

PRESENCIA DE PLASMIDOS DE DNA DE DOBLE HEBRA EN *PHAFFIA RHODOZYMA*.*

Claudio Martínez, Germán Hermosilla,
Rubén León, Blanca Urzúa & Víctor Cifuentes
Laboratorio de Genética, Departamento de Ciencias Ecológicas,
Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
Las Palmeras 3425, Santiago, Chile.

Palabras clave: *Phaffia rhodozyma*, elementos genéticos extracromosómicos, DNA plasmidial.

Key Words: *Phaffia rhodozyma*, extrachromosomal genetic elements, plasmid DNA.

RESUMEN

El análisis mediante electroforesis en gel de agarosa, de los ácidos nucleicos de tres cepas silvestres de *Phaffia rhodozyma*, permitió determinar la presencia de elementos genéticos extracromosómicos de DNA de doble hebra en una de ellas, la cepa UCD 67-210. Esta cepa es portadora de al menos 6 bandas de DNA que migran más rápido que el DNA cromosómico y cuyos tamaños moleculares corresponden a 6.5, 5.9, 5.0, 4.4, 3.2 y 2.5 kb. Con el objetivo de determinar el tipo de ácido nucleico que constituye estos elementos, se estudió su comportamiento frente a diferentes nucleasas. El tratamiento con ribonucleasa A, ya sea en alta o baja fuerza iónica, no tiene efecto sobre las bandas electroforéticas, así como el tratamiento con nucleasa S1. Por el contrario, el tratamiento con desoxirribonucleasa pancreática conduce a una degradación completa de las bandas y del DNA cromosómico. Estos resultados sugieren que la naturaleza química de los plásmidos corresponde a DNA de doble hebra.

Por otra parte, la visualización de los plásmidos en gel de agarosa, depende de la utilización de proteinasa K y SDS en el procedimiento de purificación de los plásmidos y en las condiciones de corrida electroforética, sugiriendo la presencia de un complejo DNA plasmidial-proteína en cada uno de estos elementos. Finalmente, el análisis mediante enzimas de restricción de dos de estos plásmidos, sugiere que estos elementos no están relacionados.

INTRODUCCION

Elementos genéticos extracromosómicos han sido encontrados en una amplia variedad de organismos eucariontes inferiores. Dentro de éstos últimos, los hongos

SUMMARY

[Presence of double stranded plasmid DNA in *Phaffia rhodozyma*]

Agarose gel electrophoresis analysis of nucleic acid from three wild type strains of *Phaffia rhodozyma* indicated the presence of DNA double stranded extrachromosomal genetic elements in one, UCD 67-210. This strain has six DNA bands migrating faster than chromosomal DNA, whose molecular sizes were 6.5, 5.9, 5.0, 4.4, 3.2 and 2.5 kb respectively. To determinate the nucleic acid nature of these elements, the effect of different treatment with nucleases was studied. Ribonuclease A, in low or high ionic strength, has not effect on any electrophoretical band. Pancreatic deoxyribonuclease degrades the six bands completely in addition to chromosomal DNA. Furthermore, the six bands were insensitive to nuclease S1 digestion. These results suggest that the chemical nature of these plasmid corresponds to double stranded DNA.

On the other hand, the plasmid detection after agarose gel electrophoresis depended on treatment of samples with protease (proteinase K) and SDS in the purification methods, suggesting the presence of a DNA plasmid-protein complex in each of these elements. Finally, restriction endonuclease analysis of two plasmid from *P. rhodozyma*, indicates no relation between these elements.

gos quizás representan el grupo principal, observándose en ellos, varias clases de plásmidos. Por ejemplo, el hongo fitopatógeno *Cochliobolus heterostrophus*, posee dos plásmidos circulares monoméricos mitocondriales de 1.8 y 2 kb de tamaño, los cuales no tienen asociado un fenotipo aparente, aunque se supone una posible relación

* Financiado por el proyecto Fondecyt 193-0886.

con el proceso de senescencia (Garber et al. 1984). Por otra parte, se ha observado en mitocondrias de hongos otro tipo de plásmidos que ha evolucionado en forma independiente del cromosoma mitocondrial y posiblemente fuera del organelo. Entre este tipo de elemento genético se encuentran los círculos multiméricos *Mauriceville*, de *Neurospora crassa* (Collins et al. 1981), *LaBelle* y *Fiji*, de *Neurospora intermedia* (Stohl et al. 1982), cuyos tamaños moleculares corresponden a 3.6, 4.2 y 5.2 kb respectivamente. Con la excepción del plásmido *Kalilo*, que corresponde a un monómero lineal de 9 kb, implicado en el fenotipo senescente en *N. intermedia*, los otros plásmidos no muestran un fenotipo asociado. También se han identificado otros plásmidos lineales en las especies *Nectria haematococca*, *Fusarium oxysporum*, *Claviceps purpurea* y *Agaricus bitorquis* (Böckelmann et al. 1986 y Wickner et al. 1986).

La presencia de plásmidos no mitocondriales, asociados al núcleo se ha observado en otros hongos. Es así como el DNA de 2 micras (2 μ) de *Saccharomyces cerevisiae*, fue uno de los primeros plásmidos descubiertos y es uno de los mejor caracterizados entre los hongos. El círculo de 2 micras, está presente en la mayor parte de las cepas de *S. cerevisiae* analizadas y su número de copias que varía entre 30 y 100 por célula, llegando a constituir hasta el 3% del DNA de la levadura (Futcher et al. 1983, Futcher, 1988).

Por otra parte, en *Dictyostelium discoideum* se han identificado dos elementos extracromosómicos diferentes. Uno de ellos corresponde a un dímero palindrómico lineal de 8.8 kb el cual codifica para los genes de rRNA y el otro corresponde al plásmido Ddp1 de 13 kb el que podría conferir resistencia a cobalto (Orii et al. 1987 y Mertz et al. 1983).

Otro tipo de elementos genéticos extracromosómicos descubiertos con mucha frecuencia en hongos, corresponde a los plásmidos de RNA de doble hebra (dsRNA). En general dichas moléculas se encuentran en un gran número de especies, tanto de hongos filamentosos como de levaduras. Entre los primeros, se ha detectado en especies como *Rhizoctonia solani* (Finkler et al. 1985) *Phytophthora infestans* (Nuss, 1987) y *Helminthosporium victoriae* (Ghabrial, 1986), entre otras. En levaduras se ha observado en *Saccharomyces cerevisiae*, donde se encuentra asociado a partículas tipo virus (VLP) (Tipper & Bostian, 1984). En este organismo, junto con *Ustilago maydis* y *Zygosaccharomyces bailii*, los dsRNA codifican por un sistema killer, el que mata a células sensibles (Radler et al. 1993, Peery et al. 1987 y Koltin, 1986). *Phaffia rhodozyma*, una levadura Deuteromycetina carotenogénica, también es portadora de moléculas de dsRNA asociadas a partículas tipo virus y fenotipo killer

(Castillo & Cifuentes 1993, 1994).

Otro tipo de elementos extracromosómicos presentes en hongos, corresponden a plásmidos lineales de DNA de doble hebra, que en algunos casos están asociados a proteínas covalentemente unidas en sus extremos. Ejemplo de ello son los elementos presentes en *Ascobolus immersus*, donde se han observado varios plásmidos lineales tales como pA1 de 6.4 kb, pA11 de 7.9 kb y pA12 de 5.6 kb y en *Claviceps purpurea*, donde se han identificado varios plásmidos lineales tales como pCIK1 de 6.7 kb, pCIK2 de 5.5 kb, y pCIK3 de 1.1 kb (para una revisión detallada ver Meinhardt et al. 1990). Los plásmidos lineales de DNA más estudiados son los presentes en *Kluyveromyces lactis*, pGKL1 de 8.9 kb (Hishinuma et al. 1984) y pGKL2 de 13.4 kb (Tommasino et al. 1988), los cuales codifican por toxinas killer y por inmunidad contra la misma (Gunge et al. 1981). Por último, en la levadura *Pichia inositovora* es posible encontrar tres plásmidos lineales de 10, 13 y 18 Kb, los cuales parecen no tener relación con el fenotipo killer que presenta esta levadura (Ligon et al. 1989).

En nuestro trabajo, presentamos resultados inéditos que permiten determinar la presencia de al menos seis elementos genéticos extracromosómicos de DNA de doble hebra, en una cepa silvestre de *P. rhodozyma*, los cuales migran en posiciones diferentes al DNA cromosómico y cuyos tamaños moleculares corresponden a 6.5, 5.9, 5.0, 4.4, 3.2 y 2.5 kb respectivamente.

MATERIALES Y METODOS

Cepas

En este estudio se utilizó las cepas UCD 67-210, UCD 67-383 y UCD 67-385 de *Phaffia rhodozyma*, cuyos números corresponden al American Type Culture Collection (ATCC) 24202, 24203 y 24230 respectivamente.

Todas las cepas fueron cultivadas en medio líquido YM con agitación a 22 °C, según la técnica descrita por An et al. (1989). Cuando fue necesario, el medio de cultivo se solidificó agregando agar al 2%.

Purificación de DNA

Los ácidos nucleicos de *P. rhodozyma* fueron purificados a partir de un cultivo en fase exponencial tardía o en fase estacionaria, de acuerdo a la técnica descrita por Castillo & Cifuentes 1994. Las células fueron colectadas y lavadas dos veces con tampón TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM pH=8.0) mediante sucesivas centrifugaciones a 7.000 rpm en una centrifuga Sorvall RC5B. Las células

concentradas se trituraron utilizando perlas de vidrio (0.5 mm de diámetro). Posteriormente se realizaron tres extracciones con fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1) seguidas de tres extracciones con cloroformo-alcohol isoamílico (24:1). Los ácidos nucleicos fueron precipitados con 1/10 de volumen de acetato de sodio 3M y 2.5 volúmenes de etanol absoluto a -20°C, resuspendidos en TE y guardados a -20 °C, para análisis posteriores. Cuando fue necesario, el DNA fue purificado a partir de protoplastos de *P. rhodozyma* obtenidos mediante tratamiento de las células con Novozyma 234, utilizando KCl 0.8 M como estabilizador osmótico. Para romper los protoplastos fueron tratados con SDS 1% y proteinasa K 100 ug/ml, para liberar así el DNA.

Digestiones enzimáticas

Las condiciones para los tratamientos con las enzimas DNasa I, nucleasa S1 y endonucleasas de restricción, fueron realizadas basándose en los métodos descritos por Sambrook et al. 1989. Las digestiones con RNasa A en alta (2X SSC, 0.3 M NaCl, 0.03 M citrato de sodio, pH 7.0) y baja (0.1X SSC) fuerza iónica, fueron realizadas de acuerdo a (Castillo & Cifuentes, 1994).

Electroforesis en geles de agarosa

Los ácidos nucleicos fueron analizados mediante electroforesis en geles de agarosa al 0.7%, en tampón TBE, en presencia de bromuro de etidio a una concentración final de 0.5 µg/ml. Para la corrida electroforética se utilizó tampón TBE en presencia de bromuro de etidio 0.5 µg/ml de acuerdo a lo descrito por Sambrook et al. 1989. En algunos casos, para tener una mejor separación y detección de los plásmidos de DNA de la levadura, fue necesario realizar las electroforesis en geles de agarosa, en presencia de SDS al 0.2% en el gel y en el tampón de corrida, según la técnica descrita por Stam et al. 1986. En este caso, luego de la electroforesis, los geles fueron lavados con agua destilada y teñidos con bromuro de etidio a una concentración final de 0.5 µg/ml y finalmente visualizados en un transiluminador Hoeffer UVTM-40.

Determinación de fenotipo killer.

Se realizaron ensayos para la detección de actividad killer de la cepa UCD 67-210 de *P. rhodozyma*. Para ello se aplicó la técnica del azul de metileno (Gunge et al. 1981, Gunge y Sakaguchi, 1981; Worsham y Bolen, 1990 y Radler et al. 1993) y adaptada en nuestro laboratorio para la cepa UCD 67-385 de *P. rhodozyma* (Castillo & Cifuentes, 1994). Las células de la cepa blanco, fueron cultivadas en medio YM a 22° C (An et al. 1989) hasta alcanzar la fase exponencial (10⁷ células/ml). Luego fueron lavadas en agua destilada estéril, mezcladas en

YM-agar azul de metileno fundido y precalentado a 45° C en placas Petri, para obtener su desarrollo. Las placas fueron mantenidas a temperatura ambiente hasta que el medio solidificó y posteriormente se sembró con un asa de platino las cepas a estudiar. Finalmente, las placas se incubaron a 22° C por 7 días y se determinó la presencia de una zona de inhibición, alrededor de la cepa killer.

RESULTADOS Y DISCUSION

La figura 1 muestra los resultados de una electroforesis en gel de agarosa al 0.7% de ácidos nucleicos totales de tres cepas silvestres de *P. rhodozyma*, las cepas UCD 67-210, 67-385 y 67-383. Claramente se observa en las tres cepas (Fig. 1 carril 2, 3 y 4) una banda que corresponde a DNA cromosómico cuya velocidad de migración es igual o cercana a la banda de 23 kb del bacteriófago lambda, utilizado como estándar de tamaño molecular (Fig. 1 carril 1 y 5). En forma adicional, en las cepas UCD 67-210 y UCD 67-385 se observan bandas que migran más rápido que el DNA cromosómico (Fig. 1 carriles 2 y 3 respectivamente), que corresponden a elementos genéticos extracromosómicos. La naturaleza de estos plásmidos de la cepa UCD 67-385 corresponde a moléculas de RNA de doble hebra las cuales han sido descritas previamente (Castillo & Cifuentes, 1994). Sin embargo, los elementos extracromosómicos que se detectan en la cepa UCD 67-210 tal como lo muestra la figura 1 carril 2, presentan una movilidad electroforética diferente y número de moléculas mayores que lo observado en la cepa UCD 67-385. Estos plásmidos no han sido descritos con anterioridad y son el motivo del presente estudio.

La figura 2 muestra los resultados de un análisis utilizando diferentes tratamientos enzimáticos de los ácidos nucleicos de la cepa UCD 67-210. El tratamiento con DNasa I, elimina completamente el DNA cromosómico y hace desaparecer las bandas correspondientes a los elementos extracromosómicos de la cepa UCD 67-210, manteniéndose el RNA de bajo peso molecular, así como el dsRNA en la cepa UCD 67-385 (figura 2, carril 3 y 5, respectivamente). Sin embargo, el tratamiento de los ácidos nucleicos con RNasa A, en baja fuerza iónica, no tiene efecto sobre los elementos extracromosómicos de la cepa UCD 67-210, no obstante, el RNA de bajo peso molecular en ambas cepas analizadas y el dsRNA de la cepa UCD 67-385 es degradado completamente (figura 2, carril 4 y 6). La digestión de los ácidos nucleicos con RNasa A en presencia de un tampón de alta fuerza iónica, tampoco tiene efecto sobre los plásmidos de la cepa UCD 67-210, lo mismo que sobre las moléculas de dsRNA de la cepa UCD 67-385 (datos no mostrados). El tratamiento

con nucleasa S1, no posee efecto sobre los plásmidos de la cepa UCD 67-210, lo que sugiere la falta de regiones de hebra simple (resultado no mostrado). Todos estos análisis permiten afirmar que los elementos extracromosómicos presentes en la cepa UCD 67-210 corresponden a plásmidos de DNA de doble hebra.

Por otra parte, debido a que las bandas correspondientes a elementos genéticos extracromosómicos de la cepa UCD 67-210, de la figura 1 carril 2, aparecen poco nítidas, su determinación numérica no es exacta. Esta situación puede ser una consecuencia de la naturaleza de tales plásmidos, o que correspondan a moléculas de DNA lineal con proteínas unidas covalentemente en sus extremos. De hecho, dicho fenómeno ha sido observado en otros hongos portadores de plásmidos lineales (Stam et al. 1986 y Ligon et al. 1989). Stam et al. 1986, observaron que en *Kluyveromyces lactis*, la aparición de bandas de DNA plasmidial en geles de agarosa, dependía de la utilización de proteasas (proteínasa K) y SDS en el método de purificación del DNA. Además, observaron que para lograr una mejor resolución de las bandas, los geles de agarosa debían contener SDS, lo mismo que el tampón de corrida. Dado estos antecedentes y debido a que en la electroforesis de preparaciones de DNA de la cepa UCD 67-210, en las cuales la técnica no utilizó proteínasa K y SDS, las bandas de DNA plasmidial eran muy débiles o no se observaron, nosotros probamos en condiciones similares a las descritas para *K. lactis*, la posibilidad de obtener una mejor resolución de los plásmidos de *P. rhodozyma*.

En la figura 3 se observan los resultados de electroforesis en gel de agarosa, en presencia de SDS al 0.2%, de preparaciones de DNA de la cepa UCD 67-210, que incorporan el tratamiento con proteínasa K y SDS. Bajo estas condiciones es posible resolver al menos 6 bandas de DNA plasmidial cuyos tamaños moleculares corresponden a 6.5, 5.9, 5.0, 4.4, 3.2 y 2.5 kilobase respectivamente. De esta forma, nuestros resultados sugieren que, al igual que lo descrito para *K. lactis*, los plásmidos de DNA de *P. rhodozyma* corresponderían a moléculas de DNA lineales, con proteínas unidas en sus extremos. En forma adicional, como una caracterización preliminar de alguno de tales plásmidos, se realizó un análisis de restricción de las moléculas de 6.5 y 2.5 Kb con las endonucleasas BamHI y EcoRI. Los resultados se muestran en la figura 4 e indican que dichos elementos genéticos no presentan fragmentos de restricción de tamaño similar, sugiriendo que no están relacionados.

La presencia de un fenotipo killer, capaz de inhibir el crecimiento de cepas sensibles, asociado a plásmidos lineales ha sido descrito en algunos hongos (Niwa et al. 1981, Worsham & Bolen, 1990 y Radler et al. 1993). En

atención a esto y dadas las características de los plásmidos de la cepa UCD 67-210 de *P. rhodozyma*, se realizaron experimentos para determinar la presencia de un fenotipo killer en esta levadura. La tabla 1, muestra el resultado de dicho estudio e indica que la cepa UCD 67-210 es capaz de inhibir el crecimiento de la cepa UCD 67-383. Por el contrario, la misma cepa no posee efecto inhibitorio del crecimiento sobre la cepa UCD 67-385, en la cual se ha descrito un sistema killer asociado a elementos genéticos extracromosómicos de RNA de doble hebra (Castillo & Cifuentes, 1994).

Tabla 1. ACTIVIDAD KILLER EN *PHAFFIA RHODOZYMA*

La actividad killer se determinó a partir de la presencia de un halo de inhibición del crecimiento de la cepa césped alrededor de la cepa prueba

Cepas de prueba	Cepa Césped		
	UCD 67-385	UCD 67-383	UCD 67-210
UCD 67-385	-	+++	-
UCD 67-383	-	-	-
UCD 67-210	-	+++	-

+++ = Presencia de halo de inhibición de crecimiento, actividad killer.

- = Ausencia de halo de inhibición de crecimiento.

UCD = cepas de *Phaffia rhodozyma*.

CONCLUSIONES

Los antecedentes presentados en este trabajo permitieron determinar que, en la cepa UCD 67-210 de *P. rhodozyma* se observan un mínimo de seis bandas de DNA que corresponden a elementos genéticos extracromosómicos. Las características de dichos plásmidos sugieren que son moléculas lineales, con proteínas unidas en sus extremos y que probablemente tienen asociado un fenotipo killer. Debido a que *P. rhodozyma* es una levadura imperfecta (Miller et al. 1976), la existencia de plásmidos de DNA, permitirán la construcción de vectores de clonado, proporcionando enormes expectativas para el desarrollo de estudios genéticos en este organismo. Estos plásmidos permitirán la construcción de vectores de clonado para *P. rhodozyma*, e indudablemente contribuirán al desarrollo de los conocimientos genéticos de dicha levadura.

Figura 1

Electroforesis en gel de agarosa al 0,7% de ácidos nucleicos de tres cepas silvestres de *Phaffia rhodozyma*. Carril 1 y 5, DNA del fago lambda digerido con Hind III. Carril 2, cepa UCD 67-210. Carril 3, cepa UCD 67-385. Carril 4, cepa UCD 67-383.

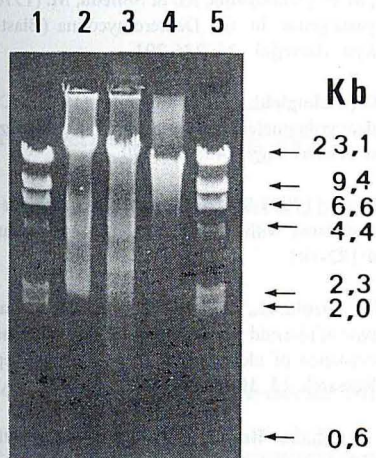


Figura 2

Electroforesis en gel de agarosa al 1% de ácidos nucleicos de dos cepas silvestres de *Phaffia rhodozyma* tratadas con nucleasas. Carril 1 y 8, DNA del fago lambda digerido con Hind III. Carril 2, ácidos nucleicos de la cepa UCD 67-210, control sin tratar. Carril 3, ácidos nucleicos de la cepa UCD 67-210 tratados con DNasa I. Carril 4, ácidos nucleicos de la cepa UCD 67-210 tratados con RNasa A en baja fuerza iónica. Carril 5, ácidos nucleicos de la cepa UCD 67-385 tratados con DNasa I. Carril 6, ácidos nucleicos de la cepa UCD 67-385 tratados con RNasa A en baja fuerza iónica y carril 7, ácidos nucleicos de la cepa UCD 67-385 control sin tratamiento.

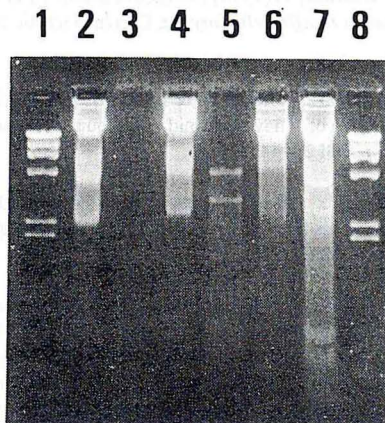


Figura 3

Electroforesis de DNA de la cepa UCD 67-210 de *Phaffia rhodozyma* en gel de agarosa al 1%, en presencia de 0.2% SDS. Carril 1 y 6, DNA del fago lambda digerido con Hind III. Carril 2 al 5, DNA de la cepa UCD 67-210. En el lado izquierdo las flechas indican la posición de los plásmidos.

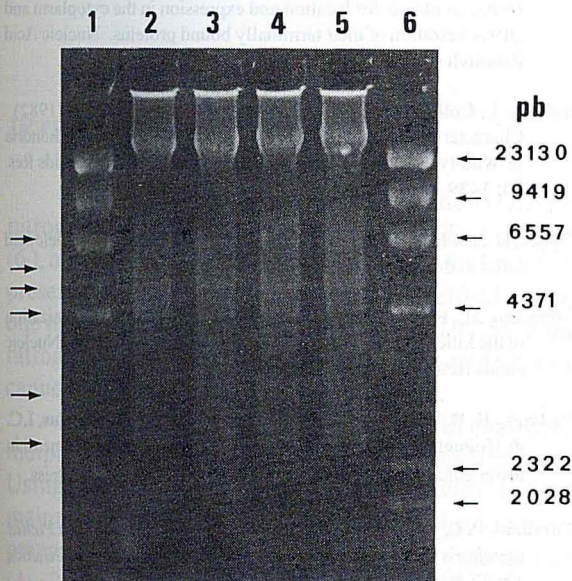
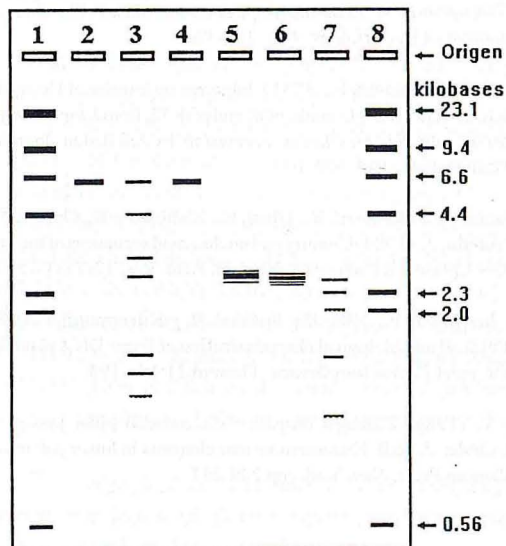


Figura 4

Representación esquemática de los resultados de digestiones de los plásmidos de 6.5 y 2.5 kb de *Phaffia rhodozyma*, observados en un gel de agarosa al 0,7%. Carril 1 y 8, DNA del bacteriófago lambda digerido con Hind III. Carril 2, DNA del plásmido 6.5 kb. Carril 3, plásmido 6.5 kb digerido con BamHI. Carril 4, plásmido 6.5 kb tratado con EcoRI. Carril 5, plásmido 2.5 kb. Carril 6 plásmido 2.5 kb tratado con EcoRI. Carril 7, plásmido 2.5 kb tratado con BamHI.



REFERENCIAS

- An Gil-Hwan, Schuman D.B. & Johnson, E. (1989). Isolation of *Phaffia rhodozyma* mutants with increased astaxanthin content. *Applied and Environmental Microbiology* 55: 116-124.
- Böckelmann, B.B., Osiewacz, H.D., Schmidt, F.R. & Schulte, E. (1986). Extrachromosomal DNA in fungi, organization and function. In: *Fungal Virology*. K.W. Buck (Ed.) Cap 9. C.R.C. Press. N. York, pp. 238-283
- Castillo, A. & Cifuentes, V. (1993) RNA de doble hebra asociado a partículas tipo virus en *Phaffia rhodozyma*. *Anal. Microbiol.* 1: 63-66.
- Castillo, A. & Cifuentes, V. (1994) Presence of double-stranded RNA mycoviruses in *Phaffia rhodozyma*. *Current. Genetic* 26: 364-368
- Collins, R.A., Stohl, L.L., Cole, M.D. & Lambowitz, A.M. (1981). Characterization of a novel plasmid DNA found in mitochondria of *N. crassa*. *Cell* 24: 443-448.
- Finkler, A., Koltin, Y., Barash, I., Sneh, B. & Pozniak, D. (1985) Isolation of a virus from virulent strains of *Rhizoctonia solani*. *J. Gen. Virol.* 66:1221-1232.
- Futcher, A. B. (1988). The 2 µm circle plasmid of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 4:27-40.
- Futcher, A. B. & Cox, B.S. (1983). Maintenance of the 2 µm circle plasmid in populations of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biology* 154: 612-622.
- Garber, R.C., Turgeon, B.G. & Voder, O.C. (1984). A mitochondrial plasmid from the plant pathogenic fungus *Cochliobolus heterostrophus*. *Mol. Gen. Genet.* 196: 301-307.
- Ghabrial, S. A. (1986) A transmissible disease of *Helminthosporium victoriae*: evidence for a viral etiology. En Buck KW (ed) *Fungal virology*. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 163-176.
- Gunge, N., Tamaru, A., Ozawa, F. & Sakaguchi, K. (1981). Isolation and characterization of linear deoxyribonucleic acid plasmids from *Kluyveromyces lactis* and the plasmid-associated killer character. *Journal of Bacteriology*. 145: 382-390.
- Gunge, N. & Sakaguchi, K. (1981). Intergeneric transfer of Deoxyribonucleic Acid killer plasmids, pGK and pGK12, from *Kluyveromyces lactis* into *Saccaromyces cerevisiae* by cell fusion. *Journal of Bacteriology*. 147 :155-160.
- Hishinuma, F., Nakamura, K., Hirai, K., Nishizawa, R., Gunge, N. & Maeda, T. (1984) Cloning and nucleic acid sequences of the linear DNA plasmids from yeast. *Nucleic. Acid. Res.* 12:7581-7587.
- Ligon, J., Bolen, P., Hill, D., Bothast, R. y Kurtzmann, C. (1989) Physical and biological characterization of linear DNA plasmid of the yeast *Pichia inositovora*. *Plasmid* 21:185-194.
- Koltin, Y. (1986) *Ustilago maydis* virus-encoded killer system. En Leander A. (ed) *Extrachromosomal elements in lower eukaryotes*. Plenum Press, New York, pp 239-257.
- Mertz, B.A., Ward, T.E., Welker, D.L. & Williams, K.L. (1983). Identification of an endogenous plasmid in *Dictyostelium discoideum*. *EMBO Journal* 2: 515-519.
- Meinhardt, F., Kempken, F., Kämper, J. & Esser, K. (1990). Linear plasmids among eukaryotes: fundamentals and application. *Current Genetics* 17: 89-95.
- Miller, M.W., Yoneyama, M. & Soneda, M. (1976). *Phaffia*, a new yeast genus in the Deuteromycotina (Blastomycetes). *Int. J. Syst. Bacteriol.* 26: 286-291.
- Niwa, O., Sakagichi, K. & Gunge, N. (1981). Curing of the killer deoxyribonucleic acid plasmids of *Kluyveromyces lactis*. *J. of Bacteriology* 148: 988-990.
- Nuss, D. L. (1987). Surprising structural properties of genetic elements associated with biological control of chestnut blight. *BioEssays* 6:182-183.
- Orii, H., Suzuki, K., Tanaka, Y. and Yanagisawa, K. (1987). A new type of plasmid from a wild isolate of *Dictyostelium* species: the existence of closely situated long inverted repeats. *Nucleic Acid Research*. 15: 1097-1107.
- Peery, T., Shabat-Brand, T., Steinlauf, R., Coltin, I. & Bruenn, J. (1987). Virus encoded toxin of *Ustilago maydis*. Two polypeptides are essential for activity. *Mol. Cell. Biol.* 7:470-477.
- Radler, F., Herzberger, S., Schönig y Schwarz P. (1993). Investigation of a killer strain of *Zygosaccharomyces bailii*. *Journal of General Microbiology*. 139:495-500.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning*. A laboratory manual. Eds. C.S.H. Press. Cold Spring Harbor, New York.
- Stam, J. C., Kwakman, E., Meijer, M. y Stuitje, A. (1986). Efficient isolation of the linear DNA killer plasmid of *Kluyveromyces lactis*: evidence for location and expression in the cytoplasm and characterization of their terminally bound proteins. *Nucleic Acid Research* 14: 6871-6884.
- Stohl, L. L., Collins, R. A., Cole, M. D. & Lambowitz, A.M. (1982). Characterization of two new plasmid DNAs found in mitochondria of wild-type *Neurospora intermedia* strains. *Nucleic Acids Res.* 10: 1439-1444.
- Tipper, D.J. & Bostian, K. A. (1984). Double-stranded ribonucleic acid killer system in yeasts. *Microbiol. Reviews.* 48:125-156.
- Tomasino, M., Ricci, S. & Galeotti, C.L. (1988). Genome organization of the killer plasmid pGKL2 from *Kluyveromyces lactis*. *Nucleic Acids Research*. 16: 5863-5878.
- Wickner, R. B., Hinnebusch, A., Lambowitz, A.M., Gunsalus, I.C. & Hollaender, A. (Eds.) (1986). *Extrachromosomal elements in lower eukaryotes*. Basic Life Sciences Vol 40. Plenum Press.
- Worsham, P. L. y Bolen, P. L. (1990). Killer toxin production in *Pichia acaciae* is associated with linear DNA plasmids. *Current Genetics* 17: 77-80.