

UCH-FC
Doc-Microb
F 634
C.1

**IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE LOS
ELEMENTOS GENÉTICOS EXTRACROMOSÓMICOS DEL TIPO dsRNA EN
XANTHOPHYLLOMYCES DENDRORHOUS**



Tesis

Entregada a la Universidad de Chile

En cumplimiento parcial de los requisitos para optar al grado de
Doctora en Ciencias con mención en Microbiología
Facultad de Ciencias

Por

Oriana Isabel Flores Díaz

Agosto 2014

Santiago-Chile

Director de Tesis: Dr. Marcelo Baeza Cancino

Co-director: Dr. Víctor Cifuentes Guzmán

FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD DE CHILE

**INFORME DE APROBACION
TESIS DE DOCTORADO**

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 Doctor en Ciencias con mención en Microbiología, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 2 de Junio del 2014.

Director de Tesis:

Dr. Marcelo Baeza C.

Co-Director de Tesis:

Dr. Víctor Cifuentes G.

Comisión de Evaluación de la Tesis

Dra. Margarita Carú M.

Dr. Carlos Jerez G.

Dr. Claudio Vázquez G.



[Handwritten signature of Dr. Marcelo Baeza C.]
[Handwritten signature of Dr. Víctor Cifuentes G.]
[Handwritten signature of Dra. Margarita Carú M.]
[Handwritten signature of Dr. Carlos Jerez G.]
[Handwritten signature of Dr. Claudio Vázquez G.]

A mis padres, Isabel Díaz y Luis Flores
A mi familia



Nací un 9 de enero de 1984 en la ciudad de Arica, lugar donde viví durante 18 años con mis familia. Mi aventura universitaria comenzó en el 2002 cuando ingresé al Programa Académico de Bachillerato de la Universidad de Chile. De esta gran etapa a tengo los mejores recuerdos, donde con mucho esfuerzo logré superar mis primeros desafíos. El ingreso a la carrera de Ingeniería en Biotecnología Molecular en el 2004 marcó el inicio de mi camino en la ciencia, donde adquirí los conocimientos básicos para comprender el complejo y desafiante mundo del trabajo en investigación. El laboratorio de Genética de la Facultad de Ciencias fue mi hogar por muchos años (8 en total), lugar que me permitió crecer profesionalmente y me dio la seguridad para ingresar al Magister en Ciencias Biológicas y posteriormente al Doctorado. Aunque esta última etapa no fue fácil, me quedo con la satisfacción de haber cumplido con la tarea y que todo lo aprendido lo utilizaré en los nuevos desafíos profesionales y personales que tenga en mi futuro.

AGRADECIMIENTOS

Las palabras se hacen pocas para agradecer infinitamente a mis amados padres Isabel y Luis por su amor, paciencia y apoyo incondicional durante toda mi vida y durante todo este largo camino. Todos mis logros son gracias a ustedes. A mi tutor Dr. Marcelo Baeza que fue esencial para el desarrollo de este trabajo y para mi formación profesional durante todos los años que estuve en el laboratorio para las distintas tesis de pregrado y postgrado. Gracias por toda la paciencia, críticas, apoyo, discusiones de trabajo y sobretodo amistad que me ayudaron a terminar esta tarea. Al Dr. Victor Cifuentes por permitirme trabajar en el laboratorio de Genética, mi segundo hogar, por invitarme participar en las ayudantías y por su preocupación y apoyo constante por mi desarrollo profesional y personal. A todos los que forman o formaron parte del Laboratorio de Genética con los que compartí muchas jornadas de trabajo y momentos de esparcimiento, especialmente a Salva y Rafa que me ayudaron siempre. Gracias al grupo "killer": Mario, Pablo (gracias por los RT-qPCR) y JuanMa por el ambiente "serio" de trabajo, amistad y compañía. A Dony por su cariño, apoyo y ayuda. A mis compañeritas y amigas de laboratorio Iris, Sole y Gabi por tantos momentos y aventuras que compartimos. A mis amigos del alma Carolina, Fernanda, Javiera, Felipe, Nelson, Claudia, por su amistad y cariño en todos estos años, porque siempre estuvieron conmigo. A CONICYT por las becas otorgadas para el financiamiento de mis estudios de Doctorado y de la investigación, y por la Beca Chile de Pasantía Doctoral. Gracias a la Dra. María Fernandez Lodato por permitirme realizar parte de mi trabajo en el Centro de Biología Molecular Severo Ochoa en Madrid, España y al proyecto FONDECYT 1100324 que financió parte de mi trabajo.

ÍNDICE

Índice.....	iv
Índice de Figuras.....	v
Índice de Tablas.....	vii
Abreviaturas.....	viii
Resumen.....	x
Abstract.....	xiii
Introducción.....	1
Hipótesis.....	10
Objetivos.....	11
Materiales y métodos.....	12
Materiales.....	12
Métodos.....	15
Resultados.....	28
Discusión.....	56
Conclusiones.....	62
Bibliografía.....	63
Anexos.....	75

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Organización genómica de las moléculas de dsRNA presentes en <i>S. cerevisiae</i>	3
Figura 2. Ciclo de replicación viral en <i>S. cerevisiae</i>	5
Figura 3. Perfiles de dsRNAs presentes en las cepas de <i>X. dendrorhous</i>	8
Figura 4. Perfiles de dsRNAs de los aislados chilenos de <i>X. dendrorhous</i>	29
Figura 5. Efecto de la anisomicina sobre el crecimiento y contenido de dsRNAs de la cepa RV4 de <i>X. dendrorhous</i>	34
Figura 6. Ensayos de protección a la digestión con RNAsa A con los extractos de VLPs de las cepas de <i>X. dendrorhous</i>	41

Figura 7. Separación y análisis de los componentes de las VLPs

aisladas desde las cepas de *X. dendrorhous*.....43

Figura 8. Análisis de las proteínas Gag de los genomas virales

de *X. dendrorhous* por MALDI-TOF/MS.....48

Figura 9. Alineamiento y análisis estructural de las proteínas

Gag de *X. dendrorhous*.....51

Figura 10. Microscopía electrónica de transmisión de las VLPs

aisladas desde las cepas portadoras de L1 y/o L2-dsRNAs.....55

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Levaduras utilizadas en este estudio.....	13
Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo.....	14
Tabla 3. Actividad antifúngica de las cepas de <i>X. dendrorhous</i> en distintas condiciones de temperatura y pH.....	31
Tabla 4. RT-PCR con los L1 y L2-dsRNAs aislados desde las cepas de <i>X. dendrorhous</i>	37
Tabla 5. Alineamiento de los cDNAs secuenciados del L1-dsRNA de la cepa RV4 con la base de datos GenBank.....	39
Tabla 6. Distribución de los componentes de las VLPs de <i>X. dendrorhous</i> en el gradiente de sacarosa.....	46

ABREVIATURAS

CML	Corrimiento del marco de lectura
EGEs	Elementos genéticos extracromosómicos
dsDNA	DNA de doble hebra
dsRNA	RNA de doble hebra
dNTPs	Desoxinucleótidos
EDTA	ácido etilendiaminotetracético
gDNA	DNA genómico
ICTV	Comité Internacional de Taxonomía de Virus
NCBI	National Center of Biotechnology Information
ORF	Marco abierto de lectura
RDRP	RNA polimerasa dependiente de RNA
ScV	Virus de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	dodecil sulfato de sodio
ssRNA	DNA de hebra simple
TAE	amortiguador tris-acetato-EDTA
TE	amortiguador tris-EDTA

Tris	tris(hidroximetil)aminometano
VLPs	partícula tipo virus
YM	medio de cultivo completo
XdV	Virus de <i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i>

RESUMEN

Xanthophyllomyces dendrorhous es una levadura basidiomicete aislada desde distintas regiones frías del planeta y que se caracteriza por producir astaxantina, un pigmento utilizado en la industria acuícola y farmacéutica. En la mayoría de las cepas de esta levadura se describió la presencia moléculas de RNA de doble hebra (dsRNA) y partículas tipo virus (VLPs). Este tipo de Elementos Genéticos Extracromosómico es comúnmente encontrado en levaduras y hongos filamentosos, los cuales se encuentran encapsidados en VLPs. Las investigaciones realizadas en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* permitieron identificar a los dsRNAs como micovirus dando origen al género *Totivirus*, cuyos miembros poseen genomas no segmentados con dos marcos de lectura abiertos sobrepuestos, que codifican para la proteína de la cápside y para una RNA polimerasa viral. Algunos aislados de *S. cerevisiae* que tienen un fenotipo conocido como "killer" (capacidad de matar a otras levaduras) además poseen otros dsRNAs M-dsRNA que codifican para una micotoxina y la inmunidad a la misma. Estos M-dsRNAs son considerados elementos llamados "satélites" porque dependen de las proteínas virales codificadas por el genoma viral para su replicación y mantenimiento, conformando de esta forma un sistema viral conocido como helper/satélite. En las diferentes cepas de *X. dendrorhous* existe una alta variación en el número y tamaño de las moléculas de dsRNAs presentes, incluso existiendo una relación con el origen geográfico. En estudios realizados por nuestro grupo con la cepa UCD 67-385, que posee 4 dsRNAs de diferente tamaño, se logró identificar tres genomas de *Totivirus* distintos. En el presente trabajo se realizó una caracterización molecular y funcional de los dsRNAs presentes en cinco cepas de *X. dendrorhous* que

se diferencian el tipo de dsRNAs que contienen, de acuerdo con su tamaño. En cada cepa se evaluó la existencia de dsRNAs virales y satélites, la encapsidación de los dsRNAs en partículas virales y la posible participación de estos en la producción de micotoxinas. Se realizaron ensayos de actividad antifúngica de *X. dendrorhous* contra diferentes especies de levaduras, y si bien se detectó actividad, ésta no se pudo correlacionar con la presencia de los dsRNAs. Los análisis moleculares permitieron identificar distintos genomas de *Totivirus* en los aislados, los que pueden coexistir además con dsRNAs satélites. Desde cultivos de cada cepa se purificó y separaron las partículas virales por densidad usando gradientes de sacarosa y en cada fracción obtenida se determinó el contenido de dsRNA y proteínas. Tal como ocurre en el sistema helper/satélite descrito en *S. cerevisiae*, los distintos dsRNAs estarían encapsidados separadamente en las partículas virales, las que estarían principalmente constituidas por una proteína de 76 o 37 kDa apróx, según el genoma viral presente. La cepa UCD 67-385 es la única en que se observan ambas proteínas, cuyo tamaño estimado coincide con el predicho para la proteína de la cápside codificada por los tres genomas virales identificados. La identidad de estas proteínas se confirmó por MALDI-TOF/MS, encontrando además en sus secuencias múltiples segmentos de estructura secundaria característicos de las proteínas de la cápside y aminoácidos que son conservados en los *Totivirus*. La existencia de partícula tipo virus en los aislados que contienen sólo una o ambas proteínas virales (76 y/o 37 kDa) se determinó por microscopía electrónica, observando partículas con diámetros que variaron (40, 26 y 36 nm) según la proteína Gag que las conforma. Con los resultados obtenidos en este trabajo se logró describir por primera vez la presencia de un sistema viral compuesto por genomas virales y dsRNAs satélites en *X. dendrorhous*, demostrando la coexistencia de hasta tres *Totivirus* diferentes en un mismo hospedero, fenómeno que

es inusual en levaduras. Estos virus son los responsables de generar las proteínas virales necesarias para para la encapsidación de todos los dsRNAs, permitiendo la mantención y propagación de estos elementos en los distintos aislados de la levadura.

ABSTRACT

Xanthophyllomyces dendrorhous is a Basidiomycetous yeast isolated from cold regions of the planet, which have the characteristic to produce astaxanthin, a pigment used in aquaculture and pharmaceutical industry. Most strains of this yeast have double-stranded RNA (dsRNA) molecules and virus like particles (VLPs), an extrachromosomal genetic element commonly found in yeasts and filamentous fungi. Studies performed in *Saccharomyces cerevisiae* conducted to the identification of dsRNAs as viral genomes giving origin to the *Totivirus* genus, whose members are characterized by have unsegmented genomes with two overlapped open reading frames encoding for a capsid protein and a RNA-dependent RNA polymerase. Strains of *S. cerevisiae* that have a "killer" phenotype (ability to kill other yeasts), furthermore have dsRNAs of minor sizes called M-dsRNA, which encodes for a mycotoxin and self-immunity. The M-dsRNA is classified as a "satellite" element because depends on viral proteins encoded by the totiviruses for its replication/propagation, conforming in this way an helper/satellite virus system. There is a high variation in the number and sizes of dsRNAs among the different strains of *X. dendrorhous*, even there exists a correlation with the geographic origin of isolation. In studies of our group with the strain UCD 67-385 that has four dsRNAs, three different *Totivirus* were identified. In this work, the dsRNAs of five strains of *X. dendrorhous* were studied in relation to their encapsidation into viral particles and involvement in mycotoxins production, and were characterized at molecular level. The antifungal activity of *X. dendrorhous* was assayed against different yeast species, finding no correlation between the antimicrobial activity and the presence of dsRNAs. The molecular analysis suggests the existence of

different *Totivirus* genomes in all *X. dendrorhous* strains studied, which coexist with probable satellite dsRNAs in some strains. The virus-like particles were purified and separated by sucrose gradients, and the content of dsRNA and protein were determined in the fractions obtained. Similar to helper/satellite viral system described in *S. cerevisiae*, the dsRNAs of *X. dendrorhous* would be separately encapsidated into viral particles, which are formed by a protein of 76 or 37 kDa approx. according to the viral genome present in the strain. Only in the strain UCD 67-385 it appeared both proteins, whose estimated size matches with these ones predicted for capsid protein encoded by the viral genomes identified in this strain. The identity of these proteins was confirmed by MALDI-TOF/MS and multiple segments of secondary structure were founded in capsid protein sequences, while the conserved amino acids of the *Totivirus* also were identified. Under electron microscopy, the VLPs were determined appear with morphology similar of the *Totivirus*, with diameters of 36, 40 and 26 nm, for VLPs associated to 37 kDa, 76 kDa and both proteins. With the results obtained in this work, we described for first time the existence of a Helper/satellite viral system in *X. dendrorhous*, demonstrating the coexistence of three different *Totivirus* on the same host, which is unusual phenomenon in yeast. These viruses are responsible for generating all viral proteins necessary for dsRNAs encapsidation, allowing the maintenance and propagation of these elements in the different isolates of *X. dendrorhous*.

INTRODUCCIÓN

Elementos genéticos extracromosómicos

La mayoría de las levaduras y hongos filamentosos portan Elementos Genéticos Extracromosómicos (EGEs) que pueden ser plasmidios de DNA de doble hebra (dsDNA) circulares o moléculas de RNA de doble hebra (dsRNA). Los EGEs son generalmente considerados como elementos crípticos en función y sólo en algunos casos se han logrado relacionar con algún fenotipo en sus hospederos fúngicos como por ejemplo, la senescencia en hongos filamentosos (Castro y cols., 2003), la hipovirulencia en fitopatógenos (Nuss, 2005) y la producción de micotoxinas en levaduras (Schmitt y Breing, 2006; Magliani y cols., 1997; Van de Sade y cols., 2010). No obstante, las investigaciones realizadas en relación a la replicación y propagación de los EGEs han permitido importantes avances en el conocimiento biológico de sus hospederos (Widner y Wickner, 1993; Ohtake y Wickner, 1995; Magliani y cols., 1997), el desarrollo de métodos para el biocontrol de fitopatógenos y la identificación de nuevos agentes antifúngicos (Magliani y cols., 1997; Nuss, 1996, 2005). Actualmente el estudio de los EGEs es un campo activo de investigación debido a su potencial uso como herramienta para estudiar hongos no convencionales y por sus aplicaciones en el área médica, agricultura, microbiología industrial, entre otras (Magliani y cols., 1997, Nuss, 2005; Powilleit y cols., 2007). Los EGEs del tipo dsRNAs son encapsidados en partículas tipo virus (VLPs, del inglés Virus-Like Particles) que están localizadas en el citoplasma de sus hospederos fúngicos, razón por la que son llamados micovirus. A diferencia de los virus de animales, los micovirus no poseen efectos nocivos para sus hospederos y carecen de una fase extracelular de infección, por lo que su transmisión es citoplasmática y ocurre durante la esporogénesis, división y fusión celular (Pfeiffer y

cols., 1996; Schmitt y Breining, 2006). El Comité Internacional para la Taxonomía de Virus (ICTV) clasifica a los micovirus con genomas de dsRNA en las familias Chrysoviridae, Reoviridae, Partitiviridae, Hypoviridae y Totiviridae según la organización de sus genomas y la forma en que éstos son encapsidados (Mertens, 2004; Wickner y cols., 2005). Los micovirus en levaduras se encuentran principalmente clasificados en el género *Totivirus* de la familia de los Totiviridae, que se caracterizan por tener un genoma no segmentado que es encapsidado en partículas icosaédricas de una sola cubierta con un diámetro aproximado de 40 nm (Ghabrial y Patterson, 1999; Mertens, 2004).

Género *Totivirus*

Los *Totivirus* se describieron por primera vez en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, dando origen a la familia de los Totiviridae. La mayoría de los aislados ambientales, industriales y clínicos de esta levadura portan genomas virales de 4,6 kb nombrados como L-A o L-BC según se secuencian. Ambos genomas poseen dos marcos de lectura abiertos (ORFs) sobrepuestos en 130 nucleótidos: El ORF del extremo 5' codifica para la proteína de la cápside (Gag, 76 kDa) y del extremo 3' que codifica para una RNA polimerasa dependiente de RNA (Pol). Ésta última sólo se sintetiza como una proteína de fusión con la Gag (Gag-Pol, 171 kDa) como resultado del corrimiento del marco de lectura en menos una base (CML-1) que ocurre durante la traducción (Schmith y Breining, 2002; Wickner, 1996; Dinman, 1995; Farabaugh, 1996). En varios aislados de *S. cerevisiae* se describió un segundo elemento llamado M-dsRNA (1,6 - 1,8 kb) que sólo contiene un ORF y que codifica para la micotoxina responsable de la actividad antifúngica que posee la levadura (Schmitt y Breinig, 2006) (Figura 1).

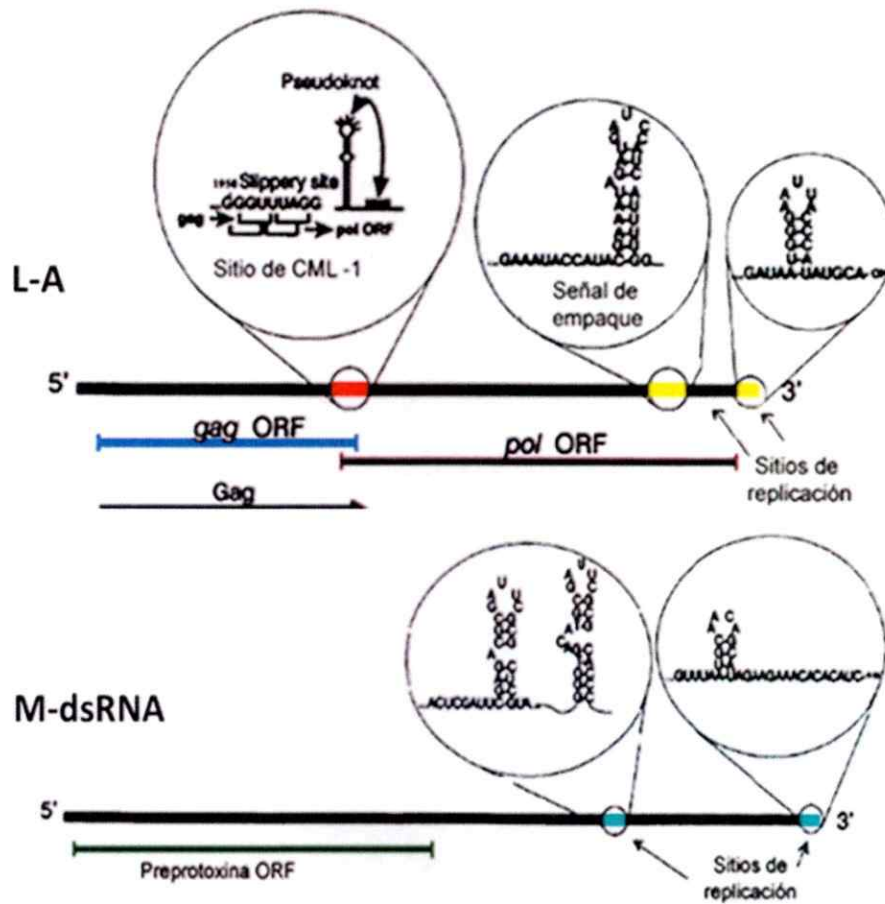


Figura 1. Organización genómica de las moléculas de dsRNA presentes en *S. cerevisiae*. El genoma viral L-A contiene dos ORFs: el 5' que codifica para la proteína de la cápside Gag y el ORF 3' que codifica para una RNA polimerasa dependiente de RNA (Pol). Ambos ORFs están sobrepuestos en 130 nucleótidos, zona que contiene las señales necesarias (Pseudoknot y slippery site) para el corrimiento en el marco de lectura -1 (CML-1) y que permite la síntesis de la proteína de fusión Gag-Pol. El M-dsRNA sólo contiene un ORF que codifica para una preprotóxina responsable de la actividad antifúngica de la levadura. La posición de los sitios de reconocimiento para la replicación y señales de empaquetamiento de los dsRNAs son indicadas en cada caso (Adaptado desde Wickner, 1996).

El M-dsRNA es considerado un elemento satélite del genoma L-A o L-BC, ya que requiere de las proteínas virales para su replicación y encapsidación. Es así como la pérdida del genoma viral conlleva a la eliminación consecutiva del genoma satélite y del fenotipo antifúngico. Ambos dsRNAs forman un sistema viral conocido como "Helper/Satélite" que fue descrito en detalle en *S. cerevisiae* (Fujimura y cols, 1990; Ribas y cols., 1994). El ciclo replicativo del sistema viral *Totivirus* es conservativo, donde los dsRNAs son encapsidados en partículas virales compuesta por 120 monómeros de la proteína Gag y un dímero de la proteína Gag-Pol (Figura 2). Desde estas partículas se libera al citoplasma un (+) ssRNA (L-A (+) ssRNA ó L-BC (+) ssRNA) previamente sintetizado por la RNA polimerasa sintetiza desde el genoma viral L-A-dsRNA o L-BC-dsRNA (Fujimura y Wickner, 1988; Fujimura y Wickner, 1989). La proteína Gag, que constituye la cápside viral, corta el 5' Cap (7-metil GMP) de los mRNA celulares y los transfiere al (+) ssRNA favoreciendo su interacción con la maquinaria de traducción del hospedero para la síntesis de las proteínas Gag y Gag-Pol (Fujimura y Esteban, 2011, 2013). La hebra (+) ssRNA porta además estructuras secundarias específicas ("Stem-loop") en su extremo 3' que son reconocidas por la proteína Gag-Pol, conformando de un complejo que sirve como base para la polimerización de la proteína Gag y la formación de la cápside. Una vez ensamblada la partícula, la RNA polimerasa viral sintetiza la segunda hebra de RNA desde el (+) ssRNA para formar el genoma viral completo dsRNA, terminando la maduración del virion (Wickner y cols., 1996). El ciclo replicativo del M-dsRNA es similar al descrito para genoma viral y utiliza las proteínas virales sintetizadas desde el L-A o L-BC para su encapsidación. En este caso, desde el M (+) ssRNA se sintetiza la preprotoxina que participa en la actividad antifúngica y en la inmunidad a la misma.

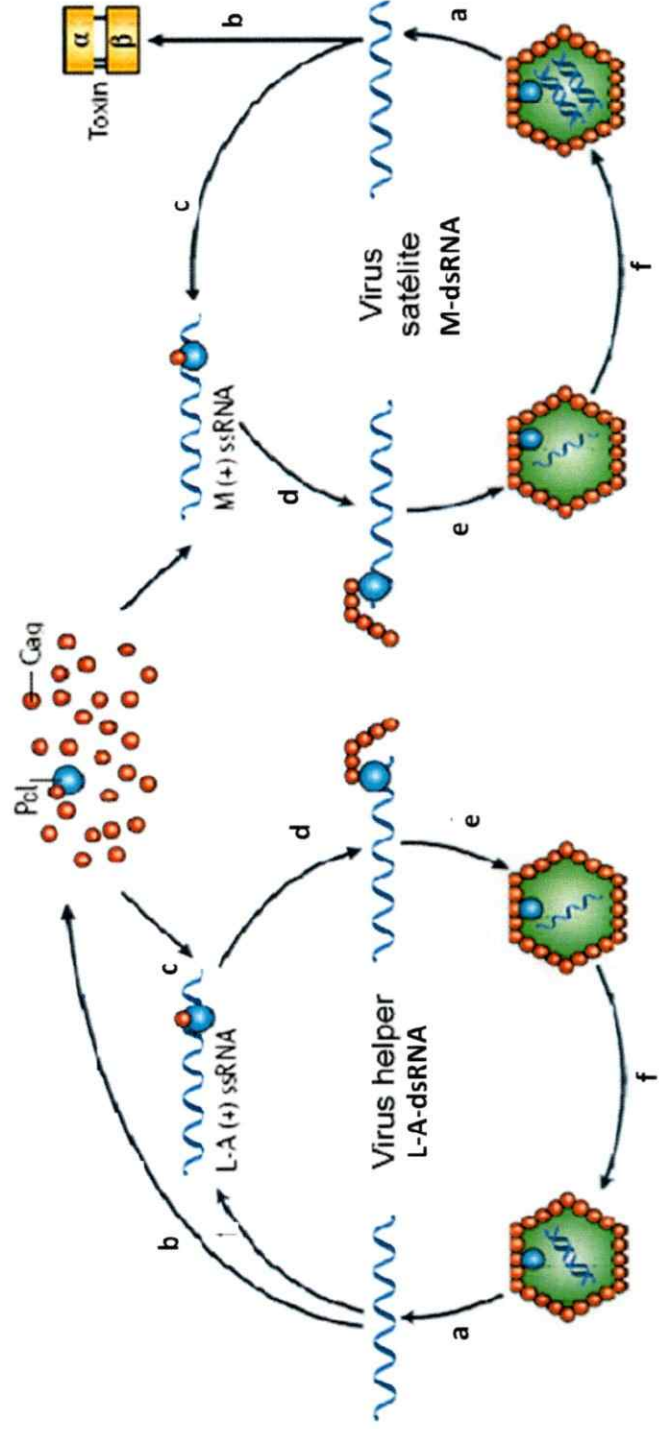


Figura 2. Ciclo de replicación viral en *S. cerevisiae*. El genoma viral L-A-dsRNA (virus "Helper") y del M-dsRNA (Virus satélite) requieren a las proteínas Gag y Gag-Pol para su encapsidación en las partículas virales. Para ambos dsRNAs el ciclo se inicia con la liberación al citoplasma de un (+)ssRNA previamente sintetizado desde el dsRNA por la RNA polimerasa viral (a). Tanto el L-A (+) ssRNA como el M (+) ssRNA pueden ser utilizados por el hospedero para traducción de las proteínas Gag/ Gag-Pol y la toxina, respectivamente (b), o bien pueden unirse a la proteína de fusión (Gag-Pol) para formar un complejo que permite la polimerización de la proteína Gag (c-d). Una vez ensamblada la partícula (e), desde el (+) ssRNA encapsidado la RNA polimerasa viral sintetiza la hebra complementaria formando el dsRNA (f). En las partículas que portan el M-dsRNA, a diferencia de las que portan el L-A-dsRNA, la RNA polimerasa viral sintetiza una segunda molécula completando la maduración del virus satélite (Adaptado desde Schmitt y Breining, 2006).

A diferencia de las partículas que encapsidan al genoma viral, el virus satélite maduro contiene dos moléculas del M-dsRNA. En trabajos previos atribuyen este comportamiento al fenómeno denominado “llenado de cabeza”, donde la RNA polimerasa puede sintetizar nuevas moléculas hasta completar la cápside viral. De acuerdo a esto, el virus satélite pueda contener varias moléculas de dsRNA cuando éstas tienen un tamaño menor que el genoma viral (Newman y cols., 1981; Williams y cols., 1987; Fujimura y cols., 1989).

En *S. cerevisiae* se describieron diferentes secuencias de M-dsRNAs que codifican para tres micotoxinas proteicas distintas que son secretadas al medio extracelular, cuyos mecanismos de acción sobre las células blanco incluyen la formación de canales iónicos en la membrana citoplasmática o el arresto del ciclo celular (Magliani y cols, 1997; Marquina y cols., 2002; Schmitt y Breining, 2006). La actividad antifúngica o fenotipo “killer” se observó en otras especies de levaduras tales como *Kluyveromyces lactis*, *Ustilago maydis*, *Hanseniaspora uvarum*, *Zygosaccharomyces bailii*, (Magliani y cols., 1997), *Saccharomyces bayanus* (Ivannikova y cols., 2005), *Wickerhamomyces anomalus* (Guo y cols., 2013), *Debaromyces hanseii* (Marquina y cols., 2002), *Williopsis saturnus* (Wang y cols., 2012), *Pichia acaciae* (Paluszynski y cols., 2007), *Mrakia frigida* (Hua y cols., 2010) entre otras. Aunque la existencia de actividad antifúngica se relaciona con la existencia de dsRNAs satélites en levaduras, las bases genéticas implicadas en el fenotipo son variadas, pudiendo las micotoxinas estar codificadas en plasmidios lineales de dsDNA o en genes nucleares (Magliani y cols, 1997; Schmitt y Breinig, 2006). Para todos los casos las cepas “killer” son inmunes a las micotoxinas que producen, confiriéndoles una mayor ventaja en la colonización de nichos durante la competencia por nutrientes y espacio (Lenski and Riley, 2002). Factores como la temperatura, pH, la

concentración salina son importantes para la determinación del fenotipo "Killer" sobre una especie de levadura en particular, las que deben ser consideradas para el estudio de la actividad antifúngica en el laboratorio (Golubev and Shabalín, 1994; Marquina y cols., 2002).

dsRNAs en *Xanthophyllomyces dendrorhous*

Xanthophyllomyces dendrorhous es una levadura basidiomicete aislada desde las regiones frías de Japón, Rusia, Alaska, Finlandia y Alemania (Miller y cols., 1976; Golubev, 1995; Weber y cols., 2007), y recientemente desde la Patagonia Argentina (Libkind y cols., 2008) y del sur de Chile (Weber y cols., 2008; datos no publicados). En estudios realizados con esta levadura se describió la existencia de múltiples EGEs de tipo dsDNA lineales y dsRNAs en varias cepas de esta levadura (Castillo y Cifuentes, 1994; Pfeiffer y cols., 1996), siendo el primer hallazgo de dsRNAs en la cepa japonesa UCD 67-385 (Castillo y Cifuentes, 1994). La caracterización de los perfiles de dsRNAs realizada por nuestro laboratorio permitió determinar que la mayoría de las cepas de *X. dendrorhous* poseen dsRNAs, los que se nombraron de acuerdo con su tamaño como L1 (5 kb), L2 (3,7 kb), M (1,4 kb), S1 (0,9 kb) y S2 (0,8 kb) (Baeza y cols., 2009). En estas cepas se observó un polimorfismo en el número de dsRNAs que contienen, existiendo algunas que portan 4 (L1, L2, S1, S2), 2 (L1 y S1 o L1 y M) o un (L1 o L2) dsRNA (Figura 3). A pesar de esta diversidad de dsRNAs, los L1- y L2-dsRNAs de las distintas cepas presentarían similitud nucleotídica de acuerdo a los experimentos de Dot-blot (Baeza y cols., 2009).

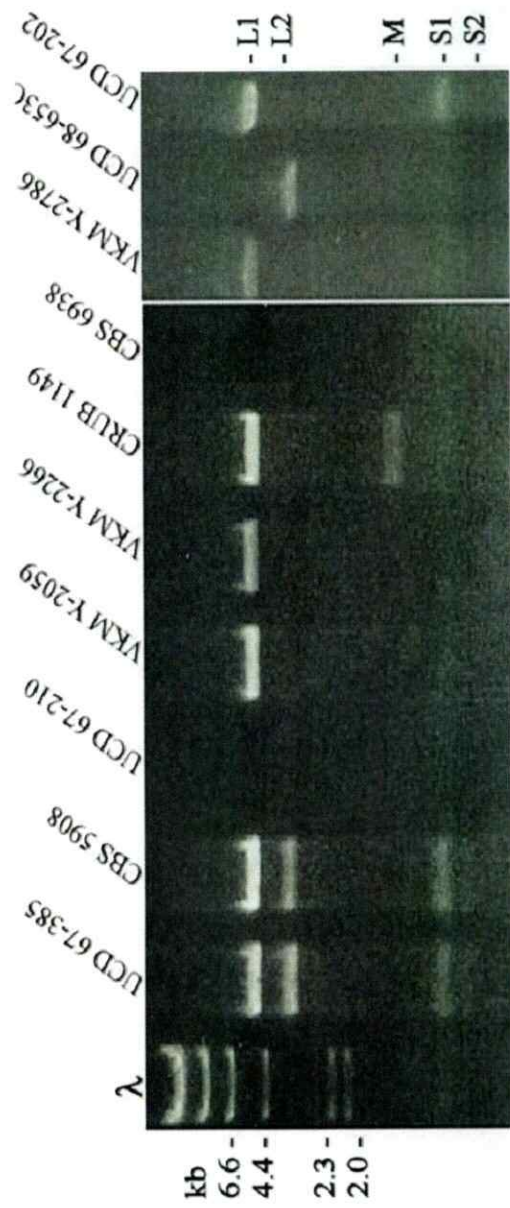


Figura 3. Perfiles de dsRNAs presentes en las cepas de *X. dendrorhous*. Desde cada cepa de la levadura (UCD 67-385, CBS 5908, UCD 67-210, VKM Y-2059, CRUB 1149, CBS 6938, VKM Y-2786, UCD 68-653C y UCD 67-202) se extrajo el RNA total y las muestras se trataron con Nucleasa S1 para la observación de los distintos dsRNAs (L1, L2, M, S1 y S2). λ : Marcador de peso molecular *Lambda HindIII* (Adaptada desde Baeza y cols., 2009).

En estudios posteriores se realizaron experimentos de curación en la cepa UCD 67-385 usando diversos agentes físicos y químicos que fueron efectivos en la eliminación de los dsRNAs en otras levaduras y hongos filamentosos. Sólo se logró obtener cepas que perdieron el S2-dsRNA y que no presentaron diferencias fenotípicas con la cepa silvestres, pero sí se observó un incremento en el número de copias del L1-dsRNA (Flores, 2008; Baeza y cols., 2009). Paralelo a esta Tesis, se logró clonar y secuenciar los cuatro dsRNAs (L1, L2, S1 y S2-dsRNA) de la cepa UCD 67-385, lográndose identificar tres genomas *Totivirus* distintos desde los L1 y L2-dsRNAs, mientras que los ORFs de los dsRNAs de menor tamaño (S1- y S2- dsRNA) no presentaron identidad con la base de datos (NCBI). De acuerdo con estos antecedentes, en este trabajo se propuso caracterizar los dsRNAs presentes en las distintas cepas de *X. dendrorhous*, evaluando la existencia de sistemas helper/satélite, identificando las proteínas virales que participan en la encapsidación de los dsRNAs, y abordar además los posibles fenotipos asociados a estos elementos.

HIPÓTESIS

El alto grado de polimorfismo en los perfiles de Elementos genéticos extracromosómicos del tipo dsRNA en las cepas de *Xanthophyllomyces dendrorhous* se debe a la existencia de distintos genomas virales y a sus elementos satélites, los que constituyen un sistema viral que permite la mantención y replicación de los dsRNAs en su hospedero.

OBJETIVOS

Objetivo general

Caracterizar molecular y funcionalmente los dsRNAs presentes en *Xanthophyllomyces dendrorhous*.

Objetivos específicos

1. Determinar el contenido de dsRNAs en aislados chilenos de *X. dendrorhous* y seleccionar cepas representativas para la caracterización de estos elementos.
2. Analizar la existencia de actividad antifúngica en los aislados de *X. dendrorhous* y su posible relación con los perfiles de dsRNAs observados.
3. Caracterizar molecularmente los dsRNAs de distintas cepas de *X. dendrorhous*.
4. Analizar el contenido genómico y proteico de las partículas virales purificadas desde las cepas de *X. dendrorhous*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Células

Las levaduras utilizadas en este trabajo se describen en la Tabla 1. Para la clonación se utilizó la cepa de *Escherichia coli* DH5 α .

Ácidos nucleicos

Los marcadores de peso molecular 1 kb, el DNA del bacteriófago lambda digerido con la enzima de restricción *Hind*III, y el 100 bp, se adquirieron desde New England Biolabs y Thermo Scientific. El plasmidio pBluescript SK- (pBS) se obtuvo desde la colección disponible en el Laboratorio de Genética de la Facultad de Ciencias, Universidad de Chile. Los oligonucleótidos utilizados en las reacciones de PCR, RT-PCR y RT-qPCR se indican en la Tabla 2.

Enzimas

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

Tabla 1. Levaduras utilizadas en este estudio.

Especie	Cepa	Origen
<i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i>	UCD 67-385	Shinkai, Kiso, Japón
	UCD 67-202	Hiroshima, Japón
	UCD 68-653C	Rainbow Lake, Península Kenai, Alaska
	VKMY-2786	Moscú, Rusia
	CBS 6938	Finlandia
	ANT1 – ANT9	Península Barton, Territorio Antártico Chileno ^a
	RV4	Parque Nacional Puyehue, X Región, Chile ^a
	RV7,6	Parque Nacional Puyehue X Región, Chile ^a
	MCNT	Parque Nacional Huerquehue IX región, Chile ^a
	AVHÑ1	Parque Nacional Ñuble, VIII Región, Chile ^a
	CCNA	Parque Nacional Huerquehue, IX Región, Chile ^a
	385 (S2)-40	Derivada de la cepa UCD 67-385 ^b
<i>Sporidiobolus salmonicolor</i>		Isla Rey Jorge, región subantártica ^a
<i>Leucosporidiella fragaria</i>		
<i>Leuconeurospora</i> sp.		
<i>Cryptococcus gilvencens</i>		
<i>Cryptococcus victoriae</i>		
<i>Rodothorula laringis</i>		
<i>Holtermanniella watticus</i>		
<i>Candida sake</i>		
<i>Leucosporidiella creativora</i>		
<i>Cryptococcus gastricus</i>		
<i>Mrakia blollopis</i>		
<i>Mrakia</i> sp2		
<i>Diozsegia fristingensis</i>		
<i>Diozsegia</i> sp		



Colecciones: CBS, Centraalbureau voor Schimmelcultures, Netherlands; ATCC, American Type Culture Collection, USA; UCD, Culture Collection, Department of Food Science and Technology, University of California at Davis, USA; VKM, Russian Collection of Microorganisms, Russia. a. Colección del Laboratorio de Genética. b Obtenida por tratamiento con anisomicina (Flores, 2008; Baeza y cols., 2009).

Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo.

Nombre	Secuencia (5'→3')	Posición o aplicación
M13 Fw	GTAAAACGACGGCCAGT	Plásmido pBS
M13 Rv	AACAGCTATGACCATG	Plásmido pBS
pL1A.F1	GCGAAAATGAAGCGATGACA	RT-qPCR, específico para XdV-L1A
pL1A.R1	TTAGTCTCCGCGCCCTTCTA	RT-qPCR, específico para XdV-L1A
pL1B.F2	GACGAACTGATGCCCAAACA	RT-qPCR, específico para XdV-L1B
pL1B.R2	CCGGAGACAGCTCATTGTA	RT-qPCR, específico para XdV-L1B
Cap661Rv	GAGGACTTCAAGGGTTACG	RT-PCR, específico para XdV-L1A
Cap288Rv	GAAGTTTTCGCCACAAGAG	RT-PCR, ORF Gag de XdV-L1B
L1RV4	AACGTTTCAGGGTTAAGGGGC	"Primer walking", L1-dsRNA cepa RV4
LIVR2	AACAGCTATCGCCACATAAT	RT-PCR, específico para XdV-L1A
LIVR3	CCTCTGCTGATCTGAAATGTT	RT-PCR, ORF Gag de XdV-L1B
L8,2R	CCGTGTAGAGCTAAAATACC	RT-PCR, ORF Gag de XdV-L1A
L13F1	GAAGGGATAAAAGCTACAGTC	RT-PCR, específico para XdV-L1B
L13IR	TGGCTGGGATAAAGACGAAC	RT-PCR, específico para XdV-L1B
L23F	AGGTCCAAATTGCATGGAA	RT-PCR, específico para XdV-L1B
Mot 4F	GAGGACTTCAATAGTCAACA	Motivo conservado de la RdRp de XdV-L1A
Mot 5R	AAGTCGTCAGCCTCCACCCC	Motivo conservado de la RdRp de XdV-L1A
Mot 6R	AGACATCGTCTCCGTTGTGC	Motivo conservado de la RdRp de XdV-L1A
Mot 4FB	GAAGATTTCAACAGTCAACATAG	Motivo conservado de la RdRp de XdV-L1B
Mot 5RB	ATGTCGTTAACCTCCAGCCC	Motivo conservado de la RdRp de XdV-L1B
Mot 6RB	GCACGTCGTCGCCGTTATG	Motivo conservado de la RdRp de XdV-L1B
M1c15R	ACCAGTGGCTGTGTTGGGAA	Específico para clon M-dsRNA cepa RV4
M1c15F	TTCCCAACACAGCCACTGGT	Secuenciación y PCR, Clon M-dsRNA
M19R1	TTAGGAAACATAGACCCAA	RT-PCR, específico para XdV-L1A
SR4	AAGCGCATCTTCTGGGCTCA	RT-PCR, ORF Gag de XdV-L1A
S1 Kan4 Fw	CTACCCATTTAAGCTCATTGTA	RT-PCR, específico para XdV-L1A
S1 Kan 4 Rv	TACAATGAGCTTAAATGGGTAG	RT-PCR, específico para XdV-L1A
S2Fw K5	TTAAGGCATAGACAAGTTAAC	RT-PCR, específico para XdV-L1B
13.3	GTACGATTTAAACCTAGGATC	RT-PCR, específico para XdV-L1B
Random primer	NNNNNN	RT-PCR, Clonación dsRNAs

Reactivos químicos.

Los componentes de los medios de cultivo o reactivos químicos se adquirieron de Sigma Chemical y Merck. El antibiótico anisomicina se obtuvo de Sigma aldrich.

Métodos**Condiciones de cultivo.**

X. dendrorhous: Se utilizó el medio YM (extracto de levadura 0,3%, extracto de malta 0,3% y peptona 0,5%) suplementado con glucosa 2%. A los medios semi-sólidos se adicionó agar microbiológico Bacto™-agar 1,5 %. Para el medio YM tamponado, los sustratos se disolvieron en el buffer fosfato-citrato (pH 4,2 - 4,6 - 5,4 - 5,6 -5,8). La levadura se incubó a la temperatura óptima de crecimiento (22 °C).

E. coli: Se utilizó el medio Luria Bertani (LB) que contiene Triptona 1%, extracto de levadura 0,5% y NaCl 0,5%. A los medios LB sólidos se agregó Bacto™-Agar 1,5%. Para la selección de transformantes, el medio se suplementó con ampicilina (Amp) 100 µg/ml y X-Gal 75 µg/ml. Las placas y los cultivos de *E.coli* se incubaron a 37 °C.

Extracción de ácidos nucleicos

Extracción de RNA total: Se realizó de acuerdo a la metodología descrita por Baeza y cols. (2009). Las células (0,1 g) se colectaron por centrifugación a 10.000 x *g* por 1 min desde un cultivo de *X. dendrorhous* en fase estacionaria y se lavaron 2 veces con 1 ml del buffer TE (Tris-HCl 10 mM pH 8,0, EDTA1mM). El sedimento se suspendió en 2 ml del mismo buffer y se adicionó 4 g de microesferas de vidrio (0,5 mm de diámetro) y un volumen de fenol ácido (pH 4,0). La ruptura celular se realizó en un homogeneizador (Marca: Bio Spec products; modelo: Mini-Beadbeater-16) durante 3 min y se centrifugó a 10.000 x *g* por 10 min. La fase acuosa se colectó en un tubo limpio para realizar la extracción orgánica con un volumen de fenol ácido, y posteriormente con un volumen de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1). Finalmente se adicionó 2 volúmenes de isopropanol absoluto y se incubó a -20 °C durante 2 h para la precipitación del RNA total. Posteriormente, la muestra se centrifugó a 14.000 x *g* durante 10 min y se suspendió en 40 µl de agua libre de nucleasas. Las muestras se guardaron a -20 °C hasta su análisis por electroforesis en geles de agarosa.

Extracción del DNA plasmidial: Se utilizó el Kit de extracción de DNA plasmidial MiniPrep (Axigen) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Electroforesis de ácidos nucleicos

Las muestras de ácidos nucleicos se mezclaron con buffer de carga 6X (azul de bromofenol 0,25%, ficoll 15%, glicerol 30%) y se cargaron en geles de agarosa (1%) que contenían bromuro de etidio 0,5 µg/ml y buffer TAE 1X (Sambrook y cols, 2001). La corrida electroforética se realizó a 90 V utilizando el buffer TAE 1X. Para la visualización de los ácidos nucleicos el gel se expuso a la luz ultravioleta utilizando un transiluminador (UVP, High Performance UV transilluminator, 302 nm) y se fotografió con una cámara digital con filtro UV. La estimación de los tamaños moleculares y de la concentración de los ácidos nucleicos se realizó de acuerdo a los marcadores de pesos moleculares utilizados en la corrida (1 kb o λ HindIII) utilizando el programa ImageJ (Rasband, 2007).

Purificación de ácidos nucleicos por GeneClean

La purificación se realizó de acuerdo a la metodología descrita por Boyle y Lew (1995). Los ácidos nucleicos se separaron en un gel de agarosa (1%) y la banda de interés se cortó con un bisturí. El fragmento se depositó en un tubo eppendorf al que se adicionaron 500 µl de KI 6M y se incubó durante 10 min a 55 °C hasta disolver la agarosa. Se agregó 10 µl de sílica de vidrio (Sigma) y se incubó por 5 min a temperatura ambiente para permitir la adherencia de los ácidos nucleicos. La sílica se concentró por centrifugación a 14.000 x *g* por 1 min y se lavó dos veces con la solución NewWash (Tris-HCl 10 mM pH 8,0, NaCl 50 mM, EDTA 2,5 mM, etanol 50%). Posteriormente se suspendió en 20 µl de H₂O bidestilada, se incubó a 55 °C por 5 min y se realizó una centrifugación a 14.000 x *g* por 5 min. El sobrenadante obtenido se transfirió a un tubo limpio y se almacenó a -20 °C hasta su análisis por electroforesis en geles de agarosa.

Digestiones enzimáticas

DNasa I: Se utilizó 1 U de enzima por μg de ácido nucleico. La reacción se incubó durante 1 h a 37 °C con el buffer acetato de sodio 50 mM, MgCl_2 10 mM, CaCl_2 2 mM, pH 6,5, en un volumen final de 20 μl .

Nucleasa S1: La reacción se realizó a 37 °C en el buffer acetato de potasio 30 mM pH 4,5, NaCl 0,3 M, sulfato de zinc 1 mM y glicerol 5% en un volumen final de 20 μl . Se utilizó 1 U de enzima por μg de ácido nucleico.

RNasa A: La digestión se realizó a 37 °C durante 30 min con una concentración de enzima de 50 $\mu\text{g/ml}$.

RNasa H: Se usó 1 U de enzima por μg de ácido nucleico, incubando durante 20 min a 37 °C en un buffer que contiene Tris-HCl 20 mM pH 7,5, KCl 0,1 M, MgCl_2 10 mM, DTT 0,1 mM, sacarosa 5%,

EcoRV: Para cada reacción se utilizó 5 U de la enzima y el buffer dispuesto por el proveedor. Se digirió 300 ng de DNA en un volumen final de 20 μl a 37 °C durante 2 h.

Extracción y purificación de las partículas tipo virus (VLPs)

La metodología para la extracción y purificación de las VLPs de *X. dendrorhous* se optimizó de acuerdo a los trabajos de Castillo y Cifuentes (1994), Pfeiffer y cols. (1996) y Bostian y cols. (1980). Las células (4-6 g) se colectaron por centrifugación a $10.000 \times g$ por 7 min desde un cultivo de *X. dendrorhous* en fase estacionaria, se lavaron con 10 ml de agua destilada y se suspendieron en 20 ml de buffer TBS (Tris-HCl 10 mM pH 7,6; NaCl 150 mM; EDTA 1 mM), suplementado con el inhibidor de proteasas "CompleteTM Protease Inhibitor Cocktail Tablets" (Roche). El volumen total (20 ml) se distribuyó en alícuotas de 3 ml y a cada uno se adicionó 4 g de microesferas de vidrio (0,5 mm de diámetro). La ruptura celular se realizó utilizando un homogeneizador (Marca: Bio Spec products; Mini-Beadbeater-16) durante 30 s y posteriormente se incubaron en hielo por 1 min. Los pasos de ruptura y de incubación se repitieron por 4 veces y posteriormente las muestras se centrifugaron a $6.000 \times g$ por 5 min y posteriormente a $12.000 \times g$ por 20 min a 4 °C para remover las perlas de vidrio y los restos celulares, respectivamente. El sobrenadante se ultracentrifugó a $120.000 \times g$ por 90 min y el precipitado se suspendió en 1,5 ml del buffer TBS suplementado con el inhibidor de proteasas y se depositó en el gradiente lineal de sacarosa (10 % - 40 % p/v). El gradiente se ultracentrifugó a $120.000 \times g$ por 3 h y alícuotas de 500 μ l se recolectaron desde el borde superior del tubo hasta completar el volumen total del gradiente (15 ml). Para la extracción de los dsRNAs, alícuotas de 300 μ l de cada fracción se mezclaron con un volumen de fenol (pH 4,0): cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1), se agitaron en vórtex por 5 min y se centrifugaron a $14.000 \times g$ por 10 min. La fase acuosa se colectó en un tubo limpio y se realizó una extracción con un volumen de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1). Los RNAs se precipitaron adicionando 2 volúmenes de isopropanol absoluto e incubando a -20 °C durante 2 h. Las muestras obtenidas desde

cada fracción se centrifugaron a 14.000 x *g* por 10 min, se suspendieron en 20 µl de agua libre de nucleasas y se analizaron en geles de agarosa. Las fracciones que contenían los dsRNAs se mezclaron y se adicionó 7 ml del buffer TBS. Las VLPs se concentraron por centrifugación a 120.000 x *g* por 90 min a 4 °C, se suspendieron en 200 µl de buffer TBS suplementado con el inhibidor de proteasas y se guardaron a 4 °C hasta su utilización.

Ensayo de protección a la digestión con RNAsa A

El tratamiento enzimático con las muestras de VLPs se realizó con 50 µg/ml de RNAsa A a 37 °C por 30 min, antes y después de la extracción orgánica del RNA total. Para la extracción de los RNAs, a 200 µl de la muestra de VLPs se adicionó un volumen de fenol ácido, se agitó en vórtex por 2 min y se centrifugó a 12.000 x *g* por 5 min. La fase acuosa se colectó y se mezcló con un volumen de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) y se centrifugó nuevamente. El sobrenadante se colectó en un tubo limpio, se mezcló con 2 volúmenes de isopropanol absoluto y se incubó a -20 °C por 2 h. Los RNAs se precipitaron a 14.000 x *g* durante 10 min y se suspendieron en 40 µl de agua libre de nucleasas. Las muestras se guardaron a -20 °C hasta su análisis.

Determinación de la cantidad relativa de dsRNAs en el gradiente de sacarosa

La intensidad de banda de los distintos dsRNAs se determinó desde los geles de agarosa con el programa ImageJ (Rasband, 2007). Los valores de intensidad se normalizaron (%) con respecto al valor más alto (100%) estimado entre las dsRNAs separados en un mismo gel. Los datos se graficaron (Intensidad v/s n° de fracción) y se

identificaron las fracciones que presentaron un máximo en la intensidad a lo largo del gradiente. Para el cálculo de la razón entre los pesos moleculares de las partículas (W_r) se utilizó la fórmula $W_r = (N_r)^{3/2}$, donde $N_r = N_L/N_H$ es la razón entre la movilidad (distancia recorrida) de las partículas en el gradiente a baja (N_L) y alta (N_H) densidad de sacarosa (Martin y Ames, 1961; Falston, 1993). Los valores de N_L y N_H se representaron con el N° de la fracción donde la intensidad del dsRNA fue máxima.

Separación de proteínas por electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalantes (SDS-PAGE).

Los geles de poliacrilamida, la preparación de las muestras y las condiciones de la electroforesis se realizaron de acuerdo a Sambrock y cols. (2001).

Preparación de las muestras: 30 μ l de cada fracción del gradiente se mezclaron con 10 μ l del buffer de carga (Tris-HCl 50 mM pH 6,8, SDS 2%, glicerol 10%, β -mercaptoetanol 1%, EDTA 12,5 mM, azul de bromofenol 0,02%) y se incubó a 98 °C por 5 min. La totalidad de la muestra se cargó en un gel de poliacrilamida al 10%.

Condiciones de corrida y tinción de geles. En la electroforesis se utilizó un voltaje constante de 150 V. El gel se tiñó con azul de Coomassie G-250 0,25 % disuelto en metanol 45%: ácido acético 10% durante 10 min con agitación. Se retiró el colorante y el gel se destiñó con una solución de metanol: ácido acético: agua destilada (3:1:7).

Determinación del tamaño molecular: En la corrida electroforética se utilizó el marcador Prestained Protein Marker (New England) con el que se construyó una curva de calibración considerando los valores del logaritmo de la masa molecular de cada

proteína relativo a su movilidad electroforética (Rf). Los tamaños de las proteínas de interés se determinaron utilizando su valor de Rf e interpolando su masa molecular en la curva de calibración.

Análisis de las proteínas por MALDI-TOF MS

Una alícuota (30 μ l) de la muestra de VLPs purificadas por gradiente de sacarosa se utilizó para la separación de las proteínas por SDS-PAGE. Las bandas de interés, previamente teñidas con azul de Coomassie, se cortaron con un bisturí y se enviaron para su análisis por MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization - Time Of Flight) acoplado a espectrometría de masas a Alphalyse Inc., USA. Las masas experimentales se compararon con las obtenidas (Masas teóricas) desde las secuencias primarias de las proteínas Gag de *X. dendrorhous* (L1A, 681 aa; YP_007697650), L1B (683 aa; AFH09413), L2 (347 aa; AFH09415) y la secuencia parcial deducida desde el L1-dsRNA de la cepa RV4) con el programa FindPept (<http://web.expasy.org/findpept/>) (Gattiker y cols., 2002; Asteiger y cols., 2005), permitiendo una diferencia máxima $\pm 0,5$ Da (Tolerancia) entre las masas experimentales y teóricas. Los péptidos identificados se compararon con los obtenidos por la digestión *in silico* de las proteínas Gag con el programa MS-Digest de Protein Prospector (<http://prospector.ucsf.edu>), utilizando los siguientes parámetros: digestión enzimática: tripsina; rango de masas: 400 – 5.000 Da, y cero sitios de corte enzimáticos no reconocidos. Para la comparación de las masas experimentales con la secuencia nucleotídica parcial de la Gag, se utilizó el programa GFS (Genome-based Fingerprint Scanning; <http://athena.bioc.uvic.ca/virology-ca-tools/gfs/>) (Wisniewski y cols., 2004; Holmes y Giddings, 2008). El porcentaje de cobertura de la proteína (C) se estimó utilizando la fórmula $C = (A_i/A_T) * 100$, donde A_i es el número total

de aminoácidos que componen los péptidos identificados por MALDI-TOF y A_T es el número de aminoácidos totales que tiene la proteína analizada.

Análisis bioinformático de proteínas

El alineamiento de las secuencias de aminoácidos se realizó con el programa ClustalW (<http://athena.bioc.uvic.ca/virology-ca-tools/gfs/>) (Larkin y cols., 2007; Goujon y cols., 2010). En la predicción de estructuras secundarias se utilizó varios métodos de predicción disponibles en el servidor GeneSilico fold prediction metaserver (<https://genesilico.pl/meta2/>) (Kurowski y Bujnicki, 2003). La generación del modelo 3D a partir del alineamiento se realizó con el programa Jalview (<http://www.jalview.org/>) (Waterhouse y cols., 2009), utilizando como referencia la estructura de la Gag de ScV-LA disponible en la base de datos Protein Data Bank (N° de acceso 1M1C).

Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Una alícuota (5 μ l) de la muestra de VLPs purificadas se depositó en una rejilla de cobre para su tinción negativa con de acetato de uranilo 2 % (p/v). Las muestras se analizaron y fotografiaron en un microscopio electrónico Jeol JEM1010, disponible en el Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, Universidad Autónoma de Madrid, España. Los tamaños de las VLPs se determinaron a partir de las microfotografías utilizando el programa ImageJ (N = 100) (Rasband, 2007).

Clonación de los dsRNAs

Las reacciones de RT-PCR se realizaron de acuerdo a la metodología previamente optimizada por Baeza y cols. (2012). Una alícuota (8 μ l) del dsRNA (100 ng) purificado por GeneClean se mezcló con 2 μ l de dimetil sulfóxido (DMSO) y se incubó a 94 °C durante 10 min. Posteriormente se enfrió en hielo y el ssRNA se hibridó con 1 μ l de cada oligonucleótido (25 mM) a 25 °C por 5 min. La transcripción reversa se realizó con Maxima Reverse Transcriptase 200 U y los dNTPs 0,2 mM a 50 °C por 90 min. A la muestra se adicionó 4 U de RNasa H para degradar el RNA molde. Para la formación de la segunda hebra, 2 μ l del cDNA obtenido se utilizó en una mezcla de reacción que contenía Taq DNA polimerasa 2,5 U, el buffer de PCR (Tris-HCl 20 mM pH 8,8, 50 mM KCl), dNTPs 0,2 mM y partidores (25 μ M) en un volumen final de reacción de 50 μ l. La amplificación por PCR se realizó utilizando 35 ciclos a 94 °C, 55 °C y 72 °C por 1 min, 30 s, y 3 min, respectivamente; seguido por una incubación a 72 °C por 7 min. Los cDNAs obtenidos se purificaron por GeneClean y se ligó al vector pBS previamente digerido con la enzima *EcoRV* utilizando la enzima T4 DNA ligasa durante 16 h a 22 °C. La muestra se dializó sobre membranas de nitrocelulosa (Millipore) y se utilizó para la transformación de la cepa electrocompetente de *E. coli* DH5 α . Los clones recombinantes se reconocieron por su color blanco dado por su incapacidad de degradar el sustrato X-Gal debido a la interrupción del gen *lacZ* del plasmidio pBS. Las colonias blancas se sembraron en una nueva placa LB-Amp-XGal y se guardaron a 4 °C hasta su análisis. Se determinó la existencia del fragmento de interés en el plasmidio pBS por PCR con los oligonucleótidos M13Fw y M13Rv utilizando el DNA plasmidial purificado de los clones recombinantes. Los fragmentos de interés fueron secuenciados por Macrogen Inc. Korea y las secuencias obtenidas se analizaron con el programa Vector Suite (Invitrogen). Los ensamblajes se generaron con la herramienta "contig" del programa

Vector y el análisis bioinformático se realizó con la herramienta de búsqueda Blastn y Blastx del National Center for Biotechnology Information, (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>).

Transformación de *E. coli* por electroporación

La cepa de *E. coli* DH5 α se creció en 200 ml de medio LB hasta alcanzar una D.O._{600 nm} entre 0,5 y 0,8. Las células se cosecharon por centrifugación a 5.000 x *g* por 10 min. Posteriormente se lavaron dos veces con 50 ml de agua destilada estéril y una vez con 5 ml de glicerol (10 %) estéril y frío. Las células se suspendieron en 2 ml de glicerol (10%) y se guardaron alícuotas de 50 μ l a -80 °C hasta su uso. Para la electroporación las células electrocompetentes se descongelaron y se mezclaron con 5 μ l de la reacción de ligación. Posteriormente, la mezcla se depositó en una cubeta de 0,2 cm (BioRad). Con el equipo Gene Pulser BioRad se realizó un pulso (25 μ F, 200 Ω y 2,5 kV) tras el cual las células se suspendieron en 1 ml de medio LB y se incubaron a 37 °C por 1 h. Posteriormente, 100 μ l de las células se sembraron en placas con medio LB-Amp-XGal y se incubaron a 37 °C.

RT-PCR en tiempo real (RT-qPCR)

Una mezcla de 10 ng del dsRNA purificado con 2 μ l de DMSO y 1 μ l del partidor forward (25 μ M) se incubó a 94 °C por 10 min. Se adicionó 1 μ l de dNTPs (25 mM), 200 U de Maxima Reverse Transcriptase (Fermentas Life Sciences), 4 μ l de 5X RT buffer y 9 μ l de agua libre de nucleasas. La mezcla se incubó a 50 °C por 90 min seguido por

una incubación a 85 °C por 20 min. El qPCR se realizó en MX3000P Real-time PCR Thermal cycler (Stratagene) utilizando 2X de Sensimix SYBR kit (Bioline) utilizando las siguientes condiciones: volúmenes de 0,5, 1 o 3 µl de los productos de la reacción de RT, se mezclaron con 10 µl de Sensimix Kit, 1 µl de primers mix (50 µM) y agua libre de nucleasa hasta un volumen final de 20 µl. Las condiciones para el PCR fueron: incubación a 95 °C por 10 min; 40 ciclos a 95 °C por 15 s, 60 °C por 15 s y 72 °C por 15 s; y una incubación a 95 °C, 25 °C, 70 °C y 95 °C por 10, 5, 1 y 1 s, respectivamente. Se utilizó el software MxPro-Mx3000P v3.20 (Stratagene) para estimar los valores de Ct y las cantidades relativas se determinaron utilizando el método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Pfaffl, 2001; Livak y cols., 2001).

Determinación de la actividad antifúngica

Los ensayos de actividad se llevaron a cabo en céspedes de levaduras según la metodología de Baeza y cols. (2010). Para ello, 10 ml que contenía aproximadamente 10^7 células/ml de un cultivo de la posible levadura sensible se mezclaron con 100 ml de medio YM o YM-tamponado (fosfato-citrato) semisólido previamente fundido (a 35 - 40 °C) y con 1 ml de azul de metileno (0,3% p/v). Aproximadamente 25 ml de la mezcla homogeneizada se vertieron en un placa Petri y se dejaron gelificar a temperatura ambiente. Para cada posible especie de levadura sensible se realizaron 6 placas con el césped y las colonias de los aislados de *X. dendrorhous* se sembraron en su superficie. Tres de estas placas se incubaron a 22 °C y las restantes se incubaron 15 °C por 5 días. Una actividad antifúngica positiva se observó por la formación de halos de muerte (precipitado de azul de metileno) alrededor de la muestra sembrada. Para el análisis cualitativo de la actividad se determinó el diámetro del halo de muerte en cada caso.

Tratamiento con anisomicina

Los experimentos con anisomicina en *X. dendrorhous* se realizaron de acuerdo a los trabajos de Baeza y cols. (2009) y Flores (2008, 2011). Desde un cultivo en fase exponencial de la cepa RV4 se inoculó 20 ml de medio YM suplementado con 0, 60 y 90 μ M de anisomicina, para obtener un título inicial aproximado de 10^3 células/ml. Los cultivos se incubaron a 22 °C y el crecimiento se registró midiendo la D.O._{600 nm} por 7 días. Para realizar los cultivos seriados, desde un cultivo de la levadura en fase exponencial media (10^5 células/ml) suplementado con anisomicina, se extrajo una alícuota (200 μ l) para inocular un nuevo medio YM suplementado con el antibiótico (20 ml). Este proceso se repitió en siete ocasiones y desde este último cultivo se realizaron diluciones seriadas las que se sembraron en placas YM/agar suplementadas con anisomicina y se incubaron a 22 °C hasta la obtención de colonias. Las colonias obtenidas se replicaron en placas YM-agar y se sembraron en 7 ml de medio YM para la extracción del RNA total. Las muestras de RNA se trataron con Nucleasa S1 y se analizaron por electroforesis en geles de agarosa.

Predicción de estructuras secundarias en dsRNAs

Se utilizó el programa RNAfold web server (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAfold.cgi>) (Gruber y cols., 2008) y las secuencias de los dsRNAs L1A (NC_020903.1), L1B (JN997473.1), L2 (JN997474.2), S1 (JN997475.1) y S2 (JN997476.1) disponibles en la base de datos del GenBank (NCBI).

RESULTADOS

3.1. Perfiles de dsRNAs en aislados chilenos de *X. dendrorhous*

Considerando el alto polimorfismo en los EGEs del tipo dsRNAs presentes en *X. dendrorhous*, se propuso determinar la existencia de estos elementos en 14 aislados de esta levadura recientemente obtenidos desde el sur de Chile y del territorio subantártico (resultados no publicados). Para esto, se extrajo el RNA total desde los respectivos cultivos y aquellos que presentaron bandas extracromosómicas resistentes a DNasa I fueron seleccionados y caracterizados por digestión enzimática. Como se muestra en la Figura 4, varios aislados presentan bandas de ácidos nucleicos que fueron digeridas por la RNasa A y resistentes a nucleasa S1, resultado que sugiere que estas moléculas corresponden a moléculas de dsRNAs. Según su tamaño, estos últimos fueron nombrados como L1, M y S1, existiendo aislados que sólo poseen L1-dsRNA (CCNA), L1-dsRNA y M-dsRNA (AVHÑ1 y RV4) o L1-dsRNA y S1-dsRNA (MCNT). El aislado RV4 se seleccionó para este estudio ya que posee el M-dsRNA, elemento que no ha sido caracterizado previamente.

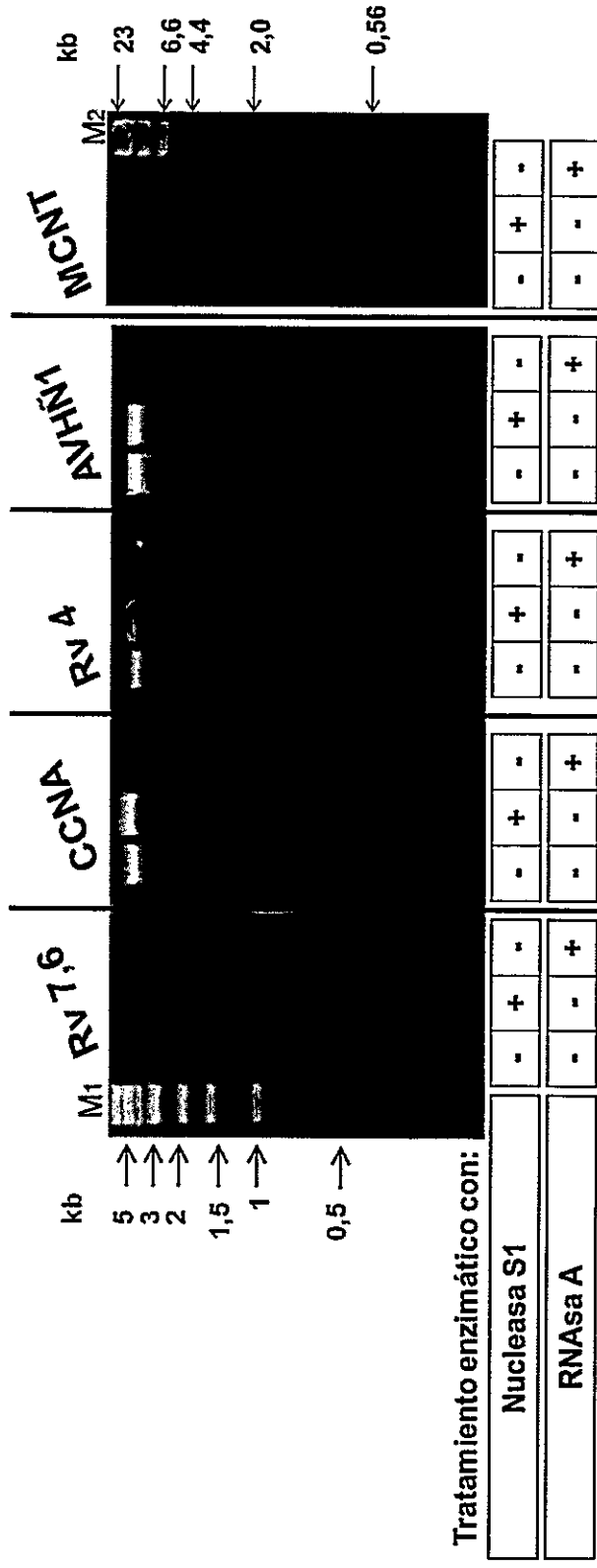


Figura 4. Perfiles de dsRNAs de los aislados chilenos de *X. dendrorrhous*. Las muestras de RNA total obtenidas desde los diferentes aislado (que se indican en la parte superior) se trataron enzimáticamente con Nucleasa S1 o RNAsa A y se analizaron en geles de agarosa.

+ : Aplicación del tratamiento / - : Sin Tratamiento. M₁: Marcador de peso molecular 1 kb DNA marker; M₂: λ HindIII DNA Marker.

3.2. Determinación de la actividad antifúngica en *X. dendrorhous*

En algunas levaduras la actividad antifúngica está asociada a la presencia de dsRNAs responsables de la producción de micotoxinas. Para evaluar la existencia de este fenotipo en *X. dendrorhous*, se seleccionaron cepas con distintos perfiles de dsRNAs: UCD 67-385 (L1, L2, S1 y S2), UCD 67-202 (L1 y S1), UCD 68-653C (L2) y VKM Y-2786 (L1), RV4 (L1 y M). Además se incluyó la cepa UCD 6938 que no contiene dsRNAs. Estas cepas se utilizaron en ensayos de actividad antifúngica contra céspedes de distintas especies de levaduras (14 en total) que fueron co-aisladas con las cepas chilenas de *X. dendrorhous*. Los experimentos se realizaron a distintas condiciones de pH y temperaturas de incubación, las cuales son óptimas para el crecimiento de todas las cepas utilizadas. La existencia de actividad antifúngica se determinó mediante la aparición de halos de muerte sobre el césped de levaduras alrededor de la colonia de *X. dendrorhous* sembrada. Se obtuvo patrones de actividad antifúngica similares para las distintas cepas a pesar de sus diferencias en el contenido de dsRNAs (Tabla 3). Un ejemplo de esto es la cepa CBS 6938 que carece de dsRNAs pero que presenta actividad sobre las mismas especies de levaduras que son sensibles a las cepas restantes de *X. dendrorhous*. Sólo se registraron algunas variaciones en el patrón de actividad con las cepas VKMY-2796 - UCD 68-653C y CBS 6938, las que no presentaron el fenotipo sobre *C. gilvencens* y *R. laringis*, respectivamente. No se observaron diferencias significativas en la actividad antifúngica por efecto de las temperaturas ensayadas, mientras que el pH sí fue determinante para la actividad de las cepas VKMY-2796, UCD 68-653C y CBS 6938 sobre *Leuconeurospora* sp.

Tabla 3. Actividad antifúngica de las cepas de *X. dendrorhous* a distintas condiciones de temperatura y pH

Especies de levaduras ensayadas ^a	RV4						UCD 67-385						UCD 67-202					
	YM		YM-4,6		YM		YM-4,6		YM		YM-4,6		YM		YM-4,6			
	22°C	15°C	22°C	15°C	22°C	15°C	22°C	15°C	22°C	15°C	22°C	15°C	22°C	15°C	22°C	15°C		
<i>S. salmonicolor</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++		
<i>L. fragaria</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
<i>Leuconeuropora</i> sp.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
<i>C. gilvencens</i>	+	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++		
<i>C. victoriae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
<i>R. laringis</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++		
<i>H. waticcus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
<i>C. sake</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
<i>L. creativora</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
<i>C. gastricus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
<i>M. biollopis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
<i>Mrakia</i> sp	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
<i>D. fristingensis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
<i>Diozsegia</i> sp.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		

-: Sin actividad / Diámetro del halo de muerte: +: < 3mm / ++: 3 – 5 mm / +++: > 5 mm

Especies de levaduras ensayadas ^a	VKMY-2786				UCD 68-653C				CBS 6938			
	YM		YM-4,6		YM		YM-4,6		YM		YM-4,6	
	22°C	15°C	22°C	15°C	22°C	15°C	22°C	15°C	22°C	15°C	22°C	15°C
<i>S. salmonicolor</i>	+	+	+	++	++	++	++	++	++	++	++	++
<i>L. fragaria</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Leuconeuospora</i> sp	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
<i>C. givencens</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. victoriae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>R. laringis</i>	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
<i>H. waticus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. sake</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. creativora</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. gastricus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>M. blollopis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Mrakia</i> sp	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>D. fristingensis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Diozsegia</i> sp.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

-: Sin actividad / Diámetro del halo de muerte: +: < 3mm / ++: 3 – 5 mm / +++: > 5 mm

a. Levaduras utilizadas en el césped.

b. Ensayos realizados a 22°C y 15°C en placas con medio YM (pH 5,5).

c. Ensayos realizados a 22°C y 15°C en placas con medio YM tamponado con buffer citrato-fosfato (pH 4,6).

Con los resultados obtenidos, no se puede atribuir un perfil de dsRNAs específico como el responsable de la actividad antifúngica sobre una especie de levadura en particular, sugiriendo que los dsRNAs no participarían en el fenotipo.

3.3. Experimentos de curación de la cepa RV4 de *X. dendrorhous*

En trabajos previos la utilización de agentes físicos y químicos permitió obtener cepas “curadas” que carecen de dsRNAs, logrando relacionar a estos elementos con la actividad antifúngica o con otros fenotipos en su hospedero (Dinman y cols., 1997). Estudios similares se realizaron con anisomicina, un inhibidor de la síntesis de proteínas en eucariontes, sobre la cepa UCD 67-385 de *X. dendrorhous*, lográndose obtener cepas que carecen del S2-dsRNA (385 (S2-40)). Se realizaron experimentos de curación de la cepa chilena RV4 seleccionada por su similitud con el perfil de dsRNAs del sistema viral “killer” de *S. cerevisiae*. Inicialmente se evaluó el crecimiento de la cepa RV4 en cultivos suplementados con anisomicina (60 y 90 μM), concentraciones seleccionadas según los trabajos previos. En las curvas de crecimiento se observaron diferencias en la extensión de fase de latencia, la cual tuvo una mayor duración en los cultivos suplementados con anisomicina (80 h) en comparación a los cultivos sin antibiótico (20 h aproximadamente) (Figura 5A). Un comportamiento similar se observó en el tiempo requerido para el desarrollo de las colonias, el que fue mayor en las placas suplementadas con anisomicina (7 días) en comparación con las colonias crecidas en placas sin antibiótico (3 días) (Figura 5B). Las colonias resultantes se utilizaron en extracciones de RNA total y el contenido de dsRNAs de ellas fue analizado (Figura 5C).

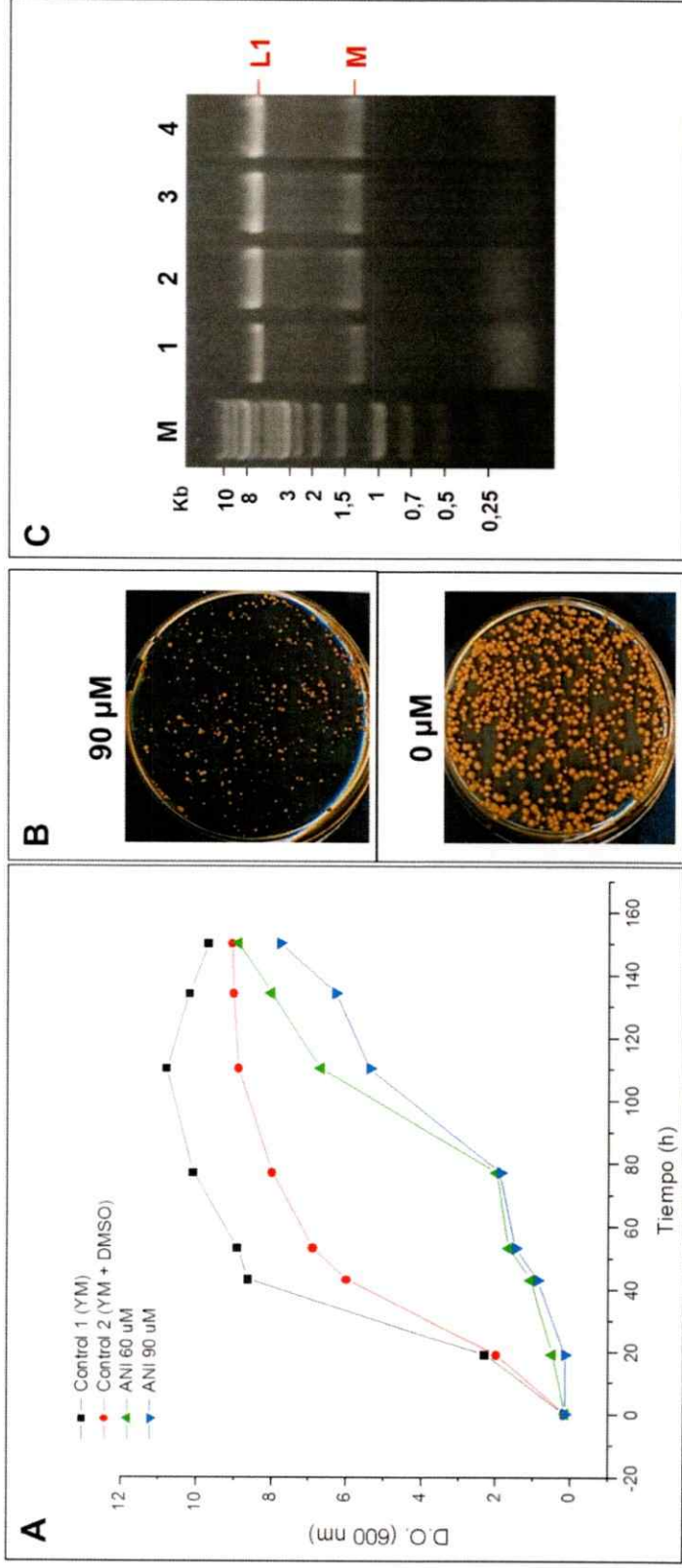


Figura 5. Efecto de la anisomicina sobre el crecimiento y contenido de dsRNAs de la cepa RV4 de *X. dendrorhous*. A. Curvas de crecimiento de la cepa en cultivos suplementados con anisomicina y DMSO: Control 1, Medio YM (■); Control 2, Medio YM suplementado con: DMSO (●), 0 µM (■); 60 µM (▲); 90 µM (▼). B. Crecimiento de las colonias en placas YM/agar suplementadas con 0 y 90 µM de anisomicina (Foto obtenida a 7 días de incubación). C. Análisis del contenido de dsRNAs de las colonias tratadas con anisomicina por electroforesis en geles de agarosa. Las muestras se trataron con Nucleasa S1 para la observación del L1 y M-dsRNA. Carril M, marcador de peso molecular (1 kb).

Perfiles idénticos a la cepa original se observaron en las colonias tratadas, no lográndose obtener colonias que carezcan parcial o totalmente de dsRNAs a pesar de que varias generaciones de la levadura se expusieron al tratamiento con anisomicina.

3.4. Caracterización molecular de los dsRNAs de *X. dendrorhous*

Las cepas de *X. dendrorhous* contienen perfiles de dsRNAs variables en cuanto al número y tamaño de los elementos presentes, entre los que existirían distintos genomas virales y elementos satélites. En trabajos desarrollados en paralelo a esta Tesis, se logró identificar tres secuencias de genomas *Totivirus* en la cepa UCD 67-385, dos en el L1-dsRNA (XdV-L1A y XdV-L1B) y una del L2 (XdV-L2), la que presenta una alta identidad con la secuencia del XdV-L1A (Baeza y cols., 2012). Además de los genomas virales, la cepa UCD 67-385 posee elementos de menor tamaño S1- y S2-dsRNA, siendo este último considerado como un satélite según los resultados obtenidos en los experimentos de curación (Baeza y cols., 2009). Considerando el incremento en el número de copias del L1-dsRNA en la cepa curada 385 (S2-40), se propuso determinar las cantidades relativas entre los genomas XdV-L1A/XdV-L1B en esta cepa y compararla con la cepa silvestre UCD 67-385. Los L1-dsRNAs se purificaron y se utilizaron en reacciones de transcripción reversa con partidores específicos diseñados desde los genomas XdV-L1A y XdV-L1B. Los cDNAs obtenidos se utilizaron como molde en reacciones de PCR en tiempo real y desde las curvas de amplificación se determinaron los respectivos ciclos umbrales (Ct) para la cuantificación (RT-qPCR). Las cantidades relativas entre los genomas XdV-L1A/XdV-L1B fue variable (Anexo 1): la razón para la cepa UCD 67-385 fue de aproximadamente 0,3, mientras que para la cepa 385(S2)-40 la relación fue de 12,98, existiendo un incremento en el número de copias

del genoma XdV-L1A en la cepa que carece del S2-dsRNA. Para analizar la relación entre estos genomas virales y los dsRNAs de menor tamaño, se analizó la existencia en estructuras secundarias en los extremos 3' UTR, los que de acuerdo al sistema viral de *S. cerevisiae* son conservados en el genoma viral y sus elementos satélites. Una región común de 19 pb que forma un "Stem-Loop" se identificó en las secuencias de los genomas virales XdV-L1A y XdV-L2 y en los S1 y S2-dsRNAs, la cual difiere en su secuencia (Anexo 2). Estos resultados indicarían que posiblemente existe una estrecha relación entre los genomas virales y los dsRNAs de menor tamaño, los cuales podrían constituir un sistema Helper/satélite.

Para analizar la existencia de genomas virales en las distintas cepas de *X. dendrorhous* (UCD 67-385, UCD 67-202, UCD 68-653C, VKM Y-2786 y RV4), los L1 y L2-dsRNAs se purificaron desde las cepas y se utilizaron como molde para reacciones de RT-PCR con partidores diseñados desde los ORFs del XdV-L1A y XdV-L1B (Tabla 2, en Materiales y métodos). Desde los distintos L1-dsRNAs se obtuvieron amplicones de tamaño esperado con los partidores específicos para los motivos de la RNA polimerasa viral de XdV-L1A y XdV-L1B (Tabla 4). Con los partidores específicos para la cápside, sólo se observó resultados positivos para las cepas UCD 67-385 y UCD 67-202. Un análisis similar se realizó con el L2-dsRNA de la cepa UCD 67-385, para el cual sólo se obtuvieron amplicones con los partidores diseñados desde el XdV-L1A, mientras que para la cepa UCD 68-653C no se obtuvieron amplicones en ninguna de las reacciones realizadas. Los resultados obtenidos sugieren que el L1-dsRNA de las distintas cepas corresponderían a genomas virales *Totivirus*.

Tabla 4. RT-PCR con los L1 y L2-dsRNAs aislados desde las cepas de *X. dendrorhous*

Cepa	dsRNA	Partidores ^a					
		XdV-L1A			XdV-L1B		
		Mot 4F- Mot5R	Mot 4F- Mot 6R	L8.2R- SR4	Mot 4FB- Mot 5RB	Mot 4FB- Mot6RB	LIVR3- Cap288
UCD 67-385	L1	+	+	+	+	+	+
	L2	+	+	+	-	-	-
UCD 67-202	L1	+	+	+	+	+	+
VKMY-2786	L1	+	+	-	+	+	-
RV4	L1	+	+	-	+	+	-
UCD 68-653C	L2	-	-	-	-	-	-

+: Presencia de amplicón de tamaño esperado / - : Ausencia de amplicón

a. Las parejas de partidores se diseñaron desde los ORFs de los genomas virales XdV-L1A y XdV-L1B de la cepa UCD 67-385 de *X. dendrorhous*.

Continuando con la caracterización de los dsRNAs de *X. dendrorhous*, el L1-dsRNA de la cepa RV4 se utilizó como molde en reacciones de RT-PCR con partidores específicos diseñados desde los genomas virales de *X. dendrorhous* y hexanucleótidos de secuencia aleatoria. Los amplicones de cDNA obtenidos tuvieron tamaño promedio de 600 pb, los que se clonaron y secuenciaron para la construcción de una genoteca. Las secuencias obtenidas se analizaron bioinformáticamente para la generación de alineamientos, a partir de los que se diseñó nuevos partidores desde sus extremos con el fin de extender la hebra por "primer walking". De esta forma se logró obtener una secuencia final de 1821 pb, la que se comparó con las secuencias depositadas en la base de datos del Genbank (NCBI) (Anexo 3A). Sólo se encontró identidad con las secuencias de la cápside viral (Gag) de los tres genomas de dsRNAs descritos en *X. dendrorhous*, tanto a nivel nucleotídico como de secuencia traducida (Tabla 5). Considerando estos resultados, se predijo una posible secuencia parcial para la proteína Gag de la cepa RV4 (599 aa) a partir del análisis comparativo con los genomas virales de *X. dendrorhous* (Anexo 4). Un segundo fragmento de 476 pb se amplificó desde el L1-dsRNA, el que presentó identidad con las secuencias de la RNA polimerasa dependiente de RNA de los genomas virales de *X. dendrorhous* y de otras levaduras (Anexo 3B, Tabla 5).

Tabla 5. Alineamiento de los cDNAs secuenciados del L1-dsRNA de la cepa RV4 con la base de datos GenBank^a

cDNA (pb)	Secuencias del Genbank	Identidad (%)
1821	capsid protein [<i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i> virus L1A]	73
	capsid protein [<i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i> virus L2]	68
	capsid protein [<i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i> virus L1b]	33
450	RNA-dependent RNA dependent [<i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i> virus L1A]	86
	RNA-dependent RNA dependent [<i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i> virus L2]	86
	RNA-dependent RNA dependent [<i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i> virus L1B]	82
	putative RNA-dependent RNA dependent [Grapevine associated micovirus-1]	77
	RNA polymerase [<i>Tuber aestivum</i> virus1]	64
	ssRNA-binding protein [<i>Saccharomyces cerevisiae</i> L-A virus]	55

a. La comparación se realizó con la herramienta de búsqueda Blastx (NCBI).

Una estrategia similar se realizó para el clonamiento del M-dsRNA, el que se utilizó como molde en reacciones de RT-PCR con hexanucleótidos de secuencia aleatoria. Se logró obtener una secuencia final de 850 pb que no presentó identidad con las secuencias depositadas en la base de datos Genbank, tanto a nivel nucleotídico como de secuencia traducida (Anexo 3C).

3.5. Caracterización de las VLPs en las cepas de *X. dendrorhous*

Para analizar la encapsidación de los dsRNAs en VLPs en *X. dendrorhous*, se optimizó un protocolo para la extracción y purificación de las partículas virales. Se realizaron ensayos de protección a la digestión con RNAsa A con los extractos de VLPs con el fin de determinar si los dsRNAs se encuentran encapsidados. Todos los dsRNAs de la cepa UCD 67-385 (L1, L2, S1 y S2) fueron resistentes a la digestión enzimática cuando ésta se aplicó antes de la extracción orgánica del RNA total con fenol ácido, los que sólo se digirieron con RNAsa A después de que las proteínas se removieron del extracto. Lo mismo se observó en muestras obtenidas desde las otras cepas de la levadura, en las cuales tanto los elementos L1 (VKMY-2786, UCD 67-202, RV4), L2 (UCD 68-653C), M (RV4) y S1 (UCD 67-202), resistieron el tratamiento enzimático previo a la desproteización (Figura 6). Sugiriendo que los dsRNAs presentes en las distintas cepas se encontrarían encapsidados.

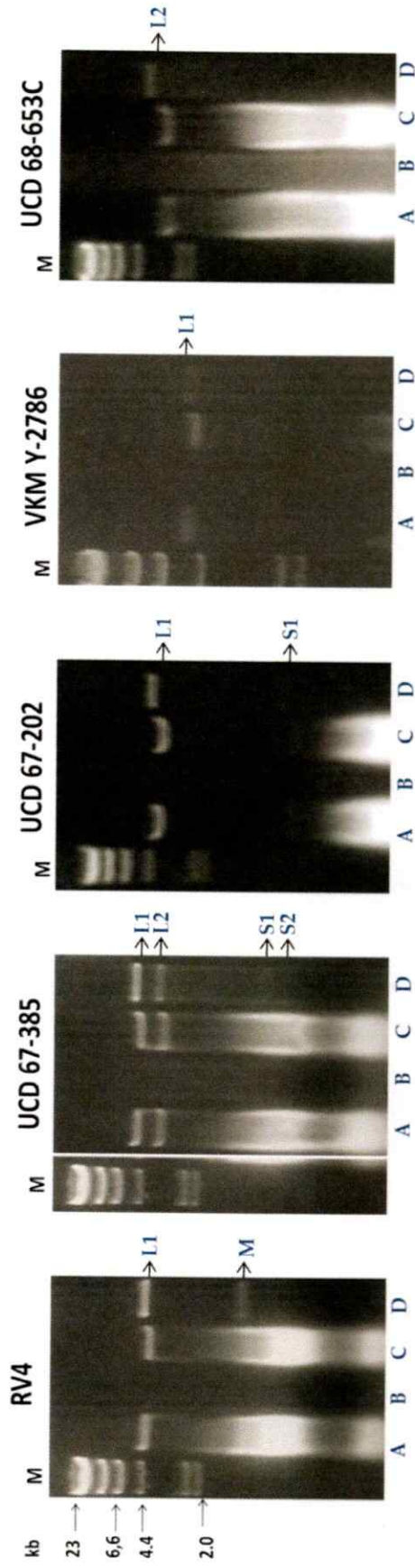
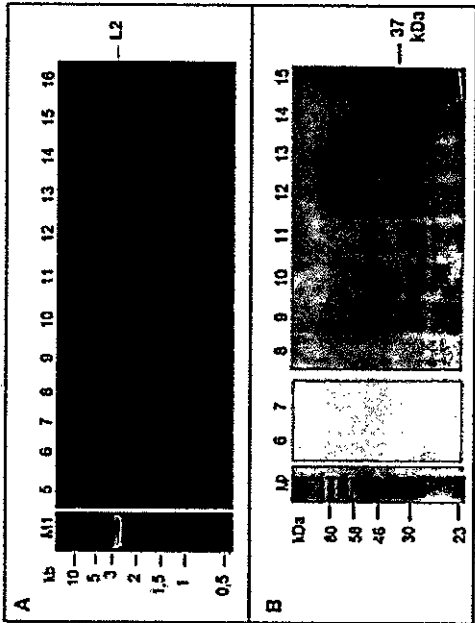


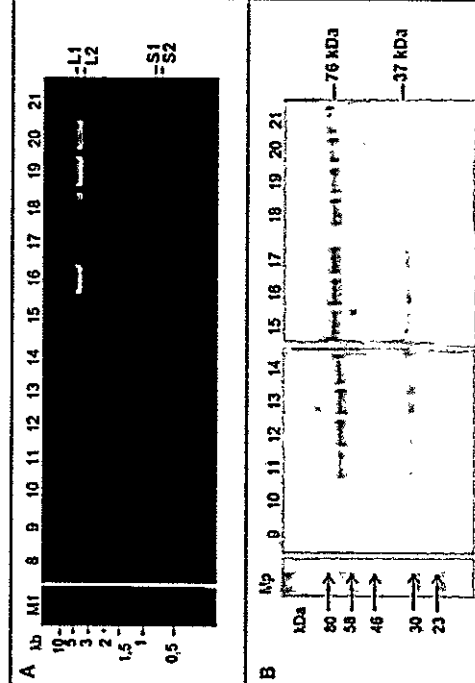
Figura 6. Ensayos de protección a la digestión con RNAsa A con los extractos de VLPs de las cepas de *X. dendrothous*. Se extrajeron las VLPs desde las cepas (RV4, UCD 67-385, UCD 67-202, VKMY-2786 y UCD 68-653.3) y se sometieron a los tratamientos indicados A. Extracto tratado con fenol ácido (pH 4.0); B. Extracto digerido con la enzima RNAsa A después del tratamiento con fenol ácido. C. Extracto tratado con fenol ácido y posteriormente incubado por 1 h a 37 °C; D. Extracto tratado con RNAsa A antes de la extracción con fenol. En cada caso se analizó la presencia de dsRNAs por geles de agarosa. M: Marcador de peso molecular λ HindIII.

Las muestras de VLPs obtenidas de las distintas cepas se separaron según su densidad por ultracentrifugación en gradientes lineales de sacarosa (10-40%). Los dsRNAs y las proteínas presentes en cada fracción se analizaron por electroforesis en geles de agarosa y por SDS-PAGE, respectivamente. Para las cepas VKMY-2786 y UCD 68-653C, varias fracciones que contenían dsRNAs fueron obtenidas a distintas densidades del gradiente de sacarosa, las que además contenían un polipéptido principal de aproximadamente 76 y 37 kDa, respectivamente (Figura 7). Se observó una distribución diferencial en los perfiles de dsRNAs de las cepas de la levadura que portan distintos dsRNAs (RV4 y UCD 67-202): los elementos M-, S1- y L1-dsRNA aparecen solos en los extremos del gradiente, mientras que los múltiples dsRNAs son observados en la mitad del gradiente. En estas cepas, todas las fracciones que portan los dsRNAs contienen una proteína de aproximadamente 76 kDa. Un comportamiento similar se observó en el perfil de dsRNA de la cepa UCD 67-385, encontrando fracciones que sólo contienen el L1- o L2-dsRNA, mientras que los S1 y S2-dsRNAs se observaron en las fracciones intermedias y en conjunto con los dsRNAs de mayor tamaño. En el perfil de proteínas, dos polipéptidos de aproximadamente 76 y 37kKDa se encontraron en las fracciones que contienen los distintos dsRNAs de la cepa, siendo la proteína de mayor tamaño principalmente detectada en las que portan el L1-dsRNA (Figura 7). Los perfiles obtenidos sugieren que sólo existe una proteína viral en las cepas asociada a los L1 y L2-dsRNAs, respectivamente, excepto para la cepa UCD 67-385 que porta ambos dsRNAs, donde se observó las dos proteínas de distinto tamaño. .

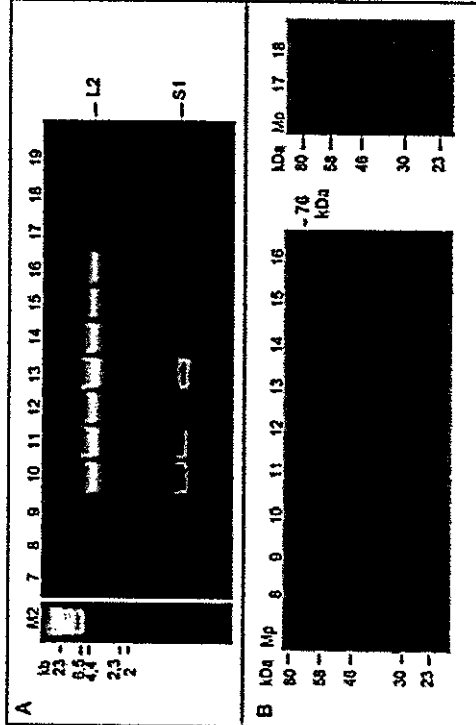
UCD 68-653C



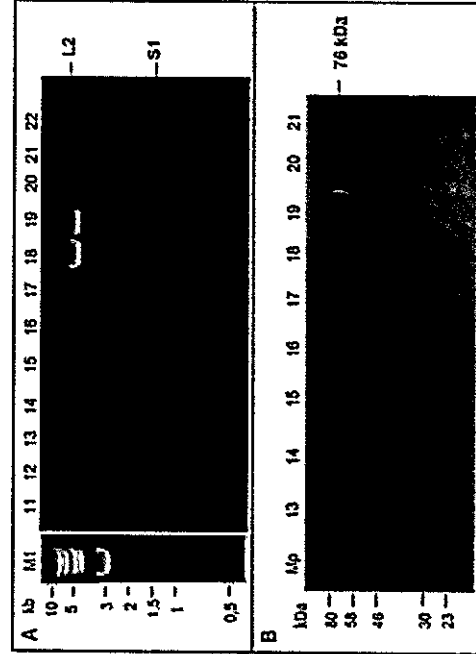
UCD 67-385



UCD 67-202



RV4



VKM Y-2786

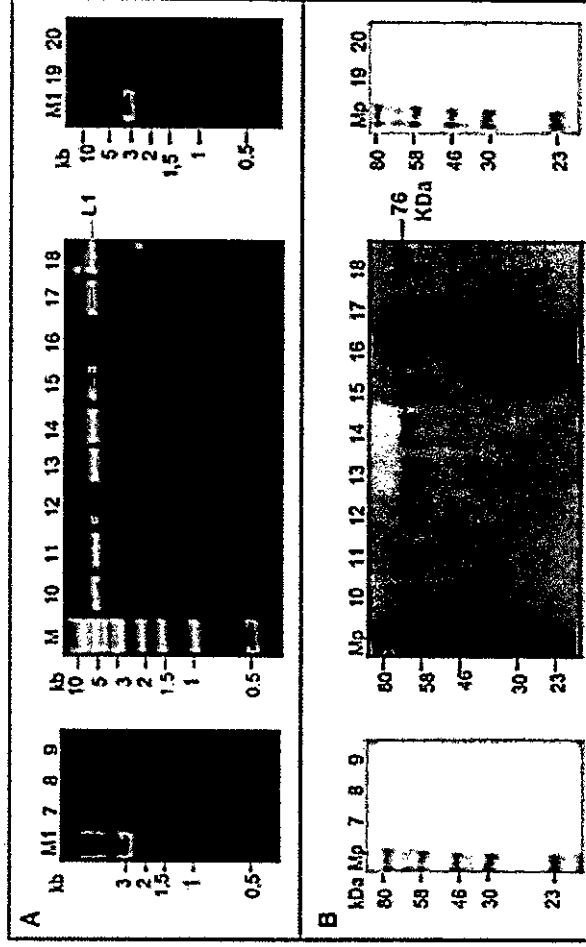


Figura 7. Separación y análisis de los componentes de las VLPs aisladas desde las cepas de *X. dendrothous*. Ordenar cepas según la figura y agrandar la figura. Las VLPs se extrajeron de las distintas cepas de la levadura (VKM Y-2786, UCD 68-653C, RV4, UCD 67-202, UCD 67-385) y se separaron por ultracentrifugación en gradientes de sacarosa (10 – 40 %). Las fracciones se recolectaron desde la zona menos densa hasta completar el volumen total del gradiente. Para cada cepa, se analizó los dsRNAs y las proteínas (37 y 76 kDa) presentes en las fracciones recolectadas por electroforesis en geles de agarosa (A) y SDS-PAGE (B), respectivamente. Se indica el número de la fracción, los dsRNAs y las proteínas observadas. Carril M1: 1 kb DNA marker; M2: λ HindIII; MP: Prestained protein marker.

Para caracterizar los perfiles obtenidos, se determinó la cantidad relativa de cada dsRNA en las distintas fracciones del gradiente con el fin de graficar la distribución de las partículas. En general, se observó dos a tres máximos para los distintos elementos, excepto para el S2-dsRNA de la cepa UCD 67-385 que sólo presentó un máximo (Anexo 5, Tabla 6). La distribución diferencial de los dsRNAs en el gradiente sugiere que existen partículas con distinta densidad producto de variaciones en el contenido de dsRNAs. Considerando las partículas que migran a mayor densidad del gradiente corresponderían a las partículas maduras, se determinó la razón entre los pesos moleculares de las distintas VLPs (W_r) a partir de los picos de intensidad en la concentración de dsRNAs de acuerdo con las fórmulas de Martin y Ames (1961) y Ralston (1993) y se compararon con los valores obtenidos en cada cepa. Las razones estimadas para los L1-dsRNAs fueron similares tanto para la cepa que sólo porta este dsRNA (VKM Y-2786), como para las cepas que además contienen a otros dsRNAs de menor tamaño (RV4, UCD 67-202 y UCD 67-385) (Tabla 6). Un comportamiento similar se observó en las cepas que portan el L2-dsRNAs (UCD 68-653C y UCD 67-385), para las que se obtuvo valores de W_r a pesar que presentan diferencias en el contenido de dsRNAs.

Tabla 6. Distribución de los componentes de las VLPs de *X. dendrorhous* en el gradiente de sacarosa

Cepa	dsRNA	Intensidad máxima ^a	W _r ^b	Proteína (kda) ^c
VKM Y 2786	L1	11	0,5	76
		14	0,7	76
		18	1	76
UCD 67-202	L1	11	0,6	76
		13	0,7	76
		16	1	76
	S1	10	0,7	76
		13	1	76
RV4	L1	18	0,8	76
		21	1	76
	M	14	0,7	76
		17	1	76
UCD 68-653C	L2	9	0,6	37
		11	0,8	37
		13	1	37
UCD 67-385	L1	14	0,6	76 - 37
		16	0,8	76 - 37
		20	1	76 - 37*
	L2	11	0,4	76 - 37
		19	1	76 - 37*
	S1	10	0,7	76 - 37
		13	1	76 - 37
	S2	12	—	76 - 37

- Fracciones que presentan máximos en la intensidad de banda de cada dsRNA.
- El máximo de intensidad registrado a la mayor densidad del gradiente para un dsRNA determinado es considerado como referencia N_H (W_r=1) para calcular los W_r restantes.
- Bandas de proteínas observadas en SDS-PAGE. (*) Proteínas observadas como bandas tenues son indicados.

Identificación de las proteínas virales presentes en *X. dendrorhous*

En trabajos realizados con *S. cerevisiae*, la proteína Gag se observó por SDS-PAGE, mientras que la proteína de fusión Gag-Pol sólo es detectada por análisis de Western blot debido a que es sintetizada en una baja proporción (2%) en comparación con la proteína Gag (Bostian y cols., 1986). Las proteínas Gag de los genomas XdV-L1A, XdV-L1B y XdV-L2 de *X. dendrorhous* tienen una masa molecular estimada de 76.652 Da (681 aa), 38.653 Da (345 aa) y 76.216 (683 aa), respectivamente, los que son similares a los estimados para las proteínas virales purificadas de la cepa UCD 67-385. De acuerdo a esto, las proteínas de 76 y 37 kDa se separaron y aislaron desde los geles de SDS-PAGE para su análisis por MALDI-TOF/MS. Para la identificación de los péptidos, las masas experimentales obtenidas se compararon con las secuencia de la proteína Gag codificada por los genomas virales XdV-L1A, XdV-L1B y XdV-L2 utilizando los programas MS-Digest y FindPept (Anexo 6, Figura 8 A-C). Varios péptidos se identificaron con las masas obtenidas desde la proteína de 76 kDa, lográndose una cobertura total de 27% y 22% de las secuencias de los genomas XdV-L1A y XdV-L1B, respectivamente, mientras que con las masas de la proteína de 37 kDa se obtuvo cobertura total del 19 % para la proteína Gag del XdV-L2. Un análisis similar se realizó con el polipéptido de 76 kDa purificado desde la cepa RV4, lográndose identificar varios péptidos de la secuencia parcial de la proteína Gag (602 aa) (Figura 8 D).

A. XdV-L1A

MHTKFIESIVKTDYEGSFQPLFKDGRFTLINKQTAMVDMLGRQYDVNSELASNFVCGKKKPEVL
HNVGEADFSGLNRKYFDDTNTYSPLAINEFTKFPVGVRLTKGEVDAFAKSQIYEDSQEAYILN
 MLISWFKALLYEDTNSKDNVLHVKQSGYQDSHVKAKEYGGVTGDVVHEINMGPPVDDMPEVMMMV
 RSKDNYWDRPYVLRFDNRSSAQYTFYITHCFGRDGTSPLNVDIHI PSVDFDQMLFEPASGAMRS
ITDPAALPWCKSGTLFGWIKDYVTLNRVERAFSAAFETLTATAFTPMPSYQESLVWDKAITQVV
IAKFAPCRAKI PSNLEGEAMVTDMDAHDVLDDETKTPRKALFSGAMINYLA FMGLHAILSNYAS
 RHENWRS AFLHSHEELAILHDRTVRAALTSVITGKEMVTFMNP NLFVSYDVT PMVNVSKVSFEE
VLERGYPSSLPVHGVPVPMVSGSLF L SANASDVASQCHLEQGMKVTVDEYGT VSPEDALRVAQMY
RMFGHELEIRSEKTEEIHELFAPVQECVIYPSALLYNTRDTDRLKLVSSLRRPRGRSSTIPDVSA
 LTAGQTITIDYTI PRIGMHYFNKRVLPIAPSMVLPQRKREITFRVKGHTVLHKVKMNASNVTRP
VKDFHGGEIQVAPLLPVLRNARVPIQVNQ

B. XdV-L1B

MLTEYVNSIVRLGNGGAFEP T LGDGRFTMVNKTRAVMELGGVKYASNLELATHFQVAKAKFDVI
KPVARSNFYGYNKKFIDESGVYDPLRAIDEYSRTVPGMRLGRDDLRALSLTDNKTDSQEAYIYN
 MLVSWLKARLYVDMKGS DNKFTVKYSSFKDTHVGYDINDSYGIESVEVNLGPPNPTGEAAISLE
 FRDTNNFWSKPYVLKYSNNSMEQGSFYLAHVLSNGTSGLSADIQIDALDFNELLLDPVGSFPT
 GAFNIFADFWAKPNVIWLWIMDYVRLNRVEQEFASAFELLGALATQPLPSYHESILWSKSRTTV
 NMSKFSPTRARVPANLTGEPNVHDLNAQQFTFDEEKSPAGFITASAVLN YAFWIGIYGMVSNFA
 EDCSDWTDAFISSDAELGILSTVEARPAMISLVTGKETNSCFSNNCFLTYDLSGMYGVKQLIVD
EKIDPNHPGVILFDTPVPAFVSGSLLMGAVATDYPVLKHLEPHQHIKVERDGLLGAREAAMLANS
YRLFGNDVIEEHFRSAEVYPTYANSEECVIATYELFGRTRTFDIMRVSSSYKRTGRTYEIPDAT
HVRTYGECKLTMDMPVLAVCGWKQRKTVHRPKMMLDSRRRVATKFMVGATSGFEKTRFAVYNRRN
 VMAQGFHEAKAEMAPALPLVRGSAVSTAPIEPVQEQEPANAVE

C. XdV-L2

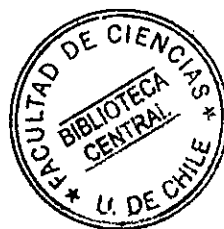
MEGEAMVTDMDAHDVFLDETKTPRKALFSGAMINYLAFMGLHALSNYASRHENWRSAFLHSHEE
 LAILHDRTRAALTSVITGKEMVTFMNPFLVSYDVTMPVNVSKVSFEEVLERGYPSSLPVHGUV
 PMVSGSLFLSANASDVASQCHLEQGMKVTVDEYGTVSPEDALRVAQMYRMFGHELEIRSEKTEE
 IHELFPVQECVIYPSALLYNTRDTDRLKLVSSLRRPGRSSTIPDVSALTAGQTITIDYTI PRI
 GMHYFNKRVLPIAPSMVLPQRKREITFRVKGHTVLHKVKMNASNVT RPVKDFHGGEIQVAPLLP
 VLRNARVPIQVNQTSEEDVTAEDVE

D. L1-dsRNA RV4

FNVCGMKPEIIRNLGEADFTGINKKYFDDTNTYSPLAAINEFTKFVPGVRLTKLEVEAFAKSQV
 YEDTHEQYIYNMLVSWFKAVLYEDTKSKDYILKVKQKGYQDSHVKAIEFGGVGEIEHEIPMGPP
VADVPEVTMTQRSKENYWDRPMVLRFDNKSSAQYTFYLLHCFGRDGSSSLNVDVNI GSVDQDL
LFEPASGAMRSITDPNALPWTHASTLYGWIKDYVTLNRLERAFSAAFEMLTSAFSPAPSYQES
 LVWGKCITQLXMSDFNPCRAKIPSNLDGEPMVYDMDAHDFIIDETLTPRKALLSGALMTYLSYM
 GLHAVLTNYSERHANWRSAFLHTHEELEILHDRASRVALASVIIGKEITTFANMYISYDVT PMA
 DVRAVSFEEILELGXPRSVQIDGIPPFVSGSLFGAVASDVASQTHLRQDLSVTPDRYGTVNSEE
AIQVAQIYRLFGHXIEIRSEKTEELHEIFAPVQECVVYPTTMLHNTRDTDRLLLMSSLRRPGRS
 STIPDVSALTAGQTITLNYTVPRLMHKFNKRVLPIAPSMVLPQRNRDITFRVKGHTVMHKVMRA
KTTLNLTQDFQRENVQIAPLLTI

Figura 8. Análisis de las proteínas Gag de los genomas virales de *X. dendrorhous* por MALDI-TOF/MS. Las proteínas virales de 76 y 37 kDa observadas para la cepa UCD 67-385 se purificaron individualmente desde los geles de SDS-PAGE y se analizaron por MALDI-TOF/MS (Alphalyse Inc.). Los péptidos identificados mediante análisis bioinformático con los programas MS-Digest y FindPept en la secuencia de la proteína Gag de los genomas virales XdV-L1A, XdV-L1B, XdV-L2 y del L1-dsRNA de la cepa RV4 se destacan en rojo.

Las masas experimentales obtenidas para la proteína Gag de la cepa RV4 se compararon con la secuencia de DNA del fragmento clonado desde L1-dsRNA. Para esto, se utilizó el programa Genome-based Fingerprint Scanning (gfs), el que genera una lista de masas teóricas traduciendo los seis marcos de lectura (tres en sentido directo y tres en reverso) y las proteínas resultantes son digeridas *in silico* con tripsina para contrastar los péptidos con las masas obtenidas por el análisis de MALDI-TOF/MS. Se obtuvo resultados positivos en los distintos marcos de lectura, lográndose una mayor coincidencia (35 en total) con la proteína traducida desde el marco de lectura +2 con un 43% de cobertura de la secuencia (Anexo 7). Los resultados obtenidos sugieren que los polipéptidos observados corresponderían a las proteínas de la cápside Gag codificada por los genomas virales de *X. dendrorhous*. Las secuencias de aminoácidos de las proteínas Gag de *X. dendrorhous* identificadas se alinearon y compararon con la descrita para la proteína de la cápside del *Totivirus* de *S. cerevisiae* (ScV-LA). Cada secuencia se analizó con el programa GeneSilico fold prediction metaserver que, a través de distintos algoritmos, permite determinar la existencia de estructuras secundarias. Los aminoácidos que son conservados en los *Totivirus* se identificaron en las secuencias de *X. dendrorhous*, mientras que regiones comunes que forman estructuras de alfa-hélice y hojas-beta se detectaron en todas las secuencias analizadas (Figura 9A). Con estos alineamientos se estableció una secuencia consenso y se elaboró un modelo 3D para la Gag de *X. dendrorhous* que tiene una estructura similar al modelo descrito para la proteína Gag del virus ScV-LA (Figura 9B-C).



A

XdV-L1A MHTKFIESIVKTDYEGSFQPLFKDGRFTLINKQTAMVDMLGRQYDVNSEL 50
 L1-RV4 -----
 XdV-L2 -----
 XdV-L1B MLTEYVNSIVRLGNGGAFEPFLGDGRFTMVNKTRAVMELGGVKYASNLEL 50
 ScV-LA -MLRFVTKNSQDKSSDLFSICSDRGTFFVAHNRVVRTDFKFDNLVFNRYVGV 49

XdV-L1A ASNFNVCCKPEVLHNVGEADFSGLNRKYFDDTNTYSPLAAINEFTKTFVP 100
 L1-RV4 ---FNVCGMKPEIIRNLGEADFTGINKKYFDDTNTYSPLAAINEFTKTFVP 47
 XdV-L2 -----
 XdV-L1B ATHFQVAKAKFDVIKPVARSNFYGYNKKFIDESGVYDPLRAIDEYSRTVP 100
 ScV-LA SQKFTLVG-NPTVCFNEGSSYLEGIACKYLTLDGGLAIDNVLNELRSTCG 98

XdV-L1A GVRLTKGEVDFAKSOIYEDSQEAYILNMLISWFKALLYEDTNSKDNVLH 150
 L1-RV4 GVRLTKLEVEAFKASQVYEDTHEQYIYNMLVSWFKAVLYEDTKSKDYILK 97
 XdV-L2 -----
 XdV-L1B GMRLGRDDLRLALSLTDNKTDSEAYIYNMLVSWLKARLYVDMKGS DNKFT 150
 ScV-LA IPGNAVASHAYNITSWRWYDNHVALLMNMLRAYHLQVLT EQQYSAGDIP 148

XdV-L1A VKQSGYQDSHVKAIEYGGVTG--DVVHEINMGPP-VDDMPEVMMVRSKDN 197
 L1-RV4 VKQKGYQDSHVKAIEFGGVG--EIEHEIPMGPP-VADVPEVTMTQRSKEN 144
 XdV-L2 -----
 XdV-L1B VKYSSFKDTHVGYDINDSYG--IESVEVNLGPPNPTGEAAISLEFRDTNN 198
 ScV-LA MYHDGHVKIKLPVTIDDTAGPTQFAWPSDRSTDSYPDWAQFSESFPSIDV 198

XdV-L1A YWDRPYVLRFDNRSSAQYTFYITHCFGRDGTSPLNVDIHIPSVDFDQMLF 247
 L1-RV4 YWDRPMVLRFDNKSSAQYTFYLLHCFGRDGSSSLNVDVNIQSVDFDQLLF 194
 XdV-L2 -----
 XdV-L1B FWSKPYVLKYSNNSMEQGSFYLAHVLSNGTSGLSADIQIDALDFNELL 248
 ScV-LA PYLDVRPLTVTEVNFVLMMSKWHRRTNLAIDYEAPQLADKFAYRHALTV 248

XdV-L1A EPASGAMRSITDPAALPWCKSGTLFGWIKDYVTLNRVERAFSAAFETLTA 297
 L1-RV4 EPASGAMRSITDPNALPWTASTLYGWIKDYVTLNRLERAFSAAFEMLTS 244
 XdV-L2 -----
 XdV-L1B DPVGSFPTGAFNIFADFWAKPNVIWLWIMDYVRLNRVEQEFASAFELLGA 298
 ScV-LA QDADEWIEGDRTDQFRPPSSKVMLSALRKYVNRNRLYNQFYTAAQLLAQ 298

XdV-L1A IAFTPMPSYQESLVWDKAITQVVIKAFAPCRAKIPSNLEGEAMVTDMDAH 347
 L1-RV4 IAFSPAPSYQESLVWGKCITQL-MSDFNPCRAKIPSNLDGEPVYDMDAH 293
 XdV-L2 -----MEGEAMVTDMDAH 13
 XdV-L1B LATQPLPSYHESILWSKSRTVVNMSKFSPTRARVPANLTGEPNVHDLNAQ 348
 ScV-LA IMMKPVPNCAEGYAWLMHDALVNIKFGSIRGRYPFLLSGDAALIQTAL 348

XdV-L1A DFVLDDETKTPRKALFSGAMINYLAFLMGLHAILSNYASRHENWRS AFLHSH 397
 L1-RV4 DFIIDETLTTPRKALLSGALMTYLSYMGLHAVLTNYSERHANWRS AFLHSH 343
 XdV-L2 DFVLDDETKTPRKALFSGAMINYLAFLMGLHAILSNYASRHENWRS AFLHSH 63
 XdV-L1B QFTFDEEKSPAGFITASAVLN YAFWIGIYGMVSNFAEDCSDWTD AFISSD 398
 ScV-LA DWSAIMAKPELVFTYAMQVSV ALNTGLYLRR----VKKTGFGTTIDDSY 394

XdV-L1A EELAILH DRTVRAALTSVITGKEMVTFMNP NLFVSY-DVTPMVNVSKVSF 446
 L1-RV4 EELEILH DRASVALASV IIGKEIT TFA--NMYISY-DVTPMADVRAVSF 390
 XdV-L2 EELAILH DRTVRAALTSVITGKEMVTFMNP NLFVSY-DVTPMVNVSKVSF 112
 XdV-L1B AELGILSTVEARPAMISLVTGKETNSCF SNNCFLTY-DLSGMYGVKQLIV 447
 ScV-LA EDGAF LQPETFVQAALACCTGQDAPLNGMSDVYV TYPDLLEFD AVTQVPI 444

XdV-L1A EEVLERGY---PSSLPVHGVVPMVSGSLF LLSANASDVA---SQCHLEQGM 490
 L1-RV4 EEILELGY---PRSVQIDGIPPFVSGSLF -GAVASDVA---SQTHLRQDL 433
 XdV-L2 EEVLERGY---PSSLPVHGVVPMVSGSLF LLSANASDVA---SQCHLEQGM 156
 XdV-L1B DEKIDPNH---PGVILFD T VPAFVSGSLLMGAVATDYP---VLKHLEPHQ 491
 ScV-LA TVIEPAGYNI VDDHLVVVGV PVACSPYMI F PVA AFDTANPYCGNFV I KAA 494

XdV-L1A KVTVDEYGT VSPEDALRVAQMYRMFGHELEIRSEKTEEIHEL FAPVQECV 540
 L1-RV4 SVTPDRYGT VNSEEA IQVAQIYRLFGH-IEIRSEKTEELHEI FAPVQECV 482
 XdV-L2 KVTVDEYGT VSPEDALRVAQMYRMFGHELEIRSEKTEEIHEL FAPVQECV 206
 XdV-L1B HIKVERDGLLGAREAA MLANSYRLF GNDV IIEHFRSAEVYPTYANSEECV 541
 ScV-LA NKYL RKGAVYD KLEAWKLA WALRVAGYD THFKVHGDTHGLTKFYADNSDT 544

XdV-L1A IYPSALLYNTRD TDRLKLVSSLRRPGRSSTI PDVSALTAGQTITIDYTIP 590
 L1-RV4 VVYPTTMLHNTRD TDRLLLMSSLRRPGRSSTI PDVSALTAGQTITLNYTV 532
 XdV-L2 IYPSALLYNTRD TDRLKLVSSLRRPGRSSTI PDVSALTAGQTITIDYTIP 256
 XdV-L1B IATYELFGRTRTFDIMRVSSSYKRTGRTYEIPDATHVR TYGECKLTMDMP 591
 ScV-LA WTHIPEFVTDGDVMEVFVTAIERRARHFVELPRLNSPAFFRSVEVSTTIY 594

XdV-L1A RIGMHYFNKRVLPIAPSMVLPQRKREITFRVKGHTVLHKVKMNASN-VTR 639
 L1-RV4 PRLMHKFNKRVLPIAPSMVLPQRNRDITFRVKGHTVMHKVXMR AKT-TIL 581
 XdV-L2 RIGMHYFNKRVLPIAPSMVLPQRKREITFRVKGHTVLHKVKMNASN-VTR 305
 XdV-L1B VLAVCGWKQRKTVHRPKMMLDSRRVATKFMVGATSGFEKTRFAVYNRRNV 641
 ScV-LA DTHVQAG-----AHSVYHARRINLDYVKPVSTGIQVINAGELKNYWG 636

XdV-L1A PVKDFHGGEIQVAPLLPVLARNARVPIQVNQTSEEDVTAEDVE-- 681
 L1-RV4 NTQDFQRENVQIAPLLTI----- 599
 XdV-L2 PVKDFHGGEIQVAPLLPVLARNARVPIQVNQTSEEDVTAEDVE-- 347
 XdV-L1B MAQGFHEAKAEMA PALPLVRGSAVSTAPIEPVQE QEPANAVE-- 683
 ScV-LA SVRR TQOGLGVVGLTMPAVMPTGEPTAGAAHEELIEQADNVLVE 680

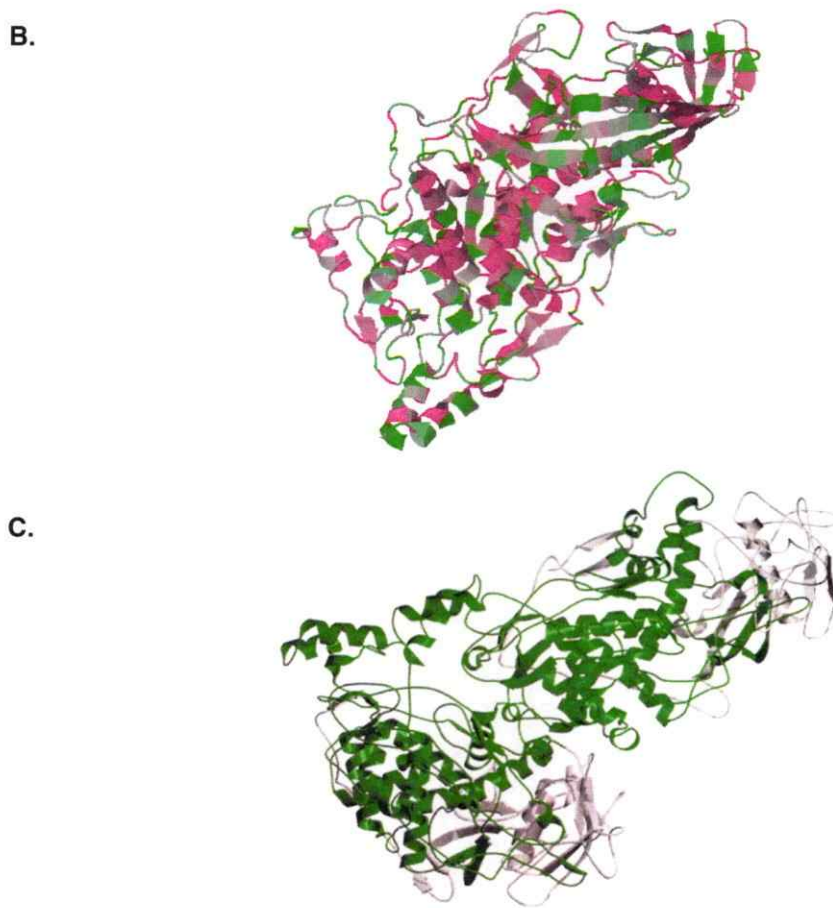
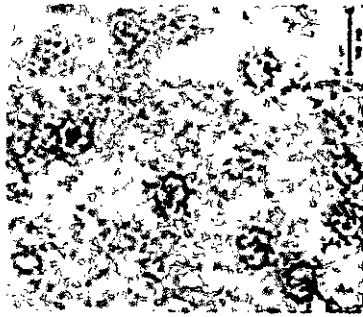


Figura 9. Alineamiento y análisis estructural de las proteínas Gag de *X. dendrorhous*.

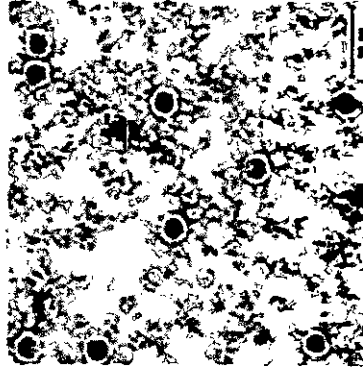
Arreglar y adicionar otra foto A. Las secuencias de distintos genomas de *X. dendrorhous* (XdV-L1A, L1-RV4, XdV-L1B y XdVL2) se alinearon utilizando el programa ClustalW con la secuencia del genoma viral de *S. cerevisiae* (ScV-LA). Las secuencias se analizaron individualmente para determinar la existencia de alfa-hélices (morado) y láminas-beta (verde) con el servidor GeneSilico fold prediction metaserver. Los aminoácidos conservados en los *Totivirus* que fueron identificados son indicados en rojo. B. Modelo de la proteína Gag de *X. dendrorhous* generado con el programa Jalview basado en la estructura cristalográfica de la proteína de la cápside del ScV-LA (PDB N° de acceso 1M1C, 680 aa). Alfa-hélices (morado) y láminas-beta (verde). C. Modelo de la proteína Gag de ScV-LA disponible en la base de datos (PFam: PF09220). Se destacan las regiones con alto (verde) y bajo (gris) contenido de alfa-hélices.

Considerando los resultados anteriores y la similitud de tamaño entre las proteínas virales observadas para las distintas cepas que portan el L1 y/o L2-dsRNA, estas corresponderían a las respectivas proteínas de la cápside viral. Para analizar la morfología de las partículas virales por microscopía electrónica de transmisión (TEM), se seleccionó tres cepas de *X. dendrorhous*, UCD 67-385, RV4 y UCD 68-653C, que poseen el L1 y/o el L2-dsRNAs. Se observaron partículas esféricas de morfología similar a la descrita para los *Totivirus* en las tres cepas analizadas. En la cepa UCD 67-385, éstas presentan un diámetro aproximado de 40 nm, mientras que en las cepas RV4 y UCD 68-653C, las partículas tienen 36 y 26 nm, respectivamente (Figura 10). Los resultados obtenidos sugieren que tanto las cepas que portan el L1 y/o el L2-dsRNA contienen partículas virales, las que se encargarían de la encapsidación de los distintos tipos de dsRNAs observados en *X. dendrorhous*.

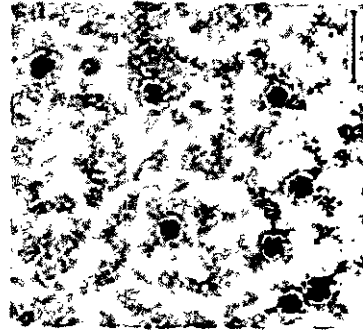
UCD 68-653.3



RV4



UCD 67-385



dsRNA	L2	L1	L1-L2
Díámetro (nm)	25,8 ± 2,57	40 ± 2,51	36,0 ± 2,97
Barra (nm)	40	90	90

Figura 10. Microscopía electrónica de transmisión de las VLPs aisladas desde las cepas portadoras de L1 y/o L2-dsRNAs. Las VLPs fueron purificadas, concentradas y teñidas con acetato de uranilo para su observación en el microscopio electrónico. El diámetro de las partículas fue determinado para cada caso (nm).

DISCUSIÓN

En este trabajo se caracterizó por primera vez los dsRNAs presentes en los aislados de *X. dendrorhous* obtenidos desde el Sur y territorio antártico Chileno. En estos aislados, el número y tamaño de los dsRNAs observados son similares a los previamente descritos para otras cepas de la levadura obtenidas de Rusia, Japón y Argentina (Baeza y cols, 2009; Libkind, 2007). En particular, los dsRNAs (L1 y M-dsRNAs) presentes la cepa RV4 constituyen un perfil similar a los descritos para los aislados de la Patagonia Argentina, siendo el M-dsRNA solamente observado en los aislados obtenidos del cono sur americano. Los análisis moleculares realizados permitieron determinar que ambos dsRNAs (L1 y M-dsRNAs) constituirían un sistema viral similar al descrito para las cepas de *S. cerevisiae* (Wickner y cols., 1996), donde el L1 correspondería al genoma viral y el M-dsRNA al elemento satélite. Los ensayos de actividad antifúngica con la cepa RV4 no permitió relacionar al dsRNA satélite con el fenotipo, ya que tanto las cepas que portan o no el M-dsRNA presentan actividad sobre las mismas especies de levaduras. Estos resultados son similares a los obtenidos en trabajos previos, en el que la actividad de *X. dendrorhous* contra las levaduras *R. sloffiae* y *K. apiculata*, es producida por una proteasa aspártica codificada por un gen nuclear (Baeza y cols., 2010). Se requieren más estudios para identificar la naturaleza de la toxina son necesarios para caracterizar en detalle la actividad antifúngica en *X. dendrorhous*.

En levaduras y hongos filamentosos la relación virus–hospedero se ha estudiado mediante la generación de cepas “curadas” que pierden todos o algunos de los dsRNAs. Para esto se utilizó agentes físicos y químicos que intervienen en los procesos celulares que participan en la mantención y propagación viral. La anisomicina es uno de estos agentes y se caracteriza por tener un efecto mayor en la propagación de los dsRNAs debido a que disminuye la eficiencia del corrimiento en el marco de lectura -1 (CML-1), necesario para la síntesis de la proteína Gag-pol, alterando la generación de las partículas virales que encapsidan a los dsRNAs (Meskauskas y cols., 2003; Dinman y cols., 1997). En la cepa UCD 67-385 sólo el tratamiento con anisomicina permitió generar cepas que carecen del S2-dsRNA (385(S2-40)), las que contienen un número mayor de copias del L1-dsRNA que la cepa silvestre (Flores, 2008; Baeza y cols., 2009-2012). Este comportamiento es similar al descrito para las cepas curadas del M-dsRNA en *S. cerevisiae*, en las que existe una mayor disponibilidad de las proteínas Gag y Gag-Pol para la encapsidación del genoma viral ante la ausencia del dsRNA satélite (Fujimura y cols., 1992; Carroll y Wickner, 1995). Los análisis por RT-qPCR permitieron comparar la cantidad relativa entre XdV-L1A/XdV-L1B en las cepas curada 385(S2-40) y silvestre (UCD 67-385). Interesantemente, se observó un incremento del XdV-L1A en la cepa curada, sugiriendo que el S2-dsRNA es un satélite del genoma viral XdV-L1A y no del XdV-L1B. La existencia de segmentos comunes con estructura de “horquilla” en los distintos dsRNAs, apoyaría la idea que estos elementos conforman un sistema viral Helper/satélite en la cepa UCD 67-385, siguiendo un modelo similar al descrito para los dsRNAs de *S. cerevisiae* (Esteban y cols., 1989). El tratamiento de la cepa RV4 con anisomicina no fue efectivo para inducir la pérdida parcial o total de los dsRNAs, incluso utilizando concentraciones hasta 30 veces mayores a las requeridas para eliminar los dsRNAs en *S. cerevisiae*. Estos resultados fueron inesperados considerando que varias

generaciones de la cepa RV4 se expusieron continuamente a la acción del antibiótico y el efecto inhibitorio de la anisomicina sobre el crecimiento de la levadura en placas y cultivos.

En *X. dendrorhous* el L1-dsRNA es un elemento común entre las cepas que portan dsRNAs, lográndose identificar dos secuencias virales XdV-L1A y XdV-L1B desde el L1-dsRNA de la cepa UCD 67-385 (Baeza y cols., 2009). Resultados similares se obtuvieron en los RT-PCR con los L1-dsRNAs de las distintas cepas analizadas, los cuales contienen motivos conservados de la RNA polimerasa viral de ambos genomas virales, mientras que para la región de la cápside sólo existiría similitud nucleotídica entre los virus de cepas con origen geográfico cercano. Estas observaciones concuerdan con los obtenidos en estudios previos por dot-blot, en los que sólo se observó una hibridación cruzada entre los L1-dsRNAs de las cepas que tienen el mismo origen geográfico (Sanhueza, 2007; Baeza y cols., 2009). Estos resultados fueron recientemente publicados en Baeza y cols. (2012), los que confirman la existencia de genomas virales *Totivirus* en las cepas analizadas. Un caso distinto es el L2-dsRNA de la cepa de UCD 68-653C, con el que no se obtuvo resultados positivos en el RT-PCR con los partidores diseñados desde los genomas virales de la cepa UCD 67-385. Sin embargo, sí presentaría similitud nucleotídica con los L1-dsRNAs de otras cepas de acuerdo con los experimentos de dot-blot (Sanhueza, 2007; Baeza y cols., 2009). Aunque el L2-dsRNA de la cepa UCD 68-653C puede ser considerado como un genoma viral ya que es capaz de mantenerse autónomamente en su hospedero y es encapsidado en VLPs, su clonación y secuenciación es necesaria para caracterizarlo y determinar si corresponde o no a la familia de los *Totivirus*. Además de dsRNAs virales (L1 y/o L2-dsRNA), las cepas de *X. dendrorhous* pueden contener otros dsRNAs de menor tamaño (S1, S2 y M-

dsRNA), los que formarían parte de un sistema viral como elementos satélites. Los ensayos de protección a RNasa A y el análisis de las VLPs lograron por primera vez establecer que todos los dsRNAs observados son encapsidados en partículas virales. Los resultados obtenidos para las cepas UCD 67-202 y RV4 sugieren que tanto el S1 y como el M-dsRNA estarían separadamente encapsidados del L1-dsRNA, obteniéndose fracciones con partículas que sólo contienen un tipo de elemento. Considerando que no existen diferencias estructurales entre las partículas que encapsidan los distintos dsRNAs, la razón W_r entre las partículas que contienen el genoma viral o el dsRNA satélite debe ser similar a la razón entre los pesos moleculares (T_r) de las moléculas encapsidadas. Para ambas cepas UCD 67-385 y RV4, el valor del W_r obtenido ($W_{r_{L1/S1}} = 1,7$; $W_{r_{L1/M}} = 1,4$) es menor al estimado a partir de los tamaños moleculares de los dsRNAs ($T_{r_{L1/S1}} = 4,9$, $T_{r_{L1/M}} = 3,4$), sugiriendo que las partículas que contienen los dsRNAs satélites (S1 y M-dsRNA) presentarían una densidad mayor a la esperada. Este comportamiento se ajusta al modelo de encapsidación por "llenado de cabeza" descrito para los virus de *S. cerevisiae*, en los que el número de moléculas encapsidadas en las partículas virales depende del tamaño del dsRNA: Las partículas que contienen el genoma viral sólo contienen una molécula del L1-dsRNA, a diferencia de las dos moléculas que contiene las partículas que encapsidan al M-dsRNA (Wickner, 1996; Wickner y cols., 2005; Tipper y Schmitt, 1991; Esteban y Wickner, 1986; Thiele y cols., 1984). Independiente del contenido genómico, las partículas virales de *X. dendrorhous* están principalmente constituidas por proteínas de 76 o 37 kDa en las cepas que portan el L1 o el L2-dsRNA, respectivamente. Ambos polipéptidos corresponderían a la proteína de la cápside Gag, ya que es la única que se observa por SDS-PAGE según los trabajos previos realizados en *S. cerevisiae*. La proteína de fusión Gag-Pol sólo puede ser detectada por análisis de "Western blot" debido a su baja tasa de síntesis y a que sólo

existe un dímero de la proteína por partícula viral (Wickner y cols., 1996). Los análisis por MALDI-TOF para las proteínas de la cepa UCD 67-385 permitieron identificar tres proteínas de cápside distintas codificadas por los respectivos genomas virales (XdV-L1A, XdV-L1B y XdV-L2). Resultados similares se obtuvieron para la proteína de 76 kDa de la cepa RV4 al realizar las comparaciones con la secuencia parcial de la Gag identificada. Además, en estas secuencias se identificó múltiples regiones con estructura secundaria y los aminoácidos específicos que participan en el “decapping” de los mRNAs, características comunes para las Gag de los *Totivirus* (Fujimura y Esteban, 2011; Luque y cols., 2010; Caston y cols., 1997-2006). Los resultados obtenidos sugieren que las proteínas virales observadas para las distintas cepas de *X. dendrorhous* corresponderían a la proteína Gag codificada por los genomas virales: 76 kDa por L1-dsRNA y 37kDa por L2-dsRNA. Estas proteínas serían los constituyentes principales de las VLPs y determinarían el tamaño de las partículas que forman. Es así como en la cepa que porta el L1 y L2-dsRNA (UCD 67-385) se observó VLPs de 36 nm de diámetro, tamaño que es promedio considerando las partículas de las otras cepas que sólo portan el L1 (RV4, 40 nm) o el L2-dsRNA (UCD 68-653C, 27 nm). De acuerdo a estas observaciones, se sugiere que VLPs de la cepa UCD 67-385 pueden ser constituídas por las distintas proteínas Gag identificadas. La alta similitud en la secuencia aminoacídica entre las Gag codificadas por XdV-L1A y XdV-L2 apoyaría esta hipótesis. Sin embargo, son necesarios mayores estudios estructurales para evaluar la composición de las VLPs en esta cepa.

En el trabajo realizado se caracterizó por primera vez los dsRNAs y las partículas virales presentes en las distintas cepas de *X. dendrorhous*, logrando determinar la existencia de múltiples genomas virales y satélites capaces de co-existir en un mismo hospedero. Considerando que los micovirus de dsRNAs carecen de una ruta de infección extracelular, estos deben relacionarse estrechamente con sus hospederos, convirtiendo a *X. dendrorhous* en un buen modelo para estudios de co-infección de virus y de co-evolución virus-hospedero. Mayores estudios moleculares y bioquímicos serán necesarios para comprender mejor la replicación y co-existencia de los sistemas virales presentes en los aislados de *X. dendrorhous*.

CONCLUSIONES

1. Los L1 y L2-dsRNA corresponden a genomas virales Totiviridae capaces de coexistir en un mismo hospedero. Estos elementos formarían parte de un sistema viral Helper/satélite en las distintas cepas de la levadura, siendo M, S1 y S2-dsRNAs los elementos satélites.
2. En la cepa UCD 67-385 se expresan tres proteínas Gag diferentes que son las encargadas de encapsidar a los distintos dsRNAs. Estos constituyen un sistema viral altamente complejo y distinto a lo observado en otras levaduras.
3. Los dsRNAs de *X. dendrorhous* no son los responsables de la actividad antifúngica observada en la levadura, siendo la función de los dsRNAs satélites (M, S1 y S2-dsRNA) aún desconocida.

BIBLIOGRAFÍA

Baeza M., Sanhueza M., Flores O., Oviedo V., Libkind D., Cifuentes V. 2009. Polymorphism of viral dsRNA in *Xanthophyllomyces dendrorhous* strains isolated from different geographic areas. *Viol. J.* 6:160.

Baeza M., Flores O., Carrasco M., Rozas JM., Oviedo V., Barahona S., Cifuentes V. 2010. The inter-generic fungicidal activity of *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *J. Microbiol.* 48:822-828.

Baeza M., Bravo, N., Sanhueza, M., Flores, O., Villarreal, P., and Cifuentes, V., 2012. Molecular characterization of *Totiviruses* in *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Viol. J.* 9, 140.

Bevan E., Makower M. 1963. The physiological basis of the killer character in yeast. 21st Int. Congr. Genetics 1:202-203.

Bostian K., Sturgeon J., Tipper D. 1980. Encapsulation of yeast killer double-stranded ribonucleic acids: dependence of M on L. *J. Bacteriol.* 143:463-470.

Boyle J., Lew A. 1995. An inexpensive alternative to glassmilk for DNA purification. *Trends Genet.* 11:8.

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.

Castón J., Luque D., Trus B., Rivas G., Alfonso C., González J., Carrasco J., Annamalai P., Ghabrial S. 2006. Three-dimensional structure and stoichiometry of *Helminthosporium victoriae* 190S *Totivirus*. *Virology* 347:323-332.

Castón J., Trus B., Booy F., Wickner R., Wall J., Steven A. 1997. Structure of L-A virus: a specialized compartment for the transcription and replication of double-stranded RNA. *J. Cell Biol.* 138:975-985.

Dinman J., 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. Sci.* 94:6606-6611.

Dinman J., Icho T., Wickner R. 1991. A -1 ribosomal frameshifting in a double-stranded RNA virus of yeast forms gag-pol fusion protein. Proc. Natl. Acad. Sci. 88:174-178.

Esteban R., Wickner R. 1986. Three different M1 RNA-containing viruslike particle, types in *Saccharomyces cerevisiae*: in vitro M1 double-stranded RNA synthesis. Mol. Cell Biol. 6:1552-1561.

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.

Flores O. 2011. Caracterización de Elementos Genéticos Extracromosómicos y su relación con la actividad micocida en *Xanthophyllomyces dendrorhous*. Tesis entregada para optar al grado de Magíster en Ciencias Biológicas con mención en Microbiología. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

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

Fujimura T., Esteban R. 2011. Cap-snatching mechanism in yeast L-A double-stranded RNA virus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108:17667-17671.

Fujimura T., Esteban R., 2013. Cap snatching in yeast L-BC double-stranded RNA *Totivirus*. *J. Biol. Chem.* 288:23716-23724.

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

Fujimura T., Esteban R., Esteban L., Wickner R. 1990. Portable encapsidation signal of the L-A double-stranded RNA virus of *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell.* 62:819–828.

Fujimura T., Wickner R. 1989. Reconstitution of template-dependent in vitro transcriptase activity of a yeast double-stranded RNA virus. *J. Biol. Chem.* 264:10872-10877.

Fujimura T., Wickner R. 1988. Gene overlap results in a viral protein having an RNA binding domain and a major coat protein domain. *Cell* 55:663–671.

Gasteiger E., Hoogland C., Gattiker A., Duvaud S., Wilkins M., Appel R., Bairoch A. 2005. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server: The Proteomics Protocols Handbook, Humana Press pp. 571-607.

Gattiker A., Bienvenut W., Bairoch A., Gasteiger E. 2002. FindPept, a tool to identify unmatched masses in peptide mass fingerprinting protein identification. *Proteomics* 2; 1435-1444.

Ghabrial S., Patterson J. 1999. *Totiviruses* (Totiviridae). *Encyclopedia of Virology*, 2nd Edition. Academic Press. New York, USA. pp 1808-1817.

Golubev W. 1995. Perfect state of *Rhodomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*). *Yeast* 11:101-110.

Golubev W., Shabalin Y. 1994. Microcin production by the yeast *Cryptococcus humicola*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 19:105-110.

Goujon M., McWilliam H., Li W., Valentin F., Squizzato S., Paern J., Lopez R. 2010. A new bioinformatics analysis tools framework at EMBL-EBI. *Nucl. Acids Res.* 38 Suppl: W695-9.

Gruber A., Lorenz R., Bernhart H., Neuböck R., Hofacker I. 2008. The Vienna RNA Websuite. *Nucl. Acids Res.* 36 (Web Server issue): W70–W74.

Guo F., Ma Y., Xu H., Wang X., Chi Z. 2013. A novel killer toxin produced by the marine-derived yeast *Wickerhamomyces anomalus* YF07b. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 103:737-746.

Holmes M., Giddings M. 2008. Using GFS to identify encoding genomic loci from protein mass spectral data. *Curr. Protoc. Bioinformatics.* 13: 13.9.

Hua M., Chi Z., Liu G., Buzdar M., Chi Z. 2010. Production of a novel and cold-active killer toxin by *Mrakia frigida* 2E00797 isolated from sea sediment in Antarctica. *Extremophiles.* 14:515-21.

Ivannikova Y., Naumova E., Naumov G. 2007. Viral dsRNA in the wine yeast *Saccharomyces bayanus var. uvarum*. *Res. Microbiol.* 158:638-43.

Kurowski M., Bujnicki J. 2003. GeneSilico protein structure prediction meta-server. *Nucl. Acids Res.* 3:3305-3307.

Larkin M., Blackshields G., Brown N., Chenna R., McGettigan P., McWilliam H., Valentin F., Wallace I., Wilm A., Lopez R., Thompson J., Gibson T., Higgins D. 2007. ClustalW and ClustalX version 2. *Bioinformatics* 23:2947-2948.

Lenski R., Riley M. 2002. Chemical warfare from an ecological perspective. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99:556-558.

Libkind D., Moline M., de Garcia V., Fontenla S., van Broock M. 2008. Characterization of a novel South American population of the astaxanthin producing yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*). *J. Ind Microbiol Biotechnol* 35:151-158.

Libkind D., Ruffini A., Van Broock M., Alves L., Sampaio J. 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.

Luque D., González J., Garriga D., Ghabrial S., Havens W., Trus B., Verdaguer N., Carrascosa J., Castón J. 2010. The T=1 capsid protein of *Penicillium chrysogenum* virus is formed by a repeated helix-rich core indicative of gene duplication. *J. Virol.* 84:7256-7266.

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

Martin R., Ames B. 1961. A method for determining the sedimentation behavior of enzymes: application to protein mixtures. *J. Biol. Chem.* 236:1372-1379.

Marquina D., Santos A., Peinado J. 2002. Biology of killer yeasts. *Int. Microbiol.* 5:65-71.

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

Meskauskas A., Harger J., Muldoon K., 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 M., Soneda M. 1976. *Phaffia*, a New Yeast Genus in the *Deuteromycotina* (*Blastomycetes*). *Inter. J. Syst. Bacteriol.* 26:6

Newman A., Elliott S., McLaughlin C., Sutherland P., Warner R. 1981. Replication of double-stranded RNA of the virus-like particles in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Virol.* 38:263-271.

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

- Nuss D. 1996. Using Hypoviruses to Probe and Perturb Signal Transduction Processes Underlying Fungal Pathogenesis. *Plant Cell*.8:1845–1853.
- Ohtake Y., Wickner R. 1995. Yeast virus propagation depends critically on free 60S ribosomal subunit concentration. *Mol. Cell. Biol.* 15:2772-2781.
- Paluszynski J., Klassen R., Meinhardt F. 2007. *Pichia acaciae* Killer System: Genetic Analysis of Toxin Immunity. *Appl. Environ. Microbiol.* 73:4373–4378.
- 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.
- Powilleit F., Breining T., Schmitt M. 2007. Exploiting the yeast L-A viral capsid for the *In vivo* assembly of chimeric VLPs as platform in vaccine development and foreign protein expression. *Plos One* 2:e415.
- Ralston, G. B. 1993. Introduction to analytical ultracentrifugation. Beckman Instruments.
- Rasband W. 2010. ImageJ (US National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, 1997–2007). World Wide Web (URL: <http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

Ribas J., Fujimura T., Wickner R. 1994. A cryptic RNA-binding domain in the Pol region of the L-A double-stranded RNA virus Gag-Pol fusion protein. *J. Virol.* 1994, 68:6014-6020.

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

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

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

Sanhueza M. 2007. Caracterización genética de moléculas de dsRNA presentes en *Xanthophyllomyces dendrorhous*. Memoria de título entregada para optar al título de Ingeniero en Biotecnología Molecular. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

Thiele, D. , Hannig E.,Leibowitz M. 1984. Multiple L double-stranded RNA species of *Saccharomyces cerevisiae*: evidence for separate encapsidation. *Mol. Cell. Biol.* 4:92-100.

Tipper D., Schmitt M.1991. Yeast dsRNA viruses: replication and killer phenotypes. *Mol. Microbiol.* 5:2331-2338.

Van de Sande W., Lo-Tem-Foe J., Belkum A., Netea M., Kullberg B., Vonk A. 2010. Mycoviruses: future therapeutic agents of invasive fungal infections in humans?. *Eur. J. Microbiol. Infect Dis.* 29:755-763.

Wang X., Chi Z., Peng Y., Wang X., Ru X., Chi Z. 2012. Purification, characterization and gene cloning of the killer toxin produced by the marine-derived yeast *Williopsis saturnus* WC91-2. *Microbiol. Res.* 167:558–563.

Waterhouse A., Procter J., Martin D., Clamp M., Barton G. 2009. Jalview Version 2-a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics* 25:1189–1191.

Weber R., Davoli P., Anke H. 2007. A microbial consortium involving the astaxanthin producer *Xanthophyllomyces dendrorhous* on freshly cut birch stumps in Germany. *Mycologist* 20:57-61.

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

Wickner R., Jinghua T., Gardner N., Johnson J. 2008. The Yeast dsRNA Virus L-A Resembles Mammalian dsRNA Virus Cores. In John T. Patton. *Segmented Double-stranded RNA Viruses: Structure and Molecular Biology*. Caister Academic Press. ISBN 978-1-904455-21-9.

Wickner R., Wang C., Patterson J. 2005. Family Totiviridae. In *Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses: eighth report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses*. Elsevier Academic Press, San Diego, CA, pp. 571-580.

Williams T., Leibowitz M. 1987. Conservative mechanism of the in vitro transcription of killer virus of yeast. *Virology* 158:231-234.

Wisniewski M., Suarez M., Holmes M., Giddings M. 2004. GFSWeb: A web tool for genome-based identification of proteins from mass spectrometric samples. *J Proteome Res.* 3: 1292-1295.

Anexos.

Anexo 1. Cuantificación relativa de los genomas XdV-L1A y XdV-L1B en las cepas de *X. dendrorhous* por RT-qPCR.

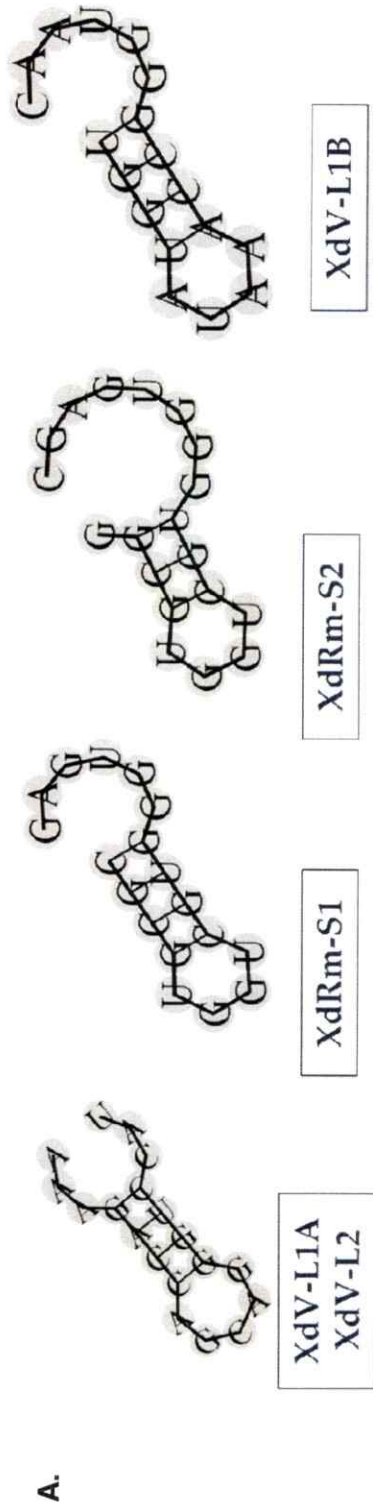
Cepa	Genoma	Ct ^a	Ct _{promedio}	Δ Ct ^b	L1A/L1B (2 ^{-ΔCt}) ^c
UCD 67-385	XdV-L1A	17,53	17,38	-1,61	0,32
		17,4			
		17,21			
	XdV-L1B	15,85	15,77		
		15,68			
		15,79			
385 (S2)-40	XdV-L1A	11,87	11,70	1,81	12,98
		11,97			
		11,25			
	XdV-L1B	13,34	13,57		
		13,58			
		13,78			

a. Valores de Ct (ciclo umbral) obtenido desde las curvas de amplificación. Para cada genoma las mediciones por RT-qPCR se realizaron por triplicado.

b. Δ Ct = (Ct_{promedio}(XdV-L1A) – Ct_{promedio}(XdV-L1B))

c. Cantidad relativa entre los genomas virales XdV-L1A/XdV-L1B.

Anexo 2. Identificación de estructuras secundarias en los 3'UTR de los dsRNAs de la cepa UCD 67-385.



B.

XdV-L1A	augugcaca	aaga	ccag	caggguc	cau	aacaacauc	cugaauc	uacaaaggcca
XdV-L2	augucaca	aaga	ccag	caggguc	cau			
XdRm-S1	ggucgugauc	gcgu	ggucgug	gggugag	cgucug	ccaagg	cagcccc	gucaccagcgca
XdRm-S2	aagggauu	ggcgug	ggcgug	gggugag	cgucug	ccaagg	cagcccc	gucaccagcgcauuuaaagu
XdV-L1B	ggcguaacc	gguuu	aaac	cgggu	aac	gaggg	agag	agaaa

A. Alineamiento de los 3'UTR de los dsRNAs (XdV-L1A, XdV-L1B, XdV-L2, XdRm-S1 y XdRm-S2) descritas para la cepa. La región que forma el "Stem-loop" es destacada en cada caso: XdV-L1A, XdV-L2 en rojo; XdRm-S1, XdRm-S2 en azul y XdV-L1B en verde. B. Esquema del "Stem-loop" identificado por el programa RNA fold web server en las secuencias analizadas.

Anexo 3. Secuencias de los fragmentos clonados desde el L1-dsRNA y M-dsRNA de la cepa RV4.

A. L1-dsRNA: Contig N° 1 (1821 pb)

1 CTTCAACGGTT TGTGGTATGA AACCTGAAAT CATAAGGAAC CTAGGTGAAG CAGATTTTAC CGGTATCAAC AAGAAATATT TTGATGATAC CAACACCTAC

101 TCACCTCTGG CCGCAATAAA CGAGTTTACC AAATTCGTTT CAGGAGTCAG ACTTACGAAG TTAGAAGTCG AAGCTTTTGC TAAAAAGCCAA GTATATGAAG

201 ACACTCATGA GCAGTACATT TACAATATGC TCGTCTCTTG GTTTAAAGCG GTCCCTATG AAGACACCAA GTCTAAAAGAT TATATTTCTTA AGGTTAAACA

301 GAAGGGCTAT CAGGATTAC ACGTTAAAGC CGAATTCGGT GGCCTGGTAG GTGAGATCGA ACACGAAATA CCTATGGGTC CGCCTGTTGC CGACGTCCCC

401 GAAGTAACAA TGACTCAGG CAGCAAAGAA AACTATTTGG ACAGGCCTAT GGTCTTGAGA TTTGATAACA AATCTTCTGC CCAATACACT TTTTACTTAC

501 TCCACTGTTT CGGTAGAGAC GGATCTTCGT CTCTCAATGT TGATGTGAAC ATAGGCTCAG TGGACTTTGA ACAACTGCTG TTCGAACCAG CTTCAGGAGC

601 AATGCGTTCA ATAAC TGACC CAAACGCACT CCCTGGACTC ATGCTTCAAC TTTGTACGGA TGGATCAAAG ATTATGTGAC GCTAAAACAGA CTTGAGAGGG

701 CTTTTCAGTGC CGCCTTCGAA ATGCTCACTT CAATTGCGTT TTCTCCAGCA CCGTCTACC AGGAGAGTTT AGTATGGGGG AAGTGCAATCA CTCAGCTAAC

801 TATGAGTGAT TTCAATCCGT GTAGAGTAA AATACCTTCT AATCTAGACG GAGAGCCGAT GGTATACGAC ATGGATGCGC ATGACTTTTAT AATCGATGAA

901 ACTCTAACAC CGAGGAAAGC GCTGTTGTCA GGGGCCCTGA TGACATACTT AAGTTACAIG GGTTTACACG CTGTGCTTAC CAACTATTTCG GAGCGACATG

1001 CTAAC TGGAG GTCGGCCTTC CTACATACAC ACGAAGAGTT GGAATATTA CATGACAGGG CGTCAACGTT AGCACTGGCC AGCGTGATAA TCGGGAAGGA

1101 GATCAACA TCCGCAAWMG YCAACATGTA TATCAGCTAC GATGTGACCC CAATGGCGGA TGTGAGAGCT GTATCTTTTG AAGAAATATT GGAATTTGGGA

1201 TACCCTAGGT CCGTTCAGAT AGACGGTATT CCACCATTTCG TATCGGGATC TCTATTTCYA GGGGCTGTAG CTTCTGATGT AGCGTCTCAA ACTCACTTAA

1301 GACAGGACCT GTCTGTACA CCGGATAGGT ACGGCACTGT AAACAGTGAG GAGGCGATCC AGGTTGCACA AATATACAGA CTGTTCCGGTC ATGRAATAGA
 1401 GATCAGGTCT GAGAAGACAG AGGAGCTTCA CGAAATATTC GCTCCTGTAC AGGAGTGTGT GGTATACCCG ACCACCATGT TGCATAACAC AAGAGATACA
 1501 GACAGACTAC TGCTCATGTC TTCACTACGC AGACCCGGCC GCAGTTCAAC TATACTGAC GTCTCGGCC TAACTGCTGG ACAGACTATT ACACTCAATT
 1601 ACACCGTGCC GAGGCTGTCC ATGCATAAGT TTAATAAACG GGTATTACCT ATAGCGCCTT CTATGGTTTT GCCTCAACGC AACAGAGACA TAACTGTTACG
 1701 GGTAAAGGG CACACCGTGA TGCACAAAGT GRAGATGGC GCTAAAACA CAACTCTGAA TACACAGGAT TTCAAAGAG AAAACGTACA AATTGCACCC
 1801 CTGTTGACTA TTGAAGTCCT C

B. L1-dsRNA: Contig N°2 (476 pb)

1 GTTCTTGAGC ACGCTGCAA CTCCGTTGGT GACGTTTACG TCATTAGTGT CTTGCCTAC CGGGAAC TGGGCAGCA CGTTTTGCA ATTGTAGAAA
 101 GCAAAATGTG CAAGCACGTA ACTGGTGAGA TCGGTGCCGT AGATTGCACG TTGTTTACC CATTATATT CGTTGAAGAC CAGCCTCGTA TTTCTGGTGG
 201 TCTGTACCG AAGTTGTAT ATTACATATT AGGCATATTT GTTATCGTTA TAAATTTGTT CTTGAGCGCC TGCTGTTCTT TGATTACGTA TTGTTCACT
 301 CTCTGATATT GCGAGTGAT GCTGCCAGCG GCGCTCCACT GCCACCTATT AGACCAGTAT TCGTCCACG AGAACTTGA AGGTCCTCTT CCTATGCTT
 401 TAGTGTCCG AATATCTTTG CATGCACCTAT TAAAGATGTC GTCGTAGCTA AAGTTAGTTA CGTTAACAGA CATTCT

C. M-dsRNA (850 pb)

1 GCTTGATGGC GTGCACGACA TTTGAATGTG AATCCGGTG GTAATAGCAAG AGCTGGACAG CAGCCTGCAG TGATGACACC GTGGTGTATC CGATAATGCT

101 GTTAGAAGAC TGATCGGTGT ATCATGTGGG CGCGATGATG AGGGCGTAGA ATACTGGTGA AAGAAATAAT AACAAATATA AGCTAGCCGC CGCACAACTC

201 CAAGGTGTAT AGTAATAAAT AGGAGCAATT ATGTAACAAC AGAATGTGCA GTATGATGTC AGCCACCGAC AATGGCATCA CGAACGACTT ATGGGCGGAG

301 CCGTAACCCG ACGTTGACTA GCTATTTCTGA AAGTGTCTGG GACAGAGACT CGTGGCGCCG ATATAGTATG CGGCAAAACG GCGGCCTGAG GTGCAGTAAG

401 TACCTTAGAA CCAAGTCGAA ACTAAGCGCG ACCTAATGAT TCGGCGGACA GTGTCCCAGA TGGCAGGCTC ATAAGTGGGT GTCTCTGGGA TACGAGTGAC

501 CACGCAGCAC CAGTGGCTGT GTTGGGAACT ATTATCGATG AAGCAAAACG CTGAGCAAAG TGTGTGAGCA GCTACCGACA ATGCACCAC TAACAACAAC

601 GGGCGGAGCA GTAACCTGAA GTTGACTAAT GTAAAGCACA TGGCAAAGTA ACAGCCGATA AGGAAATATG GCGGAATATG CACACCTATG ATGGTGGCAG

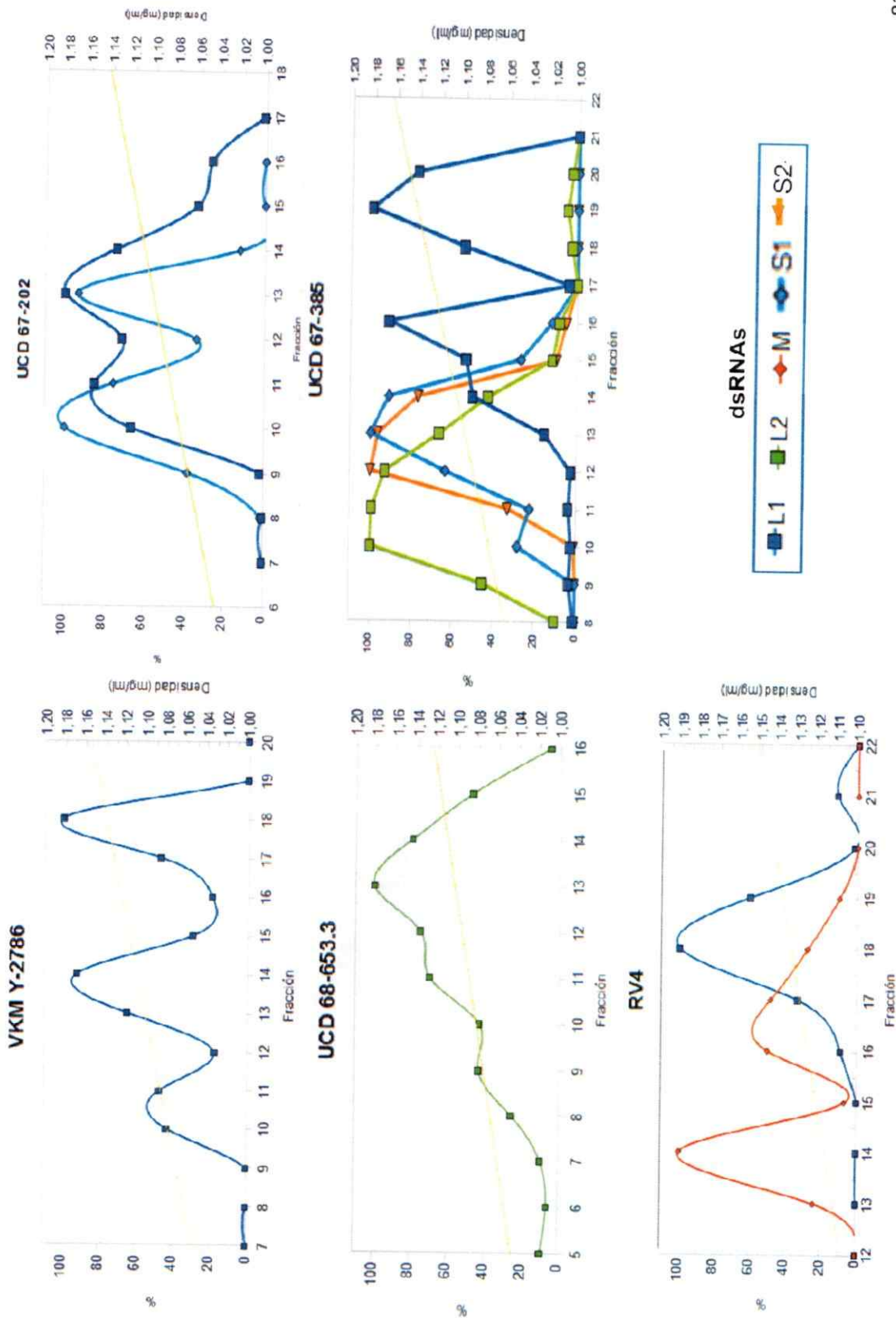
701 AATCTGCGTC GCGCTCAAAC GTTGACGGTG GAGCGGGGTA TATTCCTAAA AAGCGAFTTG CACCATCAAC TGGTAACGCG GTTGGTGTGTC TGACCTGATAG

801 TGACGTACAC AACCACTAC GTGCTGAAAT GCGATCGGGT CACGCATCAA

Anexo 4. Secuencia de aminoácidos parcial de la proteína Gag (599 aa): cepa RV4

1 FNVCGMKPEI IRNLGEADFT GINKKYFDDT NTYSPLAAIN EFTKFVPGVR LTKLEVEAFA KSQVYEDTHE QYIYNMLVSW
80 FKAVLYEDTK SKDYILKVKQ KGYQDSHVKA EFGGVVGEIE HEIPMGPPVA DVPEVTMTQR SKENYWDRPM VLRFDNKSSA
160 QYTFYLLHCF GRDGSSSLNV DVNIGSVDFD QLLFEPASGA MRSITDPNAL PWTASTLYG WIKDYVTLNR LERAFSAAFE
240 MLTSAFSPA PSYQESLVWG KCITQLTMSD FNPCRAKIPS NLDGEPMYD MDAHDFIIDE TLTPRKALLS GALMTYLSYM
320 GLHAVLTNYS ERHANWRSF LHTHEELEIL HDRASRVALA SVIIGKEITT FANMYISYDV TPMADVRAVS FEEILLELGGXP
400 RSVQIDGIPP FVSGSLFGAV ASDVASQTHL RQDLSVTPDR YGTVNSEEAI QVAQIYRLFG HXIEIRSEKT EELHEIFAPV
480 QECVVYPTTM LHNTRDTRL LLMSSLLRRPG RSSTIPDVSA LTAGQTITLN YTVPRMLMHKF NKRVLPIAPS MVLPRNDIT
560 FRVKGHTVMH KVMRAKTTIL NTQDFQRENV QIAPLLTIF

Anexo 5. Distribución de los dsRNAs presentes en las cepas de *X. dendrorhous* en el gradiente de sacarosa.



Anexo 6. Digestión *in silico* de las proteínas Gag de *X. dendrorhous* con el programa MS Digestor.

A. XdV-L1A

Masasteóricas (M+H)^a	Nº aa	% de cobertura de la proteína^b	Secuencia de aminoácidos
403,2	4	0,6	RPGR
427,2	4	0,6	<u>DTDR</u>
485,3	4	0,6	<u>MHTK</u>
506,2	4	0,6	FDNR
593,3	5	0,7	FAPCR
665,4	5	0,7	<u>EITFR</u>
674,4	6	0,9	<u>FVPGVR</u>
674,4	6	0,9	<u>LVSSLR</u>
735,4	6	0,9	FTLINK
741,3	5	0,7	HENWR
767,4	6	0,9	<u>VAQMYR</u>
791,5	7	1,0	GHTVLHK
824,5	7	1,0	DNVLHVK
835,5	7	1,0	<u>FIESIVK</u>
836,4	8	1,2	<u>GEVDAFAK</u>
880,5	7	1,0	DYVTLNR
942,6	9	1,3	<u>AITQVVIK</u>
960,6	10	1,5	AALTSVITGK
1.008,6	9	1,3	<u>SGTLFGWIK</u>
1.009,5	8	1,2	<u>IGMHYFNK</u>
1.107,6	9	1,3	<u>VSFEEVLER</u>
1.121,5	10	1,5	<u>QTAMVDMLGR</u>
1.148,5	10	1,5	QSGYQDSHVK
1.153,6	10	1,5	ALLYEDTNSK
1.216,6	11	1,6	<u>MNASNVTRPVK</u>
1.301,7	12	1,8	<u>SITDPAALPWCK</u>
1.420,8	13	1,9	VLPIAPSMVLPQR
1.431,7	12	1,8	<u>TDYEGSFQPLFK</u>
1.496,7	11	1,6	<u>DNYWDRPYVLR</u>
1.750,8	16	2,3	VTVDEYGTVSPEDALR
1.780,8	15	2,2	SSAQYTFYITHCFGR
1.861,0	17	2,5	DFHGGEIQVAPLLPVLR
1.875,0	16	2,3	SAFLHSHEELAILHDR

1.887,9	17	2,5	QYDVNSELASNFNVCCK
1.982,0	18	2,6	<u>KPEVLHNVGEADFSGLNR</u>
2.102,0	19	2,8	VPIQVNQTSEEDVTAEDVE
2.210,0	19	2,8	<u>YFDDTNTYSPLAAINEFTK</u>
2.520,3	24	3,5	SSTIPDVSALTAGQTITIDYTIPR
2.578,2	21	3,1	SQIYEDSQEAYILNMLISWFK
2.762,3	24	3,5	EMVTFMNPFLVSYDVTMPVNVSK
2.831,4	26	3,8	ALFSGAMINYLAFLMGLHAILSNYASR
3.035,5	26	3,8	TEEIHLEFAPVQECVIYPSALLYNTR
3.259,5	30	4,4	DGTSPLNVDIHIPSVDFDQMLFEPASGAMR
3.121,5	28	4,1	AFSAAFETLTAIAFTPMPSYQESLVWDK
3.375,5	33	4,8	AEYGGVTGDVVHEINMGPPVDDMPEVMMVVR
3.999,9	39	5,7	GYPSSLPVHGVVPMVSGSLFLSANASDVASQCHLEQGMK

90 (26)^c**B. XdV-L1B**

Masas teóricas (M+H) ^a	N° aa	% de cobertura de la proteína ^b	Secuencia de aminoácidos
402,2	3	0,4	LNR
403,2	3	0,4	<u>VER</u>
418,3	4	0,6	VATK
494,3	4	0,6	<u>FTVK</u>
518,3	4	0,6	<u>DDL R</u>
520,2	5	0,7	GSDNK
607,3	5	0,7	FSPTR
631,3	5	0,7	<u>YSSFK</u>
660,3	6	0,9	TVPGMR
670,3	6	0,9	VSSSYK
700,3	6	0,9	<u>TYGECK</u>
701,4	7	1,0	<u>DGLLGAR</u>
737,4	6	0,9	<u>TVHRPK</u>
739,4	6	0,9	FTMVNK
752,3	6	0,9	<u>MMLDSR</u>
768,4	6	0,9	LYVDMK
769,4	6	0,9	<u>FAVYNR</u>
778,4	7	1,0	TVVNMSK
782,4	6	0,9	<u>TFDIMR</u>

844,5	7	1,0	<u>QLIVDEK</u>
853,4	7	1,0	<u>AIDEYSR</u>
861,5	8	1,2	<u>ALSLTDNK</u>
903,5	9	1,3	AVMELGGVK
992,4	8	1,2	<u>SNFYGYNK</u>
1.044,6	9	1,3	<u>FDVIKPVAR</u>
1.125,5	10	1,5	<u>EAAMLANSYR</u>
1.138,6	9	1,3	<u>HLEPHQHIK</u>
1.167,7	11	1,6	AEMAPALPLVR
1.173,6	11	1,6	<u>FMVGATSGFEK</u>
1.231,6	11	1,6	NVMAQGFHEAK
1.301,6	11	1,6	<u>TYEIPDATHVR</u>
1.324,7	11	1,6	MLTEYVNSIVR
1.410,7	12	1,8	FIDESGVYDPLR
1.459,8	12	1,8	LFGNDVIIEHFR
1.460,7	15	2,2	LGNGGAFEPTLGDGR
1.563,8	14	2,0	LTMDMPVLAVCGWK
1.611,8	13	1,9	<u>DTNNFWSKPYVLK</u>
1.691,9	15	2,2	<u>YASNLELATHFQVAK</u>
2.061,0	17	2,5	TDSQEAYIYNMLVSWLK
2.223,1	22	3,2	GSAVSTAPIEPVQEQEPANAVE
2.593,1	23	3,4	ETNSCFSNNCFLTYDLSGMYGVK
2.712,2	24	3,5	SAEVYPTYANSEECVIATYELFGR
2.813,3	25	3,7	VPANLTGEPNVHDLNAQQFTFDEEK
3.461,8	31	4,5	VEQEFASAFELLGALATQPLPSYHESILWSK
3.653,9	35	5,1	IDPNHPGVILFDTVPAFVSGSLLMGAVATDYPVLK
3.975,9	37	5,4	DTHVGYDINDSYGIESVEVNLGPPNPTGEEAISLEFR

74(23)^c

C. XdV-L2.

Masas Teóricas (M+H)^a	N° aa	% de cobertura de la proteína^b	Secuencia de aminoácidos
485,3	4	1,2	<u>RPGR</u>
506,3	4	1,2	<u>DTDR</u>
665,4	5	1,4	EITFR
674,4	6	1,7	LVSSLR
741,3	5	1,4	<u>HENWR</u>
767,4	6	1,7	<u>VAQMYR</u>
791,5	7	2,0	GHTVLHK
960,6	10	2,9	AALTSVITGK
1.009,5	8	2,3	IGMHYFNK
1.107,5	9	2,6	<u>VSFEEVLER</u>
1.131,6	9	2,6	<u>MFGHELEIR</u>
1.216,7	11	3,2	MNASNVTRPVK
1.420,8	13	3,7	<u>VLPIAPSMVLPQR</u>
1.750,9	16	4,6	<u>VTVDEYGTVPEDALR</u>
1.861,0	17	4,9	DFHGGEIQVAPLLPVLR
1.875,0	16	4,6	SAFLHSHEELAILHDR
2.102,0	19	5,5	VPIQVNQTSEEDVTAEDVE
2.384,0	21	6,1	MEGEAMVTDMDAHDFVLDETK
2.520,3	24	6,9	SSTIPDVSALTAGQTITIDYTIPR
2.762,3	24	6,9	EMVTFMNPNFLVSYDVTPMVNVSK
2.831,4	26	7,5	ALFSGAMINYLAFMGLHAILSNYASR
3.035,5	26	7,5	TEEIHLELFAPVQECVIYPSALLYNTR
3.999,9	39	11,2	GYPSSLPVHGVPMPVSGSLFLSANASDVASQCHLEQGI
94 (19)^c			

D. Gag L1-dsRNA RV4.

Masas teóricas (M+H) ^a	Nº aa	% de cobertura de la proteína ^b	Secuencia de aminoácidos
485,3	4	0,7	<u>RPGR</u>
506,2	4	0,7	<u>DTDR</u>
523,3	4	0,7	<u>FDNK</u>
528,3	4	0,7	<u>LMHK</u>
651,3	5	0,8	DITFR
651,4	5	0,8	DYILK
674,4	6	1,0	<u>FVPGVR</u>
683,3	5	0,8	<u>HANWR</u>
809,4	7	1,2	<u>GHTVMHK</u>
880,5	7	1,2	<u>DYVTLNR</u>
906,5	8	1,3	LEVEAFK
932,5	8	1,3	<u>LLMSSLR</u>
933,4	8	1,3	<u>GYQDSHK</u>
938,5	8	1,3	<u>AVLYEDTK</u>
970,7	10	1,7	VALASVIIGK
1.030,5	9	1,5	QDLSVTPDR
12.107,0	11	1,8	ENVQIAPLLTI
12.786,3	12	2,0	<u>NLGEADFTGINK</u>
13.366,9	11	1,8	<u>TTILNTQDFQR</u>
14.067,3	12	2,0	<u>FNVCGMKPEIIR</u>
14.208,3	13	2,2	VLPIAPSMVLPQR
1.478,2	11	1,8	ENYWDRPMVLR
17.928,5	15	2,5	<u>SSAQYTFYLLHCFGR</u>
19.409,7	17	2,8	<u>YGTVNSEEAIQVAQIYR</u>
19.469,7	16	2,7	<u>SAFLHTHEELEILHDR</u>
22.100,3	19	3,2	YFDDTNTYSPLAINEFTK
23.712,1	21	3,5	SITDPNALPWTHASTLYGWIK
25.053,2	24	4,0	SSTIPDVSALTAGQTITLNYTVPR
26.802,4	21	3,5	SQVYEDTHEQYIYNMLVSWFK
28.744,5	26	4,3	ALLSGALMTYLSYMGHVLNYSER
30.354,9	28	4,7	AFSAAFEMLTSAFSPAPSYQESLVWGK
30.574,8	26	4,3	TEELHEIFAPVQECVVYPTTMLHNTR
31.404,8	30	5,0	<u>DGSSSLNVDVNIQSVDFDQLLFEPASGAMR</u>
32.044,9	28	4,7	<u>IPSNLDGPEMIVYDMDAHDFFIIDLTPR</u>
32.916,0	31	5,2	<u>AEFGGVVGEIEHEIPMGPPVADVPEVTMTQR</u>
	474	79 (39,6)	

- a. Masas obtenidas por la digestion in sílico con tripsina. Las masas de los péptidos que están fuera del rango (m/z 400 a 5,000) fueron omitidos,
- b. Calculado a partir del total del número de aminoácidos de las respectivas proteínas Gag (XdV-L1A: 681 aa, XdV-L1B: 683 aa and XdV-L2: 347 aa; Gag cepa RV4: 599 aa)
- c. Los péptidos identificados a partir de las masas experimentales son indicados (subrayados).

Anexo 7. Péptidos identificados por Genome-based fingerprint scanning (gfs) desde la secuencia nucleotídica parcial del L.1-dsRNA (cepa RV4).

A. Marco de lectura +2:

Matches		E-Mass		DP	Start	Stop	LOC	Frame	AA Seq	Frain Seq
196.287	496.263	0.0048	908	920	1	2	HRGK	CAKCGAGGAAG		
1563.8484	1563.7239	0.0080	953	992	0	2	VNYTLCLPTR	GTACATGGGTTACACGCT		
1459.7606	1459.8314	0.0049	998	1037	1	2	MLTGGRPSYHTK	ATGCTACTGGAGGTGGGCG		
1245.6506	1245.582	0.0055	1016	1046	1	2	PSYHTKSVK	CCTTCCTACATACACACGAA		
568.3082	568.2616	0.0082	1055	1073	1	2	TGRVY	ACAGGGCGTCAAGTGTAG		
2440.1152	2440.0718	0.0018	1103	1166	0	2	SOHSQ	TCACACGATTCGCAAGYCA		
3203.5334	3203.4505	0.0013	1124	1208	1	2	MS/DVTPMADVRANSFEE	ATGATAICAGCTACGATGT		
1528.723	1528.8154	0.0060	1127	1166	0	2	YSYDVTPIADVR	TATACAGCTACGATGTGAC		
2003.0146	2002.9874	9.0E-4	1154	1208	1	2	ADVRANSFEELELG	GCGGATGTGAGAGCGTGTATC		
2003.0146	2003.115	0.0050	1154	1208	1	2	ADVRANSFEELELG	GCGGATGTGAGAGCGTGTATC		
3167.6668	3167.6714	3.0E-4	1208	1301	0	2	SVDDGIPFVSGSLF	TCCGTTCCAGATAGACGGTAT		
1939.964	1939.9805	8.0E-4	1328	1379	0	2	YGMSEEAQVAQIYR	IACGGCAGCTGTAAACAGTGA		
1257.5884	1257.5334	0.0044	1475	1505	1	2	MLHTRDTR	ATGTTGCATAACACAGAGA		
931.5525	931.5732	0.0022	1505	1529	0	2	LLLSLR	CTACTGCTCATGTCTTCACT		
617.3609	617.3995	0.0062	1517	1532	1	2	SSLR	TCTCAGTACGCAGA		
617.3609	617.3887	0.0045	1517	1532	1	2	SSLR	TCTCAGTACGCAGA		
484.287	484.3444	0.0057	1529	1541	1	2	RPRGR	AGACCCGGCGCG		
2504.3123	2504.3188	3.0E-4	1541	1613	0	2	SSTPDVSALTAGQITILNY	AGTTCACTATACCTCAGCT		
1575.9282	1575.9159	8.0E-4	1637	1679	1	2	RVLPAPSMVLPOR	CGGGTATTACCTATAACGGCC		
1419.8271	1419.8219	4.0E-4	1640	1679	0	2	VLPIAPSMVLPOR	GIATTACCTATAGCGCCITC		
1689.9712	1689.9264	0.0027	1640	1685	1	2	VLPIAPSMVLPORNIR	GIATTACCTATAGCGCCITC		
920.4828	920.5007	0.0019	1679	1700	1	2	NRDTR	ACAGAGACATACCGTTCAG		
617.3609	617.3995	0.0062	1517	1532	1	2	SSLR	TCTCAGTACGCAGA		
617.3609	617.3887	0.0045	1517	1532	1	2	SSLR	TCTCAGTACGCAGA		
484.287	484.3444	0.0057	1529	1541	1	2	RPRGR	AGACCCGGCGCG		
2504.3123	2504.3188	3.0E-4	1541	1613	0	2	SSTPDVSALTAGQITILNY	AGTTCACTATACCTCAGCT		
1575.9282	1575.9159	8.0E-4	1637	1679	1	2	RVLPAPSMVLPOR	CGGGTATTACCTATAACGGCC		
1419.8271	1419.8219	4.0E-4	1640	1679	0	2	VLPIAPSMVLPOR	GIATTACCTATAGCGCCITC		
1689.9712	1689.9264	0.0027	1640	1685	1	2	VLPIAPSMVLPORNIR	GIATTACCTATAGCGCCITC		
920.4828	920.5007	0.0019	1679	1700	1	2	NRDTR	ACAGAGACATACCGTTCAG		
877.5021	877.4157	0.0064	1685	1706	1	2	DIIRVK	GKATAACGTTACAGGGTTAA		
1534.8102	1534.8235	9.0E-4	1739	1778	1	2	AKTILNTQDFOR	GCTAAACACACATCGTGA		
1335.6782	1335.6887	8.0E-4	1745	1778	0	2	TILITQDFOR	ACAACATCCTGATACACA		

B. Marco de lectura: +1

Matches		T-Mass	E-Mass	DP	Start	Stop	MC	Frame	AA Seq	Frag Seq
	3203.4785	3203.4905	4.0E-4	832	916	0	1	1PSNLDGEPINVDHDAHDFI		ATACCTTCTAATCTAGACGG
	1945.9647	1945.9758	6.0E-4	1012	1060	0	1	1SAFLHTHEELEILHDR		TCGGCCCTTCTACATACAGA
	1691.8632	1691.954	0.0054	1099	1141	0	1	1EITIFA		GAGATCACAAACATTCGCAAG
	700.3578	700.4263	0.0098	1183	1207	0	1	1RIGIG		AATATTGGAAITGGGATRCC
	1138.5804	1138.6879	0.0094	1240	1276	1	1	1GISI		ATCGGGATCICATTTCTYAG
	386.1736	386.1855	0.0031	1333	1342	0	1	1HCK		CACIGTAA
	401.2386	401.2726	0.0085	1432	1441	0	1	1NIR		AATATTGG
	1708.8646	1708.8418	0.0013	1495	1537	1	1	1YRCITARIFITQIR		TACAGACAGACTACTGCTCA
	1708.8646	1708.8405	0.0014	1495	1537	1	1	1YRCITAIWFITQIR		TACAGACAGACTACTGCTCA

C. Marco de lectura: 0

Matches		T-Mass	E-Mass	DP	Start	Stop	MC	Frame	AA Seq	Frag Seq
	601.3296	601.3629	0.0055	1568	1593	1	0	0GRDVR		GGCCGAGACGCTCAGG
	568.2718	568.2616	0.0018	1520	1505	1	0	0RHEQ		AGACATGAGCAGTAG
	1063.5814	1063.6238	0.0040	1466	1442	0	0	0VYHLLYR		GTATACCACACACTCCTGTA
	1570.712	1570.8225	0.0070	1391	1352	0	0	0MTEGSWLCNLDLDR		ATGACCCGACACAGTGTGTATA
	1230.7336	1230.6909	0.0035	1352	1319	0	0	0LLTVSAVPIR		CTCCTCACTGTTTACAGTGC
	392.1478	392.1777	0.0076	1319	1310	0	0	0CDR		TGTACAGA
	1939.9331	1939.9805	0.0024	1247	1202	1	0	0SRYEWNTVYLNLPDR		TCCCGATACCGAATGGTGAA
	1696.7998	1696.8391	0.0023	1241	1202	0	0	0RYEWNTVYLNLPDR		TACGAATGGTGGAAATACCGT
	1666.8693	1666.7944	0.0045	1154	1112	0	0	0HWGHVADIVH		CATTGGGGTCACATCGTAGC
	2772.3936	2772.5217	0.0046	968	887	1	0	0VNPICNLSMSSGFLTTALSSV		GTAACCCCATGTACTAATTAG
	655.4016	655.4119	0.0016	866	848	0	0	0IPSALR		ATACCATCGGCTCTCCCGT

D. Marco de lectura: -2

Matches										
T-Mass	E-Mass	DP	Start	Stop	MC	Frame	AA Seq	Frag Seq		
1885.1038	1885.0161	0.0046	1119	1065	0	2	LAWWISFPHILASATR	CTGCCAATGTGTGCATCTC		
790.5065	790.5029	5.0E-4	954	936	1	2	LKYWR	CITAAATATGCATCAGG		
1677.9666	1677.8768	0.0053	843	792	1	2	LEGIALHGLKSLI	TTAGAAGGTATTTAGCTCT		
1677.9666	1678.0906	0.0074	843	792	1	2	LEGIALHGLKSLI	TTAGAAGGTATTTAGCTCT		
995.5011	995.5435	0.0043	792	768	0	2	VIRHFFHTK	GTGATGCACCTCCCCCATAC		
765.3922	765.3492	0.0056	786	768	0	2	HFPHTK	CACTTCGCCCCACTACTAA		
1771.9315	1771.8253	0.0060	756	702	1	2	DGAGENIEVVISKALK	GACGGTCTGGAGAAACGC		
401.2638	401.2726	0.0022	714	702	0	2	AALK	CCGGCACTGMA		
1248.6462	1248.7567	0.0088	639	603	0	2	VQGSFSGVIER	GTCCAGGGTAGTCCGTTGG		