

UCH-FC
DOC-B
C 352

ELEMENTOS GENÉTICOS EXTRACROMOSÓMICOS EN
Phaffia rhodozyma

Tesis
entregada a la
Universidad de Chile
en cumplimiento parcial de los requisitos
para optar al grado de
Doctor en Ciencias con mención en Biología

Facultad de Ciencias
por
Antonio Rosamel Castillo Nara
Octubre 1995

Director de Tesis: Dr. Víctor Cifuentes Guzmán
Co-Director de Tesis: Dr. Guido Pincheira Vega



FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACIÓN
TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Comisión de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato

ANTONIO ROSAMEL CASTILLO NARA

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluación de la Tesis como requisito de tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Biología, en el Examen de Defensa de Tesis rendido el día 30 de Agosto de 1995.

Director de Tesis

Dr. Víctor Cifuentes



Co-Director de Tesis

Dr. Guido Pincheira

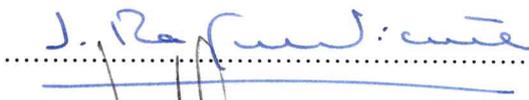


Comisión de Evaluación de la Tesis

Dra. Catherine Connelly



Dr. Rafael Vicuña



Dr. Romilio Espejo



A mis padres, Alvaro y Monik

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer a Dios quien siempre me ha protegido y me ha dado fuerzas para que lleve a cabo las metas que me he propuesto en la vida.

También quiero agradecer en forma muy especial:

Al Dr. Víctor Cifuentes por su preocupación, apoyo e incentivos constantes durante toda mi estadía en su Laboratorio.

Al Dr. Guido Pincheira por su apoyo desinteresado y sus consejos valiosos que me permitieron ampliar mi visión de lo que es la ciencia.

A la Dra. Eliana Canelo quien siempre me estimuló e incentivó a que terminara esta Tesis.

A un gran amigo que me ha apoyado incluso en los peores momentos de mi vida, gracias Mario Chiong.

A todos los integrantes del Laboratorio de Genética, Blanca Urzúa, Rubén León, Germán Hermosilla, Claudio Martínez y Rafael Negrete con quienes compartí gratos momentos.

A mis padres María y Pedro quienes siempre me han entregado todo para que yo pueda ser feliz.

A mis hermanos, Neffaye Aurora, José Miguel, María Teresa y Pedro Alfonso, que siempre me apoyaron e incentivaron para que siguiera estudios superiores, los quiero mucho.

A mi hijo Alvaro Rodrigo por su comprensión y apoyo.

A Mónica Aramúndiz por su amor, apoyo, comprensión y ayuda.

A todos los integrantes del Subcomité del Programa de Microbiología y en forma muy especial a la Dra. Rosalba Lagos quien me inició en el campo de la Biología Molecular y al Dr. Eugenio Spencer por su apoyo y sus sabios consejos.

Al Dr. Guido Mora quien me inició como investigador y me apoyó para que ingresara al Doctorado.

Al Profesor Víctor Monasterio, a José Morillas y a Alejandro Munizaga quienes me ayudaron desinteresadamente en los experimentos de Microscopía Electrónica.

A mis colegas Milena Cotorás y Claudio Laurido quienes siempre me brindaron su apoyo desinteresado.

A todos los que me brindaron su amistad y apoyo, muchas gracias.

ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
INDICE DE FIGURAS	x
INDICE DE TABLAS	xiv
RESUMEN	xv
ABSTRACT	xix
ABREVIATURAS	xxii
INTRODUCCIÓN	1
MATERIALES Y MÉTODOS	19
I. Materiales	19
1. MATERIAL BIOLÓGICO	19
1.1 <i>Phaffia rhodozyma</i>	19
1.2 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	19
1.3. Enzimas	19
1.4. Ácidos nucleicos	20
2. REACTIVOS QUÍMICOS	20

2.1. De Sigma Chemical Co., Saint Louis Missouri U.S.A.	20
2.2. De Aldrich Chemical Co. Saint Louis Missouri, U.S.A.	20
2.3. De Merck Darmstadt, Germany	21
2.4. De Bethesda Research Laboratories, Grand Island N.J., U.S.A.	21
2.5. De Difco, Detroit Michigan U.S.A.	21
II. Métodos	22
1. CONDICIONES DE CULTIVO	22
1.1. Cultivo en medio completo	22
1.2. Cultivo en medio mínimo	22
1.3. Cultivo en gran escala en fermentador	22
2. MANTENCIÓN DE LAS CEPAS	23
2.1. <i>Phaffia rhodozyma</i>	23
2.2. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	23
3. PURIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS	24
3.1. Purificación de ácidos nucleicos totales	24
3.2. Aislamiento de dsRNAs por el método del fenol ácido	25
3.3. Purificación de dsRNAs	26
3.4. Purificación de moléculas individuales de dsRNA	26

3.4.1.	Preparación de las membranas	27
3.4.2.	Purificación	27
4.	DETERMINACIÓN DE LA TEMPERATURA DE DESNATURACIÓN TÉRMICA (T_m) DEL M-DSRNA	28
5.	HIDRÓLISIS ALCALINA DE LOS DSRNAS	29
6.	DIGESTIONES ENZIMÁTICAS	29
6.1.	Digestión con DNasa I	29
6.2.	Digestión con Nucleasa S1	29
6.3.	Digestión con RNasa H	30
6.4.	Digestión con RNasa A	30
6.5.	Digestión con EcoRI	30
7.	ELECTROFORESIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS	30
8.	AISLAMIENTO DE PARTÍCULAS TIPO VIRUS	31
9.	ANÁLISIS DE PROTEÍNAS	32
10.	MICROSCOPIA ELECTRÓNICA	33
10.1.	Tinción negativa	33
10.2.	Secciones ultrafinas	33
11.	TRATAMIENTO CON LUZ ULTRAVIOLETA, CICLOHEXIMIDA Y BROMURO DE ETIDIO	34
11.1.	Luz UV	34
11.2.	Cicloheximida	35
11.3.	Bromuro de etidio	35

12. ENSAYOS DE ACTIVIDAD KILLER	35
RESULTADOS	37
1. DETECCIÓN DE ELEMENTOS GENÉTICOS EXTRACROMOSÓMICOS EN <i>Phaffia rhodozyma</i>	37
1.1. Análisis electroforético de los ácidos nucleicos de cepas silvestres de <i>P. rhodozyma</i>	37
2. NATURALEZA QUÍMICA DE LOS ELEMENTOS GENÉTICOS EXTRACROMOSÓMICOS	40
2.1. Ensayos enzimáticos	40
2.2. Cromatografía de afinidad	42
2.3. Perfil de hipercromicidad del M-dsRNA	44
3. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE PARTÍCULAS TIPO VIRUS	46
3.1. Centrifugación en gradientes de sacarosa	46
3.2. Microscopía electrónica	49
3.3. Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS	51
4. CURACIÓN DEL S ₂ -DSRNA	51
5. LOCALIZACIÓN INTRACELULAR DE LAS VLPs DE <i>P. rhodozyma</i>	57
6. PRESENCIA DE UN SISTEMA KILLER EN <i>P. rhodozyma</i>	70
DISCUSIÓN	78
1. CARACTERIZACIÓN DE LOS EGES	78

2. ASOCIACIÓN DE LOS DSRNAS CON VLPS	81
3. OBTENCIÓN DE CEPAS CURADAS DE DSRNAS	86
4. ANÁLISIS MICROSCÓPICO DE LAS VLPS EN CORTES FINOS	87
5. FENOTIPO KILLER EN <i>P. rhodozyma</i>	90
CONCLUSIONES	94
PROYECCIONES	96
BIBLIOGRAFÍA	99

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	: Ciclos replicativos de los virus L _A y M de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	10
Figura 2	: Estructura esquemática del precursor proteico y de la toxina madura	12
Figura 3	: Microfotografía electrónica de transmisión de <i>P. rhodozyma</i> UCD 67-385.....	17
Figura 4	: Electroforesis en gel de agarosa de los ácidos nucleicos de cepas silvestres de <i>Phaffia rhodozyma</i>	38
Figura 5	: Electroforesis en gel de agarosa de los ácidos nucleicos de <i>P. rhodozyma</i> UCD 67-385 después de diferentes tratamientos	41
Figura 6	: Purificación de los dsRNAs por cromatografía en celulosa CF11	43

Figura 7	: Perfil de hipercromicidad del M-dsRNA de <i>P. rhodozyma</i> UCD 67-385	45
Figura 8	: Aislamiento de VLPs por centrifugación en gradiente de sacarosa	48
Figura 9	: Microfotografía electrónica de partículas tipo virus de <i>P. rhodozyma</i> UCD 67-385	50
Figura 10	: Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS al 12% del pico principal de la gradiente de sacarosa	52
Figura 11	: Electroforesis en gel de agarosa de los ácidos nucleicos de una cepa de <i>P. rhodozyma</i> curada del S ₂ -dsRNA	53
Figura 12	: Electroforesis en gel de agarosa de los ácidos nucleicos de cuatro cepas de <i>P. rhodozyma</i> curadas del S ₂ -dsRNA mediante tratamiento con cicloheximida	55
Figura 13	: Electroforesis en gel de agarosa de los ácidos nucleicos de dos cepas de <i>P. rhodozyma</i> curadas del S ₂ -dsRNA mediante tratamiento con cicloheximida	56

Figura 14	: Secciones ultrafinas de células de <i>P. rhodozyma</i> conteniendo numerosas VLPs citoplasmáticas	59
Figura 15	: Sección ultrafina de una célula de <i>P. rhodozyma</i> en la que se observan pequeños agregados de VLPs	60
Figura 16	: Distribución intracelular de VLPs en <i>P. rhodozyma</i>	61
Figura 17	: Secciones ultrafinas de células degeneradas de <i>P. rhodozyma</i>	63
Figura 18	: Secciones de células degeneradas con abundantes VLPs citoplasmáticas	64
Figura 19	: Aspecto del citoplasma en células que contienen VLPs	65
Figura 20	: Secciones ultrafinas de células de <i>P. rhodozyma</i> que contienen VLPs	66

Figura 21	: Sección ultrafina de una célula de <i>P. rhodozyma</i> en la que se visualizan VLPs cercanas al núcleo, pero no se observan partículas tipo virus intranucleares	67
Figura 22	: Secciones ultrafinas de células que no presentan VLPs	69
Figura 23	: Ensayo del fenotipo <i>killer</i> de la cepa silvestre	71
Figura 24	: Ensayo del fenotipo <i>killer</i> de cepas curadas del S ₂ -dsRNA	72
Figura 25	: Ensayo del fenotipo <i>killer</i> de cepas curadas con cicloheximida	73
Figura 26	: Ensayo del fenotipo <i>killer</i> de la cepa silvestre <i>P. rhodozyma</i> UCD 67-385	75
Figura 27	: Ensayo del fenotipo <i>killer</i> de cepas de <i>P. rhodozyma</i> curadas del S ₂ -dsRNA sobre la cepa <i>S. cerevisiae</i> AH22	77

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. PROPIEDADES FÍSICOQUÍMICAS DE VIRUS FÚNGICOS	7
Tabla 2. VIRUS DE DSRNA DE <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i>	8
Tabla 3. CURACIÓN DE CEPAS DE <i>PHAFFIA RHODOZYMA</i> QUE POSEEN DSRNAS	58

3

RESUMEN

Elementos genéticos extracromosómicos (EGEs) han sido descritos en una amplia variedad de hongos filamentosos y levaduras. En algunos casos dichos EGEs corresponden a plasmidios de DNA lineales o circulares. Sin embargo, en la gran mayoría de los hongos los EGEs son moléculas de RNA de doble hebra (dsRNAs). Casi en la totalidad de los casos descritos, los dsRNAs se encuentran encapsidados en partículas tipo virus (VLPs). No obstante, la presencia y persistencia de estas partículas está asociada muy pocas veces a un fenotipo detectable en los hongos que las poseen. Es así que en sólo algunas especies, como *Saccharomyces cerevisiae* y *Ustilago maydis*, se ha demostrado que una toxina *killer* está codificada en el genoma viral y, por lo tanto, una clara expresión fenotípica está asociada a la infección. En ambos microorganismos, la toxina es secretada y es responsable de la muerte de células sensibles de la misma especie, siendo las cepas *killer* inmunes a la toxina que ellas producen.

En este trabajo, se presenta la caracterización de EGEs y VLPs de *Phaffia rhodozyma*, una levadura productora de carotenoides de la subdivisión *Deuteromycotina* (*Blastomycetes*), aunque sus propiedades indican que es un *Basidiomycete*. Los principales pigmentos que sintetiza

este organismo son astaxantina y β -caroteno, los cuales son responsables de su color anaranjado.

El análisis de la composición de ácidos nucleicos de algunas cepas silvestres de *P. rhodozyma* nos permitió detectar que una de ellas, la cepa UCD 67-385, posee cuatro moléculas extracromosómicas cuyos tamaños moleculares aproximados determinados por electroforesis en gel de agarosa son 4,3; 3,1; 0,9 y 0,75 kilo pares de bases (kpb). A estos elementos genéticos se les denominó L, M, S₁ y S₂ respectivamente. Tanto la incubación en medio alcalino, como el tratamiento con RNasa A en un amortiguador de baja fuerza iónica los degradan completamente. Sin embargo, son resistentes al tratamiento con DNasa I, lo que indica que se trata de moléculas de RNA. Por otra parte, dichas moléculas son resistentes al tratamiento con RNasa A en un amortiguador de alta fuerza iónica y su migración electroforética no se altera cuando se tratan con nucleasa S1, RNasa H y endonucleasa *EcoRI*, lo que indica que se trata de moléculas de RNA de doble hebra, sin poseer secuencias de hebra simple ni regiones híbridas DNA:RNA. Su retención específica en columnas de celulosa CF11 y la cinética de desnaturación térmica de la molécula M, constituyen pruebas adicionales de la naturaleza química de RNA de doble hebra de estos elementos.

Mediante centrifugación de extractos libres de células en gradientes de sacarosa, los dsRNAs copurifican con VLPs isométricas, aparentemente icosaédricas, de 36 nm de diámetro, lo que revela que existiría una

asociación de los dsRNAs con las VLPs y que probablemente constituirían el material genético de dichas partículas. El análisis electroforético en geles de poliacrilamida-SDS de las fracciones que contienen VLPs, reveló la presencia de dos bandas principales de aproximadamente 35 y 80 kilodaltons que podrían corresponder a polipéptidos de la partícula viral, siendo el candidato más probable para ello el polipéptido de 80 kDa, ya que polipéptidos de similar masa molecular han sido detectados como el principal constituyente de la cápside de las VLPs en otros hongos.

Tanto la irradiación con luz UV, como el tratamiento con cicloheximida de la cepa silvestre, permiten obtener cepas curadas sólo del S₂-dsRNA. Todos los clones curados contienen VLPs idénticas a las de la cepa parental, lo que sugiere que el S₂-dsRNA no codifica polipéptidos estructurales de las VLPs.

El análisis de secciones ultrafinas por microscopía electrónica de transmisión, permitió determinar que la localización intracelular de las VLPs es citoplásmica, observándose partículas aisladas y pequeñas agrupaciones de éstas. Algunas se encuentran asociadas a estructuras citoplasmáticas membranosas y otras cercanas al plasmalema. No se observaron VLPs intranucleares, pero sí muy cercanas al núcleo. Además, se observó que la gran mayoría de las partículas se encuentran asociadas a estructuras filamentosas, posiblemente ácidos nucleicos que son extruídos de la cápside micoviral.

Tanto la cepa silvestre como los clones curados del S₂-dsRNA, poseen un fenotipo *killer* que destruye a células sensibles de *P. rhodozyma* y *S. cerevisiae*, lo que estaría indicando que el S₂-dsRNA no sería importante para la expresión del fenotipo *killer*. Las condiciones óptimas de la toxina *killer* fueron pH 4,6 y 22 °C.

ABSTRACT

Extrachromosomal genetic elements (EGEs) have been described in a wide variety of filamentous fungi and yeasts. In some cases, such EGEs correspond to linear or circular DNA plasmids. However, most fungi have EGEs that are double-stranded RNA molecules (dsRNAs), usually encapsidated in virus like particles (VLPs). The presence and persistence of these particles in fungi are seldom associated to a detectable phenotype. A *killer* toxin is codified in the viral genome of infected *Saccharomyces cerevisiae* and *Ustilago maydis* and hence, a clear phenotypic expression can be associated in this case to the mycoviral infection. In those microorganisms, a toxin is secreted and it is responsible of the death the sensitive cells. The *killer* strains are immune to their own toxin.

In this work, EGEs and VLPs of *Phaffia rhodozyma* were characterized. This carotenoid producing yeast belongs to the Subdivision *Deuteromycotina* (*Blastomycetes*), with properties indicative of a *Basidiomycete*. The major pigments synthesized are astaxanthin with a minor proportion of β -carotene and other pigments which are responsible for their orange or salmon-red color.

The analysis of nucleic acid composition in some *P. rhodozyma* wild-type strains allowed us to detect in one of them (UCD 67-385 strain), the presence of four extrachromosomal molecules, whose molecular sizes were 4.3, 3.1, 0.9 and 0.75 kilo base pairs (kpb), as determined by agarose gel electrophoresis. They were named L, M, S₁ and S₂ respectively. Both incubation in alkaline media and RNase A treatment (in a low ionic strength buffer) completely degraded those EGEs. Nevertheless, they were resistant to DNase I treatment, suggesting that they are RNA molecules.

On the other hand, such molecules were resistant to RNase A treatment in a high ionic strength buffer. Likewise, their electrophoretic migration were not altered by nuclease S1, RNase H and EcoRI endonuclease treatments. The results showed that those EGEs were double stranded RNA molecules, without either single strand or RNA:DNA hybrids regions. Additional evidence of the chemical nature of those dsRNA molecules was provided by their specific adsorption to CF11 cellulose resin columns and the thermal denaturation kinetics of the M molecule.

The dsRNAs cosedimented in sucrose gradient centrifugation of free-cell extracts with isometric virus-like particles of 36 nm in diameter, suggesting that the dsRNAs are associated with the VLPs and those dsRNAs probably constitute the genetic material of such particles. When the gradient fractions containing VLPs were analyzed by SDS-PAGE, two major polypeptidic bands were observed of 35 and 80 kDa that could correspond to viral particles polypeptides. The 80 kDa polypeptide could be the principal

capsid component since similar molecular weight polypeptides have been described as a major structural capsid component in other fungal VLPs.

Both UV irradiation and cycloheximide treatment of wild-type strain permitted the isolation of only S₂-dsRNA cured strains. All cured clones contain VLPs identical to those of the parental strain suggesting that S₂-dsRNA does not encode for VLPs structural polypeptides.

The VLPs intracellular localization was determined by electron microscopy of ultrathin yeast cell sections. The VLPs were found in the cytoplasm as isolated particles or in small clusters. Some of those particles are associated to membranous cytoplasmic structures and others are found near the plasmalemma and nuclei, but not inside the nuclei. Moreover, most VLPs were found associated to filamentous structures, possibly nucleic acids that were extruded from mycoviral capsids.

Both wild-type and S₂-dsRNA cured strains had a *killer* phenotype that destroyed *P. rhodozyma* and *S. cerevisiae* sensitive strains. This indicates that the S₂-dsRNA is not involved in the *killer* phenotype expression.

The optimal conditions for *killer* activity were 22 °C and pH 4.6.

ABREVIATURAS

BSA	: Albúmina de suero de bovino
DNA	: Ácido desoxirribonucleico
DNasa I	: Desoxirribonucleasa I
dsDNA	: DNA de doble hebra
dsRNA	: RNA de doble hebra
EDTA	: Ácido etilendiamino tetraacético
EGEs	: Elementos genéticos extracromosómicos
ϕ x174 DNA/ <i>Hae</i> III	: DNA del fago ϕ x174 digerido con <i>Hae</i> III
kpb	: Kilo pares de bases
kDa	: Kilodaltons
kV	: Kilovolts
LA-ScV	: Virus LA de <i>Saccharomyces</i> <i>cerevisiae</i>
λ DNA/ <i>Hind</i> III	: DNA del fago λ digerido con <i>Hind</i> III
min	: Minutos

NET	: Amortiguador (150 mM NaCl, 100 μ M EDTA, 20 mM Tris-HCl pH 8,0)
pb	: Par de bases
PEG	: Polietilén glicol
PM	: Peso molecular
poliA	: Ácido poliadenílico
poliC	: Ácido policitidílico
poliI	: Ácido poliinosínico
poliU	: Ácido poliuridílico
RNA	: Ácido ribonucleico
RNasa A	: Ribonucleasa A
RNasa H	: Ribonucleasa H
ScV-L _A	: Virus L _A de <i>S. cerevisiae</i>
ScV-L _{BC}	: Virus L _{BC} de <i>S. cerevisiae</i>
ScV-M ₁	: Virus M ₁ de <i>S. cerevisiae</i>
ScV-M ₂	: Virus M ₂ de <i>S. cerevisiae</i>
SDS	: Dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE	: Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS
SSC	: Amortiguador (150 mM NaCl, 15 mM citrato de sodio, pH 7,0)
ssDNA	: DNA de simple hebra
ssRNA	: RNA de simple hebra

STE	: Amortiguador (100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl pH 7,0)
TBE	: Amortiguador (44,5 mM Tris, 44,5 mM ácido bórico, 1mM EDTA pH 8,0)
TE	: Amortiguador (10 mM Tris-HCl, 1mM EDTA pH 8,0)
TCA	: Ácido tricloroacético
Tris	: Trishidroximetil aminometano
T _m	: Temperatura de desnaturación térmica
U	: Unidad enzimática
UV	: Ultravioleta
VLPs	: Partículas tipo virus

INTRODUCCIÓN

Elementos genéticos extracromosómicos (EGEs) han sido descritos en una amplia variedad de hongos filamentosos y levaduras (Wickner y col., 1986; Buck, 1986; Koltin, 1988). En algunos casos, dichos elementos corresponden a plasmidios de DNA lineales (Ligon y col., 1989; Meinhardt y col., 1990; Worsham y Bolen, 1990) o circulares (Collins y col., 1981; Stohl y col., 1982; Fitcher, 1988). Sin embargo, la mayoría de los EGEs fúngicos observados corresponden a moléculas de RNA de doble hebra (dsRNAs) (Wood y Bozarth, 1972; Lemke, 1979; Doods, 1980; Treton y col., 1986; Pryor y Boelen, 1987; Dickinson y Pryor, 1989). Sólo en algunos hongos se ha determinado que la presencia de EGEs se encuentra asociada con una clara expresión fenotípica. Es así como se ha observado que la presencia de plásmidos de DNA lineales está asociada a la producción de toxinas *killer* en *Kluyveromyces lactis* (Stark y col., 1990) y *Pichia acacie* (Worsham y Bolen, 1990), o bien, a fenómenos de senescencia en *Neurospora intermedia* (Bertrand y col., 1985). Por otra parte, también se ha observado que la presencia de RNA de doble hebra (dsRNA) le confiere un fenotipo *killer* a *Sacharomyces cerevisiae* (Tipper y Bostian, 1984) y *Ustilago maydis* (Koltin, 1986a) o es responsable de la hipovirulencia en *Endothia parasitica* (Van Alfen, 1986).

Las moléculas de dsRNA presentes en la mayoría de los hongos, generalmente se encuentran encapsidadas en partículas tipo virus (VLPs) y en muy pocos casos no encapsidadas, pero si asociadas a vesículas membranosas (Buck, 1986; Koltin y Leibowitz, 1988; Brown y Finnegan, 1989; Seroussi y col., 1989). Dichas partículas tipo virus han sido detectadas en numerosas especies de hongos, tales como *Helminthosporium maydis* (Bozarth, 1977), *Lentinus edodes* (Ushiyama y col., 1977), *Puccinia striiformis* (Dickinson y Pryor, 1989), *Rhizoctonia solani* (Tavantzis y Bandy, 1988), *S. cerevisiae* (Herring y Bevan, 1974), *Septoria tritici* (Zelikovitch y col., 1990) y *U. maydis* (Lemke, 1979; Buck, 1986; Koltin y Leibowitz, 1988) y han sido denominadas por algunos investigadores como micovirus de dsRNA (Pryor y Boelen, 1987; Zelikovitch y col., 1990; Schmitt y Neuhausen, 1994). De acuerdo a lo anterior, se ha definido como virus de hongos, o micovirus, a las partículas que morfológicamente se asemejan a los virus y que mediante su purificación y caracterización, se ha demostrado que contienen un genoma encerrado en una cubierta proteica. Por otra parte, en el caso de las partículas que sólo se ha determinado su morfología y no existe información sobre su composición, se utiliza el término partículas tipo virus o VLPs (Buck, 1986).

Tanto las VLPs como los micovirus, son partículas intracelulares generalmente citoplasmáticas, que poseen algunas propiedades que los hacen diferentes de los virus de bacterias, plantas y animales. Son latentes o crípticos, debido a que la mayoría de los hongos infectados no presentan síntomas evidentes, no poseen un ciclo infectivo extracelular y se propagan

sólo por anastomosis de hifas, apareamiento, meiosis o mitosis de los hongos infectados (Buck, 1986).

En relación a su organización estructural, la mayoría de los micovirus y las VLPs de dsRNA descritas corresponden a partículas isométricas icosaédricas o esféricas, carentes de envoltura lipídica, con un rango de tamaño entre 25 y 50 nm de diámetro (Buck, 1986). Sin embargo, se han observado VLPs cuyos tamaños caen fuera del rango comúnmente observado. Tal es el caso de las VLPs de *Penicillium citrinum* que poseen un diámetro de 20 nm (Benigni y col., 1977) y las de *Histoplasma capsulatum* con un tamaño aproximado de 60 a 66 nm (Adler, 1979). Adicionalmente, se han descrito otros tipos morfológicos de VLPs y virus fúngicos que corresponden a partículas con forma de varillas rígidas observadas en *Peziza ostracoderma* (Dieleman-van Zaayen, 1967; Dieleman-van Zaayen y col., 1970), o partículas con cabeza y cola, similares a algunos bacteriófagos, en *Saccharomyces carlsbergensis* (Volkoff y Walters, 1970), entre otros.

En términos generales, los estudios realizados en los micovirus de dsRNA mejor caracterizados han permitido determinar que la estructura de su cápside es simple. La mayoría de ellos poseen una cubierta compuesta de un polipéptido principal cuya masa molecular es aproximadamente 85.000 daltons (Bruen y col., 1988), diferenciándose de los reovirus, cuya cubierta está conformada de 7 subunidades proteicas con pesos moleculares en el rango de 34.000 a 155.000 (Wood, 1973). El análisis detallado de la cubierta

de algunos micovirus ha permitido determinar que poseen una estructura icosaédrica, formada por 60 unidades estructurales idénticas. Estas últimas, consisten de una o dos subunidades polipéptidicas iguales. Por ejemplo, cápsides formadas por 60 subunidades se encuentran en los virus de *Penicillium chrysogenum* (Buck y Girvan, 1977), *Penicillium cyaneo-fulvum* (Buck y Girvan, 1977) y *S. cerevisiae* (Reilly y col., 1984). En cambio, cápsides formadas por 120 subunidades se han descrito en los virus de *Aspergillus foetidus* (Buck y Ratti, 1975), *H. maydis* (Bozarth, 1977) y *Penicillium stoloniferum* (Buck y Kempson-Jones, 1974).

En relación al material genético de los virus fúngicos, se ha determinado que poseen genomas de 3,5 hasta 10 kpb, tamaño suficiente para codificar los polipéptidos de la cápside viral y algún otro polipéptido. Además, mediante experimentos de traducción *in vitro* utilizando dsRNA desnaturado, se ha demostrado que el genoma viral codifica para los polipéptidos de la cápside de los micovirus de *S. cerevisiae* (Hopper y col., 1977; Reilly y col., 1984; El-Sherbeini y col., 1984), *R. solani* (Finkler y col., 1988), *Helminthosporium victoriae* (Ghabrial y col., 1987) y *U. maydis* (Dalton y col., 1985; Podila y col., 1987).

Por otra parte, se han encontrado RNA polimerasas dependientes de dsRNA, formando parte de la estructura de los viriones en todos los micovirus de dsRNA hasta ahora analizados (Buck, 1986). Sin embargo, sólo en pocos casos hay evidencias que indican que dichas enzimas están codificadas en el genoma del micovirus. Estudios realizados con el virus L_A

de *S. cerevisiae* (L_A -ScV) han permitido determinar que la RNA polimerasa es capaz de replicar y transcribir el genoma viral. Además, el L_A -dsRNA codifica para la proteína principal de la cápside (Gag) y posiblemente en él estaría codificada una proteína de fusión (Gag-Pol), existiendo evidencias que correspondería a la RNA polimerasa (Wickner, 1989).

Las familias de virus fúngicos han sido clasificadas basándose principalmente en la organización del genoma viral. Dicha clasificación ha resultado muy difícil, particularmente en el establecimiento del número mínimo de segmentos genómicos requeridos para su replicación. Esto se debe a que muchos aislados aparentemente contienen RNAs satélites y/o RNAs defectivos.

La primera familia, *Totiviridae*, comprende a los virus con un genoma no dividido con un tamaño de 4,7 a 6,3 kpb (Buck, 1986). Se requiere menos de la mitad de dicho genoma para codificar los polipéptidos de la cápside, por lo cual se supone que su dsRNA es, al menos, dicistrónico. Los genes de los polipéptidos de la cápside en los virus de *S. cerevisiae* están localizados cerca del extremo 5' de sus dsRNAs (Wickner, 1989), sin embargo no existe aún información comparable para los otros virus. La segunda familia es la *Partitiviridae* y comprende los virus con genomas de dos dsRNAs monocistrónicos, usualmente de tamaño similar, en el rango de 1,4 a 2,2 kpb. Uno de los segmentos de dsRNA codifica el polipéptido de la cápside y el otro segmento codifica un polipéptido no relacionado (Romanos y col., 1981). Otra familia, no claramente definida

aún, comprende a los virus de *P. chrysogenum*, los que se caracterizan por poseer tres a cuatro segmentos de dsRNA monocistrónicos (Buck y Girvan, 1977). No obstante, no se conoce la razón por la cual se requieren tantos segmentos de dsRNA para la replicación del virus. Los micovirus que ya se han clasificado en alguna de estas tres familias y algunas de sus propiedades fisicoquímicas se presentan en la Tabla 1.

Numerosos micovirus no han sido clasificados, debido principalmente a que no se tiene suficiente información de la organización de su genoma. Algunos de ellos pueden ser clasificados en una de las familias existentes, mientras que para otros puede ser necesario establecer nuevas familias. Por ejemplo, el virus de *H. maydis* que tiene sólo un segmento de dsRNA de 8,3 kpb, probablemente al menos dicistrónico, podría llegar a ser un género de los *Totiviridae*, a diferencia del virus 45/101-C de *Gaeumannomyces graminis*, cuyo único dsRNA de 1,8 kpb tiene capacidad codificante sólo para su proteína de la cápside (Buck, 1986). Este último podría ser un virus satélite, sin embargo se debe tener cuidado en las interpretaciones, ya que puede contener dos dsRNAs distintos, pero del mismo tamaño.

Entre los micovirus mejor estudiados se encuentran los de *S. cerevisiae* (Wickner, 1993). La mayoría de las cepas de esta levadura contienen uno o más virus de dsRNA. Entre ellos se incluyen tres familias con genomas de dsRNA (L_A , L_{BC} y M). El tamaño de sus genomas y los productos codificados en ellos se muestran en la Tabla 2 (Wickner, 1989). El virus L_A posee un segmento de dsRNA de 4,6 kpb, cuyo proceso replicativo

Tabla 1. PROPIEDADES FÍSICOQUÍMICAS DE VIRUS FÚNGICOS (Buck, 1986).

FAMILIA	MIEMBROS	DIÁMETRO (mm)	DSRNAs (kpb)	POLIPÉPTIDOS DE LA CÁPSIDE (PM x 10 ⁻³)
TOTIVIRIDAE	Virus L _A de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	40	4,7	88
	Virus 87-1-H de <i>Gaeumannomyces graminis</i>	40	6,1	84
	Virus de <i>Mycogone perniciosa</i>	42	6,3	69
	Virus L _{BC} de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	40	4,7	82
	Virus P1-H1 de <i>Ustilago maydis</i>	41-43	6,1	73
	Virus de <i>Yarrowia lipolytica</i>	50	5,5	76
PARTITIVIRIDAE	Virus 019/6-A de <i>Gaeumannomyces graminis</i>	35	1,8 1,7	60
	Virus 4 de <i>Agaricus bisporus</i>	35	2,2 2,0	69
	Virus T1-A de <i>Gaeumannomyces graminis</i>	35	2,2 2,1	73
	Virus S de <i>penicillium stoloniferum</i>	30-34	1,6 1,4	56
PENICILLIUM CHRYSOGENUM	Virus de <i>Penicillium chrysogenum</i>	35-40	3,2 3,0 2,9	125
	Virus de <i>Penicillium brevicompactum</i>	35-40	3,2 3,0 2,9	N.D.
	Virus de <i>Penicillium cyaneo-fulvum</i>	35-40	3,2 3,0 2,8	125

N.D. = No determinado.

Tabla 2. VIRUS DE DSRNA DE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* (WICKNER, 1989).

NOMBRE	KB	PROTEÍNAS CODIFICADAS
L _A -ScV	4.6	Proteína principal de la cápside (80 kDa). RNA polimerasa (180 kDa).
M ₁ -ScV M ₂ -ScV	1.8	Proteína precursora de la toxina <i>killer</i> y del péptido de inmunidad (32 kDa).
L _{BC} -ScV	4.6	Proteínas principales de la cápside (77 y 73 kDa).

es *conservativo*, lo que significa que las hebras parentales permanecen asociadas, y *secuencial* en el sentido que la hebra (+) es sintetizada primero y luego se sintetiza la hebra (-) usando como templado la hebra (+) (Newman y McLaughlin, 1986). Se ha demostrado que la síntesis de ambas hebras tanto del L_A como de los M dsRNAs ocurre dentro de partículas virales aisladas y además que partículas aisladas que sólo contienen la hebra (+) de L_A son capaces de realizar la síntesis de la hebra (-) usando como templado la hebra (+). Enseguida a partir del dsRNA sintetizado, comienza la síntesis conservativa de hebras (+) que son extruídas de las partículas L_A . Las hebras (+) expulsadas fuera de la cápside viral tienen la función de servir como mRNA para la síntesis de proteínas virales y como el sustrato de empacamiento para formar nuevas partículas virales completándose así el ciclo replicativo (Fujimura y col., 1986; Esteban y Wickner, 1986; Fujimura y Wickner, 1987) (Fig. 1A). Los dsRNAs M_1 y M_2 codifican proteínas precursoras de toxinas secretadas (las toxinas *killer*) y sus correspondientes proteínas de inmunidad. Se definen como dsRNAs satélites, ya que para su replicación utilizan las proteínas de la cubierta codificadas por L_A , las que están diseñadas para encapsidar una molécula de L-dsRNA de 4,5 kb. Como el tamaño de M_1 y M_2 es menor que la mitad del tamaño de L_A , las moléculas M son replicadas al igual que L_A , pero los transcritos de hebra (+) de M son retenidos dentro de la partícula y son convertidos a una segunda molécula de M dsRNA en la misma partícula hasta que la cápside esté llena. Posteriormente comienza la síntesis conservativa de hebras (+) que son extruídas de la cápside sirviendo como mRNA de la proteína precursora de la toxina y de la proteína de inmunidad (Bussey, 1988) (Fig. 1B).

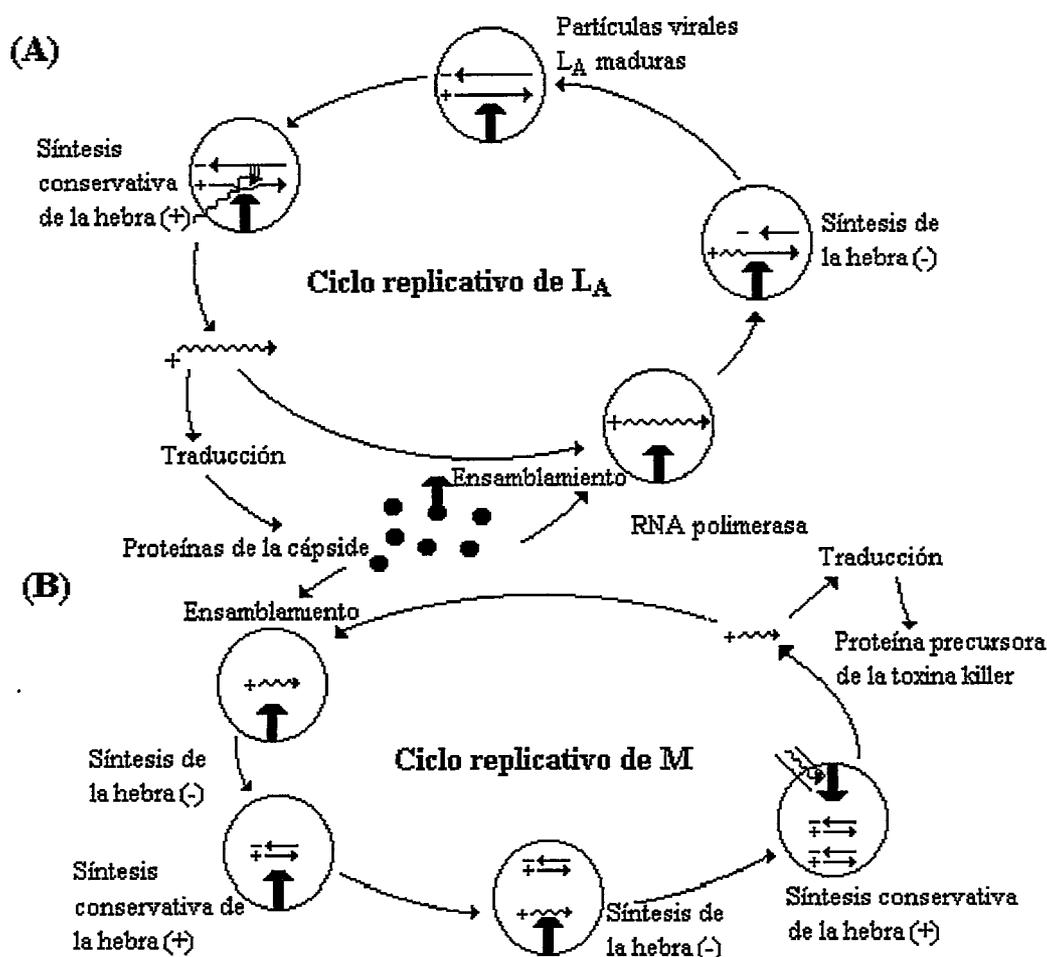


Fig. 1. Ciclos replicativos de los virus L_A y M de *Saccharomyces cerevisiae*. En ambos ciclos (A y B) la replicación es *conservativa*, es decir, las hebras parentales permanecen unidas, y *secuencial*, lo que significa que las hebras (+) se sintetizan en la etapa de transcripción y las hebras (-) en la etapa de replicación.

Los estudios de virus fúngicos se han realizado tanto en levaduras como en hongos filamentosos, algunos con sexualidad y otros imperfectos, que van desde los *Phycomycetes* hasta los *Basidiomycetes*. Sin embargo, en muy pocas especies tales como *S. cerevisiae* (Tipper y Bostian, 1984), *U. maydis* (Koltin, 1986a), *Hanseniaspora uvarum* (Schmitt y Neuhausen, 1994) y *Zygosaccharomyces bailii* (Radler y col., 1993; Schmitt y Neuhausen, 1994), se ha determinado que una toxina *killer* está codificada en el genoma viral y por lo tanto, una clara expresión fenotípica está relacionada a dicha infección. En estos casos, la toxina es secretada y es responsable de la muerte de células sensibles de la misma especie y de especies estrechamente relacionadas (Young, 1987; Bussey y col., 1990; Peery y col., 1987; Tao y col., 1990). Además, se ha observado que las cepas *killer* son inmunes a la toxina que ellas producen, debido a que sintetizan una proteína que las protege contra su propia toxina (Day y Doods, 1979; Tipper y Bostian, 1984). Existen al menos, tres virus diferentes que pueden conferir un fenotipo *killer* a las cepas de *S. cerevisiae* que los contienen. Todos producen proteínas diferentes, las toxinas K_1 , K_2 y K_{28} , siendo cada sistema de inmunidad específico para un sólo tipo de toxina (Bussey y col., 1990). Se ha demostrado experimentalmente que tanto la toxina K_1 como el componente de inmunidad son codificados por un sólo gen contenido en el M_1 -dsRNA que especifica un precursor proteico preprotoxina/inmunidad (Bostian y col., 1984; Skipper y col., 1984). La estructura de esta proteína precursora de 316 residuos de aminoácidos se muestra esquemáticamente en la Fig. 2A. En el extremo amino de la subunidad α de la toxina hay un péptido *leader* de 44 aminoácidos, de los

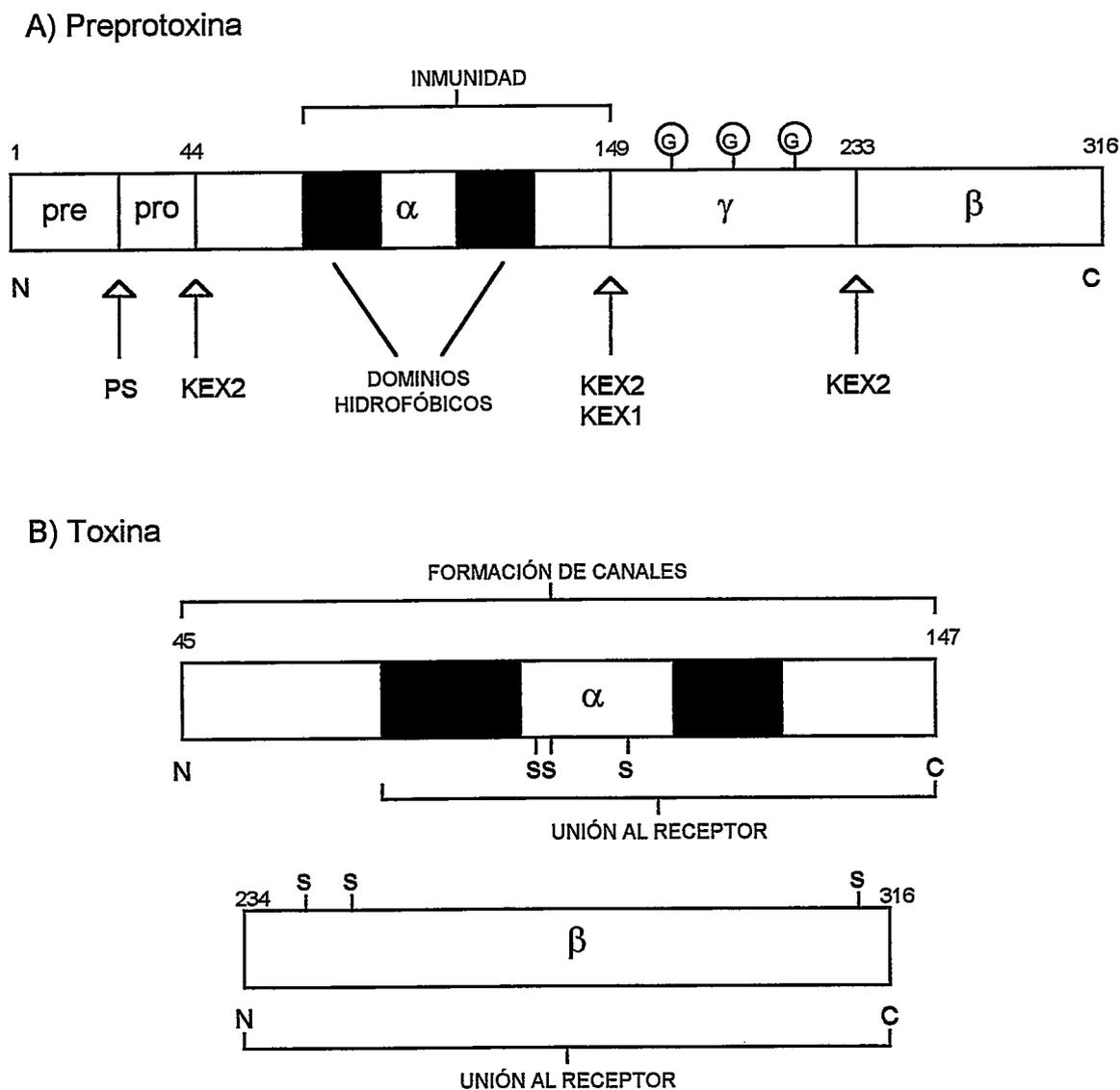


Fig. 2. Estructura esquemática del precursor proteico y de la toxina madura. (A) **La preprotoxina.** Desde el N hasta el C-terminal están la secuencia señal (pre), una región pro seguida por las subunidades α y β separadas por un péptido γ glicosilado (G). Los sitios de procesamiento por la peptidasa señal (PS) y por las proteasas KEX2 y KEX1 están indicados con flechas. También se ilustran las localizaciones de los dominios hidrofóbicos y del dominio de inmunidad en la subunidad α . (B) **La toxina.** Se muestran las subunidades α y β que constituyen el dímero tóxico. Ellas se encuentran covalentemente unidas por enlaces disulfuros cuyas uniones no han sido determinadas. Las posiciones de los residuos de cisteína se indican con una S. También se muestran los dominios requeridos para la formación de canales y para la unión al receptor de la pared celular (Tipper y Schmitt, 1991).

cuales los primeros 26 residuos constituyen una secuencia señal convencional que es cortada por una peptidasa señal en el retículo endoplásmico. La toxina K_1 está compuesta de dos subunidades distintas unidas por puentes disulfuros denominadas α y β (Fig. 2B). La subunidad α comprende 103 residuos de aminoácidos y contiene dos dominios hidrofóbicos de 20 y 16 residuos de aminoácidos respectivamente, que son requeridos para su actividad tóxica (Bostian y col., 1984; Zhu y col., 1987). Además, la subunidad α es multifuncional, ya que está involucrada en la unión al receptor de la pared celular y se requiere para la función de inmunidad en la proteína precursora. La subunidad β de la toxina es un polipéptido hidrofílico de 83 residuos de aminoácidos que se requiere para la unión al receptor de la pared celular (Bussey, 1991). La proteína precursora de la toxina es extensivamente procesada postraduccionalmente en la vía secretora de levaduras. Una de las primeras etapas es su entrada cotraduccional a membranas del retículo endoplásmico, donde se remueve su péptido señal y es N-glicosilada en el péptido γ (Fig. 2A). Posteriormente, durante el paso por el aparato de Golgi, el precursor es procesado proteolíticamente por la endoproteasa dibásica codificada por el gen KEX2 (Mizuno y col., 1988) y por la carboxipeptidasa codificada por el gen KEX1 (Dmochowska y col., 1987), que remueve los residuos básicos del COOH-terminal de la cadena α (Bussey y col., 1990). Después de este procesamiento, la toxina madura es secretada por la vía secretora constitutiva al medio de cultivo (Bussey, 1988).

El mecanismo de acción de las toxinas K_1 y K_2 de *S. cerevisiae* está parcialmente dilucidado y se ha demostrado que reconocen un β -1,6-D-glucano como receptor en la pared de células sensibles y son capaces de formar canales *in vitro*, lo que podría explicar su acción a nivel de la membrana celular (Bussey y col., 1990; Bussey, 1991). En cambio, la toxina K_{28} se une a cadenas laterales de manotriosa, unidas por enlaces α -1,3 de una manoproteína de la pared celular, con posterior inhibición de la síntesis de DNA (Tipper y Schmitt, 1991). En el caso de *U. maydis*, se ha determinado que la toxina *killer* posee actividad nucleásica capaz de degradar dsDNA, ssDNA y ssRNA. Sin embargo, no presenta actividad cuando se usa dsRNA como sustrato (Koltin, 1986a).

Por otra parte, en hongos filamentosos fitopatógenos, se han descrito otras propiedades fenotípicas conferidas por el genoma micoviral. Entre ellas se incluye la virulencia en *R. solani* (Finkler y col., 1985), el débil crecimiento y la escasa o nula esporulación en *H. victoriae* (Ghabrial, 1986) y la hipovirulencia en *E. parasitica* (Van Alfen, 1988). Estudios realizados con distintas cepas de *R. solani* revelaron que las cepas que no contenían micovirus eran hipovirulentas y que la pérdida de algunos o todos los segmentos de dsRNA de las cepas virulentas las transformaba en hipovirulentas. Además, la transferencia de dsRNAs de una cepa virulenta hacia una hipovirulenta se asoció con la transmisión de la virulencia (Finkler y col., 1985). El descubrimiento de la hipovirulencia en *E. parasitica*, fue el primer ejemplo conocido de un agente transmisible responsable en reducir la virulencia de un patógeno. Para controlar el cáncer del castaño en Europa y

en Norteamérica, producido por cepas virulentas de *E. parasitica*, se usaron cepas hipovirulentas de este hongo fitopatógeno que se aislaron de árboles que sobrevivían a la infección. Se demostró que el único material genético detectable asociado con la hipovirulencia correspondía a moléculas de dsRNA y que existía una cotransferencia de los dsRNAs y la hipovirulencia durante la anastomosis de hifas. Además, la curación de los dsRNAs de una cepa hipovirulenta la convertía en virulenta (Fulbright, 1984). Por otra parte, en este hongo, los dsRNAs no se encuentran asociados a VLPs (Nuss, 1987), aunque copurifican con partículas aisladas cuando se emplean métodos para obtener partículas virales (Doods, 1980). Sin embargo, no tienen la forma icosaédrica comúnmente encontrada en los hongos y contienen cantidades significativas de lípidos y carbohidratos. Por lo tanto, las evidencias indican que los dsRNAs existen como moléculas desnudas dentro de vesículas membranosas (Doods, 1980). Es necesario destacar que este es un caso excepcional dentro del gran número de hongos que poseen dsRNAs, ya que la gran mayoría se encuentran encapsidados (Buck, 1986; Koltin y Leibowitz, 1988).

En este trabajo, se presenta un estudio realizado con la levadura *Phaffia rhodozyma*. Este hongo, pertenece a la subdivisión *Deuteromycotina*, sin embargo, posee características propias de un *basidiomycete* tales como: los polisacáridos de su pared celular contienen una alta proporción de α -1,3-glucano (pseudonigerano) polímero que se encuentra tanto en levaduras basidiomycetes como en los géneros ascomycetes *Schizosaccharomyces* y *Endomyces*; es capaz de hidrolizar

urea, propiedad más comunmente encontrada en levaduras basidiomycetes que en ascomycetes (Miller y col., 1976); produce una serie de pigmentos carotenoides que no se encuentran en levaduras ascógenas siendo los principales astaxantina y β -caroteno que le confieren a las células un color rojo-anaranjado (Miller y col., 1976; Andrewes y col., 1976). Sin embargo, la evidencia más concluyente del origen filogenético de *Phaffia* es el descubrimiento de la presencia de multicapas de pared celular cerca del área de yemación (Fig. 3). Este mecanismo de yemación es similar al de levaduras heterobasidiomycetes (Kreger-van Rij y Veenhuis, 1971). Debido a su complejidad y a que no ha sido posible aún determinar su ciclo reproductivo sexual, el conocimiento de la genética de este microorganismo es muy escaso. Es por ello, que el **propósito de esta tesis** está centrado en la detección y caracterización de EGEs en dicha levadura, de lo cual no se conocía nada antes de la realización de este trabajo. De esta manera, será posible disponer de herramientas metodológicas que puedan proporcionar alternativas para el estudio de la genética de *P. rhodozyma* en aspectos relevantes de su fisiología génica como lo es por ejemplo, la carotenogénesis.

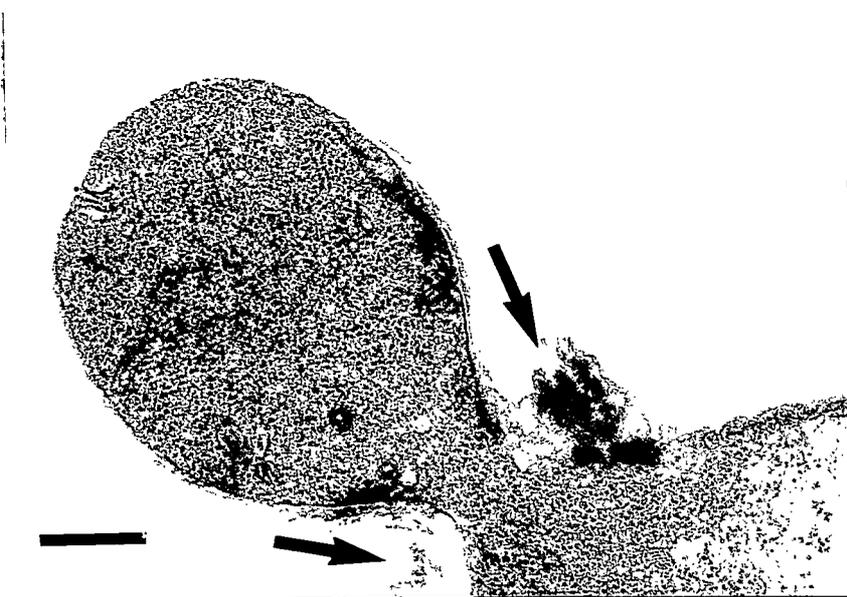


Fig. 3. Microfotografía electrónica de transmisión de *P. rhodozyma* UCD 67-385. Se puede apreciar claramente la naturaleza de multicapas de pared celular en la zona de yemación. La barra representa 200 nm.

Estudios iniciales en nuestro laboratorio mediante análisis electroforético de los ácidos nucleicos de cepas silvestres de *P. rhodozyma* nos permitieron detectar en una de ellas la presencia de cuatro EGEs que migran más rápido que el DNA cromosómico. Estos elementos correspondieron a moléculas de RNA, ya que fueron degradados por tratamiento con ribonucleasa A (RNasa A) y experimentos preliminares indicaban que se trataba de dsRNAs. Además, dicha cepa destruyó a otra que no poseía EGEs cuando eran cocultivadas. Estos resultados, nos permitieron plantear la siguiente **hipótesis** “Los EGEs corresponderían a moléculas de RNA de doble hebra (dsRNA) y constituirían el genoma de partículas virales. Dichos dsRNAs codificarían para los polipéptidos constituyentes de la cápside de las partículas virales y para una proteína tóxica que le conferiría un fenotipo *killer* a las cepas que los poseen”. De acuerdo a esto, el **objetivo general** de este trabajo fue la caracterización de los EGEs de *P. rhodozyma* y los **objetivos específicos** fueron los siguientes:

1. Determinación de la naturaleza química de los EGEs.
2. Detección de partículas tipo virus (VLPs) y determinación de su asociación con los EGEs.
3. Determinación de la distribución intracelular de las VLPs y sus características morfológicas.
4. Detección de algún fenotipo asociado a los EGEs (fenotipo *killer*).
5. Curación de una o más moléculas de dsRNA, para determinar en cual de ellas está codificada la toxina.

MATERIALES Y MÉTODOS

I. Materiales

1. MATERIAL BIOLÓGICO

- 1.1. *Phaffia rhodozyma*: Se usaron las cepas silvestres UCD 67-383 (ATCC 24203) y UCD 67-385 (ATCC 24230) de *P. rhodozyma* (Miller y col, 1976). Las cepas UV-S2, CYH-117, y una serie de clones obtenidos por tratamiento con cicloheximida, carecen del S₂-dsRNA y fueron obtenidas en este trabajo (Castillo y Cifuentes, 1994a, 1994b).
- 1.2. *Saccharomyces cerevisiae*: Se utilizó la cepa AH22 de *S. cerevisiae* como cepa control de sensibilidad en algunos experimentos de actividad *killer*.
- 1.3. **Enzimas**: Endonucleasa de restricción EcoRI, nucleasa S1 y RNasa H se obtuvieron de Bethesda Research Laboratories, Grand Island, N.J., U.S.A. RNasa A, se obtuvo de Sigma Chemical Co., Saint Louis Missouri, U.S.A., DNasa I libre de ribonucleasas, se obtuvo de Boheringer Mannheim, Sandhofer Straße, Germany.

1.4. Ácidos nucleicos: DNA del bacteriófago lambda (λ) digerido con *Hind*III se obtuvo de Bethesda Research Laboratories, Grand Island, N.J., U.S.A. y DNA del bacteriófago ϕ X174 digerido con *Hae*III se obtuvo de New England Biolabs, Tozer Road, Beverly Massachusetts, U.S.A.

2. REACTIVOS QUÍMICOS

2.1. De Sigma Chemical Co., Saint Louis Missouri, U.S.A., se adquirieron los siguientes reactivos: Trizma base, EDTA disódico, ditiotreitól, glucosa, cloruro de magnesio, cloruro de calcio, polietilén glicol 8.000, ácido cítrico, ácido tricloroacético, acrilamida, N,N'-metilén bisacrilamida, glicina, persulfato de amonio, azul brillante de Coomassie R-250, azul de bromofenol, ficoll, dodecilsulfato de sodio, bromuro de etidio, cicloheximida, albúmina de suero de bovino, citrato trisódico, acetato de sodio, acetato de amonio, Formvar 15/95E, glutaraldehído y tetróxido de osmio.

2.2. De Aldrich Chemical Co., Saint Louis Missouri, U.S.A., se obtuvo ácido fosfotúngstico.

- 2.3. De Merck Darmstadt, Germany,** se obtuvieron los siguientes reactivos: Azul de metileno, fosfato de sodio monobásico y dibásico, fosfato de potasio dibásico, hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, sulfato de magnesio, glicerol, metanol, etanol, isopropanol, n-butanol, cloruro de potasio, cloruro de sodio, cloruro de litio, ácido bórico, ácido clorhídrico, ácido acético, acetato de potasio, sulfato de cinc, fenol, cloroformo, acetona, alcohol isoamílico y formamida.
- 2.4. De Bethesda Research Laboratories, Grand Island N.J., U.S.A.,** se obtuvo: sacarosa, estándares de proteínas preteñidos de alto y bajo peso molecular y agarosa.
- 2.5. De Difco, Detroit Michigan U.S.A.,** se obtuvo lo siguiente: extracto de levaduras, triptona, extracto de malta, peptona, base nitrogenada para levaduras (*yeast nitrogen base*), agar-agar.

II. Métodos

1. CONDICIONES DE CULTIVO

- 1.1. **Cultivo en medio completo.** *P. rhodozyma* fue crecida en medio completo YM que contiene 3 g/L de extracto de levaduras, 3 g/L de extracto de malta, 5 g/L de peptona y 10 g/L de glucosa (An y col., 1989). *S. cerevisiae* fue crecida en medio YPD que contiene 10 g/L de extracto de levaduras, 20 g/L de peptona y 20 g/L de glucosa (Sherman, 1991). Para los medios sólidos se adicionó 15 g/L de agar-agar.

- 1.2. **Cultivo en medio mínimo.** Para algunos experimentos se usó medio mínimo que contenía base nitrogenada para levaduras (*yeast nitrogen base*) 6,7 g/L y 20 g/L de glucosa como fuente de carbono (Sherman, 1991).

- 1.3. **Cultivo en gran escala en fermentador.** Con la finalidad de disponer de gran cantidad de masa celular para el aislamiento de VLPs, se realizó cultivos en gran escala de *P. rhodozyma*. Para ello, las cepas 67-385, UV-S2 y CYH-117 se crecieron en un fermentador New Brunswick Scientific Co., Edison, N.J., U.S.A., de 15 litros. En cada caso, se utilizó cultivos de 10 litros en medio de fermentacion (MF) que contenía 2,5 g/L de

$K_2HPO_4 \cdot H_2O$; 2,5 g/L de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 12 g/L de extracto de levaduras y 8,5 g/L de glucosa.

El fermentador se inoculó con 200 mL de un cultivo en fase exponencial de cada una de las cepas. Se incubó a 22°C con un flujo de aire de 10 litros/min y con agitación constante a 600 rpm durante 96 horas.

2. MANTENCIÓN DE LAS CEPAS

2.1. *Phaffia rhodozyma*. Las cepas de *P. rhodozyma*, se mantuvieron congeladas a -70 °C en medio YM suplementado con glicerol al 30% (v/v).

2.2. *Saccharomyces cerevisiae*. Las cepas de *S. cerevisiae* se mantuvieron congeladas a -70 °C en medio YPD suplementado con glicerol al 30% (v/v).

3. PURIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

3.1. Purificación de ácidos nucleicos totales. Los ácidos nucleicos de *P. rhodozyma* se purificaron por una metodología desarrollada en nuestro laboratorio (Castillo y Cifuentes, 1993, 1994a). Para ello, se crecieron cultivos líquidos de 40 mL a 22 °C hasta la fase exponencial tardía. Las células se colectaron mediante centrifugación a 5.000 rpm durante 7 min en una centrifuga Sorvall RC-5B, utilizando un rotor SS34, se lavaron dos veces con TE (10 mM Tris·HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) y se resuspendieron en 3 mL de TE. La ruptura celular se realizó usando perlas de vidrio (0,5 mm de diámetro, Sigma). Para ello, se mezclaron volúmenes iguales de la suspensión celular y perlas de vidrio, luego se agitaron vigorosamente en vortex cuatro veces durante 30 segundos, enfriando en hielo entre cada agitación por igual período de tiempo. Luego, se agregó un volumen de fenol pH 8,0 (fenol saturado en agua equilibrado primero con 1M y luego con 0,05 M Tris·HCl pH 8,0): cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1), se agitó en vortex por 1 min y se centrifugó por 10 min a 10.000 x g. La fase acuosa se transfirió a un tubo estéril y se realizó dos extracciones adicionales con 3 mL de mezcla fenólica (25:24:1) y dos extracciones con 3 mL de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1). Los ácidos nucleicos se precipitaron con 0,1 volumen de acetato de sodio 3M y 2,5 volúmenes de etanol absoluto a

-20 °C durante toda la noche. Se resuspendieron en TE y se mezclaron con 1 volumen de LiCl 4M para precipitar los RNAs de simple hebra (Baltimore, 1966). La mezcla se dejó a 4 °C toda la noche y luego se centrifugó a 20.000 x g durante 15 min. El sobrenadante se dializó contra TE y finalmente se reprecipitó con etanol como se describió anteriormente.

3.2. Aislamiento de dsRNAs por el método del fenol ácido. El uso de fenol ácido en una primera extracción permite que el DNA pase a la fase orgánica quedando sólo los RNAs en la fase acuosa. Las células se resuspendieron en amortiguador TE y se rompieron por agitación vigorosa con perlas de vidrio de 0,5 mm (Sigma). Se agregó un volumen de fenol pH 4,0 (fenol saturado en agua y equilibrado con amortiguador acetato de sodio 50 mM pH 4,0) y se agitó vigorosamente durante 3 min. Para separar las fases, se centrifugó a 5.000 rpm en un rotor Sorvall SS-34. Luego, se realizó una extracción de la fase acuosa con 2 volúmenes de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1 v/v). Se centrifugó a baja velocidad y se transfirió la fase acuosa a un tubo limpio. Se agregó $\frac{3}{4}$ volumen de isopropanol y se precipitaron los RNAs por 3 ciclos de congelamiento (en hielo seco o nitrógeno líquido) y descongelamiento. Finalmente, se centrifugó a 10.000 rpm por 10 min, el sedimento que contenía los RNAs se lavó con etanol al 70% (v/v), se secó y se

resuspendió en amortiguador TE o en agua destilada estéril (Flegr, 1987).

3.3. Purificación de dsRNAs. Los dsRNAs totales se purificaron por cromatografía en celulosa CF11. Para ello, se utilizó una columna de 2 cm de diámetro por 15 cm de alto. Se montó la columna con la resina prehidratada en amortiguador STE (1 mM EDTA, 100 mM NaCl, 50 mM Tris·HCl, pH 7,0) y se lavó con el mismo amortiguador conteniendo 1% (v/v) de β -mercaptoetanol y 10 mM EDTA. Enseguida la columna se lavó con STE:etanol=65:35 (v/v) hasta que la A_{260} del eluido fuera la misma que la del amortiguador. Se cargó en la columna 500 μ g de ácidos nucleicos totales y se eluyó con STE-16% de etanol hasta la completa recuperación del DNA y ssRNAs. Luego se cambió el amortiguador de elución a STE sin etanol y se eluyó la columna hasta la completa recuperación de los dsRNAs (Franklin, 1966; Valverde, 1990).

3.4. Purificación de moléculas individuales de dsRNA. Se purificaron usando membranas DEAE-NA45 (Schleicher & Schuell). Este método se basa en que el dsRNA cargado negativamente se une a las membranas que tienen carga positiva en las condiciones electroforéticas de separación de ácidos nucleicos en geles de agarosa. La purificación se realiza en las siguientes etapas:

3.4.1. Preparación de las membranas. Para aumentar la capacidad de unión las membranas se lavaron por 10 min en EDTA 10 mM pH 7,6. Luego se lavaron 5 min en NaOH 0,5 M, seguido de varios lavados rápidos en agua destilada. Después de estos lavados, las membranas se pueden almacenar por varias semanas en agua destilada a 4 °C.

3.4.2. Purificación. En primer lugar se realizó una electroforesis en gel de agarosa para separar los dsRNAs (ver métodos). Luego de esto, el gel se tiñó con bromuro de etidio para visualizar la posición de las bandas de ácidos nucleicos. Enseguida se insertó un trozo de membrana inmediatamente delante de la banda que se deseaba purificar y se continuó la electroforesis para que las moléculas se unieran a la membrana, verificando mediante inspección visual en un transiluminador UV. Después de retirar la membrana del gel, se removieron los restos de agarosa agitándola en un tubo con amortiguador NET (0,15 M NaCl, 0,1 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl pH 8,0). La tira húmeda se traspasó a un tubo de microcentrífuga de 500 µL y se agregaron 250 µL de amortiguador NET de alta fuerza iónica (1 M NaCl, 0,1 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl pH 8,0) para cubrir la membrana. Se incubó a 60 °C por

15 min con agitación ocasional, se removió el amortiguador que contiene los ácidos nucleicos y se lavó la membrana con 5 μ L adicionales de amortiguador. Se realizó una extracción con 3 volúmenes de n-butanol saturado en agua para remover el bromuro de etidio residual y el dsRNA se precipitó con 2,5 volúmenes de etanol a -20 °C durante una noche. Para eliminar el NaCl se repitió la etapa de precipitación por lo menos 2 veces más utilizando etanol y 2,5 M de acetato de amonio (Sambrook y col., 1989).

4. DETERMINACIÓN DE LA TEMPERATURA DE DESNATURACIÓN TÉRMICA (T_m) DEL M-DSRNA

El M-dsRNA (15 μ g) se resuspendió en 1 mL de amortiguador 0,1 x SSC (15 mM NaCl; 1,5 mM citrato de sodio, pH 7,0) conteniendo 50% (v/v) de formamida. Para las mediciones se utilizó un espectrofotómetro Shimadzu de doble haz modelo UV-150-02. A este instrumento se le adaptó un portacubetas especial al que se le hacía circular agua proveniente de un baño termostático. Se registraron mediciones de Absorbancia a 260 nm por cada dos grados de alza de temperatura, determinado con una termocupla.

5. HIDRÓLISIS ALCALINA DE LOS DSRNAS

Los dsRNAs se hidrolizaron en KOH 1M a 22 °C durante 22 horas (Gomatos y Tamm, 1963). Como control se dejó una muestra de los dsRNAs en las mismas condiciones, pero en amortiguador TE pH 7,4.

6. DIGESTIONES ENZIMÁTICAS

6.1. Digestión con DNasa I. La reacción se realizó a 37 °C durante 30 minutos en amortiguador acetato de sodio 50 mM pH 6,5; 10 mM MgCl₂ y 2 mM CaCl₂ en un volumen final de 50 µL. Se utilizó 1U de enzima por µg de ácidos nucleicos (Sambrook y col., 1989).

6.2. Digestión con Nucleasa S1. La reacción se realizó a 37 °C en amortiguador acetato de potasio 30 mM pH 4,5; 0,3 M NaCl, 1 mM sulfato de zinc y 5% de glicerol en un volumen final de 40 µL. La reacción se detuvo enfriando en hielo y ajustando la concentración de EDTA a 10 mM (Muthukrishnan y Shatkin, 1975). Se utilizó 1U de enzima por µg de ácidos nucleicos.

- 6.3. Digestión con RNasa H.** La reacción se realizó a 37 °C durante 30 minutos en amortiguador Tris-HCl 20 mM pH 7,5; 0,1 M KCl, 10 mM MgCl₂, 0,1 mM DTT y 5% (p/v) sacarosa en un volumen final de 50 µL. Se utilizó 1U de enzima por µg de ácidos nucleicos.
- 6.4. Digestión con RNasa A.** Las digestiones con ribonucleasa A se realizaron a 37 °C en amortiguadores de alta y baja fuerza iónica, 2 x SSC (0,3 M NaCl, 0,03 M citrato de sodio, pH 7,0) y 0,01 x SSC, respectivamente (Pryor y Boelen, 1987). En este caso se utilizó 0,2 µg de enzima por mL de mezcla de reacción.
- 6.5. Digestión con EcoRI.** La reacción se realizó a 37 °C durante 60 minutos en amortiguador Tris-HCl 50 mM pH 8,0; 100 mM NaCl, 10 mM MgCl₂ y 0,1 mg/mL de BSA en un volumen final de 50 µL. Se utilizó 1U de enzima por µg de ácidos nucleicos.

7. ELECTROFORESIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS

Los ácidos nucleicos se resuspendieron en TE, se mezclaron con el amortiguador de carga que contenía 0,25% (p/v) de azul de bromofenol, 15% (p/v) de ficoll y 30% (v/v) de glicerol y se analizaron por electroforesis en geles

de agarosa al 1,2% (p/v), utilizando amortiguador TBE (Tris 44,5 mM, ácido bórico 44,5 mM y EDTA 1 mM, pH 8,0) para la preparación del gel y como amortiguador de corrida. La tinción de los geles se realizó con 0,5 µg/mL de bromuro de etidio en TBE (Sambrook y col., 1989).

8. AISLAMIENTO DE PARTÍCULAS TIPO VIRUS

Se utilizó el método de Dickinson y Pryor (1989) con leves modificaciones (Castillo y Cifuentes, 1994a). Las células (10 g peso húmedo) se resuspendieron en 50 mL de amortiguador fosfato (100 mM fosfato de sodio, pH 7,5; 10 mM MgCl₂) y se rompieron por agitación en vortex con perlas de vidrio. Los restos celulares se removieron por centrifugación a 10.000 x g por 10 min a 4 °C. El sobrenadante se ajustó a 9% (p/v) polietilén glicol 8.000 (Sigma), 2,5% (p/v) NaCl y se mantuvo a 4°C con agitación suave toda la noche. Después de centrifugar a 10.000 x g por 15 min, el precipitado se resuspendió en amortiguador fosfato y se centrifugó a 100.000 x g durante 3 horas con el objeto de sedimentar el material particulado. Este sedimento, se resuspendió en mínimo volumen de amortiguador fosfato y se cargó en una gradiente lineal de sacarosa del 10-40% (p/v) que se centrifugó en una ultracentrífuga Hitachi a 30.000 rpm por 90 min en un rotor de

ángulo variable (swinging bucket) RPS 40 (Hitachi). Se determinó el perfil de absorbancia a 260 y 280 nm y las fracciones de los picos principales se juntaron y se dializaron contra amortiguador fosfato. Las VLPs se recuperaron centrifugando a 35.000 rpm por 4 horas en un rotor de ángulo fijo RP 40 (Hitachi).

9. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS

Los picos principales de la gradiente de sacarosa se analizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS al 10%, con un gel concentrador al 5%. Se utilizaron minigeles en placas (10 x 10 x 0,08 cm). Las muestras a analizar se mezclaron con un volumen de amortiguador de carga [50 mM Tris•HCl, pH 6,8; 100 mM ditiotreitol, 2% (p/v) de SDS, 10% (v/v) de glicerol y 0,1% (p/v) de azul de bromofenol] y se calentaron a ebullición durante 3 minutos. La electroforesis se realizó a 15 mA corriente constante y a temperatura ambiente, utilizando como amortiguador de corrida 25 mM Tris•HCl, 250 mM glicina, pH 8,3 y 0,1 % (p/v) SDS (Laemmli, 1970). Después de finalizada la corrida electroforética, las proteínas se fijaron por 15 min en 10% (p/v) de ácido tricloroacético (TCA) y 50 % (v/v) de isopropanol. Posteriormente se tiñeron por 2 h en 0,1% (p/v) de azul brillante de Coomassie R-250 en

10% (p/v) de TCA y 25% (v/v) de isopropanol. Finalmente el gel se destiñó en metanol:ácido acético:H₂O (2:3:35 v/v).

10. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

10.1. Tinción negativa. Se aplicaron gotas de suspensiones particuladas sobre grillas de cobre de 200 *mesh* cubiertas con Formvar y carbón. Las grillas se pusieron sobre gotas de agua destilada 2 minutos para remover sales y luego se tiñeron con fosfotungstato de potasio al 2% (p/v) pH 7,0 (Herring y Bevan, 1974).

10.2. Secciones ultrafinas. Las células se fijaron con glutaraldehído al 3% (p/v) en amortiguador fosfato de sodio 0,1 M pH 7,0 durante toda la noche a temperatura ambiente. Luego de esto se realizó un lavado en el mismo amortiguador por 6 horas a 4 °C. La post-fijación se realizó con tetróxido de osmio al 1% (p/v) en amortiguador fosfato de sodio pH 7,0 durante 120 min a temperatura ambiente. Se lavó durante 15 min a temperatura ambiente con agua destilada y luego se realizó una tinción en bloque con acetato de uranilo acuoso al 1% (p/v) durante 90 min. Después de otro lavado con agua destilada las células se deshidrataron usando acetona al 50, 70, 95, 95, 100, 100 y 100% (v/v) durante 20 min con cada solución. Se realizó una

preinclusión con Epon:acetona (1:1) durante toda la noche y luego con Epon puro durante 4-6 horas con exposición al aire. La etapa final de inclusión se realizó con Epon fresco a 60 °C durante 48 horas. Los cortes se realizaron en un ultramicrotomo Sorvall MT-2 usando cuchillos de diamante. La tinción se realizó con acetato de uranilo al 4% (p/v) en metanol por 2 min y luego con citrato de plomo por 15-60 segundos (Reynolds, 1963).

Tanto para el examen de partículas aisladas como para las observaciones de las secciones ultrafinas se utilizó un microscopio electrónico Phillips 300 a 80 kV.

11. TRATAMIENTO CON LUZ ULTRAVIOLETA, CICLOHEXIMIDA Y BROMURO DE ETIDIO

11.1. Luz UV. Un cultivo en fase exponencial de *P. rhodozyma* UCD 67-385 se irradió con luz ultravioleta usando una lámpara germicida de 15 W General Electric tipo GT85, que emite radiación principalmente a 254 nm. El flujo de la fuente UV fue de 0,6 W/m². Las células tratadas se esparcieron en placas de agar YM y se incubaron a 22 °C hasta la aparición de colonias. Posteriormente las colonias aisladas se sembraron en placas de

agar YM. A cada uno de los clones obtenidos se les analizó su contenido de dsRNAs.

11.2. Cicloheximida. El tratamiento con cicloheximida se realizó esparciendo directamente células provenientes de un cultivo en fase exponencial sobre placas de agar YM conteniendo 2 $\mu\text{g/mL}$ de cicloheximida. Las placas se incubaron a 22 °C durante 10-15 días y las colonias aisladas se sembraron en agar YM sin cicloheximida. A los clones obtenidos se les realizó extracción de ácidos nucleicos y análisis electroforético con la finalidad de determinar su contenido de dsRNAs.

11.3. Bromuro de etidio. Algunos clones curados del S₂-dsRNA por tratamiento con cicloheximida, se incubaron en medio mínimo conteniendo 25 $\mu\text{g/mL}$ de bromuro de etidio. Los matraces se agitaron durante 1 mes a 22 °C. Luego, se sembraron placas de agar YM con 100 μL del medio líquido y se incubaron a 22 °C hasta la aparición de colonias. A los clones obtenidos se les analizó su contenido de dsRNAs y su actividad *killer*.

12. ENSAYOS DE ACTIVIDAD KILLER

Se ensayaron las cepas UCD 67-385, UV-S2, CYH-117, los clones curados del S₂-dsRNA por tratamiento con

cicloheximida y los tratados con bromuro de etidio. Aproximadamente 10^7 células de la cepa sensible (UCD 67-383 o *S. cerevisiae* AH22) provenientes de un cultivo en fase exponencial tardía, se mezclaron con 10 mL de agar YM al 0,7% (p/v) tamponado a pH 4,6 con amortiguador fosfato-citrato (Gomori, 1955), conteniendo 0,003% (p/v) de azul de metileno para teñir células muertas. La mezcla se vertió en una placa Petri y se dejó a temperatura ambiente hasta que gelificara. Las cepas *killer* y sensibles provenientes de placas de agar con 72 h de crecimiento, se aplicaron en la superficie de la placa que se incubó por un mínimo de tres días a 22 °C. Después de este tiempo se observaron zonas claras sólo alrededor de las cepas *killer*.

RESULTADOS

1. DETECCIÓN DE ELEMENTOS GENÉTICOS EXTRACROMOSÓMICOS EN *Phaffia rhodozyma*

1.1. Análisis electroforético de los ácidos nucleicos de cepas silvestres de *P. rhodozyma*

Con el propósito de investigar si algunas cepas de *P. rhodozyma* contenían elementos genéticos extracromosómicos (EGEs), se aislaron los ácidos nucleicos totales de dos cepas silvestres (UCD 67-383 y UCD 67-385) y se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 1,2% (p/v). El perfil electroforético reveló la presencia de cuatro bandas nítidas que migran más rápido que el DNA cromosómico en la cepa UCD 67-385 (Fig. 4, carril 2), mientras que en la cepa UCD 67-383 se observó sólo DNA cromosómico (Fig. 4, carril 3). Los ácidos nucleicos extracromosómicos de la cepa UCD 67-385 por nomenclatura definida en nuestro laboratorio y para diferenciarlos por su tamaño, se denominaron L, M, S₁ y S₂ siendo el significado de estas abreviaturas *large*, *medium* y *small* respectivamente. La estimación de sus tamaños

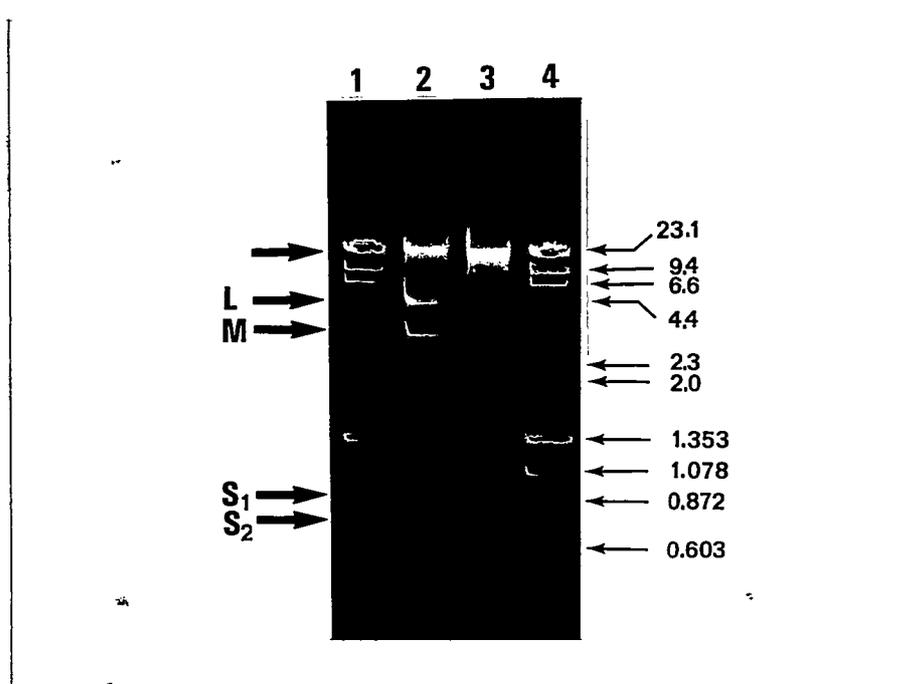


Fig. 4. Electroforesis en gel de agarosa de los ácidos nucleicos de cepas silvestres de *Phaffia rhodozyma*. Carriles 1 y 4, mezcla de fragmentos λ DNA/*Hind*III y ϕ x174 DNA/*Hae*III; carril 2, ácidos nucleicos totales de la cepa UCD 67-385; carril 3, ácidos nucleicos totales de la cepa UCD 67-383. Los números de la derecha indican tamaños moleculares expresados en kilo pares de bases (kpb). Las flechas de la izquierda indican la posición del DNA genómico y de los dsRNAs.

moleculares aproximados usando como estándares fragmentos de DNA de doble hebra fue de 4,3; 3,1; 0,9 y 0,75 kilo pares de bases (kpb) para L, M, S₁ y S₂, respectivamente. Los estándares de tamaño molecular utilizados correspondieron a una mezcla de fragmentos que contenía DNA del fago λ digerido con *Hind*III (λ DNA/*Hind*III) y DNA del fago ϕ X174 digerido con *Hae*III (ϕ X174 DNA/*Hae*III) (Fig. 4, carriles 1 y 4). No fue posible utilizar como estándares moléculas de dsRNA, ya que no se encuentran disponibles comercialmente.

La masa molecular aproximada de estos elementos calculada de acuerdo a sus tamaños y considerando 687 daltons por par de bases (pb) para dsRNA (Field y col., 1983) fue estimada en $2,95 \times 10^6$, $2,13 \times 10^6$, $6,18 \times 10^5$ y $5,15 \times 10^5$ daltons para L, M, S₁ y S₂, respectivamente.

2. NATURALEZA QUÍMICA DE LOS ELEMENTOS GENÉTICOS EXTRACROMOSÓMICOS

2.1. Ensayos enzimáticos

Para determinar si los ácidos nucleicos extracromosómicos de *P. rhodozyma* UCD 67-385 corresponden a DNA de doble hebra (dsDNA), DNA de simple hebra (ssDNA), RNA de doble hebra (dsRNA) o RNA de simple hebra (ssRNA), se realizaron los siguientes experimentos: Se incubaron los ácidos nucleicos totales de dicha cepa en medio alcalino (KOH 1M) y paralelamente se trataron con RNasa A en un amortiguador de baja fuerza iónica (0,01 x SSC) (Fig. 5, carril 3). Ambos tratamientos resultan en la completa degradación de las cuatro moléculas extracromosómicas. Sin embargo, estos elementos son resistentes al tratamiento con DNasa I y *EcoRI*, mientras que el DNA cromosómico fue totalmente (Fig. 5, carril 4) y parcialmente (Fig. 5, carril 9) digerido por dichas enzimas respectivamente. Estos resultados indican que tales elementos genéticos corresponden a moléculas de RNA. Por otra parte, el tratamiento con las enzimas nucleasa S1 (Fig. 5, carril 5) y RNasa H (Fig. 5, carril 6), no alteraron el patrón electroforético de estas moléculas. La enzima nucleasa S1 degrada ácidos nucleicos de simple hebra y la enzima RNasa H degrada RNA

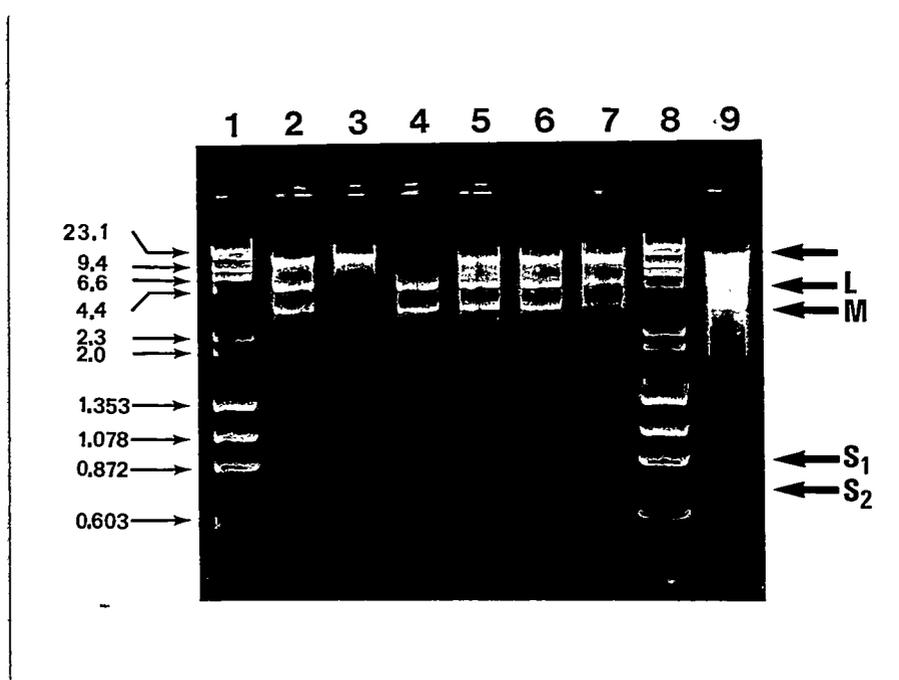


Fig. 5. Electroforesis en gel de agarosa de los ácidos nucleicos de *P. rhodozyma* UCD 67-385 después de diferentes tratamientos. Carriles 1 y 8, mezcla de fragmentos λ DNA/*Hind*III y ϕ x174 DNA/*Hae*III. Ácidos nucleicos totales tratados con: carril 2, sin tratamiento; carril 3, RNasa A (0,1 μ g/ml) en un amortiguador de baja fuerza iónica (0,01 x SSC); carril 4, DNasa I; carril 5, nucleasa S1; carril 6, RNasa H; carril 7, RNasa A (0,1 μ g/ml) en un amortiguador de alta fuerza iónica (2 x SSC); carril 9, *Eco*RI. Los números de la izquierda indican tamaños moleculares expresados en kilo pares de bases. Las flechas de la derecha indican la posición del DNA genómico y de los dsRNAs.

cuando está formando híbridos con DNA, sugiriendo que los EGEs corresponden a moléculas de dsRNA sin poseer secuencias de RNA de simple hebra ni regiones híbridas DNA:RNA. Además, estas moléculas fueron resistentes a la degradación con RNasa A en un amortiguador de alta fuerza iónica (2 x SSC) (Fig. 5, carril 7) como se esperaba de acuerdo a los resultados recién indicados.

2.2. Cromatografía de afinidad

Para determinar el comportamiento cromatográfico de los EGEs de *P. rhodozyma*, se realizaron experimentos utilizando columnas de celulosa CF11. La utilidad de esta resina se debe a su capacidad de retener específicamente moléculas de dsRNA, lo que permite separarlos de los ssRNAs. Cuando los ácidos nucleicos totales se cargaron en dicha columna, equilibrada con STE (100 mM NaCl, 1 mM EDTA y 50 mM Tris-HCl, pH 7,0)-16% (v/v) etanol, y luego se eluyeron con el mismo amortiguador, sólo eluye el DNA y los RNAs de simple hebra, que se visualizaron cuando se realizó una electroforesis en gel de agarosa con los ácidos nucleicos obtenidos de las fracciones 1, 2, 3 y 4 (Fig. 6). Los dsRNAs fueron retenidos en la columna y luego se eluyeron con STE sin etanol (Fig. 6). El inserto de la Fig. 6 corresponde a un gel de agarosa realizado con los ácidos nucleicos obtenidos de las fracciones 12, 13 y 14. Claramente

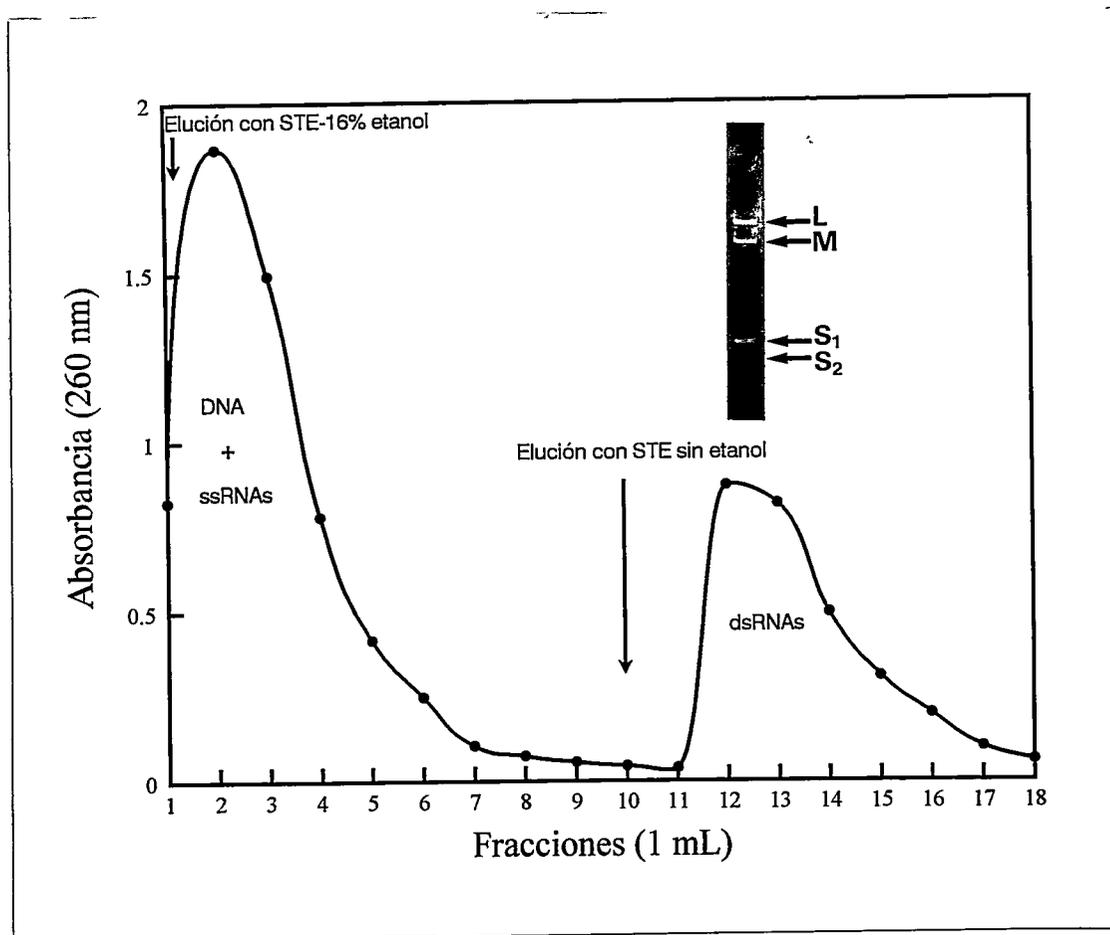


Fig. 6. Purificación de los dsRNAs por cromatografía en celulosa CF11. Los ácidos nucleicos totales de *P. rhodozyma* UCD 67-385 se solubilizaron en amortiguador STE (100 mM NaCl, 1 mM EDTA y 50 mM Tris-Cl, pH 7,0) conteniendo 16% (v/v) de etanol y se aplicaron a una columna equilibrada con el mismo amortiguador. Se eluyó con este amortiguador hasta completa recuperación del DNA y de los ssRNAs. Luego, los dsRNAs se eluyeron con STE sin etanol como se indica en la figura. El inserto corresponde a un gel de agarosa realizado con los ácidos nucleicos de las fracciones 12, 13 y 14. Se aprecian claramente las cuatro moléculas de dsRNA.

se pueden observar las cuatro moléculas de dsRNA no observándose otro tipo de ácidos nucleicos, lo que demuestra la pureza de las preparaciones de dsRNA obtenidas por este método.

Por lo tanto, la resistencia a la degradación por RNasa A en un amortiguador de alta fuerza iónica y su comportamiento cromatográfico en celulosa CF11, constituyen evidencias que proporcionan una clara confirmación de la naturaleza de RNA de doble hebra de estos elementos genéticos.

2.3. Perfil de hipercromicidad del M-dsRNA

Con el objeto de disponer de pruebas adicionales sobre la naturaleza química de los EGEs de *P. rhodozyma*, se analizó el comportamiento térmico del M-dsRNA. En la Fig. 7 se muestra la cinética de desnaturalización térmica del M-dsRNA en amortiguador 0,1 x SSC (0,15 M NaCl, 0,015 M citrato de sodio, pH 7,0) conteniendo 50% (v/v) de formamida. Se observa claramente que sobre los 50 °C hay un agudo aumento de la absorbancia a 260 nm. El T_m aproximado del M-dsRNA fue de 51 °C con una hipercromicidad de aproximadamente 50% en las condiciones descritas anteriormente. Este resultado confirma una vez más que el M-dsRNA es una molécula de doble hebra.

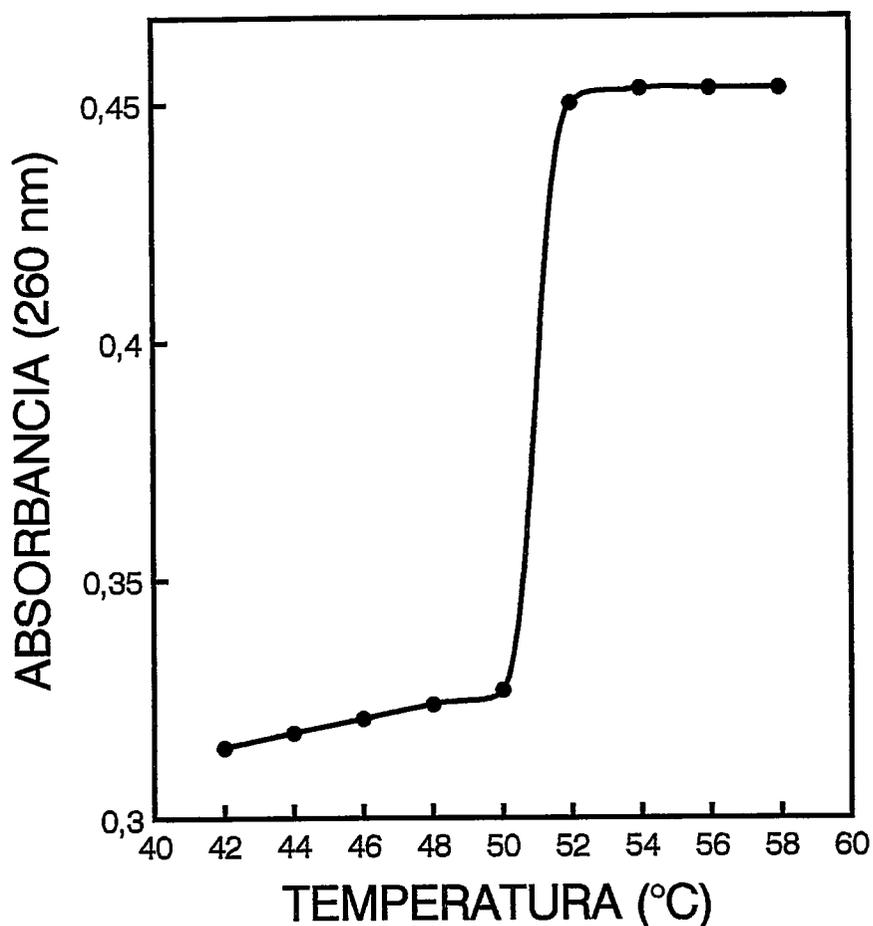


Fig. 7. Perfil de hiper Cromicidad del M-dsRNA de *P. rhodozyma* UCD 67-385. El ácido nucleico, aislado por extracción de un gel de agarosa como se describió en métodos (Sección 3.4), se disolvió en 0,1 x SSC (0,15 M NaCl; 0,015 M citrato de sodio; pH 7,0) y 50% (v/v) de formamida.

3. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE PARTÍCULAS TIPO VIRUS

3.1. Centrifugación en gradientes de sacarosa

Para determinar si las moléculas de dsRNA se encontraban desnudas en el citoplasma de la levadura o asociadas a VLPs, se realizó una gradiente lineal de sacarosa con extractos libres de células obtenidos por centrifugaciones diferenciales, precipitación con polietilén glicol y ultracentrifugación. Brevemente, después de romper las células, el extracto crudo se centrifugó a baja velocidad para remover células enteras y restos celulares, procedimiento que se repitió hasta que no se obtuvo sedimento y se logró con ello la clarificación del extracto, lo que se visualiza fácilmente, ya que se pierde el color anaranjado de las células enteras y de los pigmentos que se encuentran asociados a membranas (Andrewes y col., 1976). Posteriormente, las macromoléculas presentes en el el extracto clarificado, se precipitaron con polietilén glicol 8.000 (PEG-8.000), aprovechando la propiedad que tiene este polímero de formar una malla compacta que permite atrapar las macromoléculas que luego se sedimentan por centrifugación a baja velocidad. Finalmente, el sedimento obtenido se resuspendió en cantidad adecuada de amortiguador fosfato de sodio con la finalidad de diluir el PEG y se ultracentrifugó para sedimentar el material particulado como las

VLPs y los ribosomas. El sedimento obtenido se cargó en una gradiente lineal de sacarosa para la separación de los distintos componentes (para detalles ver Materiales y Métodos).

El perfil de la gradiente fue prácticamente idéntico a 260 y 280 nm destacándose dos picos principales centrados en las fracciones 7 y 10 (Fig. 8A). Las fracciones de la gradiente se analizaron por electroforesis en gel de agarosa, microscopía electrónica después de tinción negativa y electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato de sodio (SDS). El análisis electroforético en geles de agarosa después de extracciones con fenol:cloroformo de las fracciones de la gradiente, mostró la presencia de moléculas de dsRNA en todas ellas (Fig. 8B). Sin embargo, fue posible detectar cuatro moléculas de dsRNA con idéntica movilidad electroforética que la observada en la Fig. 1, sólo en las fracciones 5, 6, 7 y 8 (Fig. 8B, carriles 6, 7, 8 y 9), observándose con mayor intensidad en las fracciones 6 y 7 (Fig. 8B, carriles 7 y 8), mientras que en el resto de las fracciones sólo se observaron las moléculas L y M. En las fracciones 11, 12, 13 y 14 además, se observan ácidos nucleicos de bajo peso molecular que probablemente corresponden a RNA ribosomal.

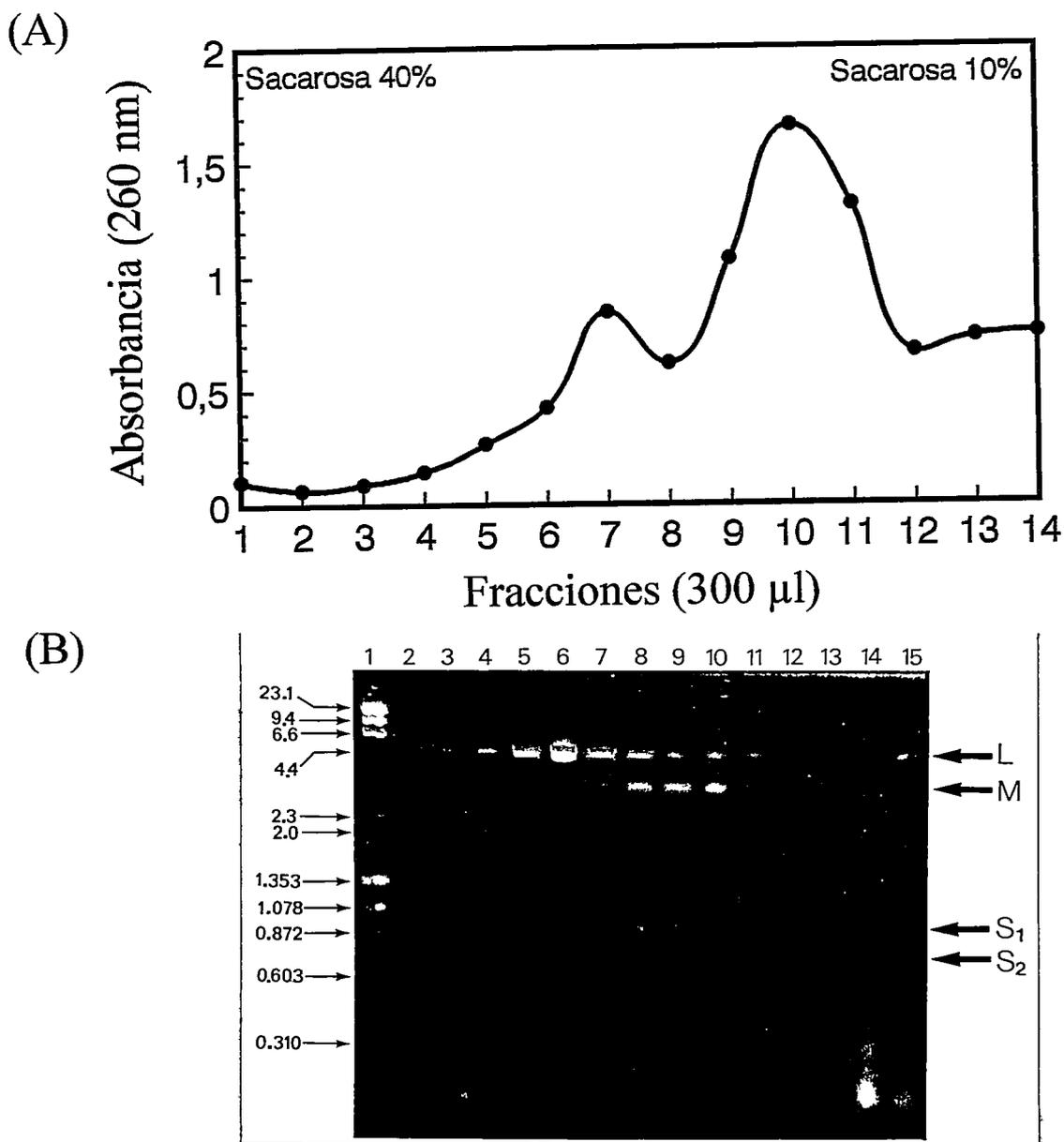


Fig. 8. Aislamiento de VLPs por centrifugación en gradiente de sacarosa. (A) Perfil de la gradiente de las VLPs de *P. rhodozyma* UCD 67-385. (B) Electroforesis en gel de agarosa de los ácidos nucleicos presentes en las fracciones de la gradiente. Carril 1, mezcla de fragmentos λ DNA/*Hind*III y ϕ x174 DNA/*Hae*III; carriles 2 al 15, ácidos nucleicos presentes en las fracciones de la gradiente 1 al 14 respectivamente. Los números de la izquierda indican tamaños moleculares expresados en kilo pares de bases. Las flechas de la derecha indican la posición de los dsRNAs.

3.2. Microscopía electrónica

Las observaciones al microscopio electrónico de las fracciones de la gradiente, después de tinción negativa con fosfotungstato de potasio, revelaron la presencia de abundantes VLPs isométricas de 36 nm de diámetro, aparentemente icosaédricas en las fracciones 5, 6, 7 y 8 (Fig. 9), observándose la mayor cantidad de partículas en las fracciones 6 y 7 coincidente con la migración de las cuatro moléculas de dsRNA (Fig. 8B, carriles 7 y 8). En las fracciones 9, 10 y 11 se observan escasas partículas de la misma forma y tamaño que las detectadas en las fracciones 5, 6, 7 y 8 (resultado no mostrado). Por lo tanto, las VLPs comigran en la gradiente con los dsRNAs que podrían corresponder a su material genético. El hecho que se detecten VLPs en las fracciones que contienen sólo las moléculas L y M, podría estar indicando que existirían al menos dos tipos de partículas con distinto contenido de dsRNAs o bien podrían corresponder a cápsides vacías de acuerdo a su sedimentación en la gradiente.



Fig. 9. Microfotografía electrónica de partículas tipo virus de *P. rhodozyma* UCD 67-385. Tinción negativa con fosfotungstato de potasio al 2% (p/v), pH 7,0. Las flechas indican la posición de partículas que no son penetradas o son parcialmente penetradas por la tinción. En (A) se observan algunas VLPs rotas. Las barras en (A), (B), (C) y (D) representan 100, 75, 50 y 25 nm respectivamente.

3.3. Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS

Con la finalidad de determinar en forma preliminar la composición polipeptídica de las VLPs se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS de la fracción 7 (Fig. 8B, carril 8) de la gradiente. El perfil electroforético reveló la presencia de 2 bandas intensamente teñidas de aproximadamente 35 y 80 kilodaltons que podrían corresponder a polipéptidos de la cápside viral (Fig. 10).

4. CURACIÓN DEL S₂-DSRNA

Para obtener cepas que hayan perdido una o más moléculas de dsRNA, se realizaron varios experimentos de curación. Los procedimientos utilizados fueron: crecimiento de las células en presencia de concentraciones sub-letales de cicloheximida, irradiación con luz UV y crecimiento de las células en presencia de bromuro de etidio. De 300 colonias analizadas después del tratamiento con luz UV, sólo se encontró una de ellas curada del S₂-dsRNA y fue denominada UV-S2 (Fig. 11, carril 3). El tratamiento con cicloheximida resultó ser mucho más eficiente, ya que de 300 colonias analizadas 50 de ellas habían perdido el S₂-dsRNA. Los ácidos nucleicos de cuatro cepas curadas con cicloheximida se muestran en la

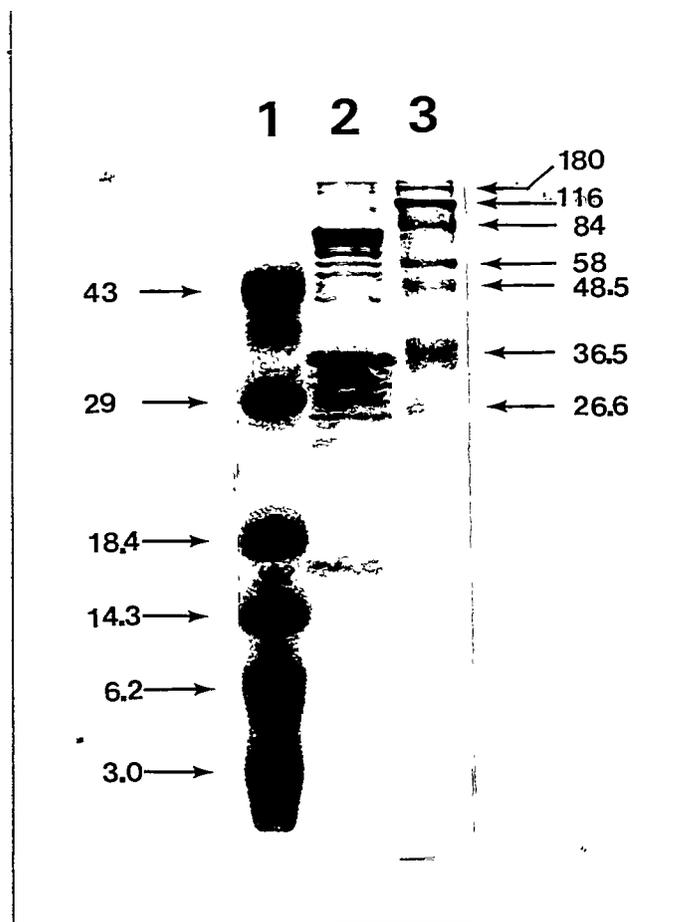


Fig. 10. Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS al 12% del pico principal de la gradiente de sacarosa. (1) Estándares de baja masa molecular preteñidos; (2) Polipéptidos correspondientes a las fracciones del pico principal de la gradiente de sacarosa; (3) Estándares de alta masa molecular preteñidos. Las masas moleculares de los estándares de bajo y alto rango, se indican a la izquierda y a la derecha de la figura respectivamente, en kilodaltons.

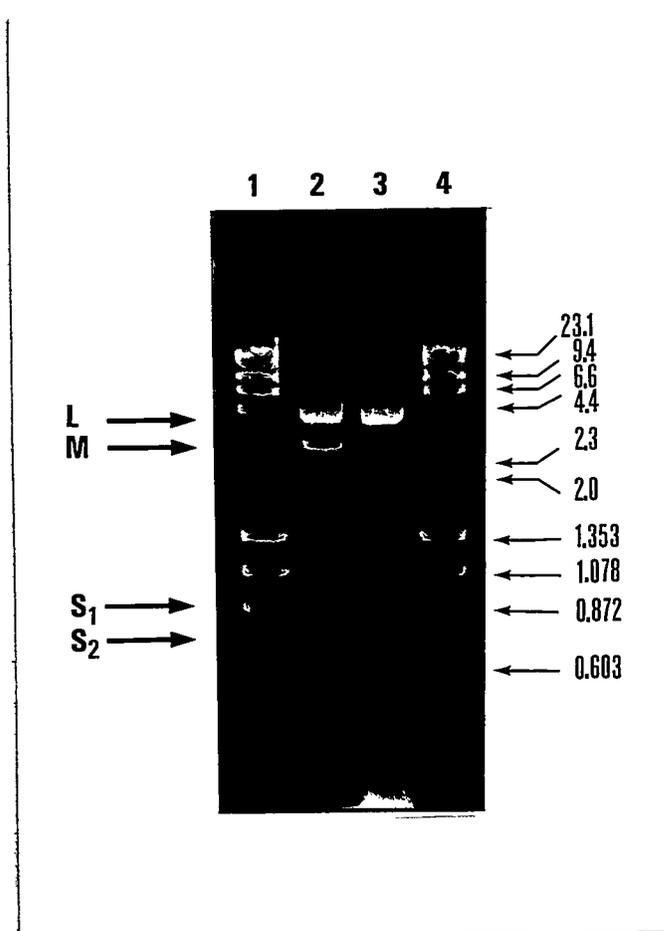


Fig. 11. Electroforesis en gel de agarosa de los ácidos nucleicos de una cepa de *P. rhodozyma* curada del S₂-dsRNA. Carriles 1 y 4, mezcla de fragmentos λ DNA/*Hind*III y ϕ x174 DNA/*Hae*III; carril 2, cepa UCD 67-385; carril 3, cepa UV-S2. Las muestras se trataron con DNasa I para degradar el DNA genómico. Los números de la derecha indican tamaños moleculares expresados en kilo pares de bases. Las flechas de la izquierda indican la posición de los dsRNAs.

Fig. 12. Para confirmar que dichos clones carecían del S₂-dsRNA se corrieron geles de agarosa con distintas concentraciones de sus ácidos nucleicos no observándose en ningún caso el S₂-dsRNA. Además, la migración electroforética de los ácidos nucleicos de las cepas curadas se comparó con los de la cepa silvestre para confirmar que dichos clones carecían del S₂-dsRNA. En la Fig. 13 se muestran dos clones curados por tratamiento con cicloheximida (Fig. 13, carriles 2 y 4), se puede observar claramente la diferencia con la cepa silvestre (Fig. 13, carril 3) y la total ausencia del S₂-dsRNA en ellos (Fig. 13, carriles 2 y 4).

De los 50 clones obtenidos por tratamiento con cicloheximida, se seleccionó uno denominado CYH-117 para su caracterización. El análisis mediante microscopía electrónica por tinción negativa de partículas aisladas, tanto de la cepa UV-S2 como de la cepa CYH-117, reveló la presencia de VLPs isométricas de 36 nm de diámetro idénticas en morfología y tamaño a las de la cepa parental. De estos resultados es posible predecir que el S₂-dsRNA no codificaría polipéptidos estructurales de las partículas virales.

Con la finalidad de obtener cepas curadas en más de una molécula de dsRNA, un cultivo en fase exponencial del clon CYH-117 se traspasó medio mínimo que contenía bromuro de

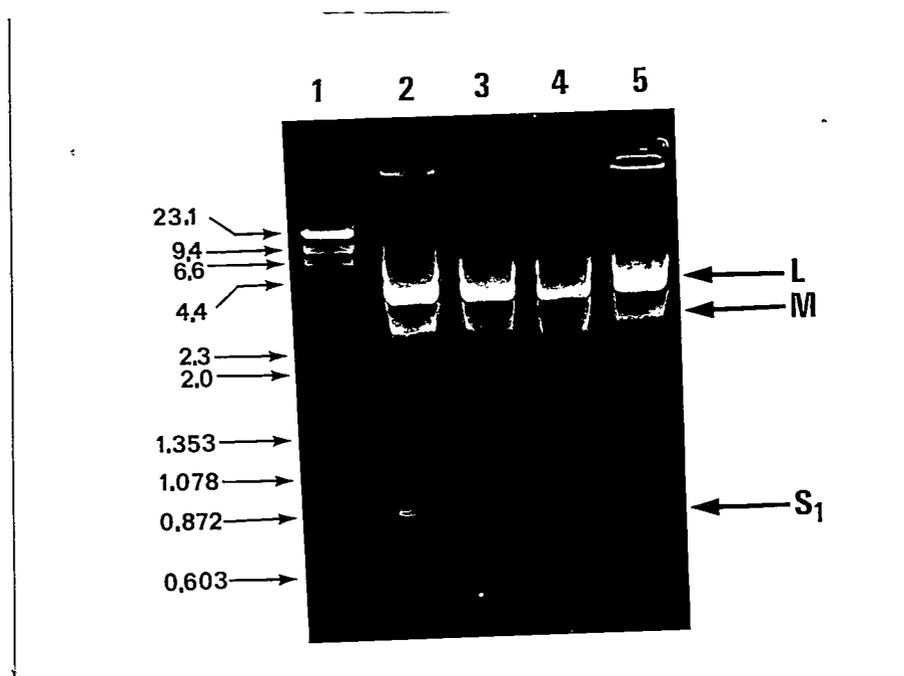


Fig. 12. Electroforesis en gel de agarosa de los ácidos nucleicos de cuatro cepas de *P. rhodozyma* curadas del S₂-dsRNA mediante tratamiento con cicloheximida. Carril 1, mezcla de fragmentos λ DNA/*Hind*III y ϕ x174 DNA/*Hae*III; carriles 2, 3, 4 y 5 cepas curadas del S₂-dsRNA. Las muestras se trataron con DNasa I para degradar el DNA genómico. Los números de la izquierda indican tamaños moleculares expresados en kilo pares de bases. Las flechas de la derecha indican la posición de los dsRNAs.

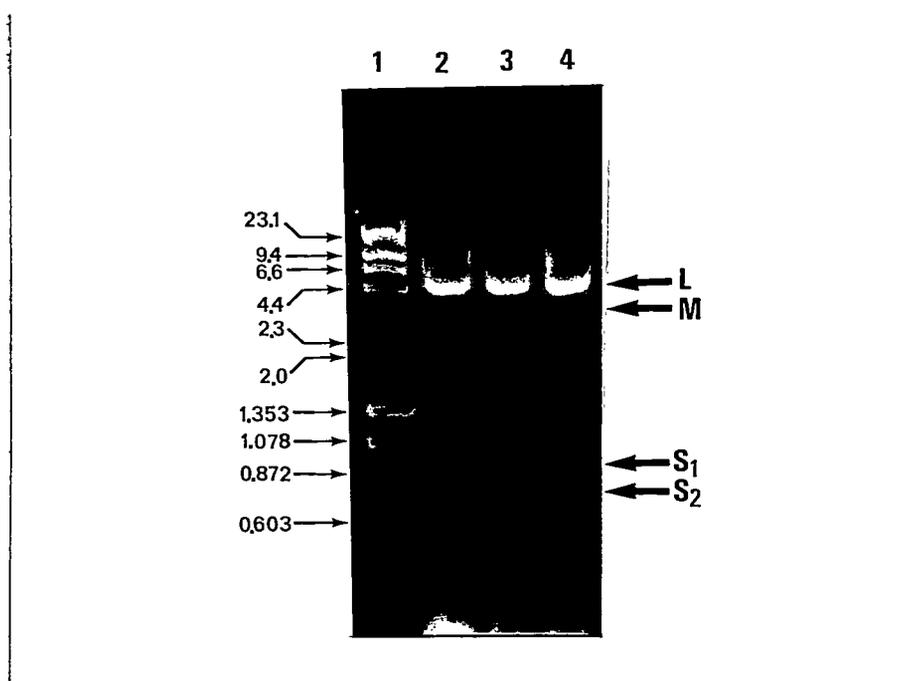


Fig. 13. Electroforesis en gel de agarosa de los ácidos nucleicos de dos cepas de *P. rhodozyma* curadas del S₂-dsRNA mediante tratamiento con cicloheximida. Carril 1, mezcla de fragmentos λ DNA/*Hind*III y φx174 DNA/*Hae*III; carriles 2 y 4 cepas curadas del S₂-dsRNA; carril 3, cepa silvestre. Las muestras se trataron con DNasa I para degradar el DNA genómico. Los números de la izquierda indican tamaños moleculares expresados en kilo pares de bases. Las flechas de la derecha indican la posición de los dsRNAs.

etidio y se mantuvo con agitación suave y continua durante 30 días a 22 °C. Luego de transcurrido este tiempo, se plaquearon alícuotas de este cultivo en agar YM y se incubaron a 22 °C hasta la aparición de colonias. A 200 de las colonias obtenidas, se les analizó su contenido de ácidos nucleicos por electroforesis en geles de agarosa, no encontrándose en ninguna de ellas la carencia de alguna molécula de dsRNA adicional (Tabla 3).

5. LOCALIZACIÓN INTRACELULAR DE LAS VLPs DE *P. rhodozyma*

Con la finalidad de obtener información acerca de la distribución intracelular y aspectos morfológicos de las VLPs, se prepararon secciones ultrafinas de cultivos de las cepas UCD 67-385, UCD 67-383, UV-S2 y CYH-117 y se examinaron al microscopio electrónico. En la única cepa que no se logró visualizar VLPs fue en *P. rhodozyma* UCD 67-383. En las otras cepas se observaron partículas isométricas de aproximadamente 36 nm de diámetro, morfológicamente similares a las VLPs visualizadas por tinción negativa (ver como ejemplos las Figs. 14, 15 y 16). Dichas partículas se localizan casi exclusivamente en el citoplasma como partículas aisladas o formando pequeños agregados (Figs. 14, 15 y 16). Es posible observar que algunos de estos grupos de partículas y algunas

Tabla 3. CURACIÓN DE CEPAS DE *PHAFFIA RHODOZYMA* QUE POSEEN DSRNAS.

Tratamiento	Condiciones o dosis	Colonias analizadas	Cepas curadas ^a
Irradiación con luz UV	0,6 W/m ²	300	1
Crecimiento en cicloheximida	2 µg/ml	300	50
Crecimiento en bromuro de etidio ^b	25 µg/ml	200	0

^aTodas las cepas curadas carecían sólo del S2-dsRNA.

^bEl tratamiento se realizó sobre el clon CYH-117 con la finalidad de obtener cepas curadas en más de una molécula de dsRNA.



Fig. 14. Secciones ultrafinas de células de *P. rhodozyma* conteniendo numerosas VLPs citoplasmáticas. Algunas de las partículas parecen vacías y en otras se visualiza un *core* central denso a los electrones. Se observa gran cantidad de material fibrilar libre en el citoplasma y asociado a las VLPs. La flecha en (B) indica una partícula localizada en el espacio periplásmico. En (A) y (B) la barra representa 200 nm.

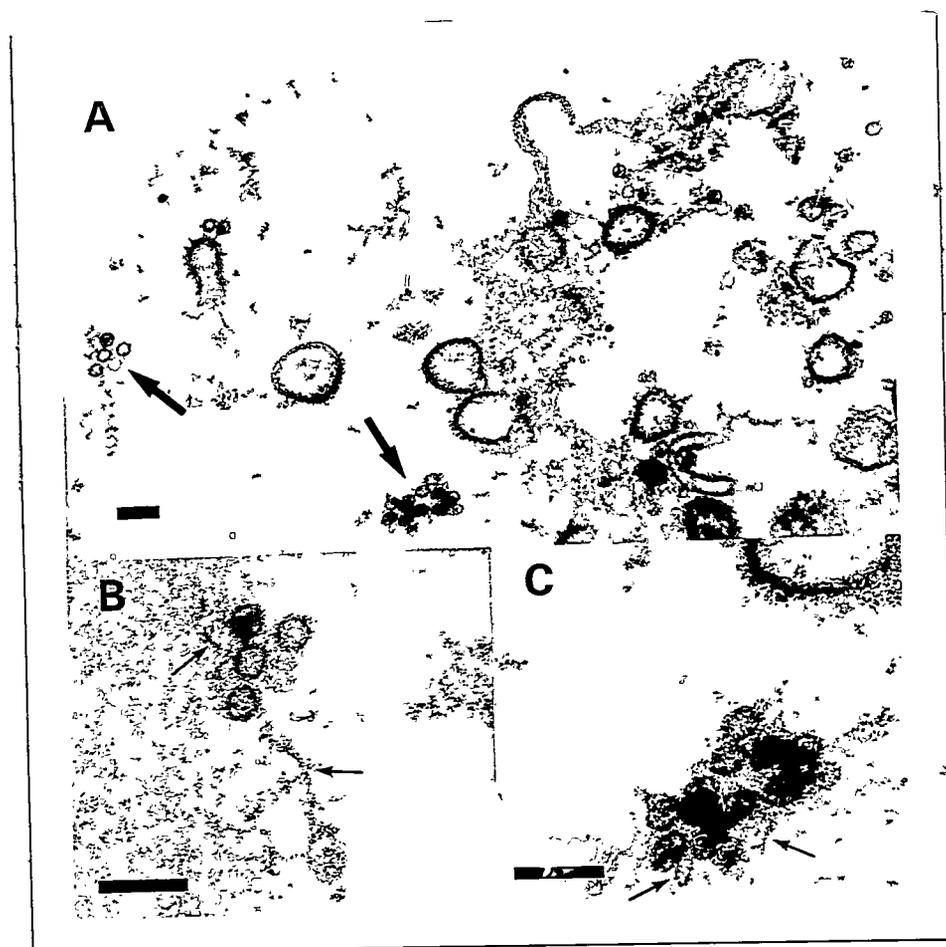


Fig. 15. Sección ultrafina de una célula de *P. rhodozyma* en la que se observan pequeños agregados de VLPs. Algunas de las partículas se encuentran asociadas a estructuras membranosas y otras a la membrana plasmática (A). En (B) y (C) se muestran con mayor aumento los agregados de partículas indicados con flechas en (A). En los dos grupos de partículas se visualiza material fibrilar asociado a ellas (ver flechas). Las barras en (A), (B) y (C) representan 100 nm.

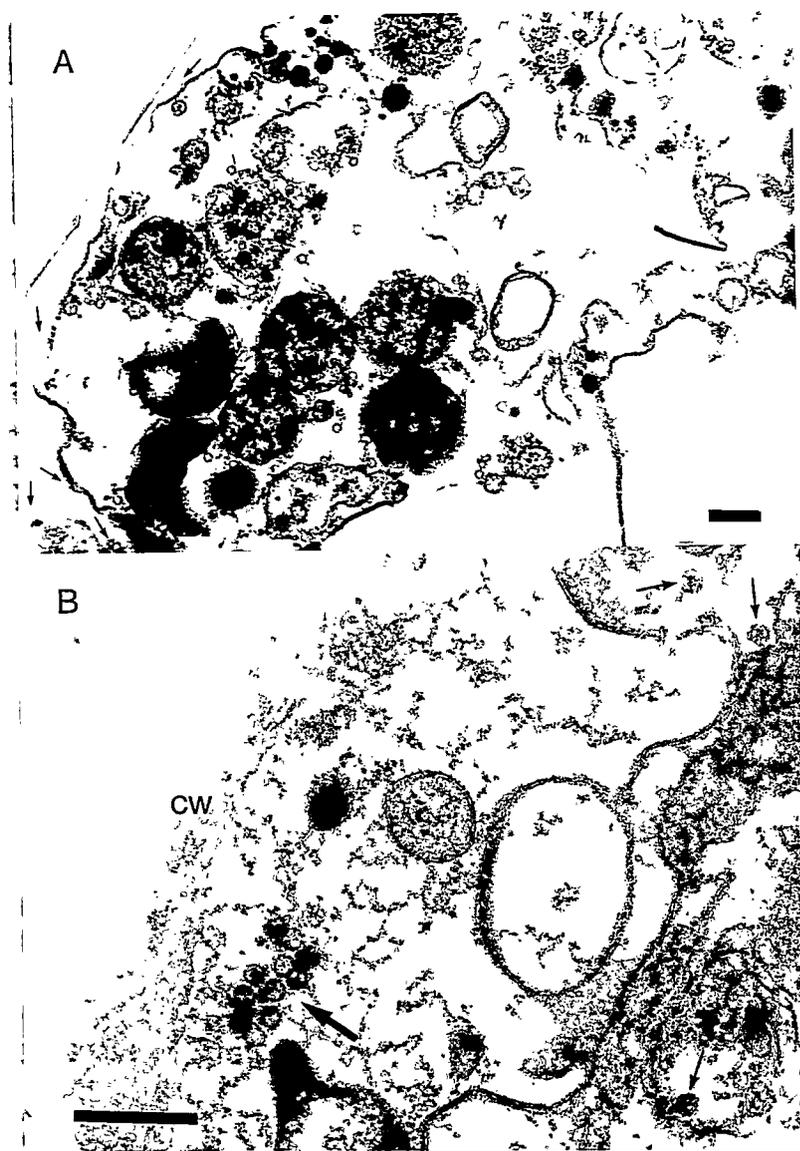


Fig. 16. Distribución intracelular de VLPs en *P. rhodozyma*. (A) Se observan abundantes partículas citoplasmáticas aisladas con el aspecto de estar vacías. Las flechas indican VLPs localizadas en el espacio periplásmico. (B) Partículas agrupadas cercanas a la membrana citoplasmática (flecha grande) y partículas aisladas (flechas pequeñas). CW = pared celular. Las barras en (A) y (B) representan 200 nm.

VLPs aisladas se encuentran adyacentes o asociadas a estructuras citoplasmáticas membranosas (Figs. 15A, 17 y 18) y en algunos casos encerradas en vesículas membranosas de simple o doble membrana (Figs. 17 y 18). También fue posible detectar partículas muy cercanas a la membrana plasmática (Figs. 14, 15, 16, 17, 18, 19 y 20) y en muy pocos casos se observaron partículas en el espacio periplásmico, entre la pared celular y la membrana citoplasmática (ver las partículas indicadas por flechas en las Figs. 14B, 16A, 17A y 19B,), o asociadas a la cara externa del plasmalema (Figs. 16A y 19B). Por otra parte, no se observaron partículas intranucleares, sin embargo se visualizaron VLPs aisladas cercanas a la envoltura nuclear (Fig. 21). Tampoco fue posible encontrar partículas intramitocondriales, dentro de vacuolas o de cuerpos lipídicos.

Es importante observar que en los cortes de células en que se observan grandes cantidades de partículas se aprecia claramente lo que se ha denominado como "degeneración o necrosis celular" (Metitiri y Zachariah, 1972; Yamashita y col., 1973; Roos y col., 1976; Weber, 1979; Kazama, 1979), es decir no es posible visualizar claramente algún organelo o estructura celular y el citoplasma se encuentra completamente desorganizado (Figs. 14, 15, 17, 18). La formación de estructuras membranosas, la asociación de las VLPs con membranas y la generación de vesículas son síntomas



Fig. 17. Secciones ultrafinas de células degeneradas de *P. rhodozyma*. (A) Se observan abundantes estructuras citoplasmáticas membranosas y abundantes VLPs asociadas a ellas o libres en el citoplasma. Las flechas indican la presencia de partículas en el espacio periplásmico. (B) Vesícula de doble membrana con abundantes partículas en su interior. Las barras en (A) y (B) representan 200 nm.

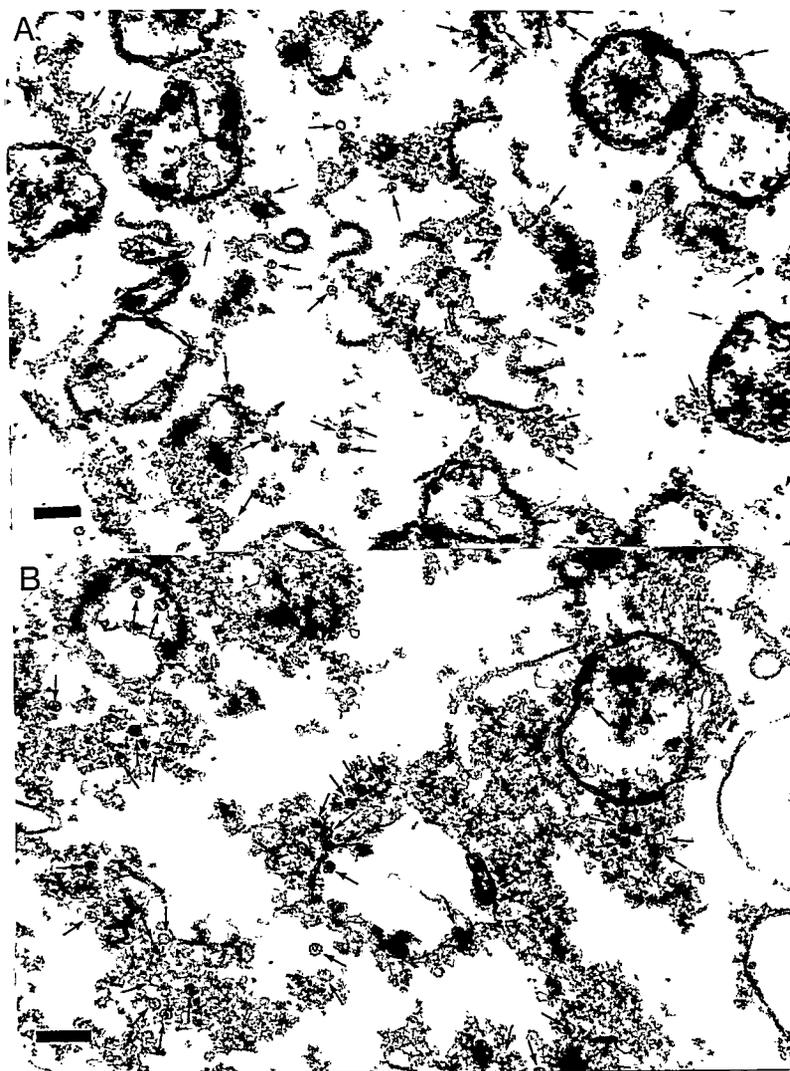


Fig. 18. Secciones de células degeneradas con abundantes VLPs citoplasmáticas. En (A) y (B) se observan abundantes estructuras membranas en un citoplasma altamente desorganizado. Las flechas indican la posición de algunas VLPs. Las barras en (A) y (B) representan 200 nm.

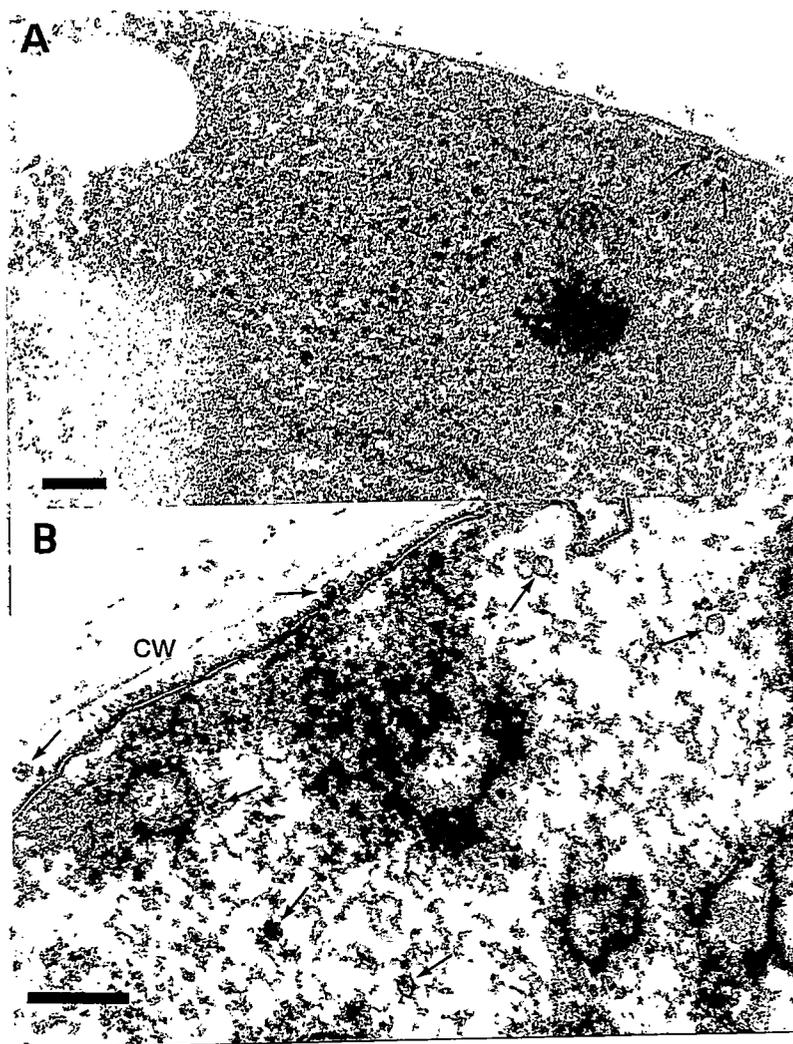


Fig. 19. Aspecto del citoplasma en células que contienen VLPs. (A) Célula con escasas VLPs (ver flechas). Se observa un citoplasma organizado con sus estructuras aparentemente intactas. (B) Mayor cantidad de VLPs y avanzado grado de degeneración citoplasmática. Se observan partículas en el periplasma. CW = pared celular. Las barras en (A) y (B) representan 200 nm.

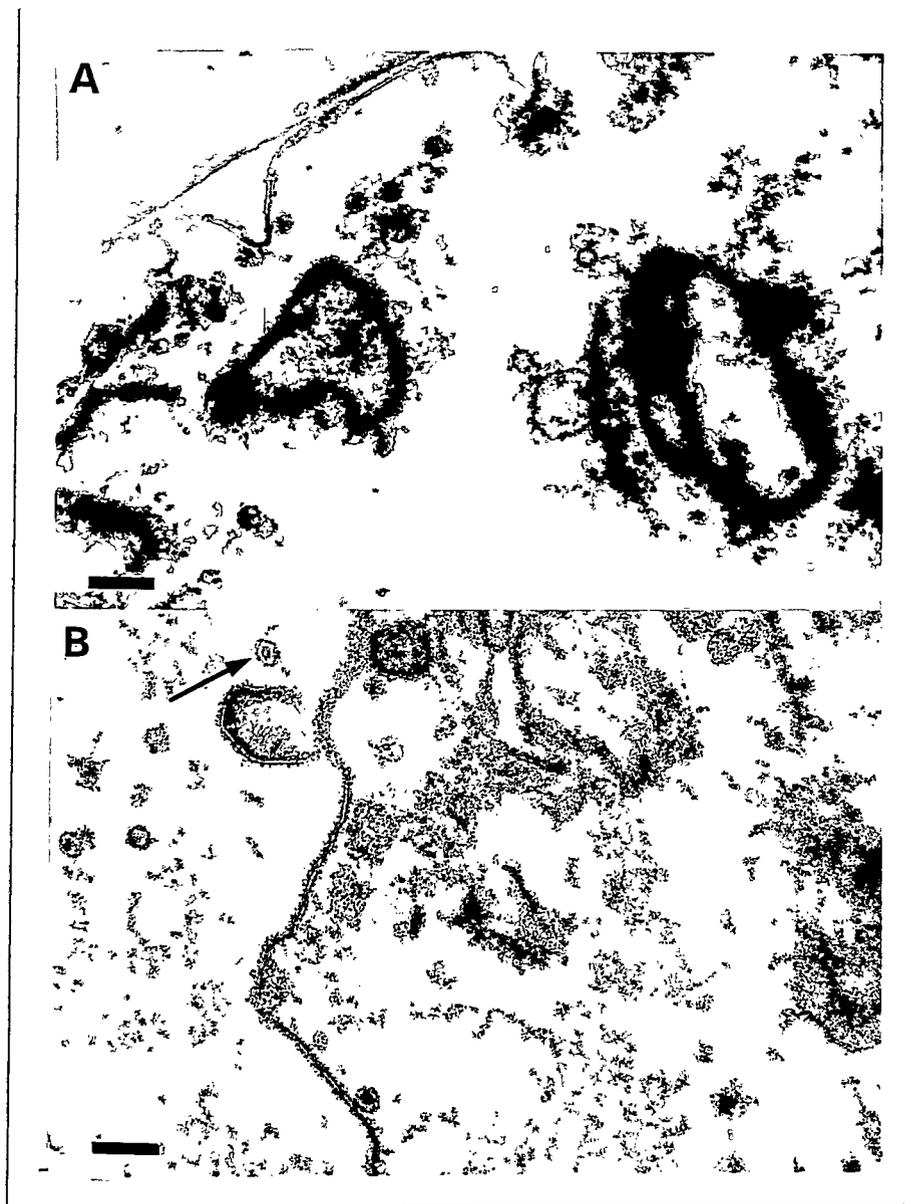


Fig. 20. Secciones ultrafinas de células de *P. rhodozyma* que contienen VLPs. En (A) la mayoría de las partículas tienen el aspecto de estar vacías. En (B) se indica con una flecha una partícula con morfología hexagonal. Las barras en (A) y (B) representan 100 nm.

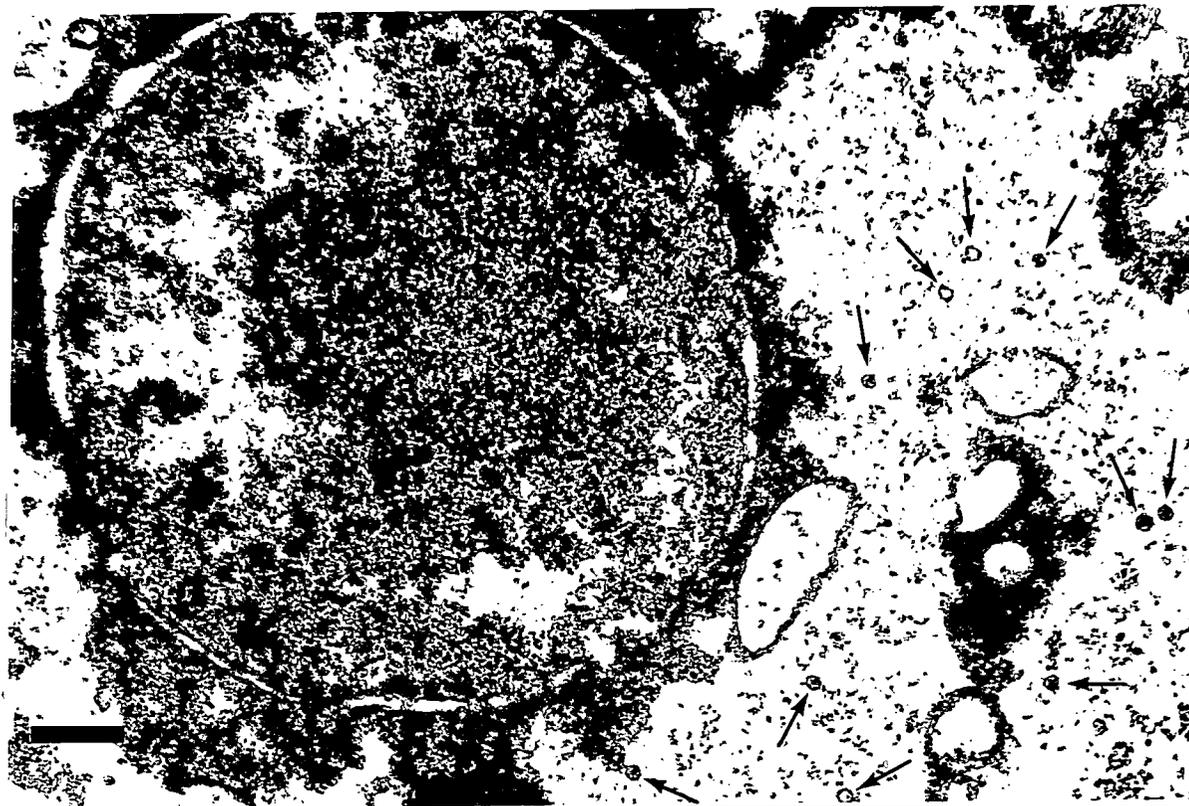


Fig. 21. Sección ultrafina de una célula de *P. rhodozyma* en la que se visualizan VLPs cercanas al núcleo, pero no se observan partículas tipo virus intranucleares. Las flechas indican la posición de las VLPs. La barra representa 200 nm.

típicos de degeneración de las células fúngicas (Weber, 1979). Sin embargo, en las células que se visualizan escasas VLPs (Fig. 19A), o en las que no es posible encontrar fácilmente partículas, el citoplasma se aprecia sin alteraciones y es posible observar claramente estructuras y organelos celulares (Fig. 22). Existen evidencias que indican que existiría una correlación entre edad del cultivo, título de partículas virales y grado de degeneración. Es decir, a medida que aumenta la edad del cultivo, aumenta la cantidad de partículas y la degeneración celular (Lemke, 1979). Como los cultivos usados en este trabajo no eran sincrónicos y como se sabe que dentro de una colonia de microorganismos existen células en distintas etapas de crecimiento y por consiguiente en distinto estado fisiológico, es probable que las células que se observaron con mayor cantidad de VLPs correspondan a células más viejas.

El análisis ultraestructural de las VLPs al microscopio electrónico nos permitió detectar que en aproximadamente el 50% de las partículas se visualiza un *core* central denso a los electrones de aproximadamente 15 nm de diámetro (Figs. 14B, 15, 16B, 18, 19B y 21) y el resto de las partículas parecen estar vacías (Figs. 14B, 15, 16A, 17B, 18, 19B, 20A y 21). Es interesante notar que gran parte de las partículas se encuentran asociadas a material fibrilar posiblemente ácidos nucleicos, sugiriendo que dicho material filamentoso podría corresponder

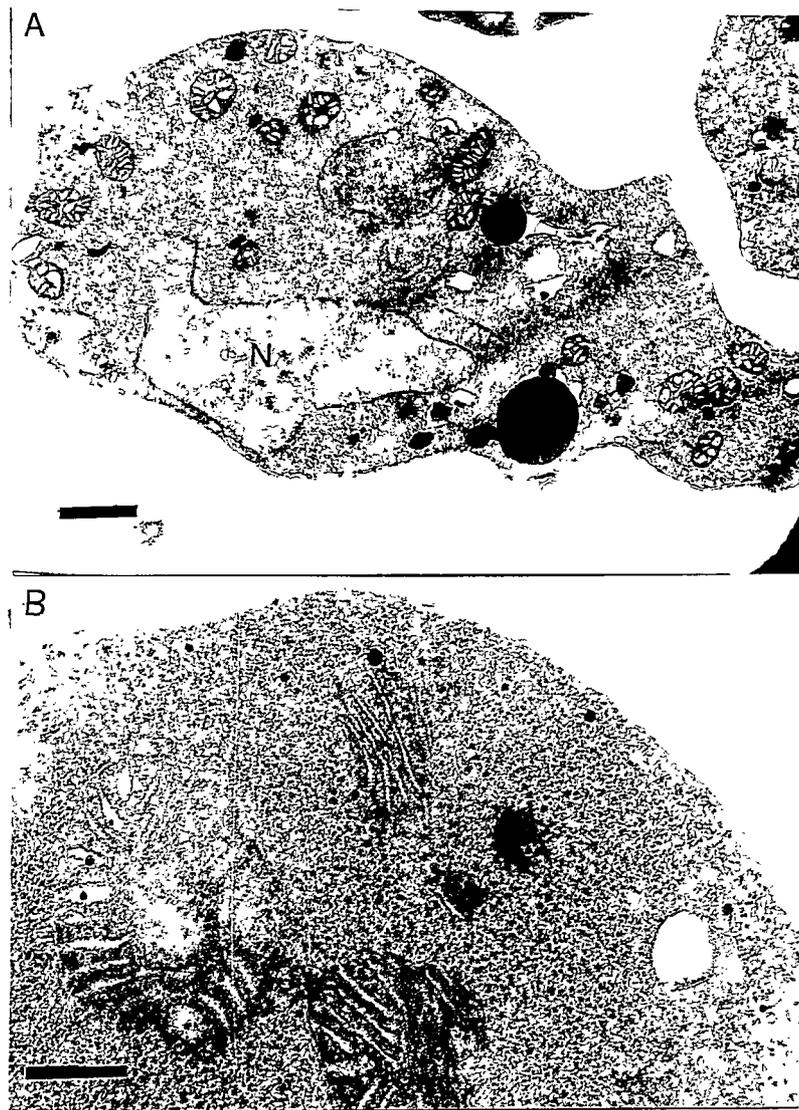


Fig. 22. Secciones ultrafinas de células que no presentan VLPs. En (A) y (B) se observa un citoplasma intacto con gran cantidad de mitocondrias. N = núcleo. Las barras en (A) y (B) representan 1 μm y 200 nm, respectivamente.

al genoma micoviral (Figs. 15, y 20A). Coincidente con los resultados obtenidos con las partículas aisladas, la morfología de éstas también parece ser icosaédrica. Por ejemplo, en la Fig. 20B se observa claramente una partícula hexagonal lo que está indicando que su morfología sería icosaédrica.

6. PRESENCIA DE UN SISTEMA KILLER EN *P. rhodozyma*

La presencia de moléculas de dsRNA podría conferirle algún fenotipo característico a *P. rhodozyma* UCD 67-385 y como se ha observado en otras levaduras que la presencia de tales elementos se encuentra asociada a un sistema *killer*, se realizaron experimentos para detectar la presencia de tal fenotipo en esta levadura. Para ello se utilizó la cepa UCD 67-383, que no posee dsRNAs, como cepa sensible. Después de sembrar las cepas UCD 67-385, UV-S2, CYH-117 y otros clones curados del S₂-dsRNA obtenidos por tratamiento con cicloheximida, sobre un césped de la cepa sensible e incubar las placas a 22 °C por tres a siete días, se observó una zona clara de inhibición del crecimiento alrededor de las cepas ensayadas. Además esta zona clara presentaba un anillo de color azul intenso indicativo de muerte celular (Figs. 23, 24 y 25). Estos resultados constituyen clara evidencia de la presencia de un sistema *killer* en las cepas ensayadas. Las condiciones



Fig. 23. Ensayo del fenotipo *killer* de la cepa silvestre. Sobre un césped de la cepa sensible (*P. rhodozyma* UCD 67-383), se sembraron las cepas UCD 67-385 (A) y UCD 67-383 (B) como control.

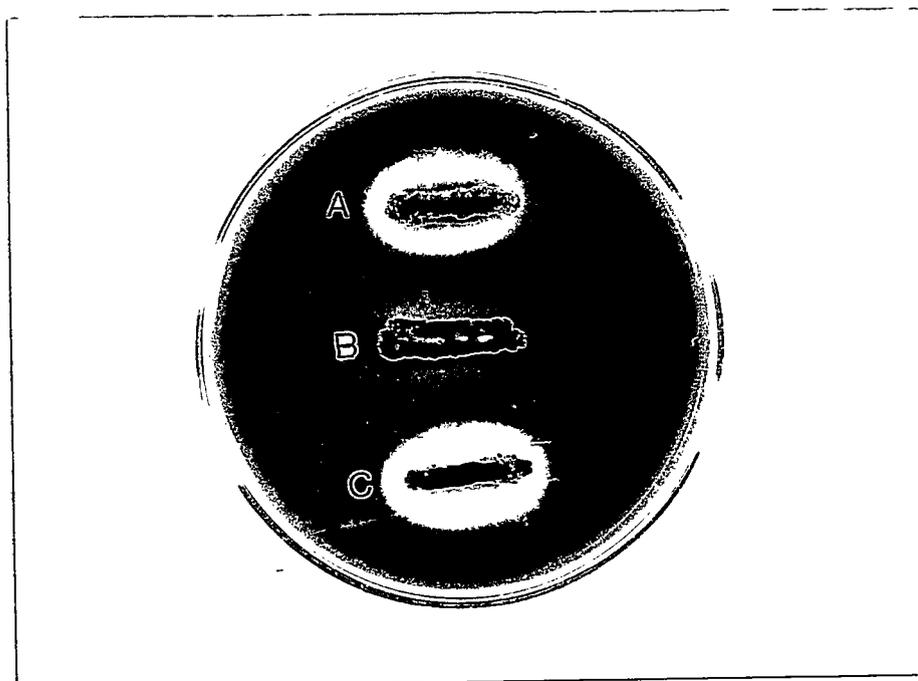


Fig. 24. Ensayo del fenotipo *killer* de cepas curadas del S₂-dsRNA. Sobre un césped de la cepa sensible (*P. rhodozyma* UCD 67-383), se sembraron las cepas UV-S2 (A), CYH-117 (C) y la cepa UCD 67-383 (B) como control.

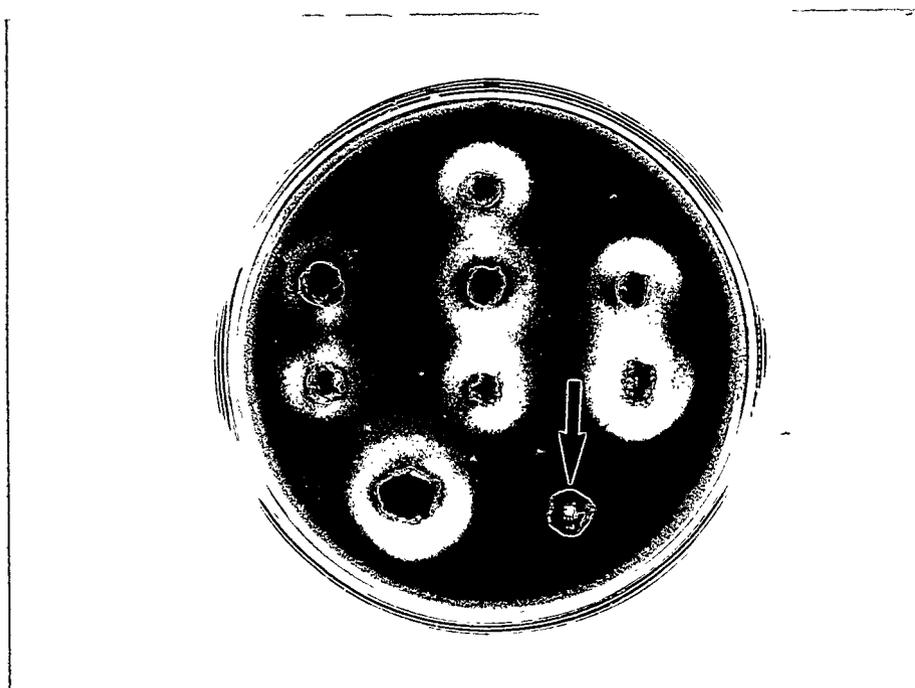


Fig. 25. Ensayo del fenotipo *killer* de cepas curadas con cicloheximida. Sobre un césped de la cepa sensible (*P. rhodozyma* UCD 67-383), se sembraron ocho clones curados del S₂-dsRNA obtenidos por tratamiento con cicloheximida. La flecha indica la posición de la cepa control UCD 67-383.

óptimas de actividad de la aparente toxina *killer* fueron pH 4,6 y 22 °C.

Cabe destacar que si se ensaya la cepa UCD 67-383 sobre alguna de las cepas *killer*, no se observa ningún efecto. Lo mismo ocurre cuando se analiza una cepa *killer* sobre otra, por ejemplo la cepa UCD 67-385 sobre la cepa UV-S2 (resultados no mostrados).

Por otra parte, se realizaron experimentos para determinar si la toxina *killer* de *P. rhodozyma* era capaz de destruir células sensibles de una levadura distinta. Para ello se utilizó *S. cerevisiae* AH22 que no posee dsRNAs como cepa sensible frente a las cepas *killer* UCD 67-385, UV-S2 y CYH-117. Los resultados indican que existe actividad *killer* de *P. rhodozyma* contra esta cepa de *S. cerevisiae*. La figura 26 muestra el efecto *killer* de la cepa UCD 67-385 sobre *S. cerevisiae* AH22. Se puede observar claramente que existe una zona de inhibición del crecimiento de la cepa sensible y además es posible visualizar un anillo intensamente teñido por el azul de metileno indicando que la cepa UCD 67-385 es capaz de matar a la cepa sensible de *S. cerevisiae* (Fig. 26). Lo mismo se observa cuando se ensayan las cepas UV-S2 y CYH-117

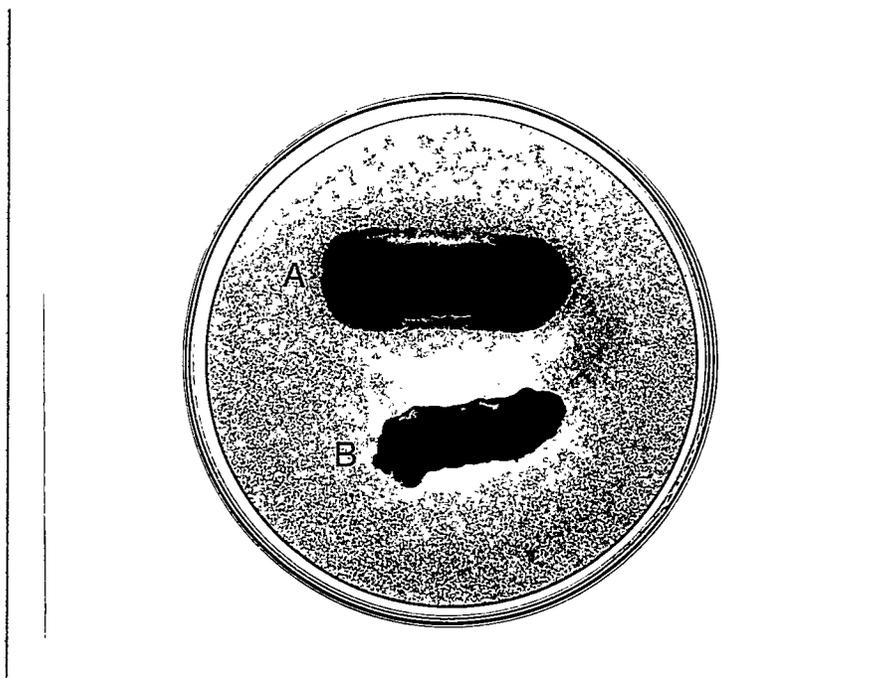


Fig. 26. Ensayo del fenotipo *killer* de la cepa silvestre *P. rhodozyma* UCD 67-385. Sobre un césped de la cepa sensible (*S. cerevisiae* AH22), se sembraron las cepas *P. rhodozyma* UCD 67-385 (A) y *S. cerevisiae* AH22 (B) como control.

sobre la cepa sensible de *S. cerevisiae* (Fig. 27). Sin embargo, en estos casos, la magnitud del efecto *killer* es menor que contra la cepa UCD 67-383 de *P. rhodozyma*, lo que se puede apreciar claramente al comparar las figuras 23, 24 y 25 con la 26 y 27.

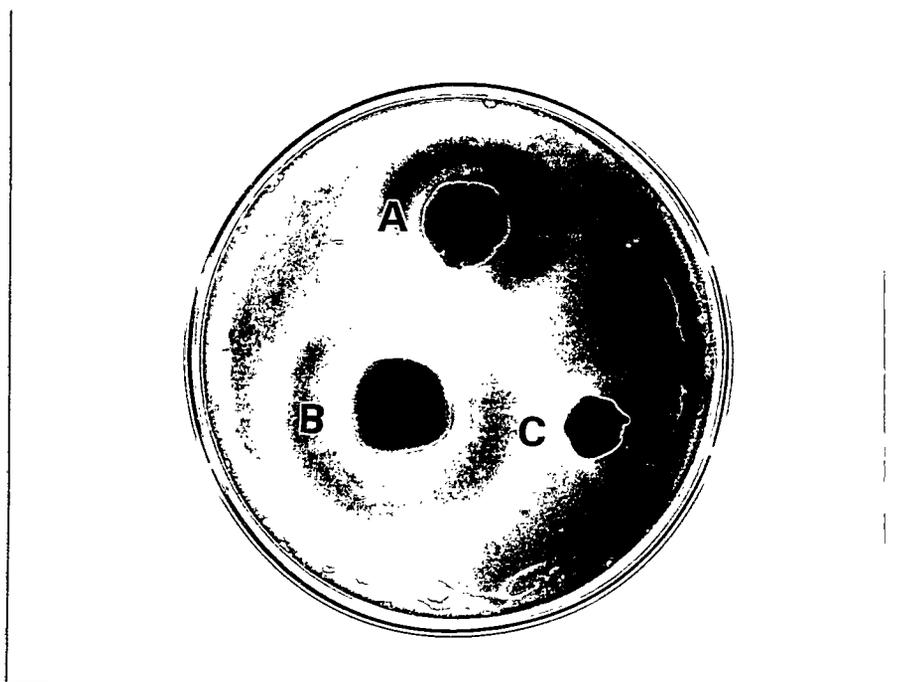


Fig. 27. Ensayo del fenotipo *killer* de cepas de *P. rhodozyma* curadas del S₂-dsRNA sobre la cepa *S. cerevisiae* AH22. Sobre un césped de la cepa sensible (*S. cerevisiae* AH22), se sembraron las cepas de *P. rhodozyma* UV-S2 (A) y CYH-117 (B). La cepa AH22 se usó como control (C).

DISCUSION

1. CARACTERIZACIÓN DE LOS EGES

Los elementos genéticos extracromosómicos de *Phaffia rhodozyma* UCD 67-385 detectados en este trabajo, se identificaron como moléculas de dsRNA. Se confirma su naturaleza química por su resistencia a la degradación con distintas enzimas como DNasa I, nucleasa S1 y RNasa A en un amortiguador de alta fuerza iónica; así como por su unión específica a celulosa CF11, una resina cromatográfica usada para separar ssRNA de dsRNA (Franklin, 1966), y además por su total sensibilidad a la digestión con RNasa A en un amortiguador de baja fuerza iónica. Dichos ensayos constituyen pruebas estándares que se han utilizado para caracterizar las moléculas de dsRNA de otros hongos (Koltin, 1986b; Pryor y Boelen, 1987).

Prueba adicional que el M-dsRNA es una molécula de doble hebra lo demuestra su comportamiento frente a distintas temperaturas, observándose un efecto hipercrómico característico de los ácidos nucleicos de doble hebra, cuando se realiza un experimento de cinética de desnaturación térmica de dicha molécula (Ushiyama y col., 1977). El aumento de absorbancia de aproximadamente 50% observado para el M-dsRNA de *P. rhodozyma* fue similar al obtenido para el L_A-dsRNA de *S. cerevisiae* (Bevan y col., 1973),

para el dsRNA viral de *Penicillium chrysogenum* (Petrovic y col., 1974); para el dsRNA del virus f de *Penicillium stoloniferum* (Bozarth y col., 1971) y para el dsRNA de las partículas L del virus S de *Penicillium stoloniferum* (Buck y Kempson-Jones, 1973). En estos casos, el aumento de absorbancia relativa al valor inicial fue de aproximadamente 45, 45, 43 y 47%, respectivamente. Por otra parte, Bevan y col., 1973 determinaron el T_m del L_A -dsRNA de *S. cerevisiae* en diferentes amortiguadores, obteniendo valores de 46,5; 53,8 y 99,3 °C en 0,1 x SSC + 67% (v/v) de formamida; 0,5 x SSC + 67% (v/v) de formamida y 1 x SSC, respectivamente (Bevan y col., 1973). Con el valor de T_m obtenido en 1 x SSC (0,15 M NaCl; 0,015 M citrato de sodio pH 7,0) condiciones que permiten utilizar la expresión dada por Cox y col., 1970, estimaron un contenido de G+C de 49,6% para el L_A -dsRNA de *S. cerevisiae* (Bevan y col., 1973). En nuestro caso, no fue posible determinar el contenido de G+C del M-dsRNA, ya que para las condiciones en que fue hecho el experimento (0,1 x SSC y 50% de formamida), no se ha determinado una curva de calibración y no se dispone de una ecuación adecuada para el análisis de estos datos.

Además de estas pruebas, se han descrito otros métodos tanto inmunológicos como bioquímicos, para detectar la presencia de dsRNA en hongos (Adler y Del Vecchio, 1979). Las técnicas inmunológicas utilizan antisueros contra dsRNA para detectar este tipo de ácido nucleico en extractos fúngicos. Habitualmente se utilizan polirribonucleótidos sintéticos de doble hebra tales como ácido poliadenílico:poliuridílico (poliA:poliU) o ácido poliinosínico:policitidílico (poliI:poliC) conjugados a albúmina de

suero de bovino para la producción de anticuerpos en conejos (Moffit y Lister, 1973). Entre los procedimientos descritos están la inmunofluorescencia indirecta, la inmunodifusión bidimensional, la microscopía inmunoeléctrica y la inmunoeléctroforesis. Algunas de las técnicas bioquímicas utilizadas para este propósito son la electroforesis en geles de poliacrilamida, la ultracentrifugación analítica y la inhibición de la síntesis de proteínas *in vitro* (Adler y Del Vecchio, 1979). La electroforesis en geles de poliacrilamida se ha usado para la detección de dsRNA en muchos hongos (Koltin y Day, 1976; Marino y col., 1976; Vodkin y col., 1974; Wood y Bozarth, 1972). Es una de las técnicas más directas, ya que las bandas de dsRNA se tiñen de un color rosado violáceo con azul de toluidina, lo que permite su rápida identificación. Sin embargo, es necesario tratar previamente las muestras de ácidos nucleicos con desoxirribonucleasa, ya que el DNA de doble hebra se tiñe del mismo color que el dsRNA con dicho colorante. Como la mayoría de los hongos que contienen dsRNAs no presentan alteraciones fenotípicas discernibles (Doods y col., 1984), para detectar la presencia de dichas moléculas es necesario utilizar alguna de las técnicas anteriormente mencionadas o las utilizadas en este estudio. No obstante, de acuerdo a los antecedentes obtenidos en este trabajo, la evidencia es clara respecto a la presencia de EGEs de naturaleza de dsRNA en *P. rhodozyma*.

La nomenclatura usada en nuestro laboratorio para denominar los dsRNAs de *P. rhodozyma*, se basó en la utilizada inicialmente para los distintos dsRNAs de los virus de *S. cerevisiae* los que se denominaron de

acuerdo a su tamaño molecular con las letras L, M y S y cuyo significado fue *large*, *medium* y *small* respectivamente (Bozarth, 1979). Sin embargo, a pesar que otros investigadores se han basado en el tamaño relativo de las moléculas para su denominación, han utilizado una nomenclatura distinta. Tal es el caso de los dsRNAs de *U. maydis* que se han denominado H, M y L por *heavy*, *medium* y *light* (Koltin, 1988). Además, se han utilizado distintas nomenclaturas para individualizar los L-dsRNAs de los virus de *S. cerevisiae*. Así por ejemplo, la molécula L₁ de Bruen (Bruenn y Brennan, 1980) es el L_A de Wickner (Sommer y Wickner, 1982) y el L₂ de Bevan (El-Sherbeini y col., 1983). El L_a de Bruenn (Bruenn y Brennan, 1980) es el L_{BC} de Wickner (Sommer y Wickner, 1982) y el L₁ de Bevan (El-Sherbeini y col., 1983). Por lo tanto, es claro que hasta el momento no existe uniformidad en la nomenclatura utilizada para los dsRNAs de virus fúngicos y es necesario una revisión y estandarización de la terminología utilizada.

2. ASOCIACIÓN DE LOS DSRNAS CON VLPs

Los resultados de los experimentos de centrifugación de extractos libres de células en gradientes lineales de sacarosa, sugieren que las cuatro moléculas de dsRNA se encuentran asociadas a VLPs, ya que copurifican en la gradiente y por lo tanto, es probable que los dsRNAs constituyan el material genético de dichas partículas. La presencia de escasas VLPs en fracciones que sólo contienen las moléculas L y M podría estar evidenciando la existencia de un segundo tipo de partículas que sólo contienen los dos

dsRNAs de mayor tamaño molecular, sugiriendo que podría existir encapsidación diferencial de los dsRNAs. Sin embargo, lo más probable es que se trate de viriones vacíos, ya que la ausencia de las moléculas S_1 y S_2 no sería suficiente para explicar la diferencia en sedimentación con las partículas llenas. Estos resultados concuerdan con las observaciones realizadas por Welsh y col., 1980 en una cepa *killer* de *S. cerevisiae* que posee las moléculas de dsRNA L y M. Ellos también observaron RNA de doble hebra en todas las fracciones de la gradiente de sacarosa, fundamentalmente la molécula de mayor tamaño molecular (L-dsRNA). Sin embargo, en las fracciones que contenían los más altos niveles de dsRNAs, se encontraban las moléculas L y M comigrando con gran cantidad de VLPs isométricas de aproximadamente 40 nm de diámetro. También encontraron partículas similares a los viriones intactos en fracciones que sedimentaron más lentamente y que contenían sólo el L-dsRNA en baja concentración, pero concluyeron que se trataba de viriones vacíos y partículas rotas (Welsh y col., 1980). Similares a éstos y a los nuestros, son los resultados obtenidos por Dickinson y Pryor, 1989 con las VLPs de *Puccinia striiformis*. Este hongo posee a lo menos 12 moléculas de dsRNA con tamaños moleculares que van desde los 150 hasta los 5.000 pb. Mediante experimentos de fraccionamiento de extractos libres de células en gradientes de sacarosa, obtuvieron un perfil de absorción al UV que presentó dos máximos centrados en la gradiente. El análisis del contenido de ácidos nucleicos de las fracciones de la gradiente reveló la presencia de los tres dsRNAs de mayor tamaño molecular en todas las fracciones de la gradiente. Sin embargo, el análisis del contenido de ácidos nucleicos de las fracciones del pico de

sedimentación rápida, reveló la presencia de la totalidad de los dsRNAs coincidente con las observaciones al microscopio electrónico que en esas fracciones se encontraron abundantes VLPs. También fue posible detectar VLPs en las fracciones del máximo de sedimentación más lenta, sin embargo al igual que los resultados de Welsh y col., 1980, concluyeron que se trataba de cápsides vacías y partículas rotas (Dickinson y Pryor, 1989).

Los resultados obtenidos en nuestro trabajo no constituyen evidencia suficiente para afirmar que las moléculas de dsRNA de *P. rhodozyma* son encapsidadas separadamente. Para dilucidar este punto, es necesario utilizar técnicas de alta resolución como gradientes de densidad de CsCl al equilibrio, metodología que se ha usado para demostrar la encapsidación diferencial de los dsRNAs en *Saccharomyces cerevisiae* (Esteban y Wickner, 1986). No obstante, se debe tener en mente que en algunos casos las VLPs son inestables en CsCl y por lo tanto, se debe usar Cs₂SO₄ (Dickinson y Pryor, 1989). Es así que mediante centrifugación en gradientes de CsCl Esteban y Wickner (1986), han podido separar partículas que contienen L_A-dsRNA de partículas que contienen M₁-dsRNA. Además, usando esta metodología ellos han logrado separar dos tipos de VLPs que contienen M₁-dsRNA (VLPs M₁-H y VLPs M₁-L). Las VLPs M₁-H son de mayor densidad que las VLPs M₁-L. Los tres tipos de VLPs (M₁-H, M₁-L y L_A) poseen los mismos tipos de proteínas en aproximadamente las mismas proporciones, pero mientras que las VLPs L_A y M₁-L tienen una molécula de dsRNA por partícula, las VLPs M₁-H contienen dos moléculas de dsRNA por partícula (Esteban y Wickner, 1986). Estos resultados demuestran el

poder resolutivo de las gradientes de CsCl en la separación de partículas que difieren muy poco en densidad y por lo tanto, es claro que su aplicabilidad es esencial en la caracterización de VLPs fúngicas.

El tamaño y las características morfológicas de las VLPs de *P. rhodozyma* UCD 67-385 aisladas por centrifugación en gradientes de sacarosa y visualizadas al microscopio electrónico después de tinción negativa, son similares a las descritas en *S. cerevisiae* (Herring y Bevan, 1974); es decir, se trata de partículas isométricas aparentemente icosaédricas de 36 y 39 nm de diámetro para *P. rhodozyma* y *S. cerevisiae*, respectivamente. En ambos casos se observaron partículas rotas y la mayoría parecían estar vacías. Sin embargo, se ha demostrado que las partículas que se visualizan con el centro oscuro por tinción negativa, no necesariamente corresponden a partículas vacías, debido a que tanto las cápsides llenas con dsRNA y las cápsides verdaderamente vacías habitualmente son penetradas por la tinción (Bozarth, 1979).

El perfil electroforético de las fracciones que contienen VLPs reveló la presencia de 2 bandas polipeptídicas mayoritarias de alrededor de 35 y 80 kilodaltons intensamente teñidas, que no se detectan en el resto de las fracciones de la gradiente. Es posible que alguno(s) de estos polipéptidos correspondan a proteína(s) de la cápside viral. Lo más probable es que el polipéptido de 80 kilodaltons corresponda a la proteína estructural del virus, ya que se han descrito proteínas de similar masa molecular como únicas o principales constituyentes de la cápside micoviral. Tal es el caso de las VLPs

de *Ustilago maydis* (Koltin, 1988), *S. cerevisiae* (Reilly y col., 1984), *Hanseniaspora uvarum* (Schmitt y Neuhausen, 1994) y *Helminthosporium victoriae* (Ghabrial y col., 1987) que poseen como principal constituyente de la cápside polipéptidos de 75, 80, 85 y 88 kilodaltons (kDa) respectivamente. Sin embargo, Schmitt y Neuhausen, 1994, estudiando una cepa de *Zigosaccharomyces bailii* que posee 3 moléculas de dsRNA, L, M y Z de 4,5; 1,8 y 2,8 kpb respectivamente, demostraron que tanto el L como el M dsRNA son encapsidados en VLPs cuya cápside está formada por una proteína de 85 kDa, mientras que el Z dsRNA es encapsidado en partículas virales cuya cubierta está formada por una proteína de 35 kDa. Por lo tanto, de acuerdo a estos antecedentes, a su abundancia y a su presencia en las fracciones que contienen la mayor cantidad de VLPs, no se puede descartar la posibilidad de que el polipéptido de 35 kDa sea el principal o forme parte de la cápside de VLPs de *P. rhodozyma*.

Nuestros resultados no son concluyentes acerca de la composición proteica de las VLPs de *P. rhodozyma* y es necesario confirmarlos con experimentos que permitan purificar las partículas virales libres de otras proteínas contaminantes. Para ello, es necesario realizar centrifugaciones en gradientes de densidad de CsCl ó Cs₂SO₄ al equilibrio. Con esta técnica se han logrado purificar las VLPs de *S. cerevisiae* (Esteban y Wickner, 1986), *H. victoriae* (Ghabrial y col., 1987) y *Rhizoctonia solani* (Tavantzis y Bandy, 1988), entre otras.

3. OBTENCIÓN DE CEPAS CURADAS DE DSRNAS

Se han descrito varias condiciones, que resultan en la pérdida de al menos una de las moléculas de dsRNA presentes en las células fúngicas, tales como tratamiento con cicloheximida (Fink y Styles, 1972), exposición a la luz ultravioleta (Tréton y col., 1987) y crecimiento a altas temperaturas (Wickner, 1974). En nuestro caso, con los experimentos de curación con luz UV se obtuvo sólo una cepa curada del S₂-dsRNA (cepa UV-S2) de 300 colonias analizadas, mientras que el tratamiento con cicloheximida resultó ser mucho más eficiente, obteniéndose 50 clones curados sólo del RNA más pequeño (S₂-dsRNA) con el análisis del mismo número de colonias. El tratamiento con bromuro de etidio de algunos de estos clones no altera su contenido de dsRNAs y hasta el momento no ha sido posible obtener cepas curadas de otro(s) dsRNA(s), lo que sugiere que podría existir cierta interdependencia entre las moléculas L, M y S₁ para su mantención intracelular o simplemente que éstos dsRNAs son resistentes a la curación por estos métodos.

Tanto la cepa UV-S2 como el clon CYH-117 contienen VLPs idénticas a las detectadas en la cepa silvestre, lo que sugiere que el S₂-dsRNA no codifica polipéptidos estructurales de las partículas virales.

4. ANÁLISIS MICROSCÓPICO DE LAS VLPs EN CORTES FINOS

La microscopía electrónica se ha mantenido como una de las principales herramientas para la detección de partículas virales en hongos y es así como en muchas especies fúngicas la única evidencia de la presencia de VLPs está basada en la visualización directa de secciones ultrafinas de micelio, esporas o levaduras utilizando esta metodología. En muy pocos casos, extensos estudios ultraestructurales han contribuido con información importante en relación a la distribución y localización intracelular de las VLPs y subsiguientes cambios en la sub-estructura de las células hospedadoras acompañados por la acumulación de dichas partículas. Uno de los principales problemas que se encuentran en la microscopía electrónica de material biológico, es la interpretación de estructuras desconocidas. En general, las partículas virales están representadas como unidades repetitivas regulares o estructuras atípicas de organelos celulares. Los virus pueden distinguirse en el microscopio electrónico por su uniformidad en el tamaño y forma y por su estructura fina. Dichas partículas deben diferenciarse de otras partículas esféricas, vesículas, estructuras tubulares seccionadas, ribosomas e inclusiones cristalinas de naturaleza no viral (Lemke, 1979).

En nuestro caso, el análisis microscópico de secciones ultrafinas de distintas cepas de *P. rhodozyma* reveló la presencia de partículas similares en morfología y tamaño a las visualizadas por tinción negativa en las cepas UCD 67-385, UV-S2 y CYH-117. Dichas partículas se encuentran dispersas en el citoplasma, observándose algunos agregados y partículas aisladas

asociadas a estructuras membranosas. Tipos similares de distribución intracelular de VLPs han sido descritas en otros hongos como *Lentinus edodes* (Ushiyama y Nakai, 1980) y *Penicillium chrysogenum* (Yamashita y col., 1973). No se observaron estructuras organizadas de VLPs como las detectadas en otras especies fúngicas (Weber, 1979). Por ejemplo, en células degeneradas de *Penicillium chrysogenum* se han encontrado ordenamientos cilíndricos y estructuras tubulares formadas por partículas virales (Yamashita y col., 1973). Estructuras organizadas similares también han sido detectadas en *Mycogone pernicioso* y *Peziza ostracoderma* (Weber, 1979). Sin embargo, fue posible encontrar partículas aisladas y agregados de VLPs encerradas en estructuras membranosas con aspecto de vesículas citoplasmáticas de simple y doble membrana en células degeneradas, fenómeno que también se ha observado en otros hongos (Buck, 1986). La asociación de los virus fúngicos con sistemas membranosos se ha interpretado como un intento de la célula hospedadora para delimitar un virus potencialmente lítico en cuerpos separados (Weber, 1979). La degeneración con desaparición de organelos celulares y citoplasma al parecer es un fenómeno de lisis interna y es probable que la gruesa y rígida pared celular prevenga la lisis celular.

Algunas VLPs se detectaron localizadas muy cerca de la membrana plasmática y otras en el espacio periplásmico lo que también ha sido encontrado para otros hongos (Lemke, 1979), sin embargo, el significado de la existencia de partículas en el espacio periplásmico no está claro.

Se observaron VLPs aisladas cercanas a la envoltura nuclear, pero no dentro del núcleo. Tampoco fue posible observar VLPs intramitocondriales. Uno de los pocos casos en que se han detectado VLPs asociadas a mitocondrias corresponde al descrito en una cepa mutante de *Neurospora crassa* (Kuntzel y col., 1973).

En relación a aspectos morfológicos y estructurales de las VLPs, se obtuvo la siguiente información: en muchas de las partículas se visualiza un centro denso a los electrones y otras parecen vacías. Es curioso que en algunas células prácticamente la totalidad de las partículas tengan el aspecto de estar vacías. Esta no es una observación aislada, ya que también se ha encontrado en otras especies fúngicas (Ushiyama y Nakai, 1982). Si tiene algún significado fisiológico de las células o de las VLPs o si se trata de un artefacto de técnica no está claro. La gran cantidad de estructuras fibrilares asociadas a gran parte de las VLPs es muy probable que correspondan a los RNAs genómicos que son extruidos de la cápside micoviral. Un antecedente que apoya esta hipótesis es que la fijación con glutaraldehído o tetróxido de osmio estabiliza las cápsides virales, pero no fija el ácido nucleico eficientemente (Vernon y col., 1976). Por otra parte, en *Penicillium chrysogenum* se ha descrito que las VLPs liberan un material fibroso proveniente del *core* de las partículas virales y que por lo tanto, correspondería a dsRNA (Yamashita y col., 1973). Además, Ushiyama y Nakai (1982) demostraron que estructuras filamentosas similares asociadas a las VLPs de *L. edodes*, corresponden a dsRNA. Ellos trataron preparaciones de VLPs parcialmente purificadas con RNasa A en

amortiguadores de baja (0.01 x SSC) o alta (2 x SSC) fuerza iónica y luego de aplicarlas a las grillas, las sombrearon con platino:paladio y las examinaron al microscopio electrónico. Sólo en las preparaciones tratadas con RNasa A en 2 x SSC permanecen las fibrillas asociadas a las partículas, confirmándose que corresponden a dsRNAs (Ushiyama y Nakai, 1982).

5. FENOTIPO KILLER EN *P. RHODOZYMA*

Finalmente, los experimentos realizados para detectar si los dsRNAs le confieren alguna característica fenotípica a *P. rhodozyma* UCD 67-385, revelaron la presencia de un sistema *killer* en esta levadura. Dicho sistema fue responsable de la muerte de una cepa sensible, *P. rhodozyma* UCD 67-383, que no contiene dsRNAs. Para la óptima visualización del efecto *killer* se requirió un mínimo de incubación de 72 horas, mientras que levaduras *killer* de otros géneros tienen un efecto máximo después de 24 horas de incubación (Young, 1987). La menor velocidad de crecimiento de *P. rhodozyma* comparada con *S. cerevisiae* por ejemplo, puede explicar esta diferencia. Por otra parte, tanto la cepa UV-S2 como los clones curados del S₂-dsRNA obtenidos por tratamiento con cicloheximida presentan la misma actividad *killer* que la cepa UCD 67-385, lo que indica que el S₂-dsRNA no es importante para la expresión de la toxina *killer*. Este último resultado difiere notablemente con los obtenidos en *S. cerevisiae*, ya que el tratamiento con concentraciones sub-letales de cicloheximida permite la curación de cepas *killer* en alta frecuencia (Fink y Styles, 1972). Recientemente Carroll

y Wickner, (1995) han descrito un mecanismo probable por el cual la cicloheximida es capaz de curar el M_1 -dsRNA en *S. cerevisiae*. Ellos demostraron que la curación de esta molécula depende de la fuente de las proteínas codificadas por el L_A -dsRNA. Cuando estas proteínas son sintetizadas a partir del mRNA viral poli(A)⁻, el M_1 -dsRNA es curado por cicloheximida; sin embargo, cuando Gag y Gag-Pol son sintetizadas a partir de un mRNA poli(A)⁺ de un clon del cDNA de L_A , la cicloheximida no disminuye el número de copias de M_1 . Como se sabe, la cicloheximida actúa sobre la proteína L29 de la subunidad ribosomal grande (Del Pozo y col., 1991). De acuerdo a esto, los autores concluyen que una deficiencia en las subunidades ribosomales 60S resulta en una preferencial disminución en la traducción de los transcritos del mRNA viral (Carroll y Wickner, 1995). Además, estos investigadores argumentan que L_A proporcionaría las proteínas Gag y Gag-Pol a M_1 , sólo después que sus propios requerimientos hayan sido satisfechos. Es decir, existiría un mecanismo de empacamiento *cis* preferencial y por lo tanto, una disminución en la concentración de subunidades ribosomales 60S, tendría como consecuencia lógica una disminución en la traducción de la hebra (+) de L_A lo que resultaría en la pérdida selectiva de M_1 (Carroll y Wickner, 1995). Aparentemente, los dsRNAs de *P. rhodozyma* al igual que los de *S. cerevisiae*, no poseen colas de poli(A), ya que no son retenidos en columnas de oligodT celulosa (resultados no mostrados). Por lo tanto, la imposibilidad de obtener cepas curadas del dsRNA que codifica para la toxina *killer* (cepas que hayan perdido el fenotipo *killer*) mediante tratamiento con concentraciones sub-letales de cicloheximida, estaría indicando que el mecanismo de

mantención y/o replicación intracelular de esta molécula sería distinto al del M₁-dsRNA de *S. cerevisiae*. El mecanismo de pérdida del M₁-dsRNA de *S. cerevisiae* podría ser homologable sólo para el S₂-dsRNA de *P. rhodozyma*.

Por otra parte, coincidente con nuestros resultados, levaduras *killer* de otros géneros distintos de *Saccharomyces* no se pueden curar por tratamiento con cicloheximida (Kandel, 1988). Es interesante el hecho que las cepas *killer* de *P. rhodozyma* puedan destruir a una cepa sensible de *S. cerevisiae*, lo que confirma las observaciones que sugieren que todas las levaduras de género distinto a *Saccharomyces* matan algunas cepas de *Saccharomyces* (Young, 1987). Sin embargo, la intensidad del efecto es menor que la que se obtiene con la cepa sensible de *P. rhodozyma*. Esta diferencia también puede explicarse por las distintas velocidades de crecimiento de dichas levaduras.

En la mayoría de los hongos que contienen dsRNAs no ha sido posible detectar un sistema *killer*. Una probable explicación a este fenómeno es que las toxinas son extremadamente inestables y se inactivan rápidamente en condiciones de pH y temperatura inadecuadas. Por lo tanto, es probable que un gran número de cepas *killer* no hayan sido detectadas debido a que las condiciones de ensayo que se han usado no han sido las más adecuadas.

En relación a lo último, el análisis de la composición de polipéptidos del medio de cultivo nos permitió determinar la presencia de dos bandas

polipeptídicas adicionales de 20 y 22 kDa en los cultivos de las cepas *killer* que no se visualizan en el la cepa sensible. Es probable que uno a ambos polipéptidos sean o formen parte de la toxina *killer* de *P. rhodozyma*. Esta suposición está apoyada en el hecho que los sobrenadantes del medio de cultivo de dichas cepas presentan actividad *killer* cuando se ensayan sobre un césped de la cepa sensible, *P. rhodozyma* UCD 67-383. La menor actividad *killer* de los sobrenadantes del medio de cultivo de las cepas UCD 67-385, UV-S2 y CYH-117 sobre la cepa UCD 67-383 en comparación al uso de células intactas, estaría indicando una baja estabilidad y rápida desnaturalación de el(los) polipéptido(s) que son o forman parte de la toxina *killer* de *P. rhodozyma*.

CONCLUSIONES

1. Los EGEs presentes en *Phaffia rhodozyma* UCD 67-385 corresponden a moléculas de RNA de doble hebra (dsRNA) que se encuentran asociadas a partículas tipo virus (VLPs) isométricas de 36 nm de diámetro.
2. Las VLPs se localizan en el citoplasma y en el espacio periplásmico de la levadura como partículas aisladas o formando pequeños agregados.
3. Las células infectadas que contienen abundantes VLPs presentan el fenómeno de degeneración celular con una alta desorganización citoplasmática.
4. Es posible obtener cepas curadas del S₂-dsRNA mediante tratamiento con luz ultravioleta o crecimiento de la cepa silvestre, en presencia de concentraciones sub-letales de cicloheximida.
5. Existe una asociación entre dsRNAs y fenotipo *killer*, ya que las cepas que poseen dsRNAs presentan actividad *killer* sobre cepas que no los contienen.

6. Los resultados indican que el S₂-dsRNA no codifica polipéptidos estructurales de las VLPs, ya que las cepas curadas del S₂-dsRNA poseen VLPs morfológicamente idénticas a las de la cepa parental.

7. El S₂-dsRNA no es importante para la expresión del fenotipo *killer*, ya que tanto la cepa silvestre como las cepas curadas carentes de esta molécula poseen un fenotipo *killer* que destruye células sensibles de *P. rhodozyma* y *S. cerevisiae* que no poseen dsRNAs.

PROYECCIONES

A la luz de los resultados obtenidos en este trabajo se generan una serie de proyecciones interesantes:

En primer lugar sería muy interesante la purificación de las VLPs por gradientes de CsCl o Cs₂SO₄ para poder caracterizar la composición polipeptídica de la cápside y además poder determinar si existe o no encapsidación diferencial de las moléculas de RNA de doble hebra. Complementario a estos experimentos, sería importante realizar traducción *in vitro* de los dsRNAs y posterior análisis bioquímico (comportamiento electroforético y mapeo peptídico) e inmunoquímico (precipitación con anticuerpos) de los productos obtenidos para poder determinar cuál de los dsRNAs codifica para los polipéptidos de la cápside micoviral, mediante comparación de los productos de traducción con los polipéptidos de las VLPs purificadas.

Otro aspecto interesante de realizar sería la purificación y caracterización de la toxina *killer*. De esta manera se podría demostrar si los polipéptidos de 20 y 22 kDa que se encuentran en los sobrenadantes de los medios de cultivos de las cepas *killer* corresponden o forman parte de la toxina *killer* de *Phaffia rhodozyma*. Con la toxina *killer* purificada se

podrían realizar experimentos destinados a la caracterización del mecanismo de acción de dicha toxina. Por ejemplo, se podría ensayar si forma canales iónicos en bicapas fosfolipídicas o si posee actividad endonucleasa sobre dsDNA, ssDNA o ssRNA, mecanismos que han sido descritos para las toxinas de *Saccharomyces cerevisiae* y *Ustilago maydis*, respectivamente.

El clonamiento del gen de la toxina puede ser útil en la construcción de vectores que permitan estudiar los mecanismos de procesamiento y secreción de proteínas. Este gen puede ser usado como un marcador de selección dominante para transformación genética y mantención de plásmidos. Del mismo modo, utilizando las secuencias regulatorias que dirigen la secreción de la toxina, se podrían construir vectores de expresión que permitan la secreción del producto del gen clonado.

Sería interesante además clonar y secuenciar las otras moléculas de dsRNA. Con esta información se pueden analizar los posibles marcos de lectura abiertos para los potenciales polipéptidos codificados en estos elementos y la comparación con las secuencias publicadas de los dsRNAs de otros micovirus. De esta manera, es posible determinar, por ejemplo, en cuál de los dsRNAs está codificada la RNA polimerasa viral.

Por otra parte, el estudio de sistemas *killer* en *P. rhodozyma* podría tener interesantes aplicaciones en la industria. Por ejemplo, algunas cepas de este microorganismo se utilizan para la producción de astaxantina en gran escala y en algunas ocasiones la producción del pigmento se ha visto muy

disminuída por la contaminación de los cultivos con cepas *killer* que producen menor cantidad o no producen el pigmento. Por lo tanto, sería muy importante intentar obtener una cepa *superkiller* sobreproductora del pigmento.

Finalmente, el estudio de los sistemas *killer* de *P. rhodozyma* podría constituir una alternativa médica para el tratamiento de pacientes infectados con levaduras patógenas sensibles a dicha toxina.

BIBLIOGRAFIA

- ADLER, J.P. (1979) Screening for viruses in human pathogenic fungi. In Fungal Viruses, H.P. Molitoris, M. Hollings and H.A. Wood (Eds.). Springer-Verlag, pp. 129-149.
- ADLER, J.P. AND DEL VECCHIO, V.G. (1979) Specialized assays for detection of fungal viruses and double-stranded RNA. In *Viruses and Plasmids in Fungi.*, P.A. Lemke (Ed.) Marcel Dekker Inc. New York and Basel, pp. 325-362.
- AN, G-H., SCHUMAN, D.B. AND JOHNSON, E.A. (1989) Isolation of *Phaffia rhodozyma* mutants with increased astaxanthin content. Appl. Environ. Microbiol. **55**: 116-124.
- ANDREWES, A.G., PHAFF, H.J. AND STARR, M.P. (1976) Carotenoids of *Phaffia rhodozyma*, a red-pigmented fermenting yeast. Phytochemistry **15**: 1003-1007.
- BALTIMORE, D. (1966) Purification and properties of poliovirus double-stranded ribonucleic acid. J. Mol. Biol. **18**: 421-428.

- BENIGNI, R., IGNAZZITO, G. AND VOLTERRA, L. (1977) Double-stranded ribonucleic acid in viruses of *Penicillium citrinum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **34**: 811-814.
- BERTRAND, H., CHAN, B.S.S. AND GRIFFITH, A.J.F. (1985) Insertion of a foreign nucleotide sequence into mitochondrial DNA causes senescence in *Neurospora intermedia*. *Cell* **41**: 877-884.
- BEVAN, E.A., HERRING, A.J. AND MITCHELL, D.J. (1973) Preliminary characterization of two species of dsRNA in yeast and their relationship to the "killer" character. *Nature* **245**: 81-86.
- BOSTIAN, K.A., ELLIOT, Q., BUSSEY, H., BURN, V., SMITH, A. AND TIPPER, D.J. (1984) Sequence of the preprotoxin dsRNA gene of type 1 killer yeast: multiple processing events produce a two component toxin. *Cell* **36**: 741-751.
- BOZARTH, R.F., WOOD, H.A. AND MANDELBROT, A. (1971) The *Penicillium stoloniferum* virus complex: Two similar double-stranded RNA virus-like particle in a single cell. *Virology* **45**: 516-523.
- BOZARTH, R.F. (1977) Biophysical and biochemical characterization of virus-like particles containing a high molecular weight ds-RNA from *Helminthosporium maydis*. *Virology* **80**: 149-157.

- BOZARTH, R.F. (1979) The physico-chemical properties of mycoviruses. In *Viruses and Plasmids in Fungi.*, P.A. Lemke (Ed.) Marcel Dekker Inc. New York and Basel, pp. 43-91.
- BRUENN, J. AND BRENNAN, V. (1980) Yeast viral double-stranded RNAs have heterogenous 3' termini. *Cell* **19**: 923-933.
- BRUENN, J.A., NEMEROFF, M.E., LEE, M., PIETRAS, D.F., DOWHANICK, J.J. AND FIELD, L.J. (1988) Structure, Transcription, and Replication of killer virus dsRNAs. In *Viruses of Fungi and Simple Eukaryotes*, Y. Koltin, M.J. Leibowitz (Eds.). Marcel Dekker, Inc. New York and Basel. pp. 117-132.
- BROWN, G.G. AND FINNEGAN, P.M. (1989) RNA plasmids. *Int. Rev. Cytol.* **117**: 1-56.
- BUCK, K.W. (1986) *Fungal Virology*. K.W. Buck (Ed.) CRC Press, Boca Raton, Florida.
- BUCK, K.W. AND GIRVAN, R.F. (1977) Comparison of the biophysical and biochemical properties of *Penicillium cyaneo-fulvum* virus and *Penicillium chrysogenum* virus. *J. Virol.* **34**: 145-154.
- BUCK, K.W. AND KEMPSON-JONES, G.F. (1973) Biophysical properties of *Penicillium stoloniferum* virus S. *J. Gen. Virol.* **18**: 223-235.

- BUCK, K.W. AND KEMPSON-JONES, G.F. (1974) Capsid polypeptides of two viruses isolated from *Penicillium stoloniferum*. J. Gen. Virol. **22**: 441-445.
- BUCK, K.W. AND RATTI, G. (1975) Biophysical and biochemical properties of two viruses isolated from *Aspergillus foetidus*. J. Gen. Virol. **27**: 211-224.
- BUSSEY, H. (1988) Proteases and the processing of precursors to secreted proteins in yeast. Yeast **4**: 17-26.
- BUSSEY, H., BOONE, C., ZHU, H., VERNET, T., WHITEWAY, M. AND THOMAS, D.Y. (1990) Genetic and molecular approaches to synthesis and action of the yeast killer toxin. Experientia **46**: 193-200.
- BUSSEY, H. (1991) K1 killer toxin: a pore-forming protein from yeast. Mol. Microbiol. **5**: 2339-2343.
- CARROLL, K. AND WICKNER, R.B. (1995) Translation and M₁ double-stranded RNA propagation: MAK18=RPL41B and cycloheximide curing. J. Bacteriol. **177**: 2887-2891.
- CASTILLO, A. Y CIFUENTES, V. (1993) RNA de doble hebra asociado a partículas tipo virus en *Phaffia rhodozyma*. Anal. Microbiol. **1**: 63-66.

- CASTILLO, A. AND CIFUENTES, V. (1994a) Presence of double-stranded RNA and virus-like particles in *Phaffia rhodozyma*. *Curr. Genet.* **26**: 364-368.
- CASTILLO, A. Y CIFUENTES, V. (1994b) Caracterización genética de un sistema *killer* en *Phaffia rhodozyma*. *Anal. Microbiol.* **2**: 40-42.
- COLLINS, R.A., STOHL, L.L., COLE, M.D. AND LAMBOWITZ, A.M. (1981) Characterization of a novel plasmid DNA found in mitochondria of *N. crassa*. *Cell* **24**: 443-448.
- COX., R.A., KANAGALINGAM, K. AND SHUTERLAND, E.S. (1970) Double-helical character of ribonucleic acid from virus-like particles found in *Penicillium chrysogenum*. *Biochem. J.* **120**: 549-558.
- DALTON, R.E., PODILA, G.K., FLURKEY, W.H. AND BOZARTH, R.F. (1985) In vitro translation of the major capsid polypeptide from *Ustilago maydis* virus strain P1. *Virus Res.* **3**: 153-163.
- DAY, P.R. AND DOODS, J.A. (1979) Viruses of plant pathogenic fungi. In *Viruses and Plasmids in Fungi.*, P.A. Lemke (Ed.) Marcel Dekker Inc. New York and Basel, pp 201-238.

- DEL POZO, L., ABARCA, D., CLAROS, M.G. AND JIMÉNEZ, A. (1991) Cycloheximide resistance as a yeast cloning marker. *Curr. Genet.* **19**: 353-358.
- DICKINSON, M.J. AND PRYOR, A. (1989) Isometric virus-like particles encapsidate the double-stranded RNA found in *Puccinia striiformis*, *Puccinia recondita*, and *Puccinia sorghi*. *Can. J. Bot.* **67**: 3420-3425.
- DIELEMAN-VAN ZAAYEN, A. (1967) Virus-like particles in a weed mould growing on mushroom trays. *Nature* **216**: 595-596.
- DIELEMAN-VAN ZAAYEN, A., IGESZ, O. AND FINCH, J.T. (1970) Intracellular appearance and some morphological features of virus-like particles in an *ascomycete* fungus. *Virology* **42**: 534-537.
- DMOCHOWSKA, A., DIGNARD, D., HENNING, D., THOMAS, D.Y. AND BUSSEY, H. (1987) Yeast KEX1 gene encodes a putative protease with a carboxypeptidase B-like function involved in killer toxin and α -factor precursor processing. *Cell* **50**: 573-584.
- DOODS, J.A. (1980) Association of type 1 viral-like dsRNA with club-shaped particles in hypovirulent strains of *Endothia parasitica*. *Virology* **107**: 1-12.

- DODDS, J.A., MORRIS, T.J. AND JORDAN, R.L. (1984) Plant viral double-stranded RNA. *Annu. Rev. Phytopathol.* **22**: 151-168.
- EL-SHERBEINI, M., BEVAN, E.A. AND MITCHELL, D.J. (1983) Two biochemically and genetically different forms of L dsRNA of *Saccharomyces cerevisiae* exist: one form, L₂, is correlated with the [HOK] plasmid. *Curr. Genet.* **7**: 63-68.
- EL-SHERBEINI, M., TIPPER, D.J., MITCHELL, D.J. AND BOSTIAN, K.A. (1984) Virus-like particles capsid proteins encoded by different L double-stranded RNAs of *Saccharomyces cerevisiae*: their roles in maintenance of M double-stranded killer plasmids. *Mol. Cell. Biol.* **4**: 2818-2827.
- ESTEBAN, R. AND WICKNER, R.B. (1986) Three different M₁ RNA-containing virus like particle types in *Saccharomyces cerevisiae*: In vitro M₁-double-stranded RNA synthesis. *Mol. Cell. Biol.* **6**: 1552-1561.
- FIELD, L.J., BRUEN, J.A., CHANG, T-H., PINHASI, O. AND KOLTIN, Y. (1983) Two *Ustilago maydis* viral dsRNAs of different size code for the same product. *Nucleic Acids Res.* **11**: 2765-2778.
- FINK, G.R. AND STYLES, C.A. (1972) Curing of a killer factor in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **69**: 2846-2849.

- FINKLER, A., KOLTIN, Y., BARASH, Y., SNEH, B. AND POZNIAK, D. (1985) Isolation of a virus from virulent strains of *Rhizoctonia solani*. J. Gen. Virol. **66**: 1221-1232.
- FINKLER, A., BEN-ZVI, B-S., KOLTIN, Y. AND BARASH, I. (1988) Transcription and in vitro translation of the dsRNA virus isolated from *Rhizoctonia solani*. Virus Genes. **1,2**: 205-219.
- FLEGR, J. (1987) A rapid method for isolation of double stranded RNA. Prep. Biochem. **17**: 423-433.
- FRANKLIN, R.M. (1966) Purification and properties of the replicative intermediate of the RNA bacteriophage R17. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **55**: 1504-1511.
- FUJIMURA, T., ESTEBAN, R. AND WICKNER, R.B. (1986) In vitro L-A double-stranded RNA synthesis in virus-like particles from *Saccharomyces cerevisiae*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **83**: 4433-4437.
- FUJIMURA, T. AND WICKNER, R.B. (1987) L-A Double-stranded RNA virus-like particle replication cycle in *Saccharomyces cerevisiae*: particle maturation in vitro and effects of *mak10* and *pet18* mutations. Mol. Cell. Biol. **7**: 420-426.

- FULBRIGHT, D.W. (1984) Effect of eliminating dsRNA in hypovirulent *Endothia parasitica*. *Phytopathology* **74**: 722-724.
- FUTCHER, A.B. (1988) The 2 μ m circle plasmid of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **4**: 27-40.
- GHABRIAL, S.A. (1986) A transmissible disease of *Helminthosporium victoriae*-Evidence for a viral etiology. In *Fungal Virology*, K.W. Buck (Ed.). CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 163-176.
- GHABRIAL, S.A., BIB, J.A., PRICE, K.H., HAVENS, W.M. AND LESNAW, J.A. (1987) The capsid polypeptides of the 190S virus of *Helminthosporium victoriae*. *J. Gen. Virol.* **68**: 1791-1800.
- GOMATOS, P.J. AND TAMM, I. (1963) Base composition of the RNA of a reovirus variant. *Science*. **140**: 997-998.
- GOMORI, G. (1955) Preparation of buffers for use in enzyme studies. *Meth. Enzymol.* **1**: 138-146.
- HERRING, A.J. AND BEVAN, E.A. (1974) Virus-like particles associated with the double-stranded RNA species found in killer and sensitive strains of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Virol.* **22**: 387-394.

- HOPPER, J.E., BOSTIAN, K.A., KOWE, L.B. AND TIPPER, D.J. (1977) Translation of the L-species dsRNA genome of the killer-associated virus-like particles of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **252**: 9010-9017.
- KANDEL, J.S. (1988) Killer Systems and Pathogenic Yeast. In *Viruses of Fungi and Simple Eukaryotes*, Y. Koltin, M.J. Leibowitz (Eds.). Marcel Dekker, Inc. New York and Basel. pp. 243-263.
- KAZAMA, F.Y. (1979) Ultrastructural evidence for viruses in lower fungi. In *Viruses and Plasmids in Fungi*. P.A. Lemke (Ed.) Marcel Dekker Inc. New York and Basel, pp. 405-439.
- KOLTIN, Y. AND DAY, P.R. (1976) Inheritance of killer phenotypes and double-stranded RNA in *Ustilago maydis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **73**: 594-598.
- KOLTIN, Y. (1986a) The killer systems of *Ustilago maydis*. In *Fungal Virology*, K.W. Buck (Ed.). CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 109-141.
- KOLTIN, Y. (1986b) *Ustilago maydis* virus-encoded killer system. In *Extrachromosomal Elements in Lower Eukaryotes*, R.B. Wickner, A. Hinnebusch, A.M. Lambowitz, I.C. Gunsalus and A. Hollaender (Eds.). Plenum Press, New York, pp. 239-257.

KOLTIN, Y. (1988) The killer system of *Ustilago maydis*: Secreted polypeptides encoded by viruses. In *Viruses of Fungi and Simple Eukaryotes*, Y. Koltin, M.J. Leibowitz (Eds.). Marcel Dekker, Inc. New York and Basel. pp. 209-242.

KOLTIN, Y. AND LEIBOWITZ, M. (1988) *Viruses of Fungi and Simple Eukaryotes*. Marcel Dekker, Inc. New York.

KREGER-VAN RIJ, N.J.W. AND VEENHUIS, M. (1971) A comparative study of the cell wall structure of basidiomycetous and related yeasts. *J. Gen. Microbiol.* **68**: 87-95.

KUNTZEL, H., BARATH, Z., ALI, I., KIND, J. AND ALTHAUS, H. (1973) Virus-like particles in an extranuclear mutant of *Neurospora crassa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **70**: 1574-1578.

LAEMMLI, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.

LEMKE, P.A. (1979) *Viruses and Plasmids in Fungi*. Marcel Dekker, Inc. New York.

- LIGON, J., BOLEN, P., HILL, D., BOTHAST, R. AND KURTZMANN, C. (1989) Physical and biological characterization of linear DNA plasmid of the yeast *Pichia inositovora*. *Plasmid* **21**: 185-194.
- MARINO, R., SAKSENA, K.N., SCHULER, M., MAYFIELD, J.E. AND LEMKE, P.A. (1976) Double-stranded ribonucleic acid in *Agaricus bisporus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **31**: 433-438.
- MEINHARDT, F., KEMPKEN, F., KÄMPER, J. AND ESSER, K. (1990) Linear plasmids among eukaryotes: fundamentals and applications. *Curr. Genet.* **17**: 89-95.
- METTIRI, P.O. AND ZACHARIAH, K. (1972) Viruslike particles and inclusion bodies in *Penicillus* cells of a mutant of *Penicillium*. *J. Ultrastruct. Res.* **40**: 272-283.
- MILLER, M.W., YONEYAMA, M. AND SONEDA, M. (1976) *Phaffia*, a new yeast genus in the *Deuteromycotina* (*Blastomycetes*). *Int. J. Syst. Bacteriol.* **26**: 286-291.
- MIZUNO, K., NAKAMURA, T., OSHIMA, T., TANAKA, S. AND MATSUO, H. (1988) Yeast KEX2 gene encodes an endopeptidase homologous to subtilisin-like serine proteases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **156**: 246-254.

- MOFFIT, E.M. AND LISTER, R.M. (1973) Detection of mycoviruses using antiserum specific for dsRNA. *Virology*. **52**: 301-304.
- MUTHUKRISHNAN, S. AND SHATKIN, A.J. (1975) Reovirus genome RNA segments: Resistance to S1 nuclease. *Virology* **64**: 96-105.
- NEWMAN, A.M. AND McLAUGHKIN, C.S. (1986) Sequential replication of L dsRNA in *Saccharomyces cerevisiae*. In *Extrachromosomal Elements in Lower Eukaryotes*, R.B. Wickner, A. Hinnebush, A.M. Lambowitz, I.C. Gunsalus and A. Hollaender (Eds.). Plenum Press, New York, pp. 173-187.
- NUSS, D.L. (1987) Surprising structural properties of genetic elements associated with biological control of chestnut blight. *BioEssays* **6**: 182-183.
- PEERY, T., SHABAT-BRAND, T., STEINLAUF, R., KOLTIN, Y. AND BRUENN, J. (1987) Virus encoded toxin of *Ustilago maydis*: Two polypeptides are essential for activity. *Mol. Cell. Biol.* **7**: 470-477.
- PETROVIC, S.L., SUMONJA, B.D. AND VASILJEVIC, R.B. (1974) Fractionation of nucleic acids from *Penicillium chrysogenum* and associated ribonucleic acid viruses by selective exclusion and retention in agarose gels. *Biochem. J.* **139**: 157-162.

- PODILA, G.K., FLURKEY, W.H. AND BOZARTH, R.F. (1987) Identification and Comparison of viral genes coding for capsid proteins of *Ustilago maydis* virus. J. Gen. Virol. **68**: 2741-2750.
- PRYOR, A. AND BOELEN, M.G. (1987) A double-stranded RNA mycovirus from the maize rust *Puccinia sorghi*. Can. J. Bot. **65**: 2380-2383.
- RADLER, F., HERZBERGER, S., SCHÖNIG, I. AND SCHWARZ, P. (1993) Investigation of a killer strain of *Zygosaccharomyces bailii*. J. Gen. Microbiol. **139**: 495-500.
- REILLY, J.F., BRUEN, J. AND HELD, W. (1984) The capsid polypeptides of yeast viruses. Biochem. Biophys. Res. Comm. **121**: 619-625.
- REYNOLDS, E.S. (1963) The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. J. Cell. Biol. **17**: 208-212.
- ROMANOS, M.A., BUCK, K.W. AND RAWLINSON, C.J. (1981) A satellite double-stranded RNA in a virus from *Gaeumannomyces graminis*. J. Gen. Virol. **57**: 375.
- ROOS, U.-P., KHANDJIAN, E.W. AND TURIAN, G. (1976) RNA virus in *Allomyces arbuscula*: Ultrastructural localization during the life-cycle. J. Gen. Microbiol. **95**: 87-95.

- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F. AND MANIATIS, T. (1989) *Molecular Cloning- A Laboratory Manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- SCHMITT, M.J. AND NEUHAUSEN, F. (1994) Killer toxin-secreting double-stranded RNA mycoviruses in the yeasts *Hanseniaspora uvarum* and *Zygosaccharomyces bailii*. *J. Virol.* **68**: 1765-1772.
- SEROUSSI, E., PEERY, T., GINZBERG, I. AND KOLTIN, Y. (1989) Detection of killer-independent dsRNA plasmids in *Ustilago maydis* by a simple and rapid method of extraction of dsRNA. *Plasmid* **21**: 216-225.
- SHERMAN, F. (1991) Getting started with yeast. *Meth. Enzymol.* **194**: 3-21.
- SKIPPER, N., THOMAS, D.Y. AND LAU, P.C.K. (1984) Cloning and sequencing of the preprotoxin-coding region of the M1-dsRNA. *EMBO J.* **3**: 107-111.
- SOMMER, S.S. AND WICKNER, R.B. (1982) Yeast L dsRNA consists of at least three distinct RNAs; evidence that non-Mendelian genes [HOK], [NEX], and [EXL] are on one of these dsRNAs. *Cell* **31**: 429-441.
- STARK, M.J.R., BOYD, A., MILEHAM, A.J. AND ROMANOS, M.A. (1990) The plasmid encoded killer system of *Kluyveromyces lactis*: A review. *Yeast* **6**: 1-29.

- STOHL, L.L., COLLINS, R.A., COLE, M.D. AND LAMBOWITZ, A.M. (1982) Characterization of two new plasmid DNAs found in mitochondria of wild-type *Neurospora intermedia* strains. *Nucleic Acids Res.* **10**: 1439-1444.
- TAO, J., GINSBERG, I., BANERJEE, N., HELD, W., KOLTIN, Y. AND BRUENN, J.A. (1990) *Ustilago maydis* KP6 killer toxin: structure, expression in *Saccharomyces cerevisiae*, and relationship to other cellular toxins. *Mol. Cell. Biol.* **10**: 1373-1381.
- TAVANTZIS, S.M. AND BANDY, B.P. (1988) Properties of a mycovirus from *Rhizoctonia solani* and its virion-associated RNA polymerase. *J. Gen. Virol.* **69**: 1465-1477.
- TIPPER, D.J. AND BOSTIAN, K.A. (1984) Double-stranded ribonucleic acid killer system in yeasts. *Microbiol. Rev.* **48**: 125-156.
- TIPPER, D.J. AND SCHMITT, M.J. (1991) Yeast dsRNA viruses replication and killer phenotypes. *Mol. Microbiol.* **5**: 2331-2338.
- TRÉTON, B., LEDALL, M-T. AND HESLOT, H. (1986) *In vitro* RNA synthesis by viruses isolated from the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Biochimie* **68**: 991-999.

- TRÉTON, B.Y., LE DALL, M.-T. AND HESLOT, H. (1987) UV-induced curing of the double-stranded RNA virus of the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Curr. Genet.* **12**: 37-39.
- USHIYAMA, R., NAKAI, Y. AND IKEGAMI, M. (1977) Evidence for double-stranded RNA from polyhedral virus-like particles in *Lentinus edodes*. *Virology.* **77**: 880-883.
- USHIYAMA, R. AND NAKAI, Y. (1980) Intracellular virus-like particles in *Lentinus edodes*. *J. Gen. Virol.* **46**: 507-509.
- USHIYAMA, R. AND NAKAI, Y. (1982) Ultrastructural features of fungal virus-like particles from *Lentinus edodes*. *Virology* **123**: 93-101.
- VALVERDE, R.A. (1990) Analysis of double-stranded RNA for plant virus diagnosis. *Plant Dis.* **74**: 255-258.
- VAN ALFEN, N.K. (1986) Hypovirulence of *Endothia* (*Cryphonectria*) *parasitica* and *Rhizoctonia solani*. In *Fungal Virology*, K.W. Buck (Ed.). CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 143-162.
- VAN ALFEN, N.K. (1988) Viruses of *Endothia parasitica*. In *Viruses of Fungi and Simple Eukaryotes*, Y. Koltin, M.J. Leibowitz (Eds.). Marcel Dekker, Inc. New York and Basel. pp. 371-386.

- VERNON, S.K., LAWRENCE, W.C., COHEN, G.H., DURSO, M. AND RUBIN, B.A. (1976) Morphological components of herpesvirus. II. Preservation of virus during negative staining procedures. *J. Gen. Virol.* **31**: 183-191.
- VODKIN, M., KATTERMAN, R. AND FINK, G.R. (1974) Yeast killer mutants with altered double-stranded RNA. *J. Bacteriol.* **117**: 681-686.
- VOLKOFF, O. AND WALTERS, T. (1970) Virus-like particles in abnormal cells of *Saccharomyces carlsbergensis*. *Can. J. Genet. Cytol.* **12**: 621-626.
- WEBER, H. (1979) Ultrastructural evidence for viruses in *Ascomycetes* and *fungi imperfecti*. In *Viruses and Plasmids in Fungi*. P.A. Lemke (Ed.) Marcel Dekker Inc. New York and Basel, pp. 363-404.
- WELSH, J.D., LEIBOWITZ, M.J. AND WICKNER, R.B. (1980) Virion DNA-independent RNA polymerase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* **8**: 2349-2362.
- WICKNER, R.B. (1974) "Killer character" of *Saccharomyces cerevisiae*: Curing by growth at elevated temperature. *J. Bacteriol.* **117**: 1356-1357.
- WICKNER, R.B., HINNEBUSCH, A., LAMBOWITZ, A.M., GUNSALUS, I.C. AND HOLLAENDER, A. (1986) *Extrachromosomal elements in lower eukaryotes*. Plenum Press, New York.

WICKNER, R.B. (1989) Yeast virology. *FASEB J.* **3**: 2257-2265.

WICKNER, R.B. (1993) Host control of yeast dsRNA virus propagation and expression. *Trends Microbiol.* **1**: 294-299.

WOOD, H.A. AND BOZARTH, R.F. (1972) Properties of viruslike particles of *Penicillium chrysogenum*: One double-stranded RNA molecule per particle. *Virology* **47**: 604-609.

WOOD, H.A. (1973) Viruses with double-stranded RNA genomes. *J. Gen. Virol.* **20**: 61-85.

WORSHAM, P.L. AND BOLEN, P.L. (1990) Killer toxin production in *Pichia acacie* is associated with linear DNA plasmids. *Curr. Genet.* **18**: 77-80.

YAMASHITA, S., DOI, Y. AND YORA, K. (1973) Intracellular appearance of *Penicillium chrysogenum* virus. *Virology* **55**: 445-452.

YOUNG, T.W. (1987) Killer Yeasts. In *The Yeasts and the Environment*, A.H. Rose, J.S. Harrison (Eds.). Academic Press, New York. pp. 131-164.

ZELIKOVITCH, N., EYAL, Z., BEN-ZVI, B. AND KOLTIN, Y. (1990) Double-stranded RNA mycoviruses in *Septoria tritici*. *Mycol. Res.* **94**: 590-594.

ZHU, H., BUSSEY, H., THOMAS, D.Y., GAGNON, J. AND BELL, A.W. (1987)
Determination of the carboxyl termini of the α and β subunits of yeast K1
killer toxin. *J. Biol. Chem.* **262**: 10728-10732.