



**CARACTERIZACIÓN DE ELEMENTOS GENÉTICOS
EXTRACROMOSÓMICOS EN *Xanthophyllomyces
dendrorhous* Y SU RELACIÓN CON LA ACTIVIDAD
MICOCIDA**

Tesis

Entregada A La

Universidad De Chile

En Cumplimiento Parcial De Los Requisitos

Para Optar Al Grado De

Magíster en Ciencias con Mención en Microbiología

Facultad De Ciencias

Por

Oriana Isabel Flores Díaz

Diciembre, 2011

Santiago-Chile

Director de Tesis: Dr. Marcelo Baeza Cancino

Co-director: Dr. Víctor Cifuentes Guzmán

UCH-FC
MAG - Ciencias Microb.

F634

C. 1



FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACION

TESIS DE MAGISTER

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

Oriana Isabel Flores Díaz

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Magister en Ciencias con mención en Microbiología, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 25 de Octubre del 2011.

Director de Tesis:
Dr. Marcelo Baeza

A handwritten signature in blue ink, appearing to be "Marcelo Baeza", written over a horizontal dotted line.

Co-Director de Tesis:
Dr. Víctor Cifuentes

A handwritten signature in green ink, appearing to be "Víctor Cifuentes", written over a horizontal dotted line.

Comisión de Evaluación de la Tesis

Dr. Nicolás Giulliani

A handwritten signature in purple ink, appearing to be "Nicolás Giulliani", written over a horizontal dotted line.

Dr. Claudio Martínez

A handwritten signature in black ink, appearing to be "Claudio Martínez", written over a horizontal dotted line.



A mis padres, Luis e Isabel



Nací un 9 de enero del 1984 en Arica, lugar donde viví con mi familia hasta que complete mi enseñanza media. Migré a Santiago en el 2002, para ingresar al Programa Académico de Bachillerato de la Universidad de Chile, lo que me permitió comenzar mi formación académica y conocer a mis grandes amigos. En el 2004 ingresé a la carrera de Ingeniería en Biotecnología Molecular, donde adquirí los conocimientos iniciales que me permitieron desarrollar la tesis de pregrado, mi primer trabajo científico, en el 2008. Desde entonces, decidí seguir “jugando” a ser científico entrando al magister y continuar la formación con el doctorado.



AGRADECIMIENTOS

A mis padres Isabel y Luis por apoyarme incondicionalmente desde siempre y sobre todo durante estos años que vivo en Santiago...!!! Gracias por cuidarme, quererme y por creer siempre en mí!!!. A mi prima Solange, por su cariño y preocupación. A mi tutor Dr. Marcelo Baeza por su gran paciencia y críticas durante el desarrollo de esta tesis, además de su apoyo y amistad que me han ayudado a continuar muchas veces. Al Dr. Víctor Cifuentes por su constante preocupación y por apoyarme en todos los nuevos caminos que he tomado. A mis compañeritos del grupo "Killer": Mario, Juan Manuel, Pablo por su alegría durante las jornadas de trabajo y durante "los eventos extra-académicos". A los que forman o formaron parte del Laboratorio de Genética, especialmente a: Rafa, Salvador, Jenny, Carla, Andrés, Dony, Pilar, Iris, Gabi, Sole, por su amistad, compañerismo y ayuda. A mis grandes amigos...de los comienzos de la U: Felipe, Claudia, Alejandra, Nelly...y a los que conocí después: Fernanda, Carolina, Javiera, Matías, Jorge, Nelson, el Club de las "LPs"...!!! Gracias a todos por su amistad y apoyo!!!, y por todos esos buenos momentos que pasamos. Todos ustedes me han acompañado durante estos años y me han ayudado a ser una mejor profesional, y sobre todo ser mejor persona.

ÍNDICE

Índice.....	iv
Índice de figuras.....	v
Índice de Tablas.....	vii
Abreviaturas.....	viii
Resumen.....	ix
Abstract.....	xi
1. Introducción.....	1
1.1. Plasmidios lineales de dsDNA.....	1
1.2. Virus de dsRNA.....	3
1.3. Curación de EGEs.....	6
1.4. EGEs de <i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i>	7
Hipótesis.....	10
Objetivos.....	11
2. Materiales y métodos.....	12
2.1 Materiales.....	12
2.2 Métodos.....	15
3. Resultados.....	25
4. Discusión.....	47
5. Conclusiones.....	57
6. Bibliografía.....	58
7. Anexos.....	66

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Organización genómica de las moléculas de dsRNA presente en <i>S. cerevisiae</i>	5
Figura 2. DNA total de las cepas UCD 67-210 y CBS 6938 de <i>X. dendrorhous</i> obtenido por dos métodos de lisis celular.....	26
Figura 3. Perfiles de los EGEs tipo dsDNA y dsRNA en las cepas de <i>X. dendrorhous</i>	28
Figura 4. Contenido de dsRNAs de la cepa 385 (S2-40) durante la curva de crecimiento.....	33
Figura 5. Efecto inhibitorio de la anisomicina sobre el crecimiento de la cepa 385 (S2-40) de <i>X. dendrorhous</i>	37
Figura 6. Efecto de la temperatura sobre la viabilidad celular de la cepa 385(S2-40) y análisis del contenido de dsRNA de las colonias sometidas a estrés térmico.....	39
Figura 7. Amplificación por PCR desde los dsDNAs de las cepas de <i>X. dendrorhous</i> con partidores específicos para pXd1-6938 y pDK1.....	43

Figura 8. Amplificación por PCR del gen *asp* a partir del DNA genómico de las cepas de *X. dendrorhous*.....45

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Cepas de <i>X. dendrorhous</i> utilizadas en este estudio.....	13
Tabla 2. Partidores utilizados.....	14
Tabla 3. EGEs tipo dsDNAs presentes en las cepas de <i>X. dendrorhous</i>	31

ABREVIATURAS

CML	Corrimiento del marco de lectura
EGEs	Elementos genéticos extracromosómicos
dsDNA	DNA de doble hebra
dsRNA	RNA de doble hebra
EDTA	ácido etilendiaminotetracético
gDNA	DNA genómico
ICTV	Comité Internacional de Taxonomía de Virus.
ORF	Marco abierto de lectura
RDRP	RNA polimerasa dependiente de RNA
SDS	dodecil sulfato de sodio
ScV	virus de dsRNA de <i>S. cerevisiae</i>
ssRNA	DNA de hebra simple
TAE	amortiguador tris-acetato-EDTA
TE	amortiguador tris-EDTA
Tris	tris(hidroximetil)aminometano
UV	luz ultravioleta
VLP	partícula tipo virus
YM	medio de cultivo completo

RESUMEN

Xanthophyllomyces dendrorhous es una levadura basidiomicete pigmentada que ha sido aislada principalmente desde regiones frías de Japon y Rusia. En varias de sus cepas se ha descrito la existencia de Elementos genéticos extracromosómicos (EGEs) del tipo RNA de doble hebra (dsRNA) y plasmidios lineales de DNA de doble hebra. En hongos filamentosos y levaduras Generalmente estos elementos son crípticos en función y sólo en algunos casos han sido asociados con algún fenotipo en su hospedero como la actividad antifúngica. Recientemente, por primera vez se determinó la existencia de esta actividad en algunas cepa de la *X. dendrorhous* y se identificó una proteasa aspártica como posible micotoxina, sin embargo, las bases genéticas de este fenotipo aun son desconocidas. En trabajos previos, desde la cepa UCD 67-385, que posee 4 dsRNAs - L (5 kb), M (3,7 kb), S1 (0,9 kb) y S2 (0,6 kb) -- se obtuvo una cepa 385(S2-40) que carecen de S2 dsRNA y que mantienen la actividad antifúngica, sugiriendo que este elemento no es el determinante genético del fenotipo. Considerando estos antecedentes, el objetivo de este trabajo fue caracterizar los EGEs de diferentes cepas de *X. dendrorhous* y analizar su posible relación con la actividad antifúngica observada.

Inicialmente, se determinaron los perfiles de EGEs de distintas cepas de *X. dendrorhous* optimizando un método de extracción y análisis de dsDNAs. En el perfil de dsRNAs, se encontró un polimorfismo en los dsRNAs presentes, el cual estaría relacionado con el origen geográfico donde fue aislada cada cepa. Estos resultados sugieren que los dsRNAs no son las bases genéticas responsables de la actividad antifúngica y su función en el hospedero aún es desconocida. Se analizó la estabilidad del perfil de dsRNAs en la cepa curada durante la curva de crecimiento debido ya que

en otras levaduras se ha descrito la aparición de nuevos dsRNAs que provienen del procesamiento de los dsRNAs de mayor tamaño. La ausencia permanente de la molécula S2, sugiere que esta corresponde a un dsRNA satélite. Para analizar la funcionalidad de L, M y S1, se realizaron experimentos de curación sobre la cepa 385(S2-40) utilizando distintos métodos que en otras levaduras han permitido la eliminación completa de los dsRNAs. A pesar de los efectos inhibitorios de los tratamientos aplicados sobre el crecimiento de la cepa, no se obtuvieron clones que carezcan de alguno o todos los dsRNAs. Continuando con la caracterización de EGEs, en los perfiles de dsDNAs obtenidos para las distintas cepas, se observó una alta variabilidad en el número (2 a 7) y tamaño (1,2 a 7,5 kb) de los dsDNAs. Fue posible clonar y secuenciar el plasmidio de menor tamaño de la cepa CBS 6938 de *X. dendrorhous*. En el análisis bioinformático de la secuencia nucleotídica y traducida, no se encontraron similitudes con la base de datos del NCBI Sólo se logró identificar regiones de repetidos invertidos en los extremos de la secuencia. Estas regiones fueron previamente descritas para otro plasmidio lineal de *X. dendrorhous* pDK1, y que participarían en la estabilidad de estas moléculas. Considerando que se identificó una proteasa aspártica como la potencial toxina, se diseñaron partidores específicos para el gen *asp* para las reacciones de PCR usando como molde el DNA genómico purificado de las distintas cepas de *X. dendrorhous*. Los resultados obtenidos sugieren que la actividad estaría codificada en el cromosoma celular. Todas las cepas de poseen EGEs del tipo dsDNAs y/o dsRNAs, los cuales forman perfiles altamente complejos. Esta alta variabilidad de EGEs intra-especie es interesante desde el punto de vista genético que hace a esta levadura un buen modelo para estudiar la diversidad de la información genética a nivel de los micovirus y plasmidios, fenómeno poco comprendido especialmente en levaduras basidiomicetes.

ABSTRACT

Xanthophyllomyces dendrorhous is a basidiomycetous pigmented yeast mainly isolated from cold regions of Japan and Russia. The existence of Extrachromosomal Genetics Elements (EGEs), that can be double-stranded RNA (dsRNA) and linear plasmids of double-stranded DNA (dsDNA), have been reported in several strains of this yeast. Usually these genetic elements are cryptic in function in yeast and filamentous fungi, and only in few cases have been associated to a phenotype in the host such as the antifungal activity. Recently, we determined for first time that some strains of *X. dendrorhous* display this phenotype and aspartic protease was identified as a potential toxin, however the genetic bases are still unknown. In previous works with *X. dendrorhous* UCD 67-385, strain that has 4 dsRNAs - L1 (5 kb), L2 (3,7 kb), S1 (0,9 kb) y S2 (0,6 kb) - we obtained a strain lacking the S2 dsRNA 385(S2-40). This cured strain maintains the antifungal activity, suggesting that S2-dsRNA is not the genetic determinant of this phenotype. Considering these antecedents, the objective of this work was to characterize the EGEs in different strains of *X. dendrorhous* and *P. rhodozyma*, and to analyze their possible relationship to the observed antifungal activity.

Initially, the EGEs profiles of numerous strains of *X. dendrorhous* and *P. rhodozyma* were determined and a method for the extraction and analysis of the dsDNA plasmids was optimized. In the profile of dsRNAs, we found a polymorphism in these molecules might be related to the geographical origin of each strain. From their comparison it was concluded that dsRNA is not responsible for the antifungal activity; therefore its possible function is still unknown. We analyzed the stability of the dsRNAs

profiles of the cured strain along to growth curve, because in other yeasts it have been reported the emergence of new dsRNA elements at later phases of growth, from the processing of the larger dsRNAs. The S2 absence results obtained suggest that corresponds to satellite dsRNA. To analyze the functionality of L1, L2 and S1, curing experiments were performed on strain 385 (S2)-40 using several methods that in other yeasts elicited the complete elimination of dsRNAs. In spite of the inhibitory effects the treatment applied on the yeast growth, no clones lacking some or all of the dsRNAs were obtained. Following with the characterization of EGEs, the dsDNA profiles observed in different strains are highly variable in number (2 to 7) and size (1.2 to 7,5 kb) It was possible to clone and to sequence the smaller plasmid of the strain *X. dendrorhous* CBS 6938. In the bioinformatics analyses of the nucleotide or translated sequence, no similarities to NCBI database were found. Only inverted repeat regions characteristic were found in the ends of plasmid. This region was described for other *X. dendrorhous* linear plasmid pDK1, suggesting would be important for stability of these molecules. According to an aspartic protease identified as a potential toxin, specific primers for the Asp gene were designed and used in the PCR assays using as template genomic DNA purified from different strains of *X. dendrorhous*. The results obtained strongly suggest that the activity is encoded in the cellular chromosome.

All strains of *X. dendrorhous* have EGEs, which can be of dsRNAs and/or dsDNAs, and display highly complex profiles. This high intra-specie variability od EGEs is interesting from a genetic standpoint, making these yeasts as good models for studying the diversity of genetic information at plasmids and mycovirus level, a phenomenon poorly understood especially in basidiomycetous yeast.

1. INTRODUCCION

En hongos filamentosos y levaduras los Elementos Genéticos Extracromosómicos (EGEs) corresponden principalmente a plasmidios lineales de DNA de doble hebra (dsDNA) y moléculas de RNA de doble hebra (dsRNA) encapsidadas en partículas tipo virus (VLPs, del inglés Virus-Like Particles). Aunque se caracterizan por ser funcionalmente crípticos, sólo en algunos casos se han logrado asociar con algún efecto detectable en el hospedero (Magliani y cols., 1997; Schmitt y Breinig, 2002). Las investigaciones realizadas sobre los EGEs han permitido incrementar el conocimiento biológico de los organismos que los portan al determinar los mecanismos celulares involucrados en la mantención y propagación de estos elementos (Magliani y cols., 1997). Además, los fenotipos asociados a EGEs han sido utilizados para el mejoramiento de cepas industriales, identificación de agentes antifúngicos, el biocontrol de fitopatógenos (Nuss, 1996; 2005), entre otras aplicaciones. Estas características han motivado a analizar los EGEs en otras especies de levaduras que no han sido mayormente estudiadas y en las que se desconocen la funcionalidad de estos elementos en el hospedero.

1.1. Plasmidios lineales de dsDNAs.

La presencia de moléculas de DNA se describió por primera vez en la levadura *Kluyveromyces lactis* por Gunge y cols. (1981). Las moléculas se caracterizaban por presentar una configuración lineal y por su resistencia a la acción de la enzima RNAsa A. Aunque la localización de los dsDNAs es principalmente citoplasmática, se han encontrado plasmidios aislados desde fracciones mitocondriales en las levaduras *Hansenula mkarii* y *Pleurotus ostreatus*

(Wesolowsky y Fukuhara, 1981; Cong y cols., 1994; Gunge y cols., 1995). A pesar de que a nivel de secuencias son altamente variables, los plasmidios poseen algunas características comunes, como las secuencias de repetidos invertidos terminales (IR) y la presencia de proteínas unidas a los extremos 5', los que participarían en la mantención en su hospedero. Además en algunos plasmidios se han encontrado los marcos de lectura abiertos (ORFs, del inglés Open Reading Frames) de la RNA y DNA polimerasa que estarían implicadas en la replicación. Aunque este proceso para los plasmidios de dsDNAs no ha sido determinado, algunos investigadores sugieren que el mecanismo de replicación sería similar al descrito para los adenovirus, debido a las analogías estructurales entre estos elementos y el genoma viral (Meinhardt y cols., 1997).

En levaduras como *Pichia acaciae* y *K. lactis*, entre otras, los plasmidios se relacionan con la producción de toxinas o actividad antifúngica. El sistema de *K. lactis* es el mejor caracterizado y está compuesto por los plasmidios pGKL1 (8,9 kb), el cual codifica para una DNA polimerasa, las 3 subunidades de la toxina y la proteína de inmunidad a la misma; y el pGKL2 (13,5 kb) que codifica para la DNA polimerasa, RNA polimerasa y la helicasa, las que serían necesarias para mantener el sistema autónomamente (Gunge y cols., 1981; Meinhardt y cols., 1997; Fukuhara, 1995). Las regiones terminales de pGKL1 y pGKL2, poseen secuencias IR de 202 y 184 pb respectivamente, y proteínas unidas en sus extremos distintas para cada plasmidio (Stark y cols., 1986). La toxina es una proteína extracelular heterotrimérica llamada zimocina, capaz de degradar los tRNAs de la célula blanco, siendo la primera descrita que muestra esta acción (Jablonowski y Shaffrath, 2007). Otros fenotipos asociados a los plasmidios de dsDNAs, como la senescencia o la pérdida progresiva del potencial de crecimiento se ha observado en hongos filamentosos como *Neurospora* spp (Griffiths, 1992). Este envejecimiento es

provocado por la inserción del plasmidio en el gen *m1* que codifica para un rRNA localizado en el genoma mitocondrial, provocando deficiencias funcionales en los ribosomas mitocondriales y la posterior muerte celular (Mass, 2005). Mientras que en *Podospora anserina*, el plasmidio de integración está asociado a la longevidad o incremento en el tiempo de vida por un mecanismo que aún no ha sido determinado (Hermanns y cols., 1994; Mass, 2005).

1.2. Virus y elementos tipo dsRNA.

Los dsRNAs presentes en las levaduras están asociados a partículas tipo virus (VLPs) que se caracterizan por carecer de un ciclo infectivo extracelular, siendo transmitidos citoplasmáticamente durante la esporogénesis, división y fusión celular (Pfeiffer y cols., 1996; Schmitt y Breining, 2006). Existen ocho familias distintas de virus de dsRNA, entre las cuales los *Chrysoviridae*, *Reoviridae*, *Hypoviridae*, *Partitiviridae* y *Totiviridae*, se encuentran en los distintos micovirus que tienen como hospedero a los grupos taxonómicos del reino fungi y que son capaces de infectar persistentemente (Mertens, 2004). En algunos hongos filamentosos, los dsRNAs participan en la atenuación de la virulencia de algunas especies patógenas como *Cryphonectria parasitica*, *Rhizoctonia solani*, *Botrytis cinerea*, fenotipo llamado hipovirulencia (Castro y cols., 2003; Nuss, 2005). Por otra parte, en las levaduras los dsRNAs pueden codificar para las micotoxinas capaces de matar a otras levaduras sensibles. Estos micovirus se encuentran principalmente clasificados dentro de los *Totiviridae*, que se caracterizan por tener un genoma no segmentado y partículas icosaédricas de 40 nm diámetro (Ghabrial y Patterson, 1999; Mertens, 2004).

El sistema viral mayormente caracterizado es el de *S. cerevisiae*, que está constituido por una molécula de dsRNA de 4,6 kb (ScV-L o L-dsRNA), mientras que las cepas que poseen la actividad antifúngica portan además un dsRNAs de 1,6 - 1,8 kb (ScV-M o M-dsRNA). El genoma viral ScV-L contiene dos marcos de lectura abiertos (ORFs): el 5' que codifica para la proteína de la cápside (Gag), y el 3' que codifica para una RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRp, RNA dependent RNA polymerase) (Figura 1). Ambos ORFs presentan una sobreposición de 130 nucleótidos que a través de un evento de corrimiento del marco de lectura en menos una base (CML -1) permite la traducción del segundo ORF para generar la proteína de fusión Gag-Pol (Dinman, 1995). El genoma ScV-M sólo posee un ORF que codifica para una preprotoxina, un precursor de la toxina responsable de la actividad y que también participa en la inmunidad a la misma (Schmitt y Breinig, 2006).

La propagación viral se produce por un ciclo de replicación conservativa que es dependiente de la estequiometría de las proteínas virales Gag y Gag-Pol. La tasa de producción de la proteína de fusión es dependiente de la eficiencia del CML -1 durante la traducción, el que ocurre por el retroceso de la maquinaria en una base sobre la secuencia "resbaladiza" del RNA mensajero viral, la que es facilitada por una pausa inducida por una estructura de horquilla (RNA "pseudoknot") (Farabaugh, 1996). El exceso de Gag-Pol resulta en la formación de cápsides incompletas, mientras que una disminución en la proteína de fusión, las partículas no son formadas. En ambos casos se produce una baja gradual en los niveles de dsRNA hasta llegar a la pérdida de todos los genomas (Dinman y Wickner, 1992).

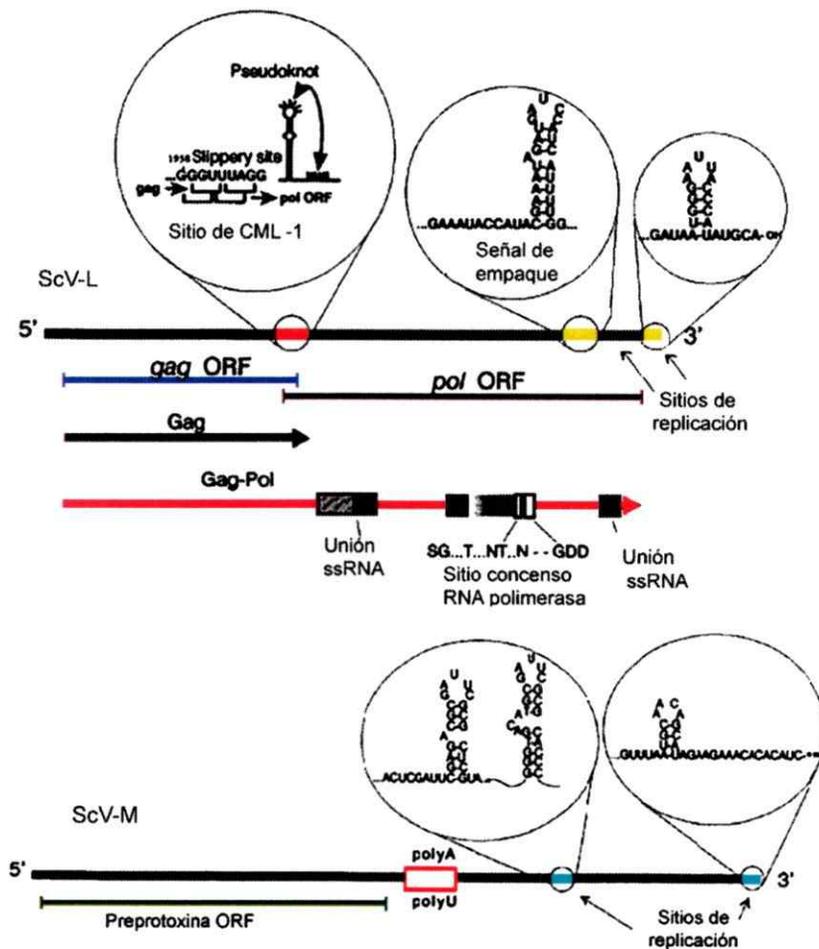


Figura 1. Organización genómica de las moléculas de dsRNA presente en *S. cerevisiae*. ScV-L, correspondiente al genoma viral, presenta dos ORFs sobrepuestos en 130 nucleótidos: el ORF 3' codifica para la proteína de la cápside Gag y el ORF 5' que codifica para la proteína de fusión Gag-Pol correspondiente a RPDR. ScV-M o satélite presenta un ORF que codifica para una preprotoxina. Se destacan secuencias de interés como sitios de replicación, señales de empaque y secuencias que participan en CML -1 y de unión a ssRNA presente en ScV-L (Adaptado desde Wickner, 1996).

Además de los micovirus, en *S. cerevisiae* se han descrito otros tipos de dsRNAs, como los T y W que no tienen relación con el ScV-L y que no se encuentran encapsidados en viriones (Wesolowski y Wickner, 1984). Estudios posteriores revelaron que estas son productos de otro virus de ssRNA de la familia de los *Narnaviridae*, generados durante la replicación y que su aparición es favorecida en ciertas condiciones de estrés (Fujimura y cols., 2005). Otros dsRNAs satélites y/o defectuosos pueden ser purificados junto con los genomas virales, los que incrementan la complejidad de los patrones de dsRNAs observados en su hospedero. En estos casos la caracterización molecular y funcional de los dsRNAs es requerida para determinar la funcionalidad y origen de estos elementos (Ghabrial, 1998).

1.3. Curación de los EGEs.

En los trabajos previos se ha determinado los efectos de los EGEs en sus hospederos mediante experimentos que permiten la eliminación o curación de estas moléculas. La incapacidad de mantener los EGEs puede resultar por mutaciones en los dsRNAs y dsDNAs o sobre los genes nucleares del hospedero que participan en su replicación y propagación. Estas pueden ser inducidas por agentes físicos como la radiación UV y la temperatura, que han sido efectivos en la eliminación de dsRNAs en *Yarrowia lipolytica* (Tréton y cols., 1987), *S. cerevisiae* (Wickner, 1974) y de dsDNAs en *Schwanniomyces occidentalis* (Chen y cols., 2000) y *K. lactis* (Gunge y cols., 1981). Los agentes químicos intercalantes de ácidos nucleicos como la naranja de acridina y el bromuro de etidio, también se han utilizado con éxito en la curación de EGEs en levaduras (Fink y Styles, 1972; Cansado y cols., 1989; Carroll y Wickner, 1995). Para el caso de los micovirus su propagación puede

inhibirse con drogas que interfieren en la síntesis de proteínas: la cicloheximida, que afecta la actividad de la subunidad ribosómica 60S bloqueando el paso de elongación, provoca una reducción en la traducción de ScV-L, lo que resulta en una pérdida selectiva del genoma satélite ScV-M (Carroll y Wickner, 1995). Antivirales inhibidores de la actividad peptidil-transferasa, como la anisomicina, afectan la eficiencia del CML -1, alterando la tasa de síntesis de la proteína Gag-Pol que provoca la eliminación completa del sistema viral en las células tratadas (Meskauskas y cols., 2003; Dinman y cols., 1997). La pérdida de los EGEs asociados a la actividad antifúngica, promueve la pérdida del fenotipo, obteniendo cepas "curadas" no productoras de micotoxinas y que muchas veces son sensibles a éstas (Wickner, 1974).

1.4. EGEs de *Xanthophyllomyces dendrorhous*.

X. dendrorhous es una levadura basidiomicete que posee importancia biotecnológica debido a su capacidad de sintetizar astaxantina, un pigmento de alto valor comercial utilizado en la industria farmacéutica y salmonera (Jhonson, 2003). Inicialmente, aislados de la levadura se obtuvieron desde exudados de árboles de regiones frías de Japón, Rusia, Alaska y Finlandia, los que presentan diferencias en el patrón de marcadores genéticos y en parámetros fisiológicos (Miller y cols., 1976; Golubev, 1995). Para el caso de la cepa UCD 67-210, esta es la única que se ha definido como la cepa tipo de *Phaffia rhodozyma*, en la que sólo se ha identificado la fase asexual de reproducción, siendo catalogada como el estado imperfecto de *X.dendrorhous* (Fell y Blatt, 1999).

En trabajos previos se han descrito plasmidios lineales de dsDNA en algunas de las cepas de *X. dendrorhous* (Martínez y cols., 1994; Pfeiffer y cols., 1996; Kucsera y cols., 2000; Santopietro y Kula, 2000). Actualmente, sólo se conoce la secuencia de uno de estos plasmidios llamado pDK1 de 4,7 kb, en el cual no se logró determinar la presencia de ORFs funcionales (Santopietro y Kula, 2001). Por otro lado, en la cepa UCD 67-385 de *X. dendrorhous* se han descrito distintos dsRNAs, los que son nombrados según su tamaño como L (4,8 kb), M (3,6 kb), S1 (0,9 kb) y S2 (0,8 kb) (Castillo y Cifuentes, 1994; Pfeiffer y cols., 1996). En trabajos realizados en nuestro laboratorio, se ha logrado clonar y secuenciar parcialmente el L-dsRNA. En la secuencia traducida de uno de los ORFs identificados muestra un alto grado de identidad con secuencias de las RNA polimerasas de micovirus *totiviridae*, lo que sugiere que éste dsRNA correspondería a un genoma viral (Sanhueza, 2008). Con el fin de determinar la funcionalidad de estos genomas, se han realizado experimentos de curación sobre la cepa UCD 67-385 (Castillo y Cifuentes, 1994; Flores, 2008). Las cepas curadas obtenidas con anisomicina, 385(S2-40) y 385(S2-42), carecen de la molécula S2 pero mantienen la actividad antifúngica sobre *Rhodotorula sloffiae*, sugiriendo que esta molécula no participa en el fenotipo (Flores, 2008). La funcionalidad de los genomas restantes de esta cepa (L, M y S1-dsRNAs) y su participación en algún fenotipo en el hospedero aún no ha sido determinada.

En *X. dendrorhous* se ha observado la existencia de actividad antifúngica sobre levaduras del género *Rhodotorula* y *Kloeckera* (Oviedo, 2008). En trabajos realizados en nuestro laboratorio y que han sido recientemente publicados (Baeza y cols., 2009), el análisis del contenido proteico extracelular y la cinética de producción de estas en varias cepas de *X. dendrorhous*, sugieren que la posible toxina responsable del fenotipo antifúngico es una proteína de 36 kDa que

correspondería a una proteasa aspártica (*asp*). Actualmente sólo se conoce la secuencia del cDNA de ésta proteína determinada en la cepa CBS 6938 por Bang y cols. (1999), sin embargo, la posible ubicación del gen *asp* en el genoma o EGEs de *X. dendrorhous* aún no ha sido identificada.

HIPOTESIS

En cepas de las levaduras *Xanthophyllomyces dendrorhous* existen elementos genéticos extracromosómicos variables en cuanto número y naturaleza. Alguno(s) de estos correspondería(n) al (a los) determinante(s) genético(s) de la actividad antifúngica observada en estas levaduras.

OBJETIVOS

Objetivo General

Caracterizar los elementos genéticos extracromosómicos de distintas cepas de *X. dendrorhous* y determinar su relación con la actividad antifúngica presente.

Objetivos Específicos

- Caracterizar los plasmidios de dsDNAs presentes en las cepas de *X.dendrorhous*.
- Curar los dsRNAs en la cepa 385(S2-40) y analizar el fenotipo de las colonias resultantes.
- Determinar las bases genéticas responsables de la actividad antifúngica.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Materiales

2.1.1. Células.

Las cepas de *X. dendrorhous* utilizadas están alistadas en la tabla 1. Para la clonación se utilizó la cepa DH5 α de *Escherichia coli*.

2.1.2. Ácidos nucleicos.

Como marcador de peso molecular se utilizó el marcador 1kb, el DNA del bacteriófago lamda digerido con la enzima de restricción *HindIII*, y el 100bp, todos adquiridos de New England Biolabs. Los partidores utilizados en las reacciones de PCR son indicados en la tabla 2.

2.1.3. Plasmidios

Para el clonamiento en la cepa DH5 α de *Escherichia coli* se utilizó el plasmidio pBluescript SK⁻ (pBS).

2.1.4. Enzimas.

Las enzimas DNasa I, RNasa A, Nucleasa S1 y Taq DNA Polimerasa, T4 DNA ligasa, DNA Polimerasa I fragmento Klenow y las endonucleasa de restricción *EcoRV* fueron adquiridas de las empresas Promega, New England BioLabs, Sigma y Gibco-BRL.

Tabla 1. Cepas de *X. dendrorhous* utilizadas en este estudio.

Cepa	Otros bancos	Origen
UCD 67-385	ATCC 24230 CBS 7919 VKM Y-2791	Honshu, Japón
UCD 67-210*	ATCC 24202 CBS 5905 VKM Y-2274	Honshu, Japón
CBS 6938	ATCC 74438 VKM Y-2793	Finlandia
VKM-Y 2266	UCD 76-18	Moscú, Rusia
VKM-Y 2786	CBS 7918	Moscú, Rusia
UCD 68-653.3	ATCC 24228 VKM Y-2814	Alaska, USA
UCD 67- 202	ATCC 24229 VKM Y-2788	Honshu, Japón
385(S2-40)	No disponible	Derivada desde la cepa UCD 67-385/ (Flores, 2008)

Las abreviaciones utilizadas para las colecciones de microorganismos: CBS, Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, Netherlands; ATCC, American Type Culture Collection, Manassas, USA; UCD, Phaff Yeast Culture Collection, Department of Food Science and Technology, University of California at Davis, Davis, USA; VKM, The All-Russian Collection of Microorganisms, Moscow, Russia.

* Cepa de *Phaffia rhodozyma*

Tabla 2. Partidores utilizados.

Nombre	Secuencia (5'→ 3')
C2F2	CTCGCAGTGAACAGAGGATA
C2F7	TCAGAGCGTCGGAAAGGACA
C2R7	AAAGTCCTCTGCGAGGGAGA
C2F50	CTCTTTCTACACCACTCAGAT
C2F5	TGTCTCGTCTACTCGACTCT
Asp F1	ACCGTCATCGCCATTCTTGC
Asp R1	CCAGTGGAGGTCAAGGTATAC
Asp F2	AGAAGGCCTACTGGACGATC
Asp R2	GAATCCGACTCTGGCGTTTC
M13 fw	GTA AACGACGGCCAGT
M13 rv	AACAGCTATGACCATG

2.1.5. Reactivos Químicos.

Los componentes de los medios de cultivo o reactivos químicos, se adquirieron de Sigma Chemical, Merk y Difco Laboratorios. El antibiótico Anisomicina fue adquirido de Sigma y la Higromicina de Invitrogen.

2.2. Métodos

2.2.1. Condiciones de cultivo.

X. dendrorhous

Para las cepas analizadas se utilizó el medio YM (0,3% de extracto de levadura, 0,3% de extracto de malta y 0,5% de peptona) suplementado con 2% glucosa. Para medios semi-sólidos se adicionó 1,5 % de agar microbiológico (BBL).

E. coli.

Se utilizó el medio Luria Bertani (LB) que contiene 1% de Triptona, 0,5% de extracto de levadura y 0,5% de NaCl. Para los medios sólidos se agregó 1,5% de Bacto-Agar. Para el reconocimiento de transformantes, al medio LB-agar, se le agregó 100 µg/ml de ampicilina y 75 µg/ml de X-Gal (Placas LB-amp-X Gal)

2.2.2. Extracción de Ácidos nucleicos totales.

Extracción mediante ruptura mecánica.

La metodología fue adaptada desde Castillo y Cifuentes (1994). A partir de 50 ml de un cultivo de *X. dendrorhous* crecido durante 3 días a 22°C, se tomaron alícuotas de 1 ml y se colectaron las células por centrifugación a 10.000 x g por 1 min. Se lavaron 2 veces con amortiguador TE (10 mM Tris-HCl, 25 mM EDTA, pH 8,0) y se resuspendieron en 400 µl de TE. La ruptura se realizó mediante agitación en vortex por 10 min usando 250 µl de microesferas de vidrio de 0,5 mm de diámetro. Posteriormente se adicionó un volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1), pH 8,0 y se agitó en vortex por 1 min. La fase acuosa se colectó en un tubo limpio y se realizó una extracción con un volumen de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1). Para precipitar los ácidos nucleicos se adicionó 2 volúmenes de etanol absoluto y se incubó a -20°C durante toda la noche. Finalmente se centrifugó a 15.000 x g durante 10 min y se resuspendió en 20 µl de agua libre de nucleasas.

Extracción mediante ruptura química.

La purificación se realizó desde esferoplastos obtenidos de acuerdo a Retamales y cols. (1998) y el aislamiento del DNA se realizó según la metodología adaptada desde Santopietro y Kula (2001). Desde un cultivo de 100 ml de *X. dendrorhous* crecido a 22°C hasta fase exponencial se cosecharon las células por centrifugación a 10.000 x g durante 10 min. Las células se lavaron una vez con 100

ml de KCl 0,8 M y se resuspendieron en 16 ml de KCl 0,8 M. Este volumen se fraccionó en 4 matraces con 4 ml cada uno y se adicionó "Lising enzyme" (Sigma) a una concentración final de 4 mg/ml, completando un volumen de 5 ml. Esta mezcla se incubó a 22°C con agitación suave durante 3 a 4 h. Los esferoplastos se cosecharon por centrifugación a 5000 x g por 10 min y se lavaron con KCl 0,8 M. Se resuspendieron en 5 ml de TE (50 mM Tris-HCl, 20 mM EDTA pH 8), con 1% de SDS y proteinasa K a una concentración final de 100 µg/ml. La solución se incubó a 65°C por 30 min, se adicionó 1,5 ml de acetato de potasio 3 M y se incubó en hielo durante 1 h. Posteriormente se centrifugó a 12000 x g por 10 min a 4°C y se recuperó el sobrenadante. Para precipitar los ácidos nucleicos se adicionó 1 volumen de isopropanol y se incubó a -20°C durante toda la noche. Finalmente se centrifugó a 15.000 x g durante 10 min a 4°C y el precipitado se lavó con 5 ml de etanol al 50% y se resuspendió en 1 ml de agua libre de nucleasas.

2.2.3. Extracción de RNA total.

La extracción por fenol ácido y ruptura mecánica se realizó de acuerdo a la metodología optimizada por Flores (2008). Desde 7 ml de un cultivo de *X. dendrorhous* crecido durante 3 días a 22°C, se colectaron las células por centrifugación a 10.000 x g por 1 min. Se lavaron 2 veces con buffer TE (10 mM Tris-HCl pH 8, 1mM EDTA) y se resuspendieron en 400 µl de TE. Se adicionó 250 µl de microesferas de vidrio de 0,5 mm de diámetro y un volumen de fenol a pH 4,0. La ruptura se realizó mediante homogeneizador de células (Marca: Bio Spec products; modelo: Mini-Beadbeater-16) durante 3 min y se centrifugó a 15.000 g por 10 min. La fase acuosa se colectó en un tubo limpio y se realizó una extracción con

un volumen de fenol ácido, y otra con un volumen de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1). Finalmente se adicionó 1 ml de isopropanol absoluto y se incubó a -20°C durante 1 h, se centrifugó a 15.000 x g durante 10 min y se resuspendió en 10 µl de agua libre de nucleasas.

2.2.4. Digestiones enzimáticas

Digestión con RNasa A. La reacción se incubó a 37°C durante 1 h con una concentración de enzima de 50 µg por ml de reacción.

Digestión con DNasa I. Se utilizó 1 U de enzima por µg de ácido nucleico, y se incubó durante 1 h a 37°C en buffer 50 mM CH₃COONa, 10 mM MgCl₂, 2mM CaCl₂, pH 6,5, en un volumen final de 20 µl.

Digestión con EcoRV. se utilizó XU de enzima para digerir 500 ng de DNA en un volumen final de 20 µl y se incubó durante 2 h a 37°C.

2.2.5. Electroforesis en geles de agarosa.

Se utilizaron geles de agarosa al 1% que contenían 0,5 µg/ml de bromuro de etidio y 1X de buffer TAE (Sambrook y cols, 1989), el que también se utilizó como buffer de corrida. Para el análisis, a las muestras se les agregó el buffer de carga (0,25% azul de bromofenol, 15% ficoll, 30% glicerol). La cuantificación de la concentración de los ácidos nucleicos y determinación de tamaños se realizó con el

software Kodak 1D Science (Kodak scientific Imagen System) y con el software Image J (Rasband, 1997).

2.2.6. Purificación de los dsDNAs.

Las muestras tratadas con RNAsa A fueron utilizadas para separar las moléculas en un gel de agarosa al 0,8%. Los fragmentos de interés fueron cortadas mediante un bisturí en un transiluminador de luz UV y utilizados para la purificación mediante el kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System de acuerdo a las indicaciones del fabricante.

2.2.7. Purificación de DNA genómico mediante GeneClean.

Las moléculas a purificar fueron separadas en un gel de agarosa al 1% tras lo cual se cortó el fragmento de interés con un bisturí en un transiluminador de luz UV. El fragmento cortado se depositó en un tubo eppendorf al cual se le agregaron 500 µl de 6M KI y se incubó durante 10 min a 55°C para disolver la agarosa. Se agregaron 10 µl de sílica de vidrio para permitir la adherencia de los ácidos nucleicos y tras 10 min de incubación con agitación suave, la solución se centrifugó a 10000 x g por 1 min. Tras esto, se realizaron 2 lavados con la solución de lavado NewWash (10 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 2,5 mM EDTA, 50 % etanol), se resuspendió en 10 µl de H₂O estéril (H₂O-DEPC para el caso de los dsRNA) y se incubó a 55°C por 10 min. El sobrenadante obtenido después de una centrifugación a 10000 x g por 2 min se transfirió a un tubo eppendorf limpio y el ácido nucleico se analizó y cuantificó en un gel de agarosa.

2.2.8. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Las reacciones de PCR se realizaron utilizando 2 mM de MgCl₂, 0,4 mM de dNTPs, 1 uM de partidor, 1 X de buffer de reacción (20 mM Tris-HCl, pH 8,4; 50 mM KCl), 1 U de Taq polimerasa y 10 ng de DNA molde. Se realizaron 35 ciclos de amplificación comprendidos por un paso de desnaturalización a 94 °C por 30 s, alineamiento a 50 °C por 30 s, y de elongación a 72 °C por 3 min.

2.2.9. Clonación de dsDNAs

Reacción de ligación.

Los dsDNAs de la cepa CBS 6938 fueron purificados desde geles de agarosa, y fueron tratados con DNA polimerasa I fragmento Klenow, utilizando 1 U / µg DNA, durante 15 min a 25°C. La reacción se detuvo adicionando EDTA a una concentración final de 10 mM y calentando a 75°C por 20 min. El DNA obtenido se ligó al vector pBS previamente digerido con la enzima *EcoRV*, mediante la enzima T4 DNA ligasa durante 16 h a 22°C.

Transformación mediante electroporación

Preparación de células electrocompetentes

Desde cultivos en fase exponencial (DO_{600nm} entre 0,5 y 0,8.) de la cepa de *E. coli* DH5α se cosecharon las células por centrifugación a 5000 x g por 10 min a 4°C. Las células se lavaron dos veces con agua destilada estéril fría y una vez con

5 ml de glicerol al 10 % estéril y frío, centrifugando a 5000 x g por 10 min a 4°C cada vez. Las células se resuspendieron en 500 µl de glicerol al 10 % estéril frío, se alicuotaron 40 µl en tubos Eppendorf y luego, guardadas a -80°C.

Electroporación

Cada tubo de células electrocompetentes se descongeló y se agregó entre 5 y 10 µl de reacción de ligación. La mezcla se depositó en una cubeta de electroporación de 0,2 cm (BioRad). Con el equipo Gene Pulser BioRad se realizó un pulso (25 µF, 200 Ω y 2.5 kV) tras el cual las células se resuspendieron en 1 ml de medio LB e incubadas a 37°C por 1 h. Se sembraron 100 µl de células en placas con medio LB-Amp-XGal y se incubaron a 37°C hasta la aparición de colonias. Los clones recombinantes se reconocieron por su color blanco debido por la incapacidad de degradar el sustrato X-Gal debido a la interrupción del gen *lacZ* del plasmidio pBlueScript SK⁻ (PBS).

Purificación de DNA plasmidial.

Se utilizó el Kit de extracción de DNA Plasmidial MiniPrep adquirido a Promega y se siguieron las instrucciones que recomienda el fabricante.

2.2.10. Secuenciación y análisis bioinformático.

La molécula pXd1-6938 fue secuenciada mediante la técnica "primer walking" a través del servicio impartido por Macrogen Inc. (Korea). La secuencia

obtenida se analizó con el programa Bioedit (Hall, 1999). La búsqueda bioinformática de secuencias promotoras se realizó mediante los programas PromoterScan (Prestridge, 1995) y Easy Promoter Prediction Program (EP3) (Abeel y cols., 2008), mientras que mediante la herramienta ORF finder (National Center for Biotechnology Information, NCBI) se buscaron los posibles marcos de lectura abiertos. Además se utilizó las herramientas de predicción de genes codificantes de proteínas GenBuilder (Institute of Advanced Biomedical Technologies, 2000). El análisis comparativo de la secuencia nucleotídica y traducida del plasmidio se realizó por blastn y blastx, respectivamente, mientras que para secuencias de proteínas se realizó por blastp (NCBI).

2.2.11. Experimentos de curación.

Se realizaron varios tratamientos que han permitido eliminar con éxito los dsRNAs en *S. cerevisiae* (Wickner, 1974; Meskauskas y cols., 2003; Goss y cols., 2002), los que fueron adaptados para ser aplicados en *X. dendrorhous*.

Tratamiento por estrés térmico

La cepa 385 (S2-40) de *X. dendrorhous* fue crecida a 22°C hasta fase exponencial de crecimiento y se cosecharon las células por centrifugación a 7000 x g por 10 min. Posteriormente, las células se resuspendieron en 200 ml de medio YM estéril, el cual se dividió en 2 matraces, de 100 ml en cada uno, y se incubaron

a 30 y 37°C, respectivamente. Se determinó las células viables en placas YM/agar a 22°C.

Tratamiento con Higromicina

Desde un cultivo en fase exponencial de la cepa 385(S₂-40) ,se realizaron diluciones seriadas decimales las que se sembraron en placas YM suplementadas con 1 y 2 µg/ml de higromicina. Las placas se incubaron a 22 °C por 5 a 7 días hasta el desarrollo de colonias, las que fueron posteriormente sembradas en placas YM/agar. Éstas últimas se incubaron a 22 °C y se conservaron a 4 °C hasta su estudio.

Tratamiento con anisomicina

Tratamiento en placas. Los ensayos sobre placas YM suplementadas con el antibiótico, se realizaron de acuerdo a Flores (2008). A partir de un cultivo en fase exponencial de la cepa 385(S₂-40), se realizaron diluciones seriadas decimales y se sembraron en placas YM suplementadas con 0, 60, 90, 120 y 150 µM de anisomicina. Las placas se incubaron a 22 °C por 5 a 7 días hasta el desarrollo de colonias, las que fueron posteriormente sembradas en placas YM/agar. Éstas últimas se incubaron a 22 °C y se conservaron a 4 °C hasta su procesamiento.

Tratamiento en cultivos. Desde un cultivo en fase exponencial de la cepa de *X. dendrorhous* se inocularon 20 ml de medio YM suplementado con 0 y 60 µM de anisomicina, obteniendo un título inicial aproximado de 10³ UFC/ml. Los cultivos se

incubaron a 22°C y el crecimiento de cada uno se registró mediante medición de la D.O. a 600 nm durante 7 días. Se extrajeron alícuotas durante el inicio de la fase exponencial de estos cultivos para inocular un nuevo set de medios YM suplementados con concentraciones equivalentes de antibiótico. Este proceso se realizó en varias ocasiones para obtener una serie de generaciones bajo tratamiento. En la última sucesión (7ª) se realizaron diluciones seriadas desde el cultivo tratado con el antibiótico y se sembraron en placas YM/agar suplementadas con 60 µM de anisomicina.

3. RESULTADOS

3.1. Caracterización de los EGEs en *X. dendrorhous*.

Las metodologías de extracción de EGEs previamente utilizadas en *X.dendrorhous* no se encuentran ampliamente descritas lo que dificulta principalmente la identificación de los elementos tipo dsDNA. Considerando esto, se propuso encontrar una estrategia experimental que permita observar la totalidad de elementos presentes en *X. dendrorhous* con el fin de determinar la variabilidad de los EGEs presentes en la levadura.

3.2.1.Evaluación de los métodos de extracción de EGEs.

Se comparó la calidad de los ácidos nucleicos totales obtenidos por los dos métodos de extracción utilizados en levaduras y que se diferencian en la forma de ruptura celular y los procedimientos desproteínización. Con este fin, los extractos de las cepas CBS 6938 y UCD 67-210, que sólo portan EGEs del tipo dsDNA, se trataron con RNasa A y se analizaron por electroforesis en gel de agarosa. Inicialmente se evaluó el método que utiliza la agitación en vortex con perlas de vidrio para la lisis celular (ruptura mecánica). En el perfil de los ácidos nucleicos obtenidos para ambas cepas se observaron principalmente dos bandas que contienen DNAs los que de acuerdo a los perfiles descritos en trabajos previos estos corresponderían al DNA genómico (gDNA) y a los posibles EGEs (Figura 2A). A pesar de esto, la presencia de DNA degradado posiblemente originado por la acción mecánica durante la ruptura, no permitió una observación más resolutive de los EGEs presentes.

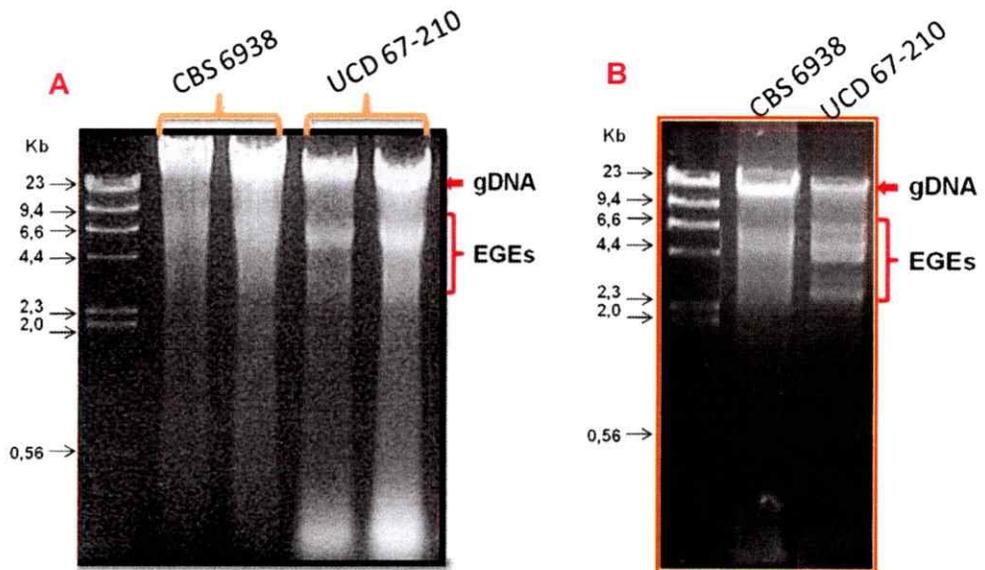


Figura 2. DNA total de las cepas UCD 67-210 y CBS 6938 de *X. dendrorhous* obtenido por dos métodos de lisis celular. A. Ruptura mecánica por agitación con perlas de vidrio. B. Ruptura celular mediante generación de esferoplastos y lisis con SDS (enzimática/química). Los extractos obtenidos se trataron con RNAsa A y se analizaron por electroforesis en geles de agarosa. La presencia del DNA genómico (gDNA) y los EGEs es indicada. Carril M: Marcador de peso molecular lambda *Hind III*.

Con el segundo método de extracción que utiliza la generación de protoplastos y su posterior lisis para la obtención de los ácidos nucleicos totales (ruptura enzimática/química), se obtuvo una mayor definición de los elementos de DNA, lográndose observar el DNA genómico y otras bandas que corresponderían a los dsDNAs (Figura 2B). Considerando los resultados obtenidos, esta última metodología fue elegida para la caracterización de EGEs en las cepas restantes de *X. dendrorhous*

3.1.2. Determinación de los EGEs presentes en las cepas de *X. dendrorhous*.

Se analizaron los EGEs presentes en las cepas de *X. dendrorhous* previamente seleccionadas de acuerdo al lugar geográfico donde fueron aisladas. En los perfiles de ácidos nucleicos totales obtenidos, se observaron numerosas bandas adicionales al DNA genómico, en todas las cepas analizadas, las que corresponderían a los distintos tipos de EGEs presentes. Para determinar la naturaleza química de estos elementos, los extractos fueron tratados enzimáticamente con DNAsa I y RNAsa A, para definir los perfiles de dsRNAs y dsDNAs de las distintas cepas (Figura 3).

Los EGEs tipo dsRNA, se determinaron por la resistencia al tratamiento con DNAsa I, los que fueron encontrados en la mayoría de las cepas de *X. dendrorhous*, excepto en las cepas CBS 6938 y UCD 67-210 que carecen de estas moléculas. De acuerdo al tamaño de los dsRNAs, se logró identificar 4 moléculas que se nombraron como L-dsRNA (4,8 kb), M-dsRNA (3,4 kb), S1-dsRNA (0,9 kb) y S2-dsRNA (0,7 kb), según lo descrito en trabajos previos.

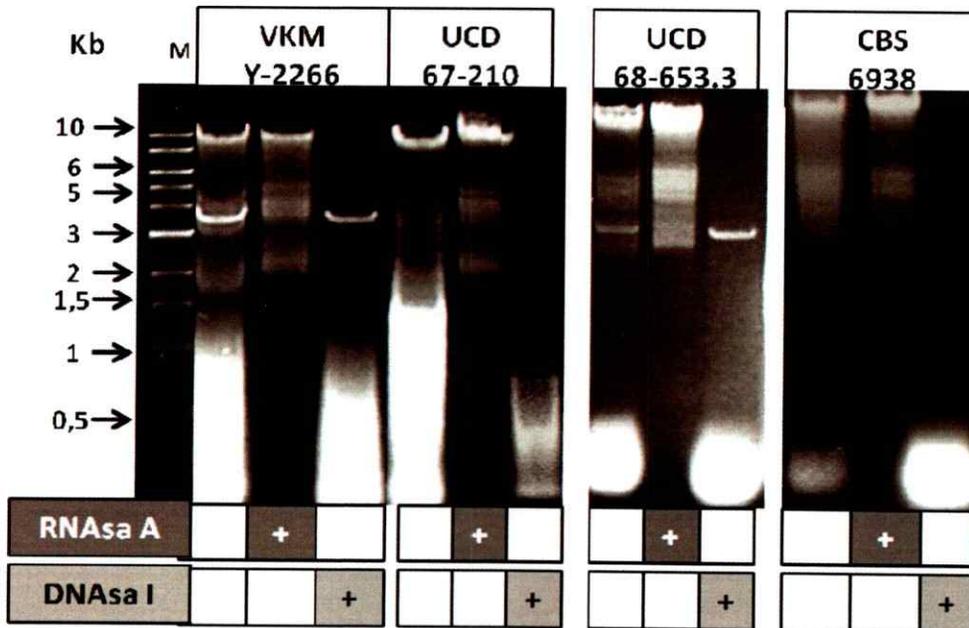
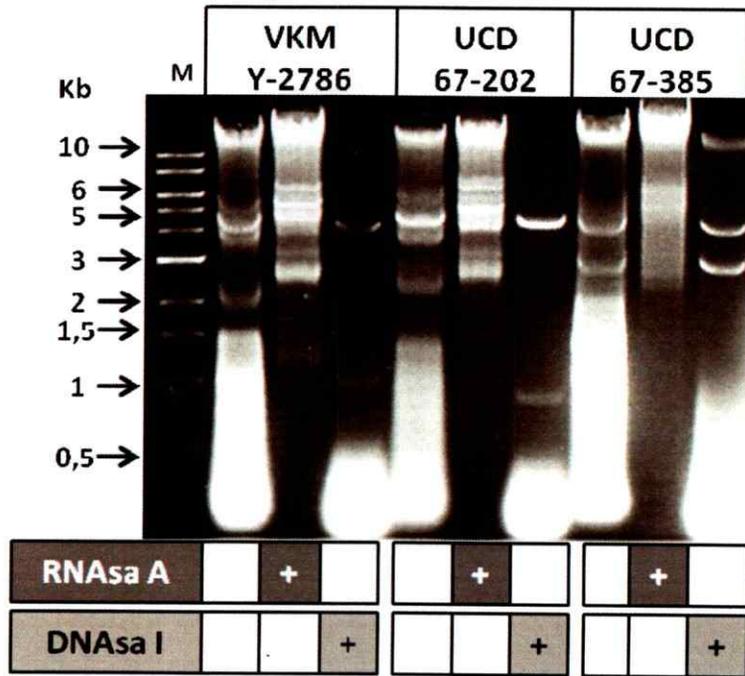


Figura 3. Perfiles de los EGEs tipo dsDNA y dsRNA en las cepas de *X. dendrorhous*. Se aislaron los ácidos nucleicos totales de las cepas VKM Y-2786, UCD 67-202, VKM Y-2266, UCD 67-385, CBS 6938, UCD 68-653.3 y UCD 67-210. La naturaleza química de los EGEs presentes se determinó mediante el tratamiento enzimático con RNasa A y DNasa I (+, aplicación del tratamiento; -, sin tratamiento). M: marcadores de peso molecular 1 Kb.

El L-dsRNA, es el elemento común de las cepas que portan dsRNAs, descontando a la cepa UCD 68-653.3 que posee únicamente la molécula M-dsRNA. Por otro lado, las moléculas de menor tamaño, S-dsRNAs, no son observadas en ausencia de L-dsRNA. Este polimorfismo permitió agrupar las cepas de acuerdo al número de dsRNAs presentes, encontrando cepas que portan más de un elemento (UCD 67-385, UCD 67-202), otras que sólo poseen un dsRNA (VKM Y-2266, VKM Y-2059, UCD 68-653.3) y las que carecen de dsRNAs.

Para determinar los dsDNAs de *X. dendrorhous*, los extractos de las distintas cepas se trataron con la enzima RNAsa A y analizados por electroforesis en geles de agarosa. En los resultados obtenidos, se encontraron elementos que fueron resistentes al tratamiento enzimático en todas las cepas analizadas y que tendrían tamaños que comprenden desde 1,2 kb a 7 kb. El perfil de dsDNAs observado fue variable de acuerdo a la cepa, encontrándose diferencias en el número de moléculas estimado: al menos 7 moléculas en UCD 67-202, 6 moléculas en VKM Y-2786, 5 moléculas UCD 67-210 y UCD 68-653.3, 4 moléculas en VKM Y-2266 y las con 2 moléculas (UCD 67-385, y CBS 6938) (Tabla 3).

Tabla 3. EGEs tipo dsDNAs presentes en las cepas de *X. dendrorhous*.

Cepa	dsDNAs (Kb)							
	7,5	6,8	5,4	4,7	4,4	3,4	2,7	1,2
UCD 67-202	+	+	+	+	+	+	+	-
VKM Y-2786	-	+	+	+	-	+	+	+
VKM Y-2266	-	+	+	+	-	+	-	-
UCD 67-210	-	+	+	+	-	+	+	-
UCD 68-653.3	-	+	+	+	-	+	+	-
UCD 67-385	-	+	+	-	-	-	-	-
CBS 6938	-	+	+	-	-	-	-	-

(+) Presencia de dsDNA (-) Ausencia de dsDNA

3.2. Análisis de los dsRNAs presentes en la cepa UCD 67-385 de *X. dendrorhous*.

De acuerdo a trabajos previos la complejidad del patrón de dsRNAs observado en la cepa UCD 67-385 de *X. dendrorhous*, se debería a la presencia de elementos anexos que coexisten con el genoma y que podrían estar implicados en alguna función en su hospedero.. Para determinar si los dsRNAs L, M y S1 podrían estar implicados en algún fenotipo, como la actividad antifúngica, se realizaron una serie de experimentos con la cepa 385(S2-40) que tenían como objetivo la eliminación de los dsRNAs.

3.2.1. Determinación del contenido de dsRNAs en la cepa 385(S2-40) de *X. dendrorhous* durante las distintas fases de crecimiento.

Con el fin de evaluar la estabilidad del contenido de los dsRNAs en la cepa 385(S2-40), se extrajeron alicuotas a distintos tiempos durante la curva de crecimiento desde las cuales se recolectaron las células para la extracción de RNA total. En el análisis de la electroforesis en geles de agarosa se reconocieron las tres moléculas características de la cepa (L, M y S1) en los extractos provenientes de todas las muestras representativas de las distintas fases de crecimiento, indicando que el número de dsRNAs es constante (Figura 4). Estos resultados sugieren que la ausencia de S2-dsRNA es permanente e independiente a la fase de crecimiento en que se encuentre la cepa.

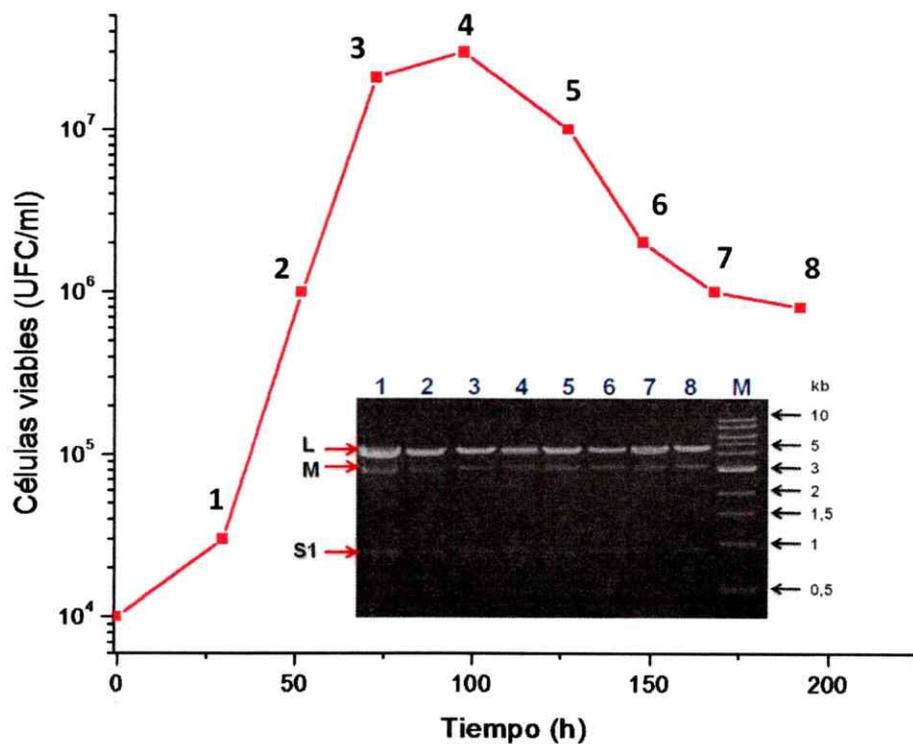


Figura 4. Contenido de dsRNAs de la cepa 385 (S2-40) durante la curva de crecimiento. Curva de crecimiento de la cepa 385 (S2-40) en la que se indican los tiempos de recolección de las alícuotas (1 al 8) durante la curva de crecimiento. Desde estas muestras las células fueron cosechadas para ser utilizadas en la extracción de RNA total y determinación del contenido de dsRNA. En la electroforesis en geles de agarosa, se observa el perfil de dsRNAs obtenido para cada muestra (Carriles 1 al 8, respectivamente), destacando los dsRNAs (L, M y S1) característicos de la cepa. Carril M: Estándar de peso molecular 1 kb.

3.2.2. Experimentos de curación.

Con el fin de eliminar los dsRNAs L, M y S1, se utilizaron los distintos tratamientos que han permitido la eliminación de los dsRNAs en otras levaduras y que se adaptaron para ser aplicados sobre la cepa 385(S2-40) de *X. dendrorhous*. Los resultados obtenidos para cada caso se detallan a continuación.

Tratamiento con antibióticos.

En trabajos previos, cultivos y placas suplementadas con anisomicina (hasta 25 μM), permitieron obtener la cepa curada de S2-dsRNA. Considerando esto, se planteó realizar nuevos ensayos utilizando concentraciones crecientes del antibiótico con el fin de incrementar la probabilidad de obtener cepas que carezcan de dsRNAs. A partir de un cultivo de 385(S2-40), se extrajeron alícuotas desde la fase exponencial media (aprox. 10^5 ufc/ml) y tardía (aprox. 10^7 ufc/ml), las que fueron sembradas sobre placas suplementadas con 0, 60, 90, 120 y 150 μM de anisomicina. Para evaluar la acción del antibiótico sobre la cepa, se determinó el tiempo de incubación necesario para el desarrollo de las colonias (hasta alcanzar un diámetro aproximado de 5 mm), y el número de células viables para cada placa, mientras que para la búsqueda de "cepas curadas" se caracterizó el contenido de dsRNA de las colonias.

Para las dos fases de crecimiento analizadas, se observaron diferencias en el tiempo requerido para el desarrollo de las colonias sembradas en las distintas placas. Este período fue variable de acuerdo a la concentración de anisomicina utilizada en cada caso: para la placa control sin antibiótico (0 μM) el tiempo

necesario fue aproximadamente 3 días, mientras que al suplementar con 30 μM fue de 5 días . Esta diferencia fue mayor al incrementar las concentraciones utilizadas: para 60 y 90 μM de anisomicina, el tiempo requerido fue de 7 días; y al suplementar con 120 y 150 μM , este tiempo se extendió hasta los 10 días. A pesar de estas diferencias, no se observaron variaciones significativas en el número de células viables determinados para las alícuotas provenientes desde ambas fases de crecimiento y que fueron sembradas en las placas suplementadas con 0, 30 y 60 μM de antibiótico. Un comportamiento distinto fue encontrado al suplementar las placas con 90 y 150 μM de anisomicina, en las cuales se pierde progresivamente la viabilidad de las células provenientes de la fase exponencial media de crecimiento (Figura 5A). Este efecto fue menos determinante para las células extraídas desde la fase exponencial temprana de crecimiento, las que sólo presentan una disminución en un orden de magnitud a la concentración máxima de anisomicina utilizada. Las colonias obtenidas desde las distintas placas suplementadas con anisomicina (80 aproximadamente), se les extrajo el RNA total para determinar el contenido de dsRNA. No se encontraron variaciones en el número de dsRNAs presentes.

Con el fin de incrementar la probabilidad de obtener cepas curadas, se realizaron subcultivos suplementados con anisomicina para lograr obtener varias generaciones de la levadura expuestas al tratamiento. Para determinar la concentración de antibiótico a utilizar, se realizaron cultivos suplementados con 0, 30 y 60 μM y se registró el crecimiento en el tiempo mediante D.O. (600 nm) (Figura 5B).

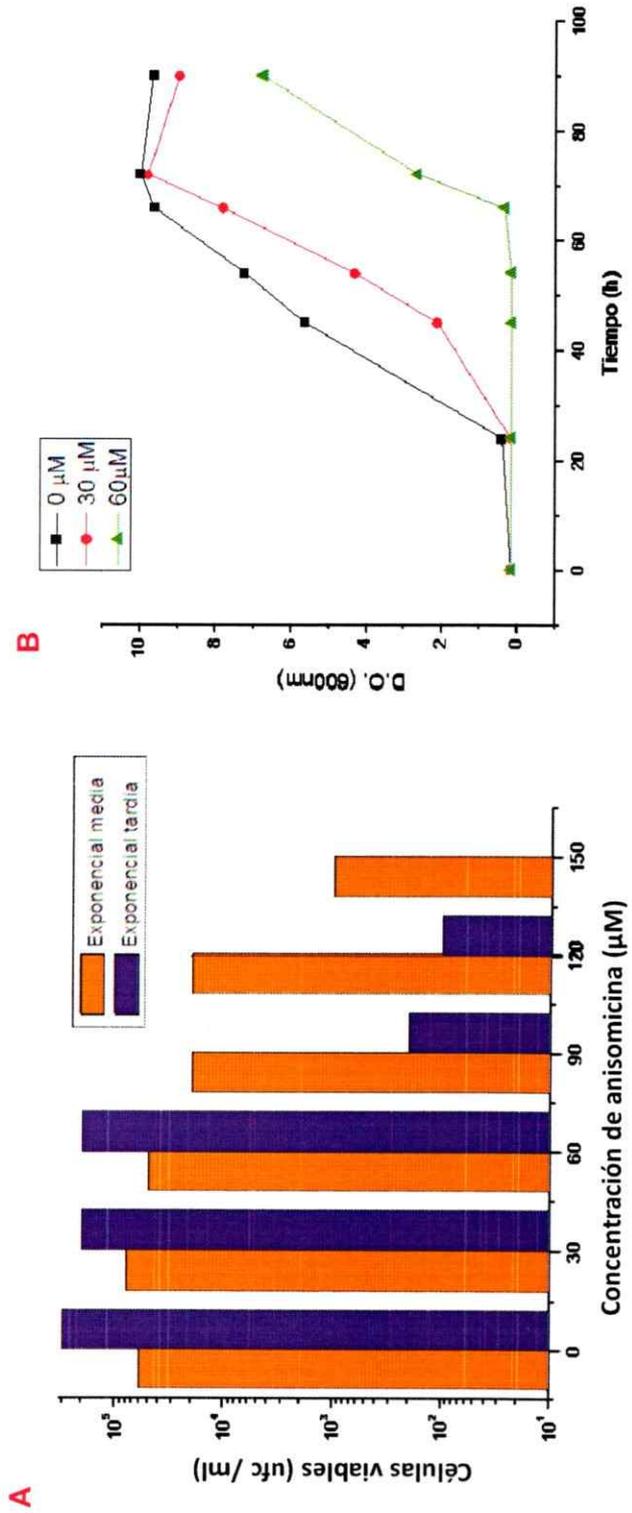


Figura 5. Efecto inhibitorio de la anisomicina sobre el crecimiento de la cepa 385 (S2-40) de *X. dendrorhous*. A. Alicuotas extraídas desde un cultivo se sembraron en placas YM-agar suplementadas con anisomicina (0, 30, 60, 90, 120 y 150 µM) las que se incubaron hasta el desarrollo de las colonias. B. Se realizaron curvas de crecimiento para la cepa en medios suplementados con distintas concentraciones de anisomicina: 0 µM (■), 30 µM (●), 60 µM (▲).

En las curvas obtenidas se observaron diferencias en la fase latencia entre los cultivos ensayados, la que varió según la concentración de anisomicina. Para el cultivo suplementado con 30 μM anisomicina, esta fase tuvo una duración de 48 h, mientras que al utilizar de 60 μM , el tiempo se extendió hasta las 64 h. En ambos casos, el tiempo de duración de la fase de latencia fue mayor al observado para el cultivo control sin antibiótico (20 h). De acuerdo a los resultados obtenidos, se escogió la concentración de 60 μM para realizar la serie de los siete subcultivos. Las alícuotas extraídas desde el último cultivo tratado se sembraron en placas YM/agar que también contienen 60 μM de anisomicina con el fin de prolongar la acción del antibiótico durante el desarrollo de las colonias. Se analizaron los dsRNAs presentes en las 60 colonias tratadas, las cuales mantienen los dsRNAs L, M y S1. El mismo experimento se realizó además con la cepa UCD 67-385 y se determinó el contenido de dsRNAs de las colonias obtenidas con el tratamiento. Se encontraron 10 colonias parcialmente curadas que sólo carecían del S2-dsRNAs.

Considerando los resultados anteriores, se propuso realizar un nuevo experimento utilizando el antibiótico higromicina B (HgrB), otro agente inhibidor que afecta múltiples procesos durante la síntesis de proteínas y que presenta un efecto negativo sobre *X. dendrorhous* (Niklitschek, 2007). Para esto, alícuotas provenientes desde un cultivo en fase exponencial de la cepa 385(S2-40) se sembraron en placas YM/agar suplementadas con HgrB, seleccionando las concentraciones utilizadas, de acuerdo a la concentración mínima inhibitoria establecida en trabajos previos. El tiempo para el desarrollo de las colonias fue variable de acuerdo a la concentración de anisomicina utilizada para cada caso: en la placa control sin antibiótico (0 μM) el tiempo requerido fue aproximadamente 3 días, mientras que al suplementar con 1 y 2 $\mu\text{g/ml}$ de HgrB fueron necesarios 5 y 7 días respectivamente. Se observó además diferencias en la viabilidad celular

estimada para las distintas concentraciones ensayadas: en la placa sin antibiótico el número de células viables fue de 10^7 UFC/ml, mientras que al suplementar con 1 $\mu\text{g/ml}$, fue de 10^5 UFC/ml. Un mayor efecto tóxico del antibiótico sobre la cepa fue observado al utilizar 2 $\mu\text{g/ml}$ de HgrB, que presentó un menor número de células viables (10^2 UCF/ml) que el estimado para los ensayos anteriores. Con las colonias obtenidas por el tratamiento (48 en total) con ambas concentraciones de HgrB, se realizó una extracción de RNA total y se analizaron los dsRNAs presentes. No se encontraron variaciones en el perfil, observando las 3 moléculas características de la cepa .

Tratamiento por estrés térmico

En trabajos previos en otras levaduras, la aplicación de un estrés térmico puede alterar las funciones celulares y virales involucradas en la mantención de los dsRNAs.. Considerando que *X. dendrorhous* tiene una temperatura óptima de crecimiento de 22°C , los cultivos de la cepa 385(S2-40) se incubaron a 30 y 37°C para inducir el estrés térmico que promueva la eliminación de los dsRNAs. Los cultivos fueron seguidos por D.O (600 nm) y por recuento de células viables durante los distintos tiempos de incubación. En la curva obtenida a 30°C , se registró una disminución en la viabilidad celular a partir de las 31 h, no detentándose la presencia de células viables a las 55 h de incubación. Un efecto negativo mayor se observó a la temperatura de incubación de 37°C , en la cual no se detectaron células viables a las 8 horas. Ambas temperaturas utilizadas fueron restrictivas para el crecimiento de la cepa induciendo una disminución en la viabilidad celular, sin embargo, en el análisis del contenido de dsRNA de la totalidad de las colonias sometidas al estrés termico (60 en total) no presentaron variaciones en el número de elementos presentes (Figura 6).

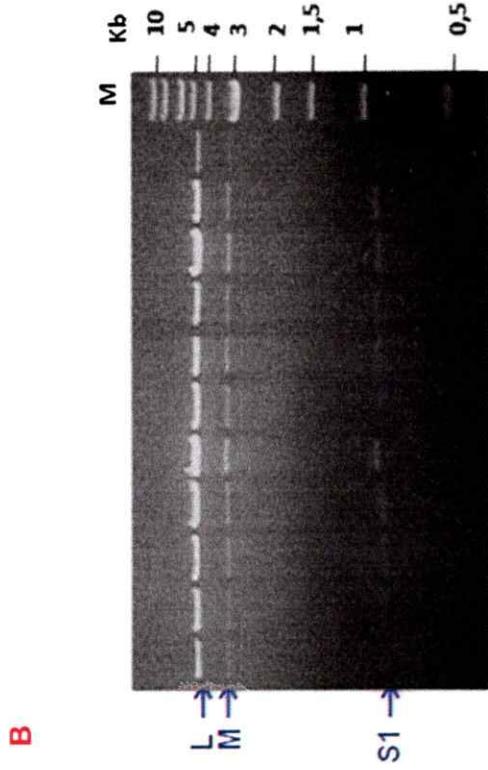
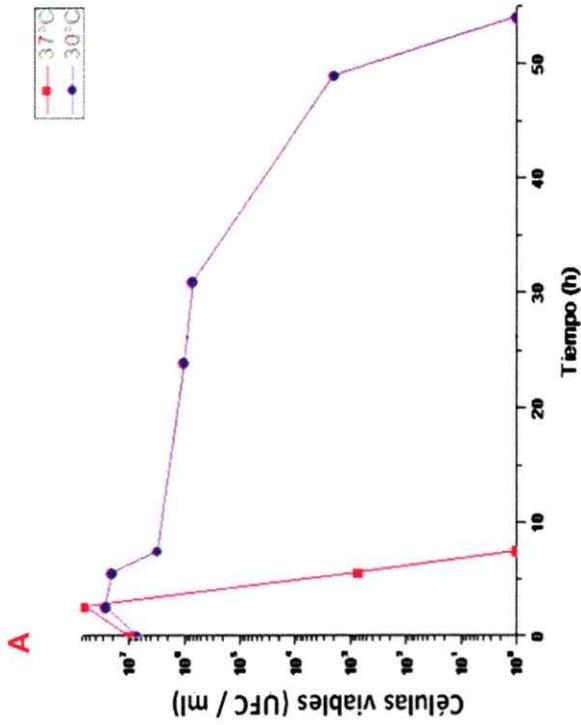


Figura 6. Efecto de la temperatura sobre la viabilidad celular de la cepa 385(S2-40) y análisis del contenido de dsRNA de las colonias sometidas a estrés térmico. A. El gráfico muestra el decaimiento en el número de células viables en el tiempo para las dos temperaturas de incubación, 30 (●) y 37 °C (■). **B.** El contenido de dsRNAs de las colonias provenientes del cultivo incubado a 37 °C fue analizado mediante electroforesis en geles de agarosa. En el RNA total de todas las colonias se observaron las moléculas L, M y S1-dsRNA características de la cepa. Carril M, marcador de peso molecular 1kb.

3.2. Plasmidios de dsDNA en *X. dendrorhous*.

Entre los perfiles de EGEs obtenidos para las cepas de *X. dendrorhous* analizadas, la cepa CBS 6938 sólo posee elementos de dsDNA de tamaño estimado 6,8 y 5,4 kb. Considerando esto y la actividad antifúngica que presenta esta cepa, se propuso caracterizar molecularmente los dsDNAs encontrados para determinar su funcionalidad y su posible responsabilidad en el fenotipo observado.

3.2.2. Clonamiento y secuenciación de dsDNAs de la cepa CBS 6938.

Para la clonación, los dsDNAs fueron conjuntamente purificados y tratados con DNA polimerasa I fragmento Klenow, metodología que se propuso considerando la naturaleza lineal de estos elementos. Se logró obtener sólo un clon recombinante que contenía un fragmento de 4899 pb, el que fue exitosamente secuenciado. La comparación bioinformática a nivel nucleotídico de esta secuencia con las registradas en la base de datos NCBI, sólo se permitió encontrar un 89 % de identidad con un fragmento de 207 nt del plasmidio pDK1 de *X. dendrorhous* (Nº de acceso AJ278424.1) Este segmento contiene una secuencia de 30 pb que forma parte de uno de los repetidos invertidos descritos para pKD1, y que en la secuencia obtenida están ubicados entre los nucleótidos 1 al 30 y del 4867 al 4896 (Anexo 1). Considerando estos resultados, el dsDNA clonado se nombró como pXd1-6938 (plasmidio de *X. dendrorhous* Nº 1 de la cepa CBS 6938).

Con la secuencia de pXd1-6938 se realizó una búsqueda bioinformática de regiones promotoras utilizando los programas Easy Promoter Prediction Program (EP3) y PromoterScan. Ambas aproximaciones no detectaron regiones promotoras

en pXd1-6938 a pesar que las programas se diferencian en los algoritmos para realizar las predicciones, ya sea considerando las propiedades estructurales del DNA o las homologías con promotores reconocidos por la RNA polimerasa II de eucariontes. Para encontrar posibles regiones codificantes se utilizó la herramienta Genebuilder que se basa en la identificación de secuencias que componen la unidad de transcripción en eucariontes. Se obtuvo la predicción de 2 secuencias de 99 pb (desde el nt 3136 al 3235) y 100 pb (desde nt 4181 al 4281), que codificarían para una proteína de 33 aminoácidos (Anexo 2). El análisis por blastp con estas secuencias no mostró homologías con la base de datos del NCBI. En la búsqueda de marco de lectura abiertos utilizando la herramienta ORF finder (NCBI), se encontraron 11 probables ORFs que tienen un rango de tamaño entre 111 y 174 pb (Anexo 3). Las secuencias traducidas se compararon con la base de datos mediante blastx, las que no presentaron homologías. Se realizó un alineamiento entre las secuencias de los plasmidios descritos en las levaduras *K. lactis*, *Pichia etchellsii*, *Debaryomyces hansenii*, no encontrándose identidades significativas entre estas moléculas.

3.2.3. Presencia del plasmidio pXd1-6938 en las cepas de *X. dendrorhous*.

Para analizar la presencia pXd1-6938 en las cepas de *X. dendrorhous*, los dsDNAs fueron purificados y utilizados como molde para las reacciones de PCR con partidores específicos para secuencia del plasmidio. Las parejas de partidores se diseñaron de acuerdo a la secuencia de los ORFs predichos, evitando las zonas extremas de la molécula que contiene elementos repetidos invertidos que pueden ser comunes para todos los dsDNAs. De acuerdo a la secuencia establecida con la

pareja C2F2-C2R7, el amplificado esperado tiene un tamaño de 1705 pb; mientras que con los partidores C2F7-C2R5, el tamaño del amplificado es de 1180 pb.

En el análisis por electroforesis en geles de agarosa, con los dsDNAs purificados desde la cepa portadora del plasmidio pXd1-6938 (CBS 6938) además de los amplificados de tamaño esperado, se obtuvieron otros de menor tamaño para ambas parejas de partidores utilizadas (Figura 7). Desde los dsDNAs de las cepas UCD 67-385, VKM Y-2786 y UCD 67-210 se obtuvo el mismo perfil de amplicones que la cepa CBS 6938, sugiriendo que estas también serían portadoras del plasmidio pXd1-6938. El perfil de amplicones fue distinto para las cepas restantes: UCD 68-653.3, UCD 67-202 y VKM 2266, en las que se encontró varios amplicones variables y que no presentaban el tamaño esperado de acuerdo a los partidores utilizados, sugiriendo que estas no contienen el plasmidio pXd-6938 entre sus dsDNAs. Un análisis similar se realizó con partidores diseñados desde la secuencia del plasmidio pDK1 disponible en la base de datos, que generaron un único amplicon que tiene el tamaño esperado en casi todas las cepas analizadas, sugiriendo que la presencia de la molécula pDK1. La cepa UCD 67-202 es la única con la que no se obtuvo este amplicon.

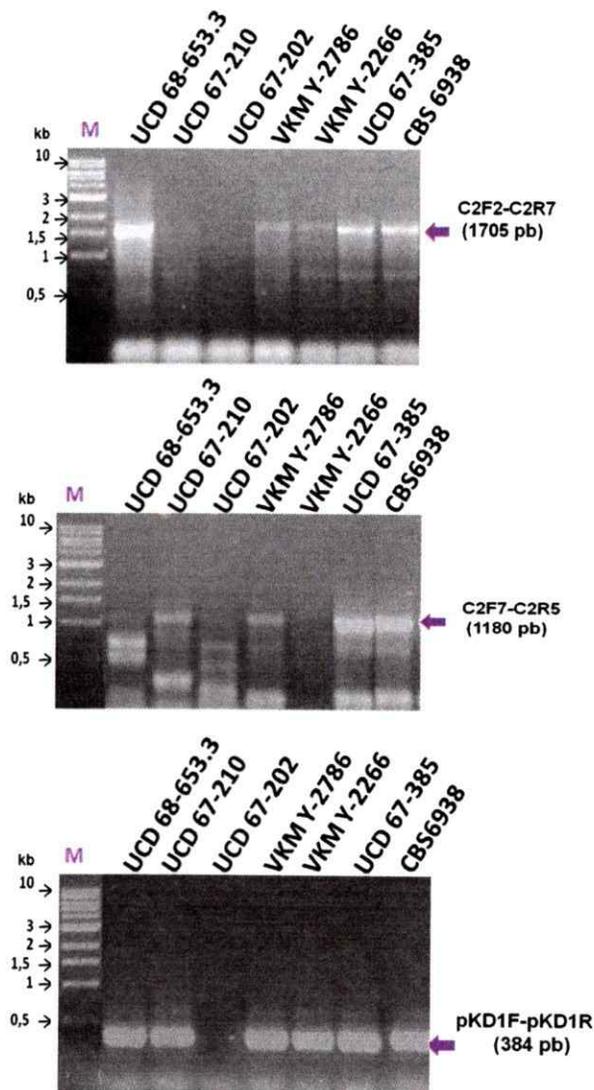


Figura 7. Amplificación por PCR desde los dsDNAs de las cepas de *X. dendrorhous* con partidores específicos para pXd1-6938 y pDK1 Se diseñaron partidores desde las secuencias del plasmidio pXd1-6938 (C2F2, C2R7 y C2R5) y del pDK1 (pKD1F-pKD1R) para la reacción de PCR. Se utilizó como molde los dsDNAs purificados de las distintas cepas de *X. dendrorhous*: UCD 68-653.3, UCD 67-210 UCD 67-202, VKM Y-2786, VKM Y-2266, UCD 67-385 y CBS 6938. Los tamaños de los amplicones esperados son indicados para cada pareja de partidores (flecha). Carril M. Marcador de peso molecular 1Kb.

3.4. Localización del gen *asp* en *X. dendrorhous*.

La actividad antifúngica en levaduras es producida por una toxina secretada al medio extracelular. Trabajos recientes en varias cepas de *X. dendrorhous*, sugieren que toxina responsable del fenotipo antifúngico es una proteína de 36 kDa, que correspondía a una proteasa aspártica (*asp*). La ausencia de ORFs identificables en los dsDNAs de *X. dendrorhous* secuenciados, sugiere que el gen *asp* se encontraría en el DNA genómico de la levadura. Considerando esto, se purificó el gDNA de las distintas cepas y se utilizaron como molde para la reacción de PCR con partidores específicos para *asp*. Las dos parejas de partidores se diseñaron a partir de la secuencia del cDNA (1474 pb) disponible en la base de datos del NCBI (Nº de acceso AF064871.1): Asp F1-Asp R1 amplifican una región después del primer ATG: y Asp F2-Asp R2 permiten el reconocimiento de la secuencia antes del extremo de poli A. Con ambas parejas de partidores se obtuvieron amplicones: para la pareja Asp F1-Asp R1 este amplicon fue de 700 pb, mientras que para Asp F2-Asp R2 del tamaño fue 900 pb. Este perfil es igual para todas las cepas analizadas, incluyendo la cepa CBS 6938 en la cual se identificó la proteína (Figura 8)

Se realizó una búsqueda bioinformática de la secuencia del cDNA de *asp* en la base de datos del laboratorio que contiene por separado las secuencias del genoma y de los cDNAs provenientes de la cepa UCD 67-385, recientemente generada y disponible. En los resultados obtenidos, se logró encontrar un cDNA de 1528 pb que presenta un 98% de identidad, lográndose identificar además un fragmento de 2700 pb que correspondería el gen *asp*, El alineamiento entre las secuencias del cDNA y gDNA obtenidas permitió analizar el ORF del gen *asp*, el que contiene 11 regiones intrónicas y 12 exónicas (Anexo 4).

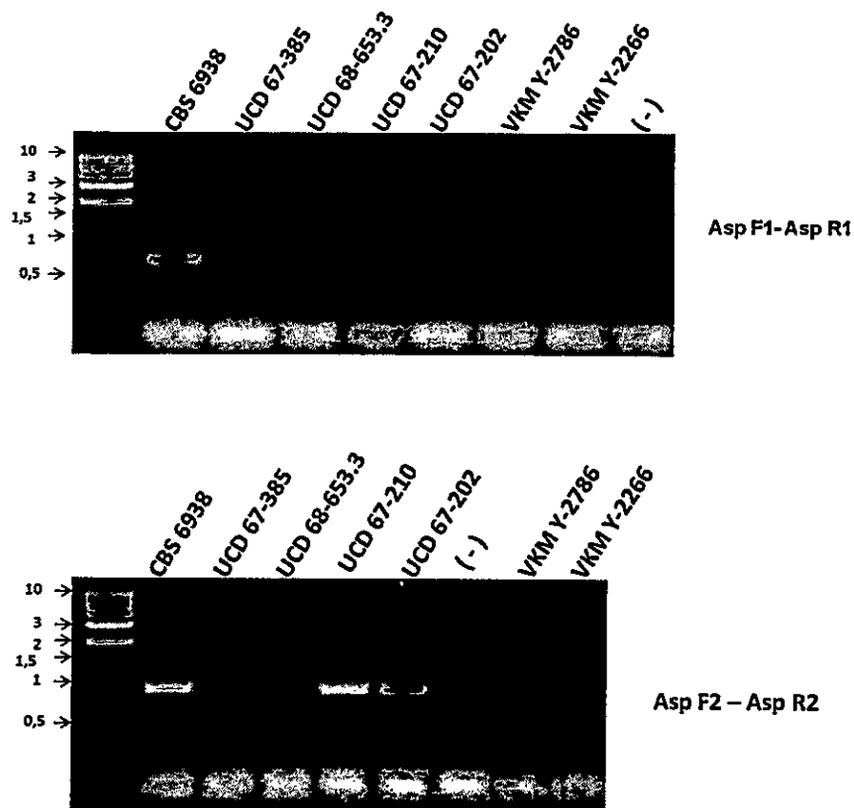


Figura 8. Amplificación por PCR del gen *asp* a partir del DNA genómico de las cepas de *X. dendrorhous*. Se diseñaron las parejas de partidores específicos (Asp F1- Asp R1 y AspF2 - Asp R2, desde la secuencia del cDNA de *asp*. Para el PCR se utilizó como molde los DNAs genómicos de las cepas CBS 6938, UCD 67-385, UCD 68-653C, UCD 67-210, UCD 67-202, VKM Y-2786 y VKM Y-2266. Carril (-): Control negativo, reacción sin DNA. Carril M: Marcador de paso molecular 1Kb.

Considerando los resultados anteriores, se realizó el alineamiento de los partidores diseñados con el ORF de *asp*, con el propósito de definir el tamaño esperado de los fragmentos amplificados. Con los partidores Asp F1-Asp R1 el tamaño del amplicon es de 704 pb, mientras que para Asp F2- AspR2 este corresponde a 904 pb Ambos tamaños son consecuentes con los estimados para los amplicones obtenidos por el PCR, sugiriendo que el gen *asp* se encuentra en el DNA genómico de las distintas cepas *X. dendrorhous*.

4. Discusión

4.1. EGEs en cepas de *X. dendrorhous*.

La metodología de extracción de los ácidos nucleicos totales aplicada, permitió la observación de los EGEs presentes en *X. dendrorhous*, lográndose además definir algunas discrepancias en los resultados de trabajos anteriores. Para la cepa UCD 67-210, no se había determinado si esta cepa era o no portadora de dsDNAs. De acuerdo a esta tesis, la cepa posee al menos 6 dsDNAs, los que además presentan un tamaño similar a los observados por Martínez y cols. (1994). Estos resultados son contrarios a los obtenidos por Kucsera y cols., (1996) quien describió la ausencia de elementos en la cepa. Los perfiles obtenidos desde las cepas UCD 67-202, CBS 6938 y UCD 67-385, que son correspondientes a los descritos en trabajos previos (Castillo y Cifuentes, 1994; Pfeiffer y cols., 1996), y para UCD 68-653.3, VKM Y-2266 y VKM Y-2786, que no habían sido previamente analizadas, permitieron establecer la variabilidad de elementos presentes en las cepas de *X. dendrorhous* que son representativas de los distintos orígenes geográficos donde ha sido aislada la especie.

En los perfiles de dsRNAs, no se encontraron nuevos elementos que difieran a los descritos previamente en la cepa UCD 67-385, pero si se observó un polimorfismo en el número de elementos identificados y que estaría relacionado con el origen geográfico de las cepas: las que presentan 4 moléculas son de origen japonés (UCD 67-385); las que portan la molécula L son de origen ruso (VKM-Y 2266, VKM-Y 2786), la cepa de Alaska posee la molécula M es (UCD 68-653.3). Finalmente las cepas de origen finlandés (CBS 6938), y a la cepa de *P. rhodozyma*

de origen japonés UCD 67-210 carecen de dsRNAs. Esta cepa ha sido catalogada de forma diferencial respecto a las otras cepas de ese origen, tanto por características fisiológicas como genéticas propias (Fell y Blatt, 1998; Libkind, 2007).

En los perfiles de dsDNAs, se observaron elementos de distintos tamaño entre 1,2 y 6,4 kb, encontrando desde 2 hasta 7 moléculas en una misma cepa. El rango de los tamaños estimados fueron similares a los observados en los trabajos previos realizados por Martínez y cols. (1994), Kucsera y cols. (2000) y Santopietro y Kula (2001) para la levadura. El número y tamaño de dsDNAs fueron estimados de acuerdo a la definición de las bandas observadas en el análisis por geles de agarosa, la que en algunos casos fue dificultada por la poca definición. Este comportamiento ha sido observado en trabajos previos en que describen la presencia de elementos lineales de dsDNAs, los cuales poseen proteínas unidas a sus extremos y que interfieren en la migración. La utilización de la enzima proteinasa K durante la extracción de ácidos nucleicos totales y de geles de agarosa que contienen SDS, permitirían mejorar la visualización de bandas en la electroforesis (Fukuhara, 1995). Ambas estrategias fueron realizadas no encontrando mayores variaciones en el perfil definido. Contrario a lo observado en los dsRNAs, la relación entre el polimorfismo de las moléculas de dsDNAs y el origen de las cepas no es directa, ya que cepas provenientes desde el mismo lugar difieren en el número y tamaño de los dsDNAs que contienen, o bien, cepas que tienen el mismo perfil provienen desde distintos orígenes.

Los EGEs generalmente no intervienen en las funciones vitales en levaduras, y sólo en algunos casos confieren una ventaja al hospedero, como sucede en el fenotipo antifúngico (Fukuhara, 1995; Magliani y cols., 1997). Todas

las cepas analizadas presentaron por lo menos un tipo de EGEs, encontrando dsDNAs en todas ellas, los que no han sido relacionados con alguna función en el hospedero (Kucsera y cols., 2000; Santopietro y Kula, 2001). A pesar de esto la posible participación de los dsDNAs en los procesos celulares de *X. dendrorhous* no puede ser descartada hasta identificar y caracterizar molecularmente la totalidad de los dsDNAs presentes. Por otro lado, no existen diferencias en el potencial de crecimiento o en la viabilidad celular entre las cepas que presentan o carecen de dsRNAs (Pfeiffer y cols., 2001). La ausencia de dsRNAs en las cepas UCD 67-210 y CBS 6938, sugiere que no son esenciales y que estos generalmente se comportarían como elementos crípticos.

4.2. dsRNAs de la cepa UCD 67-385 de *X. dendrorhous*.

La cepa UCD 67-385 presenta un perfil complejo que ha motivado a caracterizar dsRNAs presentes y que no ha sido completamente comprendido. La ausencia de S2-dsRNA en la cepa curada durante todas las fases de crecimiento sugiere que este elemento es eliminado y no proviene de la acumulación de otros tipos de dsRNAs. Esto es contrario a lo observado en otras levaduras en donde la aparición espontánea de dsRNAs es producto al procesamiento de elementos de mayor tamaño, o por la presencia de "replicones" derivados de otros virus o la acumulación de dsRNAs defectuosos (Koltin y cols., 1980; Esteban y cols., 1988). En el trabajo previo, se observó un incremento en el número de copias de la molécula L en la cepa que perdió el S2-dsRNA (Flores, 2008), comportamiento que ha sido observado en cepas que pierden sus genomas satélites debido a la mayor disponibilidad de las proteínas virales (Gag y Gag-Pol) para la encapsidación del genoma viral (Fujimura y cols., 1992; Carroll y Wickner, 1995). Estos resultados

sugieren que S2-dsRNA sería un genoma satélite dependiente de las proteínas proporcionadas por el genoma viral L-dsRNA.

Varios de los tratamientos aplicados, fueron exitosos para la eliminación del sistema viral de las levaduras como *S. cerevisiae*, *Y. lipolytica*, entre otras (Tréton y cols., 1987; Carroll y Wickner, 1995). La inducción de un estrés térmico puede afectar la actividad y estructura de las proteínas, alterando la fisiología celular y la de los virus presentes (Wickner, 1974). La levadura *X. dendrorhous* se ha aislado desde las regiones frías del planeta, siendo una levadura adaptada a estas condiciones y que tiene una temperatura óptima de crecimiento de 22 °C. Considerando lo anterior, el estrés térmico inducido sobre la cepa es observado en la baja gradual de la viabilidad celular a 30 °C, sugiriendo cierta tolerancia de la cepa a esta temperatura. El efecto negativo es más acentuado a 37 °C ya que no es posible detectar células viables después de 8 h de exposición. A pesar de estos efectos, el contenido de dsRNA no varió, sugiriendo que la propagación y mantención de estos elementos no fue afectada por el incremento de la temperatura. En trabajos previos, la cicloheximida provocó cambios en el contenido de dsRNA de la cepa UCD 67-385 de *X. dendrorhous* sin eliminarlos completamente (Castillo y Cifuentes, 1994). Este comportamiento es esperado de acuerdo a lo observado en *S.cerevisiae*, donde el antibiótico reduce la actividad de la maquinaria de traducción pero no impide la síntesis de las proteínas virales (Carroll y Wickner, 1995). La anisomicina se caracteriza por tener un efecto mayor en la propagación de los dsRNAs al disminuir la eficiencia del CML -1 y de la tasa de producción de la proteína Gag-pol, razón por la que es considerada una droga antiviral (Meskauskas y cols., 2003; Dinman y cols., 1997). La aplicación de este antibiótico en *X. dendrorhous* tiene un efecto inhibitorio en su crecimiento que es dosis dependiente de acuerdo a los resultados obtenidos tanto en placas y cultivos

suplementados con anisomicina, disminuyendo la viabilidad celular de la cepa. Este efecto sería más pronunciado al utilizar células obtenidas desde fase de crecimiento más tardías, de acuerdo a lo observado experimentalmente. La utilización de subcultivos como estrategia tuvo como fin prolongar la exposición al antibiótico a medida que las células iniciales se dividen. Este efecto de dilución de VLPs, permitió obtener más colonias curadas de S2-dsRNA desde la cepa UCD 67-385, en comparación a las obtenidas en trabajos previos (Flores, 2008; Castillo y Cifuentes, 1994). No se consiguió eliminar los dsRNAs restantes en la cepa 385 (S2-40), aun cuando de acuerdo a la secuencia parcial del L-dsRNA este correspondería a un genoma viral tipo *totiviridae* y que presentaría un posible sitio de CML -1 (Sanhueza, 2008). La higromicina B es otro inhibidor de la traducción en eucariontes que tiene efecto negativo en la translocación del ribosoma y en la afinidad entre el ribosoma con el aminoacil-tRNA (Borovinskaya y cols., 2008). En *X. dendrorhous*, este antibiótico tiene un efecto toxico disminuyendo la viabilidad celular, sin embargo no provocó cambios en el contenido de dsRNAs.

A pesar de todos los tratamientos de curación aplicados que afectaron la fisiología celular (inhibición de crecimiento y disminución de la viabilidad) no permitieron eliminar la totalidad de los dsRNAs, sugiriendo que las moléculas L, M y S son recalcitrantes a los tratamientos aplicados, fenómeno que ha sido poco descrito en levaduras. La existencia de más de un genoma *totiviridae*, podría favorecer la generación de las proteínas virales necesarias para la encapsidación de los dsRNAs y que aseguren su propagación. Esta idea sería reforzada por la existencia de un segundo genoma viral en la cepa UCD 67-385, el M dsRNA que es similar a la descrita para L-dsRNA y que contiene una RpRd (Sanhueza, 2008). En levaduras, sólo se ha descrito un sistema viral dual en *U. maydis*, en la cual se realizó experimentos de curación con cicloheximida, logrando eliminar sólo algunos

genomas del sistema viral (Kolting y cols., 1980; Bruenn, 2002). A pesar de estos antecedentes, no se puede descartar que L, M y S1 formen parte de un genoma viral segmentado, existiendo una alta interdependencia entre estos genomas. Para confirmar estos supuestos la caracterización molecular y funcional de los dsRNAs es requerida para determinar así la organización genómica de los virus presentes: verificar si el genoma esencial es o no segmentado, si existen otros dsRNAs satélites o si la complejidad observada es el resultado de la presencia de uno o más virus.

Recientemente se han encontrado copias de genes de plasmidios de dsDNAs y dsRNAs virales integradas en el DNA genómico en *S. cerevisiae*, *D. hansenii* y *K. lactis*, entre otras, llamadas secuencias nucleares de origen viral y plasmidial NUPAVs (Nuclear Sequence Plasmid and Viral origin), las que serían incorporadas por la maquinaria de reparación del DNA (Frank y Wolfe, 2009). Aún no se relacionado la presencia de estos con la replicación de los EGEs, los que podrían estar implicados en su mantención. Actualmente se está investigando la presencia de NUPAVs en *X. dendrorhous*.

4.3. Plasmidio pXd1-6938 de *X. dendrorhous*.

De acuerdo a los perfiles de EGEs, la cepa CBS 6838 sólo porta 2 dsDNAs de tamaño de 6,8 y 5,4 kb que fueron clonados considerando la estructura lineal utilizando la enzima DNA polimerasa I fragmento Klenow para reparar los extremos de la molécula. El fragmento clonado tiene un tamaño aproximado de 4,9 kb, presenta un tamaño menor al estimado inicialmente para los dsDNAs de la cepa. Esta diferencia es atribuida a las variaciones en la migración electroforética por la

presencia de proteínas de los extremos de los plasmidios, que los protegen de la degradación y que participarían en los procesos de replicación generando un extremo OH libre para iniciar la polimerización (Meinhardt y cols., 1997; Fukuhara, 1995). Santopietro y Kula (2001) también observaron estas diferencias al clonar y secuenciar el plasmidio, pDK1 que tenía un tamaño estimado en la electroforesis de 4,7 Kb, mientras que la secuencia obtenida fue de 4077 pb. Considerando esta diferencia, la molécula pXd1-6938 correspondería al dsDNA de menor tamaño de la cepa CBS 6938.

Las secuencias de repetidos invertidos (IR) identificados en pXd1-6938, fueron determinadas desde la identidad que presentaba con el plasmidio pDK1. No se encontraron otras secuencias de repetidos contrario a lo descrito para pDK1, donde el segmento de 32 pb forma una serie de 16 repetidos directos y que podrían estar implicadas en su replicación (Santopietro y Kula, 2000). La conservación de la secuencia de IR sugiere que son importantes para la replicación y que el mecanismo de mantención sería común para los dsDNAs en *X. dendrorhous*. El plasmidio pXD1-6938 no presentó identidades con otras disponibles en la base de datos del NCBI, formando parte de la amplia diversidad de secuencias de dsDNAs encontradas en levaduras.

El análisis bioinformático de la secuencia del pXd1-6938 se realizó utilizando distintas aproximaciones para con el fin de identificar las posibles regiones promotoras y ORFs presentes. La ausencia de sitios de unión a la RNA polimerasa y la carencia de homologías entre las unidades de transcripción detectadas con las secuencias de disponibles en la base de datos, sugiere que pXd1-6938 es un elemento críptico, que al igual que el otro plasmidio pDK1 identificado en *X. dendrorhous*, la funcionalidad de los elementos no ha podido ser determinada. No

se encontraron ORFs correspondientes a RNA y DNA polimerasa y que si han sido descritos para plasmidios de dsDNAs implicados en el sistema killer de *K. lactis* (Gunge y cols., 1981). La presencia de estos ORFs no es una constante en los plasmidios de dsDNAs que participan en la actividad antifúngica, encontrando en algunas especies sólo los ORFs que codifican sólo para las toxinas proteicas (Fukuhara, 1995). Los marcos de lectura abiertos encontrados en el pXd1-6938 y la ausencia de homologías con otras secuencias, sugieren que no codificarían para algún tipo de toxina.

El conocimiento de las secuencias de los plasmidios pXd1-6938 y pDK1 permitió evaluar mediante PCR la presencia de estas moléculas en las cepas de *X. dendrorhous*. El perfil de amplicones obtenidos con los partidores diseñados desde pXd1-6938 y utilizando como molde los dsDNAs de su cepa hospedera (CBS 6938), se observan 2 amplicones, uno que posee el tamaño esperado y otro de menor tamaño, sugiriendo que los dos dsDNAs presentes en esta cepa compartirían parte de sus secuencias. La obtención de amplicones de tamaño esperado con ambas parejas de partidores utilizadas sugiere la presencia del plasmidio pXD1-6938 entre sus dsDNAs en varias de las cepas de *X. dendrorhous*.

El número de amplicones detectados fue variable dependiendo del segmento que fue amplificado: la zona amplificada por C2F2-C2R7 sería menos frecuente entre los dsDNAs, mientras que el otro segmento amplificado por C2F7-C2R5 contienen más secuencias comunes entre estos elementos. Esto estaría relacionado con la presencia de una mayor cantidad de potenciales ORFs detectados en esta última zona. Las cepas que no se obtuvieron amplicones esperados pero que sí presentan otros de menor tamaño sugiere que los dsDNAs presentes en un mismo hospedero pueden tener secuencias comunes. Un análisis

similar se realizó con los partidores diseñados desde el plasmidio pDK1, obteniendo un único amplicon de tamaño esperado, sugiriendo que esta molécula estaría presente en la mayoría de las cepas de *X. dendrorhous*, con excepción de la cepa UCD 67-202. Estos resultados en su conjunto confirman la presencia de secuencias comunes entre los plasmidios que había sido descrita en trabajos anteriores (Kucsera y cols., 2000) mediante ensayos de hibridación. A pesar que algunas de las cepas de *X. dendrorhous* poseen perfiles de dsDNAs similares pueden presentar diferencias en las moléculas presentes encontrando una polimorfismo en número, tamaño y secuencia de estos plasmidios.

4.5. Actividad antifúngica y presencia de EGEs en *X. dendrorhous*.

Inicialmente los dsRNAs en la cepa UCD 67-385 que tienen un tamaño similar a las moléculas implicadas en el sistema antifúngico de *U. maydis*, sugirió que estos elementos podrían estar implicados en el fenotipo, excluyendo a la molécula S2-dsRNA considerando la mantención de la actividad en la cepa curada (Flores, 2008). A pesar de que todas las cepas analizadas en este trabajo presentan la actividad antifúngica *R. sloffiae* y *K. apiculata* (Oviedo, 2008), el polimorfismo en el número de elementos observados y la ausencia de estos elementos en algunas cepas, sugiere que los dsRNAs no serían las bases genéticas responsables de la actividad.

Otros elementos que pueden ser los responsables del fenotipo antifúngico son los plasmidios de dsDNAs. En las levaduras *K. lactis*, *Pichia acaciae* y *Pichia inositovora*, estos tienen un tamaño entre 6,8 y 18 Kpb, encontrando entre 2 a 3 moléculas que forman parte del sistema "killer". En *X. dendrorhous* los dsDNAs

presentan un tamaño entre 1,2 y 7 Kpb, entre los cuales existirían elementos que son comunes para todas las cepas analizadas. A pesar de la identificación de las secuencias de los plasmidios pXd1-6938 y pDK1 no permiten establecer una función de estas moléculas, la presencia de múltiples dsDNAs aún no caracterizados y secuenciados no permite descartar la participación de estos elementos en algún fenotipo en el hospedero, como la actividad antifúngica.

Trabajos realizados en nuestro laboratorio, describen la participación de una proteasa aspartica como la micotoxina responsable de la actividad antifúngica de *X. dendrorhous*. Los resultados obtenidos, se observó que el gen de esta proteína se encuentra en el DNA genómico de todas las cepas analizadas, sugiriendo que la base genética responsable de la actividad antifúngica sería un gen nuclear. La participación de genes nucleares en el fenotipo ha sido descrito en levaduras como *S. cerevisiae*, *Pichia farinosa*, *Pichia anomala*, entre otras, que se caracterizan por incrementar la permeabilidad de la membrana como mecanismo de acción (Magliani y cols., 1997). El efecto toxico de la proteasa aspartica sobre levaduras y hongos filamentosos no ha sido reportado previamente, sin embargo, se cree que la producción de proteasas puede ser un mecanismo de defensa contra hongos fitopatógenos, como en *Solanum tuberosum* (papa) (Mendieta y cols., 2006). La carencia de enzimas proteolíticas en los extractos extracelulares de *Rhodotorula* (Brizzio y cols., 2007), puede sugerir una sensibilidad en esta levadura por esta proteína secretada por *X. dendrorhous*.

5. CONCLUSIONES.

1. Las cepas de *X. dendrorhous* poseen por lo menos algún tipo de EGEs capaces de co-existir en un mismo hospedero, existiendo un polimorfismo en número, tamaño y secuencia entre los dsDNAs presentes
2. El polimorfismo en el número de dsRNAs en las cepas de *X. dendrorhous* sugiere que estos elementos no intervienen en la actividad antifúngica. Mientras que la participación de los dsDNAs en este u otro fenotipo en el hospedero, no puede ser descartada hasta que sean completamente caracterizados
3. Considerando la participación de la proteasa aspartica como posible micotoxina, un gen nuclear sería la base genética responsable para la actividad antifúngica descrita en *X. dendrorhous*,
4. Los dsRNAs L, M y S1 son recalcitrantes a los distintos tratamientos de curación aplicados. La caracterización molecular de estos genomas es necesaria para definir el sistema viral presente en *X. dendrorhous*.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Abeel T., Saeys Y., Bonnet E. 2008. Generic eukaryotic core promoter prediction using structural features of DNA. *Genome Res.* 18:310-323.
- Baeza M., Sanhueza M., Flores O., Oviedo V., Libking D., Cifuentes V. 2009. Polymorphism of viral dsRNA in *Xanthophyllomyces dendrorhous* strains isolated from different geographic areas. *Virology* 6:160
- Bang M., Villadsen I., Sandal T. 1999. Cloning and characterization of an endo- β -1,3 (4) glucanase and an aspartic protease from *Phaffia rhodozyma* CBS 6938. *Appl Microbiol. Biotechnol.* 51: 215-222.
- Borovinskaya M., Shoji S., Fredrick K., Cate J. 2008. Structural basis for hygromycin B inhibition of protein biosynthesis. *RNA* 14: 1590-1599.
- Brizzio S., Turchetti B., de García V., Libkind D., Buzzini P., van Broock M. 2007. Extracellular enzymatic activities of basidiomycetous yeasts isolated from glacial and subglacial waters of northwest Patagonia (Argentina). *Can J Microbiol.* 53(4): 519-525
- Bruenn J. 2002. The double-stranded RNA viruses of *Ustilago Maydis* and their killer toxins dsRNA Genetics elements. Tavantzis S. CRC Press. Boca Ratón.
- Cansado J., Longo E., Agrelo D., Villa T. 1989. Curing of the killer character of *Saccharomyces cerevisiae* with acridine orange. *FEMS Microbiol. Lett.* 65: 233-238.

Carroll, K., Wickner, R. 1995. Translation and M1 double-stranded RNA propagation: MAK18-RPL41B and cycloheximide curing. *J. Bacteriol.* 177: 2887-2891.

Castillo, A., Cifuentes, V. 1994. Presence of double-stranded RNA and virus-like particles in *Phaffia rhodozyma*. *Curr. Genet.* 26: 364-368.

Castro M., Kramer K., Valdivia L., Ortiz S., Castillo A. A double-stranded RNA mycovirus confers hypovirulence-associated traits to *Botrytis cinerea*. *FEMS Microbiol. Lett.* 288:87-91.

Chen W., Han Y., Jong S., Chang S. 2000. Isolation, purification, and characterization of a Killer Protein from *Schwanniomyces occidentalis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:5348-5352.

Cong Y., Yarrow D., Li Y., Fukuhara H. 1994. Linear DNA plasmids from *Pichia etchellsii*, *Debaryomyces hansenii* and *Wingea robertsiae*. *Microbiol.* 140:1327-1335.

Dinman, JD. 1995. Ribosomal frameshifting in yeast viruses. *Yeast* 11: 1115-1127.

Dinman, JD., Ruiz-Echevarria, M., Czaplinski, K., Peltz, S. 1997. Peptidyl transferase inhibitors have antiviral properties by altering programmed -1 ribosomal frameshifting efficiencies: development of model systems. *Proc. Natl. Acad. USA.* 94: 6606-6611.

Dinman, JD., Wickner R. 1992. Ribosomal frameshifting efficiency and gag/gag-pol ratio are critical for yeast M1 double-stranded RNA virus propagation. *J. Virol.* 66: 3669-3676.

Esteban R., Wickner R. 1988. A deletion mutant of L-A double stranded RNA replicates like M1 double-stranded RNA. *J. virol.* 62:1278-1285.

Farabaugh P. 1996. Programmed translational frameshifting. *Microbiol. Rev.* 60: 103-134.

Fell J., Blatt G. 1999. Separation of strains of the yeasts *Xanthophyllomyces dendrorhous* and *Phaffia rhodozyma* based on rDNA IGS and ITS sequence analysis. *J. Ind. Microbiol. Biotech.* 23: 677-681.

Fink G., Styles C. 1972. Curing of a killer factor in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 69: 2846-2849.

Flores O. 2008. Relación entre la presencia de virus de dsRNA y la actividad micocida en *Xanthophyllomyces dendrorhous*. Memoria de título para optar al título de Ingeniero en Biotecnología Molecular. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

Frank A., Wolfe K. 2009. Evolutionary capture of viral and plasmid DNA by yeast nuclear chromosomes. *Eukariotic Cell* 8:1521-1531.

Fukuhara H. 1995. Linear DNA plasmid of yeast. *FEMS Microbiol. Lett.* 131:1-9.

Fujimura T., Ribas J.C., Makhov M., Wickner R. 1992. Pol of gag-pol fusion protein required for encapsidation of viral RNA of yeast L-A virus. *Nature* 359: 746-749.

Ghabrial S., Patterson J. 1998. Totiviruses (Totiviridae). Granoff A., Webster R. (eds). *Encyclopedia of Virology*, 2nd Edition. pp 1808-1817. Academic Press. New York, USA.

Griffiths A. 1992. Fungal senescence. *Annu. Rev. Genet.* 26:351-372.

Gunge N., Tamaru A., Ozawa F., Sakaguchi K. 1981. Isolation and characterization of linear deoxyribonucleic acid plasmid from *Kluveromyces lactis* and the plasmid-associated killer character. *J. Bacteriol.* 145:382-390.

Goss T., Harger J., Carr-Schmid A., Kwon J., Shastry M., Justice M., Dinman J. 2002. New targets for antivirals: the ribosomal A-site and the factors that interact with it. *Virology* 15;300(1):60-70.

Hall T. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41:95-98.

Hermanns J., Asseburg A., Osiewacz H. 1994. Evidence for a life span-prolonging effect a linear plasmid in a longevity mutant of *Podospora anserina*. *Mol. Gen. Genet.* 243:297-307.

Institute of advanced biomedical technologies. (2000)
WebGene (<http://www.itba.mi.cnr.it/webgene/>). ITBA, National Research Council (CNR), Milan, Italy.

Koltin Y., Levine R., Peery T. 1980. Assignment of functions to segment of de dsRNA genome of *Ustilago Maydis*. *Mol. Gen. Genet.* 178:173-178.

Kucsera J., Pfeiffer I., Takeo K. 2000. Biology of the red yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*). *Mycoscience.* 41: 195-199.

Johnson, E. 2003. *Phaffia rhodozyma*: colorful odyssey. *Int. Microbiol* 6: 169-174.

Jablonowski D., Shaffrath R. 2007. Zymocin, a composite chitinase and tRNAse killer toxin from yeast. *Biochem. Soc. Trans.* 35:1533-1537.

Libkind D., Ruffini A., Broock V. M., Alves L., Sampaio JP. 2007. Biogeography, host specificity, and molecular phylogeny of the basidiomycetous yeast *Phaffia rhodozyma* and its sexual form, *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Appl Environ Microbiol.* 73: 1120-1125.

Magliani, W., Conti, S., Gerloni, M., Bertolotti, D., Polonelli, L., 1997. Yeast killer systems. *Clinical Microbiol. Rev.* 10: 369-400.

Martinez C., Hermosilla G., León R., Urzúa B., Cifuentes V. 1994. Presencia de plasmidios de DNA doble hebra en *Phaffia rhodozyma*. *Boletín Micológico.* 9:1-2.

Mass M., Van Mourik A., Hoekstra R., Debets A. 2005. Polymorphism for pKALLO based senescence in Hawai populations of *Neurospora intermedia* and *Neurospora tetrasperma*. Fungal Genet. Biol. 42:224-232.

Meinhardt F., Schaffrath R. Larsen M. 1997. Microbiol linear plasmids. Appl. Microbiol. Biotechnol. 47:329-336.

Mendieta J.R., Pagano M.R., Muñoz F.F., Daleo G.R., Guevara M.G: 2006. Antimicrobial activity of potato aspartic proteases (StAPs) involves membrane permeabilization. Microbiology. 152:2039-2047.

Mertens P. 2004. The dsRNA viruses. Virus Res. 101: 3-13.

Meskauskas, A., Harger, JW., Muldoon., KL., Dinman, J. 2003. Decreased peptidyltransferase activity correlates with increased programmed -1 ribosomal frameshifting and viral maintenance defects in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. RNA 9: 982-992.

Miller MW, Soneda M. 1976. Phaffia, a New Yeast Genus in the Deuteromycotina (Blastomycetes). Int. J. Syst. Bacteriol. 26:6.

Niklitschek M. (2007). Desarrollo de un cassette de resistencia a antibiótico en *Xanthophyllomyces dendrorhous*. Tesis para optar al título de Ingeniero en Biotecnología Molecular. Facultad de Ciencias. Universidad de Chile

Nuss D. 2005. Hypovirulence: Mycoviruses at the fungal-plant interface. Nature 3: 632-642.

Nuss D.1996. Using hipoviruses top robe and perturb signal transduction processes underling fungal pathogenesis. *Plant Cell* 8:1845-1853

Oviedo V. 2008. Espectro de actividad micocida de *Xanthophyllomyces dendrorhous* Memoria de Título para optar al título de Ingeniero en Biotecnología Molecular. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

Pfeiffer, I., Kuscera, J., Varga, J., Párduez, A., Ferenczy, L. 1996. Variability and inheritance of double-stranded RNA viruses in *Phaffia rhodozyma*. *Curr. Genet.* 30: 294-297.

Pfeiffer I, Litter J, Péntzes ZS, Kucsera J. 2001. Effects of double-stranded RNA viruses on the reproduction of *Phaffia rhodozyma*. *Acta Biol Hung.* 52:299-306

Prestridge, D.S. 1995. Predicting Pol II promoter sequences using transcription factor binding sites. *J. Mol. Biol.* 249: 923–932.

Sanhueza M. 2008. Identificación de un sistema viral del tipo de dsRNA presente en *Xanthophyllomyces dendrorhous*. Tesis presentada para optar al grado de Magister en Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

Santopietro L., Kula M. 2001. Cloning and nucleotide sequence of a linear DNA plasmid from *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia Rhodozyma*). *Folia Microbiol.* 46:277-288

Sambrook, J., Fritsch, E., Maniatis, T. 1989. Molecular Cloning, a laboratory manual. 2nd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York

Schmitt , M., Breinig, F., 2002. The viral killer system in yeast: from molecular biology to application. FEMS Microbiol. Rev. 26: 257-276.

Schmitt M., Breinig F., 2006. Yeast viral killer toxins: lethality and self-protection. Nat. Rev. Microbiol. 4: 212-220.

Stark M., Boyd A. 1986. The killer toxin of *Kluyveromyces lactis*: characterization of the toxin subunits and identification of the genes which encode them. EMBO J. 5: 1995-2000.

Tréton B., Le Dall M., Heslot H. 1987. UV-induced curing of the double-stranded RNA virus of the yeast *Yarrowia lipolytica*. Curr. Genet. 12: 37-39

Wesolowski M., Fukuhara F. 1981. Linear Mitochondrial Desoxyribonucleic Acid from the Yeast *Hansenula mrakii*. Mol. Cell Biol. 1:387-393.

Wickner R. 1974. "Killer Character" of *Saccharomyces cerevisiae*: Curing by Growth at Elevated Temperature. J. Bacteriol. 117: 1356-1357.

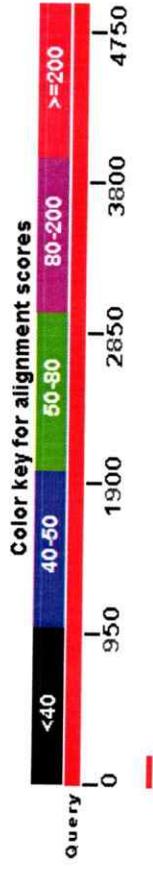
Wickner R., 1996. Double-stranded RNA viruses of *Saccharomyces cerevisiae*. Microbiol. Rev. 60: 250-265.

Anexo 1. Secuencia del plasmidio pXd1-6938

A

1 **TTGGGGTATAT** **ACTGTATAGT** **ATACCTATAG** TAATCCCTCT TATAGTGTTA TACCTGTATT AGTGTAGTCT ATGTATATCA AATCAGCTTT
 101 GCTCCGCTCC CACAACHTTC TACATGAAAG TGTGTAAGG AAGGGCCCTT TCATTACAAA GTAIGTTTTA AAAACGCATA TAGAGAGAA
 201 AACGAAACTC CCGGGCATT AATTGCCGA ATGAGGAGGA CTAGGGGAA CTAGGTTAGG ATTCTCTTCC CCCCTCCATA GACATTAGTG
 301 TGTAGCGAGA GACTTCGTTT GTCATCTAGG CTTATGCCCTC GACTGAGCTA GAAGATAGAA GTCTCGGGAT AAGCTTGTTA GTAAGACGTG GGAGCCTATG
 401 CAGCTCCCGC CTTTAGGCGG AAAGCAAGAA GAGARAAGTA GTGTCTCGG CACTGAGCTA AGTACTGCTA GCAGTACCTG CTTTGAGGAA AGCACTAGTC ATCCAACCTCG
 501 TTGCGTGAAA CGTACATCCG GTAAACGGG CATTAGTAGG CAACGAGGAT TAGTGGCGTG TACAACTGTG GGATGAAGCT GTGTAGGGTG TAAGCCTGTA
 601 AGGGTTTATG CTTTATAAT GTGTGCAGGA GAATAGCAGG GGATCGTGGC TGAACAGAGG ATATTGAACA CAAAAGACCG TAGGGACCCG GTGTCTCCAA GAAGACGAGG
 701 ATGCCCTCAGT GATGGAGATC ACGAGAGCT ACCCTCGCAG AGCTCCTCCCT GAACTTACC GAAAGAAAGG CTATCTTTTA GGCACCTCTC TATAGCCCTAT
 801 TTGGTAGACG TACTTCGCTT ACTCGCTCAG CTATTGCTCA GAGAACTTAT GATTTCTCAT AGCTCCTTT AGGTATTTTT GAGCACCTC TCTCGCAAG GAATGCTGA GCTACGGTAG
 901 ACTGCTCTGC GAGCAGTAG GATTGCTGAG AATCATTTGT CTCGAGCTAT AGCTCGGAGA GAGTATTTTT GTTCGGCATT AFACTCGCTC TCTCGCAAG TCTGTGTTCT TTGGCAATG GAGCTCGTCT
 1001 TCGCCTGTTT GTTTGCGAAG AATCATTTGT TTGGCTACTA CCTTTGGCAG TAGCCITTAG GFTTCGGCATT CTTACCTCG CTTCTAGCTG TACTCGACTC TACCTCGCT CTCTCCGCT TTTTCTCTTA TATTTTTATA AGAGAGGCAG
 1101 CGCTCTGAG GAGAGCTTAT TTGGCTACTA CCTTTGGCAG TAGCCITTAG GFTTCGGCATT CTTACCTCG CTTCTAGCTG TACTCGACTC TACCTCGCT CTCTCCGCT TTTTCTCTTA TATTTTTATA AGAGAGGCAG
 1201 GAGCCTCGAG CTCCTCTTCC TAAGCAGACC CTGTCTACTT ACTCGTAGCT TTGCTCTGTC TCCCTTAGCA CTTTCCGGG CTTTAGCCTT CCCTCAGAGA TCCGCACTCAT TCGCTACGCT CCCTCTGCTT
 1301 CTGTCTTGAG CTAAGAAGGA GGAGGAGCCT TACAGGCTGT TACAGGCTGC TTGCTCTGTC TCCCTTAGCA CTTTCCGGG CTTTAGCCTT CTGCTTCTCT TTTTCTCTTA TATTTTTATA AGAGAGGCAG
 1401 TTCATTTGAC TCAGGCTTT TCGTGCCTCA GAAGCAGAGC GCAGAGTTTT TCCCTTAGCA CTTTCCGGG CTTTAGCCTT CTGCTTCTCT TTTTCTCTTA TATTTTTATA AGAGAGGCAG
 1501 TTGCTCTCC GTAGGGTCC TCAGGCTAAA GCAGAGTTTT TCCCTTAGCA CTTTCCGGG CTTTAGCCTT CTGCTTCTCT TTTTCTCTTA TATTTTTATA AGAGAGGCAG
 1601 CTCCTGTGC CTTGGCACT TATAGAAGCA TCACTCGGTT AGGGCTATTG TGAAGGAGCT AGCGCTCACT CTTTCCAG TCTTTCACAC CACTCTGGTG GTGTAGATGA ATAGGCTAG TCGCCTATT
 1701 AATAGCCCTT GAAAGGTTTT GCTGTTGAG CTTCTCTTCC TGAAGGAGCT AGCGCTCACT CTTTCCAG TCTTTCACAC CACTCTGGTG GTGTAGATGA ATAGGCTAG TCGCCTATT
 1801 GAAGGGGTTT TTTACCOCGA ATAGCCTTGC TTTGGGGGAG TCTTTCAG
 1901 GTGTTCAATG AGAGCTATTG TTCTCGGAAA GCTTTGAAGA GATTTTTAAA CTTTGAAGC TTTTCCGTA AGGGAGGAA GCGCATGTC GCGTACTCT TCGCCTATT
 2001 CTGAGCTCCG ACTCTAAGCA CTCCTATCTA TCTGCTTTTG GATGCATAG ATAGGAGCT TACCCCTGTA GCTCTTTAG GCTCTTTAG TACTGAGAAA TACTGAGAAA AGCTCTAGCT
 2101 TTTAAGCTTT GTTTAGCTTC GGCTTTACTC TGCAGAGAAC CCCTTTGCTT TTGTTAGCT TCGTAGGGGT AATGGACCCG GCTTTGAGG GTTTGAGG GTGTTACCCG
 2201 ATCTTTGAAA AACTCTTCTA GCCTCTAGAG CCCTCTTTGG TAAGTTTAAG CCGTCTCTAT TGGCTATTGA GGTATTGTAC TCGTACAGC GTCGAARAG
 2301 ACATGTGACG TCGAGCGCTC TCCCTCGCAG AGGACTTTTG AGAAATAGCC ATTGGCTTGT TCGATTTGGAA GAGGATACTA TTCTTCTTTT TGGCTTTGCG
 2401 CCTAGAGAG CTATGGAAGC TCTACTTATA AACCTTTAGG GGCTAGTAGA GCCCTATACT TTTTAGAGCA CTCTGTGTAG CGCTGGATGA GGCTCTGCC
 2501

B

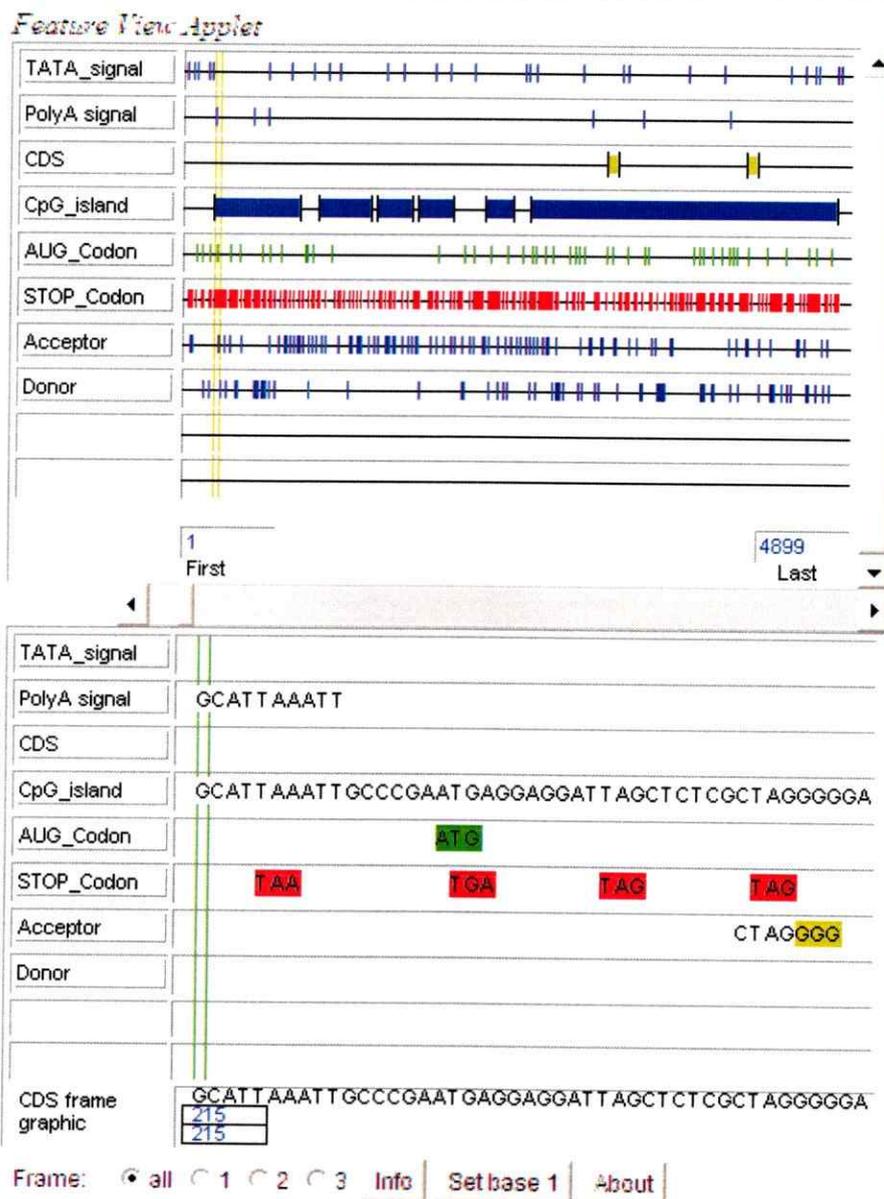


Sequences producing significant alignments:

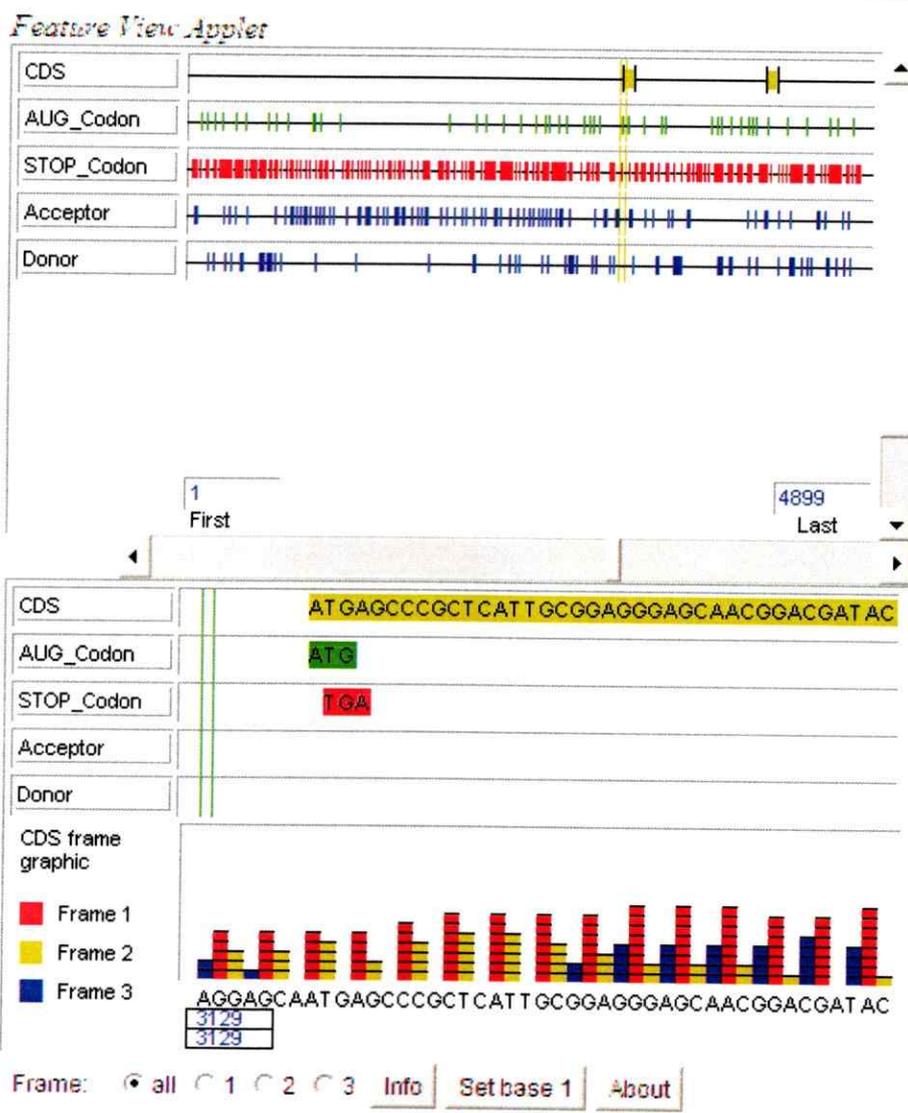
Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
AJ278424.1	Xanthophyllomyces dendrorhous partial pDK1 plasmid	268	1911	4%	2e-67	100%

Secuencia del plasmidio pXd1-6938 de *X. dendrorhous*. A. Secuencia nucleotídica del plasmidio (4896 pb). En verde se muestra los repetidos invertidos de 30 pb B. Identidad nucleotídica con el plasmidio pDK1.

Anexo 2. Análisis de pXd-6938 mediante WebGene.

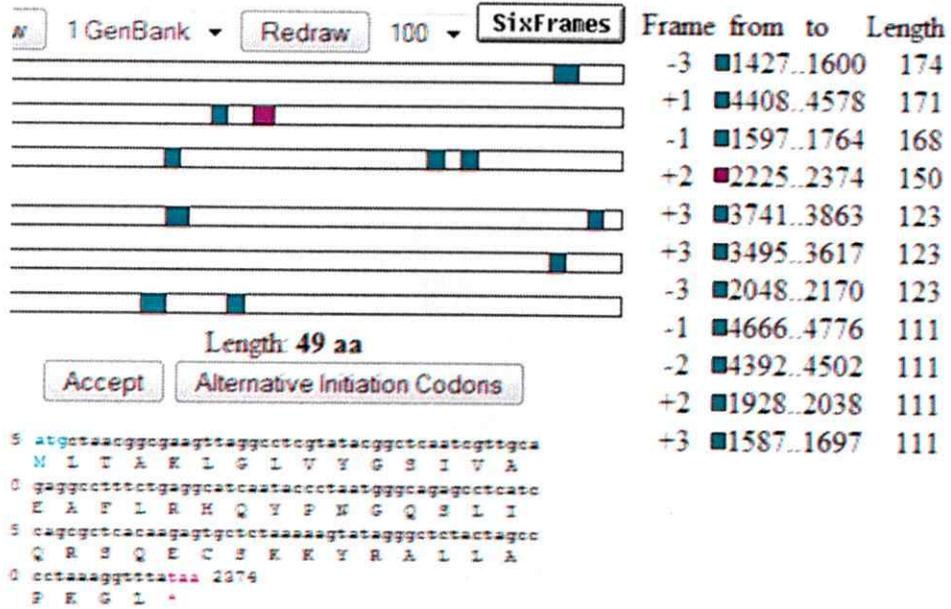


Identificación de secuencias involucradas en la transcripción de genes eucariontes en pXd-6938. Utilizando la herramienta Gene Builder se identificaron todos los posibles sitios de la caja TATA, codones de inicio y término de la transcripción, exones, sitios de poliadenilación en la secuencia de pXd-6938.



Predicción de genes codificantes de proteínas (CDS) en pXd-6938. El análisis se realizó en los tres marcos de lectura posibles prediciendo 2 secuencias que codificarían para proteínas (CDS). Estas no presentan homologías con las secuencias disponibles en la base de datos.

Anexo 3. Marcos de lectura abierto (ORFs) detectados para pXd1-6938 por la herramienta ORF Finder.



Anexo 4. Secuencia del gen *asp* de *X. dendrorhous*.

1 TCTCTGTCCT TGTATCTATT CCTACCCATC ATGATCTCTG ACACCGTCAAT GCCAATCTTT GCCGTGGCCC TCGTGGGCTC GACCGTACAA GCAGTCCCTG
101 TCGAATGGGAC CGGACCTCA ACCTCAGGTA TTATCGGGT COCAATCTCA AAGAGCGCTG CTCAGGTTGC TCGAGAGGCC GACCGGGTGC TATCTCTCGA
201 CTGGCTCAAG AAGACCAAAG CTCAGGCTCA GTAAGTCACTG TTTTCAATGC CACTCTTTGA GTGTAATCTT GGTCTCGATT TGCCTGTGC GGACATGGTT
301 CTGACTAGGC ATGTGCGGTG ATGTGCGGTT CGACATATAG TAAGCACAAAG CAGGCCAAAG CCCGGCTTCA CTCRAAGCGA GCCACCGGAG CATCCGTTTT
401 GACCGATCAG GGAAGTGAGT CTCTCTGGAC TGGACCTATC ACCATCGGTG GACAATCCTT GTGCGTTTCC GTCATCAAGT CTTTTTTTTT CTTCCTGGTA
501 GTATCGGGAT TTAGGGGCTA ACGTACGTTT GGTAATCGTA TTCGGGTCC TTCTCTTCCCT CTAGTACTGT CGACTGGGAT ACCGGTTTCAI CTGATTTATG
601 GCAAGTCCGA CATCATCTA TTCTATCTAT ACAACACGCT CTCAACCTGC TTCATTTTCAI GTACTTCTCT TGAATAGGTT TCCTTCTTCC GCGTGTCAA
701 GCGGTGCCCT TAAGGCACAC CACAAGTATA CCTTGACCTC CACTGGAAAG AAGGTAATGA TGCTCGCTCA GTCTTCAAG ACCTCTCGCC CAAAAGCTAA
801 CCTGTCAAG ATTGAAATA TATAG AATCC GGCACGTTCT CGATCTCCTA CGGAGACGGC TCGAGCGGCTT CCGGTCCAGT CTACAAGSAC AAGTCTGTGG
901 CTTCGGGACT CGAGGGGACA TCCCAGGTGT TCGGGGGCGT CACCTCAGAG TCTAGCTCTG TGAGTGTTTT CCTTTATTTT GTCTACTCG TCGAGCAAAA
1001 GGGCCCAGGA TGTGTTCTGA TCATGTGTAT TCGTTCACCT CCCTTGTTC ATAGTTCTCG TCTGATCCAT CTGATGGAAI CAGGGGTCTC GGTGGCCCTG
1101 CGTFCGCCCCA GTTGTCCGGA ACATCATATT TCTGTACGTA GTGAAAAGCT CTTGTTTCTG TGCTTATTTG TTTTGGTCTT TTTCTAACTC TGGTTTGGAT
1201 TTCTCTCTTT TTCTTCACTA TCAAAGTCT CTGATCAACC AGGTACGGT AACCTCCCA GTGTTCTCTT TCAGGCTCCG CACCACAAAC TCTGAGCTCT
1301 GTACGTTACT TTCCTTTCT TGCATCTCAC TCAATTTGAT TCATGCTGGT GCTAACCTAA AGTTTCCCTT TGTTTTCCCTC TTCCGAAAAG AGTTGGGGGG
1401 AATTAACCTG GCCACTACA CTGGTGGGAT CACTTACAG CCTGTCACTC AGAAGCCCA CTGGACGATC GCCCTTGGTG GAGTCTCCGG TATGCTGTCT
1501 CGTCTGTTT TAATTTCTAT CAGCAACTCT CAAGTTTTGA ACTGCAATTC ACCCGATTGA TCTCTTTTCT GTATTTTCTG CCGTTTTCAG T CAACGGGGCT
1601 GCCATTAACC CCTCCGTTTC GAGCGTATC ATTGATACCG GTCAGTCTGTT TTCCTAGTTG TATGCTGACT AGGACTTGA GCTGTCTTTC TCACCTCTTT
1701 TTCTTTTACA CACACACTGC CCGTTTTGTA GGAACACTCT TGGTGTATGG TCCCACTGGG GGAGTCCGCTG CGGTGTAGGC AAAGATTCCG GGATCCGCTT
1801 CGATGGCTGA TACCTATGGA TCCGACTATC AAGGTTACTA CACCTTCCCT T GTAAGTTCC TTTCCTCCCTG CTCTCCCTCT TTTTTTCTCTT TTCCTGTTTT
1901 TTTTTTGGCT CCTCCTTCT AGTCGGGCA GGTTCACG GGTTCACG CCTCTCTCCG GCGCAGCAGG ACITTTTCTAA ATTAATTAAC TTGATTGAA

2001 AAAATCGAAT ATAGGCTCGG CCGTTCCAAC GGTAGCCTTG ACGTTCGGAG GATCGTCCCT ACTTCTCCGT TCAACCTAGG AACAGTCTCAT
 2101 CCGGGTCGAA GCAGTGTGTA GGTGGAATCG TAGGCCAGGG TGATGGATCC TGCTTGGTCG GTGATGTCTT CTTCAGGGC GATAAGTGAG CTTCCCTTCCCT
 2201 TTTCTTCCCTT CTTCTCCCTCC AGTTGTCCCT CGTGTGTTGTT TGTTTGTGTTG TTTTTCGTC GAGCTGATGA ATGTTCTTTC GTCCGGGACA CCTTTTCTTC
 2301 TTCGTTTCGT AAAAGCTCAA TCTACGATGT TGSAAACGCC AGAGTCGGAT TCGCCAAGAC CGTCTAAAAG AAACCGAAGG CTTTTCCTCT CATCTTCTCTT
 2401 CTCTTTATAA TTCAGACGGC AAGCGGGAGG GAGCATCTAG TTCTATATCA GCATGGTCGG GGACGGCAG TATTGTACTC TAGGCAGGGA TATAAAAAGAT
 2501 AGAACGAATG GATGGATAAA AGGAAGGAAT CTRAAAGAAA ACAGACATGC CAAGAGGATG AACCGAGCTG AGCTTAGATA AAAGTTCCC TCGATCTTCTG
 2601 TTTCCGAATAG TTTGACTTGA TCTATCAATA TACCCCGTTC ATCGTCTCTG TTTGCTTGTT TTGAAAAGAA TGAGAGAAG AGATCCAAA GATGAGCGATA

Secuencia del DNA génomico de *X. dendrorhous* que contiene el gen *asp*. Secuencia nucleotídica del gen *asp*. En verde:
 codones de inicio y término de la traducción. En amarillo: Secuencias exónicas. En blanco: secuencias intrónicas.