

**AISLAMIENTO E IDENTIFICACION MOLECULAR DE LEVADURAS DEL  
 TERRITORIO ANTARTICO CHILENO**



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

**Mario Esteban Carrasco Troncoso**

**Agosto 2011**

**Santiago-Chile**

Director de Tesis: Dr. Marcelo Baeza Cancino.

UCH-FC  
Biotecnología

CB13

C.1

ESCUELA DE PREGRADO – FACULTAD DE CIENCIAS – UNIVERSIDAD DE CHILE



## INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TITULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por el Sr.

---

**MARIO ESTEBAN CARRASCO TRONCOSO**

### “AISLAMIENTO E IDENTIFICACION MOLECULAR DE LEVADURAS DEL TERRITORIO ANTARTICO CHILENO”

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

*Dr. Marcelo Baeza C.*  
**Director de seminario de título**

**Comisión de Evaluación**

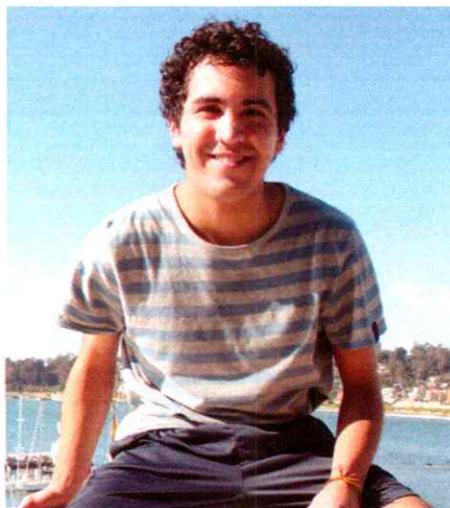
*Dra. Claudia Stange*  
**Presidenta Comisión**

*Dra. Margarita Carú*  
**Evaluador**



*[Signature]*  
*[Signature]*  
*[Signature]*

## BIOGRAFÍA



Nací un domingo 25 de Octubre de 1987 en la ciudad de Santiago, hijo del matrimonio entre Mario y Ana. Realicé la enseñanza básica en la escuela D-555, ubicada en la Comuna de la Cisterna. Posteriormente ingresé al liceo Andrés Bello A-94 ubicado en la Comuna de San Miguel, en donde cursé la enseñanza media. Debo decir que no siempre quise ser científico, sino que desde muy pequeño compatibilicé los estudios con mi pasión que es el fútbol viendo como una opción sería convertirme en jugador profesional. Al pasar esta etapa llegó el momento de optar por una carrera profesional. Elegí biotecnología porque es una carrera que permite vincular los conocimientos científicos básicos que se van adquiriendo con alguna idea innovadora que tenga aplicabilidad industrial. Dentro de este proceso de formación ingresé al laboratorio de genética el año 2008 a realizar una unidad de investigación sobre actividad micocida entre diferentes cepas de la levadura *Xantophyllomyces dendrohous*. Con el paso del tiempo realicé dos unidades de investigación más, hasta que cambie de tema en el año 2010 en donde comencé a realizar esta memoria de título sobre identificación molecular de levaduras antárticas. Actualmente soy estudiante del Magíster en Ciencias Biológicas de la facultad de Ciencias de la Universidad y continuó con la línea de investigación que comencé en este trabajo.



**A mi familia**

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco en primer lugar a mi papá y mamá, Mario y Ana que fueron las personas que me dieron la vida y me han entregado valores que hoy me hacen ser una mejor persona. Sin ustedes esta carrera no la hubiera sacado adelante, este trabajo es para ustedes. A mis hermanas Lore y Caro que independientemente de las peleas y encontrones han sido apoyo en momentos difíciles, las quiero mucho. A mi perro "Rambo" que me da alegrías a diario con sus tonteras y con su compañía, en sus paseos me ayuda a escapar un poco de la rutina.

Al Laboratorio de Genética de la Facultad de Ciencias que me abrió las puertas para realizar este trabajo y desarrollarme como científico. Al Dr. Marcelo Baeza por integrarme en su grupo de trabajo, por los consejos y por los retos cuando fue necesario. Al Dr. Víctor Cifuentes por permitirme realizar la tesis en su laboratorio, por las bromas sobre colo-colo y sobre todo por dejarme seguir trabajando después de mis episodios con la cafetera. A la Dony, Jenny y Salva por su buena disposición para responderme las preguntas que les hice y ayudarme en todo lo que necesité, gracias. A mis compañeros de Lab, no los nombro a todos porque son muchos, pero principalmente a mi gran grupo de trabajo: Ori, Natty, Pablo y JuanMa que estuvieron siempre ahí cuando los necesité, haciendo el desarrollo de este trabajo mucho más ameno. Además de una que otra salida extraprogramática.

A mis compañeros de fútbol de la facultad: Chilo, Isma, Hernán, Perú, Isra, Chiquiño, Gonza, Luchito y muchos otros, por hacer más llevadera esta etapa y por haber gritado campeón como nunca antes lo había hecho la facultad.

A mis compañeros de generación: Pablo, Jose, Lea, Lucho y Pelela por los buenos momentos que pasamos tanto en la U como en cada junta de estudio que inventábamos, en donde el estudio precisamente era escaso y la comida y tallas abundaban.

Por último agradezco a mis amigos: JuanMa, Álvaro, Roberto, Sandy, Raúl, Mylene, Carol, Karina, Ori, Fer, Sandra, Dani y Lele, por estar siempre ahí en las buenas y en las malas y aguantar mi mal genio. Especialmente a Álvaro y Roberto que nos conocemos desde niños y hemos mantenido nuestra amistad, sin importar los distintos caminos que hemos tomado. Finalmente agradezco al Instituto Chileno Antártico que a través de su proyecto T-23-09 financió este trabajo.



## INDICE

Indice General.....	2
Indice de figuras.....	5
Indice de tablas.....	6
Abreviaturas.....	7
Resumen.....	8
Abstract.....	10
1. Introducción.....	12
1.1 Regiones frías del planeta.....	12
1.2 Microorganismos adaptados a la vida a bajas temperaturas.....	13
1.3 Levaduras adaptadas al frío.....	14
1.4 Taxonomía de levaduras.....	15
1.4.1 Identificación Molecular de levaduras.....	16
1.4.2 Técnicas basadas en el DNA nuclear.....	18
1.4.3 Técnicas basadas en el análisis del rDNA.....	19
1.5 Identificación de Levaduras Antárticas.....	21
Objetivos.....	23
Materiales y Métodos.....	24
2.1 Materiales.....	24
2.2 Métodos.....	24

2.2.1 Muestras de agua.....	24
2.2.2 Muestras de suelo.....	26
2.2.3 Condiciones de cultivo.....	27
2.2.4 Procesamiento de muestras de suelo.....	27
2.2.5 Aislamiento de levaduras y condiciones de crecimiento.....	27
2.2.6 Caracterización Macroscópica y Microscópica.....	27
2.2.7 Métodos de Preservación.....	28
2.2.8 Extracción de DNA genómico.....	28
2.2.9 Amplificación del rDNA.....	28
2.2.1.0 Purificación productos de amplificado.....	29
2.2.1.1 Secuenciación automática de DNA y análisis de datos.....	29
3. Resultados.....	31
3.1 Aislamiento de levaduras.....	31
3.1.1 Muestras de suelo.....	31
3.1.2 Muestras de Agua.....	33
3.2. Identificación molecular de los aislados.....	36
3.2.1 Extracción DNA Genómico de las levaduras seleccionadas.....	36
3.2.2 Amplificación, purificación y secuenciación de la región ITS...38	
3.2.3 Secuenciación y análisis bioinformático de los productos de amplificado obtenidos para los dominios D1/D2.....	50
4. Discusión.....	53
5. Conclusiones.....	66

6. Proyecciones.....	67
7. Bibliografía.....	68
8. Anexo.....	76
8.1 Temperaturas de crecimiento.....	76
8.2 Nombres y características sitios de muestreo.....	79

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Resolución taxonómica de algunas técnicas usadas en identificación molecular.....	17
Figura 2. Organización del rDNA en hongos y la localización del espaciador transcrito interno .....	21
Figura 3. Dispositivo de filtración de muestras de agua "Monitor 55-Plus™" .....	25
Figura 4. Grupos geográficos y localización sitios de Muestreo en la Isla Rey Jorge.....	26
Figura 5. Levaduras aisladas desde muestras de suelo.....	32
Figura 6. Levaduras aisladas desde muestras de Agua.....	34
Figura 7. Extracción de DNA genómico. ....	37
Figura 8. Amplicones de la región ITS1-5.8S-ITS2 a partir de levaduras aisladas de muestras de suelo y agua desde la Antártica .....	40
Figura 9. Levaduras identificadas como Ascomycetes .....	47
Figura 10. Cladograma Neighbor- Joining de secuencias ITS obtenidas de levaduras Basidomicetes comparadas con secuencias depositadas en Genbank. ....	49

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Grupos macromorfológicos.....	35
Tabla 2. Identificación de grupos de levaduras con 100% de identidad de secuencia para la región ITS1-5.8S-ITS2. ....	41
Tabla 3. Identificación de aislados de levaduras a través de la secuenciación de la región ITS1-5.8S-ITS2.....	42
Tabla 4. Diversidad de géneros en sitios de muestreo.....	44
Tabla 5. Identificación de levaduras a través de secuenciación de los dominios D1/D2 del rDNA.....	51
Tabla 6. Especies identificadas en este estudio aisladas en otras regiones frías del planeta.....	55

## ABREVIATURAS

BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
EDTA	Acido etilendiaminotetracético
ITS	Espaciador transcrito interno
RAPD	Polimorfismo del DNA amplificado aleatoriamente
rDNA	DNA ribosómico
REA-PGFE	Análisis de restricción enzimático a través de electroforesis en gel de campo pulsado
TAE	Amortiguador Tris- ac.acético- EDTA
TE	Amortiguador Tris- EDTA
UV	Luz ultravioleta
YM	"Yeast Medium"

## RESUMEN

Los ambientes extremos son considerados reservorios de biodiversidad, y en ellos habitan una gran cantidad de microorganismos que poseen características distintas a sus contrapartes mesófilos. Esto ha motivado a realizar investigaciones para aislar microorganismos desde regiones frías del planeta, ya que poseen gran importancia ecológica y posibles aplicaciones biotecnológicas. El continente Antártico representa un reservorio microbiológico poco explorado, reportándose algunas levaduras nuevas y otros aislados que aún no han sido identificados. En el caso del territorio Antártico chileno, no existen estudios de la biodiversidad de levaduras presentes.

El objetivo de la presente memoria de título fue precisamente estudiar la microbiota de levaduras en el territorio antártico chileno, para lo cual se recolectaron muestras de suelo y de agua desde la isla Rey Jorge. Utilizando diferentes condiciones de cultivo se logró aislar gran cantidad microorganismos, los que fueron seleccionados y agrupados de acuerdo a sus características macromorfológicas. Aislados representativos de cada uno de los 64 grupos obtenidos fueron identificados a nivel molecular. Para ello se amplificaron y secuenciaron los espaciadores transcritos internos (ITS) y los dominios D1/D2 del DNA ribosómico. Los amplicones obtenidos fueron secuenciados, las secuencias analizadas bioinformáticamente y comparadas con la base de datos del NCBI. Del total de levaduras identificadas, el 93% correspondieron a levaduras Basidiomicetes mientras que el 7% restante a levaduras Ascomicetes. Las especies identificadas en este trabajo pertenecieron a los géneros *Sporidiobolus*, *Rhodotorula*, *Mrakia*, *Cryptococcus*, *Leucosporidiella*, *Leucosporidium*, *Dioszegia*,

*Wickerhamomyces*, *Candida* y *Metschnikowia*. La especie más ubicua fue la levadura *Sporidiobolus salmonicolor*. Previamente no se habían reportado levaduras pertenecientes a los géneros *Sporidiobolus* y *Wickerhamomyces* desde la Antártica, es más los aislados identificados como las levaduras *S. salmonicolor*, *W. anomalus* y *M. bicuspidata* corresponden a las primeras especies (dentro de estos géneros) aisladas desde regiones frías del planeta.

Finalmente, 18 aislados no pudieron ser identificados usando estos marcadores moleculares como herramienta taxonómica, indicándonos que si bien la identificación molecular es una manera rápida y sencilla de identificar especies, son necesarios otros estudios complementarios para identificar correctamente los aislados ambientales.

## ABSTRACT

The extreme environments are considered reservoirs of biodiversity and are colonized by microorganisms that have different characteristics related to the mesophilic counterparts. This has motivated research of microorganisms from cold regions of the planet, since these organisms have high ecological importance and potential biotechnological applications.

The Antarctic continent is an unexplored microbial reservoir, and there are works reporting new yeasts and other that still are unidentified. In the case of Chilean Antarctic territory there are no studies of the yeast biodiversity. The aim objective of this work was to isolate and to identify yeasts from soil and water samples of the Chilean Antarctic territory, specifically from King George Island. For that, different culture conditions were used, and the yeast-like colonies obtained were grouped according to their macromorphological characteristics. A total of 64 groups were obtained and representatives of each one were selected and used for molecular identification. For that, the internal transcribed spacer (ITS) and the D1/D2 domain of the rDNA region were amplified, sequenced and compared against NCBI database. A high percentage of the yeast identified (93%) were Basidiomycetes. Species belonging to *Sporidiobolus*, *Rhodotorula*, *Mrakia*, *Cryptococcus*, *Leucosporidium*, *Dioszegia*, *Wickerhamomyces*, *Candida* and *Metschnikowia* genera were identified. We isolated for the first time representatives of *Sporidiobolus* and *Wickerhamomyces* genera from the Antarctica, and furthermore, the yeasts identified as *S. salmonicolor*, *W. anomalus* and *M. bicuspidata* are the firsts isolates reported from cold regions of the planet. The most ubiquitous yeast

was *Sporidiobolus salmonicolor*. Finally, there were eighteen isolates that we did not identify using molecular taxonomy, indicating that although the molecular identification methodology is a quick and easy way to identify species, supplementary studies are needed to correctly identify environmental isolates.

## INTRODUCCIÓN

En nuestro planeta existe una gran variedad de climas que favorecen el desarrollo y la sobrevivencia de diferentes organismos, pero también existen hábitats en los cuales no pueden o les es muy difícil sobrevivir. Dentro de los ambientes extremos en los que se ha observado la presencia de organismos se pueden nombrar: fuentes termales, salares, volcanes y regiones frías.

### 1.1.Regiones frías del planeta

Las dos principales zonas terrestres frías en el planeta son el círculo polar ártico y el círculo polar antártico. Ambas zonas se caracterizan por tener constantemente temperaturas bajo 0°C, altos niveles de humedad en el aire, presencia de fuertes vientos y escasas precipitaciones durante el año, siendo las regiones más secas del planeta. La Antártica es un continente ubicado dentro del círculo polar antártico y posee una superficie aproximada de 14 millones de kilómetros cuadrados de los cuales sólo un 2% no está cubierto de hielo o nieve. Las características mencionadas la convierten en uno de los hábitats más extremos conocidos por el hombre, con condiciones hostiles para la vida, desde un punto de vista antropocéntrico.

## 1.2 Microorganismos adaptados a la vida a bajas temperaturas

Los microorganismos que son capaces de crecer a temperaturas cercanas a 0°C se denominan psicrófilos. Este término ha variado a medida que se han aislado y estudiado distintos microorganismos desde regiones frías. Los términos psicrófilos y psicotrópicos (originalmente descritos para bacterias) son usados para designar a aquellos microorganismos “amantes del frío”. De acuerdo a esta clasificación, un hongo psicrófilico es aquel que puede crecer a 0°C, que tiene una temperatura óptima de crecimiento  $\leq 15^{\circ}\text{C}$  y una temperatura máxima de crecimiento  $\leq 20^{\circ}\text{C}$ . Un hongo psicotrópico es aquel que puede crecer a 0°C y su máxima temperatura de crecimiento es cercana a 20°C. Actualmente, el término psicotrópico ha sido reemplazado por el término psicotolerante, siendo los principales microorganismos aislados desde el Ártico y la Antártica (Robinson, 2001). Esta predominancia se debe a que en algunos períodos del año la radiación solar incrementa la temperatura del suelo sobre los 15°C en estas regiones (Möller y Dreyfuss, 1996).

La colonización de estos ambientes fríos por microorganismos presenta una serie de dificultades, tales como: la formación de cristales de hielo, la disminución en la permeabilidad de la membrana, la reducción de la tasa de reacciones bioquímicas y el incremento en la viscosidad del medio (Cavicchioli y Cols., 2002). Para superar estas dificultades los microorganismos han desarrollado una serie de adaptaciones, como por ejemplo, la presencia de ácidos grasos insaturados en vez de ácidos grasos saturados en la membrana incrementando su fluidez (Rothschild y Mancinelli, 2001). Por otra parte, existen dos estrategias principales para que los microorganismos sobrevivan en

ambientes en donde la temperatura esta bajo el punto de congelamiento del agua, ya sea evitando la formación de cristales de hielo dentro de las células, o bien si los cristales se forman, impedir el daño durante el descongelamiento de estos. Ambas adaptaciones son llevadas a cabo por un tipo de proteínas llamadas anticongelantes (Rothschild y Mancinelli, 2001). Sin duda uno de los procesos más importantes para el éxito de los microorganismos en estos ambientes es la adaptación de sus enzimas. Se han realizado estudios en los cuáles se ha demostrado que los microorganismos psicrófilos sintetizan enzimas extracelulares que metabolizan fuentes de carbono complejas, siendo indispensables en el reciclaje de nutrientes y producción de biomasa en ecosistemas fríos. Las altas actividades catalíticas a bajas temperaturas y las especificidades inusuales de estas enzimas las hacen interesantes para posibles aplicaciones biotecnológicas (Rusell, 2000).

### **1.3. Levaduras adaptadas al frío**

En numerosas publicaciones se ha descrito y caracterizado enzimas adaptadas al frío producidas por bacterias, en cambio, existe poco conocimiento acerca de enzimas producidas por levaduras psicrófilas (Margesin y Cols., 2001). Este es un campo activo de investigación, debido a que los ambientes extremos son considerados reservorios de biodiversidad microbiana y por ende posibles fuentes de nuevos genes y proteínas, razón por la cual se han realizado esfuerzos para aislar levaduras desde regiones frías de Japón, los Alpes Italianos, las Montañas de Himalaya, los glaciares de agua dulce de la Patagonia Argentina y desde la Antártica (Butinar y cols., 2007; De García y cols., 2007;

Turchetti y cols., 2008; Connell y cols., 2008). Uno de los objetivos de estos trabajos es identificar nuevas enzimas que puedan tener alguna aplicabilidad a nivel industrial en procesos que requieren bajas temperaturas, como en la síntesis de compuestos orgánicos altamente volátiles (Bergauer y Cols., 2005), o en la industria textil y de alimentos, utilizando enzimas que sean capaces de degradar aceites, grasas y pigmentos, para generar productos que limpien con mayor eficiencia (Babu y Cols., 2008). En la industria alimenticia, el uso de enzimas con alta actividad catalítica a temperaturas menores a 20 °C limita la proliferación de microorganismos contaminantes y también se disminuyen los costos de producción.

Derivado de estos estudios se han aislado e identificado numerosas levaduras, pero que pertenecen a unos pocos géneros: *Cryptococcus*, *Mrakia*, *Cystofilobasidium*, *Aureobasidium*, *Naganishia*, *Rhodotorula*, *Rhodosporidium*, *Leucosporidiella*, *Dioszegia*, *Sporobolomyces*, *Udeniomyces* y *Candida*; y un número no despreciable de aislados no han sido identificados (De García y Cols., 2007, Shivaji y Prasad, 2008, Turchetti y Cols., 2008).

#### **1.4 Taxonomía de levaduras**

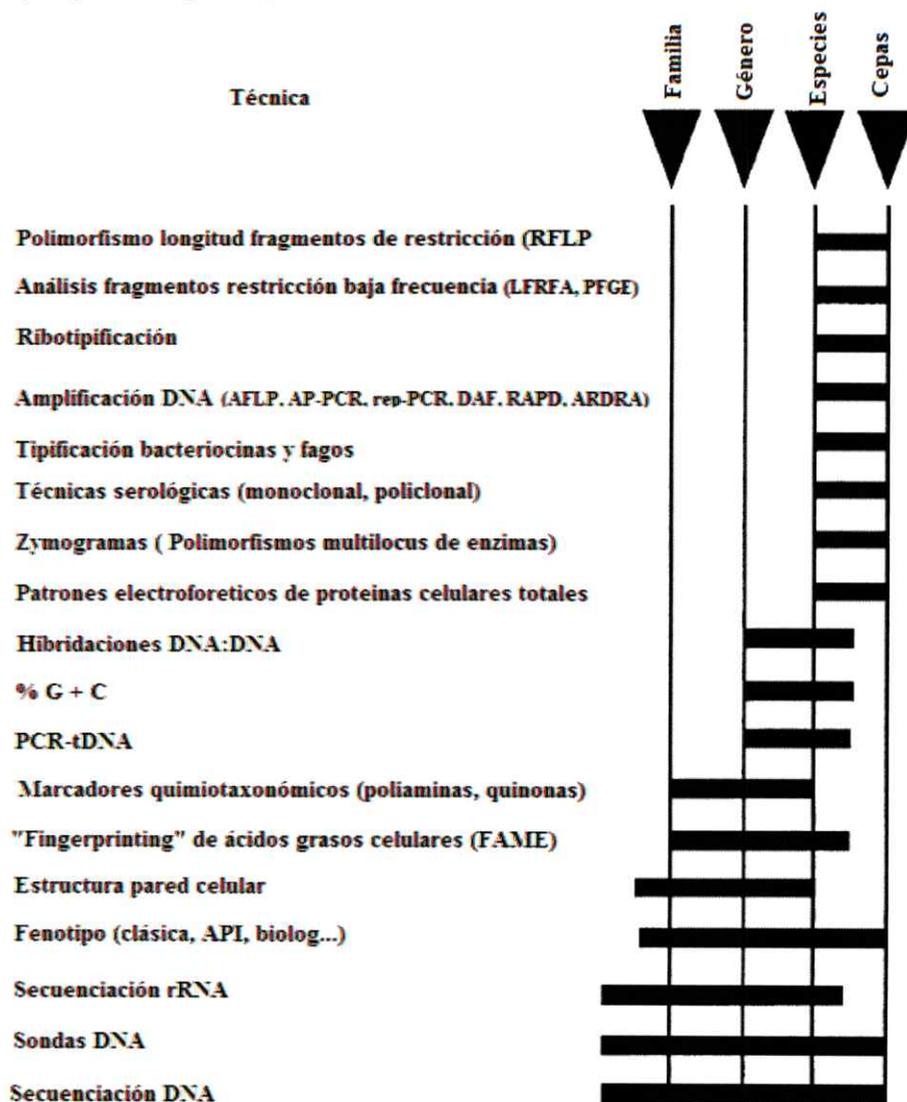
El sistema de clasificación comúnmente utilizado para la identificación de levaduras se basa en el análisis de caracteres fenotípicos y criterios fisiológicos, tales como fermentación y asimilación de sustratos (Kurtzman, 1994). Posteriormente, con el desarrollo de la microscopía electrónica de transmisión se describieron las fases

levaduriformes de Ascomicetes y Basidiomicetes, logrando distinguir las fases sexuales (teleomorfas) y vegetativas (anamorfas). Este hallazgo puso en evidencia los distintos estados de los ciclos de vida de las levaduras, que no eran distinguibles a través de la sistemática clásica. Por lo tanto ya no sólo se consideran las características fenotípicas para la clasificación, debido a que dos levaduras de una misma especie son nombradas de distinta forma dependiendo del estado del ciclo de vida en que se encuentren (Orberá, 2009). Otro criterio de identificación y clasificación de levaduras son las pruebas fisiológicas (asimilación de compuestos nitrogenados, requerimientos vitamínicos, resistencias a cicloheximida y termotolerancia) y bioquímicas (electroforesis de proteínas, análisis de los patrones de isoenzimas, número de unidades de isopreno en la coenzima Q, y cromatografía de ácidos grasos de cadena larga de la pared celular), sin embargo, estas han demostrado ser poco reproducibles al depender de las condiciones de cultivo y del estado fisiológico de las cepas al momento del análisis (Esteve-Zarzo y Cols., 1999). Debido a estas dificultades, se han desarrollado otros métodos de identificación basados en técnicas moleculares que tienen un mayor nivel de resolución taxonómico y que permite complementar los métodos convencionales de identificación antes mencionados.

#### ***1.4.1. Identificación Molecular de levaduras***

Los métodos moleculares que se han empleado tradicionalmente para tipificar levaduras se basan en el estudio de las moléculas de DNA y RNA. La primera técnica molecular que se utilizó fue la Hibridación DNA: DNA que permite resolver relaciones

filogenéticas a nivel de especie cuando dos levaduras son muy cercanas entre sí, pero no es capaz de resolver relaciones genéticas cuando dos levaduras se encuentran muy alejadas filogenéticamente (Kurtzman, 1994). Con el desarrollo de las tecnologías de DNA recombinante y secuenciación automática de DNA, han surgido numerosos métodos de tipificación de levaduras y que tienen una mayor resolución a nivel de género y especie (Figura 1).



**Figura 1:** Resolución taxonómica de algunas técnicas usadas en identificación molecular (adaptado desde Vandamme y Cols., 1996). Las barras negras horizontales muestran el rango de resolución taxonómico de cada técnica.

#### 1.4.2 Técnicas basadas en el DNA nuclear

Existen numerosas técnicas que emplean el DNA cromosómico de la levadura para identificar molecularmente aislados desde distintos orígenes, entre las principales podemos nombrar: Polimorfismo del DNA amplificado aleatoriamente (RAPD), microsatélites y Análisis de restricción enzimático a través de electroforesis en gel de campo pulsado (REA-PGFE). El RAPD se basa en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando partidores inespecíficos y bajas temperaturas de hibridación, condiciones que favorecen la amplificación de fragmentos polimórficos de DNA. Esta técnica se ha empleado para tipificar cepas clínicas del género *Candida* (Noumi y cols., 2009), pero presenta el inconveniente de tener baja reproducibilidad. Los microsatélites son secuencias repetidas simples e hipervariables presentes en el DNA; estas son amplificadas mediante PCR utilizando partidores específicos para cada tipo de microsatélite, por lo tanto su reproducibilidad es mayor. Los microsatélites se han utilizado para diferenciar cepas de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* presentes en el proceso de fermentación vínica (Vaudano y Garcia-Moruno, 2008). El método de REA-PGFE se ha empleado en la identificación de aislados de la levadura *Brettanomyces bruxellensis* en el proceso de producción de vino (Oelofse y Cols., 2009). Este método de identificación molecular se basa en la digestión del DNA nuclear con una enzima de restricción de corte poco frecuente y la posterior separación por electroforesis en gel de campo pulsado. El patrón de bandas resultante ha demostrado ser específico para cepas y tiene mejor discriminación que los microsatélites y el RAPD.

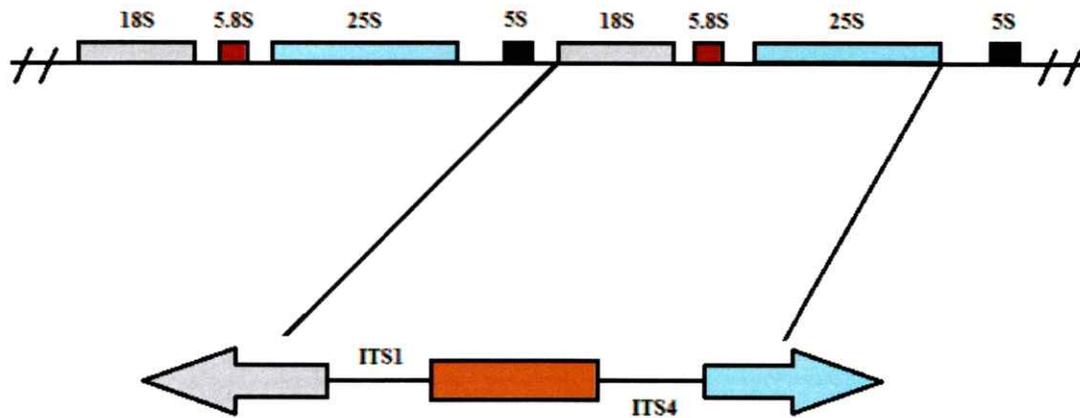
Aunque estos métodos son útiles para establecer relaciones filogenéticas cercanas, no permiten la identificación molecular de levaduras a partir de muestras ambientales sin alguna caracterización previa. Por ejemplo: si se comparan dos levaduras aisladas desde una misma muestra y se identifican a través de alguno de estos tres métodos, probablemente encontraremos diferencias a nivel de polimorfismos en el DNA, si corresponden a dos levaduras distintas. Este análisis nos revelará que ambas levaduras corresponden a aislados diferentes, pero no nos entregará como resultado a que género o especie pertenece cada uno de ellos. Una forma de lograr esta resolución son los métodos de identificación basados en el análisis de la secuencia de la región del DNA que contiene los genes ribosómicos (rDNA),

#### ***1.4.3 Técnicas basadas en el análisis del rDNA***

Los DNAs ribosómicos son una herramienta taxonómica poderosa ya que son altamente conservados y se encuentran en la mayoría de las células, siendo ampliamente utilizados en identificación molecular. En hongos, los genes ribosómicos son zonas repetitivas en el DNA que se encuentran en tándem existiendo en algunos casos entre 100 a 200 copias de esta región en el genoma (Srivastava y Schlessinger, 1991). Cada unidad repetitiva tiene una extensión de entre 8 y 12 kb y se subdivide a su vez en diferentes regiones. Los análisis de esta región han revelado zonas altamente conservadas como son la región 18S, 5,8S y 26S, y otras zonas variables como lo son los espaciadores transcritos internos ITS1 e ITS4 (ver Figura 2). Si bien existen varios trabajos en donde se han utilizado esta región para identificar aislados ambientales de

levaduras (Romo y Cols., 2010, Ferreira y Cols., 2010, Nagahama y Cols., 2001), aun así existen casos en los cuáles no es posible identificar correctamente aislados utilizando análisis de secuencias de esta región.

Por otra parte existe una región en el extremo 5' del gen que codifica para la subunidad mayor del ribosoma llamada dominio D1/D2, que ha demostrado ser útil para identificar especies (Guadet y cols., 1989), ya que ambos dominios presentan un gran polimorfismo a nivel de secuencia nucleotídica. El nivel de resolución de estos marcadores ha sido evaluado tanto para levaduras Ascomycetes (Kurtzman y Robnett, 1998) como Basidiomicetes (Fell y cols., 2000). Estas investigaciones demuestran que la mayoría de las especies estudiadas pueden ser identificadas a través del análisis de secuencia de los dominios D1/D2, pero al igual que la región ITS existen especies que no pueden ser identificadas utilizando esta aproximación. En el trabajo publicado por Scorzetti y colaboradores en el año 2002 se comparó la capacidad de identificación de ambas regiones para 450 cepas de 250 especies de levaduras. Como conclusión se obtuvo que ambos métodos son complementarios entre sí, y si bien la región ITS es más variable, existen casos en que especies estrechamente relacionadas fueron identificadas utilizando los dominios D1/D2.



**Figura 2:** Organización del rDNA en hongos y la localización de los espaciadores transcritos internos, adaptado desde (Srivastava y Schlessinger, 1991).

### 1.5 Levaduras Antárticas.

El primer reporte de levaduras desde la Antártica se realizó en el año 1960 (Menna, 1960), y hasta la fecha son pocos los estudios realizados. El género *Cryptococcus* es el con más especies de levaduras descritas desde esta región, siendo las especies *C. laurentii* y *C. albidus* las más ubicuas (Vishniac, 1985; Scorzetti y cols., 2000; Vishniac y Onofri, 2002; Thomas-Hall y cols., 2002a; Thomas-Hall y Watson, 2002b; Shivaji y Prasad, 2009). *Cryptococcus waticus* sp. corresponde a la especie del género más recientemente descrita, la que fue identificada mediante la secuenciación de la región D1/D2 y análisis comparativo de sus características fisiológicas y morfológicas con otras especies del mismo género (Guffogg y cols., 2004). En estudios recientes se han aislado nuevas especies de levaduras pertenecientes al género *Mrakia*: *M. psychrophila* (Xio y Zhou, 2007), *M. robertii*, *M. blollopis* y una levadura anamórfica relacionada llamada *Mrakiella niccombsii* (Thomas-Hall y cols., 2010); y dos nuevas

especies pertenecientes al género *Dioszegia*: *D. antártica* y *D. cryoxerica* (Connell y cols., 2010).

Las investigaciones realizadas se remitían al aislamiento, caracterización e identificación de levaduras, desde escasas muestras no representativas de una zona y que en muchos casos correspondía a ambientes contaminados. Sólo en el año 2008 en el trabajo realizado por Connell y colaboradores (Connell y cols., 2008) se estudió por primera vez la biodiversidad de levaduras presentes en el territorio antártico, específicamente en “South Victoria Land”. Los autores obtuvieron numerosos aislados de levaduras, donde el 89% correspondieron a levaduras basidiomicetes, de las cuáles el 43% pueden representar especies no descritas, reflejando el desconocimiento de la microbiota de levaduras cultivables en el territorio antártico.

En la presente memoria de título se aislaron levaduras a partir de muestras de suelo y de agua obtenidas en la isla Rey Jorge perteneciente al territorio antártico. Los aislados obtenidos fueron caracterizados a nivel macro y micromorfológico e identificados a través del análisis de secuencias del espaciador transcrito interno, y de los dominios D1/ D2 de la subunidad mayor de rDNA ribosómico cuando fue necesario.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo General**

Aislar e identificar levaduras desde el territorio Antártico chileno

### **Objetivos específicos**

- Aislamiento de levaduras desde muestras de suelo y de agua usando diferentes condiciones de cultivo.
- Optimización del método de extracción de DNA genómico desde las levaduras.
- Amplificación por PCR del espaciador transcrito interno del RNA ribosómico (ITS) y del dominio D1/D2.
- Secuenciación y análisis bioinformático de los productos de amplificación obtenidos.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. Materiales

**Ácidos nucleicos.** Como marcador de peso molecular se utilizó el marcador 1kb y el marcador de peso molecular 100 pb, ambos adquiridos de New England Biolabs.

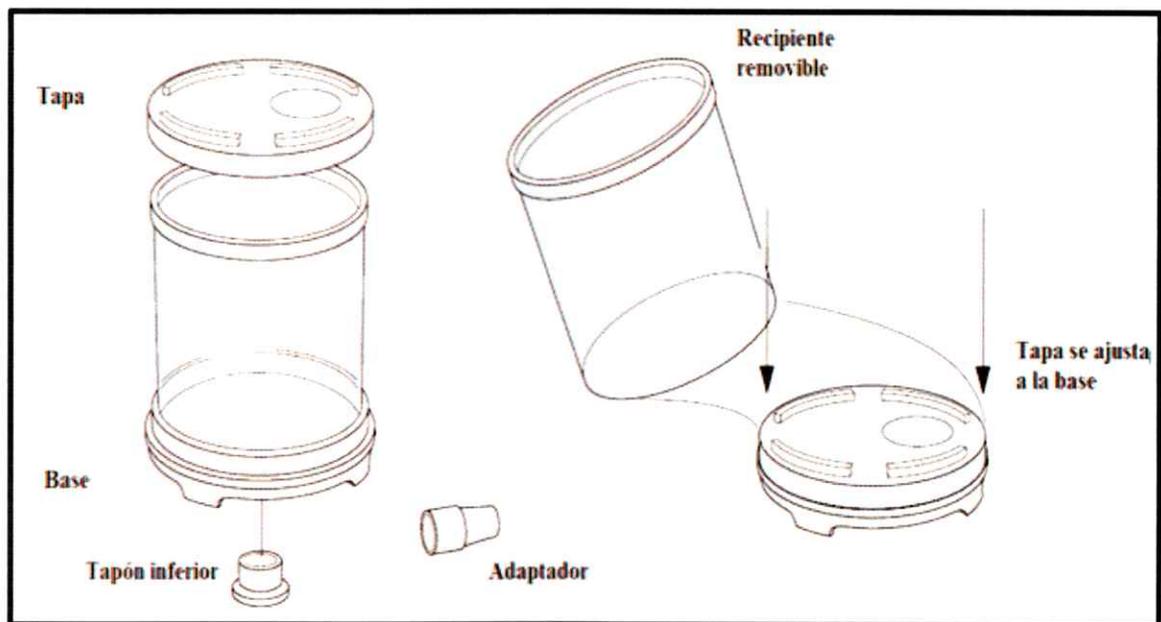
**Kits.** Para la extracción de DNA genómico total se utilizó el “Wizard Genomic DNA Purification kit” adquirido de Promega. Para la filtración de muestras de agua se utilizó la unidad “Monitor 55-Plus<sup>TM</sup>” adquirida desde Millipore.

**Reactivos Químicos.** Los componentes de los medios de cultivo o reactivos químicos puntuales, se adquirieron de Sigma Chemical, Merk y Difco Laboratorios. El antibiótico cloranfenicol fue adquirido de Sigma.

### 2.2. Métodos

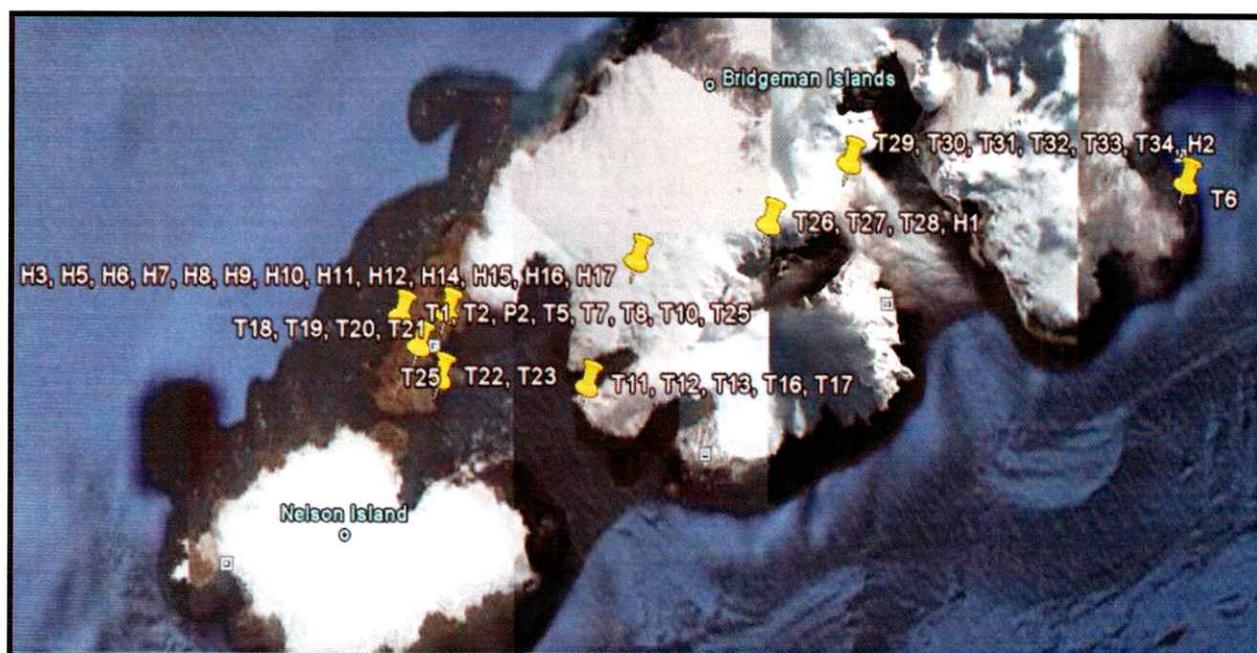
**Métodos de biología molecular.** Electroforesis y PCR se realizaron de acuerdo al manual de Sambrook y Cols. (1989).

**2.2.1 Muestras de agua:** Un total de 14 muestras de agua marina y dulce fueron recolectadas. Para ello volúmenes variables (200-500 ml) se filtraron a través del aparato de filtración de aguas “Monitor 55-Plus<sup>TM</sup>”. Este dispositivo está compuesto por: 1) Una base que posee un filtro de celulosa de 0,45µm. 2) Un recipiente al que se agrega el medio que se desea filtrar y 3) Una tapa que se ajusta a la base (Ver figura 3). Una vez filtradas las muestras se adicionó 2 ml de cultivo Millipore a la base del dispositivo.



**Figura 3:** Dispositivo de filtración de muestras de agua “Monitor 55-Plus<sup>TM</sup>”, adaptado desde ([www.millipore.com](http://www.millipore.com)).

**2.2.2 Muestras de suelo:** Los sitios de recolección (33) de muestras de suelo desde Isla Rey Jorge ( $62^{\circ}02'S$   $58^{\circ}21'W$  /  $62.033^{\circ}S$   $58.35^{\circ}W$ ) se agruparon en grupos geográficos, de acuerdo a la cercanía de cada uno de ellos (Figura 4). Las muestras se depositaron en tubos “Falcon” estériles, y se almacenaron a  $-20^{\circ}C$  hasta su procesamiento.



**Figura 4:** Grupos geográficos y localización sitios de Muestreo en la Isla Rey Jorge. T y P muestra de suelo; H muestra de agua. Los símbolos amarillos representan a cada grupo geográfico, que corresponden a las muestras que se encuentran cercanas geográficamente. Adaptado desde google earth.

### **2.2.3 Condiciones de cultivo**

**Medio de cultivo:** Para preservar y crecer levaduras se utilizó el medio de cultivo YM (0,3 % Extracto de levadura, 0,3 % Extracto de malta y 0,5 % Peptona) suplementado con 2 % de glucosa. Para la forma semisólida se adicionó agar microbiológico (Oxoid) al 1,5 %.

**2.2.4 Procesamiento de muestras de suelo:** A tubos “Falcon” estériles se les agregó 5 g de cada una de las muestras y 5 ml de agua estéril, y se agitó en vórtex por 10 min. Mediante precipitación pasiva se eliminó el material particulado y alícuotas de 200 µl fueron sembradas en medio semisólido suplementado con 100 µg/ml de cloranfenicol para inhibir el crecimiento bacteriano.

**2.2.5 Aislamiento de levaduras y condiciones de crecimiento:** Las placas inoculadas con muestras de agua fueron incubadas a 4 y 10°C. Las placas inoculadas con muestras de suelo fueron incubadas a 4, 10, 15 y 22°C. Se inspeccionó diariamente las placas para la aparición de colonias, transfiriéndose cada una de ellas a placas de agar con medio de cultivo sin antibiótico.

**2.2.6 Caracterización macroscópica y microscópica:** Las colonias obtenidas fueron caracterizadas en relación a su color, textura, borde, tamaño, elevación, forma, superficie y comportamiento con la luz. De acuerdo con estos datos, los aislados fueron agrupados

en primera instancia en “grupos morfológicos”. Las características microscópicas fueron observadas utilizando un microscopio óptico.

**2.2.7 Métodos de Preservación:** Los distintos aislados de levaduras se almacenaron a través de criopreservación en 20% glicerol y también se utilizó el método de la gota de gelatina (Marangon y Cols., 2003; Baeza y Cols, 2009).

**2.2.8 Extracción de DNA genómico:** La extracción de DNA genómico se realizó a partir de (1) “pellet celulares” obtenidos de levaduras crecidas en medio semisólido y (2) a partir de cultivos en fase exponencial que fueron centrifugados a 7,000 g por 10 min. Ambos “pellet celulares” se suspendieron en 5 ml de Buffer TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7,5). Alícuotas de 300 µl se mezclaron con 250 µl de microesferas de vidrio de 0,5 mm de diámetro y se agitaron en vórtex por 10 min. Posteriormente se utilizó el kit “Wizard Genomic DNA Purification” (Promega), para la extracción de DNA genómico de cada aislado de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

**2.2.9 Amplificación del rDNA:** Se utilizaron las parejas de partidores ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCG-3') / ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') y F63 (5-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3) / LR3 (5-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3) para amplificar el rDNA 5.8S y los espaciadores transcritos internos ITS1 e ITS2 (Fujita y Cols., 2001) y la región D1/D2 (Fell y cols., 2000), respectivamente. Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen final de 25 µl siguiendo el siguiente protocolo: Se mezcló 1µl de DNA (aprox. 10 ng) con 24 ul de “mezcla de PCR” [2,5µl de buffer PCR 10X, 0,5 µl de una mezcla de dNTP's (10 mM de

cada uno), 2 µl de mezcla de partidores (25 µM de cada partidor), 1µl de MgCl<sub>2</sub> (50 mM) y 0,5µl (1U) de Taq polimerasa]; el volumen final se ajustó con agua libre de nucleasas. La amplificación se realizó en un termociclador GeneAmp PCR system 2700 (Applied Biosystem) bajo las siguientes condiciones: denaturación inicial a 94°C por 5 min; 35 ciclos de denaturación a 94°C por 30 s; hibridación a 55 °C por 30 s y polimerización a 72 °C por 3 min. Se adicionó una etapa final de polimerización a 72 °C por 10 min. Los controles negativos de la reacción se realizaron sin DNA molde y se llevaron a cabo simultáneamente. Los productos de amplificado se separaron electroforéticamente en geles de agarosa al 1,5% en buffer TAE (44,5 mM Tris, 44,5 mM ácido bórico, 1mM EDTA, pH 8.0) que contiene bromuro de etidio (0,5 µg/ml) y se fotografiaron en un transiluminador-UV. Los tamaños de los amplicones fueron estimados en relación a los marcadores de peso molecular 100 pb y 1 Kb, usando el programa Kodak 1D Science (Kodak scientific Image System).

**2.2.1.0 Purificación productos de amplificado:** Los productos amplificados que fueron secuenciados en nuestro laboratorio se purificaron utilizando el kit "UltraClean DNA Purification" siguiendo las especificaciones para este producto.

**2.2.1.1 Secuenciación automática de DNA y análisis de datos:** Los productos amplificados se enviaron en placas de 96 pocillos y fueron secuenciados en MacroGen Inc (Seúl, Corea), a través de su servicio de secuenciación automática. Las secuencias fueron corregidas y re-secuenciadas, cuando fue necesario, en el secuenciador automático Genetic analyzer 3100 Avant (Applied Biosystem), utilizando el Kit de

secuenciación Dynamic Termination Cycle. Los datos de secuencias se analizaron en el programa BioEdit Sequence Alingment Editor versión 7.0.5.2 (Hall, 1999), los alineamientos de secuencias se realizaron en el programa Clustal W (Thompson y cols., 1994) que viene incorporado dentro del programa MEGA versión 5.0 (Tamura y cols., 2011) a través del cual se realizaron los árboles filogenéticos.

### **3. Resultados**

#### **3.1 Aislamiento de levaduras**

##### **3.1.1 Muestras de suelo**

Las distintas suspensiones de las muestras de suelo del territorio Antártico chileno, fueron sembradas en placas con medio YM suplementado con glucosa al 2% y cloranfenicol para inhibir el crecimiento bacteriano. Triplicados de las placas fueron incubadas a 4, 10, 15 y 22°C debido a que distintas levaduras poseen temperaturas de crecimiento diferentes, por lo tanto con este procedimiento se intentó aislar la mayor cantidad de levaduras posibles. Las placas se inspeccionaron diariamente y en cuanto se desarrollaba una colonia esta era de inmediato transferida a una placa YM fresca, e incubada a la misma temperatura de la placa de origen. Derivado de este proceso se obtuvieron numerosos aislados de levaduras las cuales se caracterizaron de acuerdo a las características macromorfológicas de su colonia (Figura5): color, textura, borde, tamaño, elevación, forma, superficie y comportamiento con la luz. De esta forma se obtuvieron 64 grupos de aislados, de los cuáles 37 grupos quedaron compuestos sólo por un aislado.

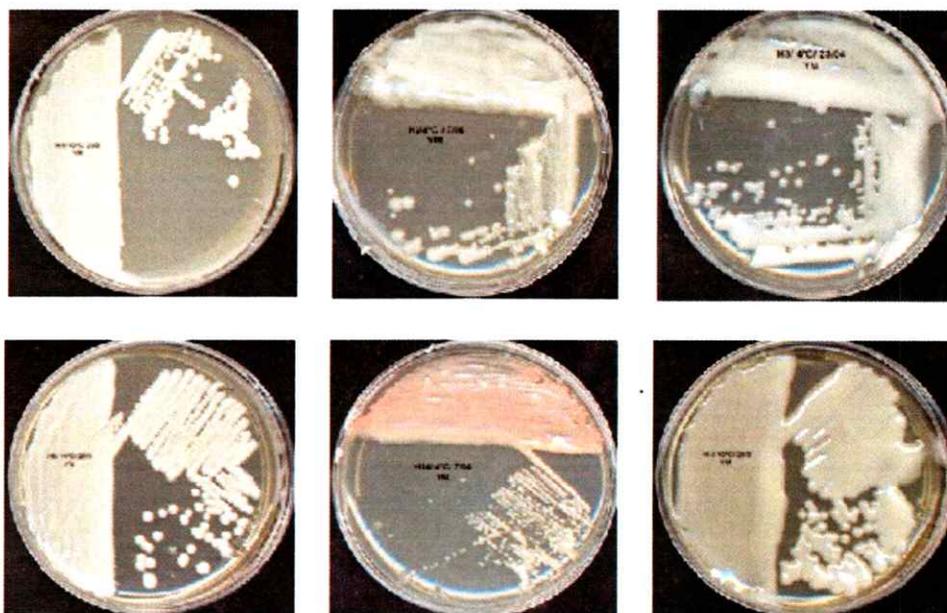


**Figura 5:** Levaduras aisladas desde muestras de suelo. Se muestran los aislados con diferencias macromorfológicas importantes, como lo son el color y el tamaño de la colonia.

### 3.1.2 Muestras de Agua

Se procedió de la forma descrita para las muestras de suelo en cuanto al desarrollo de colonias y subcultivos. Las levaduras aisladas fueron menos numerosas en comparación a las muestras de suelo (Figura 6). Especialmente, muy pocas levaduras fueron aisladas desde agua marina, como las muestras H2 y H6 desde las cuales se obtuvo un y ningún aislado, respectivamente. De las muestras de agua dulce se obtuvo una mayor cantidad de levaduras aisladas que de las muestras de agua marina, sin embargo la diversidad de los aislados en ambos casos fue menor a la reportada a partir de muestras de suelo. En la tabla 1 se resumen los grupos macromorfológicos obtenidos y el número de aislados presentes en cada uno de ellos para las muestras de suelo y de agua.

A partir de la agrupación realizada se seleccionaron aislados representativos de cada uno de ellos en base al origen y tipo de muestra desde la que se aislaron (suelo o agua) para ser caracterizados molecularmente.



**Figura 6:** Levaduras aisladas desde muestras de Agua. Se rayaron colonias de levaduras en placas medio rico YM y fueron incubadas a distintas temperaturas.

**Tabla 1. Grupos macromorfológicos.**

Color	Textura	Forma	Borde
Rojo 7	Mucosa 6	Circular 6	Liso 6
	Cremosa 1	Circular 1	Liso 1
Naranja 46	Mucosa 33	Circular 29	Liso 29
		Irregular 4	Liso 3
			Encurvado 1
	Cremosa 10	Ovalada 1	Liso 1
		Circular 8	Liso 7
			Filamentoso 1
		Puntiforme 1	Liso 1
Dura 3	Circular 3	Filamentoso 3	
Amarillo 4	Dura 1	Circular 1	Liso 1
	Cremosa 3	Circular 3	Liso 3
Blanco 149	Mucosa 72	Circular 61	Liso 57
			Filamentoso 4
		Irregular 11	Liso 8
			Filamentoso 1
	Cremosa 77	Circular 64	Liso 60
			Filamentoso 4
		Puntiforme 12	Liso 12
	Irregular 1	Liso 1	
Translúcida 9	Mucosa 6	Circular 5	Liso 5
		Puntiforme 1	Liso 1
	Cremosa 3	Puntiforme 2	Liso 2
		Circular 1	Liso 1

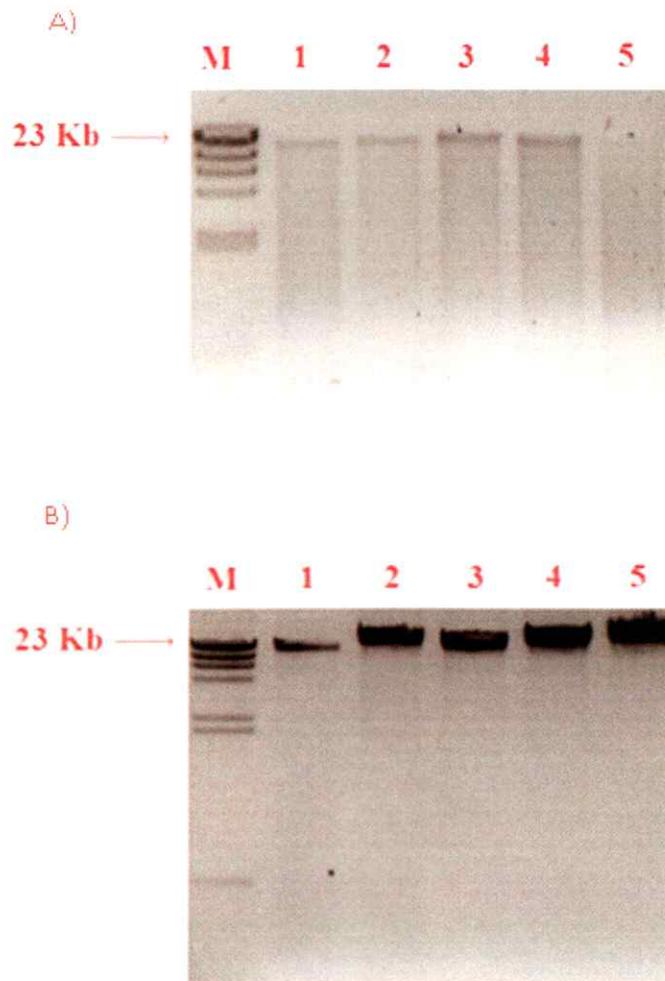
Se muestran las características de las colonias que fueron útiles en la agrupación y el número de aislados dentro de cada grupo.

## **3.2. Identificación molecular de los aislados**

### **3.2.1. Extracción DNA Genómico.**

Inicialmente y debido a la diversidad de aislados obtenidos fue necesario desarrollar un protocolo eficiente de extracción de DNA genómico, ya que la composición de las paredes celulares de las levaduras es distinta y por lo tanto el rendimiento en cuanto a cantidad y calidad del DNA genómico obtenido varía de acuerdo a la “dureza” de la pared de cada uno de ellos. Este parámetro se evaluó indirectamente como la “textura” de la colonia con un asa microbiológica curva, clasificándolas como cremosas, mucosas o duras.

Como primer paso se evaluó el rendimiento de extracción de DNA a partir de “pellets celulares” obtenidos desde placas con medio completo YM, debido a que es una manera rápida y sencilla para extraer DNA genómico. Además, se intentó desarrollar un protocolo de extracción de DNA independiente del crecimiento de las levaduras en medios de cultivos líquidos ya que este proceso demora varios días, incluso semanas, para levaduras psicrófilas estrictas. En cambio, el crecimiento de levaduras en placas demora alrededor de una semana para levaduras psicrófilas, que crecen a 4°C, y dos o tres días para levaduras que crecen a 22°C. Los aislados seleccionados para evaluar este método de extracción fueron aquellos que presentaban características distintivas entre sí, especialmente en cuanto a la textura de la colonia. La extracción de DNA genómico para los aislados escogidos desde estos tres grupos se realizó a través de ruptura mecánica en vórtex y utilizando el kit “Wizard Genomic DNA Purification” adquirido de Promega. Utilizando este método se obtuvieron bajas concentraciones de DNA (figura 7A), y de baja calidad (degradación).



**Figura 7:** Extracción de DNA genómico. Extracción de DNA genómico desde “pellet celulares” crecidos en placa (A) y líquidos (B). Se utilizaron distintos aislados que presentan diferencias en la textura de las colonias: “duras” (1 y 2), mucosas (3 y 4) y cremosa (5). M: marcador de peso molecular  $\lambda$ / *Hind III*.

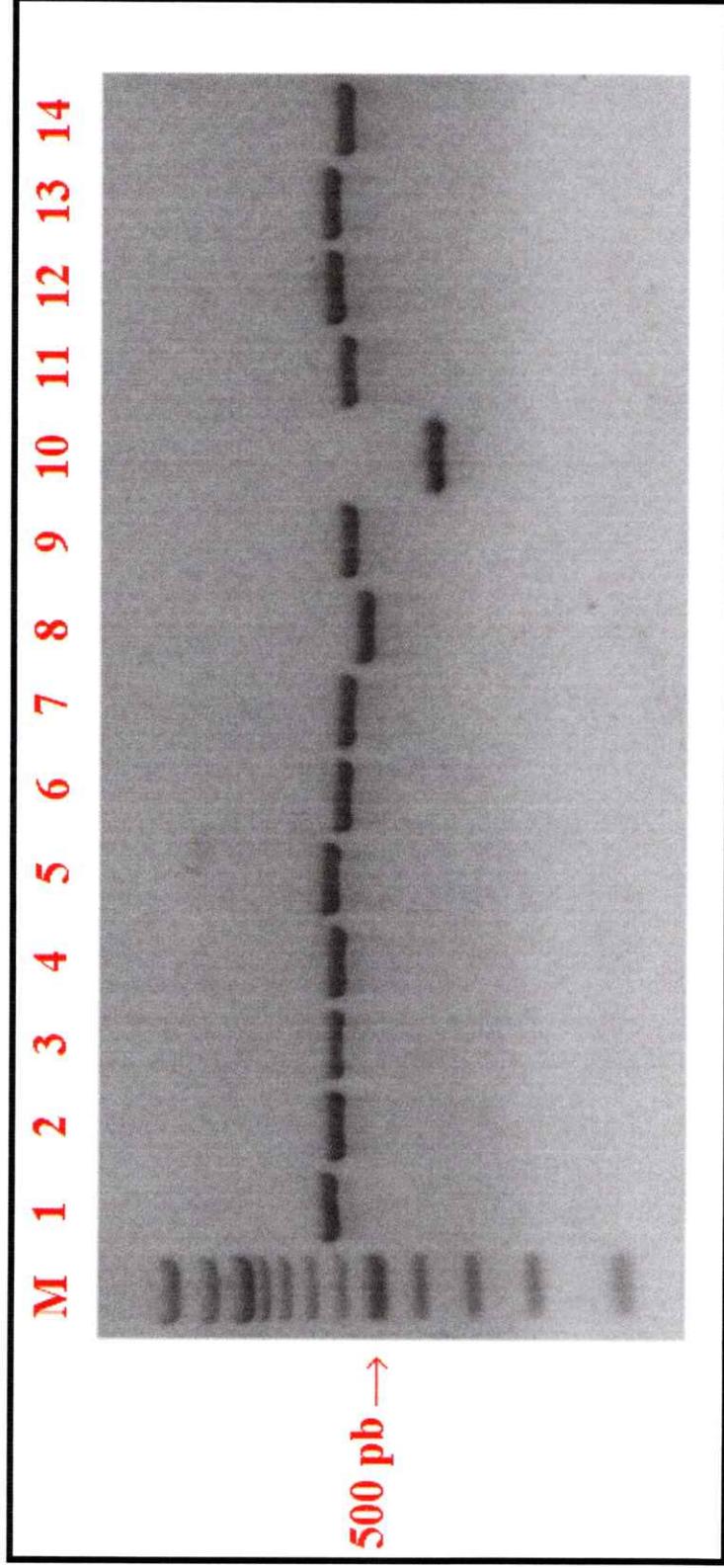
Se buscó mejorar los rendimiento de DNA genómico, variando los tiempos de agitación en vórtex y utilizando un molidor de células, pero en ninguno de los casos se obtuvieron resultados satisfactorios (datos no mostrados).

Debido a los malos resultados obtenidos con levaduras desde medios semisólidos, se realizaron extracciones de DNA a partir de cultivos líquidos. Mediante centrifugación se obtuvieron los “pellets celulares” los cuales fueron sometidos a ruptura mecánica y extracción por kit como se describió más arriba. Las muestras de DNA obtenidas desde cultivos líquidos resultaron ser mejores en cuanto a cantidad y calidad (Figura 7B).

### ***3.2.2. Amplificación, purificación y secuenciación de la región ITS.***

Se amplificó por PCR los espaciadores transcritos internos (ITS) del rDNA empleando como molde el DNA genómico aislado a partir de 81 levaduras seleccionadas y los partidores universales ITS1 e ITS4. En la figura 8 se muestra una fotografía de un gel de agarosa al 1,5% en donde se visualizan los amplicones obtenidos para algunos de los aislados. Los tamaños variaron entre 350 a 650 pb, lo que es consistente con lo esperado, ya que en levaduras se ha reportado que la región ITS varía entre 300- 1050 pb (Prasad, 2005). Los 81 productos de PCR de los espaciadores transcritos internos del rDNA fueron secuenciados por ambas hebras en MacroGen Inc (Seúl, Corea), a través de su servicio de secuenciación automática. Las secuencias se analizaron y corrigieron utilizando el programa BioEdit Sequence Alingment Editor versión 7.0.5 (Hall, 1999). Las secuencias fueron comparadas utilizando el programa

ClustalW (Thompson y cols., 1994) y aquellas que presentaron un 100 % de identidad fueron agrupadas. De ésta comparación, 56 levaduras fueron clasificadas en 11 grupos ya que fueron 100% idénticas, mientras que 25 presentaron secuencias únicas. Estas secuencias, el contig en el caso de los grupos, fueron sometidas a la búsqueda de homólogos en la base de datos del "National Center for Biotechnological Information" (NCBI, USA) utilizando el algoritmo Blastn. Los resultados obtenidos con mayor cobertura y porcentaje de identidad son mostrados en las tablas 2 y 3. Se pudieron identificar especies de levaduras pertenecientes a 9 géneros distintos en muestras de suelo y a 3 géneros en muestras de agua (tabla 4).



**Figura 8:** Amplicones de la región ITS1-5.8S-ITS2 a partir de levaduras aisladas de muestras de suelo y agua desde la Antártica. En esta fotografía se muestran un gel de agarosa al 1,5% en donde se separaron los diferentes amplicones obtenidos utilizando los partidores ITS1 e ITS4. 1-14: corresponden a diferentes aislados. M: marcador de peso molecular 100 bp.

Tabla 2. Identificación de grupos de levaduras con 100% de identidad de secuencia para la región ITS1-5.8S-ITS2.

Grupo (N° aislados) <sup>a</sup>	pb <sup>b</sup>	Cobertura; % Identidad	Blastn (Genbank) <sup>c</sup>
1 (3)	579	579/579 ; 100	<i>Leucosporidium antarcticum</i> (DQ525624)
2 (3)	614	613/614 ; 99	<i>Cryptococcus</i> (AM922286)
3 (2)	549	532/534 ; 99	<i>Ascomycota sp</i> (HM589262)
4 (2)	534	525/530 ; 99	<i>Ascomycota sp</i> (HM589262)
5 (2)	624	620/627 ; 99	<i>Mrakia</i> (AY038831)
6 (4)	595	595/595 ; 100	<i>Mrakia psychrophilia</i> (EU224267)
7 (2)	589	584/588 ; 99	<i>Rhodotorula sp</i> (EF151243)
8 (9)	603	600/601 ; 99	<i>Leucosporidiella creatinivora</i> (AF444629)
9 (24)	544	544/544 ; 100	<i>Sporidiobolus salmonicolor</i> (FJ914884)
10 (3)	505	505/505 ; 100	<i>Wickerhamomyces anomalus</i> (JF416789)
11 (2)	628	623/623 ; 100	<i>Mrakia</i> (AY038831)

<sup>a</sup> Grupos de aislados con 100% de identidad para la región ITS1-5.8S-ITS2.

<sup>b</sup> Largo contigs de cada grupo.

<sup>c</sup> Número de accesoión Genbank y nombre de la levadura que presenta el mayor porcentaje de identidad con las secuencias consenso de cada grupo.

Tabla 3. Identificación de aislados de levaduras a través de la secuenciación de la región ITS1-5.8S-ITS2.

Aislado	(pb) <sup>a</sup>	Cobertura; % Identidad	Blastn (Genbank) <sup>b</sup>
H14_1_4C	411	410/411 ; 99	<i>Candida sake</i> (AJ549822)
T15_22C	618	612/618 ; 99	<i>Cryptococcus terricola</i> (FN298664)
T02_3_10C	557	555/557 ; 99	<i>Cryptococcus</i> (AY749434)
T23_1_10C	611	611/611 ; 100	<i>Cryptococcus gastricus</i> (AF145323)
T02_2_22C	506	506/506 ; 100	<i>Cryptococcus victoriae</i> (AY040654)
T18_1_22C	506	504/506 ; 99	<i>Cryptococcus victoriae</i> (HM849622)
T29_4_4C	448	447/449 ; 99	<i>Dioszegia aurantiaca</i> (EU266500)
T09_15C	473	462/472 ; 98	<i>Dioszegia crocea</i> (AF444406)
T11_2_10C	492	474/491 ; 97	<i>Dioszegia sp</i> (EU070927)
T01_4_22C	370	338/375 ; 90	<i>Metschnikowia bicuspidata</i> (EF643581)
T15_4C	614	613/614 ; 99	<i>Mrakia robertii</i> (AY038829)
T18_1_10C	624	624/624 ; 100	<i>Mrakia lollopiis</i> (AY038828)
T08_3_4C	573	573/573 ; 100	<i>Rhodotorula / Zymoxenogloea</i> (EF151250)
T32_1_4C	538	504/539 ; 94	<i>Rhodotorula / Zymoxenogloea</i> (EF151250)
T8_1_22C	551	546/548 ; 99	<i>Rhodotorula laryngis</i> (AF444617)
T13_2_22C	561	559/562 ; 99	<i>Rhodotorula laryngis</i> (AF444617)
T27_4_4C	556	555/556 ; 99	<i>Rhodotorula laryngis</i> (EU149811)
T11_2_15C	579	576/579 ; 99	<i>Rhodotorula sp</i> (EF151243)
T20_1_4C	589	584/588 ; 99	<i>Rhodotorula sp</i> (EF151245)
T10_1_22C	496	496/497 ; 99	<i>Rhodotorula sp</i> (DQ317365)
T10_2_4C	496	496/497 ; 99	<i>Rhodotorula sp</i> (DQ317365)
T09_3_4C	584	579/584 ; 99	<i>Leucosporidium antarcticum</i> (DQ525624)
T10_1_4C	597	579/584 ; 99	<i>Levadura antártica sp</i> (AY040659)
T15_1_4C	624	596/597 ; 99	<i>Leucosporidium antarcticum</i> (EU149807)
T29_2_4C	604	580/608 ; 95	<i>Levadura antártica sp</i> (AY040659)
			<i>Leucosporidium antarcticum</i> (DQ525624)
			<i>Levadura antártica sp</i> (AY040659)
			<i>Leucosporidium / Rhodotorula</i> (FN908919)

<sup>a</sup> Largo secuencias consensos para cada aislado.

<sup>b</sup> Número de accesoión Genbank y nombre de la levadura que presenta el mayor porcentaje de identidad con las secuencias consenso de cada aislado.

El género de levaduras con mayor cantidad de aislados (24) en muestras de suelo fue el género *Sporidiobolus* (Grupo 9), representando el 30,4% del total de levaduras analizadas, y fue aislado desde 13 muestras diferentes, siendo el género más ubicuo (Tabla 5). Todos los aislados identificados dentro de este género correspondieron a la levadura Basidiomicete *Sporidiobolus salmonicolor*, demostrando de esta forma que si bien es el género que presenta una mayor cantidad de aislados es a su vez el que presenta menos diversidad. Esta levadura fue aislada en todas las temperaturas (4, 10, 15 y 22°C) a las cuales fue incubada, creciendo muy lento a 4°C y aumentando su velocidad de crecimiento en función de la temperatura, alcanzando su temperatura óptima a 22°C. Por otra parte, se obtuvieron 10 aislados pertenecientes al género *Mrakia* que representa el 12,7% del total de levaduras analizadas, desde 9 muestras de suelo y una muestra de agua, siendo el único género que se encontró en ambos tipos de muestras. Los 4 aislados del Grupo 6 fueron identificados como la levadura *Mrakia psychrophilia*, un aislado (T18\_1\_10C) como la levadura *M. blollopis* [descrita recientemente por Thomas-Hal y cols. (2010)] y un aislado (T15\_4C) como la levadura *M. roberti*. Sin embargo, los aislados H3\_4C y T29\_3\_4C (Grupo 5) y los aislados P2\_1\_4C y T23\_4C (Grupo 11) no pudieron ser identificados a nivel de especie y probablemente correspondan a las especies *M. gélida* o *M. stokesii*.

Tabla 4. Diversidad de géneros en sitios de muestreo.

Muestra*	Spor	Leu	Mra	Leucos	Dios	Rho	Crypt	Mets	Wick	Cand
T1	X							X		
T2							X			
P2			X							
T5	X		X							
T6										
T7										
T8						X				
T9				X	X					
T10				X		X				
T11					X	X				
T12										
T13	X	X				X				
T14		X	X							
T15			X	X			X			
T16	X									
T17							X			
T18			X				X			
T19	X		X				X			
T20	X									
T21	X					X				
T22										
T23							X			
T24										
T25										
T26			X							
T27	X					X				
T28	X									
T29	X		X		X					
T30				X						
T31	X									
T32	X					X				
T33		X								
T34	X									
H1									X	
H3			X							
H5									X	
H14										X

\* , T, muestra desuelo; H, muestra de agua. El carácter "X" representa la presencia de cada especie de levadura en una región determinada. *Spor*, *Sporodiobolus*; *Leu*, *Leucosporidiella*; *Mra*, *Mrakia*; *Leucos*, *Leucosporidium*; *Dios*, *Dioszegia*; *Rho*, *Rhodoroula*; *Cryp*; *Cryptococcus*; *Mets*, *Metschnikowia*; *Wick*, *Wickerhamomyces*; *Cand*, *Candida*.

Se identificaron 8 aislados pertenecientes al género *Cryptococcus* que corresponde al 10,4% de las levaduras analizadas. Dos de estos aislados se identificaron como la levadura *Cryptococcus victoriae*, un aislado como la levadura *Cryptococcus Terricola* y un aislado como la levadura *Cryptococcus gastricus*. Los cuatro aislados restantes pertenecen a este género pero no se lograron identificar a nivel de especie a través del análisis de secuencia de la región ITS. Tres de estos probablemente correspondan a la levadura *C. gilvencens* (Grupo 2) mientras que el aislado T2\_3\_10C posee similitud de secuencia con levaduras pertenecientes a este género, pero sólo a través del análisis de esta región no es posible asegurar si esta levadura corresponde a alguna especie previamente caracterizada o representa una especie nueva dentro de éste.

Por otra parte se identificaron 9 aislados pertenecientes al género *Rhodotorula* (11,4%). Dentro de éstos, se identificaron 3 aislados como la levadura *Rhodotorula laringys* (99% de identidad), los aislados T11\_2\_15C y T20\_1\_4C (Grupo 7) tuvieron similitud de secuencia con la levadura *Rhodotorula psychrophila*, pero al alinear las secuencias obtenidas para ambos aislados se obtuvo que estas son variables en 5 pares de bases en comparación a las secuencias depositadas en GenBank, por lo tanto pueden ser diferentes especies. Los restantes 2 aislados tuvieron similitud de secuencia para esta región con levaduras de este género, pero no se lograron identificar a nivel de especie utilizando la región ITS como herramienta taxonómica. Dentro de este último grupo el aislado T10\_2\_4C probablemente sea la levadura *Rhodotorula laryngis* debido a que quedó agrupada en el mismo grupo macromorfológico que los aislados que fueron identificados como esta levadura. Además, se identificaron 9 aislados (Grupo 8) como la

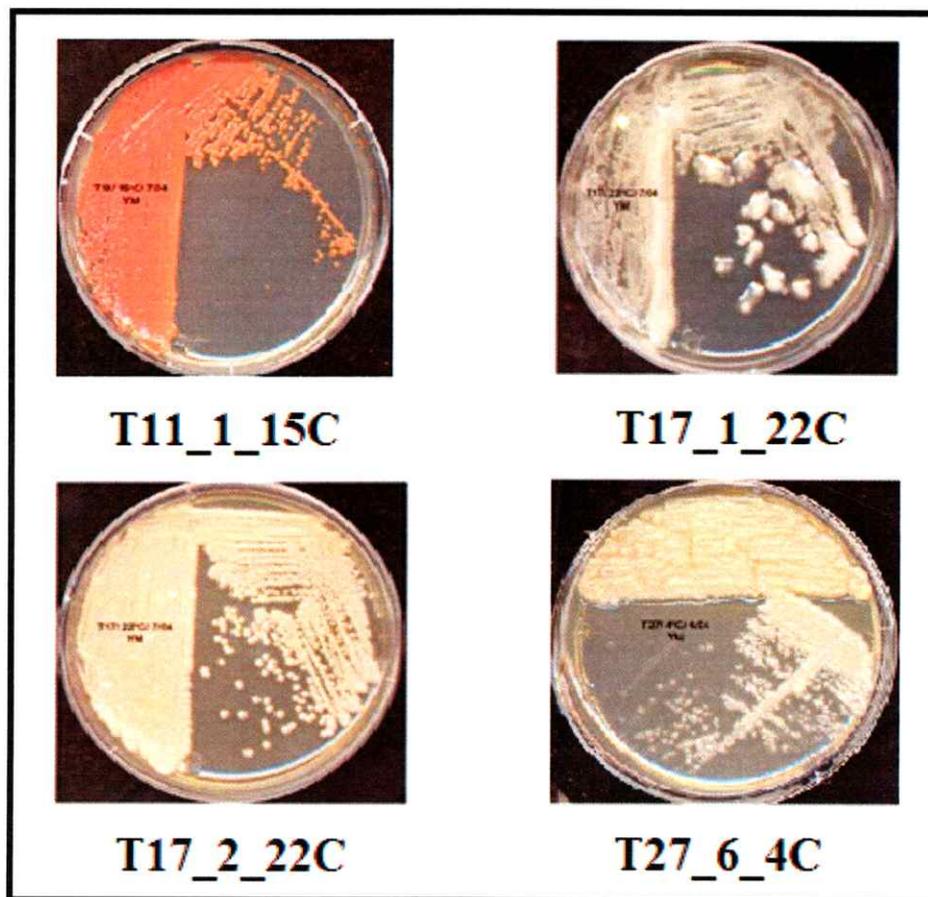
levadura *Leucosporidiella creatinivora* anteriormente descrita como *Rhodotorula creatinivora*.

También se identificaron 6 aislados que tuvieron similitud de secuencia con levaduras pertenecientes al género *Leucosporidium* (7,6%), dentro de este grupo se identificaron 3 aislados (Grupo 1) como la levadura *Leucosporidium antarcticum*. Los restantes aislados (T9\_3\_4C, T10\_1\_4C, T15\_1\_4C) poseen similitud de secuencia con la levadura *Leucosporidium antarcticum* y con una potencial nueva especie de levadura Antártica que está en proceso de caracterización por otros autores.

Uno de los géneros menos representado en las muestras de suelo fue el género *Dioszegia* con 3 aislados (3,8%), dentro de este género, dos aislados presentaron similitud de secuencia para la región ITS con la levadura *Dioszegia fristingensis* con un 97% de identidad nucleotídica. Al alinear las secuencias para ambos aislados se observa una diferencia de 20 pares de bases en esta región, sugiriendo que ambos aislados corresponden a dos levaduras diferentes. Por otra parte el aislado T29\_4\_4C no se logró identificar a nivel de especie debido a la alta similitud a nivel de secuencia para esta región entre las levaduras *Dioszegia aurantiaca* y *Dioszegia crocea*. El género menos representado fue *Metschnikowia* dentro del cual se identificó un aislado como la levadura *Metschnikowia bicuspidata* (1,3%).

Desde muestras de agua se lograron identificar levaduras pertenecientes a las especies *Wickerhamomyces* (Grupo 10) y *Candida sake* (H14\_1\_4C).

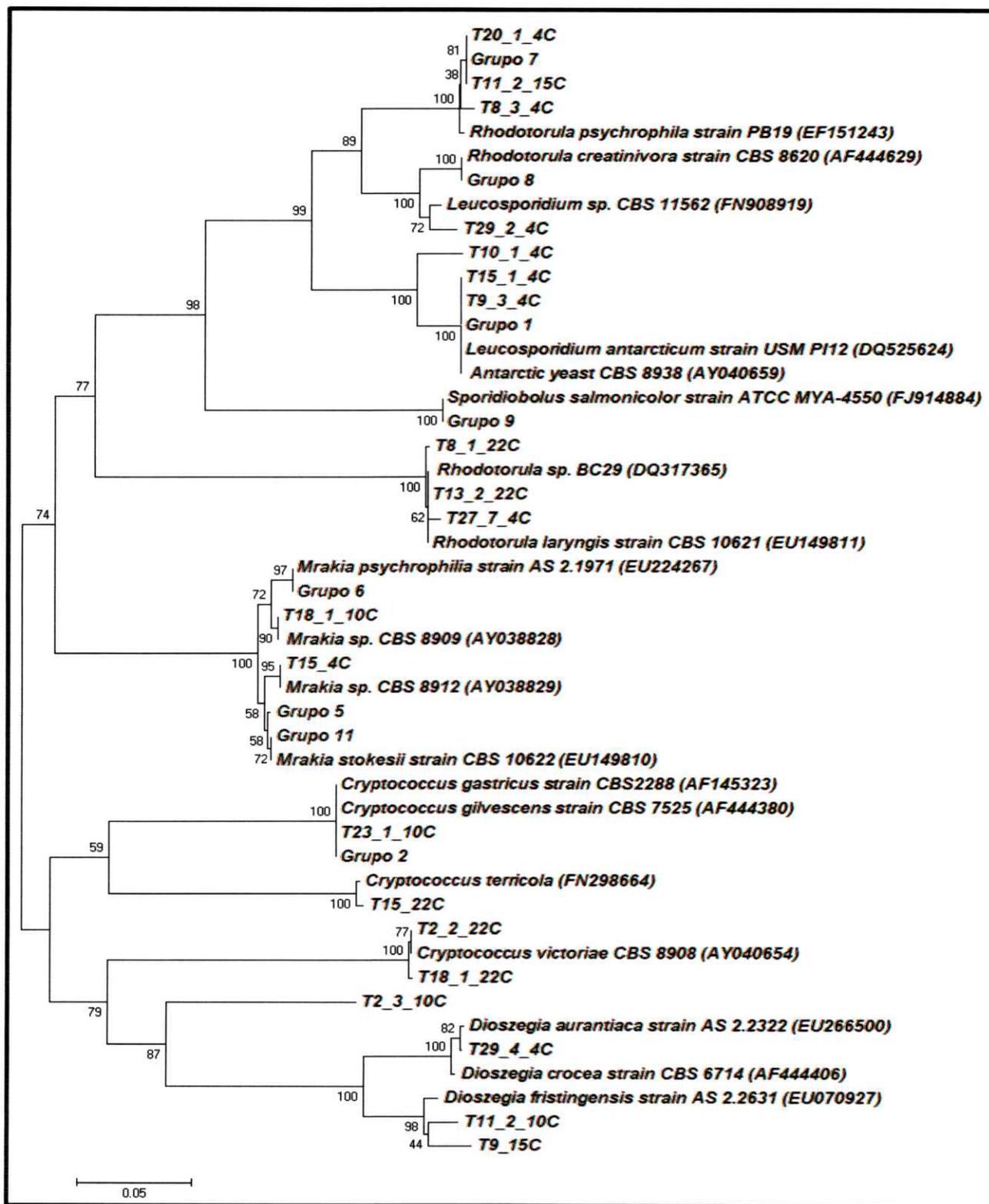
Los aislados T17\_1\_22C y T17\_2\_22C (Grupo 3) y, T11\_1\_15C y T27\_7\_4C (Grupo 4) pertenecen al *phylum* Ascomicete, pero no se lograron identificar a nivel de género ni de especie utilizando la región ITS como herramienta taxonómica. Si bien estos aislados fueron agrupados de acuerdo a su secuencia ITS, al analizar las características macroscópicas de la colonia de estos aislados se observa claramente que no corresponden a la misma levadura (Figura 9).



**Figura 9.** Levaduras identificadas como Ascomicetes. En estas fotografías se aprecian las características distintivas entre los 4 aislados, como lo son: el color, forma y el tamaño de las colonias.

Para validar los resultados obtenidos a través del algoritmo blastn, se alinearon las secuencias obtenidas a través de Clustal W (Thompson y cols., 1994) y se construyó un cladograma con el fin de ilustrar las relaciones filogenéticas para levaduras Basidiomicetes (Figura 10). Todas las levaduras pertenecientes a un mismo género quedaron agrupadas dentro del mismo clado en el árbol filogenético, resultado congruente con respecto a la identificación realizada a través de la herramienta blastn. Si observamos la Figura 10, se confirma que los aislados pertenecientes al uno, seis, ocho y nueve corresponden a las levaduras *L. antarcticum*, *M. psychrophila*, *L. creatinivora* y *S. salmonicolor* (respectivamente) ya que el alineamiento de sus secuencias consensos con respecto a la secuencia Genbank con la que presentaron el mayor porcentaje de homología, quedaron agrupadas dentro del mismo clado.

Si bien, a partir de la secuenciación de los partidores transcritos internos y comparación con las secuencias disponibles de esta región se logró identificar el 67% de las levaduras analizadas, hubo 17 levaduras que no se lograron identificar a nivel de especie y 10 levaduras a nivel de género. Por ello, se procedió a utilizar otro marcador genético que ha mostrado ser útil en taxonomía de levaduras, como lo es la región D1/D2.



**Figura 10.** Cladograma Neighbor-Joining de secuencias ITS obtenidas de levaduras Basidiomicetes comparadas con secuencias depositadas en Genbank. Este análisis fue realizado con el modelo Jukes-Cantor, con un análisis de Bootstrap (1000).

### 3.2.3 Amplificación, purificación y secuenciación de la región D1/D2.

Se seleccionaron 22 aislados que no se lograron identificar previamente a través del análisis de las secuencias ITSs. Para la amplificación se utilizaron los partidores F63 y LR3 y las condiciones de PCR y purificación fueron las que se mencionaron anteriormente en el análisis de la región ITS1- 5.8S. ITS2 Los resultados obtenidos para las levaduras analizadas se muestran en la tabla 5.

La secuenciación de esta región permitió identificar 11 levaduras a nivel de especie que previamente no se lograron identificar a través de los ITSs. Dentro de este grupo, 5 levaduras pertenecieron al género *Cryptococcus*, identificándose 2 aislados como la especie *Cryptococcus gilvescens*, 1 aislado como la especie *Cryptococcus terricola* y 1 aislado como la especie *Cryptococcus walticus*. También, se identificaron 4 aislados como *Rhodotorula glacialis*. El aislado T10\_2\_4C se identificó como la levadura *Rhodotorula laryngis*, diferenciándolas de otras especies dentro de este género. También el aislado T29\_4\_4C se identificó como la levadura *Dioszegia crocea*, logrando discriminar entre ésta y la levadura *Dioszegia aurantiaca*.

Tabla 5. Identificación de levaduras a través de secuenciación de los dominios D1/D2 del rDNA.

Aislado	(pb) <sup>a</sup>	Cobertura ; % Identidad	Blastn dominio D1/D2 <sup>b</sup>	Identificación ITS
H03_4C	544	544/544 ; 100	<i>Mrakia</i> (GQ911521)	<i>Mrakia</i>
P02_1_4C	542	542/542 ; 100 542/542 ; 100	<i>Mrakia robertii</i> (DQ513285) <i>Mrakia frigida</i> (FJ487624)	<i>Mrakia</i>
T02_3_10C	368	368/368 ; 100	<b><i>Cryptococcus waticus</i></b> (FJ748666)	<i>Cryptococcus</i>
T08_3_4C	599	598/599 ; 99	<b><i>Rhodotorula glacialis</i></b> (EF643740)	<i>Rhodotorula</i> / <i>Zymoxenogloea</i>
T09_3_4C	609	609/609 ; 100 609/609 ; 100	<i>Levadura antártica</i> sp (AY040642) <i>Leucosporidium antarcticum</i> (DQ785787)	<i>L. antarcticum</i> / <i>Levadura antártica</i> sp
T10_1_22C	586	574/587 ; 97	<i>Rhodotorula</i> sp (EF595750)	<i>Rhodotorula</i> sp
T10_1_4C	603	602/603 ; 99 593/605 ; 98	<i>Levadura antártica</i> sp (AY040646) <i>Leucosporidium antarcticum</i> (DQ785787)	<i>L. antarcticum</i> / <i>Levadura antártica</i> sp
T10_2_4C	611	611/611 ; 100	<b><i>Rhodotorula laryngis</i></b> (DQ640477)	<i>Rhodotorula</i> sp
T11_1_15C	579	574/579 ; 99	<b><i>Candida davisiana</i></b> (AF536563)	<i>Ascomycota</i> sp
T15_22C	614	603/614 ; 98	<i>Cryptococcus terricola</i> (AM039670)	<i>Cryptococcus terricola</i>
T15_4C	582	581/582 ; 99 581/582 ; 99	<i>Mrakia robertii</i> (FJ487623) <i>Mrakia frigida</i> (DQ513285)	<i>Mrakia</i>
T17_1_10C	559	559/559 ; 100	<b><i>Cryptococcus gilvoscens</i></b> (EF643717)	<i>Cryptococcus</i>
T17_1_22C	581	578/581 ; 99	<b><i>Candida davisiana</i></b> (AF536563)	<i>Ascomycota</i> sp
T17_2_22C	582	579/582 ; 99	<b><i>Candida davisiana</i></b> (AF536563)	<i>Ascomycota</i> sp
T17_10_4C	567	558/567 ; 98	<b><i>Cryptococcus gilvoscens</i></b> (EF643717)	<i>Cryptococcus</i>
T18_1_10C	555	555/556 ; 99	<i>Mrakia gelida</i> (GQ911521)	<i>Mrakia blollopis</i>
T20_1_4C	602	599/602 ; 99 599/602 ; 99	<i>Rhodotorula</i> sp (AB558450) <i>Rhodotorula glacialis</i> (EF151258)	<i>Rhodotorula</i> sp
T23_1_10C	529	529/530 ; 99	<i>Cryptococcus gastricus</i> (GQ911494)	<i>Cryptococcus gastricus</i>
T23_4C	583	581/583 ; 99	<i>Mrakia</i> (FJ487623)	<i>Mrakia</i>
T27_6_4C	579	570/571 ; 99	<b><i>Candida davisiana</i></b> (AF536563)	<i>Ascomycota</i> sp
T29_4_4C	612	608/612 ; 99	<b><i>Dioszegia crocea</i></b> (HQ256888)	<i>D. aurantiaca</i> / <i>D. crocea</i>
T32_1_4C	603	598/603 ; 99	<b><i>Rhodotorula glacialis</i></b> (EF643740)	<i>Rhodotorula</i> / <i>Zymoxenogloea</i>

<sup>a</sup> Largo de secuencias consensos para cada aislado.

<sup>b</sup> Número de accesión Genbank y nombre de la levadura que presenta el mayor porcentaje de identidad con las secuencias consenso de cada aislado.

En celeste se indican las levaduras que se identificaron utilizando los dominios D1 y D2 y no a través de la región ITS1-5.8S-ITS2.

En blanco se muestran las levaduras que no se identificaron a nivel de especie utilizando los dominios D1/D2. Con excepción de los aislados T23\_1\_10C y T15\_22C que se identificaron como la misma levadura empleando los dominios D1/D2 y los ITSs.

Existieron 7 aislados que no se lograron identificar a nivel de especie utilizando tanto el análisis de región ambos marcadores genéticos. Dentro de estas levaduras, 4 aislados tuvieron similitud de secuencia con levaduras pertenecientes al género *Mrakia*, pero no fue posible discriminar entre las 5 especies previamente descritas dentro de este género. El aislado T18\_1\_10C que tuvo 100% de identidad de secuencia con la levadura *M.blollopis* para la región ITS presentó similitud de secuencia con la levadura *M.gelida* para los dominios D1/D2, pero con un 99% de identidad de secuencia. En la base de datos de GenBank no se encontraron secuencias para la región D1/D2 de la levadura *M.blollopis*, por lo tanto no se puede analizar si este aislado presenta mayor homología con esta levadura o con la especie *M.gélida* para esta región. Además, hubo dos aislados (T9\_3\_4C y T10\_1\_4C) que no se lograron identificar si correspondían a la levadura *Leucosporidium antarticum* o pertenecían a una nueva especie de levadura antártica utilizando ambas regiones del rDNA. Por otra parte el aislado T10\_1\_22C representa una potencial especie nueva dentro del género *Rhodotorula* ya que no se logró identificar a nivel de especie utilizando los espaciadores transcritos internos y los dominios D1/D2 del rDNA.

Por último, se utilizó esta región para identificar 4 aislados que por análisis de la región ITS corresponden a levaduras Ascomicetes presentando 99% de identidad de secuencia con la misma secuencia depositada en GenBank pero morfológicamente son levaduras distintas. Los resultados obtenidos de la secuenciación de los dominios D1/D2 para estos aislados sugieren que estas levaduras corresponden a la especie *Candida davisiana*.

#### 4. DISCUSION

Una de las principales dificultades en el estudio de levaduras ambientales es la gran cantidad de aislados que se pueden obtener, de los cuales muchos corresponderán a la misma levadura. De las características macromorfológicas utilizadas para su clasificación inicial, el color, forma y textura fueron claves, mientras que propiedades como el tamaño, elevación, y olor, no aportaron a la discriminación de los diferentes aislados. De esta forma se pudo acotar la cantidad de aislados a grupos, seleccionando representantes de cada grupo para los análisis moleculares.

Un paso importante en la caracterización molecular de las levaduras es la obtención de DNA de "buena" calidad en cuanto a la cantidad e integridad, lo que a su vez está directamente relacionado con la eficiencia de ruptura celular. Los aislados obtenidos por nosotros presentaron diferentes texturas, característica que está relacionada con la composición de sus membranas y pared celular, que incidirá en su susceptibilidad a la ruptura. Se evaluó la extracción de DNA desde cultivos en medios semisólidos o líquidos, observándose mejores rendimientos con células obtenidas desde cultivos líquidos. La razón por la cual los rendimientos de extracción de DNA genómico a partir de cultivos líquidos siempre fue mayor se debe a que los "pellet celulares" obtenidos a partir de cultivos líquidos poseen células más frescas que las células mantenidas en placas y por lo tanto la composición de la pared celular de estas son menos resistentes a la ruptura que estas últimas. En células crecidas en medio semisólido, es necesario el desarrollo de alta biomasa/desarrollo de colonias que en su mayoría se encontraran en fase estacionaria, lo que concuerda con reportes previos en

donde se ha demostrado que células levaduriformes en fase estacionarias de crecimiento aumentan tanto el espesor de su membrana como también la resistencia a degradación de esta debido a cambios en la composición de sus membranas (Werner-Washburne y Cols., 1993).

De los géneros identificados en este trabajo, siete pertenecieron a levaduras Basidiomicetes (*Sporidiobolus*, *Mrakia*, *Leucosporidium*, *Rhodotorula*, *Leucosporidiella*, *Cryptococcus* y *Dioszegia*) mientras que tres correspondieron a levaduras Ascomicetes (*Candida*, *Wickerhamomyces* y *Metschnikowia*). Este resultado es congruente con reportes previos de aislamiento de levaduras en zonas frías del planeta en donde se demostró que el *phylum* Basidomicete es el grupo predominante en estos entornos, gracias a sus habilidades de proliferar y sobrevivir bajo condiciones de estrés (Shivaji y Prasad, 2008). La mayoría de estos géneros han sido descritos desde Territorio Antártico con anterioridad con excepción del género *Sporidiobolus* y *Wickerhamomyces* (Tabla 6) demostrando de esta manera que la microbiota de levaduras presente en la Isla Rey Jorge no es significativamente diferente a otras zonas dentro de este continente. En la Tabla 6 se observan las especies identificadas en este estudio y los lugares desde los que han sido aisladas. Se observan 6 especies reportadas en este estudio que no se han descrito desde territorio antártico, hecho que pone de manifiesto que la microbiota de levaduras de este continente aún es desconocida. A continuación se analizará cada género descrito en este trabajo.

Tabla 6. Especies identificadas en este estudio aisladas y en otras regiones frías del planeta.

Especies identificadas en este trabajo	Especies identificadas en otros trabajos									
	Antártica	Ártico	Alpes	Siberia	Ucrania	Islandia	Patagonia Argentina			
<i>Sporidiobolus salmonicolor</i>										
<i>Mrakia Blollopis</i>	X									
<i>Mrakia robertii</i>	X		X							
<i>Mrakia psychrophila</i>	X									
<i>Dioszegia crocea</i>					X	X				
<i>Rhodotorula laryngis</i>	X									
<i>Rhodotorula glacialis</i>			X							
<i>Rhodotorula psychrophila</i>			X							
<i>Leucosporidiella creatinovora</i>							X			
<i>Leucosporidium antarcticum</i>	X	X	X	X			X			
<i>Cryptococcus victoriae</i>	X									
<i>Cryptococcus gilyescens</i>			X							
<i>Cryptococcus terricola</i>						X				
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>										
<i>Candida sake</i>	X									
<i>Metchnikowia bicuspidata</i>										

El carácter "X" representa la presencia de la especie de levadura en una región determinada.

### **Género *Sporidiobolus*.**

Como se mencionó anteriormente se identificaron 24 levaduras como la especie *S. salmonicolor* encontrándose presente en 13 sitios de muestras de suelo. Si se observa la Tabla 4 se aprecia que los aislados identificados como esta levadura se encuentran distribuidos uniformemente a lo largo de los sitios de muestreo y no se localizan en algunos puntos de la Isla. Las temperaturas registradas en el momento que se recolectaron las muestras variaron desde 0,8 a 11°C para los sitios desde los cuales se aisló esta levadura (Tabla 1). Por otra parte se obtuvieron aislados de esta especie en todas las temperaturas de incubación utilizadas (4, 10, 15 y 22°C), por lo tanto esta es una especie de levadura psicotolerante ya que fue capaz de crecer a bajas temperaturas (menores a 15°C) pero su temperatura óptima de crecimiento es cercana a 22°C. No existen antecedentes que describan aislados de esta levadura en regiones frías del planeta (Tabla 7) o en la Antártica. Este descubrimiento abre nuevas posibilidades para analizar y evaluar el aporte de esta especie de levadura al ecosistema Antártico, mas aún siendo la especie predominante en este estudio. Al ensayar las temperaturas de crecimientos de las levaduras identificadas en medio semisólido se observó que la levadura *S. salmonicolor* es capaz de esporular en todas las temperaturas que fue incubada, es más, colonias satélites de esta levadura invadieron por completo las placas de cultivo inhibiendo el crecimiento de los restantes aislados. Esta cualidad haría a esta levadura una mejor competidora y por ende explica en parte porque fue la especie más ubicua dentro de este estudio.

## Género *Mrakia*

Se identificaron 10 levaduras pertenecientes a este género en 8 muestras de suelo y 1 muestra de agua. Las temperaturas de las muestras de las cuales se aislaron levaduras de este género variaron desde 1,7° a 7,9 °C, lo que se corresponde con las temperaturas a las cuales crecen estas levaduras (entre 4 y 15 °C) con un mayor crecimiento a 4°C (Ver anexo). Esto está de acuerdo con reportes previos (Xio y Zhou, 2007; Thomas-Hall y cols, 2010) en los que se observó el crecimiento de levaduras pertenecientes a este género a temperaturas bajo 15°C.

Mediante la comparación de las secuencias ITSs, 4 aislados fueron identificados como *Mrakia psychrophila*, levadura reportada previamente desde este mismo tipo de muestras en el territorio Antártico (Xio y Zhou, 2007). Sin embargo, el perfil de asimilación de fuentes de carbono (Rozas, 2011) de uno de estos aislados mostró ser diferente, lo que sugiere que sería una levadura distinta. Este tipo de pruebas fisiológicas han sido empleadas tradicionalmente en taxonomía de levaduras y se han ido dejando de utilizar a medida que se posee mayor información a nivel de secuencias de distintos organismos. Sin embargo, con este tipo de resultados se demuestra que aún es necesario complementar la tipificación molecular con la taxonomía clásica de levaduras para poder identificar correctamente distintas levaduras a nivel de especie. Por otra parte, los aislados T18\_1\_10C y T15\_4C se identificaron como las levaduras *M. Blollopis* y *M. robertii*, respectivamente a través del análisis de secuencia de la región ITS. Sin embargo, el aislado T18\_1\_10C se identificó como la levadura *M.gelida* al secuenciar

los dominios D1/D2. Entonces surge la problemática que utilizando dos regiones del rDNA se identificó la misma levadura como dos especies distintas. Al observar el perfil de temperaturas de crecimiento para el aislado T18\_1\_10C se aprecia que fue capaz de crecer a 22°C (Ver anexo) a diferencia de las restantes levaduras dentro de este género. Un resultado similar obtuvo el grupo de Tomas-Hall y colaboradores (Thomas-Hall y cols, 2010), que demostró que la temperatura óptima de crecimiento para la levadura *M.blollopis* fue entre 15-18°C y su temperatura máxima de crecimiento fue 20°C. Estos resultados sugieren que el aislado T18\_1\_10C probablemente corresponda a la especie *M.blollopis* y no a la levadura *M.gelida* debido a que la primera es la única especie dentro del género que es capaz de crecer a temperaturas cercanas a 20°C.

Los restantes 4 aislados no se lograron identificar a nivel de especie usando las secuencias ITS y D1/D2, por lo que pueden corresponder a algunas de las otras 5 especies dentro de este género (*M. frigida*, *M. gelida*, *M. stokesii*, *M. nivalis*, *M. curviuscula*), o bien pueden corresponder a una especie nueva. La sistemática dentro de este género se encuentra constantemente en revisión, ya que en trabajos anteriores se ha demostrado que las levaduras *M. nivalis* y *M. frigida* y por otra parte las levaduras *M. stokesii* y *M. gélida* poseen 100% de identidad para la región ITS, no lográndose diferenciar entre ellas a través de ésta (Díaz y Fell, 2000). Además, se ha demostrado que las secuencias de los dominios D1/D2 para estas 4 especies tienen 100% de identidad de secuencia, siendo una característica dentro de este género (Tomas- Hall y cols., 2010). Estudios fisiológicos lograron separar dos especies dentro del género *Mrakia* (*M. nivalis* y *M. gélida*) de acuerdo a las fuentes de asimilación de nitrógeno y

de carbono (Fell y Stazzell-Tallman, 1998) por lo tanto sería una interesante aproximación para poder identificar definitivamente los aislados obtenidos en este estudio.

Por último, todas las especies de este género han sido aisladas desde regiones frías del planeta: desde muestras de suelo y agua dulce en territorio antártico (Di menna, 1960; Xio y Xhou, 2007), desde muestras de sedimento glaciar y de hielo en los Alpes Italianos (Margesin y cols., 2002; Turchetti y cols., 2008). Por lo tanto, la identificación definitiva a nivel de especie de los aislados obtenidos en este estudio aportaría al conocimiento sobre las especies presentes en este tipo de ambientes y su participación en los procesos biológicos de estos ecosistemas.

### **Género *Dioszegia***

Se obtuvieron dos aislados que presentaron similitud de secuencias para la región ITS con la levadura *Dioszegia fristingensis*. Este porcentaje de similitud de secuencia fue sólo de un 97% de identidad para los espaciadores transcritos internos, por lo tanto ambos aislados son potencialmente nuevas especies. El género *Dioszegia* está constituido por 13 especies de las cuales la mayoría han sido aisladas desde hojas de plantas (Wang y cols., 2008; Inácio y cols., 2005), pero recientemente se han descrito dos nuevas especies (*Dioszegia antarctica sp. nov.* y *Dioszegia cryoxerica sp. nov.*) aisladas a partir de muestras de suelo desde el valle "Taylor" ubicado en "South Victoria Land" del continente Antártico (Connell y cols., 2010). Al alinear las secuencias de los aislados T9\_15C y T11\_2\_10C con la secuencia de la región ITS de la levadura

*Dioszegia antártica sp.nov* se obtuvo 13 y 24 nucleótidos de diferencia, respectivamente. Cuando se alinearon las secuencias de estos aislados con la levadura *Dioszegia cryoxerica sp.nov* se obtuvo una diferencia de 49 pares de bases con el aislado T11\_2\_10C y de 59 pares de bases con el aislado T9\_15C. En base a estos antecedentes ambos aislados representan nuevas especies de levaduras aisladas desde este territorio y para describirlos formalmente habría que realizar pruebas fisiológicas empleadas en taxonomía clásica de levaduras.

Dentro de este género se identificó un aislado que presentó similitud de secuencia con las levaduras *Dioszegia aurantiaca* y *Dioszegia crocea*, pero no se logró identificar a que especie pertenecían debido al bajo polimorfismo que presentan ambas especies dentro de la región ITS. Posteriormente, esta levadura se identificó como la especie *Dioszegia crocea* a través de la secuenciación de los dominios D1/D2 dentro del rDNA 26S. La asignación de que este aislado corresponde a esta especie demuestra que en algunas levaduras la región de los dominios D1/D2 presenta un mayor polimorfismo a nivel nucleotídico que los espaciadores transcritos internos y por esta razón es que tradicionalmente se utilizan ambas regiones en identificación molecular de levaduras. Esta sería la primera levadura de esta especie reportada desde territorio antártico ya que a la fecha sólo ha sido aislada desde otras regiones frías del planeta como Ucrania e Islandia (Takashima y cols., 2001).

## Género *Rhodotorula*

Se lograron identificar 6 aislados a nivel de especie pertenecientes al género *Rhodotorula* utilizando la región ITS y dominios D1/D2 como herramienta taxonómica. Dentro de estos aislados, 4 levaduras se identificaron como la levadura *Rhodotorula Laryngis* y 2 aislados se identificaron como la levadura *Rhodotorula glacialis*. La levadura *Rhodotorula Laryngis* ha sido reportada desde territorio antártico (Connell y col., 2008) y desde otras regiones frías como Noruega (Reiersol, 1955). La levadura *Rhodotorula glacialis* ha sido aislada previamente desde los Alpes austriacos a partir de muestras de suelo (Margesin y cols., 2007), pero no se han reportado aislados de esta levadura en otras regiones frías del planeta. Esta levadura (CBS 10436) es un microorganismo psicrófilico ya que se reportó que fue capaz de crecer a 4, 10 y 15°C pero no fue capaz de crecer a 22°C. Estos resultados se corresponden con los datos obtenidos en nuestra investigación (Ver anexo), ya que los aislados identificados como esta levadura presentan el mismo patrón de crecimiento.

Por otro parte el aislado T10\_1\_22C no se logró identificar utilizando la región ITS y los dominios D1/D2. Si bien presentó un 97% de identidad nucleotídica con la levadura *Rhodotorula laryngis*, existen diferencias macroscópicas importantes. Por ejemplo, las colonias de *R. laryngis* son de color rosado, en cambio nuestro aislado presentó colonias de color naranja; las colonias de *R. laryngis* poseen textura mucosa a diferencia del aislado T10\_1\_22C que presentó colonias “duras”. Estas evidencias sugieren que nuestro aislado sería una nueva especie dentro de este género. Del mismo

modo los aislados T11\_2\_15C y T20\_1\_4C que por similitud de secuencia tanto para la región ITS como para los dominios D1/D2 corresponderían a la levadura *R. psychrophila* aislada previamente desde los Alpes austriacos a partir de muestras de suelo (Margesin y cols., 2007), poseen diferencias en las temperaturas de crecimiento (Ver anexo) en comparación a la levadura *R. psychrophila* (CBS 10440), sugiriendo que estos aislados pueden corresponder a nuevas especies.

### **Género *Leucosporidiella***

Se identificaron 9 aislados como la levadura *Leucosporidiella creatinivora* presentando un 100% de identidad de secuencia entre ellas para la región ITS. Esta levadura ya ha sido aislada desde regiones frías del planeta a partir de muestras de suelo en Islandia y Siberia (Sampaio y cols., 2003) y desde muestra de agua de glaciares de la Patagonia argentina (De García y cols., 2007). Por lo tanto estos aislados corresponden a las primeras levaduras identificadas como esta especie desde territorio Antártico.

### **Género *Leucosporidium***

El género *Leucosporidium* ha sido reportado desde glaciares del ártico (Butinar y cols., 2007), desde glaciares en los Alpes italianos (Turchetti y cols., 2008), desde glaciares de la Patagonia argentina (De García y cols., 2007) y a partir de muestras de suelo desde “South Victoria land” en la Antártica (Connell y cols., 2008). Es más, en este trabajo fue uno de los géneros con mayor cantidad de especies reportadas,

representando el 22% de las levaduras identificadas. En nuestra investigación se identificaron 3 aislados pertenecientes a este género, que correspondieron a la especie *Leucosporidium antarcticum*. Como su nombre lo indica esta levadura ha sido aislada previamente desde territorio antártico, específicamente a partir de muestras suelo (Fell y cols., 1969). Posteriormente, esta levadura ha sido reportada desde otras regiones frías de planeta siendo la especie más ubicua dentro de este género (Connell y cols., 2008; De García y cols., 2007; Turchetti y cols., 2008). Al alinear las secuencias de los espaciadores transcritos internos obtenidas en nuestros estudios con las secuencias depositadas se obtuvo un 100% de identidad nucleotídica para esta región.

Tres de nuestros aislados presentaron similitud de secuencia tanto para la región ITS como para los dominios D1/D2 con la levadura *L. antarcticum* y con una nueva levadura antártica. No fue posible diferenciar estas levaduras al utilizar estos marcadores moleculares como herramienta taxonómica debido a que tienen un 100% de identidad de secuencia para ambas regiones. Un punto problemático dentro de este proceso de identificación fue que esta nueva especie de levadura antártica no ha sido descrita formalmente sino que sólo se publicaron las secuencias nucleotídicas de la región ITS y de los dominios D1/D2. Para comprobar si las levaduras obtenidas en esta investigación corresponden a levaduras pertenecientes al género *Leucosporidium* será necesario caracterizarlas de acuerdo a las características propias del género (Fell y cols., 1969).

### **Género *Cryptococcus***

Se identificaron 8 levaduras pertenecientes a este género correspondientes al 10,4% del total de levaduras identificadas. Dentro de estas levaduras se identificaron dos aislados como la levadura *C. victoriae* observando un 100% de identidad nucleotídica de estos aislados para la región ITS. Esta levadura fue aislada a partir de muestras de suelo desde la isla Victoria y desde muestras de suelo en el valle Liquen desde territorio antártico (Montes y cols., 1999), por lo tanto probablemente los aislados obtenidos correspondan a esta levadura. Por otra parte se identificaron 3 aislados como la levadura *C. gilvescens* y un aislado como la levadura *C. terricola*. La primera fue aislada desde muestras de hielo desde los Alpes italianos y la segunda ha sido aislada desde Islandia (Turchetti y cols., 2008), pero ambas no han sido reportadas desde el continente antártico. Por último, se identificó un aislado como la levadura *C. waticus* descrita previamente en territorio antártico (Guffogg y cols., 2004).

### **Géneros *Wickerhamomyces*, *Candida* y *Metschnikowia***

Se identificaron 3 aislados como la levadura *Wickerhamomyces anomalus* y 1 aislado como la levadura *Candida sake*. El género *Wickerhamomyces* fue descrito por primera vez por Kurtzamn y colaboradores en el año 2008 en un trabajo en donde se abordó la sistemática dentro del género *Pichia*. A partir de este trabajo las levaduras *Willia anómala*, *Hansenula anómala*, *Pichia anómala* y *Endomyces anomalus* se consideran sinónimos de la levadura *Wickerhamomyces anomalus*. No se han reportado

aislados de estas especies en territorio antártico ni tampoco son géneros de levaduras que se encuentren habitualmente en este continente (Shivaji y Prasad, 2008). Por lo tanto, es la primera vez que se identifican aislados como la levadura *Wickerhamomyces anomalus* desde territorio antártico. Por otra parte la levadura *Candida sake* ha sido aislada desde muestras de suelo, agua dulce y agua de mar en el continente antártico. El aislado identificado como esta especie de levadura tuvo 100% de identidad de secuencia para la región ITS con secuencias depositadas en Genbank para esta especie, por esta razón es que probablemente corresponda a esta levadura. También se identificó una levadura como la especie *Metschnikowia bicuspidata* que a la fecha no ha sido descrita desde regiones frías del planeta.

Por último, se identificaron 4 aislados como pertenecientes al *phyllum* Ascomicete a través del análisis de secuencia de la región ITS, pero al identificar los mismo aislados utilizando los dominios D1/D2 se identificaron como la levadura *Candida davisiana*. Como se desprende claramente de estos resultados, no fue posible identificar molecularmente estos aislados como pertenecientes a alguna especie de levadura ya que utilizando dos regiones del rDNA se obtuvieron dos resultados distintos. Además, como se mencionó anteriormente estas levaduras poseen características macromorfológicas diferentes entre sí, sugiriendo que corresponden a levaduras distintas. Por lo tanto, para una correcta identificación de ambas levaduras será necesario otro tipo de caracterización, por ejemplo a nivel bioquímico o fisiológico.

## 5. CONCLUSIONES

1.- Del total de las levaduras identificadas, el 93% correspondieron a levaduras Basidomicetes mientras que el 7% restante correspondieron a levaduras Ascomicetes. Dentro de las levaduras Basidomicetes los géneros predominantes fueron *Cryptococcus*, *Mrakia*, *Rhodotorula* y *Sporidiobolus*. Además, este es el primer trabajo en donde se reporta el aislamiento de levaduras pertenecientes a los géneros *Sporidiobolus* y *Wickerhamomyces* desde territorio antártico.

2.- Se identificaron 16 especies de levaduras utilizando la región ITS y los dominios D1/D2 del rDNA como herramienta taxonómica. Dentro de estas 16 especies se identificaron 9 especies de levaduras que no han sido reportadas desde territorio antártico.

3. Se lograron diferenciar 7 aislados a nivel de especie utilizando los dominios D1/D2 del rDNA que no se lograron identificar a través de la región ITS. Por lo tanto, esta región es una herramienta taxonómica útil en identificación molecular de levaduras siendo complementaria a la región ITS.

4.- Si bien la identificación de levaduras utilizando el rDNA como herramienta taxonómica permitió identificar 61 levaduras (77%), 18 aislados no se lograron identificar a nivel de especie. Por lo tanto, otros tipos de estudios serán necesarios para identificar correctamente a estas levaduras.

## 6. PROYECCIONES

Este trabajo es una investigación pionera en el estudio de la microbiota de levaduras del territorio antártico chileno y sienta las bases para estudios posteriores a realizar dentro de este campo. Algunas levaduras no se lograron identificar a través de los análisis moleculares realizados, por lo tanto sería interesante poder identificarlas a nivel de especie, utilizando otro marcador molecular o realizando ensayos bioquímicos y fisiológicos. Además, en este trabajo se reportaron especies de levaduras que previamente no se habían identificado desde territorio antártico. Este hallazgo abre las puertas a investigar estas levaduras desde un punto de vista ecológico, que sería descubrir ¿cuál es el aporte de estas levaduras a este ecosistema? y desde un punto de vista biotecnológico, estudiar ¿Cuáles son las posibles aplicaciones biotecnológicas de estas levaduras?.

Por último, identificar las levaduras a nivel de especie abre las puertas para otro tipo de estudios más aplicados, como evaluar la: producción de enzimas extracelulares, producción de pigmentos o posible producción de micosporinas por algunas de estas levaduras.

## 7. BIBLIOGRAFIA

**Babu J, Pramod R y George T.** 2008. Cold active microbial lipases: Some hot issues and recent developments. *Biotechnol. Ad.* **26:** 457–470.

**Baeza M, Retamales P, Sepúlveda D, Lodato P, Jiménez A y Cifuentes V.** 2009. Isolation, characterization and long term preservation of mutant strains of *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *J Basic Microb.* **49:** 135–141.

**Bergauer P, Fonteyne P-A, Nolard N, Schinner F, Margesin R.** 2005. Biodegradation of phenol and phenol-related compounds by psychrophilic and cold-tolerant alpine yeasts. *Chemosphere.* **59:** 909–918.

**Butinar L, Spencer-Martins I y Gunde-Cimerman N** 2007. Yeasts in high Arctic glaciers: the discovery of a new habitat for eukaryotic microorganisms. *Antonie van Leeuwenhoek.* **91:** 277–289.

**Cavicchioli R, Siddiqui K, Andrews D y Sowers K.** 2002. Low-temperature extremophiles and their applications. *Curr Opin Biotechnol.* **13:** 253-61.

**Connell L, Redman R, Craig S, Scorzetti G, Iszard M y Rodriguez R.** 2008. Diversity of Soil Yeasts Isolated from South Victoria Land, Antarctica. *Microb Ecol.* **56:** 448–459.

**Connell L, Redman R, Rodriguez R, Barrett A, Iszard M y Fonseca A.** 2010. *Dioszegia antarctica* sp. nov. and *Dioszegia cryoxerica* sp. nov., psychrophilic basidiomycetous yeasts from polar desert soils in Antarctica. *Inter J Syst and Evol Microb.* **60:** 1466–1472.

**De García V, Brizzio S, Libkind D, Buzzini P y Van Broock M.** 2007. Biodiversity of cold-adapted yeasts from glacial melting water rivers in Patagonia, Argentina. *FEMS Microbiol Ecol.* **59**: 331–341.

**Di menna M.** 1960. Yeast from Antarctica. *J. gen. Microb.* **23**: 295-300.

**Diaz M y Fell J.** 2000. Molecular analyses of the IGS & ITS regions of rDNA of the psychrophilic yeasts in the genus *Mrakia*. *Antonie van Leeuwenhoek.* **77**: 7–12.

**Esteve-Zarzoso R, Belloch C, Uruburul F y Querol A.** 1999. Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.85 rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *Int J Syst Bacteriol.* **49**: 329-337.

**Fell J, Statzell A, Hunter L y Phaff H.** 1969. *Leucosporidium* gen. n., the heterobasidiomycetous stage of several yeast of the genus *Candida*. *Antonie van Leeuwenhoek.* **35**: 433-462.

**Fell J y Statzell-Tallman A.** 1998. Descriptions of teleomorphic basidiomycetous genera and species. En : Kurtzman CP & Fell JW (eds). *The Yeasts, a Taxonomic Study*. 4th ed. Pp 676–677. Elsevier Science Publ. Amsterdam.

**Fell J, Boekhout T, Fonseca A, Scorzetti G y Statzell-Tallman A.** 2000. Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by large-subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis. *Int J Syst and Evol Microb.* **50**: 1351–1371.

**Ferreira N, Belloch C, Querol A, Manzanares P, Vallez S y Santos A.** 2010. Yeast Microflora Isolated From Brazilian Cassava Roots: Taxonomical Classification Based on Molecular Identification. *Curr Microbiol.* **60**: 287–293.

**Gerday C, Aittaleb M, Arpigny J, Baise E, Chessa J, Garsoux G, Petrescu I y Feller G.** 1997. Psychrophilic enzymes: a thermodynamic challenge. *Biochim Biophys Acta.* **17:** 119-31.

**Gounot A.** 1986. Psychrophilic and psychrotrophic microorganisms. *Experientia.* **42:** 1192-7.

**Guadet J, Julien J, Lafay J y Brygoo Y.** 1989. Phylogeny of Some *Fusarium* Species, as Determined by Large-Subunit rRNA Sequence Comparison. *Mol. Biol. Evol.* **6:** 227-242.

**Guffogg S, Thomas-Hall S, Holloway P y Watson K.** 2004. A novel psychrotolerant member of the hymenomycetous yeasts from Antarctica: *Cryptococcus waticus* sp. nov. *Int. J Syst and Evol Microb.* **54:** 275–277.

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

**Inácio J, Portugal L, Spencer-Martins I y Fonseca A.** 2005. Phylloplane yeasts from Portugal: Seven novel anamorphic species in the Tremellales lineage of the Hymenomycetes (Basidiomycota) producing orange-coloured colonies. *FEMS Yeast Research* **5:** 1167–1183.

**Kurtzman C.** 1994. Molecular Taxonomy of the Yeasts. *Yeast* **10:** 1727- 1740.

**Kurtzman C\_y Robnett C.** 1998. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie van Leeuwenhoek* **73:** 331–371, 1998.

**Kurtzman C, Robnett C y Basehoar-Powers E.** 2008. Phylogenetic relationships among species of *Pichia*, *Issatchenkia* and *Williopsis* determined from multigene sequence analysis, and the proposal of *Barnettozyma* gen.nov., *Lindnera* gen.nov. and *Wickerhamomyces* gen.nov. *FEMS Yeast Res.* **8**: 939–954.

**Marangon A, Bertoni T, Kioshima E, Falleiros De Pádua , Venturini S, Svidzinski T.** 1989. Dehydrated gelatin drops: a good method for fungi maintenance and preservation. *New Microb.* **26**: 305-9.

**Margasin R y Schinner F.** 2001. Biodegradation and bioremediation of hydrocarbons in extreme environments. *Appl Microbiol Biotechnol.* **56**: 650-63.

**Margasin R, Fonteyne P.A, Schinner F y Sampaio J.** 2007. *Rhodotorula psychrophila* sp. nov., *Rhodotorula psychrophenolica* sp. nov. and *Rhodotorula glacialis* sp. nov., novel psychrophilic basidiomycetous yeast species isolated from alpine environments. *Int J of Syst and Evol Microb.* **57**: 2179–2184.

**Möller C y Dreyfuss M.** 1996. Microfungi from Antarctic Lichens, Mosses and Vascular Plants. *Mycologia.* **88**: 922-933.

**Montes M, Belloch C, Galiana M, Garcia M, Andrés C, Ferrer S, Torres-Rodriguez J y Guinea J.** 1999. Polyphasic taxonomy of a novel yeast isolated from antarctic environment; description of *Cryptococcus victoriae* sp. nov. *Syst Appl Microbiol.* **22**: 97-105.

**Nagahama T, Hamamoto M, Nakase N, Takami H y Horikoshi K.** 2001. Distribution and identification of red yeasts in deep-sea environments around the northwest Pacific Ocean. *Antonie van Leeuwenhoek.* **80**: 101–110,

**Noumi E, Snoussi M, Saghroun F, Ben Said M, Del Castillo L, Valentin E y Bakhrouf A.** 2009. Molecular typing of clinical *Candida* strains using random amplified polymorphic DNA and contour-clamped homogenous electric fields electrophoresis. *J. Appl Microb.* **107**: 1991–2000.

**Oelofse A, Lonvaud-Funel A, Du Toit M.** 2009. Molecular identification of *Brettanomyces bruxellensis* strains isolated from red wines and volatile phenol production. *Food Microbiology.* **26**: 377–385.

**Orberá T.** 2009. Métodos moleculares de identificación de levaduras de interés biotecnológico. *Rev Iberoam Micol.* **21**: 15-19.

**Prasad G.** 2005. Sequence analysis of internal transcribed spacer region for phylogenetic assessment of Ascomycetous Yeasts. En Satyanarayana T, Johri B (eds.), *Microbial Diversity: Current Perspectives and Potential Applications*, Pp 149-165. I.K. International Publishing House Pvt. Ltd., New Delhi.

**Robinson C.** 2001. Cold adaptation in Arctic and Antarctic fungi. *New Phytologist.* **151**: 341-353.

**Romo S, Alves M, Arévalo M, Úbeda J y Briones A.** 2010. Yeast biodiversity from oleic ecosystems: Study of their biotechnological properties. *Food Microbiology.* **27**: 487-492.

**Rozas J.** 2011. Aislamiento y caracterización bioquímica de levaduras antárticas, y análisis de actividad enzimática extracelular. Memoria de Título para optar al título de Ingeniero en Biotecnología Molecular. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

**Rothschild L y Mancinelli R.** 2001. Life in extreme environments. *Nature.* **409**: 1092-1101.

**Rusell N.** 2000. Toward a molecular understanding of cold activity of enzymes from psychrophiles. *Extremophiles*. **4**: 83-90.

**Sampaio J, Gadanho M, Bauer R y Michael Weiß.** 2003. Taxonomic studies in the Microbotryomycetidae: *Leucosporidium golubevii* sp. nov., *Leucosporidiella* gen. nov. and the new orders Leucosporidiales and Sporidiobolales *Mycol Progress*. **2**: 53-68.

**Shivaji S y Prasad G.** 2008. Antarctic Yeast: Biodiversity and Potential Applications. En Satyanarayana T, Kunze G (eds.), *Yeast Biotechnology: Diversity and Applications*. Pp 3-15. Springer, Nueva Delhi.

**Shin-Ichi Fujita, Yasuko Senda, Shigeki Nakaguchi, y Takuma Hashimoto.** 2001. Multiplex PCR Using Internal Transcribed Spacer 1 and 2 Regions for Rapid Detection and Identification of Yeast Strains. *J of ClinMicrob*. P. 3617-3622.

**Scorzetti G, Petrescu I, Yarrow D y Fell J.** 2000. *Cryptococcus adeliensis* sp. nov., a xylanase producing basidiomycetous yeast from Antarctica. *Antonie van Leeuwenhoek*. **77**: 153-157.

**Srivastava A y Schlessinger D.** 1991. Structure and organization of ribosomal DNA. *Biochimie*. **73**: 631-638.

**Scorzetti G, Fell J, Fonseca A y Statzell-Tallman A.** 1991. Systematics of basidiomycetous yeasts: a comparison of large subunit D1/D2 and internal transcribed spacer rDNA regions. *FEMS Yeast Research*. **2**: 495-517.

**Takashima M, Deak T y Nakase T.** 2001. Emendation of *Dioszegia* with redescription of *Dioszegia hungarica* and two new combinations, *Dioszegia aurantiaca* and *Dioszegia crocea*. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **47**, 75-84.

**Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M y Kumar S. 2011.** MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol and Evol* doi:10.1093/molbev/msr121. [[www.megasoftware.net](http://www.megasoftware.net)].

**Thomas-Hall S, Watson K y Scorzetti G. 2002a.** *Cryptococcus statzelliae* sp. nov. and three novel strains of *Cryptococcus victoriae*, yeasts isolated from Antarctic soils. *Int J Syst and Evol Microb.* **52**: 2303–2308.

**Thomas-Hall S y Watson K. 2002b.** *Cryptococcus nyarrowii* sp. nov., a basidiomycetous yeast from Antártica. *Int J. of Syst and Evol Microb.* **52**: 1033–1038.

**Thomas-Hall S, Turchetti B, Buzzini P, Branda E, Boekhout T, Theelen B y Watson K. 2010.** Cold-adapted yeasts from Antarctica and the Italian Alps—description of three novel species: *Mrakia robertii* sp. nov., *Mrakia lollopis* sp. nov. and *Mrakiella niccombsii* sp. nov. *Extremophiles.* **14**: 47–59.

**Thompson J, Higgins D, Gibson T. 1994.** CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**:4673–4680.

**Turchetti B, Buzzini P, Goretti M, Branda E, Diolaiuti G, D'Agata C, Smiraglia C y Vaughan-Martini A. 2008.** Psychrophilic yeasts in glacial environments of Alpine glaciers. *FEMS Microbiol Ecol.* **63**:73–83.

**Vandamme P, Pot B, Gillis M, De Vos P, Kersters K y Swings J. 1996.** Polyphasic Taxonomy, a Consensus Approach to Bacterial Systematics. *Microb reviews.* P: 407–438.

**Vaudano E y Garcia-Moruno E.** 2008. Discrimination of *Saccharomyces cerevisiae* wine strains using microsatellite multiplex PCR and band pattern analysis. *Food Microb.* **25**: 56–64.

**Vishniac H.** 1985. *Cryptococcus socialis* sp. nov. and *Cryptococcus consortionis* sp. nov., Antarctic Basidioblastomycetes. *Int J Syst bacterio.* **35**: 119-122.

**Vishniac H y Onofri S.** 2002. *Cryptococcus antarcticus* var. *circumpolaris* var. nov., a basidiomycetous yeast from Antarctica. *Antonie van Leeuwenhoek.* **83**: 231–233.

**Wang Q, Jia J y Bai F.** 2008. Diversity of basidiomycetous phylloplane yeasts belonging to the genus *Dioszegia* (Tremellales) and description of *Dioszegia athyri* sp. nov., *Dioszegia butyracea* sp. nov. and *Dioszegia xingshanensis* sp. nov. *Antonie van Leeuwenhoek.* **93**: 391–399.

**Werner-Washburne M, Braun E, Johnston G y Singer R.** 1993. Stationary Phase in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microb reviews*, P: 383-401.

**Xio M y Xhou P.** 2007. *Mrakia psychrophila* sp. nov., a new species isolated from Antarctic soil. *J. of Zhejiang University science B.* **8**:260-265.

## 8.1 Temperaturas de crecimiento

Cepas	22°C	15°C	10°C	4°C	Especie
T01_3_22C	+++	+++	+++	+++	<i>S.salmonicolor</i>
T01_6_10C	+++	++	++	+	<i>S.salmonicolor</i>
T5_1_22C	+++	+++	+++	+++	<i>S.salmonicolor</i>
T13_1_22C	+++	+++	+++	+++	<i>S.salmonicolor</i>
T14_2_4C	+++	+++	+++	+++	<i>S.salmonicolor</i>
T14_2_22C	+++	+++	+++	+++	<i>S.salmonicolor</i>
T16_1_22C	+++	++	++	++	<i>S.salmonicolor</i>
T16_2_4C	+++	++	++	+++	<i>S.salmonicolor</i>
T19_1_22C	+++	+++	++	+++	<i>S.salmonicolor</i>
T21_1_22C	+++	+++	+++	+++	<i>S.salmonicolor</i>
T21_2_10C	+++	+++	+++	+++	<i>S.salmonicolor</i>
T21_4_10C	+++	+++	+++	++	<i>S.salmonicolor</i>
T21_6_10C	+++	++	++	+	<i>S.salmonicolor</i>
T27_2_22C	+++	+++	+++	+++	<i>S.salmonicolor</i>
T27_4_22C	+++	+++	+++	+++	<i>S.salmonicolor</i>
T27_5_22C	+++	+++	++	+++	<i>S.salmonicolor</i>
T27_2_10C	+++	++	++	+++	<i>S.salmonicolor</i>
T29_1_22C	+++	++	++	++	<i>S.salmonicolor</i>
T31_2_10C	+++	++	++	+	<i>S.salmonicolor</i>
T31_5_4C	+++	+++	++	+++	<i>S.salmonicolor</i>
T32_2_4C	+++	+++	++	+++	<i>S.salmonicolor</i>
T32_1_22C	+++	+++	++	+++	<i>S.salmonicolor</i>
T32_2_22C	+++	+++	+++	++	<i>S.salmonicolor</i>
T34_2_10C	+++	+++	+++	+++	<i>S.salmonicolor</i>

Cepas	22°C	15°C	10°C	4°C	Especie
T05 3 4C	-	+	+	+++	<i>M.psychrophilia</i>
T14 1 4C	-	+	+	+++	<i>M.psychrophilia</i>
T19 1 4C	-	+	+	+++	<i>M.psychrophilia</i>
T26 2 4C	-	+	+	+++	<i>M.psychrophilia</i>
H03 4C	+	+++	++	+++	<i>Mrakia</i>
P02 1 4C	+	++	++	+++	<i>Mrakia</i>
T15 4C	+	++	+	+++	<i>M. robertii</i>
T18 1 10C	+	++	++	+++	<i>M.blollopis</i>
T23 4C	+++	+++	+++	+++	<i>Mrakia</i>
T29 3 4C	-	++	++	+++	<i>Mrakia</i>
T9 15C	+++	+++	+++	+++	<i>Dioszegia sp</i>
T11 2 10C	+++	++	+	+	<i>Dioszegia sp</i>
T29 4 4C	-	-	-	+	<i>D.crocea</i>
T11 2 15C	+	++	++	+++	<i>Rhodotorula sp</i>
T20 1 4C	-	++	++	+++	<i>Rhodotorula sp</i>
T8 3 4C	-	+++	++	++	<i>R.glacialis</i>
T32 1 4C	-	+	+	++	<i>R.glacialis</i>
T08 1 22C	-	-	-	+	<i>R.laryngis</i>
T10 2 4C	+++	+++	++	+++	<i>R.laryngis</i>
T13 2 22C	+++	+++	++	+++	<i>R.laryngis</i>
T27 7 4C	+++	++	++	+++	<i>R.laryngis</i>
T10 1 22C	+++	-	-	-	<i>Rhodotorula sp</i>

T13 3 22C	+++	+++	+++	+++	+++	<i>L. creatinivora</i>
T13 7 10C	++	++	+++	+++	+++	<i>L. creatinivora</i>
T14 1 22C	+++	+++	+++	+++	+++	<i>L. creatinivora</i>
T14 3 22C	+++	+++	+++	+++	+++	<i>L. creatinivora</i>
T14 3 10C	+++	+++	+++	+++	+++	<i>L. creatinivora</i>
T33 1 22C	+++	++	++	++	++	<i>L. creatinivora</i>
T33 2 22C	+++	+++	+++	+++	+++	<i>L. creatinivora</i>
T33 15C	+++	+++	+++	+++	+++	<i>L. creatinivora</i>
T33 1 10C	+++	+++	+++	+++	+++	<i>L. creatinivora</i>
T1 4 22C	+++	+++	+++	+++	+++	<i>M. bicuspidata</i>
T21 1 4C	-	++	++	++	+++	<i>L. antarcticum</i>
T21 3 10C	+	++	+++	+++	+++	<i>L. antarcticum</i>
T30 2 4C	-	+	+	+	+	<i>L. antarcticum</i>
T17 10 4C	+++	+++	+++	+++	+++	<i>C. gilvoscens</i>
T17 1 10C	+++	+++	+++	+++	+++	<i>C. gilvoscens</i>
T17 4C	+++	+++	+++	+++	+++	<i>C. gilvoscens</i>
T15 22C	+++	++	++	++	++	<i>C. terricola</i>
T2 3 10C	+++	+++	+++	+++	+++	<i>C. wattiicus</i>
T23 1 10C	+++	+++	+++	+++	+++	<i>C. gastricus</i>
T2 2 22C	+++	+++	+++	+++	+++	<i>C. victoriae</i>
T18 1 22C	+++	++	++	++	+++	<i>C. victoriae</i>
H01 10C	+++	+++	+++	+++	++	<i>W. anomalus</i>
H01 1 10C	+++	+++	+++	++	++	<i>W. anomalus</i>
H05 1 10C	+++	+++	+++	+++	++	<i>W. anomalus</i>
T17 1 22C	+++	++	++	++	++	<i>Ascomycete sp</i>
T17 2 22C	+++	+++	+++	+++	-	<i>Ascomycete sp</i>
T11 1 15C	+	++	++	++	+++	<i>Ascomycete sp</i>
T27 6 4C	+++	+	+	+	-	<i>Ascomycete sp</i>
T09 3 4C	-	+	+	+	+++	<i>Levadura antarctica sp</i>
T10 1 4C	-	+	+	+	+++	<i>Levadura antarctica sp</i>
T15 1 4C	-	+	+	+	+++	<i>Levadura antarctica sp</i>
H14 1 4C	+++	+++	+++	+++	+++	<i>C. sake</i>

## 8.2. Nombres y características sitios de muestreo.

Nombre	T (°C)	Altura (m)
T1	1,3	34
T2	2,6	0
P2	2,06	5
T5	1,7	12
T6	1,7	12
T7	2,3	33
T8	0,2	32
T9	2	29
T10	0,4	49
T11	11,6	-6
T12	10,7	6
T13	11	64
T14	7,9	66
T15	4,4	74
T16	3,8	101
T17	3,9	43
T18	5,6	22
T19	5	27
T20	3,1	78
T21	0,8	84
T22	6,8	31
T23	7,4	7
T24	11,9	8
T25	4,8	2
T26	3,6	30
T27	10,2	19
T28	8,2	27
T29	3,08	20
T30	1,4	39
T31	1,1	81
T32	9,2	NM
T33	7,4	NM
T34	5,8	NM
H1	9,5	19
H2	8,2	17
H3	2,6	39
H5	1,4	39
H6	2,3	26
H7	8,8	NM
H8	5,8	NM
H9	10,1	NM
H10	5,8	NM
H11	6	NM
H12	2,6	NM
H14	ND	NM
H15	5,6	57
H16	5,1	17
H17	3,2	182

ND: No determinada

NM: Nivel del mar