

ESPECTRO DE ACTIVIDAD MICOCIDA
DE *Xanthophyllomyces dendrorhous*

Memoria de Título

Entregada a la Universidad de Chile

en cumplimiento parcial de los requisitos para optar

al título de Ingeniero en Biotecnología Molecular

Facultad de Ciencias



Vicente Eloy Oviedo Campos

2008

Director de Tesis: Dr. Marcelo Baeza C.

Co-director de Tesis: Dr. Víctor Cifuentes G.

UCH-FC
Biotecnología
096
C 1

ESCUELA DE PREGRADO - FACULTAD DE CIENCIAS - UNIVERSIDAD DE CHILE



“ESPECTRO DE ACTIVIDAD MICOCIDA
DE *Xanthophyllomyces dendrorhous*”

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en
cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de
Ingeniero en Biotecnología Molecular.

VICENTE ELOY OVIEDO CAMPOS

Dr. Marcelo Baeza Cancino
Director Seminario de Título

Dr. Víctor Cifuentes Guzmán
Co-director Seminario de Título

Comisión de Evaluación Seminario de Título

Dr. Claudia Stange Klein
Presidente Comisión

Dr. Claudio Martínez Fernández
Corrector



Santiago de Chile, Agosto de 2008



Nací en Ñuñoa muy cerca de donde hoy vivo, pero la Clínica Grecia a diferencia mía ya no existe. Como casi todas las cosas, materiales o inmateriales, estas van evolucionando. Yo comencé estudiando en el emblemático Instituto Nacional, viviendo prósperos años de construcción a un futuro universitario, y por sobretodo de grandes amistades. Luego aquí en la Universidad de Chile, he continuado la senda del estudio y cosechando amistades que uno espera continúen por largos años. Y ahora en la etapa final de este ciclo de formación académica hacia el ámbito profesional me veo un poco más maduro: conservando lo mejor del pasado, pero aun mejorando los aspectos perfectibles; evolucionando, así como le sucedió a la fachada de esa clínica que me vio nacer.

“Those were the days of our lives”
F. B. B.



A mi madre



AGRADECIMIENTOS

Quisiera en primer lugar agradecer a mi tutor, Dr. Marcelo Baeza, por su paciencia y trabajar junto a mi muchas veces en el mesón mismo. Por enseñarme desde su óptica el rigor científico. De esta misma forma agradezco los consejos del Dr. Víctor Cifuentes, y a todos en el Laboratorio de Genética por su apoyo y grata convivencia: a Dony, Salvador, Mauricio, Andrés, Pilar, Iris, Aniela, Jenny, Carla, y a mis compañeros más cercanos: Oriana, Natalia y Mario, ellos por sobretodo conocen no solo la dificultades puntuales de nuestro trabajo diario en el laboratorio, sino que además la empatía en el compartir científico nos ha permitido desarrollar lazos de amistad.

Como corresponde protocolarmente también agradezco el financiamiento de los proyectos FONDECYT adjudicados por los docentes del laboratorio, ellos constituyen parte de las herramientas para lograr los objetivos que uno pretende al sentarse a trabajar en el mesón.

Además quiero dar espacio en estas palabras a mis amigos, muchos de ellos los he conocido en el transcurso de los años universitarios a Mauricio, Andrés, Néstor, Felipe y Salvador ("washalines todos"), también a todos aquellos cuyos nombres no son desmerecidos por faltar en este documento, entre ellos mis compañeros de cursos y otros quienes fui conociendo en estos últimos años.

Finalmente agradezco a mi familia, que la constituye mi madre, Marta. Gracias a ella y nuestro amor, esfuerzo y sacrificio, estoy en las circunstancias finales de mi carrera profesional. A mis familiares, también les estoy agradecido, pues es en el núcleo familiar donde se manifiestan los aspectos emotivos que nos constituyen como personas y eventualmente como estudiantes, científicos o ingenieros. Dentro de este mismo ámbito doy gracias a Paula por la felicidad emocional que hemos compartido recientemente.

Gracias.



INDICE GENERAL

Índice General.....	v
Índice de Figuras	vii
Índice de Tablas.....	viii
Abreviaturas.....	ix
Resumen.....	x
Abstract.....	xii
Introducción.....	1
1. Micocinogenia en Levaduras.....	1
1.1 Incidencia y Rol Ecológico.....	2
1.2 Mecanismos de Acción.....	3
2. Bases Genéticas.....	6
2.1 Virus de dsRNA.....	6



3. Replicación Viral.....	7
3.1 Proteínas Virales Estructurales.....	7
3.2 Micotoxinas Virales.....	10
4. VLPs en <i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i>	12
Hipótesis.....	14
Objetivos.....	14
Materiales & Métodos.....	15
Resultados.....	19
Discusión.....	33
Conclusiones.....	35
Bibliografía.....	36



INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Corrimiento del marco de lectura en -1 durante la traducción de Gag-Pol.....	9
Figura 2. Modelo de secreción de las micotoxinas diméricas de <i>S. cerevisiae</i>	11
Figura 3. Actividad micocida de la cepa UCD 67-385 sobre otras levaduras.....	21
Figura 4. Efecto de la concentración de NaCl en la actividad micocida de <i>X. dendrorhous</i>	28
Figura 5. Actividad micocida de los extractos proteicos de <i>X. dendrorhous</i>	31
Figura 6. Curva de crecimiento de <i>X. dendrorhous</i> 67-385 / SDS-PAGE.....	32

INDICE DE TABLAS



Tabla 1. Cepas de levaduras utilizadas.....	16
Tabla 2. Actividad micocida de cepas de <i>X. dendrorhous</i> sobre <i>R .sloffiae</i>	22
Tabla 3. Actividad micocida de cepas de <i>X. dendrorhous</i> sobre <i>R minuta</i>	23
Tabla 4. Actividad micocida de cepas de <i>X. dendrorhous</i> sobre <i>R. mucilaginoso</i>	24
Tabla 5. Actividad micocida de de cepas de <i>X. dendrorhous</i> sobre <i>K. apiculata</i>	25
Tabla 6. Actividad micocida de de cepas de <i>X. dendrorhous</i> sobre <i>B. albus</i>	26
Tabla 7. Efecto de la concentración de NaCl en la actividad micocida de <i>X. dendrorohous</i>	29

ABREVIATURAS

CML	corrimiento del marco de lectura
dsRNA	ácido ribonucleico de doble hebra
EGE	elemento genético extracromosómico
HEPES	ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina-etano-sulfónico
IRES	segmento interno para iniciación de la traducción
ORF	marco abierto de lectura
PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida
RE	retículo endoplasmático
RPDR	RNA polimesara dependiente de RNA
ScV	virus de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	dodecil sulfato de sodio
ssRNA	RNA de hebra simple
Tris	tris-hidroximetil-aminometano
VLP	partícula tipo virus

RESUMEN

La micocinogenia es una característica encontrada en una amplia variedad de levaduras aisladas en ambientes naturales. Corresponde al proceso de producción y liberación de una toxina de naturaleza proteica que mata a otras levaduras, otorgando de esta manera una ventaja en la competencia por la colonización o establecimiento en dichos hábitats. Inicialmente fue descrita en ciertas cepas de *Saccharomyces cerevisiae* aisladas desde fermentaciones vínicas, y hoy en día el fenómeno se ha descrito en muchos géneros de levaduras. Las bases genéticas para la producción de toxinas varían en su localización, pudiendo estas ~~estar~~ estar en el cromosoma celular o en elementos genéticos extracromosómicos (EGEs). Dentro de estos últimos las moléculas de RNA de doble hebra (dsRNA) contenidas en partículas tipo virus (VLPs) son las más comúnmente encontradas en levaduras y hongos filamentosos, tal es el caso del sistema viral de *S. cerevisiae*, que generó las bases para los estudios de virología en levaduras. En varias cepas de la levadura *Xanthophyllomyces dendrorhous* se ha descrito la presencia de moléculas dsRNAs en VLPs, pero aun se desconocen a nivel nucleotídico y su función en el huésped.

En el presente trabajo se definieron las condiciones en que varias cepas de *X. dendrorhous* presentan un fenotipo micocida sobre levaduras del género *Rhodotorula*, *Bulleromyces* y *Kloeckera*. Dicha actividad micocida sobre *Rhodotorula* es mayor a un pH ácido cercano a 4,6 y en un rango de temperatura de 10 a 22°C; mientras que para las levaduras *Kloeckera apiculata* y *Bulleromyces albus* se observó una actividad más reducida. La actividad se vio aumentada cuando se elevó la concentración salina a un

3% p/v. Además, se determinó que esta actividad se debe a un factor exportado, que podría corresponder a proteínas de 18-16 kDa.

ABSTRACT

Micocinogeny is a characteristic found in a wide variety of yeasts isolated from natural environments. It corresponds to the production of a proteinaceous toxin that kills other yeasts, obtaining in this way an advantage in the competition for nutrient and space. Initially it was described in strains of *Saccharomyces cerevisiae* isolated from wine fermentations. Currently this phenomenon has been described in several yeasts genus. The genetic bases for toxins production can be locate in the cellular chromosome or in extrachromosomal genetic elements (EGEs). Among these last ones, double stranded RNA molecules (dsRNA) encapsidated in virus like particles (VLPs) are the most commonly found in filamentous fungi and yeasts. This is the case of the most studied viral system present in *S. cerevisiae*, which generated the bases for the study of yeasts virology. The presence of dsRNA-VLPs has been described in several strains of the yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous*, but both their nucleotide indentity and function in the host are unknown.

In the present work, the conditions in which several *X. dendrorhous* strains showed a micocide phenotype on yeasts of genus *Rhodotorula*, *Bulleromyces* and *Kloeckera* were determined. The micocide activity against *Rhodotorula* is higher at low pH (around 4,6) and in a temperature range from 10 to 22°C; while for *Kloeckera apiculata* and *Bulleromyces albus* the micocide activity was lower. An increase in activity was observed when the assay-medium was supplemented with 3 % w/v NaCl.. Also it was determined that this activity is caused by exported factors, which could be proteins of 18 and/or 16 kDa.

INTRODUCCIÓN

Se conoce como micocinogenia a la capacidad que poseen algunas levaduras para matar a otras por medio de la síntesis de toxinas de naturaleza proteica o glicoproteica. Las bases genéticas para la síntesis de estas toxinas son diversas, siendo la más común los RNA de doble hebra (dsRNA) encapsidados en partículas tipo virus (VLPs). En muchas cepas de la levadura carotenogénica *Xanthophyllomyces dendrorhous*, de alto interés biotecnológico para la producción del pigmento astaxantina, se ha reportado la existencia de dsRNAs. Sin embargo, su identidad y función aun se desconocen.

El presente trabajo se centró en la búsqueda tanto de la levadura blanco como de las condiciones en que cepas de *X. dendrorhous* presentan actividad micocida. Todas estas variables fueron evaluadas teniendo en cuenta el hábitat natural de *X. dendrorhous*.

1 Micocinogenia en Levaduras.

En su descubrimiento en la década de los sesenta el fenotipo micocinogénico se asoció a cepas de *Saccharomyces cerevisiae* capaces de producir una toxina (proteína o glicoproteína) que actúa en un ámbito reducido matando solo a levaduras emparentadas (Makower y Bevan, 1963). Durante las décadas siguientes se ha reportado la presencia de micotoxinas en una amplia variedad de levaduras abarcando los géneros *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Hanseniaspora*, *Hansenula*, *Pichia*, *Kluyveromyces*, *Metschnikowia*, *Kloeckera*, *Ustilago*, *Torulopsis*, *Williopsis* y *Zygosaccharomyces* (Schmitt y Breining, 2002).

Junto a estos descubrimientos se produjo una reevaluación del fenómeno micocinogénico con lo cual se determinó que algunas micotoxinas descritas previamente no sólo mataban a levaduras emparentadas sino que poseen actividad sobre levaduras no emparentadas, pertenecientes a otros géneros antes no estudiados (Polonelli y Morace, 1986). Algunas de estas micotoxinas, como las producidas por cepas de *Pichia anomala* que inicialmente se describieron como tóxicas para cepas de *Candida* (Sawant y cols., 1989), actualmente se utilizan para controlar además, infecciones provocadas por bacterias (Conti y cols., 1998).

1.1 Incidencia y Rol Ecológico.

Las levaduras micocinogénicas se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza, y han sido aisladas principalmente desde ambientes ricos en nutrientes, como exudados de savia de algunos árboles (Weber, 2006), frutos en putrefacción (Morais y cols., 1995) y fermentaciones alcohólicas en general (Petering, 1991; Vagnoli, 1993).

La disponibilidad de nutrientes parece ser el factor determinante para que surja la competencia por interferencia entre levaduras. Entre ellas las cepas micocinogénicas son las más aventajadas, pudiendo excluir a otras o determinar en cierto grado que levaduras prevalecen en el hábitat (Wolch-Salamon y cols, 2008).

En este sentido a un nivel ecológico las levaduras micocinogénicas actúan como un agente regulador de la biodiversidad natural de un hábitat. Esto se explica por la existencia de interacciones entre células sensibles, resistentes y micocinogénicas, que además de producir una toxina, son inmunes a la misma. En estas interacciones un

equilibrio dinámico mantiene el nivel de todas las células que compiten por un mismo sustrato. En este modelo de interacción, las células micocidas matan a las sensibles pero no a las resistentes, mientras que estas últimas aventajan a las células micocidas pero no a las sensibles, pues la inmunidad a las toxinas representa una inversión energética mayor respecto de las células que no la poseen (Lenski y Riley, 2002).

1.2 Mecanismos de Acción.

Las micotoxinas descritas hasta hoy se agrupan principalmente en dos tipos según el mecanismo que utilizan para matar a una célula sensible. El primer grupo corresponde a micotoxinas que forman canales en la membrana plasmática afectando el flujo de iones normal de la célula. Mientras el segundo grupo ataca directamente a nivel nuclear, arrojando a la célula en su ciclo replicativo (Schmitt y Breining, 2006). Además, las toxinas se circunscriben en un modelo de acción de dos etapas, donde en primer lugar se unen rápidamente a un receptor primario en la pared celular de la célula blanco, que para el caso de la toxina K28 de *S. cerevisiae* es el β -1,6-glucano, mientras para las toxinas K1 y K2 es la α -1,3-manoproteína. Este paso es rápido y no requiere energía. La segunda etapa requiere energía y corresponde a una unión más lenta que involucra el reconocimiento de un receptor en la membrana plasmática. En el caso de las toxinas ionóforas K1 y K2 de *S. cerevisiae* estas se insertan en la membrana, mientras que la toxina K28 de la misma levadura penetra hacia el interior de la célula sensible, llegando al núcleo celular, donde ejerce su efecto tóxico (Schmitt y Breining, 2002).

Existen toxinas de interés biotecnológico pues resisten altas temperaturas sin afectar su actividad, como la toxina de *Kluyveromyces lactis* (Stark y Boyd, 1986). Algunas de estas pueden usarse como biopreservantes o como control biológico de levaduras contaminantes en fermentaciones del vino (Ciani y Fatichenti, 2001).

La actividad de las micotoxinas es afectada por las variables extracelulares inmediatas a su liberación. Entre las más estudiadas están la temperatura, el pH y la salinidad. Por ejemplo, cepas aisladas de salmueras de aceitunas verdes que en condiciones de baja salinidad no muestran un fenotipo micocida, sí son tóxicas a altas concentraciones de sales (Llorente y cols., 1997). El fenómeno de halotolerancia en micotoxinas ha sido estudiado para un grupo mayor de levaduras distintas observándose dos niveles principales de tolerancia: un grupo que aumenta su actividad con mayores concentraciones salinas y otro que no aumenta su actividad al variar las condiciones salinas (Aguar y Lucas, 2000).

La temperatura y el pH son parámetros que también determinan la observación del fenotipo micocinogénico, pues afectan la estabilidad de las toxinas. Si estas condiciones no son las adecuadas, no se observa la actividad de la micotoxina. Se han descrito rangos de acción para las diversas toxinas conocidas, aunque estos suelen ser característicos para cada toxina en particular. La micotoxina de *P. membranificiens* tiene su óptimo de actividad a pH 4 y es activa hasta los 20°C (Santos y Marquina, 2004); la de *Cryptococcus aquaticus* bordea el pH 4,5 (Pfeiffer y cols., 2004) y la micotoxina de *S. occidentalis* presenta la mayor actividad micocida en el rango de pH 4,2 a 4,8 (Chen y cols., 2000). Por otra parte, todos estos rangos de pH son reducidos comparados con la micotoxina producida por *Williopsis mrakii*, la cual es estable entre los valores de pH 2 a

11, y además, la toxina permanece estable por 3 minutos a 100°C antes de inactivarse (Ashida y cols., 1983).

Además, en situaciones de estudio experimentales, otros parámetros de crecimiento del cultivo de una cepa micocinogénica son importantes. La constitución del medio de cultivo, presencia de detergentes que remueven elementos desde la pared de la célula; la velocidad de la agitación del matraz que contiene el cultivo, que incide en la estabilidad de la toxina liberada; son aspectos claves cuando se pretende optimizar la producción de una micotoxina en el laboratorio (Santos de la Sen, 1999).

2 Bases Genéticas.

La localización de los genes codificantes para las micotoxinas es variable entre las distintas levaduras pudiendo localizarse tanto en el cromosoma como en elementos genéticos extracromosómicos (EGEs). En las levaduras *Pichia farinosa* y *Williopsis mrakii* los genes para la síntesis de sus toxinas, SMK1 y HMK (0,85 kpb) respectivamente, se ubican en el cromosoma (Ashida, 1983; Hodgson, 1995). *Kluyveromyces lactis* y *Pichia acaciae* poseen plásmidos lineales de dsDNA con los ORF codificantes de sus micotoxinas. El plásmido pGKL1 (8,8-13,4 kbp) de *K. lactis* contiene un ORF que codifica para una toxina trimérica de gran tamaño (157 kDa) (Gunge y cols., 1981).

En levaduras como *Saccharomyces cerevisiae*, *Hanseniaspora uvarum*, *Ustilago maydis* y *Zygosaccharomyces bailli* los ORF codificantes se encuentran en moléculas de

RNA de doble hebra (dsRNA) encapsidadas en VLPs. *U. maydis* posee tres ORF virales (P1, P4 y P6) asociados a las síntesis de toxinas distintas (Koltin y cols., 1976).

2.1 Virus de dsRNA.

Se describieron por primera vez en *Saccharomyces cerevisiae* y corresponde al sistema viral de levaduras mejor caracterizado (Wickner, 1996). Los virus de *S. cerevisiae*, pertenecientes a la familia *Totiviridae*, género *Totivirus*, actualmente están descritos en muchas otras levaduras y hongos filamentosos, y son denominados partículas tipo virus (VLPs), pues no poseen un ciclo infeccioso extracelular y no provocan la muerte de la levadura que los posee. Las VLPs son partículas de alrededor de 40 nm de diámetro constituidas por 60 dímeros de la proteína Gag y dos proteínas Gag-Pol. En su interior se ubica el material genético de dsRNA. Según el tamaño del material genético los virus se dividen en ScV-L (de *S. cerevisiae* Virus-Large) de 4,6 kb; y ScV-M (de *S. cerevisiae* Virus-Medium) de 1,7 kb. Las moléculas dsRNA-L codifican para la proteína estructural Gag (de la cápside) y para una RNA polimerasa dependiente de RNA (RPDR). Esta última se produce como una proteína de fusión (Gag-Pol) por un corrimiento -1 del ORF durante la traducción (Herr y cols., 2000). La molécula dsRNA-M sólo contiene un ORF codificante para una toxina. En el sistema viral de *S. cerevisiae* se han identificado al menos 3 toxinas (K1, K2 y K28) codificadas por dsRNA-M distintos (M1, M2 y M28 respectivamente). Estas toxinas se han clasificado por sus distintos mecanismos de acción e inmunidad cruzada. Este criterio de inmunidad

cruzada ha sido utilizado en algunos casos con valor taxonómico para identificar entre un gran número de cepas sensibles de *Candida albicans* (Polonelli y cols., 1983).

3 Replicación Viral.

La replicación es de tipo conservativa pues ambas hebras del dsRNA permanecen unidas en la partícula mientras se sintetiza una hebra simple ssRNA (+) que sale del virión hacia el citoplasma. La hebra ssRNA (+) puede tener dos destinos; su encapsidación en una nueva VLP, o su traducción a proteínas virales (Wickner, 1996).

La síntesis de las proteínas virales utiliza la maquinaria traduccional de la levadura, sin embargo, carecen de estructuras propias de los mRNA eucariontes como lo son el 5'-Cap y el 3'-Poli(A). Esto genera una dificultad en el proceso de iniciación traduccional y ubicación de los ribosomas en el ssRNA (+) viral, la cual podría resolverse por la presencia de secuencias internas para la entrada de los ribosomas (IRES), similares a las descritas en retrovirus que parasitan a otras células eucariontes (Balvay y cols., 2007).

3.1 Proteínas Virales Estructurales.

La información para el proceso fundamental de la permanencia del sistema viral, se encuentra en el propio genoma de ScV-L. Dentro de la secuencia del dsRNA-L existen 2 ORF sobrepuestos en 130 nucleótidos, el 5'-ORF que codifica para la proteína de la cápside Gag y el 3'-ORF que codifica para la RNA polimerasa viral. Durante la

traducción 1 de cada 50 veces el ribosoma no termina el proceso en el codón de término correspondiente a Gag, sino que continúa sintetizando la proteína de fusión Gag-Pol. Este corrimiento en el marco de lectura está determinado por estructuras presentes en la (+) ssRNA. Una estructura tipo "loop" impide el avance del ribosoma, el que pasa por una secuencia denominada sitio resbaladizo. Cuando esto ocurre el ribosoma retrocede generando un corrimiento en el marco de lectura hacia atrás en 1 nucleótido (CML -1). De esta forma el ribosoma no se ubica sobre el codón de término del ORF-Gag y sí el codón de inicio del ORF-Pol, como se ilustra en la figura 1.

La baja frecuencia de este evento determina una estequiometría entre proteínas Gag y Gag-Pol en el citoplasma. Se traducen más Gag para encapsidar tanto a los ScV-L como a los ScV-M, y un bajo nivel de Gag-Pol para mantener el ciclo replicativo de estos virus, lo que permite el uso de la maquinaria de la célula huésped sin colapsar las funciones propias de la levadura. La dependencia de los genomas virales dsRNA-M de los productos génicos de dsRNA-L configura un sistema donde la partícula ScV-M parasita a ScV-L (Bostian y cols., 1980). Por esto es que dsRNA-L es llamado virus "helper" y ScV-M virus satélite.

Además, genes propios de la levadura huésped (*ski* y *mak*) participan de la regulación de la propagación de las VLPs, y por ende afectan al fenotipo micocinogénico. Estos genes codifican para subunidades ribosómicas o enzimas involucradas en la síntesis de las mismas. Luego, mutaciones en estos genes impiden la replicación viral o todo lo contrario, acentúan el fenotipo micocinogénico, observándose un carácter "super killer" (Ohtake y Wickner, 1995).

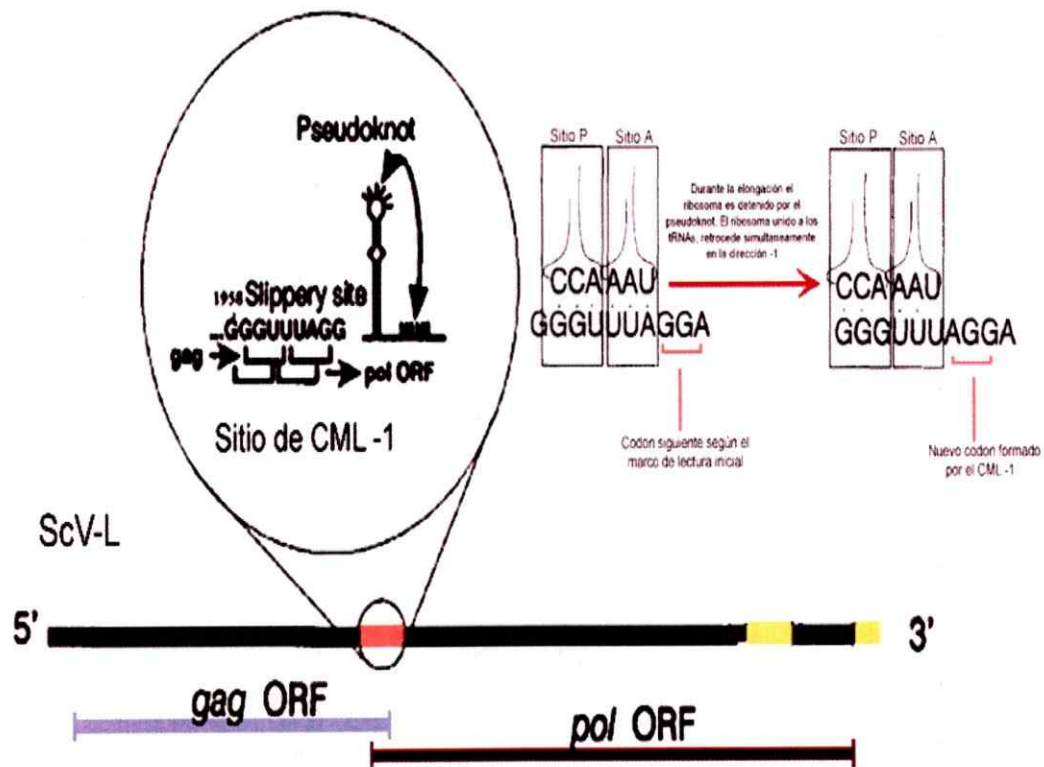


Figura 1. Corrimiento del marco de lectura en -1 durante la traducción de Gag-Pol. Los ORFs de Gag y Pol están sobrepuestos en 130 nucleótidos, en el que se encuentra un sitio "resbaladizo" que permite el retroceso del ribosoma en una base durante la traducción. Este resulta en la síntesis de la proteína de fusión Gag-Pol. (Adaptado de Dinman, 1995 y Wickner, 1996).

3.2 Micotoxinas Virales.

Las micotoxinas codificadas en dsRNA-M se traducen como preprotoxinas y sufren una serie de modificaciones postraduccionales hasta madurar en una toxina activa que es exportada. Este proceso es similar a la maduración de la insulina en organismos superiores. Se lleva a cabo utilizando la maquinaria de exportación celular desde el Retículo Endoplasmático (RE) al Golgi y vesículas secretoras, como se muestra la figura 2.

La maduración comienza por el reconocimiento de una señal hidrofóbica HDEL_R en el RE. Esta señal más la asistencia de las chaperonas Ssa1-Ssa4p citoplasmáticas permiten la entrada al lumen del RE a través del complejo de poro Sec61p. En el RE la preprotoxina es modificada y llevada a protoxina por una peptidasa que remueve la región amino terminal. Luego la protoxina sufre plegamientos por chaperonas del tipo Hsp70 (Kar2p, Cne1p). La zona gamma intermedia entre las secuencias alfa y beta es glicosilada y se forma un puente disulfuro entre las zonas extremas alfa/beta por la actividad de la disulfuro isomerasa Pdi1p. En el Golgi tardío las endopeptidasas Kex2p y Kex1p remueven la zona gamma y protoxina; y los aminoácidos carboxilo y amino terminal, respectivamente. Luego la toxina madura es secretada sin el residuo arginina del extremo carboxilo a través de una vesícula secretoria (Schmitt y Breining, 2006).

En general los tamaños de las micotoxinas maduras son pequeños. *U. maydis* sintetiza 3 toxinas de 11 (monomérica), 17 y 19 kDa (diméricas). Mientras que las 3

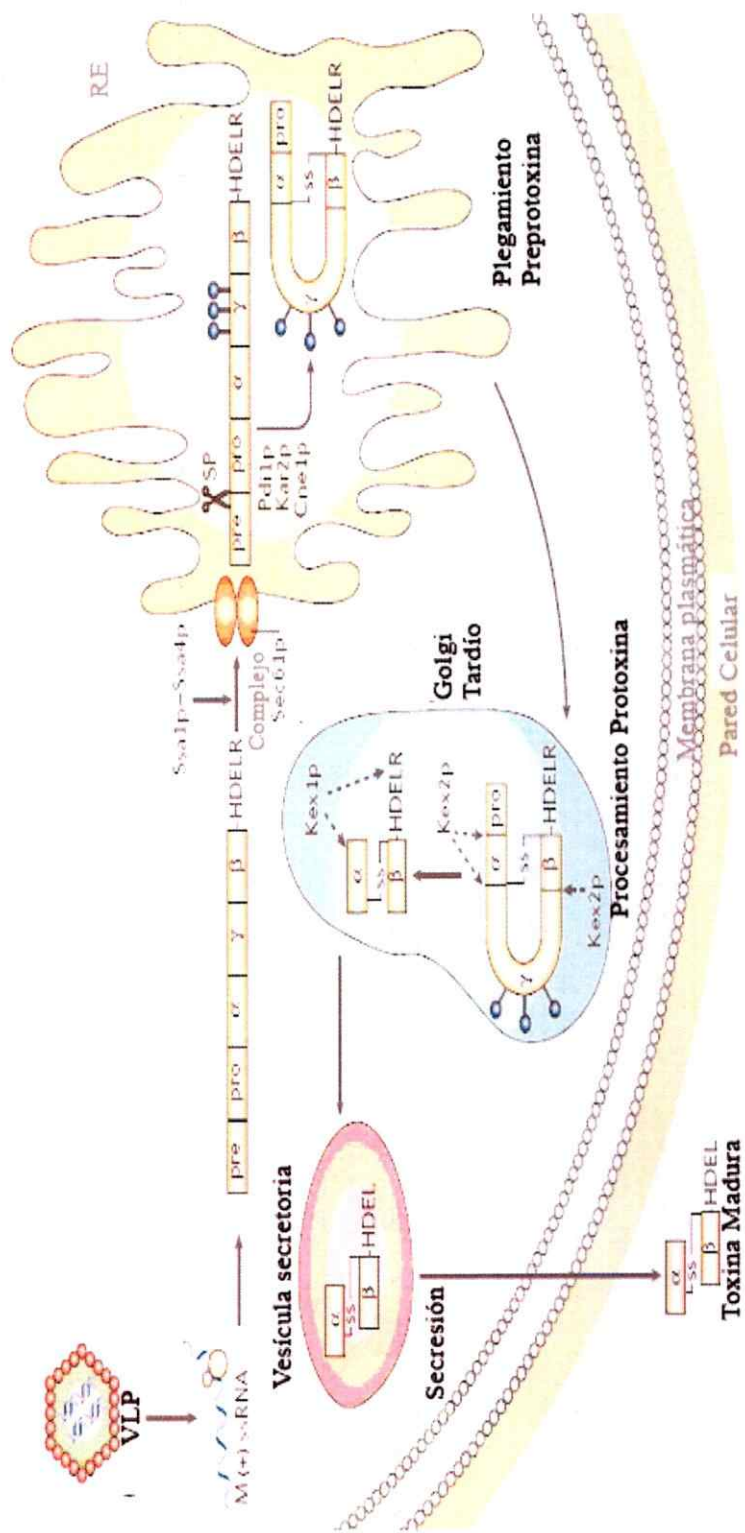


Figura 2. Modelo de secreción de las toxinas diméricas de *S. cerevisiae*. Se muestra el proceso de maduración desde preprotoxina traducida desde una ScV-M hasta su liberación como toxina madura al medio extracelular. Tomado de Schmitt y Breining, 2006.

toxinas descritas en *S. cerevisiae* son todas diméricas y poseen tamaños de 18 (K1) y 21,5 (K2 y K28). Micotoxinas triméricas como las de *K. lactis* y *P. acaeciae* tienen tamaños mucho mayores que alcanzan los 156,5 y 190 kDa, respectivamente. Por otra parte la toxina monomérica secretada por *W. mrakii* (cepa K-500) es la más pequeña con 1,8-5 kDa de tamaño (Magliani y cols, 1997).

4 VLPs en *Xanthophyllomyces dendrorhous*.

La levadura basidiomicete *Xanthophyllomyces dendrorhous* (antes *Phaffia rodoyima*) es utilizada por la industria para la obtención de un pigmento de alto valor comercial, la astaxantina, que se incluye en la dieta de salmones y le atribuye su coloración típica (Libkindaz y cols, 2007). Muchas cepas de esta levadura portan VLPs, y su contenido de moléculas de dsRNA varía en número y tamaño (Castillo, 1994; Pfeiffer, 1996). Sin embargo, este sistema viral no ha sido identificado a nivel nucleotídico ni tampoco se ha asociado a algún fenotipo en el hospedero. Estudios previos han sido infructuosos en encontrar algún fenotipo atribuible a la presencia de dsRNA. Se estudió el efecto del dsRNA en la esporulación en la fase sexual de reproducción de la levadura. Los dsRNA transferidos a cepas que no los poseen naturalmente, no generaron ningún efecto en la velocidad de crecimiento de la levadura, pero sí afectaron el número de células que llegan a fase estacionaria del crecimiento. Estos resultados son poco concluyentes y conllevan al estudio de algún otro fenotipo asociable a la presencia de los dsRNA (Pfeiffer cols., 2001).

X. dendrorhous coloniza los exudados de savia de árboles, principalmente de los géneros *Alnus*, *Betula* y *Fagus*, distribuidos en regiones frías como Rusia, Japón o Argentina-Chile (Phaff, 1987; Libkind, 2007). Este nicho se caracteriza por ser rico para el desarrollo de comunidades complejas de levaduras pues tienen un alto contenido de monosacáridos. En estos exudados de árboles se generan sucesiones de distintos tipos de levadura, donde *X. dendrorhous* comparte con levaduras de géneros como *Bullera*, *Pichia*, *Candida*, *Trichosporon*, *Cryptococcus*, *Cystofiobasidium*, *Rhodotorula* entre otros. Hacia el final del período de colonización se ha observado que solo de *X. dendrorhous* y *Trichosporon pulullans* predominan en este nicho (Weber, 2006). Teniendo en cuenta estos antecedentes en el presente trabajo se evaluó la actividad micocida de *X. dendrorhous* sobre levaduras pertenecientes a los géneros con los que conviven, variando los parámetros que principalmente afectan la observación de una actividad micocida.

HIPOTESIS

Cepas de *X. dendrorhous* presentan actividad micocida, a través de la liberación de una toxina.

OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar y caracterizar la posible actividad micocida de cepas de *X. dendrorhous*

Objetivos específicos

- Determinar una célula blanco para la actividad micocida de *X. dendrorhous* bajo distintos parámetros (temperatura, pH, fuerza iónica)
- Determinar en que fase del crecimiento de la cepa UCD 67-385 se produce y secreta la mayor cantidad de micotoxina (cinética de producción).

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Reactivos Químicos.

Los componentes de los medios de cultivo o reactivos químicos puntuales, fueron adquiridos de Sigma Chemical, Merck Química o Difco Laboratories.

Metodología

Cepas y condiciones de cultivo.

Las cepas de levaduras utilizadas se detallan en la tabla 1. Las levaduras se crecieron rutinariamente en medio YM (0,3 % extracto de levadura, 0,3 % extracto de malta y 0,5 % peptona) suplementado con glucosa (1-2% p/v). Las cepas se mantuvieron en placas YM con agar al 1,5% p/v (oxid) a una temperatura de 4°C, y fueron subcultivadas periódicamente.

Determinación de la actividad micocida.

Basado en el método de Salek y cols. (1990), este ensayo se llevó a cabo en placas de Petri sobre un césped de la levadura sensible. En estos ensayos una actividad micocida positiva se observa como un halo azul alrededor de la cepa sembrada.

Tabla 1. Cepas de levaduras utilizadas.

Cepa	Origen
<i>X. dendrorhous</i> UCD 67-385	<i>Betula taushii</i> , Japón
<i>X. dendrorhous</i> UCD 67-210	<i>Fagus crenata</i> , Japón
<i>X. dendrorhous</i> UCD 67-383	Japón
<i>X. dendrorhous</i> CBS 5908	<i>Alnus japonica</i> , Japón
<i>X. dendrorhous</i> CBS 6938	<i>Betula sp.</i> , Finlandia
<i>X. dendrorhous</i> VKM Y-2059	<i>Betula verrucosa</i> , Rusia
<i>X. dendrorhous</i> VKM Y-2266	<i>Betula verrucosa</i> , Rusia
<i>X. dendrorhous</i> VKM Y-2786	<i>Betula verrucosa</i> , Rusia
<i>Rhodotorula sloffiae</i> CBS 7035	Finlandia
<i>Rhodotorula minuta</i> CBS 319	Atmósfera, Japón
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	Hojas secas, Canadá
<i>Kloeckera apiculata</i>	Colección de laboratorio
<i>Kluyveromyces lactis</i>	Colección de laboratorio
<i>Bulleromyces albus</i> CBS 500	Paja oxidada, <i>Hordeum jubatum</i>
<i>Pichia anomala</i> 677	Aislado de piñas, Hawaii
<i>Candida albicans</i> 1001	ATCC 64385
<i>Candida albicans</i> 5314	Colección de laboratorio

Banco de colecciones: UCD, University of California Davis; CBS, Central Bureau of Fungal Cultures; VKM, All-Russian Collection of Microorganisms

- Preparación de césped.

A un matraz con 30 ml de medio YM 1,5% agar a 40°C se adicionó 300 ul de azul de metileno (0,3 % p/v) y 3 a 5 ml de cultivo de una levadura candidata. Se mezcló suavemente para homogenizar y se vertió la mezcla en una placa de Petri. La placa se incubó a temperatura ambiente para su gelificación.

- Variables analizadas.

Para estudiar el efecto del pH en la actividad micocida, el medio YM 1,5% agar fue preparado con una mezcla de buffer citrato-fosfato. De esta forma se ajustó el pH del medio de 4,2 a 5,4. Por otra parte, el efecto salino en la actividad en placa se estudió en el rango de concentraciones de 0 a 6% p/v de NaCl en los medios YM.

Las placas con césped fueron posteriormente sembradas con cada una de las cepas de *X. dendrorhous*. Luego los céspedes ya sembrados fueron incubados a 10°, 15° y 22°C, por 7-9 días.

Purificación de proteínas extracelulares.

Se creció la cepa UCD 67-385 de *X. dendrorhous* por una semana en medio líquido YM (volumen inicial de 500-600 ml). Cada 24 horas se centrifugó una alícuota de 50 ml de cultivo a 7000 g por 10 min, el sobrenadante se filtró por filtros PVDF de diámetro de poro 0,45 µm (Millipore) para descartar las células remanentes. Se adicionó

etanol absoluto a una concentración final de 70% v/v y se incubó a 4°C por 100 min. Finalmente se centrifugó a 14000 g por 40 min y el precipitado proteico se disolvió en buffer citrato-fosfato pH 4,6. Los precipitados obtenidos se diluyeron en un mayor volumen de buffer (0,5-2 ml) a medida que aumentaba el número de células (determinado indirectamente por densidad óptica).

Electroforesis en geles de poliacrilamida PAGE-SDS.

La electroforesis de proteínas se realizó en condiciones denaturantes por presencia de SDS (dodecil-sulfato de sodio) en "Precise Protein Gels" (Pierce) al 12% de acrilamida.

Las muestras se disolvieron en una solución de carga (0,25 M Tris-HCl; pH 6,8; 0,1 % glicerol; 0,001 % azul de bromofenol; 2 % SDS; 0,08 % β -mercaptoetanol) y se incubaron a 100°C por 5 min. La electroforesis se llevó acabo a 100 V (voltaje constante) en un amortiguador de corrida (23,8 g de HEPES; 1 g de SDS; 12,1 g de Tris por l). El gel se tiñó con una solución de azul de Coomasie (0,25%; 45% metanol; 10% ácido acético) por 30 min en agitación. Luego el gel se destiñó con una solución metanol: ácido acético: agua destilada (3:1:7).

Para determinar el tamaño molecular de las bandas de utilizó un patrón Sigma Protein Low Marker que contiene un rango de 6,5 KDa y 66 KDa. Mediante curvas de calibración que relacionan logaritmo del Rf de cada banda en el gel y su masa molecular, se interpoló el tamaño de las proteínas.

RESULTADOS

Determinación del fenotipo micocinogénico en *X. dendrorhous*.

Como ya se mencionó, existen muchos factores que influyen en la actividad micocinogénica y de los cuales dependerá si el fenotipo se puede reproducir en el laboratorio. Quizás lo más importante es utilizar la célula blanco apropiada. Previamente se hicieron ensayos sobre cepas de *S. cerevisiae* universalmente utilizadas para estos fines, pero los resultados fueron contradictorios y poco claros (Castillo, 1994; Pfeiffer, 1996).

En resultados previos de nuestro laboratorio se observó que cepas de *X. dendrorhous* no presentan actividad contra otras cepas de *X. dendrorhous*. Por lo tanto, un primer paso para la determinación de la existencia de un fenotipo micocinogénico en *X. dendrorhous* es encontrar la célula blanco adecuada.

Búsqueda de levaduras que sean blanco para *X. dendrorhous*.

A pesar de lo disperso del fenómeno micocinogénico, la importancia ecológica y evolutiva de la producción de toxinas no es bien entendida. La hipótesis más aceptada es que levaduras producen la toxina para matar a otras con las cuales comparte el mismo nicho ecológico, para de esta forma tener mayor acceso a nutrientes y espacio (Wolch-Salamon y cols., 2008). Por lo tanto, la búsqueda de la célula blanco se debe realizar entre aquellos que colonizan los exudados de árboles junto a *X. dendrorhous*.

Determinación de la actividad micocida.

Los ensayos se realizaron sembrando cepas de *X. dendrorhous* sobre césped confeccionados con levaduras pertenecientes a los géneros *Pichia*, *Candida*, *Bulleromyces*, *Rhodotorula*, *Kluyveromyces* y *Kloeckera*. En este tipo de ensayos la actividad se observa como un halo de precipitado de azul de metileno alrededor de la colonia sembrada (halo de muerte, ver figura 3).

Los ensayos se llevaron a cabo en rango de pH de 4,2 a 5,4, y a 10, 15 y 22° C. Estas temperaturas abarcan el rango observado en las localidades de aislamiento. De todos los ensayos realizados solo se observó actividad de algunas cepas de *X. dendrorhous* sobre levaduras de los géneros *Rhodotorula* y *Kloeckera*.

En la tabla 2 se resume los resultados obtenidos en los ensayos de actividad sobre *Rhodotorula sloffiae*. Como se observa, de las 8 cepas de *X. dendrorhous* ensayadas sólo 2 no poseen actividad micocida: UCD 67-383 y CBS 6938. En general de las cepas que presentan actividad, esta es mayor a 10 y 15°C y a un pH entre 4,2 y 4,6. Los mismos resultados fueron obtenidos en los ensayos de actividad micocida sobre *Rhodotorula minuta* como se muestra en la tabla 3. Para *Rhodotorula mucilaginosa*, sin embargo, el rango de mayor actividad se desplaza hacia pH 5,0 y se observa con las cepas rusas VKM-Y y la cepa UCD 67-385 (Tabla 4).

En el caso de *Kloeckera apiculata* solo en las cepas UCD 67-385 y UCD 67-210 se observa una actividad, aunque reducida. Dicha actividad solo se presenta a 10 y 15°C a un pH 4,2 y 4,6 (Tabla 5). Mientras que sobre *Bulleromyces albus* se observa sensibilidad mucho más reducida solo de la cepa UCD 67-385 a pH 4,2 a 15 y 22°C (Tabla 7).



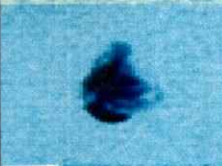


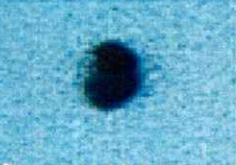
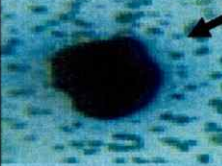
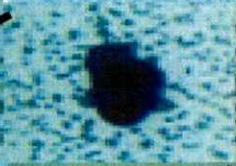

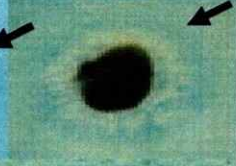
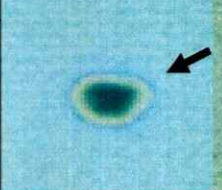

pH	4,2	4,6
<i>Pichia</i>		
<i>Candida</i>		
<i>Kluyveromyces</i>		
<i>Kloeckera</i>		
<i>Rhodotorula</i>		
<i>Bulleromyces</i>		

Figura 3. Actividad micocida de la cepa UCD 67-385 sobre otras levaduras. Las flechas señalan los halos de muerte (precipitado azul alrededor de la colonia) sobre los géneros de levadura ensayados a dos pH ácidos (4,2 y 4,6) y a 15° C.

Tabla 2. Actividad micocida de cepas *X. dendrorhous* sobre *R. sloffiae*

Temperatura	10° C				15° C				22° C			
pH	4,2	4,6	5,0	5,4	4,2	4,6	5,0	5,4	4,2	4,6	5,0	5,4
UCD 67-385	+	++	+	+	+	++	+	+	+ -	+	+	+
CBS 5908	+	++	+	+	+	++	+	+	+ -	+	+	+
UCD 67-383	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
UCD 67-210	+	++	+	+	+	+	+	-	+ -	+	+	+ -
VKM Y-2786	+	++	+	+	+	++	+	-	+ -	+	+	-
VKM Y-2266	+	+	+	+	+	++	+	+ -	+	+	+ -	+
VKM Y-2059	+	++	+	+	+	++	+	+ -	+	+ -	+	+
CBS 6938	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Los símbolos (++) indica un halo de muerte ≥ 2 mm de diámetro, (+) indica un halo de diámetro entre 1-2 mm, (+-) indica un halo de diámetro 1 mm, y (-) ausencia de halo.

Tabla 3. Actividad micocida de cepas *X. dendrorhous* sobre *R. minuta*

Temperatura	10° C				15° C				22° C			
	4,2	4,6	5,0	5,4	4,2	4,6	5,0	5,4	4,2	4,6	5,0	5,4
UCD 67-385	+	++	+	+	+-	++	+	+	+-	+	+	+-
CBS 5908	+	++	+	+	+-	++	+	+	+-	+	+	+-
UCD 67-383	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
UCD 67-210	+	++	+	+	+-	+	+	-	+-	+	+	+-
VKM Y-2786	+	++	+	+	+	++	+	-	+-	+	+	-
VKM Y-2266	+	+	+	+	+	++	+	+-	+	+	+-	+
VKM Y-2059	+	+	+	+	+	++	+	+-	+	+-	+	+
CBS 6938	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Símbolos como en tabla 2.

Tabla 4. Actividad micocida de cepas *X. dendrorhous* sobre *R. mucilaginosa*

Temperatura	10° C			15° C		
	pH	4,2	4,6	5,0	4,2	4,6
UCD 67-385	-	-	+ -	-	-	-
CBS 6938	-	-	-	-	-	-
UCD 67-383	-	-	-	-	-	-
UCD 67-210	-	++	+	-	+	-
VKM Y-2786	-	++	+	-	+	-
VKM Y-2266	-	-	+	-	-	-
VKM Y-2059	-	-	+	-	-	-

Símbolos como en tabla 2.

A 22° C la levadura no crece adecuadamente en las placas, imposibilitando observar un halo de muerte.

No se disponía de la cepa CBS 5908 durante este ensayo.

Tabla 5. Actividad micocida de cepas *X. dendrorhous* sobre *K. apiculata*

Temperatura	10° C				15° C				22° C			
pH	4,2	4,6	5,0	5,4	4,2	4,6	5,0	5,4	4,2	4,6	5,0	5,4
UCD 67-385	+-	+-	-	-	+-	-	-	-	-	-	-	-
CBS 6938	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
UCD 67-383	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
UCD 67-210	+-	+-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
VKM Y-2786	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
VKM Y-2266	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
VKM Y-2059	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Símbolos como en tabla 2.

No se disponía de la cepa CBS 5908 durante este ensayo.

Tabla 6. Actividad micocida de cepas *X. dendrorhous* sobre *B. albus*

Temperatura	10° C			15° C			22° C		
pH	4,2	4,6	5,0	4,2	4,6	5,0	4,2	4,6	5,0
UCD 67-385	-	-	-	+	-	-	+ -	-	-
CBS 6938	-	-	-	-	-	-	-	-	-
UCD 67-383	-	-	-	-	-	-	-	-	-
UCD 67-210	-	-	-	-	-	-	-	-	-
VKM Y-2786	-	-	-	-	-	-	-	-	-
VKM Y-2266	-	-	-	-	-	-	-	-	-
VKM Y-2059	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CBS 5908	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Símbolos como en tabla 2.

Efecto Salino

Se ha visto en levaduras como *Pichia membranifaciens* y otras aisladas de salmueras oliváceas que mayores concentraciones de sal se correlacionan con un aumento de la actividad micocida (Llorente, 1997). Por esto se estudió el efecto del NaCl en la actividad micocida de las cepas de *X. dendrorhous* sobre *R. sloffiae*.

Para ello se prepararon céspedes con concentraciones crecientes de NaCl (0 a 6% p/v), a pH 4,6 y las placas se incubaron a 10, 15 y 22°C.

Como se muestra en la figura 4, cepas de *X. dendrorhous* presentan un halo mayor en la placa suplementada con 3% NaCl, indicativo de que a esta concentración de sal la actividad es mayor. El efecto de NaCl sobre la actividad de las cepas micocidas a todas las temperaturas que fueron incubados los céspedes de *R. sloffiae* a un pH de 4,6 se resume en la tabla 7. A 15 y 22°C se observa que un aumento en la salinidad hasta un 3% se correlaciona con un halo de muerte mayor.

Obtención de proteínas extracelulares totales de *X. dendrorhous*

Para determinar si la actividad tóxica de *X. dendrorhous* corresponde a un producto que es exportado, se realizó la extracción de las proteínas extracelulares totales y se determinó su actividad. Para ello se realizó una curva de crecimiento de la cepa UCD 67-385 en medio YM a 22°C. Se tomaron alícuotas del cultivo, desde las cuales se obtuvo las proteínas extracelulares y se determinó su actividad sobre *R. sloffiae* a pH 4,6

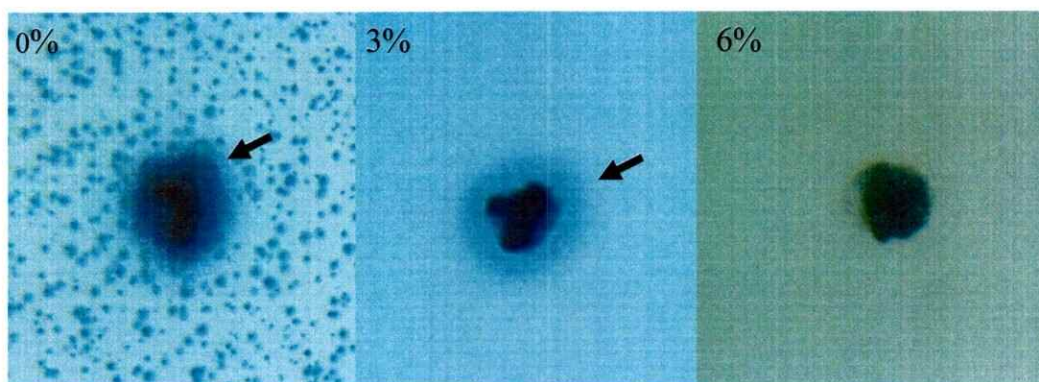


Figura 4. Efecto de la concentración de NaCl en la actividad micocida de *X. dendrorhous*. De izquierda a derecha las placas con concentraciones salinas de 0, 3 y 6% p/v NaCl. La cepa UCD 67-385 fue sembrada sobre césped de *R sloffiae* a pH 4,6. Las placas fueron incubadas por 9 días a 15°C

Tabla 7. Efecto de la concentración de NaCl en la actividad micocida de *X. dendrorhous*

Temperatura	10° C			15° C			22° C		
	[NaCl] % p/v	0	3	6	0	3	6	0	3
UCD 67-385	+	+ -	-	+ -	+	-	+ -	+	-
CBS 5908	+	+ -	-	+ -	++	-	+ -	+	-
VKM Y-2786	+	+ -	-	+ -	++	-	+ -	+	-
VKM Y-2266	+	+ -	-	+ -	+	-	+ -	+	-
VKM Y-2059	+	+ -	-	+ -	+	-	+ -	+	-

Símbolos como en tabla 2.

incubadas a 15°C. Después de 3-5 días de incubación se observa un halo de muerte alrededor de los pocillos en los que se sembró la muestra de proteína, no así en los que se sembró buffer (Fig. 5) Esto nos permite concluir que la actividad micocida de *X. dendrorhous* corresponde a un factor que es exportado.

Cinética de producción de actividad micocida.

Para determinar si la producción de la micotoxina es dependiente de la fase de crecimiento de *X. dendrorhous* se confeccionó una curva de crecimiento en medio YM a 22°C. Cada cierto tiempo (~24 hr) se tomaron alícuotas, de las cuales se determinó el título celular y se obtuvo las proteínas extracelulares. A los extractos proteicos se les determinó su actividad micocida sobre *R. sloffiae* y además, se analizaron mediante PAGE-SDS.

De los resultados obtenidos se puede concluir que la actividad micocida de los sobrenadantes de los cultivos se presenta sobre la última fase del crecimiento exponencial decayendo posteriormente (Fig. 6).

En el perfil proteico de los sobrenadantes se observa que existen al menos 4 bandas (2 de ellas de tamaño menor a 10 kDa) que aparecen a medida que el cultivo avanza, y que son más notorias en los extractos que presentan actividad. La comparación de los perfiles de las muestras provenientes de cultivos de la cepa UCD 67-385 que presentan actividad con proteínas de cultivos de la cepa CBS 6938, que no presenta actividad, sugiere que al menos 4 bandas de 18, 16 y dos de ~6 kDa podrían corresponder a la toxina responsable de la actividad.

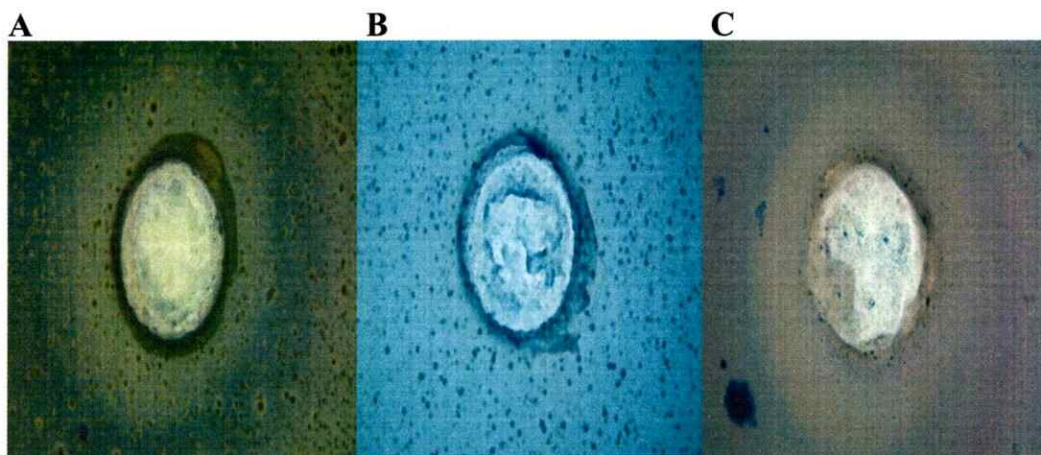


Figura 5. Actividad micocida de los extractos proteicos extracelulares de *X. dendrorhous*. Se muestra la aparición de un halo alrededor del pocillo. En los pocillos se cargaron 100 μ l de los extractos de proteínas (A y C), y se cargó un control de solución buffer citrato-fosfato pH 4,6 (B). Los ensayos se realizaron a pH 4,2 (A y B) y 4,6 (C). Las placas se incubaron 3 días a 15° C.

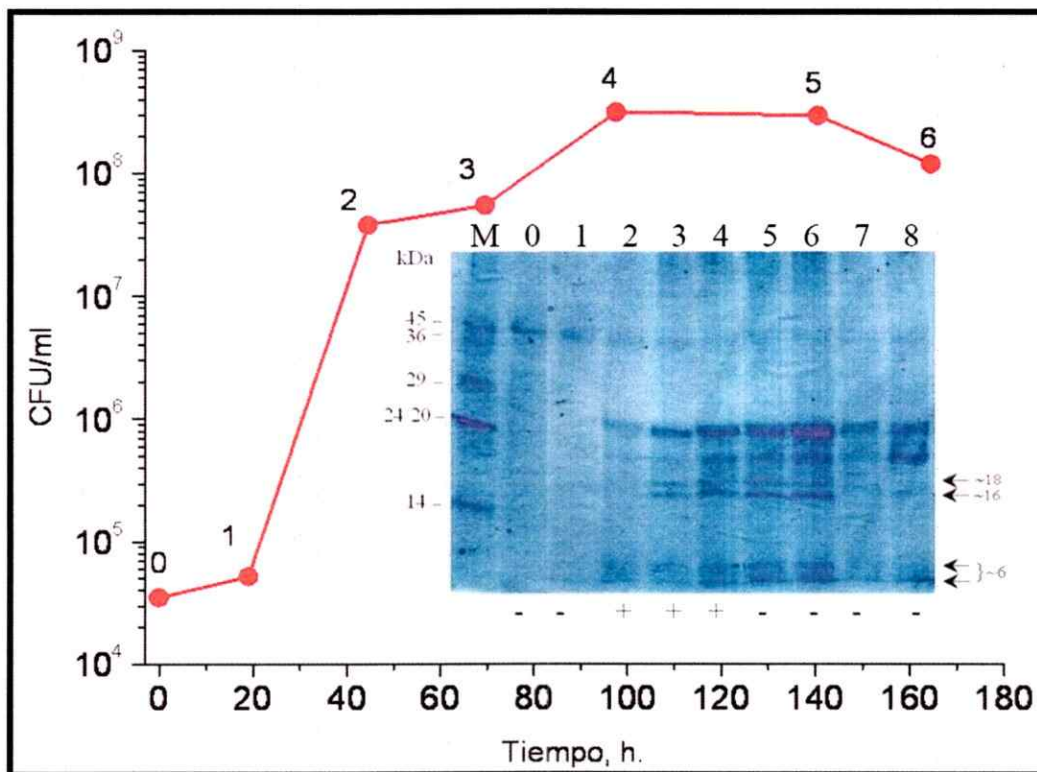


Figura 6. Curva de crecimiento de *X. dendrorhous* UCD 67-385 / SDS-PAGE. Se tomaron alícuotas en cada punto que se indica (0 a 6) y se extrajeron las proteínas extracelulares totales. A las muestras se les determinó la actividad micocida sobre un césped de *R. sloffiae* a pH 4,6 y 15 °C. Los extractos de proteínas totales se resolvieron en PAGE-SDS al 12%. Carriles: 0 al 6, muestras obtenidas en distintos puntos de la curva de crecimiento. 7 y 8, muestras obtenidas desde cultivos de la cepa de *X. dendrorhous* CBS 6938, en fase exponencial y estacionaria de crecimiento, respectivamente. Los resultados de los ensayos de actividad micocida de las muestras se indican en la parte inferior del gel. Las flechas indican las bandas proteicas que difieren entre ambas cepas y que eventualmente correspondería(n) a la(s) toxina(s).

DISCUSIÓN

El fenotipo micocida es ecológicamente relevante pues representaría una ventaja adaptativa dentro de la competencia por una fuente de carbono compartida entre levaduras en el ambiente natural. En los exudados de savia primaverales de árboles de regiones como Rusia, Italia o Alemania se han encontrado grupos muy heterogéneos de levaduras dependiendo de las condiciones de temperatura dominantes. Las heladas nocturnas al final de la estación favorece la llegada de nuevas levaduras, produciéndose una sucesión de nuevos consorcios (Weber, 2006). Las levaduras *X. dendrorhous* y *Trichosporon pullulans* predominan como colonizadores tardíos en estas sucesiones. Esta última levadura tiene actividad micocida ya descrita (Golubev y cols., 2002). Estos antecedentes sugieren que en condiciones ambientales *X. dendrorhous* posee alguna ventaja adaptativa que le ha permitido desplazar a los competidores de las etapas tempranas de colonización del nicho.

En este trabajo se ha mostrado la existencia de un fenotipo micocida de varias cepas de *X. dendrorhous* sobre al menos sobre 3 especies del género *Rhodotorula* en un rango de pH ácido. Este fenotipo podría explicar que *X. dendrorhous* desplace a levaduras del género *Rhodotorula* presente durante las etapas tempranas de colonización de los exudados. Además, esta sensibilidad es mayor a menores temperaturas (15 y 10°C) lo que concuerda con las temperaturas en las cuales *X. dendrorhous* se desarrolla en su ambiente natural.

Los extractos de proteínas extracelulares que se obtienen casi al finalizar la fase exponencial y comienzo de la estacionaria son tóxicos para *Rhodotorula*. Esto indica que el factor micocida producido es liberado al medio y que no se trata de una toxicidad por contacto entre las células sensibles y las micocinogénicas.

Se puede especular sobre la naturaleza proteica del factor tóxico, pues en al menos dos de las muestras con los extractos extracelulares se correlaciona su actividad micocida con la presencia de las bandas proteicas de tamaños ~18 y 16 kDa (y otras dos mucho menores) que no aparecen en la cepa CBS 6938, la cual no presenta actividad micocida. Sin embargo, estas bandas proteicas se correlacionan con una actividad micocida sólo en el inicio de su aparición (78-96 h), pues luego de las 96 h de crecimiento del cultivo aún prevalecen en las muestras extracelulares que ya no son tóxicas. Esta inhibición de la actividad puede deberse a que las toxinas producidas simplemente ya no son funcionales y se están acumulando en el medio extracelular.

Este comportamiento en la cinética de producción y actividad micocida concuerda con los reportados para cepas de *S. cerevisiae* (Ouchi y cols., 1978) y *P. anomala* (Sawant y cols., 1988). Estas levaduras comienzan a producir sus toxinas durante su fase exponencial y hasta el final de la misma.

Las micotoxinas de *S. cerevisiae* varían su tamaño en un rango de 13 a 20 kDa (K2 y K1 respectivamente). Además, se han reportado tamaños de 10 y 180 kDa para la zigocina de *Z. bailii* y la toxina trimérica de *K. lactis*. Por lo tanto, los tamaños encontrados para las 2 bandas proteicas mayores (alrededor de 16 y 18 kDa) en *X. dendrorhous* son razonablemente similares, y podrían corresponder a micotoxinas.

CONCLUSIONES

- Se determinó que 6 cepas de *X. dendrorhous* (UCD 67-385 y 210; CBS 5908; VKM Y-2786, 2266 y 2059) son micocidas sobre levaduras del género *Rhodotorula* en un rango de pH 4,2 a 5,4 y temperatura de 10 a 22°C. Solo 2 cepas (UCD 67-383 y CBS 6938) no presentan actividad sobre esas mismas levaduras.

- Se determinó actividad micocida de dos cepas de *X. dendrorhous* (UCD 67-210 y 385) sobre *Kloeckera apiculata*. Esta actividad se presentó en un rango reducido de temperatura (10 y 15°C) y pH (4,2-4,6). Además, se determinó actividad micocida de la cepa UCD 67-385 sobre *Bulleromyces albus*. La actividad fue reducida en un rango de temperatura (15 y 22°C) y pH (4,2)

- Se observó que la actividad micocida se debe a un factor tóxico que es exportado al medio extracelular. La mayor producción de este factor micocida activo ocurre al final de la fase exponencial del crecimiento de la levadura e incluso al comienzo de la fase estacionaria. Posterior a esto la actividad micocida ya no es observada. Es probable que esta actividad se deba a alguna proteína de 16-18 kDa de tamaño.

BIBLIOGRAFÍA

Aguiar C, Lucas C. 2000. Yeasts Killer/Sensitivity Phenotypes and Halotolerance. *Food technol biotechnol.* 38(1): 39-46

Ashida, S., T. Shimazaki, Kitano K., Hara S. 1983. New killer toxin of *Hansenula mrakii*. *Agric Biol Chem.* 47(12): 2953-2955

Balvay L., Lopez Lastra M., Sargueil B., Darlix JL., Ohlmann T. 2007. Translational control of retroviruses. *Nat Rev Microbiol.* 5(2): 128-140

Bostian K.A., Hopper J.E., Rogers D.T., Tripper D. 1980. Translational analysis of the killer-associated virus-like particle dsRNA genome of *Saccharomyces cerevisiae*: M-dsRNA encodes a toxin. *Cell.* 19(2): 403-414

Castillo A., Cifuentes V. 1994. Presence of double-stranded RNA and virus-like particles in *Phaffia rhodozyma*. *Curr Genet.* 26(4): 364-368

Chen WB., Han YF., Jong SC., Chang SC. 2000. Isolation, Purification, and Characterization of a Killer Protein from *Schwanniomyces occidentalis*. *Appl Environ Microbiol.* 66(12): 5348-5352

Ciani M., Fatichenti F. 2001. Killer toxin of *Kluyveromyces phaffii* DBVPG 6076 as a biopreservative agent to control apiculate wine Yeasts. *Appl Environ Microbiol.* 67(7): 3058-63

Conti S., Magliani W., Gerloni M., Salati A., Dieci E., Arseni S., Fiscaro P., Polonelli L. 1998. A transphyletic anti-infectious control strategy based on the killer phenomenon. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 22(1-2): 151-161

Dinman, JD. 1995. Ribosomal Frameshifting in Yeast Viruses. *Yeast* 11(12): 1115-1127

Dinman JD, Wickner RB. 1992. Ribosomal frameshifting efficiency and gag/gag-poi ratio are critical for yeast M1 double-stranded RNA virus propagation. *J Virol.* 66(6): 3669-3676

El-Sherbeini M., Tipper DJ., Mitchell DJ., Bostian KA. 1984. Virus-like particle capsid proteins encoded by different L double-stranded RNAs of *Saccharomyces cerevisiae*: their roles in maintenance of M double-stranded killer plasmids. *Mol Cell Biol.* 4(12): 2818-27

Golubev W., Pfeifer I., Churkina L., Golubeva E. 2003. Double-stranded RNA viruses in a mycotoxinogenic strain of *Cystofilobasidium infirmominatum*. *FEMS Yeast Res.* 3(1): 63-68

Golubev W. I., Pfeiffer I., Golubeva E. W. 2002. Mycocin production in *Trichosporon pullulans* populations colonizing tree exudates in the spring. FEMS Microbiol Ecol. 40(2): 151-157

Golubev W. I., Pfeiffer I., Golubeva E. W. 2006. Mycocin production in *Pseudozyma tsukubaensis*. Mycopathologia. 162(4):313-316

Gunge, N., A. Tamaru, F. Ozawa, and K. Sakaguchi. 1981. Isolation and characterization of linear deoxyribonucleic acid plasmids from *Kluyveromyces lactis* and the plasmid-associated killer character. J Bacteriol. 145(1):382-390

Herr A. J., Atkins J. F., Gesteland R. 2000. Coupling of open reading frames by translational bypassing. Annu Rev Biochem. 69(1): 343-372

Hodgson, V. J., D. Button, and G. M. Walker. 1995. Anti-Candida activity of a novel killer toxin from the yeast *Williopsis mrakii*. Microbiology. 141(8): 2003-2012

Koltin, Y., Day D. R. 1976. Inheritance of killer phenotypes and double-stranded RNA in *Ustilago maydis*. Proc Natl Acad Sci USA 73(2): 594-598

Lenski R. E., Riley M. A. 2002. Chemical warfare from an ecological perspective. Proc Natl Acad Sci USA. 99(2): 556-558

Libkind D., Ruffini A., Broock V. M., Alves L., Sampaio JP. 2007. Biogeography, host specificity, and molecular phylogeny of the basidiomycetous yeast *Phaffia rhodozyma* and its sexual form, *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Appl Environ Microbiol.* 73(4): 1120-1125

Llórente P., Marquina D., Santos A., Peinado JM., Spencer-Martins I. 1997. Effect of salt on the killer phenotype of yeasts from olive brines. *Environ Microbiol.* 63(3): 1165-1167

Magliani, W., Conti, S., Gerloni, M., Bertolotti, D., Polonelli, L., 1997. Yeast Killer Systems. *Clin Microbiol Rev.* 10(3): 369-400

Makower M., Bevan E.A. 1963. The inheritance of the killer character in yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). *Proceedings of the 11th International Congress of Genetics.* 1: 201-103

Marquina D., Santos A., Peinado JM. 2002. Biology of killer yeasts. *Int Microbiol.* 5(2): 65-71

Morais P. B. Martins M. B., Kłaczko L. B. Mendonca-Hagler L. C., Hagler A. N. 1995. Yeast succession in the amazon fruit *Parahanconia amapa* as resource partitioning among *Drosophila spp.* *Appl Environ Microbiol.* 61(12): 4251-4257

Ohtake Y., Wickner R B. 1995. Yeast virus propagation depends critically on free 60S ribosomal subunit concentration. *Mol Cell Biol.* 15(5): 2772–2781

Ouchi K., Kawase N., Nakano S., Akiyama H. 1978. Stabilization of yeast killer factor by glycerol. *Agric Biol Chem.* 42(1): 1-5

Paluszynski J. P., Klassen R., Meinherdt F. 2007. *Pichia acaciae* Killer System: Genetic Analysis of Toxin Immunity. *Appl Environ Microbiol.* 73(13): 4373-4378

Petering J. E., Symons M. R., Langridge P., Henschke P. A. 1991. Determination of Killer Yeast Activity in Fermenting Grape Juice by Using a Marked *Saccharomyces* Wine Yeast Strain. *Appl Environ Microbiol.* 57(11): 3232-3236

Pfeiffer I., Golubev W. I., Farkas Z., Kucsera J., Golubev N. 2004. Mycocin production in *Cryptococcus aquaticus*. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 86(4): 369-375

Pfeiffer, I., Kuscera, J., varga, J., Parduez, A., Ferenczy, L. 1996. Variability and inheritance of double-stranded RNA viruses in *Phaffia rhodozyma*. *Curr Genet.* 30(4): 294-297

Pfeiffer I, Litter J, Péntzes ZS, Kucsera J. 2001. Effects of double-stranded RNA viruses on the reproduction of *Phaffia rhodozyma*. *Acta Biol Hung.* 52(2-3):299-306

Phaff HJ., Knapp EP. 1956. The taxonomy of yeasts found in exudates of certain trees and other natural breeding sites of some species of *Drosophila*. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 22(2):117-130

Pollonelli L., Archibusaci C., Sestito M., Morace G. 1983. Killer system: a simple method for differentiating *Candida albicans* Strains. *J Clin Microbiol*. 17(5): 774-780

Polonelli L., Morace G. 1986. Reevaluation of the yeast killer phenomenon. *J Clin Microbiol*. 24(5): 866-869

Santos De La Sen A. 1999. Estudio de la actividad killer de *Pichia membranifaciens* CYC 1106: Producción y caracterización bioquímica, Tesis Doctoral, Universidad Complutense de Madrid.

Santos A., Marquina D. 2004. Killer toxin of *Pichia membranifaciens* and its possible use as a biocontrol agent against grey mould disease of grapevine. *Microbiology*. 150(8): 2527-2534

Sawant A.D., Abdelal AT., Ahearn DG. 1988. Anti-*Candida albicans* activity of *Pichia anomala* as determined by a growth rate reduction assay. *Appl Environ Microbiol*. 54(5): 1099-1103

Sawant A.D., Abdelal AT., Ahearn DG. 1989. Purification and characterization of the anti-*Candida* toxin of *Pichia anomala* WC 65. *Antimicrob Agents Chemother.* 33(1):48-52

Schmitt M., Breinig F. 2002. The viral killer system in yeast: from molecular biology to application. *FEMS Microbiol Rev.* 26(3): 257-276

Schmitt M., Breinig F. 2006. Yeast viral killer toxins: lethality and self-protection. *Nat Rev Microbiol.* 4(3): 212-221

Schmitt MJ, Neuhausen F. 1994. Killer toxin-secreting double-stranded RNA mycoviruses in the yeasts *Hanseniaspora uvarum* and *Zygosaccharomyces bailii*. *J Virol.* 68(3): 1765-72

Stark M., Boyd A. 1986. The killer toxin of *Kluyveromyces lactis*: characterization of the toxin subunits and identification of the genes which encode them. *EMBO J.* 5(8): 1995-2000

Vagnoli P., Musmanno R. A., Cresti S., Di Maggio T., Coratza G. 1993. Occurrence of Killer Yeasts in Spontaneous Wine Fermentations from the Tuscany Region of Italy. *Appl Environ Microbiol.* 53(12): 4037-4043

Webber S. W. Ronald. 2006. On the ecology of fungal consortia of spring sap-flowers. *Mycologist.* 20(4): 140-143

Wickner R. 1996. Double-stranded RNA viruses of *Saccharomyces cerevisiae*.
Microbiol Rev. 60(1): 250-265

Wloch-Salamon D. M., Gera D., Hoeksra R. F., de Visser J. A. 2008. Effect of dispersal
and nutrient availability on the competitive ability of toxin-producing yeast. Proc R Soc
B. 275(1634): 535-541