



UNIVERSIDAD DE CHILE - FACULTAD DE CIENCIAS - ESCUELA DE POSTGRADO

“Análisis de la expresión génica en respuesta al estrés por frío en ocho cepas de levaduras antárticas”

Tesis entregada a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de:

Magíster en Ciencias Biológicas

Facultad de Ciencias

Por

Sergio Ernesto Zúñiga Líbano

Director del Tesis:

Dr. Marcelo Enrique Baeza Cancino

Diciembre 2022

Santiago – Chile



INFORME DE APROBACIÓN TESIS DE MAGÍSTER

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Magíster, presentada por el candidato **Sr Sergio Ernesto Zúñiga Líbano**.

“Análisis de la expresión génica en respuesta al estrés por frío en ocho cepas de levaduras antárticas”

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias Biológicas, en el examen de Defensa Privada de Tesis.

Dr. Marcelo Baeza Cancino

Director Seminario de Título:

Comisión Revisora y Evaluadora

Dra. Inmaculada Vaca Cerezo

Presidente Comisión:

Dr. Claudio Veloso Iriarte

Evaluador:



Nací el miércoles 29 de Marzo de 1995, en la ciudad de Santiago, hijo de Ximena Isabel Líbano Rivera y Gustavo Emilio Zúñiga Navarro, y hermano de Gustavo Jaime Zúñiga Líbano. Crecí en una casa en la que la curiosidad y la ciencia siempre fueron muy importantes, gracias tanto a los conocimientos y vivencias de mis padres, como a los inventos de mi hermano. El año 2013 ingresé a la carrera que deseaba, Ingeniería en Biotecnología Molecular en la Universidad de Chile. El año 2016 ingresé al Laboratorio de Genética de la Facultad de Ciencias, como pasante a cargo del profesor Marcelo Baeza, donde conocí a un grupo de trabajo con una gran calidad de personas tanto en el científico como en lo personal. Durante mis años en la universidad conocí personas, cada una con su propia forma de ver la vida, que me permitieron expandir mi propia visión de la vida, y enfrenté desafíos que solo el tiempo y la paciencia (de muchas personas) me permitieron resolver.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi familia, Mamá, Papá, Tabo, Nati, Lala y mi Fio, y a mis amigos, Max y Salva, por el apoyo incondicional y la motivación constante para poder terminar esta etapa de mi vida.

Agradezco al Laboratorio de Genética de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile por abrirme las puertas y recibirme como una integrante más del equipo de trabajo.

Al Dr. Marcelo Baeza, por darme la oportunidad de ingresar a su grupo de trabajo, guiarme y ayudarme siempre respondiendo dudas, dando consejos para ser un mejor científico, y por sobre todo, por la increíble libertad y paciencia con la que me permitió trabajar. Al Dr. Víctor Cifuentes y la Dra. Jennifer Alcaíno, por permitirme trabajar en su laboratorio.

Agradezco a cada uno de los integrantes del laboratorio por enseñarme y ayudarme tanto en lo práctico como en lo humano. Al Ale, Vicho, Seba, Feña y a todos los compañeros por ayudarme y enseñarme.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

II	Biografía	ii
III	Agradecimientos	iii
IV	Índice de Contenidos	iv
V	Índice de Tablas	vi
VI	Índice de Figuras	vii
VII	Lista de Abreviaturas	viii
	RESUMEN	ix
	ABSTRACT	xii
1.	INTRODUCCIÓN	1
1.1	La Respuesta al Estrés	4
1.2	El Estrés Abiótico	5
1.3	El Estrés por Frío	6
1.4	Resistencia al Estrés por Bajas Temperaturas	8
1.5	Mecanismos de Respuesta al Estrés por Bajas Temperaturas	10
1.5.1	Los Genomas Psicrófilos	11
1.5.2	Las Enzimas Adaptadas al Frío	12
1.5.3	Los Cambios en la Expresión Génica	13
2.	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	17

2.1	Hipótesis	18
2.2	Objetivo general	18
2.3	Objetivos específicos	18
3.	MATERIALES Y MÉTODOS	19
3.1	Microorganismos y condiciones de cultivo	20
3.2	Exposición a condiciones de estrés por frío	21
3.3	Transcriptómica de levaduras antárticas	21
3.3.1	Secuenciación de los transcriptomas (RNA-seq) y análisis bioinformático primario	21
3.3.2	Predicción, anotación funcional y determinación de los niveles de expresión de los ORFeomas	23
4.	RESULTADOS	25
4.1	Levaduras antárticas y estrés por frío: secuenciación de transcriptomas y análisis de sus resultados	26
4.2	Análisis de la expresión diferencial y anotación funcional	28
5.	DISCUSIÓN	39
6.	CONCLUSIONES	46
7.	BIBLIOGRAFÍA	48
8.	ANEXO	55

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I.	Cepas de levaduras antárticas utilizadas.	20
Tabla II.	Resumen de los resultados del RNA-seq y análisis de secuencias.	27
Tabla III.	Variación de temperatura experimentada y número de genes putativos de acuerdo a los niveles de expresión, tras la exposición a condiciones de estrés por frío.	34
Tabla IV.	A. Porcentaje de DEGs que varían de acuerdo a la vía metabólica (KEGG) en las que participan. Se muestran las vías más representadas. B. Número de DEGs anotados como proteínas ribosomales y estado de expresión. Up, $\text{Log}_2\text{FC} \geq 1$; Down, $\text{Log}_2\text{FC} \leq -1$.	36
Tabla V.	DEGs anotados como proteínas asociadas a estrés en cada cepa levadura. Up, $\text{Log}_2\text{FC} \geq 1$; Down, $\text{Log}_2\text{FC} \leq -1$.	38
Tabla SI.	Reporte de las estadísticas de los resultados del RNA-seq.	56
Tabla SII	Anotación funcional por vías KEGG y número de DEGs obtenidos en cada cepa de levadura.	57

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** *Heatmap* de genes putativos expresados diferencialmente y 35 clasificados por rutas metabólicas entre levaduras cultivadas a su temperatura de crecimiento (HT) y 4°C (LT). El promedio de la razón de cambio (Log2 FC) por ruta se muestra en los paneles Up (Log2 FC \geq 1) (DEGs sobreexpresados) y Down (Log2 FC \leq -1)(DEGs reprimidos).
- Figura 2.** *Heatmap* de número de DEGs anotados como genes putativos 37 asociados a respuesta a estrés. En el panel Up (Log2 FC \geq 1), DEGs sobreexpresados y Down (Log2 FC \leq -1), DEGs reprimidos.

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ARN	Ácido Ribonucleico
BLAST	Herramienta de Búsqueda de Alineamiento Local Básico
DEGs	Genes Diferencialmente Expresados
HSP	Proteína de <i>Shock</i> Térmico
HT	Temperatura Alta
LT	Temperatura Baja (4°C)
nt	Nucleótido
ORF	Marco de Lectura Abierto
pb	Pares de Base
ROS	Especie Reactiva de Oxígeno
YM	Medio para Levaduras

RESUMEN

Los ambientes fríos corresponden a los ecosistemas predominantes de la tierra, y la Antártica es quizás, el ejemplo más representativo de un hábitat frío terrestre. Aunque estos ambientes presentan extraordinarias barreras para el desarrollo de la vida, se ha demostrado que albergan organismos metabólicamente adaptados al frío y capaces de crecer *in situ*. Estos se conocen como organismos adaptados al frío, y a pesar de las condiciones ambientales, son capaces de superar con éxito los efectos negativos de las bajas temperaturas mediante el desarrollo de una gama de adaptaciones estructurales y funcionales. Entre las principales barreras que estos organismos deben superar, se encuentra el efecto de las bajas temperaturas sobre el estado físico del agua y la disminución de las velocidades de reacción. Además, debido a que estos ambientes se asocian también con otros factores, como una baja disponibilidad de agua y nutrientes, una alta presión hidrostática, estrés osmótico y oxidativo, y radiación solar, la adaptación al frío a menudo se combina con la adaptación a otras condiciones limitantes.

Las levaduras constituyen uno de los grupos de microorganismos más relevantes en biotecnología. Están distribuidas en microbiomas de todo el mundo, encontrándose adaptadas a una amplia gama de climas, y con una alta capacidad de sobrevivir en condiciones extremas, por lo que están expuestas a diversos tipos de estrés ambientales. Estos microorganismos han desarrollado diversas estrategias o respuestas adaptativas para responder a las circunstancias que enfrentan. Típicamente, los cambios bruscos en las condiciones se consideran como estrés, y pueden afectar la supervivencia de las células. En general, las células responden al estrés mediante cambios en la expresión de genes que

codifican productos que protegen a la célula del daño producido por el estresor al que se encuentran sometidas.

El objetivo de este trabajo fue cuantificar y comparar la expresión génica frente al estrés por frío en ocho cepas de levaduras antárticas, e identificar los genes putativos descritos como parte de los mecanismos de respuesta al estrés por frío, para comprobar si los cambios en la expresión de genes asociados a la respuesta al estrés por frío en este grupo de levaduras son especie-específicos o si guardan relación con la temperatura de crecimiento. Los cultivos de las levaduras se incubaron a sus respectivas temperaturas de crecimiento para luego ser expuestas a 4°C durante 6 horas. Tras la exposición a estas condiciones, definidas como causantes de estrés por frío, se realizó una secuenciación a transcriptoma completo (RNA-seq) y un procesamiento bioinformático de sus resultados. Se ensamblaron los ORFeomas para la anotación de genes putativos, la predicción de las funciones celulares y la determinación de los cambios en la expresión génica. Las cepas de levadura exhibieron una relación directa entre el número de DEGs y la variación de temperatura (ΔT) enfrentada. Entre los DEG asociados al estrés, una cantidad significativa se describió como parte de las respuestas al estrés por frío, osmótico y oxidativo. Curiosamente, se detectó una baja cantidad de DEGs que codifican proteínas canónicas de respuesta al estrés por frío en mesófilos, como *Heat Shock Proteins* y desaturasas de ácidos grasos. Las levaduras con temperaturas de crecimiento más cercanas a 4°C tendrían adaptaciones basales y mecanismos que les permiten responder eficazmente a condiciones de frío, mientras que aquellas con temperaturas de crecimiento más elevadas disminuirían su tasa metabólica para entrar en un estado de dormancia.

ABSTRACT

Cold environments, those with constant temperatures below 5°C, correspond to the predominant ecosystems on earth, and Antarctica is perhaps the most representative example of a cold terrestrial habitat. Although these environments present extraordinary hurdles to the development of life, they have been shown to harbor organisms metabolically adapted to cold and capable of growing *in situ*. These are known as cold-adapted organisms, and despite the influence of low temperatures, they can successfully overcome its negative effects employing a range of structural and functional adaptations. Among the main barriers that these organisms must overcome there is the effect of low temperatures on the physical state of the water and the decrease in reaction rates. In addition, because these environments are also associated with other factors, such as low water and nutrient availability, high hydrostatic pressure, osmotic and oxidative stress, and solar radiation, cold adaptation is often combined with the adaptation to other limiting conditions.

Cold-adapted microorganisms have been found to predominate over other organisms in terms of biodiversity and biomass, showing their ecological importance and biotechnological potential. Yeasts are one of the most important groups of microorganisms in biotechnology. They are distributed in microbiomes around the world, being adapted to a wide range of climates, and with a high capacity to survive in extreme conditions, which is why they are exposed to various types of environmental stress. These microorganisms have developed various strategies or adaptive responses to react to the circumstances they face. Sudden changes in conditions are typically considered stress and can affect cell survival. In general, cells respond to stress through changes in the

expression of genes that encode products that protect the cell from damage caused by the stress to which they are subjected.

The objective of this work was to quantify and compare gene expression under cold stress in eight strains of Antarctic yeast and identify the putative genes described as part of the response mechanisms to cold stress, to verify if changes in gene expression associated with the response to cold stress in this group of yeasts are species-specific or if they are related to their growth temperature. The yeast cultures were incubated at their respective growth temperatures and then subjected to 4°C for 6 hours. After exposure to these conditions, defined as causing cold stress, complete transcriptome sequencing (RNA-seq) and bioinformatics processing of the results were performed. ORFeomes were assembled for putative gene annotation, prediction of cellular function, and determination of changes in gene expression. The yeast strains exhibited a direct relationship between the number of DEGs and the temperature variation (ΔT) faced. Among stress related DEGs, a significant amount was described as part of cold, osmotic, and oxidative stress responses. Interestingly, a low amount of DEGs encoding canonical cold stress response proteins in mesophiles, such as Heat Shock Proteins and fatty acid desaturases, was detected. Yeasts with higher temperatures would be preparing to downregulate their metabolism to enter dormancy, while those with lower growth temperatures would have basal adaptations and mechanisms that allow them to respond efficiently to cold conditions.

1. INTRODUCCIÓN

Los ambientes fríos, aquellos con temperaturas constantes bajo 5°C, corresponden a los ecosistemas predominantes de la tierra: las regiones polares, la alta montaña y los océanos profundos representan aproximadamente el 70% de la superficie terrestre (Buzzini and Margesin, 2014a). Por su parte, la Antártica, con una superficie de casi 14 millones de kilómetros cuadrados, mayoritariamente cubierta por hielo, es el ejemplo más representativo de un hábitat frío terrestre. Aunque estos ambientes presentan extraordinarias barreras para el desarrollo de la vida, se ha demostrado que incluso los hábitats fríos más extremos, como la Antártica, albergan organismos metabólicamente adaptados al frío y capaces de crecer *in situ*, encontrándose entre ellos: bacterias, levaduras, hongos filamentosos, algas, líquenes e invertebrados pequeños (Convey, 2010)(Margesin y Miteva, 2011).

Los organismos que habitan ambientes fríos con éxito se conocen como organismos adaptados al frío, y a pesar de la influencia de las bajas temperaturas, junto con otros factores ambientales, tanto en el crecimiento como en la eficiencia metabólica, son capaces de superar con éxito los efectos negativos de las bajas temperaturas mediante el desarrollo de una gama de adaptaciones estructurales y funcionales. Estos organismos adaptados al frío se pueden clasificar como psicrófilos (aquellos con temperaturas óptimas de crecimiento, OTG, bajo 15°C) o psicrotolerantes (OTG sobre 15°C), y particularmente en el caso de los microorganismos, son capaces de mantener la viabilidad celular por miles de años bajo el frío extremo de los ambientes que habitan (Christner y cols., 2003). Se ha determinado que los microorganismos adaptados al frío que colonizan con éxito ambientes

de baja temperatura predominan sobre otros organismos en términos de biodiversidad y biomasa (Pearce y cols, 2012).

Las levaduras son un grupo de organismos eucarióticos que pertenecen al reino de los hongos y constituyen uno de los grupos de microorganismos más relevantes en biotecnología. Están ampliamente distribuidas en microbiomas de todo el mundo, encontrándose adaptadas a una amplia gama de climas, altitudes, sustratos y ubicaciones geográficas, y con una alta capacidad de sobrevivir en condiciones extremas y explotar nutrientes aparentemente no absorbibles (Starmer y Lachance, 2011). Por esto, están expuestas a diversos tipos de estrés ambientales. Estos microorganismos han desarrollado diversas estrategias o respuestas adaptativas para responder a las circunstancias que enfrentan. Típicamente, los cambios bruscos en las condiciones, por ejemplo, en las temperaturas ambientales, se consideran como estrés, y pueden afectar la supervivencia de las células. En general, las células responden al estrés mediante cambios en la expresión de genes que codifican productos que protegen a la célula del daño producido por el estrés al que se encuentran sometidas (Enjalbert y cols., 2003).

Debido a la presión de selección que las bajas temperaturas producen sobre los organismos que habitan ambientes fríos, las comunidades que aquí se desarrollan se han descrito como altamente especializadas, desplegando diversas estrategias de adaptación que finalmente les permiten sobrevivir e incluso prosperar en condiciones de bajas temperaturas. Esto es algo que convierte a las levaduras adaptadas al frío, sumado a su reconocida importancia ecológica y potencial biotecnológico, en organismos de estudio de gran interés.

1.1 La Respuesta al Estrés

El concepto de respuesta al estrés como un conjunto de reacciones que los organismos emplean frente a circunstancias adversas fue formulado por el endocrinólogo húngaro Hans Selye, pionero de los estudios sobre el estrés (Selye, 1936). Las primeras observaciones de la respuesta celular al estrés a nivel molecular se realizaron a principios de la década de 1960, cuando Ritossa observó una activación transitoria de ciertas regiones de cromosomas de *Drosophila* en respuesta al *shock* térmico (Ritossa, 1962). El estrés es una experiencia común de cualquier ser vivo, que pone en peligro su supervivencia; sin embargo, en una escala evolutiva más larga, es una herramienta de presión de selección que finalmente diferencia a las poblaciones/individuos que mejor la soportan.

La respuesta al estrés se concentra en el despliegue de mecanismos de defensa mientras se minimizan los daños ya sufridos. Estos mecanismos pueden ser diversos e incluir la muerte celular programada, que elimina la población de células con daños irreparables para beneficiar a las sobrevivientes. La respuesta al estrés también prepara a las células para más estrés; así, las células se adaptan al estrés, adquiriendo tolerancia al estrés. De hecho, se han informado numerosas observaciones de que el estrés leve hace que las células sean más resistentes al estrés severo del mismo tipo, así como a otros tipos de estrés, un fenómeno que también se conoce como aclimatación. Además del proceso dinámico de reacción al estrés encontrado, existen circunstancias en las que las células deben ser constantemente resistentes a ciertos factores de estrés, ya sea porque el estrés actúa demasiado rápido y la célula no tiene tiempo suficiente para responder

adecuadamente, o porque las condiciones de estrés conducen a la suspensión sus procesos vitales. Por lo tanto, algunos agentes protectores contra el factor estresor deben estar presentes en las células de manera constitutiva. Estos mecanismos deben estar bien orquestados para asegurar la supervivencia de un organismo expuesto a condiciones inhóspitas, que, en algunos casos, como en los ambientes extremos, sucede durante la mayor parte de su vida.

1.2 El Estrés Abiótico

A lo largo de su vida, las células de levaduras permanecen en estrecho contacto con el medio ambiente, aisladas de él solo por una delgada y porosa pared celular de polisacáridos. Sin embargo, algunos de estos organismos pueden prosperar en ambientes aparentemente inhabitables, gracias a la presencia de varios mecanismos que neutralizan o minimizan los efectos nocivos de un entorno hostil.

El estrés causado por condiciones como un pH extremo, bajas temperaturas, presión hidrostática extrema, hiperosmolaridad y deshidratación, se denominan colectivamente estrés ambiental o abiótico (Thammavongs y cols., 2008). Estos tipos de estrés parecen diversos y, superficialmente, tienen poco en común, sin embargo, esto a menudo no es cierto. Algunos tipos de estrés aparentemente disímiles están, de hecho, estrechamente relacionados entre sí en varios aspectos. Además, existen vías de señalización intracelular que controlan la respuesta a varios estímulos externos con mecanismos comunes para eludir sus efectos nocivos y adquirir tolerancia a ellos. Un buen ejemplo es la vía HOG (**H**igh **O**smolarity **G**lycerol), uno de los centros que transmiten señales de estrés ambiental,

descrita originalmente como una vía que comunica el estrés hiperosmótico, ahora se sabe que responde a múltiples tipos de estrés, a veces junto con otras vías de MAP Kinasas (Lee y cols., 2014)(Gutin y cols., 2015)

En este sentido, aquellos organismos que se encuentran expuestos a ambientes extremos, suelen estar expuestos a una amplia diversidad de estrés abióticos. Es por esto que, los extremófilos suelen ser los organismos elegidos en los estudios sobre los mecanismos de respuesta a factores de estrés abiótico.

1.3 El Estrés Por Frío

El frío es una de las causas más comunes de estrés que pueden afectar a organismos que habitan en climas templados o fríos. Sin embargo, a diferencia de la profunda caracterización que se ha logrado de la respuesta al estrés causado por las altas temperaturas, el estrés por frío es un fenómeno menos estudiado.

Las bajas temperaturas, tienen una gran influencia sobre la capacidad de sobrevivir de un organismo o incluso prosperar con éxito en un hábitat dado, debido principalmente a su efecto en el estado físico del agua y la disminución de las velocidades de reacción (Poindexter, 2009). Además, debido a que los ambientes de bajas temperaturas también se asocian con otros factores, como una baja disponibilidad de agua y nutrientes, una alta presión hidrostática, estrés osmótico y oxidativo, y radiación solar, la adaptación al frío a menudo se combina con la adaptación a otras condiciones limitantes (Buzzini y cols., 2012).

Diversos estudios han revelado que la respuesta de las células a este tipo de estrés, y el estrés en sí, no es uniforme, y que más bien, se pueden hacer las siguientes distinciones:

- A. El estrés a temperaturas moderadamente bajas (18-10°C)
- B. El estrés a temperaturas bajas, pero sobre el punto de congelación (10-0°C), que enlentece el metabolismo celular y compromete importantes procesos celulares. Se postula que la respuesta que se gatilla en este rango de temperaturas es diverso en relación al valor exacto al que las células se encuentren expuestas.
- C. El estrés por congelación (bajo 0°C), que detiene toda la actividad celular y expone su interior, estructuras y organelos a daños causados por los cristales de hielo. Por esto, la resistencia a la congelación se considera como la habilidad de retomar el funcionamiento celular luego de la descongelación.

Las temperaturas bajas por encima del punto de congelación del agua (10-0°C) producen un conjunto de distintos desafíos que afectan la supervivencia celular:

- (1) Una menor fluidez de la membrana, con todas sus consecuencias de transporte transmembrana distorsionado y aumento de la permeabilidad (Ernst y cols., 2016) (Los y Murata, 2004)
- (2) Una disminución general de la actividad enzimática (Gerday y cols., 1997).
- (3) Una tasa metabólica disminuida, por lo que, estímulos que requieren gasto de energía son más difíciles de combatir.

- (4) Menor elasticidad de las proteínas, lo que afecta todos los procesos que dependen del reconocimiento espacial de las moléculas, como la replicación, la transcripción y la traducción (Farewell y Neidhardt, 1998).
- (5) Un tiempo prolongado de síntesis y plegamiento de proteínas.

1.4 Resistencia al Estrés por Bajas Temperaturas

Las levaduras toman varias medidas de respuesta cuando se exponen al estrés por frío. El glicerol es un conocido osmolito que se acumula en respuesta al estrés hiperosmótico, pero también es importante para la supervivencia al estrés por congelación de *S. cerevisiae* (Izawa y cols., 2004). Si bien, su concentración intracelular aumenta durante la adaptación al frío, resulta prescindible para la supervivencia del estrés por temperaturas bajas, pero sobre el punto de congelación (Panadero y cols., 2006), lo que respalda la tesis de que la respuesta al estrés por frío, de hecho, prepara a la célula para el estrés por congelación, que, en la naturaleza, suele seguir a la disminución de la temperatura ambiente hasta cerca de 0 °C.

Otro compuesto importante para la tolerancia a bajas temperaturas es la trehalosa, que se acumula en células de levadura expuestas a temperaturas bajas, cercanas al punto de congelación (10–0 °C). Los niveles de trehalosa aumentan en múltiples condiciones de estrés y, durante mucho tiempo, se ha considerado como un protector general contra el estrés. Si bien, se ha cuestionado su importancia para la tolerancia a algunos factores estresantes (Petitjean y cols., 2015), resulta indispensable para soportar la congelación y

la desecación (Mahmud y cols., 2010). La prolina es otro compuesto que también parece tener capacidades crioprotectoras en levaduras, y también favorece el crecimiento de células de *S. cerevisiae* a bajas temperaturas (Takagi y cols., 2000).

Por su parte, entre las chaperonas que son sobreexpresadas bajo condiciones de frío, un subconjunto es capaz de conferir una mayor tolerancia frente al estrés por congelación y descongelación (Naicker y cols., 2012). Hsp12p, una *Heat Shock Protein* e hidrofílica que confiere elasticidad a la pared celular, es fuertemente inducida por estrés por frío (4 °C) (Murata y cols., 2006). También se ha demostrado la contribución de otras hidrofílicas no solo a la tolerancia a la desecación sino también a la tolerancia a la congelación (Dang y Hinch, 2011).

La disminución de la fluidez de las membranas lipídicas es un sello distintivo del estrés por baja temperatura, y este fenómeno afecta funciones celulares fundamentales. Puede revertirse mediante el aumento de la proporción de ácidos grasos insaturados en los lípidos de la membrana (Martin y cols., 2007). Por el contrario, la proporción y variedad de esteroides no cambia en la adaptación al frío (Russell, 2008).

La variación intracelular de todos estos compuestos y macromoléculas a baja temperatura está comprendida fundamentalmente desde la respuesta al estrés por frío que realizan las especies mesófilas de levaduras. Sin embargo, las especies de levaduras psicrófilas y psicrotolerantes que habitan en las regiones frías de nuestro planeta tienen constantes adaptaciones a las bajas temperaturas. Además del mayor contenido de ácidos grasos mono y poliinsaturados en sus membranas, también son capaces de secretar proteínas

anticongelantes similares a las que se encuentran en los organismos superiores (Alcaíno y cols., 2015).

Las células de *S. cerevisiae* en fase estacionaria, o en dormancia, son más resistentes a la congelación que las células en fase logarítmica; además, se puede inducir una mayor tolerancia a la congelación mediante la exposición previa a otros tipos de estrés, lo que sugiere que las células preparadas para soportar diversos estreses ambientales también están mejor equipadas para resistir la congelación (Park y cols., 1997). Claramente, las adaptaciones a las bajas temperaturas, aunque se desarrollan cuando la temperatura ambiente está por encima del punto de congelación y las células aún pueden realizar sus funciones, están diseñadas para permitir la supervivencia bajo temperaturas bajo cero.

1.5 Mecanismos de Respuesta al Estrés por Bajas Temperaturas

La respuesta de las células a las bajas temperaturas depende de la gravedad del estrés. En *S. cerevisiae*, una temperatura moderadamente baja (18–12 °C) ralentiza los procesos celulares, pero también provoca una sobreexpresión de genes implicados en la traducción de proteínas. Por el contrario, estos mismos genes son fuertemente reprimidos cuando la levadura es expuesta a temperaturas cercanas al punto de congelación (4 °C) (Murata y cols., 2006). Esto muestra que las células tienen diferentes programas para el estrés por frío: Aquel que ralentiza, pero no impide el crecimiento; y para las condiciones que hacen que el crecimiento sea imposible.

La respuesta de las células de *S. cerevisiae* al estrés por baja temperatura también puede dividirse, según la duración del estrés, en dos o incluso tres fases (Sahara y cols., 2002) (Schade y cols., 2004). Una fase temprana (hasta 2 horas de exposición al frío) caracterizada por la expresión de genes involucrados en la transcripción, desaturación de ácidos grasos de membrana y síntesis de fosfolípidos; una fase media, caracterizada por la expresión de proteínas asociadas a la mantención de la maquinaria traduccional (proteínas ribosomales); y una fase tardía (activada después de 4 a 24 horas de exposición al frío), en la que se produce la activación transcripcional de genes que codifican a marcadores de estrés típicos, las *Heat Shock Proteins*, genes involucrados en el metabolismo de glicógeno y trehalosa, así como genes detoxificantes de ROS y de defensa al estrés oxidativo, como la catalasa, glutaredoxina, tiorredoxina y glutatión transferasa.

1.5.1 Los Genomas Psicrófilos

El avance de las tecnologías de secuenciación ha mejorado nuestra comprensión de la biología de los organismos amantes del frío. Hasta la fecha, se han secuenciado varios microorganismos psicrófilos, incluidas bacterias y hongos, tanto del Ártico como de la Antártica (Selbmann y cols., 2021)(Li y cols., 2018). Recientemente, se ha secuenciado el genoma completo de algunas levaduras psicrófilas, incluidas *Candida psychrophila* (Brejová y cols., 2017), *Glaciozyma antarctica* (Firdaus-Raih y cols., 2018) y *Mrakia hoshinonis* (Tsuji y cols., 2019). Si bien la opinión general es que el contenido genómico de GC no ayuda a distinguir entre los orígenes ambientales microbianos y las clases térmicas, es probable que la variación en el contenido de GC de los genomas psicrófilos

esté influenciada por factores ambientales como la temperatura y el hábitat (Wu y cols., 2012).

Análisis de genómica comparativa de *G. antarctica* con otros genomas fúngicos, incluidos *C. neoformans* y *S. cerevisiae* (levadura mesófila), *C. thermophilum* y *M. thermophile* (hongos termófilos) y *P. destructans* (hongo psicrófilo), revelaron que el 31,4 % de los genes y 54% de sus sORF (marcos de lectura cortos, largo menor a 100 codones) eran exclusivos de esta levadura y que posiblemente podrían estar asociados con la psicrofilia y un posible papel en la adaptación de esta levadura al ambiente frío de la Antártica (Firdaus-Raih y cols., 2018).

1.5.2 Las Enzimas Adaptadas al Frío

Casi todas las estructuras importantes dentro de las células vivas, como el núcleo, la membrana celular y el citoplasma, contienen proteínas como unidades estructurales o funcionales esenciales para su correcto funcionamiento. Diversos estudios sobre la función de las proteínas han demostrado que la mayoría de las enzimas adaptadas al frío muestran una mayor eficiencia catalítica en comparación con las mesófilas a medida que se reduce la temperatura, a expensas de la estabilidad térmica (Lee y cols., 2017).

Hasta la fecha, las estrategias de adaptación al frío en las proteínas y, lo que es más importante, en las enzimas, están vinculadas a una mayor flexibilidad en la arquitectura de la proteína, ya sea en el área del sitio activo o en una parte más distante de la estructura que juega un papel importante en los cambios conformacionales de la proteína (Truongvan

y cols., 2016). Otro factor clave son las sustituciones de aminoácidos en regiones clave de la proteína, donde la sustitución frecuente por glicinas se observa particularmente en las regiones del *loop*. Además, se ha encontrado que las proteínas adaptadas al frío tienen una disminución en la estructura de la proteína que estabiliza las interacciones, como los enlaces de hidrógeno, los puentes salinos, las interacciones iónicas y aromáticas en las interacciones intra o interproteicas (Michetti y cols., 2017). Sin embargo, no existe un código general para el establecimiento de propiedades adaptadas al frío ya que cada proteína tiene su forma de mejorar su actividad catalítica a bajas temperaturas.

1.5.3 Los Cambios en la Expresión Génica

El análisis de la expresión génica es importante para determinar el efecto fisiológico y ambiental sobre los cambios intracelulares (Bharudin y cols., 2014). En levaduras, se han adoptado varias técnicas, como *microarrays*, ESTs y RNA-seq, para cuantificar estos cambios y conocer en profundidad la forma en que ellas responden frente a estímulos.

Recientemente, se realizó un estudio transcriptómico en *G. antarctica* usando RNA-seq. Se generaron tres bibliotecas diferentes a partir de tres temperaturas de exposición diferentes (-12, 0 y 15 °C); para imitar sus ambientes de temperatura natural durante las diferentes estaciones del año (Bharudin y cols., 2018). Se identificó la sobreexpresión de un grupo de genes comunes en las tres condiciones probadas, como, HSP70 y HSP90, proteínas ribosómicas, componentes de iniciación de la traducción y ciclofilinas. Curiosamente, se expresaron constitutivamente varios genes reguladores y chaperonas que eran importantes para el crecimiento y la supervivencia óptimos a temperaturas bajo

cero, como la ARN helicasa, HSPs, CSDs y la peptidilprolil isomerasa (PPIasa) (Wong y cols., 2019). Además, se identificaron cuatro proteínas que contienen CSDs y diecinueve genes que codifican PPIasa. Ambos grupos de proteínas están involucrados en la activación de factores de transcripción y plegamiento de proteínas al unirse a un ácido nucleico específico (Anderson y cols., 2006).

Otro grupo de genes que son importantes en la adaptación al frío son los que codifican proteínas anticongelantes (AFP). Las AFP juegan un papel importante para evitar la formación de cristalización de hielo intracelular y extracelular, lo que permite que la célula resista temperaturas de congelación fluctuantes y, en consecuencia, la muerte celular (Białkowska y cols., 2020). *G. antarctica* tiene nueve genes que codifican AFP y los análisis de expresión génica revelaron que cada AFP tiene diversos niveles de expresión, dependiendo de varios factores, incluidos el organismo, la temperatura y el medio ambiente (Bharudin y cols., 2018).

Además, factores ambientales estresantes, como los contaminantes de metales pesados y la congelación, pueden activar la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), causando daños en el ADN intracelular (Su y cols., 2016)(Hu y cols., 2020). Para superar esto, *G. antarctica* produce varias superóxido dismutasas, donde principalmente los genes que codifican la superóxido dismutasa de manganeso (MnSOD) y la peroxirredoxina (prx) se expresaron constitutivamente. Se observaron resultados similares en otra levadura psicrófila, *M. psychrophila*, donde los genes de la superóxido dismutasa no se sobreexpresaban. Para superar el estrés ambiental, *G. antarctica* expresa genes que

codifican glutatión S-transferasa (GST), que son importantes para limpiar las ROS formadas durante el metabolismo (Collinson y Grant, 2003). GST también juega un papel importante en la protección celular contra el estallido oxidativo al catalizar varios sustratos y apagar las moléculas reactivas.

Por lo tanto, estos hallazgos podrían respaldar la importancia de entender la expresión génica global para mejorar la comprensión de los mecanismos moleculares que subyacen a la adaptación al frío de levaduras psicrófilas en su entorno natural.

La respuesta al estrés por frío ha sido ampliamente estudiada en bacterias y plantas, y durante los últimos años, en menor medida, en las levaduras, mayoritariamente en la especie mesófila *Saccharomyces cerevisiae* y algunas especies de ambientes de bajas temperaturas. Pese a esto, la forma particular en que muchas especies de levaduras adaptadas al frío, responden al estrés por frío, aún se desconoce. Además de su importancia ecológica, la capacidad de estas para crecer a bajas temperaturas, e incluso por debajo del punto de congelación (Panikov y Sizova, 2007), ha atraído gran atención debido a su capacidad de degradar los compuestos orgánicos a bajas temperaturas. Las aplicaciones biotecnológicas de las especies de levaduras que habitan ambientes de bajas temperaturas se relacionan, entre otras, con su papel en las fermentaciones a baja temperatura y su capacidad para producir enzimas activas en frío, con potenciales usos en la producción de vinos y cervezas de baja graduación alcohólica, en el control de enfermedades postcosecha en la agricultura y en la biorremediación de ecosistemas fríos contaminados por hidrocarburos (Buzzini y cols., 2012).

Para el desarrollo del presente trabajo se utilizó una colección de especies de levaduras aisladas desde la Isla Rey Jorge, en la región sub-antártica, las cuales fueron identificadas molecularmente (8 especies distintas, pertenecientes a 8 géneros distintos). En este estudio se analizaron los cambios en la expresión génica en ocho levaduras antárticas al enfrentarse a condiciones definidas como causantes de estrés por frío. A partir de sus ORFeomas, se predijeron sus genes putativos, se clasificaron funcionalmente y se determinaron los nivel de expresión. Estos resultados proporcionan información sobre las adaptaciones basales que los organismos han desarrollado y los mecanismos conservados que emplean en respuesta al estrés por frío, que en última instancia aseguran que las levaduras prosperen en su ambiente frío.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1 Hipótesis

Los cambios en la expresión de genes en respuesta al estrés por frío en levaduras adaptadas al frío no guardan relación con la temperatura de crecimiento de cada una.

2.2 Objetivo General.

Cuantificar y comparar la expresión génica frente al estrés por frío en ocho cepas de levaduras, e identificar los genes putativos descritos como parte de los mecanismos de respuesta al estrés por frío.

2.3 Objetivos Específicos

- 2.3.1** Exponer las levaduras en estudio a condiciones de estrés por frío para la secuenciación masiva de transcriptomas completos (RNA-seq).
- 2.3.2** Determinar los niveles de expresión de genes putativos frente al estrés por frío en cada una de las cepas de levadura.
- 2.3.3** Proponer modelos de la respuesta y adaptación al estrés por frío en las especies de levaduras adaptadas al frío utilizadas.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Microorganismos y condiciones de cultivo

Se utilizaron 8 cepas de levaduras pertenecientes a ocho especies distintas, (Tabla II) las cuales fueron colectadas por nuestro grupo de trabajo en la Isla Rey Jorge del Territorio Antártico Chileno, y posteriormente aisladas en el Laboratorio de Genética de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile. Estas cepas fueron seleccionadas para cubrir un amplio rango de temperaturas óptimas de crecimiento.

Tabla I. Cepas de levaduras antárticas utilizadas. Las temperaturas fueron previamente determinadas mediante el crecimiento radial en medio sólido YM 1% de glucosa

Cepa de levadura	Temperatura de crecimiento
<i>Cryptococcus</i> sp. T15-22C (Crysp) <i>Mrakia gelida</i> T29_3-4C (Mgeli)	10 °C
<i>Phenolifera glacialis</i> T8_3-4C (Pgla) <i>Vishniacozyma victoriae</i> T18_1-22C (Vvic)	15 °C
<i>Candida sake</i> H14_1-4C (Csake) <i>Leucosporidium creatinivorum</i> T33_1-10C (Lcrea) <i>Tetracladium</i> sp. T11_2-10C (Tetsp)	22°C
<i>Wickerhamomyces anomalus</i> H01_1-10C (Wanom)	30 °C

3.2 Exposición a condiciones de estrés por frío

Se cultivaron las ocho cepas por triplicado en 200ml de medio YM 1% de glucosa y 160 rpm, a sus respectivas temperaturas de crecimiento, hasta alcanzar la fase exponencial media (valor medio de la D.O respecto al máximo que cada cultivo alcanza en fase estacionaria). Luego, las dos mitades de cada cultivo se dividieron en matraces de 100ml, uno de estos se mantuvo a su respectiva temperatura de crecimiento (HT) y el otro se incubó a 4 °C (LT). El crecimiento de los cultivos se midió por densidad óptica a 600 nm cada 6 horas durante la fase de latencia y estacionaria y cada 2-3 horas durante la fase exponencial. Una vez determinado el tiempo de exposición necesario, se repitió el experimento y al finalizar el tiempo de incubación, los cultivos se centrifugaron (7000g a 4°C, por 10min), se descartó el sobrenadante y los pellets se almacenaron a -80°C para su posterior uso.

3.3 Transcriptómica de levaduras antárticas

3.3.1 Secuenciación de los transcriptomas (RNA-seq) y análisis

bioinformático primario

Los pellets de las ocho cepas de levaduras, expuestas a las condiciones anteriormente mencionadas, se enviaron en hielo seco a Omics2view Consulting company (Schauenburgerstrasse, Germany) (<https://www.omics2view.consulting/>) para realizar el aislamiento del ARN usando TRIzol (Invitrogen), la preparación de librerías de ARNm y su secuenciación en plataforma Illumina HiSeq 4000, 2 x 150bp, y el procesamiento bioinformático de los datos resultantes como se detalla a continuación. Brevemente, La calidad de las lecturas demultiplexadas se verificó con FastQC v0.11.7 (Andrews, 2018)

y se creó un informe de control de calidad resumido con MultiQC v1.7 (Ewels et al., 2016) (Tabla S1). El *trimming* de calidad de las lecturas se realizó con el paquete BBTools v38.19 (Bushnell, 2019). Esto comprendió la eliminación de duplicados ópticos, secuencias adaptadoras, lecturas de baja entropía y *trimming* de bases de calidad menor a 20. Se descartaron las lecturas con bases no válidas o ambiguas y las lecturas con una longitud menor a 127pb. Solo las lecturas que pasaron el filtro de calidad como pares ingresaron al análisis posterior. La recalibración de la calidad de lectura y la corrección de errores se realizaron con el paquete BBTools v38.19 (Bushnell, 2019). Las lecturas con *trimming* de calidad se alinearon con un ensamblaje preliminar *de novo* realizado con Tadpole a partir de un subconjunto de las lecturas con *trimming* de calidad. La información del alineamiento se usó para recalibrar la calidad de base de todas las lecturas con *trimming* de calidad. Los errores de secuenciación se corrigieron aplicando consecutivamente los programas BBTools BBMerge, Clumpify y Tadpole en el modo de corrección de errores en las lecturas de calidad recalibrada. Los resultados se denominaron "lecturas filtradas". Un total de kmers de 31pb de lecturas filtradas se normalizaron con BBNorm a una profundidad kmer de 100x, con una profundidad kmer mínima de 3x. Se construyó un ensamblaje de estas lecturas normalizadas para cada muestra individual con rnaSPAdes v3.13.0 (Bankevich et al., 2012). Los *scaffolds* producidos por rnaSPAdes se fusionaron con Dedupe del paquete BBTools v38.19 (Bushnell, 2019) si exhibían una similitud mínima del 99% y se filtraban para una longitud mínima de 240 pb. El resultado se denominó "ensamblaje primario". Las lecturas filtradas se mapearon en el ensamblaje principal con BMap del paquete BBTools v38.19 (Bushnell, 2019). Para cada contig en el ensamblaje principal, la cobertura general se determinó a partir del número de lecturas

mapeadas sin ambigüedades. Los contigs de longitud ≥ 240 pb y cobertura $\geq 10x$ se consideraron confiables y se denominan "ensamble filtrado".

3.3.2 Predicción, anotación funcional y determinación de los niveles de expresión de los ORFeomas

El análisis se realizó utilizando el software Geneious R10 y los *plugins* incluidos, como ORF finder, BLAST y Geneious RNAseq. Se predijeron los ORFs de largo superior a 210nt, luego fueron traducidos e ingresados a BLASTp para la búsqueda de homología contra una base de datos local curada conteniendo proteínas de hongos (actualizada en enero de 2021, disponible en <http://ciencias.uchile.cl/investigacion/nuestros-centros/centro-de-biotecnologia>). Las anotaciones se transfirieron desde los *hits* a las secuencias de referencia incluyendo el % de similitud, el peso molecular calculado y el largo del *hit*, y se exportaron en formato csv. El peso molecular de las secuencias de referencia se calculó como el producto de la longitud de secuencia por 110 Da (valor de referencia de peso molecular promedio de los diferentes aminoácidos). Los datos fueron procesados en Microsoft Excel 16.66 y se filtraron los *hits* con similitud ≥ 40 %, cobertura ≥ 50 %, e-value $\leq 10^{-10}$ y la relación del peso molecular calculado entre la referencia y su *blast-hit* en el rango de 0,7–1,3. La lista de ORFs filtrados se utilizó para extraer las secuencias por el nombre de su anotación de BLASTp en Geneious. Estos ORF anotados se clasificaron de acuerdo a la función celular obtenida al realizar la anotación automática de la plataforma en línea de KAAS-KEGG (Moriya et al., 2007), utilizando parámetros predeterminados y un conjunto de datos de genes eucariontes. Los niveles de expresión de los ORFs se calcularon como *reads* por kilobase por millón de *reads* mapeados

(RPKM), como se describió anteriormente (Mortazavi et al., 2008), y los ORF con RPKM ≥ 10 en cualquiera de las condiciones se consideraron para análisis posteriores. Los genes diferencialmente expresados (DEG) fueron definidos como aquellos con una razón de cambio $x \geq 2,0$, $x \leq -2,0$ y $p < 0,05$ (Up, $\text{Log}_2\text{FC} \geq 1$; Down, $\text{Log}_2\text{FC} \leq -1$).

4. RESULTADOS

4.1 Levaduras antárticas y estrés por frío: secuenciación de transcriptomas y análisis de sus resultados

Luego de obtener los resultados de la secuenciación y el análisis primario de los transcriptomas de cada cepa de levadura bajo sus condiciones de crecimiento (HT) y 4°C (LT) se realizó una revisión de los parámetros generales de los transcriptomas obtenidos (Tabla I). El porcentaje de GC osciló en un rango de 37% (*Wickerhamomyces anomalus* H01_1-10C) y 59% (*Leucosporidium creatinivorum* T33_1-10C). El número de *contigs* ensamblados con una longitud mayor o igual a 210 nucleótidos osciló entre 17.877, obtenido en el cultivo de la cepa de *Candida sake* H14_1-4C incubado a la LT, y 34.096 para el cultivo de *Tetracladium sp.* T11_2-10C incubado a su HT. El largo máximo de *contig*, tanto en condiciones HT como LT, se obtuvo en *Candida sake* H14_1-4C, con secuencias de 10.791pb y 11.257pb, respectivamente. Luego, tras la predicción de ORFs utilizando el plugin ORF Finder de Geneious, se pudo ver que en promedio, la cepa de levadura con mayor cantidad de resultados fue *Leucosporidium creatinivorum* T33_1-10C, con cerca 97 mil ORFs predichos, y por el contrario, la cepa de *Wickerhamomyces anomalus* H01_1-10C entregó la menor cantidad de resultados, bordeando los 21 mil ORFs en promedio bajo ambas condiciones de cultivo.

Tabla I. Resumen de los resultados del RNA-seq y análisis de secuencias.

Levadura	Temperatura de incubación	%GC	<i>Contigs</i>		ORFs predichos
			Número total	Largo máximo (pb)	
Mgeli	10 °C (HT)	56%	31.218	8.562	83.064
	4 °C (LT)	56%	31.057	8.124	84.269
Crysp	10 °C (HT)	52%	32.090	7.296	39.335
	4 °C (LT)	52%	29.542	7.315	37.748
Pgla	15 °C (HT)	52%	30.105	7.841	38.410
	4 °C (LT)	52%	26.594	7.787	47.903
Vvic	15 °C (HT)	51%	24.121	9.569	52.347
	4 °C (LT)	51%	27.124	9.563	54.493
Csake	22 °C (HT)	43%	24.963	10.791	27.722
	4 °C (LT)	42%	17.877	11.257	26.667
Lcrea	22 °C (HT)	59%	32.379	6.799	99.705
	4 °C (LT)	59%	31.122	6.902	93.816
Tetsp	22 °C (HT)	49%	34.096	9.551	91.126
	4 °C (LT)	49%	33.184	10.586	90.724
Wanom	30 °C (HT)	37%	26.721	5.643	19.896
	4 °C (LT)	37%	28.076	5.613	23.078

4.2 Análisis de la expresión diferencial y anotación funcional

Una vez realizado el filtro de secuencias realizado de la forma mencionada en la sección Materiales y Métodos, considerando los resultados de la búsqueda por BLASTp, la predicción de la función celular por KEGG y los valores relacionados con la expresión diferencial, se obtuvieron los ORFs anotados o genes putativos, en cada cepa de levadura (Tabla II). En promedio, se encontraron cerca de 2000 genes putativos por cepa de levadura. La cepa con la menor cantidad fue *Mrakia gelida* T29_3-4C, con 807 genes, mientras que la cepa *Wickerhamomyces anomalus* H01_1-10C resultó con el mayor número (3.329).

El análisis de la expresión diferencial permitió determinar los genes putativos diferencialmente expresados en cada levadura cuando se incubó a las condiciones de estrés por frío (LT: 4°C por 6 horas) en relación a la incubación bajo condiciones de cultivo de temperatura alta (HT: la temperatura de incubación “normal” para cada cepa de levadura), y se expresó como el Log2 de la razón de cambio bajo ambas condiciones (Log2 FC)(Tabla II). Los genes diferencialmente expresados (DEG) oscilaron en un rango entre 15 y 1839 considerando las 8 cepas. Las cepas con el mayor número de DEGs fueron *W. anomalus* H01_1-10C, *L. creatinivorum* T33_1-10C y *C. sake* H14_1-4C (en orden decreciente), y, por el contrario, las con el menor número fueron *M. gelida* T29_3-4C y *Cryptococcus sp.* T15-22C, observándose una relación directa con la variación de temperatura que enfrentaron. El número de DEGs con valores Log2 FC positivos fue mayor que el número de genes con valores Log2 FC negativos en la mayoría de las cepas, a excepción de *V. victoriae* T18_1-22C, *L. creatinivorum* T33_1-10C y de *Mrakia gelida*

T29_3-4C, la cepa con el menor número de DEGS y en la que solo se encontraron reprimidos ($\text{Log}_2 \text{FC} \leq -1$).

Luego, los genes putativos fueron clasificados de acuerdo a su función celular mediante la plataforma en línea de KEGG, obteniéndose 3 categorías con crecientes niveles de especificidad, anotadas como General, Media y Específica (Tabla SII). En el nivel general, el 75% de los genes putativos fue clasificado en la categoría “Metabolismo”, mientras que solo el 2,6% se asignó a la categoría “Procesamiento de información ambiental”. En el nivel medio, las vías en las que se clasificaron la mayor cantidad de genes putativos fueron el metabolismo de aminoácidos, la traducción, el metabolismo de hidratos de carbono y el metabolismo de lípidos. En el nivel de mayor especificidad, entre las vías con mayor abundancia de genes putativos asociados se encontró “Ribosoma”, “Fosforilación oxidativa”, “Peroxisoma”, “Metabolismo del piruvato” y “Proteasoma”.

También, hubo algunas vías que solo se encontraron en una de las cepas de levaduras analizadas, entre las que se encuentran: “Degradación de clorociclohexano y clorobenceno” y “Degradación de fluorobenzoato” en *P. glacialis* T8_3-4C, “Biosíntesis de betalaína” y “Biosíntesis de glicoesfingolípidos” en *Tetracladium sp* T11_2-10C, “Vía de señalización de apelina”, “Enzimas del metabolismo de drogas” y “Metabolismo de D-Arginina y D-ornitina” en *C. sake* H14_1-4C, y “Biosíntesis de aflatoxinas” en *W. anomalous* H01_1-10C. Algunas vías encontradas solo en dos o tres cepas de levadura fueron el metabolismo de nicotinato y nicotinamida, la autofagia, vías de señalización AMPK, la senescencia celular, y la biosíntesis de varios tipos de N-glicanos.

Considerando los DEGs y la anotación por vías de KEGG, se encontró un alto número de DEGs para el procesamiento de información genética (Tabla SI), y particularmente en *W. anomalus* H01_1-10C y *Tetracladium sp* T11_2-10C. En el nivel medio, las vías de “Traducción”, “Plegamiento, *sorting* y degradación” de proteínas, y “Transporte y catabolismo”, y en el nivel específico “Ribosoma”, “Peroxisoma” y “Biogénesis de ribosomas en eucariontes” fueron algunas de las vías más representadas.

Cuando se considera el valor promedio de la razón de cambio (Log2 FC) de los DEGs por vía metabólica (Figura 1) en el nivel medio, se puede observar que los valores más altos, relacionados con un aumento en la expresión de genes putativos asociados a una determinada vía, se asignaron al plegamiento, *sorting* y degradación de proteínas, siendo el valor de *P. glacialis* T8_3-4C, el promedio más alto de las vías analizadas en este nivel, seguida por la vía de crecimiento y muerte celular, donde *V. victoriae* T18_1-22C presentó el promedio de Log2 FC más alto. A su vez, en este mismo nivel, las vías con mayores niveles de represión (Log2 FC \leq -1) en promedio, fueron “Biodegradación y metabolismo de xenobióticos” (con *Cryptococcus sp.* T15-22C presentando la razón de cambio más negativa) y la “Biosíntesis de otros metabolitos secundarios”, donde *L. creatinivorum* T33_1-10C tuvo el promedio más bajo. En el nivel específico, se encontraron promedios más altos para el Log2 FC en las vías de degradación el ARN, en *P. glacialis* T8_3-4C, y “Sistema de dos componentes” *L. creatinivorum* T33_1-10C, mientras que se encontraron valores más bajos para la biosíntesis de glucosinolato y el metabolismo de almidón y sacarosa ambas en *L. creatinivorum* T33_1-10C.

La variación en la expresión de los genes putativos bajo las condiciones HT y LT fue considerable entre las levaduras. En las vías generales, en promedio, frente a la exposición a 4°C, se observó una represión en los procesos celulares, el procesamiento la información ambiental, el procesamiento de la información ambiental y el metabolismo, en 3, 4, 2 y 5 de las cepas de levaduras, respectivamente. Por su parte, en el nivel medio, las vías que en promedio se encontraron con valores de Log₂ FC más bajos fueron el metabolismo de aminoácidos, el metabolismo de hidratos de carbono y el metabolismo energético, con 4, 6 y 8 de las cepas de levadura presentando promedios de expresión negativos. En el nivel específico, se encontró el metabolismo del ácido alfa-linoleico, el metabolismo de xenobióticos por citocromo P450 y la degradación de ácidos grasos en 4, 4 y 6 levaduras, respectivamente.

Al realizar un análisis considerando tanto el promedio de la razón de cambio de las vías específicas en las 8 cepas, como la cantidad de levaduras en las que se anotaron DEGs para cada vía, se obtuvo cuál de las vías resultaban en una mayor representación respecto a sus niveles de expresión al exponer los cultivos de levaduras a condiciones de estrés por frío. Así, entre las vías que en promedio resultaron más veces sobreexpresadas a 4°C se encontró la proteólisis mediada por ubiquitina, el transporte de ARN, el metabolismo de Ala, Asp y Glu, el fagosoma, el ribosoma y la biosíntesis de aminoacil-ARNt. En cuanto a las vías que resultaron más veces reprimidas se encontró la degradación de ácidos grasos, el metabolismo del ácido alfa-linoléico, la degradación de Val, Leu e Ile, la biosíntesis de ácidos grasos insaturados, la exportación de proteínas y el peroxisoma.

Al comparar el número de DEGs en las levaduras en el nivel medio de clasificación KEGG, respecto al total de DEGs obtenidos en cada cepa bajo condiciones de estrés por frío, se pudo ver donde se concentraron los mayores cambios (Tabla IIIA). Aquí, se encontró que los metabolismos de aminoácidos, de hidratos de carbono, energético y de lípidos, junto con la traducción fueron las vías con mayores niveles de cambio en la expresión respecto al total, de forma similar al análisis considerando directamente el número de DEGs por vía. En estos casos, se vio una distribución equitativa entre las levaduras que aumentaron la expresión y las que la disminuyeron.

Un grupo de genes putativos cuyos niveles de expresión resultan de particular interés son aquellos asociados a subunidades ribosomales y los asociados a alguna condición de respuesta a estrés.

En el caso de los DEGs anotados como subunidades ribosomales, la mayor cantidad se obtuvo en *W. anomalus* H01_1-10C, *Tetracladium sp* T11_2-10C y *C. sake* H14_1-4C, mientras que en *V. victoriae* T18_1-22C, *Cryptococcus sp.* T15-22C, solo se obtuvieron 4 y 3, respectivamente y ninguno en *Mrakia gelida* T29_3-4C (Tabla IIIB). En la cepa de *C. sake*, todos los genes putativos de subunidades ribosomales se encontraron reprimidos, mientras que en las cepas de en *P. glacialis* y *Tetracladium sp.*, el 100% y el 98%, respectivamente, de las subunidades de ribosoma encontradas estaban sobreexpresadas.

Por su parte, se encontraron DEGs relacionados con las respuestas a varios tipos de estrés en todas las levaduras (Figura 2 y Tabla IV), con números más altos asociados a los estrés oxidativo, replicación, general, osmótico, frío y calor (Figura 2). La mayor cantidad de

DEGs asociados con respuesta a estrés se encontró en las cepas de *W. anomalus* H01_1-10C, *C. sake* H14_1-4C y *L. creatinivorum* T33_1-10C, mientras que las cepas *V. victoriae* T18_1-22C y *Mrakia gelida* T29_3-4C arrojaron el menor número. En la tabla IV se exhiben algunas de las proteínas putativas con reportes en la bibliografía como participes en la respuesta a estrés en hongos. Cerca del 44% de estas, correspondieron a proteínas asociadas a respuesta a estrés oxidativo, seguidas por respuesta a estrés por frío (22%) y estrés osmótico (17%).

Tabla III. Variación de temperatura experimentada y número de genes putativos de acuerdo a los niveles de expresión, tras la exposición a condiciones de estrés por frío.

Levadura	ΔT (°C)	N° de genes putativos		
		$\text{Log}_2 \text{FC} \geq 1$	$1 < \text{Log}_2 \text{FC} < -1$	$\text{Log}_2 \text{FC} \leq -1$
Mgeli	6	0	792	15
Crysp	6	62	1487	36
Pgla	11	118	2049	31
Vvic	11	82	1587	189
Csake	18	295	1404	228
Lcrea	18	323	523	352
Tetsp	18	237	2100	227
Wanom	26	944	1490	881

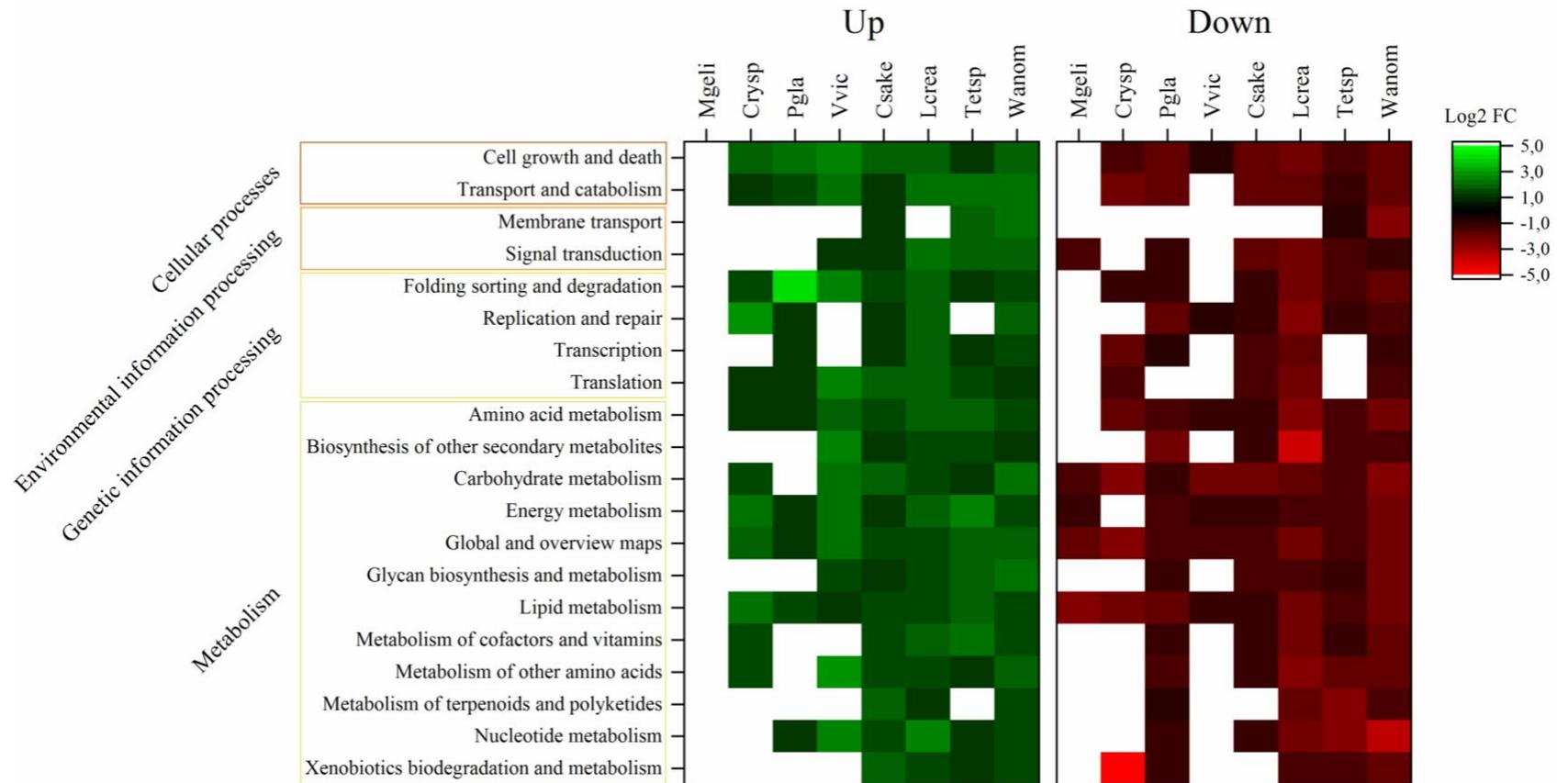


Figura 1. Heatmap de genes putativos expresados diferencialmente y clasificados por rutas metabólicas entre levaduras cultivadas a su temperatura de crecimiento (HT) y 4°C (LT). El promedio de la razón de cambio (Log2 FC) por ruta se muestra en los paneles Up (Log2 FC \geq 1) (DEGs sobreexpresados) y Down (Log2 FC \leq -1)(DEGs reprimidos).

Tabla IV. A. Porcentaje de DEGs que varían de acuerdo a la vía metabólica (KEGG) en las que participan. Se muestran las vías más representadas. B. Número de DEGs anotados como proteínas ribosomales y estado de expresión. Up, $\text{Log}_2\text{FC} \geq 1$; Down, $\text{Log}_2\text{FC} \leq -1$.

A	Mgeli		Crysp		Vvic		Pgla		Lcrea		Csake		Tetsp		Wanom	
	Up	Down	Up	Down	Up	Down	Up	Down	Up	Down	Up	Down	Up	Down	Up	Down
Amino acid metabolism			2%	2%	5%	3%	3%	4%	6%	4%	6%	3%	3%	6%	3%	5%
Carbohydrate metabolism	13%		11%	1%	12%	1%		8%	5%	4%	3%	2%	2%	5%	3%	5%
Cell growth and death			5%	6%	1%	1%	1%	1%	1%	2%	4%	2%	1%	1%	2%	2%
Energy metabolism	20%		5%		6%	1%		2%	2%	1%	1%	2%	2%	1%	1%	3%
Folding sorting and degradation			5%	5%	1%		1%	2%	1%	2%	7%	1%	1%		3%	1%
Global and overview maps	47%		20%	12%	34%	13%	6%	30%	21%	19%	19%	10%	16%	25%	22%	20%
Lipid metabolism	7%		4%	5%	3%	1%		7%	3%	2%	3%		1%	3%	2%	3%
Signal transduction	13%				1%			1%	1%	3%		2%	2%		1%	1%
Transcription				1%			1%			1%		2%	1%		1%	
Translation			2%	2%	7%		15%		1%	3%	2%	12%	17%		2%	2%
Transport and catabolism			2%	1%	1%			3%	1%	3%	3%	1%	1%	1%	1%	2%

B	Mgeli		Crysp		Pgla		Vvic		Lcrea		Csake		Tetsp		Wanom	
	Up	Down	Up	Down	Up	Down	Up	Down	Up	Down	Up	Down	Up	Down	Up	Down
Ribosomal Protein			1	2	34		4		4	8		44	53	1	19	43

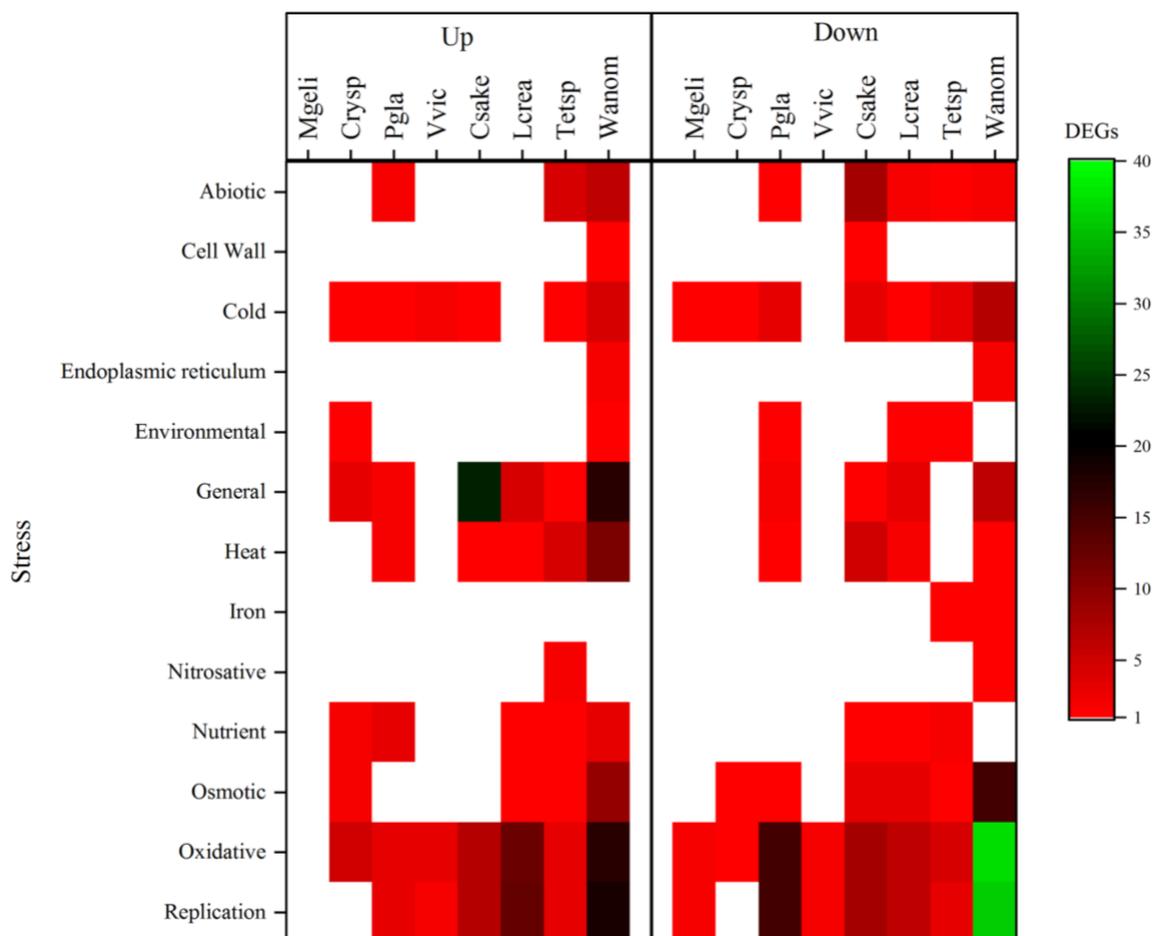


Figura 2. Heatmap de número de DEGs anotados como genes putativos asociados a respuesta a estrés. En el panel Up ($\text{Log}_2 \text{FC} \geq 1$), DEGs sobreexpresados y Down ($\text{Log}_2 \text{FC} \leq -1$), DEGs reprimidos.

Tabla V. DEGs anotados como proteínas asociadas a estrés en cada cepa levadura. Up, $\text{Log}_2\text{FC} \geq 1$; Down, $\text{Log}_2\text{FC} \leq -1$.

Tipo de estrés	Proteína	Up	Down
Cell wall	1,3-Beta-Glucan Synthase	1 Wanom	
Cold	3-Keto-Steroid Reductase	1 Wanom	
	3-Methylcrotonyl-CoA Carboxylase		1 Tetsp
	5-Aminolevulinic Acid Synthase	1Pgla	
	Alcohol Dehydrogenase	2 Vvic, 1 Lcrea, 1 Wanom	1 Pgla, 2 Lcrea, 4 Wanom
	Heat Shock Protein	1 Tetsp, 1 Wanom	1 Lcrea, 1 Csake
	Nitrate Reductase	2 Tetsp	
Heat	3-Methylcrotonyl-CoA Carboxylase		1 Tetsp
	Exosome Complex Component		1 Csake
Iron	Citrate Synthase		1 Tetsp
Osmotic	2-Dehydro-3-Deoxy-D-Gluconate 5-Dehydrogenase		1 Vvic
	2-Hydroxyacid Dehydrogenase	1 Tetsp	
	C-8 Sterol Isomerase	2 Wanom	
	Cardiolipin Synthase	1 Wanom	
	Carnitine O-acetyltransferase		1 Lcrea
	Glycerol Phosphate Dehydrogenase	4 Wanom	1 Csake; 2 Wanom
	Osmolarity Two-component System	2 Tetsp	
Oxidative	5-Oxoprolinase	2 Vvic	
	Cytochrome C Oxidase	5 Lcrea	1 Pgla, 2 Wanom
	Glutathione S-Transferase		1 Lcrea
	Osmolarity Two-Component System	2 Tetsp	
	Peroxiredoxin	1 Vvic	1 Mgeli, 1 Crisp, 1 Pgla, 4 Wanom
	Proteasome Subunit	1 Crisp, 1 Lcrea, 8 Csake, 9 Wanom	
Salt	3-Methylcrotonyl-CoA Carboxylase		1 Tetsp
	3',5'-Cyclic-Nucleotide Phosphodiesterase	1 Wanom	
	3'(2'),5'-Bisphosphate Nucleotidase		1 Lcrea
	5-Aminolevulinic Acid Synthase	1 Pgla	
Drought	Acireductone Dioxygenase		1 Wanom
	3-Methylcrotonyl-CoA Carboxylase		1 Tetsp
	Acireductone Dioxygenase		1 Wanom
Stress	Citrate synthase		2 Wanom
	Nicotinamidase	1 Csake	2 Wanom

5. DISCUSIÓN

Aun cuando los ambientes de bajas temperaturas corresponden a una gran parte de los ecosistemas en la tierra, los microorganismos, que no solo sobreviven, sino que prosperan en estos ambientes extremos, aun son poco conocidos. Por esto, el estudio de las levaduras adaptadas al frío y de sus respectivos mecanismos de respuesta y adaptación al estrés por frío resulta de interés. El análisis de los cambios en la expresión génica que estas pudiesen desplegar bajo condiciones de estrés por frío, que normalmente se presentan en sus ambientes naturales, ofrece la oportunidad de profundizar en las bases de los fenotipos que resisten y sostienen el crecimiento a bajas temperaturas, una característica de importancia ecológica y biotecnológica. Aunque el estrés por frío utilizado en este trabajo no parece extremo, es importante considerar que la región subantártica presenta cambios estacionales de temperatura, con temperaturas que durante el verano pueden alcanzar los 20°C, especialmente durante las olas de calor reportadas durante los últimos años (Robinson y cols., 2020). Por eso, una disminución de la temperatura ambiental a 4°C puede considerarse una fase intermedia a temperaturas bajo el punto de congelación que las levaduras deben sentir para adaptar sus funciones celulares.

Ocho cepas de levaduras antárticas fueron expuestas a condiciones de estrés por frío para determinar los cambios globales en la expresión génica. Los cultivos de las levaduras se incubaron a sus respectivas temperaturas de crecimiento para luego ser sometidas a 4°C durante 6 horas. Tras la exposición a estas condiciones, definidas como causantes de estrés por frío, se realizó una secuenciación a transcriptoma completo (RNA-seq) y un procesamiento bioinformático primario de sus resultados. Los porcentajes de GC entre los transcriptomas variaron entre 59 y un 37%. Aun cuando han existido reportes de una

posible correlación en el contenido genómico de GC de organismos psicrófilos (Wu y cols., 2012), no se pudo apreciar una tendencia en el grupo de cepas estudiadas. Esta amplia distribución también se puede apreciar en los genomas de otras levaduras psicrófilas como *Glaciozyma antarctica* (60%)(Firdaus-Raih y cols., 2018), *Mrakia psychrophila* (54%)(Su y cols., 2016) y *Candida psychrophila* (37%)(Brejová y cols., 2017).

En cuanto a la Tabla II, lo primero que llama la atención es que las cepas de levadura, al ser expuestas a condiciones de estrés por frío (4 °C), exhibieron una cantidad de genes expresados diferencialmente (DEGs) en relación directa con la variación de temperatura (ΔT) a la que se enfrentaron: *W. anomalus*, la cepa de levadura con el mayor ΔT experimentado, presentó la mayor cantidad de genes sobreexpresados ($\text{Log}_2 \text{FC} \geq 1$) y reprimidos (relación de expresión $\text{Log}_2 \leq -1$); por el contrario, *M. gelida*, una de las cepas con menor ΔT experimentada, presentó la menor cantidad de DEGs y no presentó genes sobreexpresados. Esto podría ser un indicio de que, dentro de este grupo de cepas de levaduras antárticas, aquellas con temperaturas de crecimiento más cercanas a los 4°C, tienen adaptaciones basalmente expresadas y mecanismos que les permiten responder eficazmente a condiciones de frío, y por su parte, aquellas con temperaturas de crecimiento superiores han desarrollado mecanismos de respuesta que se activan eficientemente contra el estrés por frío.

Siguiendo el *pipeline* de procesamiento bioinformático de los transcriptomas, se obtuvieron los ORFeomas de las levaduras y se predijeron los genes putativos, los que fueron anotados considerando una base de datos local de proteínas de hongos y la

plataforma en línea de KEGG, obteniéndose la mayor cantidad en las cepas *W anomalous* (3.315), *Tetracladium sp.* (2.564) y *P. glacialis* (2198)(Tabla II). Al predecir las funciones celulares de los genes putativos considerando la anotación por vías metabólicas KEGG, se encontraron 159 rutas en el nivel de mayor especificidad, de las cuales, 121 se encontraron en todas las levaduras. La mayor cantidad de genes putativos fue clasificada dentro del metabolismo de aminoácidos, la traducción, el metabolismo de hidratos de carbono y el metabolismo de lípidos, con el ribosoma, la fosforilación oxidativa, el peroxisoma, el metabolismo del piruvato y el proteosoma como las 5 principales vías. Algunas de las vías con menor representación en términos de especies fueron la biosíntesis de glicoesfingolípidos, enzimas del metabolismo de drogas, la autofagia y la senescencia celular. Esta última llama particularmente la atención, puesto que bajo condiciones de estrés, la senescencia aparece típicamente como uno de los principales recursos de la célula para enfrentar los daños que puede sufrir.

Se identificaron genes putativos asociados con la respuesta a todos los tipos principales de estrés, y aquellos expresados diferencialmente pertenecían principalmente a respuestas de estrés oxidativo, replicación, general, osmótico, frío y calor, que típicamente se han descrito como parte de la respuesta al estrés por frío. Se vieron genes putativos que aumentaron y disminuyeron su expresión (Figura 2 y Tabla IV). En las cepas de *P. glacialis* se notó la mayor proporción de genes putativos asociados a estrés reprimidos con relación a los sobreexpresados (71%), mientras que la relación inversa se observó en la cepa de *Cryptococcus sp.* (82% de los genes asociados a estrés se encontraron sobreexpresados). Algo que llamó la atención con respecto a las proteínas que típicamente

se describen como asociadas con el estrés por frío, es que se detectó una baja cantidad de DEGs codificando HSP (y no CSP), chaperonas que desempeñan funciones en procesos biológicos rutinarios y respuestas al estrés (Tiwari y cols., 2015). Solo en *L. creatinivorum* y *W. anomalus* se vio que un solo gen aumentó su expresión, por lo que estas cepas podrían presentar otros mecanismos para responder a la desestabilización de las estructuras proteicas, en caso de producirse.

Además, entre otras proteínas canónicas de estrés por frío, las desaturasas de ácidos grasos de membrana (Cossins y cols., 2002)(Garba y cols., 2017), solo se detectó un gen que aumentó su expresión en *Tetracladium sp.* y en *W. anomalus* (delta15 y delta 12 desaturasa, respectivamente), pero ninguno en el resto de las cepas. Esto podría estar relacionado con el hecho de que estas cepas antárticas presentan una membrana plasmática cuyos ácidos grasos se han adaptado para mantener una fluidez adecuada a temperaturas decrecientes y no se vieron afectadas significativamente por el cambio de temperatura a 4°C. Es por esto que, una expresión significativa de genes que codifican proteínas típicamente descritas para la respuesta al estrés por frío en mesófilos, podría no ser necesaria en estas levaduras.

Entre los DEGs asociados con el estrés por frío, genes que codifican la enzima alcohol deshidrogenasa se sobreexpresaron en 3 de las levaduras (*V. victoriae*, *L. creatinivorum* y *W. anomalus*), lo que podría ser un indicador de que en estas cepas hay un cambio metabólico de la respiración a la fermentación alcohólica, como se ha visto en otra cepa de levadura antártica, *Rhodotorula frigidialcoholis* (Touchette y cols., 2021), en la que, al exponerse al frío (en ese caso de 23°C a 0°C), se produjo una disminución en la expresión

de los genes de la cadena transportadora de electrones y del ciclo del Krebs; y una sobreexpresión de genes de las vías de fermentación y de las pentosas fosfato, lo que podría beneficiar su supervivencia a bajas temperaturas. Por su parte, la cepa de *L. creatinivorum* podría estar respondiendo al estrés oxidativo, considerando el aumento en la expresión de genes putativos codificando algunas de las subunidades de la citocromo c oxidasa mitocondrial, el sitio principal de consumo de oxígeno celular, esencial para la generación de energía aeróbica, y con funciones en la adaptación a condiciones de estrés como hipoxia, daño oxidativo o niveles bajos de glucosa (Khalimonchuk y Rödel, 2005; Timón-Gómez et al., 2020). Aun así, en el resto de las cepas de levaduras estudiadas, no se observaron las mismas tendencias en la expresión de genes codificando las enzimas alcohol deshidrogenasa y citocromo c oxidasa (al igual que en otros casos), lo que refleja las diferentes formas en que estas cepas de levaduras antárticas se vieron afectadas y los mecanismos que desplegaron para enfrentar el frío.

Por otra parte, se observó una sobreexpresión de genes putativos de unidades de proteasoma en las cepas *C. sake* y *W. anomalus*, lo que indicaría que el estrés por frío provoca la acumulación de proteínas dañadas en estas cepas, y por lo tanto deben responder promoviendo su degradación (Wang, 2010). En estas cepas también se observó una disminución considerable en la expresión de genes anotados como proteínas ribosomales, lo que constituye uno de los procesos más demandantes de energía para la célula (Shore, 2021). Unido a lo anterior, esto indica que estas cepas en condiciones de frío se centran en detoxificar el interior celular para mantener su integridad, y en ralentizar los procesos vitales de crecimiento para entrar en estado de hibernación. Un caso similar

se describió en la bacteria *Shewanella oneidensis*, donde una disminución en la expresión de genes relacionados con la biosíntesis de aminoácidos, la síntesis de proteínas y su integridad luego de una exposición a *shock* por frío, se propuso como un mecanismo de disminución de su metabolismo (De Maayer et al., 2014). Por el contrario, en el caso de las cepas *M. gelida*, *Cryptococcus sp.*, *P. glacialis* y *V. victoriae*, que crecen de manera óptima a temperaturas más bajas, no se detectaron cambios importantes en la expresión de genes codificando los componentes del proteasoma, lo que podría ser consecuencia de adaptaciones en estructuras proteicas que permiten una mayor estabilidad a bajas temperaturas y, en el caso de *P. glacialis*, también se observó una sobreexpresión considerable de genes que codifican proteínas ribosomales, lo que podría indicar que es capaz de sostener un crecimiento acelerado en condiciones de frío.

Estos resultados proporcionan información sobre las adaptaciones basales que los organismos han desarrollado y los mecanismos conservados que emplean en respuesta al estrés por frío, que en última instancia aseguran que las levaduras prosperen en su ambiente frío.

6. CONCLUSIONES

1. Se rechaza la hipótesis: Los cambios en la expresión de genes asociados a la respuesta al estrés por frío en estas levaduras antárticas se relacionan con sus temperaturas de crecimiento.
2. Las cepas de levadura, al ser expuestas a condiciones de estrés por frío (4 °C), exhibieron una cantidad de genes expresados diferencialmente (DEG) en relación directa con la variación de temperatura (ΔT) a la que se enfrentaron.
3. Entre los DEG asociados al estrés, una cantidad significativa se describió como parte de las respuestas al estrés por frío, osmótico y oxidativo. Curiosamente, se detectó una baja cantidad de HSP/CSP y desaturasas de ácidos grasos, proteínas comunes de respuesta al estrés.
4. Dentro de este grupo de cepas de levaduras antárticas, aquellas con temperaturas de crecimiento más cercanas a los 4°C, tendrían adaptaciones basales y mecanismos que les permiten responder eficazmente a condiciones de frío, y por su parte, aquellas con temperaturas de crecimiento superiores han desarrollado mecanismos de respuesta que se activan eficientemente contra el estrés por frío.
5. La disminución en el metabolismo de aminoácidos y la activación de subunidades del proteasoma en las levaduras con mayores temperaturas de crecimiento, podría sugerir que estas disminuyen su tasa metabólica para entrar en una etapa de dormancia.

7. BIBLIOGRAFÍA

Alcaíno, J., Cifuentes, V., Baeza, M. (2015) Physiological adaptations of yeasts living in cold environments and their potential applications. *World J Microbiol Biotechnol* **31**: 1467–1473.

Anderson, KL., Roberts, C., Disz, T., Vonstein, V., Hwang, K., Overbeek, R., Olson, PD., Projan, SJ., Dunman, PM. (2006) Characterization of the *Staphylococcus aureus* heat shock, cold shock, stringent, and SOS responses and their effects on log-phase mRNA turnover. *J. Bacteriol* **188**: 6739–6756.

Andrews, S. (2018). *FastQC: A Quality Control Tool for High Throughput Sequence Data*. Recuperado de: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc> (Accedido en Mayo, 2020).

Bankevich, A., Nurk, S., Antipov, D., Gurevich, A. A., Dvorkin, M., Kulikov, A. S., et al. (2012) SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J Comput Biol* **19**: 455–477.

Bharudin, I., Abu Bakar, MF., Hashim, NHF., Mat Isa, MN., Alias, H., Firdaus-Raih, M., Md Illias, R., Najimudin, N., Mahadi, NM., Abu Bakar, FD., et al. (2018) Unravelling the adaptation strategies employed by *Glaciozyma antarctica* PI12 on Antarctic sea ice. *Mar Environ Res* **137**: 169–176.

Bharudin, I., Zaki, NZ., Abu Bakar, FD., Mahadi, NM., Najimudin, N., Illias, RM., Murad, AMA. (2014) Comparison of RNA extraction methods for transcript analysis from the psychrophilic yeast, *Glaciozyma antarctica*. *Malays Appl Biol* **43**: 71–79.

Białkowska, A., Majewska, E., Olczak, A., Twarda-Clapa, A. (2020) Ice binding proteins: Diverse biological roles and applications in different types of industry. *Biomolecules* **10**: 274.

Brejová, B., Lichancová, H., Brázdovič, F., Cillingová, A., Neboháčová, M., Tomáška, L., Vinař, T., Nosek, J. (2017) Draft genome sequence of an obligate psychrophilic yeast, *Candida psychrophila* NRRL Y-17665(T). *Genome Announc* **5**: e00851-17.

Bushnell, B. (2019) *BBTools*. Recuperado de: <http://jgi.doe.gov/data-and-tools/bbtools/> (Accedido en Mayo, 2020).

Buzzini, P., Branda, E., Goretti, M., Turchetti, B. (2012) Psychrophilic yeasts from worldwide glacial habitats: diversity, adaptation strategies and biotechnological potential. *FEMS Microbiology Ecology*, **82**: 217–241.

- Buzzinim, P., Margesin, R. (2014a) Cold-adapted yeasts: biodiversity, adaptation strategies and biotechnological significance. Springer, Heidelberg.
- Christner, BC., Mosley-Thompson, E., Thompson, LG., Reeve, JN. (2003) Bacterial recovery from ancient glacial ice. *Environmental Microbiology*, **5**: 433-436.
- Collinson, EJ., Grant, CM. (2003) Role of yeast glutaredoxins as glutathione S-transferases. *J Biol Chem* **278**: 22492–22497.
- Convey, P. (2010) Terrestrial biodiversity in Antarctica – Recent advances and future challenges. *Polar Science*, **4(2)**: 135-147.
- Cossins, A. R., Murray, P. A., Gracey, A. Y., Logue, J., Polley, S., Caddick, M., (2002) The role of desaturases in cold-induced lipid restructuring. *Biochem Soc Trans* **30**: 1082–1086.
- Dang, NX., Hinch, DK. (2011) Identification of two hydrophilins that contribute to the desiccation and freezing tolerance of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) cells. *Cryobiology* **62**: 188–193.
- De Maayer, P., Anderson, D., Cary, C., Cowan, D.A. (2014) Some like it cold: understanding the survival strategies of psychrophiles. *EMBO Rep* **15**: 508–517
- Enjalbert, B., Nantel, A., & Whiteway, M. (2003). Stress-induced gene expression in *Candida albicans*: absence of a general stress response. *Molecular biology of the cell* **14(4)**: 1460-1467.
- Ernst R, Ejsing CS, Antony B (2016) Homeoviscous adaptation and the regulation of membrane lipids. *J Mol Biol* **428**:4776–4791.
- Ewels, P., Magnusson, M., Lundin, S., Källér, M. (2016) MultiQC: summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report. *Bioinformatics* **32**: 3047–3048.
- Farewell, A., Neidhardt, FC. (1998) Effect of temperature on in vivo protein synthetic capacity in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **180**:4704–4710.
- Feller G, Gerday C (2003) Psychrophilic enzymes: hot topics in cold adaptation. *Nat Rev Microbiol* **1**: 200–208.

Firdaus-Raih, M., Hashim, N.H.F., Bharudin, I., Abu Bakar, M.F., Huang, K.K., Alias, H., Lee, B.K.B., Mat Isa, M.N., Mat-Sharani, S., Sulaiman, S., et al. (2018) The *Glaciozyma antarctica* genome reveals an array of systems that provide sustained responses towards temperature variations in a persistently cold habitat. *PLoS ONE* **13**: e0189947.

Garba, L., Mohamad Ali, M.S., Oslan, S.N., Zalih, R.N. (2017) Review on fatty acid desaturases and their roles in temperature acclimatisation. *J App Sci* **17**: 282–295

Gerday, C., Aittaleb, M., Arpigny, JL., Baise, E., Chessa, JP., Garsoux, G., Petrescu, I., Feller, G. (1997) Psychrophilic enzymes: a thermodynamic challenge. *Biochim Biophys Acta* **1342**:119–131.

Gutin, J., Sadeh, A., Rahat, A., Aharoni, A., Friedman, N. (2015) Condition-specific genetic interaction maps reveal crosstalk between the cAMP/PKA and the HOG MAPK pathways in the activation of the general stress response. *Mol Syst Biol* **11**: 829

Hu, S., Hu, B., Chen, Z., Vosátka, M., Vymazal, J. (2020) Antioxidant response in arbuscular mycorrhizal fungi inoculated wetland plant under Cr stress. *Environ Res* **191**: 110203.

Izawa, S., Sato, M., Yokoigawa, K., Inoue, Y. (2004) Intracellular glycerol influences resistance to freeze stress in *Saccharomyces cerevisiae*: analysis of a quadruple mutant in glycerol dehydrogenase genes and glycerol-enriched cells. *Appl Microbiol Biotechnol* **66**:108–114.

Lee, C., Jang, SH., Chung, HS. (2017) Improving the stability of cold-adapted enzymes by immobilization. *Catalysts* **7**: 112.

Lee, K., Lee, J., Lee, D., Jung, W., Bahn, Y. (2014) A Ferroxidase, Cfo1, Regulates Diverse Environmental Stress Responses of *Cryptococcus neoformans* through the HOG Pathway. *Mycobiology*, **42**:2, 152-157.

Li, Y., Guo, XH., Dang, YR., Sun, LL., Zhang, XY., Chen, XL., Qin, QL., Wang, P. (2018) Complete genome sequence of *Arcticibacterium luteifluviistationis* SM1504(T), a cytophagaceae bacterium isolated from Arctic surface seawater. *Stand Genom Sci* **13**: 33.

Los D., Murata, N. (2004) Membrane fluidity and its roles in the perception of environmental signals. *Biochim Biophys Acta* **1666**: 142–157.

- Mahmud, SA., Hirasawa, T., Shimizu, H. (2010) Differential importance of trehalose accumulation in *Saccharomyces cerevisiae* in response to various environmental stresses. *J Biosci Bioeng* **109**:262–266.
- Margesin, R., Miteva, V. (2011) Diversity and ecology of psychrophilic microorganisms. *Research in Microbiology*, **162(3)**: 346–361.
- Martin, CE., Oh, CS., Jiang, Y. (2007) Regulation of long chain unsaturated fatty acid synthesis in yeast. *Biochim Biophys Acta* **1771**: 271–285.
- Michetti, D., Brandsdal, BO., Bon, D., Isaksen, GV., Tiberti, M., Papaleo, E. (2017) A comparative study of cold- and warm-adapted Endonucleases A using sequence analyses and molecular dynamics simulations. *PLoS ONE* **12**: e0169586.
- Mortazavi, A., Williams, B. A., McCue, K., Schaeffer, L., Wold, B. (2008) Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nat Methods* **5**: 621–628.
- Murata, Y., Homma, T., Kitagawa, E., Momose, Y., Sato, MS., Odani, M., Shimizu, H., Hasegawa-Mizusawa, M., Matsumoto, R., Mizukami, S., Fujita, K., Parveen, M., Komatsu, Y., Iwahashi, H. (2006) Genome-wide expression analysis of yeast response during exposure to 4°C. *Extremophiles* **10**: 117–128.
- Naicker, MC., Seul Jo, I., Im, H. (2012) Identification of chaperones in freeze tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Microbiol* **50**:882–887.
- Panadero, J., Pallotti, C., Rodríguez-Vargas, S., Randez-Gil, F., Prieto J. (2006) A downshift in temperature activates the high osmolarity glycerol (HOG) pathway, which determines freeze tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **281**: 4638–4645.
- Panikov, N., Sizova, V. (2007) Growth kinetics of microorganisms isolated from Alaskan soil and permafrost in solid media frozen down to -35C. *FEMS Microbiology Ecology*, **59**: 500–512.
- Park, JI., Grant, CM., Attfield, PV., Dawes, IW. (1997) The freeze-thaw stress response of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is growth phase specific and is controlled by nutritional state via the RAS-cyclic AMP signal transduction pathway. *Appl Environ Microbiol* **63**: 3818–3824.

Pearce, DA., Newsham, KK., Thorne, MA., Calvo-Bado, L., Krsek, M., Laskaris, P., Hodson, A., Wellington, EM. (2012) Metagenomic analysis of a southern maritime antarctic soil. *Front Microbiol* **3**: 403.

Petitjean, M., Teste, MA., François, JM., Parrou, JL. (2015) Yeast tolerance to various stresses relies on the Trehalose-6P synthase (Tps1) protein, not on trehalose. *J Biol Chem* **290**:16177–16190.

Poindexter, J. (2009) *Encyclopedia of microbiology*. Elsevier, Amsterdam.

Ritossa, F. (1962) A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in drosophila. *Experientia* **18**: 571–573.

Robinson, S.A., Klekociuk, A.R., King, D.H., Pizarro Rojas, M., Zúñiga, G.E., Bergstrom, D.M. (2020) The 2019/2020 summer of Antarctic heatwaves. *Glob Change Biol* **26**: 3178-3180.

Russell, NJ. (1990) Cold adaptation of microorganisms. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **326**: 595–608.

Russell, NJ. (2008) Membrane components and cold sensing. En: Margesin R, Schinner F, Marx J-C, Gerday C (eds) *Psychrophiles: from biodiversity to biotechnology.*, pp 177–190. Springer, Berlin.

Sahara, T., Goda, T., Ohgiya, S. (2002) Comprehensive expression analysis of time-dependent genetic responses in yeast cells to low temperature. *J Biol Chem* **277**: 50015–50021.

Schade, B., Jansen, G., Whiteway, M., Entian, K., Thomas D. (2004) Cold adaptation in budding yeast. *Mol Biol Cell* **15**: 5492–5502.

Selbmann, L., Stoppiello, GA., Onofri, S., Stajich, JE., Coleine, C. (2021) Culture-dependent and amplicon sequencing approaches reveal diversity and distribution of black fungi in Antarctic cryptoendolithic communities. *J Fungi* **7**: 213.

Selye, H. (1936) A Syndrome produced by Diverse Nocuous Agents. *Nature* **138**: 32.

Shore, D., Zencir, S., Albert, B. (2021) Transcriptional control of ribosome biogenesis in yeast: links to growth and stress signals. *Biochem Soc Trans* **49**: 1589–1599.

Starmer, W., Lachance, M. (2011) Yeast ecology. En: Kurtzman CP, Fell JW, Boekhout T (eds) The yeasts. A taxonomy study, vol 1. pp 65–83. Elsevier, New York

Su, Y., Jiang, X., Wu, W., Wang, M., Hamid, MI., Xiang, M., Liu, X. (2016) Genomic, transcriptomic, and proteomic analysis provide insights into the cold adaptation mechanism of the obligate psychrophilic fungus *Mrakia psychrophila*. *G3 Genes Genomes Genet* **6**: 3603.

Takagi, H., Sakai, K., Morida, K., Nakamori, S. (2000) Proline accumulation by mutation or disruption of the proline oxidase gene improves resistance to freezing and desiccation stresses in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Lett* **184**:103–108.

Thammavongs, B., Denou, E., Missous, G., Guéguen, M., Panoff, JM. (2008). Response to Environmental Stress as a Global Phenomenon in Biology: the Example of Microorganisms. *Microbes and Environments*, **23**(1): 20–23.

Tiwari, S., Thakur, R., Shankar, J. (2015) Role of heat-shock proteins in cellular function and in the biology of fungi. *Biotechnol Res Int* **2015**: 132635.

Touchette, D., Altshuler, I., Gostinèar, C., Zalar, P., Raymond-Bouchard, I., Zajc, J., (2021) Novel Antarctic yeast adapts to cold by switching energy metabolism and increasing small RNA synthesis. *ISME J* **16**: 221–232

Truongvan, N., Jang, SH., Lee, C. (2016) Flexibility and stability trade-off in active site of cold-adapted *Pseudomonas mandelii* esterase EstK. *Biochemistry* **55**: 3542–3549.

Tsuji, M., Tanabe, Y., Vincent, W.F., Uchida, M. (2019) *Mrakia hoshinonis* sp. nov., a novel psychrophilic yeast isolated from a retreating glacier on Ellesmere Island in the Canadian High Arctic. *Int. J. Syst Evol Microbiol* **69**: 944–948.

Wang, X., Yen, J., Kaiser, P., Huang, L. (2010) Regulation of the 26S proteasome complex during oxidative stress. *Sci Signal* **3**:ra88

Wong, CMVL., Boo, SY., Voo, CLY., Zainuddin, N., Najimudin, N. (2019) A comparative transcriptomic analysis provides insights into the cold-adaptation mechanisms of a psychrophilic yeast, *Glaciozyma antarctica* PI12. *Polar Biol* **42**: 541–553.

Wu, H., Zhang, Z., Hu, S., Yu, J. (2012) On the molecular mechanism of GC content variation among eubacterial genomes. *Biol Direct* **7**: 2.

8. ANEXO

Tabla SI. Reporte de las estadísticas de los resultados del RNA-seq.

Yeast	Sample Name	% Dups	M Seqs
Mgeli	Mgelida_H_R1	79,9	32
	Mgelida_H_R2	81,3	32
	Mgelida_L_R1	79,0	32,1
	Mgelida_L_R2	79,1	32,1
Crysp	Cryptococcus_H_R1	95,0	31,9
	Cryptococcus_H_R2	93,3	31,9
	Cryptococcus_L_R1	95,0	32,1
	Cryptococcus_L_R2	93,3	32,1
Pgla	Pglacialis_H_R1	95,9	31,9
	Pglacialis_H_R2	94,7	31,9
	Pglacialis_L_R1	93,1	32,1
	Pglacialis_L_R2	92,0	32,1
Vvic	Vvictoriae_H_R1	83,7	31,9
	Vvictoriae_H_R2	83,8	31,9
	Vvictoriae_L_R1	82,0	32,2
	Vvictoriae_L_R2	82,1	32,2
Csake	Csake_H_R1	88,7	32,3
	Csake_H_R2	87,5	32,3
	Csake_L_R1	84,5	31,9
	Csake_L_R2	82,7	31,9
Lcrea	Lcreatinivora_H_R1	76,0	31,7
	Lcreatinivora_H_R2	79,1	31,7
	Lcreatinivora_L_R1	78,5	31,9
	Lcreatinivora_L_R2	80,3	31,9
Tetsp	X_A_Tet22_R1	79,9	31,5
	X_A_Tet22_R2	79,3	31,5
	X_B_Tet4_Tet4_R1	77,9	31,4
	X_B_Tet4_Tet4_R2	77,1	31,4
Wanom	Wanomalus_H_R1	89,8	32,3
	Wanomalus_H_R2	87,8	32,3
	Wanomalus_L_R1	86,4	32,1
	Wanomalus_L_R2	84,8	32,1

Tabla SII. Anotación funcional por vías KEGG y número de DEGs obtenidos en cada cepa de levadura.

Vía KEGG			Mgeli		Crysp		Pgla		Vvic		Csake		Lcrea		Tetsp		Wanom		
General	Media	Específica	Up	Down	Up	Down	Up	Down	Up	Down	Up	Down	Up	Down	Up	Down	Up	Down	
Cellular Processes	Transport and catabolism	Autophagy				1	1				1	8					4	3	
		Endocytosis				1	1				1	5	5	3		1	4	6	
		Lysosome										2				2	2		
		Mitophagy									1	1	3			1	1	2	
		Peroxisome				1	1	7			1	1		7	1	4		28	1
		Phagosome					1				1		1	3	2		2	3	
Environmental Information Processing	Membrane transport	ABC transporters										2			1	3	2	1	
	Signal transduction	AMPK signaling pathway					1									2		9	2
		Apelin signaling pathway									2								
		Calcium signaling pathway												1				1	
		cAMP signaling pathway						1					3	1					4
		cGMP-PKG signaling pathway										1		2					2
		FoxO signaling pathway									1	2					1	9	1
		mTOR signaling pathway										1	1	4	1		1	3	3
		Phosphatidylinositol signaling system												1	2				2
		Phospholipase D signaling pathway									1			2	1				3
		Sphingolipid signaling pathway									2	1	2	2				2	2
		Two-component system				2							2	1			7		2
Genetic Information Processing	Folding sorting and degradation	Proteasome				2						18	2	1				10	
		Protein export					1					1	4				1	5	
		Protein processing in endoplasmic reticulum			1					1	1	10	5	2	1	1		20	
		RNA degradation					1	1				3		2			2	5	13
		SNARE interactions in vesicular transport			1	1	1						1	1					4
		Sulfur relay system					1					1						2	3
		Ubiquitin mediated proteolysis				3	3	1	1		1		5	2	1		1	11	2
	Replication and repair	Base excision repair										2		2					6
		DNA replication				1			1			5		3	2	1		1	7
		Homologous recombination										2		1					8
		Mismatch repair				1						2	1	1	1				5
		Non-homologous end-joining										1							1
		Nucleotide excision repair				1	1	1				2	1	4	2			1	10
	Transcription	Basal transcription factors										1	2					2	6
		RNA polymerase					1	3						1			1		2
		Spliceosome			1							7	1	7	2		4	5	12
	Translation	Aminoacyl-tRNA biosynthesis								2		3	2	1			1	1	9
		mRNA surveillance pathway										2	3	1			1		6
		Ribosome				1					7	49		4	4		61	43	17
		Ribosome biogenesis in eukaryotes				2	1				1	10	1	5	2		14	1	6
RNA transport										1	2	2	8	1		3		8	

Tabla SII (continuación). Anotación funcional por vías KEGG y número de DEGs obtenidos en cada cepa de levadura.

Via KEGG		Mgeli		Crysp		Pgl		Vvic		Csake		Lcrea		Tetsp		Wanom				
General	Media	Especifica	Up	Down	Up	Down	Up	Down	Up	Down	Up	Down	Up	Down	Up	Down	Up	Down		
Metabolism	Amino acid metabolism	Alanine aspartate and glutamate metabolism					2		1	1	4		2	4	1	9	8			
		Arginine and proline metabolism			1					3			1	4	3	3	6	3		
		Arginine biosynthesis								1			1	2	3	1	4	4		
		Cysteine and methionine metabolism		1	1	2	1	2	2	4	4	6	1	2	5	8				
		Glycine serine and threonine metabolism				3		2	5	6	8	1	2	2	8	8				
		Histidine metabolism		1	1							2	2		2	3	1			
		Lysine biosynthesis			1	1					2	1	4	1				4		
		Lysine degradation			1	1		1	1		4	2	4				6	3		
		Phenylalanine metabolism									1	1		1	2	1	9	3		
		Phenylalanine tyrosine and tryptophan biosynthesis						1			1		1				4	9		
		Tryptophan metabolism				2	1	1	1				5	2	2	9	4			
		Tyrosine metabolism								1	4	1	1	3	1	10	5			
		Valine leucine and isoleucine biosynthesis									2	3	1	2				1		
		Valine leucine and isoleucine degradation			2			4		1			3	4	7		10	2		
		Biosynthesis of other secondary metabolites	Aflatoxin biosynthesis																	1
			Betalain biosynthesis																	1
			Glucosinolate biosynthesis										1	1	1					
			Isoquinoline alkaloid biosynthesis								1	1		1				4	3	
	Monobactam biosynthesis						1			1			1	1	2					
	Phenylpropanoid biosynthesis						1			1					2					
	Tropane piperidine and pyridine alkaloid biosynthesis										1	1		1			4	3		
	Carbohydrate metabolism		Amino sugar and nucleotide sugar metabolism						2		2	3	5	2	4	1		4	13	
			Ascorbate and aldarate metabolism		1			1				2		1	3			6	1	
			Butanoate metabolism					1			1		3	3		2	1	7	3	
		C5-Branched dibasic acid metabolism											1						1	
		Citrate cycle			1					1				1	2		5	11		
		Fructose and mannose metabolism			3	3					1	1	1	3	2	3	11	3		
		Galactose metabolism			1	3			2		2			3	2		1	1		
		Glycolysis / Gluconeogenesis				3				4	1	1	4	4	1		7	1		
		Glyoxylate and dicarboxylate metabolism			1	3			1	2	1	1	2	2	3		9			
		Inositol phosphate metabolism											1	3			4	1		
		Pentose and glucuronate interconversions			1	1			1		2		1	2	1		7	1		
		Pentose phosphate pathway				1				2			2				8	1		
		Propanoate metabolism			1	1				1	1		2	2			4	9		
		Pyruvate metabolism		2		2	3			2	1	1	5	6	2	2	14	8		
		S starch and sucrose metabolism			1					1		2	1	1	6		3	2		
		Energy metabolism	Carbon fixation pathways			2	1			3	1		2	1	3		9	2		
			Methane metabolism			3	1	2		2	1	1	2	1			1	6	4	
			Nitrogen metabolism		1									2		3	1			
	Oxidative phosphorylation			2					1	10	2	3	6		3	32	2			
	Sulfur metabolism						1		1	3			2	3	1	3			2	

Tabla SII (continuación). Anotación funcional por vías KEGG y número de DEGs obtenidos en cada cepa de levadura.

Via KEGG		Mgeli		Crysp		Pgl		Vvic		Csake		Lcrea		Tetsp		Wanom			
General	Media	Especific		Up	Down	Up	Down	Up	Down	Up	Down	Up	Down	Up	Down	Up	Down		
Metabolism	Global and overview maps	2-Oxocarboxylic acid metabolism				1				2		3	6	7		6	13		
		Biosynthesis of amino acids				1	2	2	3	4	6	10	9	8	5	20	31		
		Biosynthesis of cofactors			1		7	1			4	7	8	14	8	7	26	31	
		Biosynthesis of secondary metabolites	1		3	1	15	6	4	10	10	19	25	28	19	13	67	84	
		Carbon metabolism	2			4	4	2	2	5	1	5	8	6	6	4	23	19	
		Degradation of aromatic compounds											2	1			2	3	
		Fatty acid metabolism			2	1	8		2				2	3	7	2	18	3	
		Global and overview maps											57	58					
		Metabolic pathways	4		6	10	35	7	7	21	34	52			50	38	173	185	
		Microbial metabolism in diverse environments				4	12	2	2	11	2	10	10	17	14	9	35	39	
		Glycan biosynthesis and metabolism	Glycosphingolipid biosynthesis													1			
	Glycosylphosphatidylinositol										5	1	1					12	
	Mannose type O-glycan biosynthesis											2						2	
	N-Glycan biosynthesis									1	4	2	2	1				15	
	O-Antigen nucleotide sugar biosynthesis						1			1			1						
	Other glycan degradation												1						
	Other types of O-glycan biosynthesis										1	4	1		1	1	2		
	Various types of N-glycan biosynthesis										3	1						10	
	Lipid metabolism	alpha-Linolenic acid metabolism			1		3											6	
		Arachidonic acid metabolism										2							
		Biosynthesis of unsaturated fatty acids			1		3						1	1	1	1	9	2	
		Ether lipid metabolism									3	1	1					3	
		Fatty acid biosynthesis				1	3					1	2	5	1	8	1		
		Fatty acid degradation			2		6		2			4	3	4			13		
		Fatty acid elongation					1						1				2	1	
		Glycerolipid metabolism				2	2			2		4	2	6	1		8	2	
		Glycerophospholipid metabolism			1		1			2	1	7	2	3	1	1	6	17	
		Linoleic acid metabolism				1									1				
		Sphingolipid metabolism											1	1	1		1	5	
		Steroid biosynthesis	1					1			1	2				1		6	
		Metabolism of cofactors and vitamins	Biotin metabolism					3							2	3	1	4	
			Folate biosynthesis											1	2		1	3	9
			Lipoic acid metabolism					2							1				2
	Nicotinate and nicotinamide metabolism										1	7				1	6	5	
	One carbon pool by folate						1				1		2	1		1	3	3	
	Pantothenate and CoA biosynthesis						1				1	1	3	4	2		1	6	
	Retinol metabolism					2							1		2		1		
	Riboflavin metabolism											1	2	2		1	6	4	
	Thiamine metabolism										1		1				1	1	
	Ubiquinone and other terpenoid-quinone biosynthesis											1	1	2	2		2	6	
	Vitamin B6 metabolism										1	1					2	1	

Tabla SII (continuación). Anotación funcional por vías KEGG y número de DEGs obtenidos en cada cepa de levadura.

Via KEGG		Mgeli		Crysp		Pgla		Vvic		Csake		Lcrea		Tetsp		Wanom			
		Up	Down	Up	Down	Up	Down	Up	Down	Up	Down	Up	Down	Up	Down	Up	Down		
Metabolism	Metabolism of other amino acids	beta-Alanine metabolism				2		1	2		1	3			5	5			
		Cyanoamino acid metabolism									1			1		1	2		
		D-Arginine and D-ornithine metabolism								1									
		Glutathione metabolism					2		3		2	1	1	1		5	10		
		Phosphonate and phosphinate metabolism									1				1			1	
		Selenocompound metabolism								2	1								
		Taurine and hypotaurine metabolism			1							1	1	1				1	
	Metabolism of terpenoids and polyketides	Insect hormone biosynthesis					1						2	1			1		
		Limonene and pinene degradation					1						2				1		
		Sesquiterpenoid and triterpenoid biosynthesis									1							3	
		Terpenoid backbone biosynthesis									2	2	2					6	
	Nucleotide metabolism	Purine metabolism					1	2		3	3	3	3	1	1	5	4	13	
		Pyrimidine metabolism					3				3	2	2	2		6	4	14	
	Xenobiotics biodegradation and metabolism	Aminobenzoate degradation										2		1	2	2	3	3	
		Benzoate degradation												1					
		Caprolactam degradation												1	1			1	
		Chloroalkane and chloroalkene degradation					1							1	2			3	
		Chlorocyclohexane and chlorobenzene degradation					1												
		Drug metabolism - cytochrome P450					1						2		1	1	2	1	
		Drug metabolismenzymes									1								
		Fluorobenzoate degradation					1												
		Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450			1			3						2				2	1
		Naphthalene degradation												1					2
		Styrene degradation													3	1			3
		Toluene degradation						1							2	1			