras antárticas producen una mayor proporción de PUFAs (Thomas-Hall y Watson 2002).

En la mayoría de los hongos filamentosos y levaduras, los ácidos palmítico, esteárico, oleico, linoleico y ( $\alpha$  ó  $\gamma$ )-linolénico son los FAs predominantes (Radwan 1991). Todos ellos fueron identificados en todas las cepas estudiadas en este trabajo. Adicionalmente, estos FAs también han sido encontrados en cepas de *X. dendrorhous* aisladas de otras regiones (Sanderson y Jolly 1994; Libkind y col. 2008), aunque en diferente proporción. La fracción de PUFAs encontrada en las cepas de *X. dendrorhous*

aisladas desde la Patagonia Argentina fue mayor que en los aislados ANCHs (70,5 %) (Sanderson y Jolly 1994; Libkind y col. 2008). El análisis de la composición de FAs reveló que los FAs predominantes son de C<sub>14</sub> a C<sub>18</sub>, acorde a otras levaduras (Rossi y col. 2009). Se ha reportado, que diversos organismos a bajas temperaturas sufren un acortamiento de la cadena de FAs (Guschina y Harwood 2006; Tronchoni y col. 2012) en respuesta de aclimatación y/o adaptación, incluso en poblaciones de una misma especie (Bahrndorff y col. 2007). Sin embargo, al parecer esto sólo ocurre en levaduras mesófilas (Rossi y col. 2009). En este trabajo, no se observaron grandes diferencias en cuanto a la composición de FAs en relación al largo de la cadena del FA entre las cepas estudiadas.

En todas las cepas estudiadas, los PUFAs encontrados solo fueron de dos tipos: ácido linoleico y ácido linolénico, moléculas de 18 átomos de carbono, que son los que frecuentemente se encuentran en aceites de semillas de plantas (Radwan 1991). Es decir, no se encontraron PUFAs de 20 átomos de carbono que son los de mayor interés biotecnológico por su uso farmacéutico (Radwan 1991).

Por otra parte, los esteroides incluyendo el ergosterol, son también componentes estructurales de las membranas celulares eucariotas y cumplen una importante función en la regulación de la fluidez y permeabilidad de las membranas (Shobayashi y col. 2005). Se ha sugerido que el ergosterol es esencial para el crecimiento a bajas temperaturas (Hemmi y col. 1995) y por estos motivos se evaluó la producción de esteroides en los aislados antárticos. No se encontraron diferencias entre las cepas aisladas de la Antártica y las aisladas de otras regiones, exceptuando a ANCH6 que

produce hasta 3 veces menos en comparación a las otras cepas. Por lo tanto, no existiría una relación entre el contenido de ergosterol y la zona de aislamiento, similar a lo encontrado por otros autores (Tronchoni y col. 2012).

La síntesis de ergosterol y astaxantina derivan del isopentenil pirofosfato, el que a su vez se sintetiza a partir de la vía del mevalonato en *X. dendrorhous* (Schmidt y col. 2011). Cuando se bloquea la síntesis de ergosterol en *X. dendrorhous*, hay un incremento en el contenido de carotenoides y consecuentemente de astaxantina (Loto y col. 2012). Adicionalmente, cepas mutantes sobreproductoras de astaxantina de *P. rhodozyma*, obtenidas por mutagénesis química al azar, producen menos ergosterol en comparación a la cepa parental (Miao y col. 2011). Estas evidencias sugieren que el ergosterol regula la síntesis de carotenoides mediante un mecanismo de *feedback* negativo (Loto y col. 2012). Por lo tanto, al bloquear la síntesis de ergosterol mediante ingeniería metabólica podría ser una buena alternativa para mejorar la producción de astaxantina en ANCH01.

Finalmente, hasta la fecha se ha descrito que *X. dendrorhous* y *P. rhodozyma* han sido aisladas desde regiones frías de Alaska, Finlandia, Japón, Rusia, Estados Unidos y Europa Occidental, y recientemente desde la Patagonia Argentina y el sur de Chile (Kurtzman y col. 2011). No hay reportes que describen el aislamiento y caracterización de *X. dendrorhous* aisladas desde muestra de suelo de la Antártica. Por otra parte, la producción de carotenoides de los aislados ANCH01, ANCH06 y ANCH08 de *X. dendrorhous*, difieren al de otras cepas silvestres descritas y ANCH01 resultó ser un

sobre-productor natural de astaxantina. Por lo tanto, futuras investigaciones se centrarán en mejorar la producción de astaxantina en este aislado.

## 5. CONCLUSIÓN

Basado en análisis de los dominios D1/D2 y de la región ITS del rDNA, las 13 levaduras aisladas desde muestras de suelo colectadas desde la Isla Rey Jorge de la Península Antártica, corresponden a *X. dendrorhous*.

No fue posible diferenciar los aislados de *X. dendrorhous* mediante estrategias moleculares, como MSP-PCR, presencia de EGEs o por el análisis de las secuencias de rDNA y del gen *COXI*. Sin embargo, este último análisis permitió diferenciarlas de la cepa chilena AVHN2.

En relación a la producción de los metabolitos como carotenoides, micosporinas, ergosterol y ácidos grasos, el aislado ANCH01 produce 8 veces más astaxantina que la cepas silvestre UCD 67-385. Los aislados antárticos no produjeron micosporinas en las condiciones estudiadas, no obstante, ANCH06 presentó una mayor tolerancia a la luz UV-B, por lo tanto, otros mecanismos de fotoprotección deberían estar operando. Finalmente, en relación a la producción de lípidos como FAs, los aislados antárticos producen 2 veces más PUFAs en relación a las otras cepas silvestres estudiadas, lo que también corresponde a una ventaja adaptativa para colonizar ambientes fríos. En cuanto a la producción de ergosterol no se encontró una relación entre la producción y la zona desde donde fueron aisladas las levaduras.

## 6. PROYECCIONES

*X. dendrorhous* es un productor natural de astaxantina, un metabolito relevante en biotecnología especialmente por su uso en la acuicultura. Habitualmente, esta levadura ha sido aislada en asociación a árboles y en escasas oportunidades desde muestras de agua y hojas de árboles. Este es el primer reporte sobre la caracterización de *X. dendrorhous* aislada desde una muestra de suelo proveniente de la Antártica. Por lo tanto, este trabajo es una gran contribución al conocimiento de la distribución y ecología de *X. dendrorhous*. Considerando la inusual localización desde donde fueron aisladas las levaduras, *X. dendrorhous* podría habitar otras regiones con condiciones de estrés que promuevan la formación de ROS, incluidas otras regiones de la Antártica. Al explorar nuevas regiones podrían encontrarse nuevas cepas y propiedades interesantes que podrían ser reveladas.

Este trabajo describe una cepa, ANCH01, que produce una de las mayores cantidades de astaxantina reportada en una cepa silvestre. Debido a su coloración, esto sugiere que los otros aislados antárticos de pigmentación roja, también podrían ser sobre-productores de astaxantina lo que debe ser analizado. Por otra parte, ANCH01 es un sobre-productor de astaxantina natural, por lo tanto futuras investigaciones se centrarán en mejorar la producción del pigmento de esta cepa.

La producción de carotenoides en los aislados antárticos difiere en relación a cepas silvestres aisladas de otras regiones, por este motivo sería de gran interés estudiar en ellos los genes que controlan la síntesis de los carotenoides y su regulación en comparación con otras cepas silvestres. Esto es de gran importancia ya que, a pesar que los aislados ANCHs contienen el gen *crtS* que codifica a la astaxantina sintasa, éstos producen bajas cantidades de astaxantina lo que sugiere que la regulación o estructura de este gen es diferente. Además, estudiar diferencias a nivel de secuencia de DNA y de expresión de genes, se podrían encontrar futuros blancos para el mejoramiento genético para la producción de astaxantina y contribuir a un mejor entendimiento de la carotenogénesis en este organismo.

## 7. REFERENCIAS

- Abe F. y Minegishi H. 2008. Global screening of genes essential for growth in high-pressure and cold environments: searching for basic adaptive strategies using a yeast deletion library. *Genetics*. 178: 851-872.
- Abramoff, M.D., Magalhães, Paulo J., Ram, Sunanda J. 2004. Image processing with ImageJ. *Biophoton Int*. 11 (7): 36-42
- An, G. H., Schuman, D. B. y Johnson, E. A. 1989. Isolation of *Phaffia rhodozyma* mutants with increased astaxanthin content. *Appl Environ Microb*. 55(1): 116
- Andrewes, A. G., Phaff, H. J. y Starr, M. P. 1976. Carotenoids of *Phaffia rhodozyma*, a red-pigmented fermenting yeast. *Phytochemistry*. 15(6): 1003-1007
- Baeza, M., Sanhueza, M., Flores, O., Oviedo, V., Libkind, D. y Cifuentes, V. 2009. Polymorphism of viral dsRNA in *Xanthophyllomyces dendrorhous* strains isolated from different geographic areas. *Virol J*. 6: 160
- Bandaranayake, W. M. 1998. Mycosporines: are they nature's sunscreens? *Nat Prod Rep*. 15(2): 159-172
- Bennedsen, M., Wang, X., Willén, R., Wadström, T. y Andersen, L. P. 2000. Treatment of *H. pylori* infected mice with antioxidant astaxanthin reduces gastric inflammation, bacterial load and modulates cytokine release by splenocytes. *Immunol Lett*. 70(3): 185-189
- Bligh, E. y Dyer, W. J. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Phys*. 37(8): 911-917
- Bloch, K. E. 1983. Sterol, Structure and Membrane Function. *Crit Rev Biochem mol*. 14(1): 47-92
- Boyle, J. y Lew, A. 1995. An inexpensive alternative to glassmilk for DNA purification. *Trends Genet*. 11(1): 8
- Britton, G. 1995. Structure and properties of carotenoids in relation to function. *FASEB J*. 9(15): 1551
- Britton, G. 2008. Functions of intact carotenoids. *Carotenoids* Britton G., Liaaen-Jensen S., Pfander H. (eds). pp 189-212. Birkhäuser Basel, Suiza.
- Calcott P. H. y Rose A. H. 1982. Freeze-thaw and cold-shock resistance of *Saccharomyces cerevisiae* as affected by plasma membrane lipid composition. *J Gen Microbiol* 128: 549-555.
- Carreto, J. I. y Carignan, M. O. 2011. Mycosporine-Like Amino Acids: Relevant Secondary Metabolites. *Chemical and Ecological Aspects*. *Mar Drugs*. 9(3): 387-446
- Cooke, R. C. y Whipps, J. M. 1993. *Ecophysiology of fungi*. Blackwell Scientific Publications, Oxford.

- Cowan, D. A., Chown, S. L., Convey, P., Tuffin, M., Hughes, K., Pointing, S. y Vincent, W. F. 2011. Non-indigenous microorganisms in the Antarctic: assessing the risks. *Trends Microbiol.* 19(11): 540-548
- D'Amico, S., Collins, T., Marx, J. C., Feller, G. y Gerday, C. 2006. Psychrophilic microorganisms: challenges for life. *EMBO Rep.* 7(4): 385-389
- De Caterina, R. 2011. n-3 Fatty Acids in Cardiovascular Disease. *New Engl J Med.* 364(25): 2439-2450
- De la Coba, F., Aguilera, J., Figueroa, F., De Gálvez, M. y Herrera, E. 2009. Antioxidant activity of mycosporine-like amino acids isolated from three red macroalgae and one marine lichen. *J Appl Phycol.* 21(2): 161-169
- Fell, J. y Blatt, G. 1999. Separation of strains of the yeasts *Xanthophyllomyces dendrorhous* and *Phaffia rhodozyma* based on rDNA IGS and ITS sequence analysis. *J Ind Microbiol Biot.* 23(1): 677-681
- Fell, J. W., Boekhout, T., Fonseca, A., Scorzetti, G. y Statzell-Tallman, A. 2000. Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by large-subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis. *Int J Syst Evol Micr.* 50(3): 1351-1371
- Fell, J. W., Scorzetti, G., Statzell-Tallman, A. y Boundy-Mills, K. 2007. Molecular diversity and intragenomic variability in the yeast genus *Xanthophyllomyces*: the origin of *Phaffia rhodozyma*? *FEMS Yeast Res.* 7(8): 1399-1408
- Fong, N., Burgess, M., Barrow, K. y Glenn, D. 2001. Carotenoid accumulation in the psychrotrophic bacterium *Arthrobacter agilis* in response to thermal and salt stress. *Appl microbiol biot.* 56(5-6): 750-756
- García-Pichel, F. y Castenholz, R. W. 1993. Occurrence of UV-absorbing, mycosporine-like compounds among cyanobacterial isolates and an estimate of their screening capacity. *Appl Environ Microb.* 59(1): 163-169
- Golubev, W. I. 1995. Perfect state of *Rhodomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*). *Yeast.* 11(2): 101-110
- Goodrich, R. P., Handel, T. M. y Baldeschwieler, J. D. 1988. Modification of lipid phase behavior with membrane-bound cryoprotectants. *Biochim Biophys Acta.* 938(2): 143-154
- Gounot, A. M. 1986. Psychrophilic and psychrotrophic microorganisms. *Experientia* 42:1192 – 1197
- Hebert, P. D., Ratnasingham, S. y de Waard, J. R. 2003. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proc Biol Sci.* 270(S1): 96-99
- Hemmi, K., Julmanop, C., Hirata, D., Tsuchiya, E., Takemoto, J. y Miyakawa, T. 1995. The physiological roles of membrane ergosterol as revealed by the phenotypes of *syrl/erg3* null mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biosci Biotech Bioch.* 59(3): 482-486
- Hermosilla, G., León, R., Martínez, C. y Cifuentes, V. 1995. Formation and regeneration of *Phaffia rhodozyma* protoplasts. *Bol Micol.* 10(1/2): 71-5
- Higuera-Ciajara, I., Felix-Valenzuela, L. y Goycoolea, F. 2006. Astaxanthin: a review of its chemistry and applications. *Crit Rev Food Sci.* 46(2): 185-196
- Holick, M. F. 2007. Vitamin D deficiency. *New Engl J Med.* 357(3): 266-281

- Iwamoto, T., Hosoda, K., Hirano, R., Kurata, H., Matsumoto, A., Miki, W., Kamiyama, M., Itakura, H., Yamamoto, S. y Kondo, K. 2000. Inhibition of low-density lipoprotein oxidation by astaxanthin. *J Atheroscler Thromb.* 7(4): 216
- Johnson, E. A., y Lewis, M. J. 1979. Astaxanthin formation by the yeast *Phaffia rhodozyma*. *J Gen Microbiol*, 115(1), 173-183.
- Kucsera, J., Pfeiffer, I. y Ferenczy, L. 1998. Homothallic life cycle in the diploid red yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*). *Anton Leeuw.* 73(2): 163-168
- Kurtzman, C. P. y Robnett, C. J. 1998. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Anton Leeuw.* 73(4): 331-371
- Kurtzman, C., Fell, J. W. y Boekhout, T. 2011. *The yeasts: a taxonomic study*, Elsevier.
- Leach, C. 1965. Ultraviolet-absorbing substances associated with light-induced sporulation in fungi. *Can J Bot* 43(2): 185-200
- Libkind, D., Pérez, P., Sommaruga, R., del Carmen Diéguez, M., Ferraro, M., Brizzio, S., Zagarese, H. y van Broock, M. 2004. Constitutive and UV-inducible synthesis of photoprotective compounds (carotenoids and mycosporines) by freshwater yeasts. *Photochem Photobiol Sci.* 3(3): 281-286
- Libkind, D., Diéguez M., Moliné M., Pérez P., Zagarese H., van Broock M. 2006. Occurrence of Photoprotective Compounds in Yeasts from Freshwater Ecosystems of Northwestern Patagonia (Argentina). *Photochem Photobiol.* 82 (4) 972-980.
- Libkind, D., Ruffini, A., van Broock, M., Alves, L. y Sampaio, J. P. 2007. Biogeography, host specificity, and molecular phylogeny of the basidiomycetous yeast *Phaffia rhodozyma* and its sexual form, *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Appl Environ Microb.* 73(4): 1120
- Libkind, D. 2007. Evaluación de la técnica de MSP-PCR para la caracterización molecular de aislamientos de *Rhodotorula mucilaginosa* provenientes de la Patagonia noroccidental. *Rev Argent Microbiol.* 39(3): 133-137
- Libkind, D., Gadanho, M., Broock, M. v. y Sampaio, J. P. 2008. Studies on the heterogeneity of the carotenogenic yeast *Rhodotorula mucilaginosa* from Patagonia, Argentina. *J Basic Microb.* 48(2): 93-98
- Libkind, D., Moliné, M., de García, V., Fontenla, S. y van Broock, M. 2008. Characterization of a novel South American population of the astaxanthin producing yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*). *J Ind Microbiol Biotechnol.* 35(3): 151-158
- Libkind, D., Moline, M. y Van Broock, M. 2011. Production of the UVB absorbing compound mycosporine-glutaminol-glucoside by *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*). *FEMS yeast res.* 11(1): 52-59
- Lignell, A. y Bottiger, P. (2001). Use of xanthophylls, astaxanthin e. g. for treatment of autoimmune diseases, chronic viral and intracellular bacterial infections. Patent: US 6773708.
- Liu, Z. Q., Zhang, J. F., Zheng, Y. G., & Shen, Y. C. 2008. Improvement of astaxanthin production by a newly isolated *Phaffia rhodozyma* mutant with low-energy ion beam implantation. *J Appl Microbiol*, 104(3), 861-872.

- López, V., Fernández-Espinar, M. T., Barrio, E., Ramón, D. y Querol, A. 2003. A new PCR-based method for monitoring inoculated wine fermentations. *Int J Food Microbiol.* 81(1): 63-71
- Lorenz, R. T. y Cysewski, G. R. 2000. Commercial potential for *Haematococcus* microalgae as a natural source of astaxanthin. *Trends Biotechnol.* 18(4): 160-167
- Loto, I., Gutiérrez, M. S., Barahona, S., Sepúlveda, D., Martínez-Moya, P., Baeza, M., Cifuentes, V. y Alcaíno, J. 2012. Enhancement of carotenoid production by disrupting the C22-sterol desaturase gene (*CYP61*) in *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *BMC Microbiol.* 12(1): 235
- Lu, S. y Li, L. 2008. Carotenoid metabolism: biosynthesis, regulation, and beyond. *J Integr Plant Biol.* 50(7): 778-785
- Madigan M., Martinko J., Parker J. y Brock T. 1997. *Biology of microorganisms.* Prentice Hall Upper Saddle River, New Jersey.
- Madronich, S., McKenzie, R. L., Björn, L. O. y Caldwell, M. M. 1998. Changes in biologically active ultraviolet radiation reaching the Earth's surface. *J Photoch Photobio B.* 46(1): 5-19
- Mann, V., Harker, M., Pecker, I. y Hirschberg, J. 2000. Metabolic engineering of astaxanthin production in tobacco flowers. *Nat Biotechnol.* 18(8): 888-892
- Maoka, T. 2011. Carotenoids in Marine Animals. *Mar Drugs.* 9(2): 278-293
- Miao, L., Chi, S., Tang, Y., Su, Z., Yin, T., Guan, G. y Li, Y. 2011. Astaxanthin biosynthesis is enhanced by high carotenogenic gene expression and decrease of fatty acids and ergosterol in a *Phaffia rhodozyma* mutant strain. *FEMS Yeast Res.* 11(2): 192-201
- Miki, W. 1991. Biological functions and activities of animal carotenoids. *Pure Appl Chem.* 63(1): 141-146
- Moliné M., Libkind D, Diéguez M. C., van Broock M. 2009. Photoprotective role of carotenoids in yeasts: Response to UV-B of pigmented and naturally-occurring albino strains. *J Photochem Photobiol B.* 95(3): 156-161
- Nguyen, H. y Seifert, K. 2008. Description and DNA barcoding of three new species of *Leohumicola* from South Africa and the United States. *Persoonia.* 21: 57
- Nishino, H., Murakoshi, M., Ii, T., Takemura, M., Kuchide, M., Kanazawa, M., Yang Mou, X., Wada, S., Masuda, M. y Ohsaka, Y. 2002. Carotenoids in cancer chemoprevention. *Cancer Metast Rev.* 21(3): 257-264
- Okuyama, H., Morita, N. y Yumoto, I. 1998. Cold-adapted microorganisms for use in food biotechnology. *Biotechnological Applications of Cold-Adapted Organisms.* . Margesin R. y Schinner F. (eds). pp 101-117. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Berlin.
- Oren, A. y Gunde Cimerman, N. 2007. Mycosporines and mycosporine like amino acids: UV protectants or multipurpose secondary metabolites? *FEMS Microbiol Lett.* 269(1): 1-10
- Pearce, D. A., Bridge, P. D., Hughes, K. A., Sattler, B., Psenner, R. y Russell, N. J. 2009. Microorganisms in the atmosphere over Antarctica. *FEMS Microbiol Ecol.* 69(2): 143-157

- Perrier, V., Dubreucq, E. y Galzy, P. 1995. Fatty acid and carotenoid composition of *Rhodotorula* strains. *Arch Microbiol.* 164(3): 173-179
- Phaff, H., Miller, M., Yoneyama, M. y Soneda, M. 1972. A comparative study of the yeast floras associated with trees on the Japanese islands and on the west coast of North America. Gyozo Terui (ed). pp. 759-774. Fourth International Fermentation Symposium Proceedings: Fermentation Technology Today, Society of Fermentation Technology, Osaka, Japón.
- Prakash, S. y Prakash, L. 2000. Nucleotide excision repair in yeast. *Mut Res-Fund Mol M.* 451(1): 13-24
- Radwan, S. S. 1991. Sources of C20-polyunsaturated fatty acids for biotechnological use. *Appl Microbiol Biot.* 35(4): 421-430
- Retamales, P., Hermosilla, G., León, R., Martínez, C., Jiménez, A. y Cifuentes, V. 2002. Development of the sexual reproductive cycle of *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *J Microbiol Meth.* 48(1): 87-93
- Robinson, C. H. 2001. Cold adaptation in Arctic and Antarctic fungi. *New Phytol.* 151(2): 341-353
- Rossi, M., Buzzini, P., Cordisco, L., Amaretti, A., Sala, M., Raimondi, S., Ponzoni, C., Pagnoni, U. M. y Matteuzzi, D. 2009. Growth, lipid accumulation, and fatty acid composition in obligate psychrophilic, facultative psychrophilic, and mesophilic yeasts. *FEMS Microbiol Ecol.* 69(3): 363-372
- Roy, S. 2000. Strategies for the minimisation of UV-induced damage. The effects of UV radiation in the marine environment. *Cambridge Environmental Chemistry.* de Mora S., Demers S. y Verne M. (eds). pp: 177-205. Cambridge University Press, Cambridge.
- Sambrook, J. y Russell, D. W. 2001. *Molecular cloning. A laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York.
- Sancar, A. 2003. Structure and function of DNA photolyase and cryptochrome blue-light photoreceptors. *Chem Rev.* 103(6): 2203-2238
- Sanderson, G. W. y Jolly, S. O. 1994. The value of *Phaffia* yeast as a feed ingredient for salmonid fish. *Aquaculture.* 124(1-4): 193-200
- Scorzetti, G., Fell, J., Fonseca, A. y Statzell-Tallman, A. 2002. Systematics of basidiomycetous yeasts: a comparison of large subunit D1/D2 and internal transcribed spacer rDNA regions. *FEMS Yeast Res.* 2(4): 495-517
- Schmidt, I., Schewe, H., Gassel, S., Jin, C., Buckingham, J., Hümbelin, M., Sandmann, G. y Schrader, J. 2011. Biotechnological production of astaxanthin with *Phaffia rhodozyma/Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Appl Microbiol Biot.* 89(3): 555-571
- Schroeder, W. A. y Johnson, E. 1993. Antioxidant role of carotenoids in *Phaffia rhodozyma*. *Microbiology.* 139(5): 907
- Schroeder, W. A. y Johnson, E. A. 1995. Carotenoids protect *Phaffia rhodozyma* against singlet oxygen damage. *J Ind Microbiol Biot.* 14(6): 502-507
- Seifert, K. A., Samson, R. A., de Waard, J. R., Houbraken, J., Lévesque, C. A., Moncalvo, J.-M., Louis-
- Seize, G. y Hebert, P. D. 2007. Prospects for fungus identification using *COI* DNA barcodes, with *Penicillium* as a test case. *P Natl A Sci.* 104(10): 3901-3906

- Seifert, K. A. 2009. Progress towards DNA barcoding of fungi. *Mol Ecol Resour.* 9(s1): 83-89
- Shang, F., Wen, S., Wang, X. y Tan, T. 2006. Effect of nitrogen limitation on the ergosterol production by fed-batch culture of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biotechnol.* 122(3): 285-292
- Shobayashi, M., Mitsueda, S.-I., Ago, M., Fujii, T., Iwashita, K. y Iefuji, H. 2005. Effects of culture conditions on ergosterol biosynthesis by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biosci Biotech Bioch.* 69(12): 2381-2388
- Simopoulos, A. P. 2002. The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Biomed Pharmacother.* 56(8): 365-379
- Sinha, R. P., Singh, S. P. y Häder, D. P. 2007. Database on mycosporines and mycosporine-like amino acids (MAAs) in fungi, cyanobacteria, macroalgae, phytoplankton and animals. *J Photoch Photobio B.* 89(1): 29-35
- Song, X., Zhang, J., Wang, M., Liu, W., Gu, X. y Lv, C. 2011. Astaxanthin induces mitochondria-mediated apoptosis in rat hepatocellular carcinoma CBRH-7919 cells. *Biol Pharm Bull.* 34(6): 839-844
- Swenson, U., Hill, R. S. y McLoughlin, S. 2001. Biogeography of *Nothofagus* supports the sequence of Gondwana break-up. *Taxon.* 50(4): 1025-1041
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. y Kumar, S. 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biology Evol.* 28(10): 2731-2739
- Thomas-Hall, S. y Watson, K. 2002. *Cryptococcus nyarrowii* sp. nov., a basidiomycetous yeast from Antarctica. *Int J Syst Evol Micr.* 52(3): 1033
- Tognetti, C., Moliné, M., van Broock, M. y Libkind, D. 2013. Favored isolation and rapid identification of the astaxanthin-producing yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*) from environmental samples. *J Basic Microb.* 53(9): 766-772
- Tronchoni, J., Rozes, N., Querol, A. y Guillamón, J. M. 2012. Lipid composition of wine strains of *Saccharomyces kudriavzevii* and *Saccharomyces cerevisiae* grown at low temperature. *Int J Food Microbiol.* 155(3): 191-198
- Vilgalys R y Gonzalez D. 1990. Organization of ribosomal DNA in the basidiomycete *Thanatephorus praticola*. *Curr Genet* 18: 277-280.
- Vishniac, H. y Kurtzman, C. 1992. *Cryptococcus antarcticus* sp. nov. and *Cryptococcus albidosimilis* sp. nov., Basidioblastomycetes from Antarctic Soils. *Int J Syst Bacteriol.* 42(4): 547
- Vishniac, H. S. 2006. Yeast biodiversity in the Antarctic. *Biodiversity and ecophysiology of yeasts.* Péter G. y Rosa C. (eds). pp: 419-440. Springer Berlin Heidelberg, Heidelberg.
- Volkman, M., Whitehead, K., Rütters, H., Rullkötter, J. y Gorbushina, A. A. 2003. Mycosporine-glutamicol-glucoside: a natural UV-absorbing secondary metabolite of rock-inhabiting microcolonial fungi. *Rapid Commun Mass Sp.* 17(9): 897-902
- Volkman, M. y Gorbushina, A. A. 2006. A broadly applicable method for extraction and characterization of mycosporines and mycosporine-like amino acids of

- terrestrial, marine and freshwater origin. FEMS Microbiol Lett. 255(2): 286-295
- Weber, R. W. S. y Davoli, P. 2005. *Xanthophyllomyces* and other red yeasts in microbial consortia on spring sap-flow in the Modena province (Northern Italy). Atti Soc Nat Mat Modena. 136: 127-135
- Weber, R. W. S., Davoli, P. y Anke, H. 2006. A microbial consortium involving the astaxanthin producer *Xanthophyllomyces dendrorhous* on freshly cut birch stumps in Germany. Mycologist. 20(2): 57-61
- Weber, R. W. S., Becerra, J., Silva, M. J. y Davoli, P. 2008. An unusual *Xanthophyllomyces* strain from leaves of *Eucalyptus globulus* in Chile. Mycol res. 112(7): 861-867
- White, T., Bruns, T., Lee, S. y Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenies. PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications. Innis M., Gelfand D., Shinsky J. y White T. (eds). pp 315-322. Academic Press, Inc., New York.
- Wikström, M. 1989. Identification of the electron transfers in cytochrome oxidase that are coupled to proton-pumping. Nature. 338: 776-778
- Wiseman, H. 1993. Vitamin D is a membrane antioxidant Ability to inhibit iron-dependent lipid peroxidation in liposomes compared to cholesterol, ergosterol and tamoxifen and relevance to anticancer action. FEBS lett. 326(1): 285-288
- Zlatanov, M., Pavlova, K. y Grigorova, D. 2001. Lipid composition of some yeast strains from Livingston Island, Antarctica. Folia microbiol. 46(5): 402-406

## 8. ANEXOS

### 8.1 Anexo1. Secuencia de DNA de gen *COX1* de UCD 67-385 de *X. dendrorhous*.

TATAAATGTGTGCAGGAGAATAGCACGGGATCGTGGCTTACGGCGAGCAAAGACCCTAAGGACCCCGTGTCT  
CCTAGAAGACGAGGATGCCTCAGTAATGGAGATTACGAGAGGCTACCCTCGCAGATGGGTATCTAACGATGAAGCTTGC  
GCTAACAGTGAAGCTGTACCCTTAAAGCAACTAGCTTATGGAAAGCAGGTATCTCGCCTATAGTCGGCTCGTACCCGAC  
GTTGCTTTTAGGTAACAGCGTCTGCTCTCTCCCGAGAGTAGCGTTGTTCCGGTCCAGGAGAGCCAGTTCCTGTCTCAGCC  
CTCTAACGCTTGGGATTGGGAGGAGAGAATAAACATTACTGCCTTACGGCAATCTGGTGGACTCTAAATGGGTCCTACTA  
CAACGAACCCATTTTGTGCCACAGGAGACCTTATATACTTGTTTATATGTTACTAATGTTTTCAGCCCTCGCTGGC  
TCCTGTCCACAAATGCAAAGGATATCGGTACCCTCTACCTTGCCTTTCGGGTCACTCCGGATGCTCGGTGCTGCCTT  
TTCTATGGCGATCCGCGCAGAACTTGCCTCTCAAGGGATCCAAGTCTTGGCGGTGATCACCACATATAACAACGTTGTT  
GTTTCTGCCACGCGCTCCTTATGATCTTTTATATGGTTATGCCGCGCTCGTGGGTGGCTTTGGGAACCTACCTCCTCC  
CCGTCCAGATTGGAGCGGTGGATATGGCGTTCCTCGTCTGAACAACATCTCGTCTGCGTACTGCCGCCCTCTCTGAT  
GTTGTTGCTCTTGTCCGCTCTTGTCCAACAAGGAGCAGTACTGGATGAACCTGTAACCCGCCCTCTCGAGCCTCCAG  
TCTCACAGTGGTCTCGGTAGACCTCGCAATCTTCGCCCTTTCATCTCGCTGGTATCAGTCCGACTTAGGCGCTATTA  
ACTTCATCGTTACACTCGTTAACCTCCGTGCTCCAGGGATCAGTTCGACCGAGTTCCTACTCTTCCAGTGGGCCATTGC  
CATCACAGCCGATTGCTACTCTTGGACCTTCCGGTCCAGCTGGGGTATTACTATGCTTCTAACGGACCGAACTTC  
TCGACTAGCTTCTACGACCCTGCTGGTGGAGGTGACCCCTGTGCTGTACCAGCACCTTTCTGATTTCTCGGTCACTCCG  
AGGTTTACATCCTCGTGTATCCCGCCTTTGGAGCGGTATCCCACGTGCTAGGTGCTTCTCATACAAGTCTGTATTCCG  
CACCTCGGCATGGTCTACGCTATGATGAGCATCCGGCTACTCGGTTTGTAGTCTGGTCCACCACATGTATACCGTT  
GGTATGGATGTGACTCCCGAGCCTACTTCCCGCTGCCAGCATGGTTATCGCTGTGCCAACCGGTATTAAGATTTTCT  
CTTGGTTGGCTACGCTCTATGGTGGCGCCCTTGAATACAGCACGCGTGTGTTGTTGCTCTTGGATTATCCTGCTCTT  
CACGCTCGGAGGCGTAACTGGGGTAGTATGGCCAACGCCCTCTCTCGACGTTGCGATGCATGATACATACTATGTGGTA  
GCTCACTTCCACTGTGCTGTCTATGGCGCGGTGTTGGTTTGGTTTGGCGCCTTCTACTATGGTTCCCAAAGCTCA  
CAGGCCGCTCTTTTCTGAATTGCTCGGGAAGGTACACTCGGTCTACTCTTGTAGGAGTAAACCTTACTTTCTTCCC  
TCAGCACTTCCCTTGGGTAGCTGGTATGCCCTCGACGGATCCCTGATTATGCTGACGCATTCCCTCGGGTGGAAATCGGGTC  
TCGTCACTCGGTAGCCTTCTGTCTATTGTTGCTACGGTGTGTTCCCTAGTCTTCTAGGTCAAGCTCTTCTACTGGCC  
GTGTCGTACAGCGGCATCTCCATGGACAAGCCCTGATTTTAAACTTCTGCCCGTGTTCAGCAGATCGGGTTTATGG  
GTGCGAGTGAAGCTTAGCTTCTCTACTCCTCTTCCAGCCTTTCGAGCAGCTTCTGTTGCTACAACCTAGCTAGCTCTAA  
GCTGTGAATAGTCTGTGATGACGTTGCTTGTACATTTGTTTGGAAATGTGGAGCTTTATGCTTTATGCAGTACAAGGC  
TAAATGTATTTGGTCTACACTTTTAGGTGGTGTAGTAAAGGAAGCAGGTGGTGTCTCCTTTTGGACCTCTTGTCCGGCT  
GCTTGGCTCGCAAGAAATAGGACTCTGAAAGTCTCTGGGGTATATAGGAAACGTGTACTCGGAGAAGCTCTCAGAAAAG  
TCGTGCAACGTCAAGAGGCTTTCTCTGTAAGAAATCATGTAGAGGGTAAATGGACCCCTCTCTAGTGGCTTTATAC  
TATGAAAGGAGTCTAACTCTCTATCTCTAGAGGCTAGTGGAGCCTCATTAATGGCGTAGGAACTTGAATTCCTTA  
GGAGACTATGGAGTCTCGTTCAGGGGCTATGGAGCCCTGTTGGTGAAGATAATCTGAGCATAAGGAATTGTTGC  
TCCGAGAGCCCTTGAAGGTCATGTAACATCAAGAGACTCTCTGCGTAAAGAAGAATCTGAGCATAAGGAATTGTTGC  
AAGGTAAGAACCCTGAGTTGGAGACTATGAGACCTCTGTAGAGTATGAGCAGGCTAGTGACGCTGATAGAGAA  
AGATTGTTGGGGACTAAGGAAGTCCCTCTTTAGGGCAGAGCCGATACTCTGCGGACAAGAGGGTAAGGGACCCCTCTGT  
GGAGTGTGAGGCAGAGGCCGATACCTCTGGGGCAGCAAAGAGAGCTATAGGCTCGCTCATAGGGAGGAGACGACAGAG  
ATACTGTGCGGGAGCGGGCTAAGAGAGCCCCGTTGAGCCACAGCGCATCTGTGGCAGTGCCCGGAGGGATAGTGATT  
AGGGAGGATGGTGTCAACAGAGTCTCGGGAAGGCTATGTGACGTCGAGAGCTCTGTCTCGTGGGAGTCATGGGGCAGA  
GGCGATACTCTGCAGGCGAAGGGCTAGGGGAGCCCTGGTGTGCAGCGCCGATACCGCTGTGGGACAGGGGCTCGGAA  
CCCCGTTTAGGAAGGAAATTTGGGTGAGGTACCTACTATACTAA

En negritas se indica el ORF. En letras rojas y azules se destaca el codón de inicio y término de la traducción, respectivamente.

**8.2 Anexo 2. Secuencia de aminoácidos deducida de la subunidad 1 de la citocromo oxidasa de UCD 67-385 de *X. dendrorhous*.**

MGPTQRTHEFVPQETLLYLFI MFTNVFSPRWTTSTNAKDIGTTYTAFAVISGMTGAAFSMAIRAETASQGIQ  
VTGGDHQTYNVVVS AHATMI FYMVPATVGGFGNYTTPVQIGAVDMAFPRTNNISFWTTTPSTMLLTL SA  
TVEQGAGTGWTTY PPTSSTQSHSGASVDTAIFATHTAGISSTTGAINFIVTTVNTRAPGITFDRVPTFTWA  
IAITAVLTTLSTPVTAGGITMTTDRNFSTSFYDPAGGGDPVTYQHTFWFFGHPEVYITVI PAFGAVSHVV  
GAFSYKSVFGTTGMVYAMMSIGVTGFVVVSHHMYTVGMDVDSRAYFTAATMVI AVPTGIKIFSWLATTYGG  
ATEYSTALLFATGFITTTTGGVTVVLANASTDVAMHDTYYVVAHFHYVTSMGAVFGLFAAFYYWFPKTF  
GRSTSELTGKVHFGTTFVGVNTTTTFPQHFTGTAGMPRRI PDYADAFTGWNRVSSFGSTTSIVATVVFTVTT  
GQATSTGRVVTAASPWTS PDFNTSAAVQADR VYGVEWAVASPTPTHAFEQTPVATTS