

UCH-FC
MAG-B
C313
C.1

**TIPIFICACION MOLECULAR Y ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE
LEVADURAS ANTARTICAS**



Entregada a la Universidad de Chile
En cumplimiento parcial de los requisitos para optar
al grado de Magister en Ciencias Biológicas
Facultad de Ciencias

Mario Esteban Carrasco Troncoso
Marzo 2013
Santiago-Chile

Director de Tesis: Dr. Marcelo Baeza Cancino

FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACION

TESIS DE MAGISTER

**Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de
Magister presentada por el candidato**

MARIO ESTEBAN CARRASCO TRONCOSO

**Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para
optar al grado de Magíster en ciencias biológicas con mención en
Microbiología, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el
día 22 de Enero de 2013**

Director de Tesis:

Dr. Marcelo Baeza Cancino

Comisión de Evaluación de la Tesis

Dra. Margarita Carú

Dr. Francisco Chávez

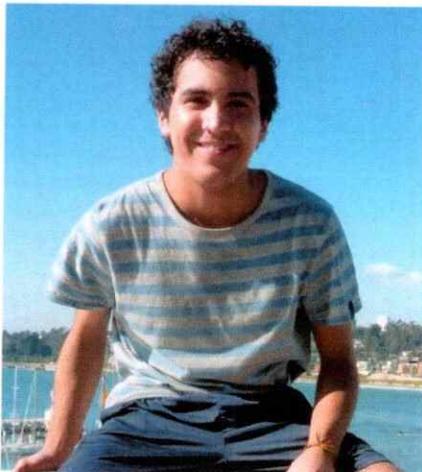


Handwritten signatures in blue ink, including a large signature that appears to be 'M. Baeza Cancino' and another signature below it.



A todos los que contribuyeron a este trabajo

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. En el año 2010 realicé y defendí mi memoria de título sobre identificación molecular de levaduras antárticas, a través de la cual obtuve el título profesional de Ingeniero en Biotecnología Molecular. A lo largo del magíster que concluye con este trabajo, continué desarrollando mi tesis en tipificación molecular de levaduras antárticas y pretendo profundizar conocimientos en esta área durante mi formación Doctoral.



AGRADECIMIENTOS

Agradezco en primer lugar, a Marcelo por integrarme en su grupo de trabajo, por los consejos, por los tirones de oreja y por dejarme formar parte de un grupo de trabajo muy ameno y que espero siga siendo igual durante mi formación Doctoral. Al Dr. Víctor Cifuentes y a Jenny por los consejos vocacionales y por la comprensión tanto científica como humana cuando lo necesité. A Dony y Salva por su buena disposición para responderme las preguntas que les hice y ayudarme en las muchas cosas que necesité, son unos grandes, gracias. A mis compañeros de Lab, no los nombro a todos porque son muchos, pero principalmente a mi gran grupo de trabajo: Ori, Pablo, Coté y JuanMa que estuvieron siempre ahí cuando los necesité, haciendo el desarrollo de este trabajo mucho más ameno. A mis amigos: JuanMa, Mauro, Salva, Carol, Karina, Ori, Dani y Lele, por estar siempre ahí en las buenas y en las malas y aguantar mi mal genio. Especialmente a Juanma y Mauro por los buenos ratos acompañados de una buena Gatorade.

A mi Familia: Mario, Ana, Loreto, Carolina y Rambo que fueron parte fundamental en este proceso, brindándome gratos momentos y siendo el pilar fundamental en el cuál me he apoyado durante toda mi vida. Gracias totales!!!!.

Por último agradezco a mi amor, Sandra, que durante el desarrollo de esta tesis pasó de ser una gran amiga a ser mi polola, mi confidente y mi compañera ideal. Gracias por la paciencia y disculpa por los malos ratos, eres la mejor!. Oye.....Te amo!!!

Finalmente agradezco a Conicyt y al Instituto Chileno Antártico (proyecto T-23-09), los cuáles financiaron este trabajo. GRACIAS!

INDICE



Resumen bibliográfico.....	ii
Agradecimientos.....	iii
Índice General.....	iv
Índice de tablas.....	vi
Índice de figuras.....	vii
Abreviaturas.....	viii
Resumen.....	ix
Abstract.....	xii
1. Introducción.....	1
Hipótesis.....	11
Objetivos.....	12
2. Materiales y Métodos.....	13
2.1 Materiales.....	13
2.2 Métodos.....	13
3. Resultados.....	20
3.1 Amplificación, purificación y secuenciación de regiones dentro del gen <i>COI</i>	20
3.1.1 Evaluación del gen <i>COI</i> en identificación de levaduras.....	26
3.2 Actividad antimicrobiana.....	34
3.2.1 Análisis de actividad micocida.....	34
3.2.2 Análisis de extractos de proteínas extracelulares y actividad micocida	38

3.2.3	Análisis de actividad antibacteriana.....	39
3.2.4	Análisis de extractos de proteínas extracelulares y actividad antibacteriana.....	42
3.3	Determinación de la existencia de dsRNA en las levaduras.....	45
4.	Discusión.....	49
4.1	Actividad micocida y perfiles de dsRNA.....	54
4.2	Actividad antibacteriana.....	56
5.	Conclusiones.....	59
6.	Referencias.....	60
7.	Anexo.....	67
7.1	Porcentajes de identidad nucleotídica entre las secuencias COI para las levaduras con las que se trabajó	67
7.2	Porcentajes de identidad nucleotídica entre las secuencias ITS para las levaduras con las que se trabajó	68
7.3	Porcentajes de identidad nucleotídica entre los dominios D1/D2 del rDNA para las levaduras con las que se trabajó.....	69
7.4	Temperaturas óptimas de crecimiento de todas levaduras con las que se trabajó.....	69

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Cepas.....	14
Tabla 2. Partidores.....	16
Tabla 3. Análisis mediante Blastx para las secuencias de la región minibar dentro del gen <i>COI</i>	25
Tabla 4. Identidad nucleotídica de secuencias entre los marcadores ITS, D1/D2 y región minibar dentro del gen <i>COI</i> , para levaduras del género <i>Cryptococcus</i>	32
Tabla 5. Identidad nucleotídica de secuencias entre los marcadores ITS, D1/D2 y región minibar dentro del gen <i>COI</i> , para levaduras de los géneros <i>Mrakia</i>	32
Tabla 6. Identidad nucleotídica de secuencias entre los marcadores ITS, D1/D2 y región minibar dentro del gen <i>COI</i> , para levaduras del género <i>Rhodotorula</i>	32
Tabla 7. Identidad nucleotídica de secuencias entre los marcadores ITS, D1/D2 y región minibar dentro del gen <i>COI</i> , para levaduras del género <i>Leuconeuospora</i>	32
Tabla 8. Ensayos cruzados de actividad micocida.....	36
Tabla 9. Ensayos de actividad antibacteriana a 22°C.....	41
Tabla 10. Ensayos de extractos proteicos extracelulares de levaduras.....	44
Tabla 11. Perfiles de dsRNA de levaduras antárticas.....	46

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Amplicones obtenidos a través de PCR con los partidores degenerados diseñados	21
Figura 2. Amplicones de la región minibar del gen COI utilizando la pareja de partidores Uniminibar	23
Figura 3. Cladograma de máxima parsimonia para las secuencias antárticas obtenidas de la región minibar del gen <i>COI</i>	27
Figura 4. Cladograma de máxima parsimonia de las secuencias antárticas obtenidas para la región ITS1-5.8S-TS2.....	28
Figura 5. Cladograma de máxima parsimonia de las secuencias antárticas obtenidas para los dominios D1/D2.....	29
Figura 6. Actividad micocida de levaduras antárticas.....	34
Figura 7. Actividad micocida de extractos proteicos extracelulares, en ensayos de placa.....	40
Figura 8. Actividad antibacteriana de extractos proteicos extracelulares de la levadura <i>L. creatinivora</i> , en ensayos de placa.....	43
Figura 9. Perfiles de dsRNA de levaduras antárticas.....	47

ABREVIATURAS

BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
EDTA	Acido etilendiaminotetracético
ITS	Espaciador transcrito interno
rDNA	DNA ribosómico
TAE	Amortiguador Tris- ac.acético- EDTA
TE	Amortiguador Tris- EDTA
YM	"Yeast Medium"
dsRNA	Ácido ribonucleico de doble hebra
EGE	Elemento genético extracromosómico
VLP	Partícula tipo virus



RESUMEN

La identificación molecular de hongos se basa principalmente en la comparación a nivel de secuencia nucleotídica de regiones del DNA ribosómico. Entre, las regiones más utilizadas están los espaciadores transcritos internos 1 y 2 (ITS1 e ITS2) incluyendo la región conservada 5.8S y los dominios D1/D2 del rDNA 26S. Estos marcadores han mostrado buenos resultados en identificación de levaduras, no obstante en muchos casos, estos marcadores no han mostrado suficiente nivel de resolución para la identificación de levaduras a nivel de especie. Debido a esto, constantemente se está en la búsqueda de marcadores moleculares con mayor nivel de resolución taxonómico. Un candidato es el gen mitocondrial citocromo oxidasa 1 (*COI*), postulado como marcador universal en organismos eucariontes, el cuál ha sido muy poco utilizado en hongos. Además, el fenotipo micocida (anteriormente Killer), corresponde a la capacidad de matar a otras levaduras por medio de la producción de toxinas proteicas. En algunos casos este fenotipo es codificado por virus del tipo RNA de doble hebra (dsRNA). Este tipo de virus se encuentra en una amplia variedad de levaduras y hongos filamentosos, no posee ciclo extracelular, coevolucionando con su hospedero y no siempre está asociado a algún fenotipo "killer". Tanto la actividad micocida como la presencia dsRNAs, han sido postulados como herramientas adicionales en tipificación de levaduras.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la utilidad del gen *COI* en identificación de levaduras y evaluar la utilidad de los perfiles de actividad micocida y los perfiles de dsRNA en tipificación de levaduras. Se analizaron bioinformáticamente las secuencias aminoacídicas de *COI* de levaduras y hongos filamentosos disponibles en la base de datos, y se diseñaron partidores degenerados que amplificarían regiones conservadas de este gen. Además se evaluaron los partidores llamados Uni-minibar (descritos previamente) que se ha demostrado que amplifican una región denominada minibar dentro del gen *COI* en diversos organismos. También, se analizaron los perfiles de actividad antimicrobiana de las diferentes especies de levaduras y su contenido de dsRNAs.

No se obtuvo resultados satisfactorios con los distintos partidores degenerados diseñados por nosotros, pero al evaluar los partidores Uni-minibar se logró obtener amplicones para las 21 especies de levaduras analizadas, pertenecientes a 12 géneros distintos. Esta región presentó una mayor resolución taxonómica en comparación a los espaciadores transcritos internos y fue similar a la obtenida para los dominios D1/D2 del rDNA. Además, este marcador logró diferenciar especies de levaduras pertenecientes a los géneros *Cryptococcus*, *Mrakia*, *Rhodotorula* y *Leuconeuospora* que no se habían logrado diferenciar anteriormente, detectando diferencias intraespecíficas. Por otra parte, los perfiles de dsRNA y de actividad micocida fueron útiles para diferenciar las levaduras pertenecientes a estos géneros ya que estas presentaron diferentes perfiles, para ambos marcadores. Específicamente, se logró diferenciar la levadura *M. psychrophila* de las restantes de su género y también se diferenciaron dos aislados identificados previamente como *R. glacialis*. Todos estos resultados sugieren que las 3

aproximaciones evaluadas en este trabajo serían útiles para tipificar levaduras, debido al nivel de resolución taxonómico que se observó para cada uno de ellos. No obstante esto debe ser validado ampliando el número de levaduras analizadas.

ABSTRACT

The molecular identification of fungi is mainly based on the comparison of nucleotide sequences of ribosomal DNA regions. The most commonly used regions are the internal transcribed spacer 1 and 2 (ITS1 and ITS2) including the conserved region 5.8S, and the D1/D2 domains of the 26S rDNA. These markers have shown good results for yeasts identification, however in many cases and with the increase of new species described from different environments, these markers have not shown enough resolution level for their identification. For that, there is a constant searching for markers with higher molecular taxonomic resolution. A candidate is the mitochondrial gene cytochrome oxidase 1 (*COI*), which has been postulated as universal marker for eukaryotic organisms, however few investigations have been made in fungi kingdom. On the other hand, the micocide phenotype (formerly Killer) corresponds to the ability of killing other yeast species by production the proteic toxins, encoded by double stranded RNA (dsRNA) viruses in some cases. These kind of viruses infected a wide variety of yeast and filamentous fungi, have no extracellular cycle co-evolving with the host, and not always are associated with a "killer" phenotype. Both, the micocide activity and the dsRNAs presence have been proposed as additional tools in yeast typing.

The aim of this study was to evaluate the usefulness of the *COI* gene in yeast identification and evaluate the usefulness of micocida activity profiles and dsRNA profiles in yeast typing. We analyzed the *COI* amino acid sequences of yeasts and

filamentous fungi available in the database, and designed degenerate primers to amplify regions of this gene. We also evaluated the Uni-minibar primers (previously described) which have shown to amplify a region called minibar within *COI* gene in several organisms. Furthermore, we examined the antimicrobial activity profiles of different yeast species and their content of dsRNAs.

No successful results were obtained with the degenerate primers designed by us, but amplicons were obtained for 21 yeast species belonging to 12 different genera using the Uni-minibar primers. This region showed a higher taxonomic resolution compared to the internal transcribed spacers and was similar in relation to D1/D2 domains of the rDNA. In addition, this marker was able to differentiate yeast species belonging to the *Cryptococcus*, *Mrakia*, *Rhodotorula* and *Leuconeuospora* genera that had not been previously differentiated, detecting intraspecific differences. Moreover, dsRNA and micocide activity profiles were useful for differentiating yeast belonging to these genera because they showed different profiles for both markers. Specifically, these profiles were able to differentiate the yeast *Mrakia psychrophila* from the other ones and also two isolates previously identified as *Rhodotorula glacialis*.

All these results suggest that the three approaches evaluated in this study would be useful to typify yeasts. However this must be validated by increasing the number of analyzed yeasts.

INTRODUCCIÓN

Un aspecto clave dentro de cualquier investigación sobre microorganismos ambientales, es la identificación y tipificación de estos. En taxonomía molecular de hongos los marcadores más utilizados son los espaciadores transcritos internos (ITS) y los dominios D1/D2 de la subunidad mayor del ribosoma. Como se discute más adelante, debido a las limitaciones de ambos marcadores, se ha postulado al gen mitocondrial citocromo oxidasa 1 (*COI*) como marcador molecular para identificación de eucariontes, pero no se ha analizado su utilidad en levaduras. En este trabajo, se evaluará la capacidad de este marcador en la identificación molecular de levaduras antárticas y también se analizará otros marcadores propuestos en tipificación de levaduras como los son la producción y/o sensibilidad a antimicrobianos y la presencia de elementos genéticos extracromosómicos.

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 la fermentación y la 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 (teleomorfias) y vegetativas (anamorfias). 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-Zaroso 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 permiten complementar los métodos convencionales de identificación antes mencionados.

Identificación Molecular de levaduras

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 en algunos casos varían entre 100 y 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 ITS2. Dentro de la zona 26S se ha descrito una región 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. Este marcador es el más utilizado en identificación molecular de levaduras debido a que permite diferenciar levaduras a nivel de género y especie. Otro marcador que es muy utilizado en identificación molecular de levaduras, corresponde a los espaciadores transcritos internos (ITS), que son dos zonas hipervariables no codificantes que flanquean a la región 5.8S del rDNA. Análisis de secuencia de esta región han sido utilizados en identificación de levaduras que son muy cercanas filogenéticamente. 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.

El nivel de resolución de estos marcadores ha sido evaluado tanto para las levaduras Ascomycetes (Kurtzman y Robnett, 1998) como Basidiomycetes (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 un 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 (Carrasco y cols., 2012).

“DNA Barcoding”

El “DNA barcoding” es una iniciativa que busca encontrar un marcador genético universal para identificar organismos eucariontes a nivel de especie, debido a las limitaciones de los métodos clásicos de identificación. Se han realizado numerosas investigaciones que han abordado la pregunta: ¿Existe un marcador genético universal que sea capaz de identificar organismos a nivel de especie?. La pregunta aún sigue abierta, pero la comunidad científica ha propuesto en los últimos años la utilización del gen que codifica para la enzima citocromo oxidasa 1 (*COI*) como este posible marcador universal. La identificación de especies utilizando este marcador se basa en la amplificación, purificación, secuenciación y análisis nucleotídico de una región de 648 pb de este gen. Este marcador ha sido utilizado en identificación de eucariontes superiores y se ha evaluado su capacidad de identificación en peces (Ward y cols., 2005), mamíferos (Hajibabaei y cols., 2007), aves (Hebert y cols., 2004) y varios artrópodos (Hajibabaei y cols., 2006). Si bien no existen gran cantidad de publicaciones relativas al uso de este gen para identificación de hongos, Seiffter y colaboradores (Seiffter y cols, 2006) analizaron el nivel de resolución taxonómico de este gen con respecto a los espaciadores transcritos internos, para distintas especies pertenecientes al género *Penicillium*, encontrando que este marcador posee un nivel de resolución taxonómico superior a los espaciadores transcritos internos y demostraron que las

variaciones nucleotídicas intraespecíficas para este gen son mínimas. Además, reportaron presencia de intrones en sólo 2 cepas de las 370 analizadas.

Por otra parte, Meusnier y colaboradores (Meusnier y cols., 2008) analizaron las secuencias del gen *COI* disponibles en la base de datos del NCBI y calcularon el largo mínimo de secuencia nucleotídica suficiente para identificar organismos a nivel de especie. Derivado de este análisis, se desarrollaron partidores “universales” que amplifican una región de 130 pb del gen *COI* para diferentes grupos taxonómicos. Ellos demostraron que esta región de 130pb tienen una resolución taxonómica suficiente para la identificación a nivel de especie de las diferentes taxas que ellos analizaron, incluyendo hongos y levaduras. Estos resultados sugieren que el marcador *COI* podría ser útil en la identificación molecular de levaduras. En este trabajo se evaluará la capacidad de diferenciación de este marcador, tanto de aislados que se lograron identificar con los marcadores moleculares convencionales como también lo que no se lograron identificar. Además se ampliará la escasa información de citocromos oxidasa de hongos disponibles y servirá como punto de partida para futuras aplicaciones de este marcador en identificación molecular de levaduras.

Perfiles de actividad antimicrobiana como herramienta en tipificación de levaduras

Si bien los marcadores moleculares son capaces de identificar levaduras a nivel de especie, estos han demostrado ser poco resolutivos para diferenciar cepas de levaduras que pertenecen a una misma especie. Es por esto que se han propuesto la utilización de perfiles de sensibilidad a micotoxinas como marcadores fisiológicos,

capaces de detectar diferencias intraespecíficas entre diferentes aislados. Este método de identificación se basa en el mecanismo de acción de diferentes toxinas, en donde la unión específica entre la micotoxina y su receptor de membrana es necesaria para la acción de ésta (Golubev, 2006). Basado en esta racionalización Golubev planteó que los perfiles de sensibilidad de actividad micocida podrían tener relevancia taxonómica, ya que levaduras cercanas filogenéticamente probablemente tendrían composición de membrana similares y por lo tanto espectros de sensibilidad a micotoxinas parecidos. Además, se ha descrito que algunas cepas de levaduras son capaces de secretar sólo una toxina killer, mientras que otras producen varias toxinas con diferentes especificidades (Schmitt y Breinig, 2002). Buzzini y colaboradores en el año 2007 evaluaron los espectros de sensibilidad de distintas micotoxinas sobre diferentes levaduras ambientales, clínicas e industriales y evaluaron la resolución de este método en tipificación de levaduras (Buzzini y cols., 2007). Se determinó que este método de tipificación fue más resolutivo que los métodos moleculares de tipificación de levaduras para el grupo de levaduras con las que se trabajó.

El fenómeno “Killer” o micocida fue descrito por primera vez en la levadura *S. cerevisiae*, demostrándose que las toxinas producidas por esta levadura son codificadas por elementos citoplasmáticos de RNAs de doble hebra (dsRNA) asociadas a partículas tipo virus (VLPs) (Makover y Bevan, 1963). Las micotoxinas son glicoproteínas o proteínas de bajo peso molecular, producidas por algunas levaduras, las cuales matan células sensibles de otras especies de levaduras del mismo género o cercanas filogenéticamente (Marquina y cols., 2002). La producción de micotoxinas se ha descrito en levaduras de diversos géneros, como: *Candida*, *Cryptococcus*,

Debaryomyces, Hanseniaspora, Hansenula, Kluyveromyces, Metschnikowia, Pichia, Saccharomyces, Ustilago, Torulopsis, Williopsis, Aureobasidium y *Zygosaccharomyces*. Este es un campo activo de investigación, ya que cada cierto tiempo se reporta el descubrimiento de nuevas toxinas (Guo y cols., 2012; Bajaj y cols., 2012; Buzdar y cols., 2011; Comitini y cols., 2011; Santos y cols., 2011). A pesar de la gran cantidad de información sobre micotoxinas que se ha publicado, existe poco conocimiento acerca de levaduras psicrófilas “Killer” y sus micotoxinas adaptadas a bajas temperaturas. Recientemente, se reportó la existencia de una nueva micotoxina adaptada a bajas temperaturas producida por la levadura *Mrakia frígida*, aislada desde la antártica (Hua y cols., 2010). Sin embargo, aunque esta publicación corresponda al único reporte sobre este fenómeno, incentiva a evaluar la producción de micotoxinas por nuestra colección de levaduras aisladas desde el territorio Antártico chileno y a analizar si la producción de micotoxinas es una forma de competencia entre levaduras en estos hábitats.

Considerando estos aspectos, evaluaremos en este trabajo los diferentes perfiles de sensibilidad a micotoxinas de las levaduras antárticas que hemos aislado. Realizaremos ensayos cruzados de actividad micocida, los cuáles nos ayudarán a diferenciar aislados que no se lograron identificar mediante los métodos convencionales (fisiológicos y moleculares). También, se realizarán ensayos de actividad antibacteriana contra diferentes especies de bacterias, tanto Gram (-) como Gram (+) y se analizará la utilidad de estos perfiles de actividad antibacteriana, como herramienta de tipificación de levaduras al igual que los análisis de actividad micocida. Además, debido al incremento de los microorganismos resistentes a los antibacterianos comerciales disponibles, se hace necesario buscar y evaluar nuevos compuestos con actividad

antibacteriana. Los hongos son una gran fuente de metabolitos secundarios para la industria farmacéutica, pero se han realizado pocos estudios en donde se haya evaluado la producción de antibacterianos por levaduras con especificidad hacia bacterias. En este trabajo se evaluará la producción de antibacterianos producidos por levaduras psicrófilas aisladas desde la Antártica, ya que algunas corresponden a especies no descritas con anterioridad y por lo tanto podrían secretar nuevos antibacterianos de interés farmacéutico.

Elementos genéticos extracromosómicos en levaduras

En levaduras existen tres tipos de elementos genéticos extracromosómicos (EGEs); el DNA mitocondrial, los plásmidos lineales de dsDNA y los RNAs de doble hebra (dsRNA). Por su importancia en la célula, el DNA mitocondrial es el de mayor relevancia variando en tamaño desde 17,3 kb hasta 101,1 kb (Pfeiffer y cols., 2002). Los plásmidos lineales de dsDNA se encuentran en el citoplasma de diferentes especies de levaduras, asociándose su presencia a la producción de micotoxinas (Gunge y cols., 1981) pero en algunos casos su función es desconocida. Por otra parte, los dsRNA son EGEs citoplasmáticos que se han descrito como sistemas virales en diferentes levaduras. Estos virus son considerados elementos genéticos crípticos y sólo en algunos casos se han asociado con algún fenotipo del hospedero (Magliani, 1997; Baeza y cols., 2012). Se han descrito diferentes dsRNA citoplasmáticos en diferentes especies de levaduras, por lo tanto es un fenómeno ampliamente distribuido pero hasta la fecha no se sabe la función de la mayoría de estos elementos (Pfeiffer y cols., 2002). Como estos dsRNA

son elementos presentes en el citoplasma de las levaduras y sólo se transmiten intracelularmente, se han propuesto como marcadores en tipificación molecular de levaduras (Maglianni y cols., 1997; Schmitt y cols., 2002; Buzzinni y cols., 2007; Maqueda y cols., 2010). La ventaja de este tipo de análisis es que la presencia o ausencia de los dsRNA no es dependiente del estado fisiológico de las levaduras, a diferencia de los test bioquímicos. Además no es necesario conocer la secuencia nucleotídica de los diferentes dsRNA, sino que sólo es necesario obtener los perfiles a través de geles de agarosa. Por estas razones y debido a que los marcadores utilizados en trabajos previos no lograron diferenciar varios aislados obtenidos, es que se obtendrán los perfiles de dsRNA para todas las levaduras previamente identificadas y se evaluará la capacidad de diferenciación que tiene este tipo de análisis con aislados ambientales.

En trabajos previos realizados por nuestro grupo, se analizó la diversidad de levaduras aisladas desde muestras de suelo y de agua obtenidas desde 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 (Carrasco y cols., 2012). Utilizando ambos marcadores se logró identificar 21 levaduras a nivel de especie, de los 26 aislados con los que se trabajó.

Las levaduras *Cryptococcus sp*, *Metschnikowia sp* y *Mrakia sp* no se lograron identificar a nivel de especie usando las secuencias ITS y D1/D2, ya que estos marcadores no presentaron variabilidad suficiente para diferenciar entre las distintas especies dentro de estos géneros de levaduras. Por lo tanto, estos tres aislados no identificados pueden corresponder a alguna especie descrita dentro de sus géneros, o

bien pueden corresponder a una especie nueva (Carrasco y cols., 2012). En particular, la sistemática dentro de él género *Mrakia*, se encuentra constantemente en revisión, ya que en trabajos anteriores se ha demostrado que las levaduras *M. nivalis* y *M. frígida* 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).

Por otra parte, dos aislados se identificaron como la levadura *Leuconeurospora* *sp* utilizando ambos marcadores. Sin embargo, ambas levaduras poseen características macromorfológicas diferentes entre sí, sugiriendo que corresponden a levaduras distintas (Carrasco y cols., 2012). Debido a la pobre resolución taxónomica de la región ITS y los dominios para la identificación de estas levaduras, es necesario evaluar otro marcador molecular para identificación de levaduras que complemente a los marcadores moleculares convencionales.

Hipótesis

Mediante el uso de *COI* se podrán identificar levaduras antárticas a nivel de especie y utilizando análisis de EGEs y actividad antimicrobiana se podrán tipificar levaduras que no se lograron diferenciar con otros marcadores.

OBJETIVOS

Objetivos Generales

1. Evaluar la utilidad del gen *COI* para la identificación de levaduras antárticas y evaluar la utilidad de los perfiles de actividad antimicrobina y existencia de dsRNAs en tipificación de levaduras aisladas desde la Antártica.

Objetivos específicos

1. Evaluar la utilidad de distintas regiones dentro del gen *COI* en identificación de levaduras.
2. Analizar la actividad antimicrobiana de los aislados antárticos contra bacterias y levaduras antárticas.
3. Determinar la existencia de EGEs del tipo dsRNA en levaduras antárticas.

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.

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

Cepas. Las levaduras y bacterias utilizadas en este trabajo se muestran en la tabla 1.

2.2 Métodos

Métodos de biología molecular. Electroforesis y PCR se realizaron de acuerdo al manual de Sambrook y Cols. (2001).

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 % p/v de glucosa. Para la forma semisólida se adicionó agar microbiológico (Oxoid) al 1,5 % p/v.

Tabla 1. Cepas

Organismo	Especie	Origen	Referencia
	<i>Candida sake</i>	Levadura aislada desde la Antártica a partir de una muestra de agua desde	
	<i>Cryptococcus sp.</i>		
	<i>Cryptococcus gastricus</i>	Levaduras aisladas desde la Antártica a partir de muestras de suelo	Carrasco y cols., 2012
	<i>Cryptococcus victorinae</i>		
	<i>Cryptococcus gilvoscens</i>		
	<i>Dioszegia fristingensis</i>		
	<i>Glaciozyma antarctica</i>		
	<i>Holtermanniella waticus</i>		
	<i>Leucosporidiella creatinivora</i>		
	<i>Leucosporidiella fragaria</i>		
	<i>Leuconeuropora sp1</i>		
	<i>Leuconeuropora sp2</i>		
	<i>Metschnikowia sp</i>		
	<i>Mrakia biollops</i>		
	<i>Mrakia psychrophila</i>		
	<i>Mrakia sp.</i>		
	<i>Rhodotorula glacialis 1</i>		
	<i>Rhodotorula glacialis 2</i>		
	<i>Rhodotorula laryngis</i>		
	<i>Sporidiobolus salmonicolor</i>		
	<i>Saccharomyces cerevisiae c288</i>	Levadura de colección	
	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	Levadura aislada desde la Antártica a partir de una muestra de agua	Carrasco y cols., 2012
	<i>Proteus vulgaris</i>	Cepas bacterianas de laboratorio	Cepas cedidas por el Dr. Nicolas Guilliani
	<i>Morganella morganii</i>		
	<i>Ksp Klebsiella</i>		
	<i>Klebsiella geylaca</i>		
	<i>Chromobacterium violaceum</i>		
	<i>Proteus mitalens</i>		
	<i>Staphylococcus aureus</i>		
Bacteria Gram (+)			
Bacteria Gram (-)			

Análisis bioinformático y diseño de partidores degenerados: Se descargaron las secuencias aminoacídicas de hongos para el gen *COI* disponibles en la base de datos del Centro Nacional de información Biotecnológica de Estados Unidos (NCBI). A través del programa Geneious Pro 5.4.5 (Biomatters, Auckland, New Zealand) se alinearon las secuencias descargadas, identificando zonas aminoacídicas conservadas adecuadas para el diseño de partidores. Se escogieron diferentes zonas conservadas para el diseño de partidores degenerados, que presentaran al menos un 50% de similitud aminoacídica entre todas las secuencias alineadas. Luego, se realizó traducción reversa *in silico* de todas las regiones aminoacídicas y a continuación se diseñaron las secuencias nucleotídicas reversas complementarias a cada una de ellas. Utilizando este procedimiento se diseñaron 24 partidores degenerados, evaluándose *in silico* su complementariedad con respecto a las secuencias nucleotídicas de genes *COI* de hongos disponibles. A través de este análisis se seleccionaron 8 partidores que amplificaran regiones entre 200 y 900pb del gen *COI*. Los partidores diseñados y sus características se muestran en la Tabla 2.

Extracción de DNA genómico: 30 ml de cultivo en fase exponencial fueron centrifugados a 7.000 g por 10 min y las células 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. Las muestras de DNA fueron analizadas en geles de agarosa, para verificar concentración y calidad de éste.

Tabla 2. Partidores

Nombre Partidor	Secuencia
COI-5prima2F	5'-MGNTTRAAAYAAAYATYWSNTTY-3'
COIDP1 F	5'-WSNACNAAYGCNAARGAYATH-3'
COIDP4 F	5'-WSNGTNGAYYTNGCNATHHTTY-3'
COIDP8 F	5'-TTYCAYTAYGTNYTNWSNATGGG-3'
COIDP5R	5'-ACNGGNARNNSWNARNARNARNAR-3'
COI-3prima2R	5'-YAANACNGGYAANSWYAAAYAA-3'
COIDP6R	5'-AARAACCARAANARRTGYTGRTA-3'
COIDP4R	5'-RAADATNGCNARRTCNACNSW-3'
COI-5prima1R	5'-AANGGNGGRTANACNRKYCANCC-3'
Uni-MinibarR1	5'-GAAAATCATAATGAAGGCATGAGC-3'
Uni-MinibarF1	5'-TCCACTAATCACAARGATATTGGAC-3'
M13R	5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'
M13F	5'-TGTAACACGACGGCCAGT-3'

Se muestran los nombres, la orientación ("fw" o "Rev") y las secuencias nucleotídicas de los partidores diseñados.

PCR y purificación de amplicones: Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen final de 25 μ l siguiendo el siguiente protocolo: Se mezcló 1 μ l de DNA (aprox. 10 ng) con 24 μ l de "mezcla de PCR" [2,5 μ l de buffer PCR 10X, 0,5 μ l de una mezcla de dNTP's (10 mM de cada uno), 2 μ l de mezcla de partidores (25 μ M de cada partidor), 1 μ l de MgCl₂ (50 mM) y 0,5 μ l (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: 95°C por 2 min, seguido por 5 ciclos de 95°C por 1min, 46°C por 1min y 72°C por 30 seg. Luego se realizaron 35 ciclos de 95°C por 1 min, 53°C por 1 min y 72°C por 30 seg, y finalmente una etapa final de extensión a 72°C por 5 min. Los amplicones se separaron electroforéticamente en geles de agarosa al 1,0 y 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 μ g/ml)

y se fotografiaron en un transiluminador-UV. Los tamaños de los amplicones se estimaron en relación a los marcadores de peso molecular 100 pb y 1 Kb, usando el programa Kodak 1D Science (Kodak scientific Image System). Los amplicones se purificaron mediante el kit “UltraClean DNA Purification” siguiendo las especificaciones del proveedor.

Clonamiento de los productos de PCR en pBlueScrip: Los amplicones obtenidos con los partidores minibar fueron purificados desde geles de agarosa, y amplificados nuevamente utilizando la enzima Pfu Taq polimerasa (Fermentas). Finalmente los amplicones fueron purificados desde geles de agarosa y ligados al vector pBluescript SK (+) digerido previamente con *EcoRV*, mediante la enzima T4 DNA ligasa (Invitrogen). Esta reacción de ligado fue dializada y utilizada para transformar por electroporación células de *E.coli DH5α*. Los clones positivos fueron seleccionados mediante resistencia a ampicilina e incapacidad de degradar Xgal. Además, estos clones positivos se verificaron a través de PCR de colonia y posteriores reacciones de PCR utilizando como molde DNA plasmidial aislado desde cada clon y empleando los partidores M13 y Uni-minibars.

Secuenciación automática de DNA y análisis de datos: Se utilizó el servicio de secuenciación de Macrogen Inc (Seúl, Corea). 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 cladogramas.

Obtención de proteínas extracelulares totales: Cultivos celulares de 500 ml fueron centrifugados a 7.000xg por 5 min a 4 °C y el sobrenadante fue filtrado a través de una membrana de fluoruro de polivinilideno de 0,45-mm (Millipore). Al sobrenadante se adicionó etanol a 75% v/v y se incubó en hielo por 1 hora. Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas a 10000xg por 15 min y el pellet de proteínas fue suspendido en 4 ml de agua. Las muestras fueron almacenadas a 4°C hasta su análisis.

Análisis de actividad antimicrobiana

Para los ensayos se confeccionaron “césped celulares” mezclando 25 ml de medio YM 1,5 % agar fundido, 250 µl de 0,3% de azul de metileno y 2,5 ml de cultivo celular (Bacterias o levaduras), el cual se vertió sobre una placa de Petri y se incubó a temperatura ambiente hasta que gelificara. Sobre estos césped se sembraron las levaduras a ensayar y se confeccionaron pocillos de 1cm, en los cuales se depositó 100µl de extracto proteico. Una actividad antimicrobiana positiva se evidenció por la aparición de un precipitado de azul de metileno (halo de muerte) que les rodea (Baeza y cols., 2010).

Extracción de RNA total y análisis enzimáticos: Los “pellet celulares” (0,1 g) fueron lavados dos veces con 1ml de buffer TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0), y se resuspendieron en 0,4 ml de TE. Se adicionó 250 µl de perlas de vidrio de 0,5mm de diámetro (BioSpec Products, Inc.) y 0,4 ml de fenol ácido (equilibrado con 50mM de acetato de sodio, pH 4.0). Esta mezcla se agitó por 1,5 minutos en el equipo “Minibead beeter” (Biospec), y luego se centrifugó a 14.000 g por 20 min. La fase acuosa fue

extraída con 1 volumen de fenol ácido, y dos veces con un volumen de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1). Los RNAs fueron precipitados desde la fase acuosa adicionando dos volúmenes de isopropanol e incubación a -20°C por 2 h. Las muestras se centrifugaron a 14.000 g y los RNAs fueron resuspendidos en 20 µl de agua libre de nucleasas. Las muestras de RNA total fueron tratadas con DNasaI y Nucleasa S1 siguiendo protocolos estándar (Routhier y Bruenn, 1998; Xie y cols., 2006) y analizadas en geles de agarosa al 1%.

3. Resultados

3.1 Amplificación, purificación y secuenciación de regiones dentro del gen *COI*

Para evaluar la utilidad de los partidores degenerados diseñados en este trabajo para amplificar específicamente parte del gen *COI* desde distintas levaduras se utilizó como molde el DNA genómico aislado desde la levadura de colección, *S.cerevisiae* c288 (Ascomicete) y desde la levadura *S. salmonicolor* (Basidiomicete), aislada desde la Antártica. Como se observa en la figura 1 al amplificar DNA genómico de la levadura *S. cerevisiae* (carriles 1-16), no se observan bandas del tamaño esperado (200 a 900 pb). Sin embargo, se observan numerosas bandas (entre 0,1 y 1,2 Kb) en los carriles 4, 8, 12 y 16, que corresponden a reacciones de PCR realizadas con el partidore COI-3prima2R y diferentes partidores "forward". Por otra parte, al amplificar DNA de la levadura *S. salmonicolor* se obtuvo un amplicón de aproximadamente 400 pb en los carriles 18, 22, 26 y 30. Se evaluó la reproducibilidad de estas parejas de partidores para amplificar DNA genómico de otras 6 especies levaduras, pero en algunos casos no se obtuvo amplicones y en otros se obtuvo bandas de tamaño no esperado (datos no mostrados). Sin embargo, el amplicón de 400 pb obtenido al amplificar DNA genómico de la levadura *S.salmonicolor*, fue purificado y posteriormente secuenciado. Los resultados del análisis de Blastx realizado indican que esta secuencia nucleotídica presenta similitud con una proteína de unión a actina (Número de accesoión: [EGU13558.1](#)).

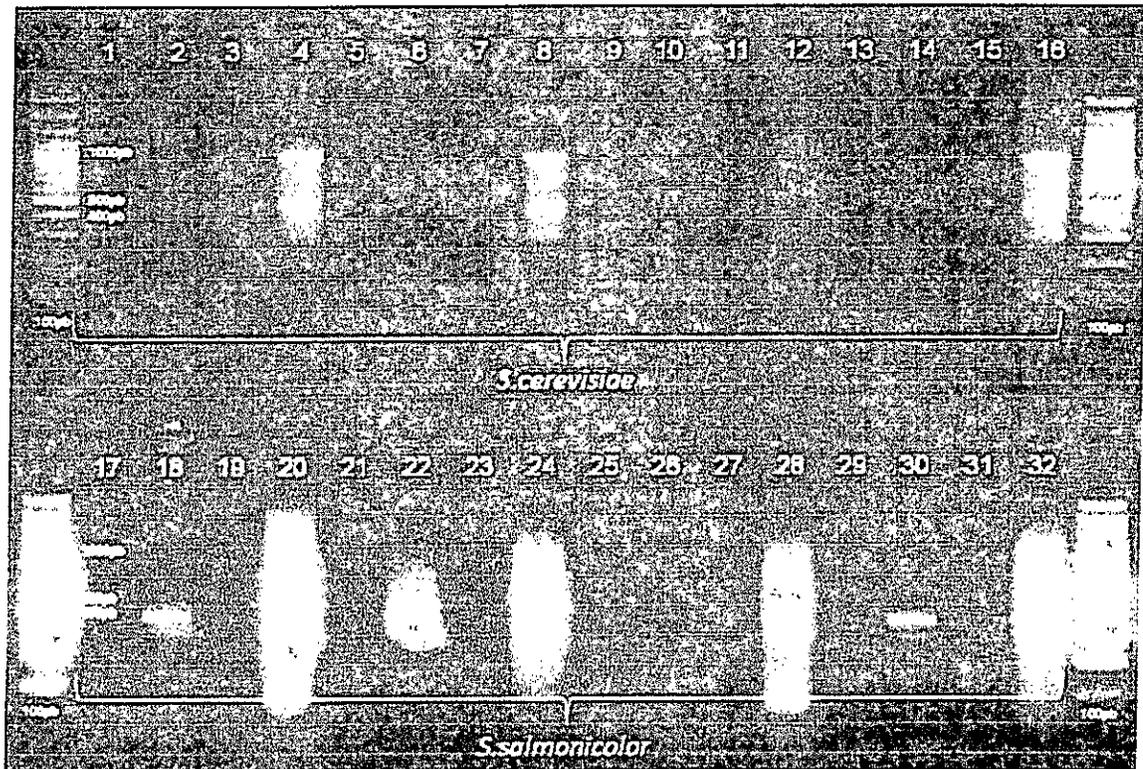


Figura 1: Amplicones obtenidos a través de PCR con los partidores degenerados diseñados. En esta fotografía se muestran un gel de agarosa al 1,5% en donde se separaron los diferentes amplicones obtenidos. Se amplificó DNA de la levadura Ascomicete *S.cerevisiae* con las siguientes parejas de partidores, 1: COIDP1F-COIDP5R, 2: COIDP1 F- COIDP6R, 3: COIDP1F- COI-5prima1R, 4: COIDP1F- COI-3prima2R, 5: COIDP4F- COIDP5R, 6: COIDP4F- COIDP6R, 7: COIDP4F- COI-5prima1R, 8: COIDP4F- COI-3prima2R, 9: COIDP8F- COIDP5R, 10: COIDP8 F- COIDP6R, 11: COIDP8F- COI-5prima1R, 12: COIDP8F- COI-3prima2R, 13: COI-5prima2F- COIDP5R, 14: COI-5prima2F- COIDP6R, 15: COI-5prima2F- COI-5prima1R, 16: COI-5prima2F - COI-3prima2R. Los carriles 17-32 corresponden a reacciones de PCR con los mismos partidores, pero utilizando como molde DNA genómico de la levadura Basidiomicete *S.salmonicolor*.

Se variaron las concentraciones de dNTPs, de DNA, de partidores, de *taq* polimerasa, y se varió la duración de las distintas etapas del programa de PCR, pero no se logró obtener amplicones al amplificar DNA genómico de distintas especies de levaduras. Estos resultados sugieren que los partidores diseñados en este trabajo no son buenos candidatos para su utilización en identificación molecular de levaduras. Por lo tanto, se evaluó la utilidad de dos partidores descritos previamente en eucariontes superiores y hongos filamentosos, los cuáles amplifican una región de 130 pb del gen que codifica para la enzima citocromo oxidasa 1 (*COI*) denominada minibar. Para esto, se amplificó el DNA genómico a través de PCR con los partidores Uni-MinibarR1 y Uni-MinibarF1, previamente descritos (Meusnier y cols., 2008). Se logró amplificar una región que varió entre 130 y 250 pb (estimado desde geles de agarosa), logrando reproducibilidad y rendimiento (Figura 2). Para 6 especies de levaduras se obtuvo amplicones con una concentración suficiente para ser secuenciados directamente. Las restantes 15 especies no se lograron secuenciar directamente debido a las bajas concentraciones obtenidas del amplicón, por lo cual fueron purificados y sometidos a otra ronda de amplificación. Los amplicones fueron clonados en el vector pBluescript SK (+) y se transformaron en *E.coli DH5α*. A los clones positivos se les extrajo DNA plasmidial y se secuenciaron ambas hebras, con los partidores del vector M13F y M13R.

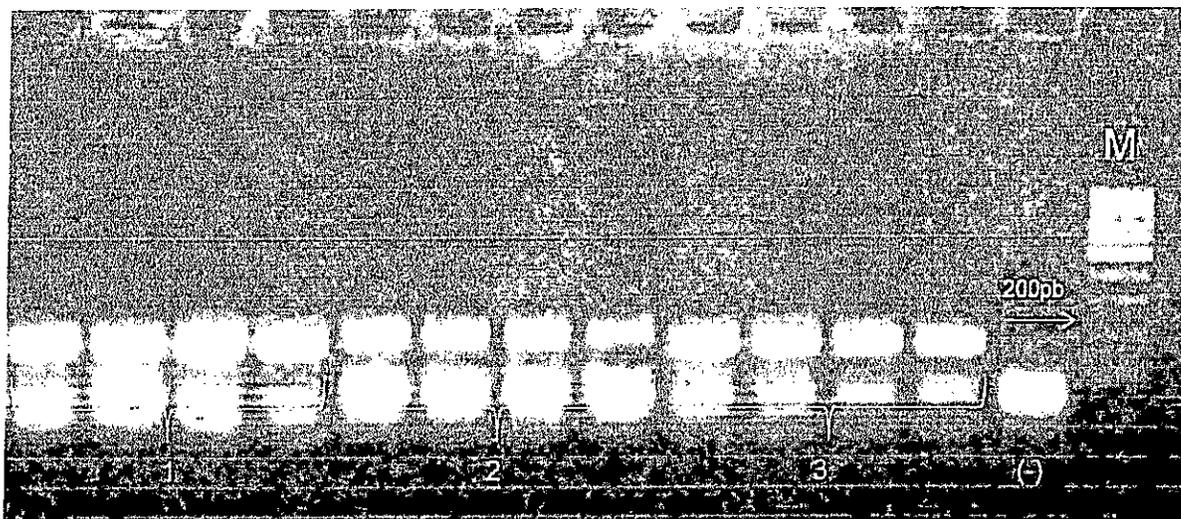


Figura 2: Amplicones de la región minibar del gen COI utilizando la pareja de partidores Uniminibar. En esta fotografía se muestra un gel de agarosa al 1,5% en donde se separaron los diferentes amplicones obtenidos utilizando los partidores Uni-MinibarF1 y Uni-MinibarR1. 1-3: corresponden a diferentes especies de levaduras. M: marcador de peso molecular 100 bp.

En el análisis de las secuencias obtenidas se observó que todas alinearon en sus extremos con la pareja de partidores utilizados. Sin embargo, en algunas secuencias los partidores no alinearon completamente, ya que las secuencias nucleotídicas presentaron cambios en una o más bases con respecto a alguno de los partidores. Esto se puede explicar, porque el protocolo de amplificación utilizado (ver materiales y métodos) no es estricto en la hibridación de los partidores ya que se realiza a 42°C. Por esta razón, las secuencias complementarias a los partidores fueron eliminadas de las secuencias nucleotídicas finales para los análisis comparativos. Luego, estas secuencias fueron sometidas a la búsqueda de homólogos en la base de datos del "National Center for Biotechnological Information" (NCBI, USA) mediante el algoritmo Blastx. Los resultados obtenidos con mayor cobertura y porcentaje de identidad se muestran en la tabla 3.

En los resultados obtenidos se puede observar que sólo cuatro levaduras presentaron similitud de secuencia con citocromos oxidasa presentes en la base de datos, con valores de identidad aminoacídica entre 67 y 77%. Por otra parte, 5 secuencias nucleotídicas traducidas a proteínas presentaron homología de secuencia con proteínas hipotéticas. También, 10 secuencias presentaron similitud con otras proteínas que son similares funcional y/o estructuralmente a las proteínas citocromos c oxidasa, como: una proteína tipo lacasa que oxida cobre, una Ferritina/ Ribonucleotido reductasa y con una prolina deshidrogenasa. Por último 2 secuencias no presentaron similitud con ninguna proteína depositada en la base de datos. Todos estos resultados dan cuenta de la poca información sobre citocromos oxidasa 1 de levaduras disponibles en base datos.

Tabla 3. Análisis mediante Blastx para las secuencias de la región minibar dentro del gen *COI*.

Aislado	(pb) ^a	Cobertura aminoacídica; % Identidad	E value	Blastx (Genbank) ^b
<i>Candida sake</i>	79	20/26; 77	2e-05	KL:TH0E07898p [Lachancea thermotolerans]
<i>Cryptococcus sp.</i>	147	12/23; 52	5,8	multi-copper oxidase laccase-like protein [Melampsora larici-populina 98AG31]
<i>Cryptococcus gastricus</i>	148	33/48; 69	7e-11	cytochrome-c oxidase (EC 1.9.3.1) chain I - Podospora comata mitochondrion (fragment)
<i>Cryptococcus victoriae</i>	133	40/44; 91	8e-18	proline dehydrogenase/delta-1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase [Serratia odorifera DSM 4582]
<i>Cryptococcus gilvescens</i>	148	32/48; 67	3e-10	cytochrome-c oxidase (EC 1.9.3.1) chain I - Podospora comata mitochondrion (fragment)
<i>Holtermanniella waticus</i>	113	22/36; 61	4e-06	hypothetical protein CNM01480 [Cryptococcus neoformans var. neoformans JEC21]
<i>Dioszegia frisingensis</i>	89		5,6	amino acid adenylation enzyme/thioester reductase family protein [Cylindrospermum stagnale PCC 7417]
<i>Mrakia sp.</i>	134	38/44; 86	1e-15	proline dehydrogenase/delta-1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase [Serratia odorifera DSM 4582]
<i>Mrakia blallopis</i>	201	20/37; 54	6e-04	Ferritin/ribonucleotide reductase [Beauveria bassiana ARSEF 2860]
<i>Mrakia psychrophila</i>	89			NR
<i>Rhodotorula glacialis 1</i>	131	11/22; 50	3,6	conserved hypothetical protein [Prevotella oris F0302]
<i>Rhodotorula glacialis 2</i>	188	19/34; 56	0,058	hypothetical protein AURDEDRAFT_159718 [Auricularia delicata TFB-10046 SS5]
<i>Rhodotorula laryngis</i>	128			NR
<i>Leucosporidiella creatinivora</i>	133	31/43; 72	9e-12	cytochrome-c oxidase (EC 1.9.3.1) chain I - Podospora comata mitochondrion (fragment)
<i>Leucosporidiella fragaria</i>	159	17/42; 40	3,0	thioredoxin family protein [Leptosiphilum ferrooxidans C2-3]
<i>Leuconeurospora sp1</i>	149	18/43; 42	0,18	GD12509 [Drosophila simulans]
<i>Leuconeurospora sp2</i>	131	19/36; 53	7,4	hypothetical protein TREMEDRAFT_59481 [Tremella mesenterica DSM 1558]
<i>Glaciozyma antarctica</i>	133	33/43; 77	9e-14	cytochrome c oxidase subunit I [Tilletia indica]
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	242	17/27; 63	0,31	Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 17 [Wickerhamomyces ciferrii]
<i>Sporidiobolus salmonicolor</i>	88	9/24; 38	5,6	amino acid adenylation enzyme/thioester reductase family protein [Cylindrospermum stagnale PCC 7417]
<i>Metschnikowia sp.</i>	131	11/22; 50	3,4	conserved hypothetical protein [Prevotella oris F0302]

a Largo secuencias nucleotídicas

b Número de accesoión Genbank y nombre de la proteína que presenta el mayor porcentaje de identidad con las secuencias consenso de cada aislado.
NR: No se encontraron homólogos

3.1.1 Evaluación del gen *COI* en identificación de levaduras

Posteriormente, se alinearon todas las secuencias obtenidas de la región minibar dentro del gen *COI* a través de Clustal W (Thompson y cols., 1994) y se construyó un cladograma con el fin de ilustrar las relaciones filogenéticas entre las levaduras con las que se trabajó (Figura 3). Utilizando la misma aproximación se alinearon todas las secuencias obtenidas de la región ITS y de los dominios D1/D2 del rDNA y se construyeron los mismos tipos de árboles (Figura 4y 5).

Como se observa en el cladograma de la región minibar, las levaduras *Cr. gastricus* y *Cr. gilvescens* quedaron agrupadas dentro del mismo clado, mientras que las levaduras *Cr. victoreae* y *Cryptococcus sp* quedaron en otro grupo. Este hecho era esperable ya que por análisis de Blastx las levaduras *Cr.gastricus* y *Cr.gilvescens* presentaron similitud de secuencia para la región secuenciada con citocromos oxidasa 1, mientras que las otras dos presentaron similitud con otras proteínas. Al observar el cladograma realizado para las secuencias ITS (figura 4), se observó que las levaduras *C.gastricus* y *C.gilvescens* quedaron agrupadas dentro de un mismo grupo, en cambio estas especies quedaron separadas en el cladograma realizado para las secuencias de los dominios D1/D2 del rDNA. La levadura *Cryptococcus sp* quedó agrupada dentro de un mismo grupo con algunas de las especies del mismo género al utilizar los marcadores ITS y los dominios D1/D2, pero se logró diferenciar de las demás al utilizar la región minibar *COI*.

Figura 3. Cladograma de máxima parsimonia para las secuencias antárticas obtenidas de la región minibar del gen *COL*. Este análisis fue realizado con el método "Close-Neighbor-Interchange (CNI) on Random Trees" y con un análisis de Bootstrap (1500), (Tamura y cols., 2011).

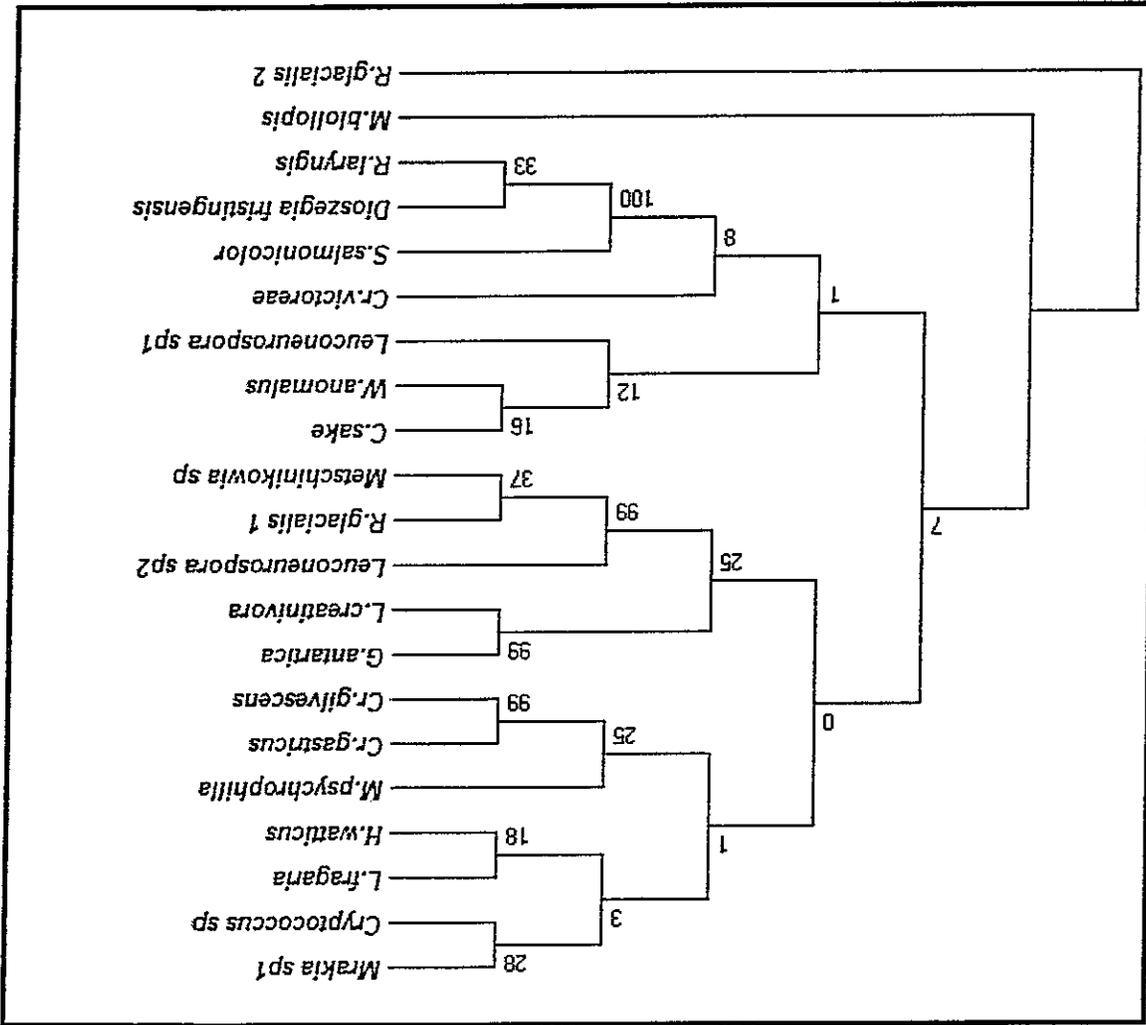


Figura 4. Cladograma de máxima parsimonia de las secuencias antárticas obtenidas para la región ITS1-5.8S-ITS2. Este análisis fue realizado con el método "Close-Neighbor-Interchange (CNI) on Random Trees" y con un análisis de Bootstrap (1500), (Tamura y cols., 2011).

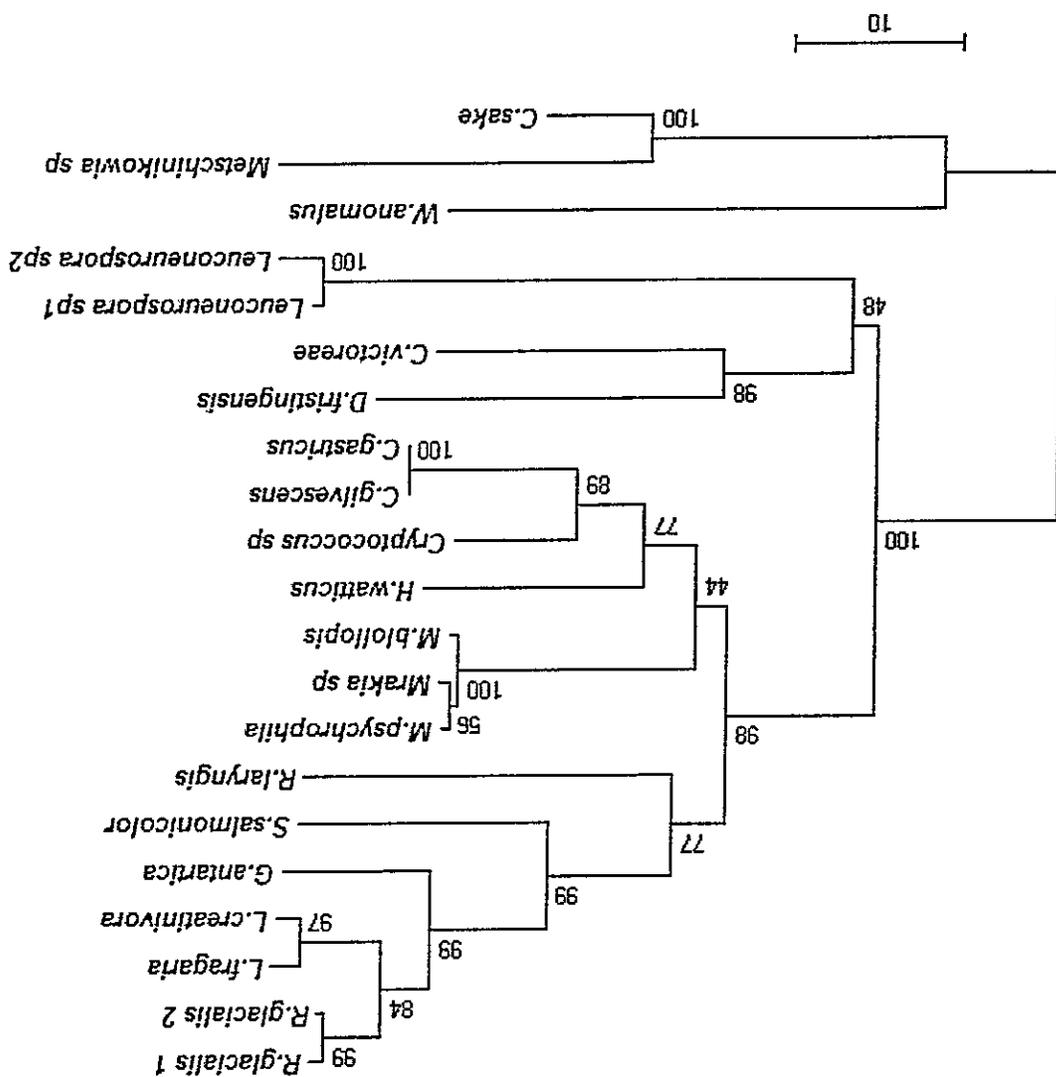
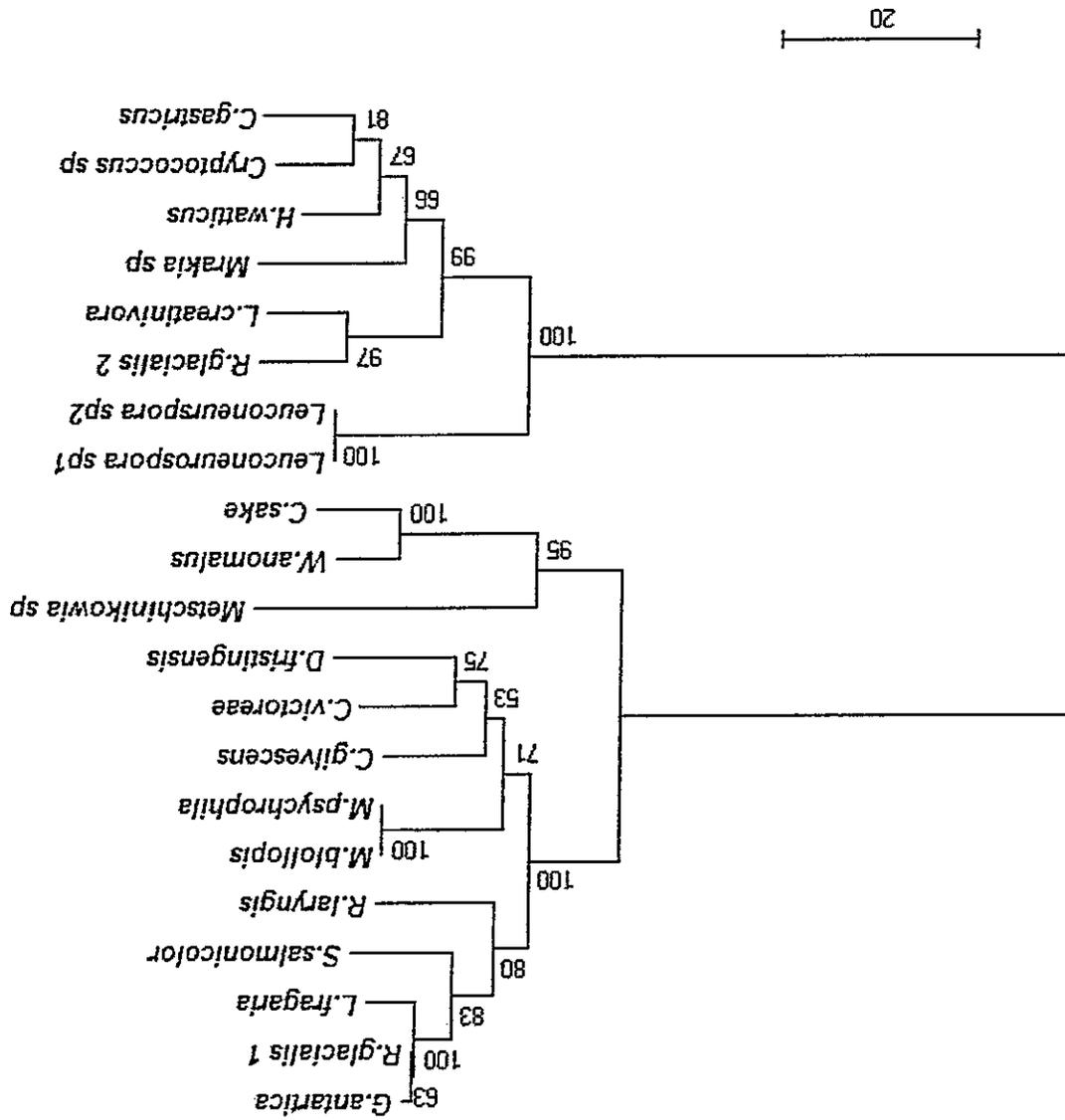


Figura 5. Cladograma de máxima parsimonia de las secuencias antárticas obtenidas para los dominios D1/D2. Este análisis fue realizado con el método "Close-Neighbor-Interchange (CNI) on Random Trees" y con un análisis de Bootstrap (1500), (Tamura y cols., 2011).



Por otra parte, todas las levaduras pertenecientes al género *Mrakia* quedaron agrupadas en distintos clados dentro del cladograma de la región COI (figura 3), a diferencia del cladograma de los espaciadores transcritos internos en donde todas las especies dentro de este género fueron agrupadas dentro de un mismo grupo (figura 4). En cambio, en el cladograma realizado para los dominios D1/D2 del rDNA, las levaduras *M.blollopis* y *M.psychrophila* fueron agrupadas siempre dentro de un mismo grupo, diferenciándolas de la levadura *Mrakia sp* que fue agrupada dentro de otro clado. Las levaduras identificadas previamente como *R.glacilis* quedaron agrupadas dentro de distintos clados del árbol tanto para la región minibar dentro del gen *COI* como para los dominios D1/D2 del rDNA, demostrando la posible utilidad del análisis de estas regiones para poder diferenciar ambas levaduras. En cambio los análisis de la región ITS no son útiles para diferenciar ambas levaduras, ya que ambas quedaron agrupadas dentro de un mismo clado. Por último, los aislados pertenecientes al género *Leuconeurospora*, que no se han logrado diferenciar a través los dominios D1/D2 y los ITS (figura 4 y 5), quedaron agrupados en distintas ramas del cladograma de la región minibar dentro del gen *COI*. Por lo tanto sería un marcador interesante de evaluar para poder diferenciar aislados pertenecientes a este género de levaduras.

A continuación, se realizó un análisis comparativo de identidad nucleotídica para determinar la similitud entre cada una de las secuencias *COI* obtenidas y de esta forma evaluar la utilidad de este marcador en identificación molecular de levaduras. Este procedimiento se realizó también para las secuencias nucleotídicas obtenidas para los espaciadores transcritos internos (ITS) y los dominios D1/D2 del rDNA (Ver anexo). Luego, se construyeron tablas comparativas para los tres marcadores moleculares

secuenciados, en donde se observan los porcentajes de identidad nucleotídica entre levaduras pertenecientes al mismo género (tablas, 4, 5, 6 y 7).

Al comparar los valores de identidad de los tres marcadores moleculares entre levaduras del género *Cryptococcus*, se observa que la región minibar dentro del gen *COI* presentó valores de identidad nucleotídica más bajos que los espaciadores transcritos internos para las especies analizadas. Al comparar los valores de identidad nucleotídica entre los dominios D1/D2 y la región minibar se observan valores de identidad similares para ambos marcadores. Sin embargo, los dominios D1/D2 del rDNA presentaron porcentajes de identidad nucleotídica inferiores a la región minibar (44 contra 99%), cuando se compararon las levaduras *Cr.gastricus* y *Cr.gilvescens*. Por lo tanto, el análisis de secuencia de la región minibar dentro del gen *COI* sería útil para diferenciar la mayoría de las especies de levaduras del género *Cryptococcus* con las que se trabajó.

Para las levaduras del género *Mrakia* se observó un patrón similar, en donde la región minibar dentro del gen *COI* presenta valores de identidad nucleotídica inferiores en comparación a los ITS, para todas las especies analizadas. Sin embargo, los dominios D1/D2 del rDNA presentan los valores más bajos de identidad nucleotídica entre las levaduras *Mrakia sp* y *M.blollopis* (41%) y entre las levaduras *Mrakia sp* y *M.psychrophila* (40%). El análisis de secuencia para los dominios D1/D2 del rDNA de las levaduras *M.psychrophila* y *M.blollopis*, indican que este marcador es 100% idéntico para estas levaduras, por lo tanto no es el marcador molecular indicado para lograr diferenciarlas. En cambio, el porcentaje de identidad de la región minibar para ambas levaduras fue sólo de un 75%.

Tabla 4. Identidad nucleotídica de secuencias entre los marcadores ITS, D1/D2 y región minibar dentro del gen *COI*, para levaduras del género *Cryptococcus*.

	<i>Cr.sp</i>			<i>Cr.gastricus</i>			<i>Cr.victoreae</i>		
	ITS	D1/D2	COI	ITS	D1/D2	COI	ITS	D1/D2	COI
<i>Cr.gastricus</i>	72	87	48						
<i>Cr.victoreae</i>	66	48	40	67	47	51			
<i>Cr.gilvescens</i>	73	48	49	100	44	99	62	77	52

Para cada caso se indica en rojo el valor más bajo de porcentaje identidad entre los tres marcadores para cada par de levaduras. *Cr.sp*: *Cryptococcus .sp*, *Cr.gastricus*: *Cryptococcus gastricus*, *Cr.victoreae*: *Cryptococcus victoreae*, *Cr.gilvescens*: *Cryptococcus gilvescens*.

Tabla 5. Identidad nucleotídica de secuencias entre los marcadores ITS, D1/D2 y región minibar dentro del gen *COI*, para levaduras de los géneros *Mrakia*

	<i>Mr.sp</i>			<i>Mr.blollopis</i>		
	ITS	D1/D2	COI	ITS	D1/D2	COI
<i>Mr.blollopis</i>	97	41	65			
<i>Mr.psychrophila</i>	97	40	67	99	100	75

Para cada caso se indica en rojo el valor más bajo de porcentaje identidad entre los tres marcadores para cada par de levaduras. *Mr.sp*: *Mrakia.sp*, *Mr.blollopis*: *Mrakia blollopis*, *Mr.psy*: *Mrakia psychrophila*.

Tabla 6. Identidad nucleotídica de secuencias entre los marcadores ITS, D1/D2 y región minibar dentro del gen *COI*, para levaduras del género *Rhodotorula*

	<i>Rh.glacialis1</i>			<i>Rh.glacialis2</i>		
	ITS	D1/D2	COI	ITS	D1/D2	COI
<i>Rh.glacialis2</i>	99	39	52			
<i>Rh.laryngis</i>	70	80	54	70	46	59

Para cada caso se indica en rojo el valor más bajo de porcentaje identidad entre los tres marcadores para cada par de levaduras. *Rh.glacialis1*: *Rhodotorula glacialis1*, *Rh.glacialis2*: *Rhodotorula glacialis2*, *Rh.laryngis*: *Rhodotorula laryngis*.

Tabla 7. Identidad nucleotídica de secuencias entre los marcadores ITS, D1/D2 y región minibar dentro del gen *COI*, para levaduras del género *Leuconeuospora*

	<i>Leuco.sp2</i>		
	ITS	D1/D2	COI
<i>Leuco.sp1</i>	99,1	99,3	44,1

Para cada caso se indica en rojo el valor más bajo de porcentaje identidad entre los tres marcadores para cada par de levaduras. *Leuco.sp1*: *Leuconeuospora sp1*, *Leuconeuospora sp2*.

Al realizar este análisis en levaduras del género *Rhodotorula* se observa que los dominios D1/D2 del rDNA y la región minibar dentro del gen *COI*, presentan valores de identidad nucleotídica inferiores a los espaciadores transcritos internos para todas las parejas de levaduras analizadas. Sin embargo, este marcador presentó valores de identidad nucleotídica mayores a los dominios D1/D2 del rDNA (52 contra 39%) cuando se compararon las secuencias de las levaduras *R.glacialis 1* y *R.glacialis 2*, que no se lograron diferenciar previamente utilizando los dominios D1/D2. Sería interesante analizar la capacidad de diferenciación de estas dos especies a través de la región minibar, ya que existen muchas menos secuencias disponibles de citocromos oxidadas de levaduras en relación a la información de secuencias de dominios D1/D2, por lo tanto al haber una mayor cantidad de secuencias en la base de datos, el análisis se dificulta y se pierde capacidad de identificación.

Por último al comparar los valores de identidad nucleotídica entre las levaduras *Leuconeuropa.sp1* y *Leuconeuropa.sp2*, observamos que la región minibar dentro del gen *COI* presenta el valor más bajo de identidad nucleotídica (44%) en relación a los otros dos marcadores. Es más, los espaciadores transcritos internos de estas levaduras presentaron un 99% de identidad nucleotídica y los dominios D1/D2 del rDNA un 100% de identidad nucleotídica. Este resultado es muy interesante, ya que en trabajos previos fue imposible determinar a través de marcadores genéticos si estas dos levaduras eran diferentes, a pesar de que macro-morfológicamente eran muy distintos. En secciones posteriores se discutirá el alcance de estos resultados y la utilidad de la región minibar para identificación molecular de levaduras en base a los resultados obtenidos.

3.2 Actividad antimicrobiana

3.2.1 Análisis de actividad micocida

Se evaluó la actividad micocida cruzada entre las 21 levaduras aisladas desde la antártica, para determinar si esta es una forma de competencia entre ellas en ecosistemas antárticos. Los céspedes fueron preparados en medio YM, suplementados con glucosa al 2% y azul de metileno al 1%. Precipitados de azul de metileno alrededor de las colonias indican actividad micocida, ya que el azul de metileno es capaz de ingresar a las células muertas (Figura 4B). Los ensayos de actividad micocida se realizaron a 10, 15 y 22°C, de acuerdo a la temperatura óptima de crecimiento de cada levadura (Ver anexo).

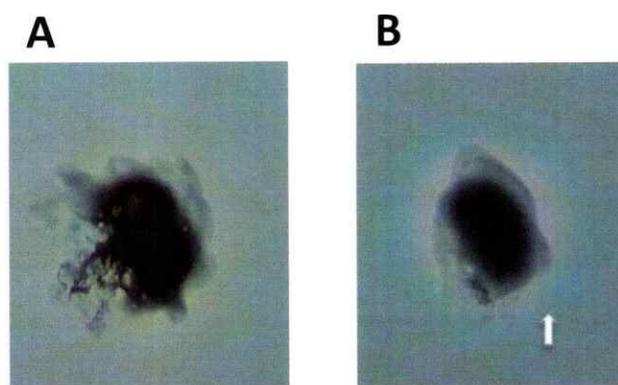


Figura 6. Actividad micocida de levaduras antárticas. Se ensayaron diferentes colonias de levaduras sobre cepas sensibles, como se describe en materiales y métodos. A) Especie de levadura que no produce halo de muerte. B) La flecha indica un halo de muerte característico producto del azul de metileno precipitado.

Las levaduras *C.sake* y *W.anomalus* fueron las que presentaron los espectros de actividad más amplios a 22°C (Tabla 8). Ambas especies presentaron actividad contra todas las levaduras pertenecientes al género *Cryptococcus* que fueron ensayadas. Además presentaron actividad sobre las levaduras *S.salmonicolor*, *G.antarctica* y *R.laryngis*. La levadura *C.sake* presentó actividad sobre la levadura *D.fristingensis*, mientras que la levadura *W.anomalus* no presentó actividad contra esta especie. Los ensayos realizados a 15°C muestran la misma tendencia, siendo las levaduras que presentan los espectros más amplios de actividad. Tanto las levaduras *C.sake* como *W.anomalus* presentaron actividad contra las levaduras *M.blollopis* y *Leuconeurospora sp1*. Sin embargo, *C.sake* tuvo actividad contra *R.glacialis* y no contra *Mrakia. sp*, al contrario de lo que se observó con *W.anomalus*. A 10°C ninguna de las dos levaduras presentaron actividad micocida contra cepas sensibles (Tabla 8). Esto puede ser debido a que tanto las levaduras *C.sake* como *W. anomalus* presentan temperaturas óptimas de crecimiento de 30°C, siendo 10°C una condición no favorable para el crecimiento de estas y por ende para la producción de metabolitos secundarios.

Por otra parte, las levaduras *D. fristingensis* y *S. salmonicolor* presentaron actividad contra seis especies de levaduras a 22°C. A 15°C se observó que ambas levaduras tenían solo una especie sensible sobre las que ejercían efecto antimicótico (Tabla 8), mientras que a 10°C ninguna de las dos levaduras presentaron actividad. La levadura *M.bicuspidata* presentó actividad contra cuatro cepas sensibles a 22°C, mientras que a 15°C presentó actividad contra tres y a 10°C contra solo una.

Tabla 8. Ensayos cruzados de actividad micocida

Levaduras sembradas	Césped																		
	22°C						15°C						10°C						
	S.sal	Cr.gas	D.fris	L.fra	R.lar	L.cre	C.sak	Cr.vic	Cr.gil	G.ant	M.sp1	M.blo	R.gla1	Le.sp1	Le.sp2	Cr.sp	M.bic	M.psy	R.gla2
S.sal	+	-	-	++	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Cr.gas	-	+	-	-	++	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cr.vic	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cr.gil	-	-	++	+	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cr.sp	+	+	-	-	++	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H.wat	+	+	-	-	-	-	+	+	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C.sak	++	++	+	-	+++	-	-	++	++	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-
D.fris	+	-	-	++	++	+	-	-	++	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
R.lar	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-
L.cre	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
L.fra	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G.ant	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-	+	+	-	-	++	-	-	-	-
W.ano	+	++	-	-	++	-	+	++	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
M.sp1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
M.blo	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
M.psy	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-
R.gla 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-	++	-	-	-	-	-
R.gla 2	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Le.sp1	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-
Le.sp2	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M.bic	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+

-: No se observó halo de muerte; +: Halo entre 0,5 y 1,9mm; ++: Halo entre 2 y 4,9mm; +++: Halo >5mm.
 S.sal: *Sporidiobolus salmonicolor*; Cr.gas: *Cryptococcus gastricus*; D.fris: *Dioszegia fristingensis*; L.fra: *Leucosporidiella fragaria*; R.lar: *Rhodotorula laryngis*; L.cre: *Leucosporidiella creatinivora*; C.sak: *Candida sake*; Cr.vic: *Cryptococcus victoreae*; Cr.gil: *Cryptococcus gilvoscens*; G.ant: *Glaciozyma antarctica*; H.wat: *Hotermaniella watticus*; Mr.sp: *Mrakia sp.*; Mr.blo: *Mrakia blolopsis*; Mr.psy: *Mrakia psychrophila*; R.gla1: *Rhodotorula glacialis 1*; R.gla2: *Rhodotorula glacialis 2*; Le.sp1: *Leuconeuospora sp1*; Le.sp2: *Leuconeuospora.sp2*; W.ano: *Wickerhamomyces anomalis*; M.bic: *Meischinkowia bicuspadata*

Las cuatro especies que pertenecen al género *Cryptococcus* exhibieron diferentes perfiles de actividad micocida a 22°C. La levadura *Cryptococcus. sp* presentó actividad sobre las levaduras *S.salmonicolor*, *R.laryngis* y sobre las levaduras *C.gastricus* y *C.gilvescens*, que pertenecen a su mismo género. En cambio la levadura *C.gilvescens* presentó actividad sobre las levaduras *D.fristingensis*, *R.laryngis* y *L.fragaria*. La levadura *C.gastricus* presentó sólo actividad contra la levadura *R.laryngis* y *G.antarctica*, mientras que cuando se ensayó *C.victoreae* se observó actividad micocida sobre *C.gastricus* y *L.creatinivora*. A 15 y a 10°C las cuatro especies de levaduras pertenecientes al género *Cryptococcus* no presentaron actividad micocida contra ninguna de las especies sensibles.

Este fenómeno también se observó al realizar ensayos de actividad micocida de las levaduras *Mrakia sp1*, *M.blollopis* y *M.psychrophila* a 22°C. No se observó actividad de las especies *Mrakia sp* y *M.psychrophila* sobre ningún césped sensible cultivado a 22°C, mientras que la levadura *M.blollopis* presentó actividad sobre cinco especies distintas de levaduras. Sin embargo, a 15°C las levaduras *M.psychrophila* y *Mrakia sp* presentaron actividad micocida contra cuatro y una especie sensible, respectivamente. En cambio, la levadura *M. blollopis* fue capaz de inhibir el crecimiento de dos levaduras sensibles a 15°C, pero ninguna a 10°C.

De la misma forma, dos levaduras previamente identificadas como *R.glacialis* presentaron distintos espectros de actividad (Tabla 8). Uno de los aislados presentó actividad contras tres especies de levaduras, en cambio el otro aislado no presentó actividad contra ningún césped sensible ensayado a 22°C. Por otra parte, uno de los aislados identificados como *Leuconeurospora sp* presentó actividad contra cuatro

levaduras distintas mientras que el otro aislado sólo contra una especie. Sin embargo, a 15°C el aislado *Leuconeuropa. sp1* que inhibió el crecimiento de sólo un césped sensible a 22°C, presentó actividad contra dos cepas sensibles a 15°C. Por el contrario, la levadura *Leuconeuropa. sp2* no tuvo actividad micocida contra ningún césped ensayado a 15°C. Ambos aislados no presentaron actividad micocida a 10°C.

Las levaduras *R.laryngis*, *L.creatinivora* y *G.antarctica* presentaron espectros de actividad bastante reducidos, observándose actividad micocida sólo contra dos céspedes sensibles a 22°C para las dos primeras y contra sólo uno para la última. A 15°C la levadura *R.laryngis* presentó actividad contra tres céspedes sensibles, la levadura *G.antarctica* contra dos cepas sensibles y la levadura *L.creatinivora* contra sólo uno. Las tres especies de levaduras no presentaron actividad a 10°C. La levadura *H.watticus* presentó actividad contra cinco céspedes sensibles a 22°C, mientras que a 15 y 10°C no se observó actividad micocida. Por último, la levadura *L.fragaria* fue la única especie que no presentó actividad micocida contra ningún césped sensible a las tres temperaturas ensayadas.

3.2.2 Análisis de extractos de proteínas extracelulares y actividad micocida

Se extrajo proteínas extracelulares a las levaduras que presentaron los espectros de actividad más amplios en contra céspedes sensibles de levaduras, para determinar si esta actividad fue producto de alguna proteína secretada al medio extracelular.

Para determinar si la actividad micocida corresponde a proteínas secretadas, se extrajo proteínas extracelulares a partir de cultivos en medio YM de las levaduras *C.sake* y *W.anomalous*, ya que presentaron los perfiles de actividad micocida más amplios.

Ambos extractos de proteínas extracelulares presentaron actividad micocida al ensayarlos sobre céspedes sensibles, a 22 y 15°C (Figura 7). Esta actividad se perdió completamente cuando los extractos fueron incubados previamente a 70°C, por 10 minutos (Figura 7). Estos resultados sugieren que la actividad micocida observada para estas levaduras puede ser producida por algún factor de naturaleza proteica secretado al medio de cultivo extracelular.

3.2.3 Análisis de actividad antibacteriana

Se evaluó la existencia de actividad antibacteriana de los aislados antárticos contra diferentes bacterias, principalmente Gram negativas. Las levaduras se sembraron sobre céspedes sensibles y se incubaron a 22°C, hasta que las colonias se desarrollarán. Como las levaduras no son capaces de crecer en medio de cultivo LB, se determinó si las bacterias que se utilizarían como sensibles fueran capaces de crecer en medio de cultivo YM y a 22°C. Las bacterias que fueron capaces de crecer en esas condiciones se utilizaron como células sensibles para evaluar la producción de antibacterianos. Los resultados obtenidos para los ensayos de colonias de levaduras sobre estos céspedes bacterianos se muestran en la tabla 9. Las levaduras *D. fristingensis*, *L. creatinivora*, *Cr. gilvescenes* y *R. glacialis*², presentaron los espectros de actividad más amplios contra las bacterias Gram (-) ensayadas, incluso las tres últimas presentaron actividad contra *S.aerous*, Gram (+).

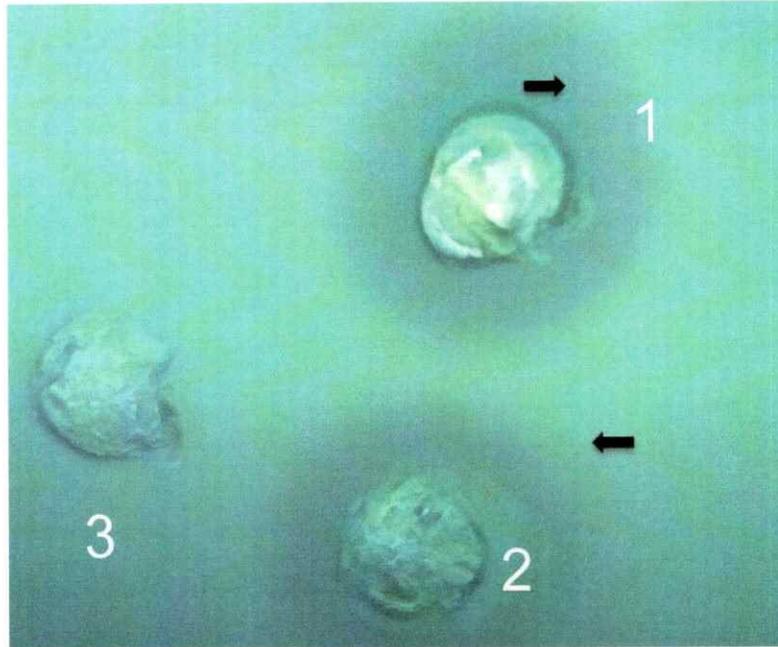


Figura 7. Actividad micocida de extractos proteicos extracelulares, en ensayos de placa. Ensayo de extracto de proteico extracelular (100 μ l en un pocillo de 1 cm de diámetro) sobre el césped de levadura. 1, extracto obtenido de la levadura *C. sake*; 2, extracto obtenido desde la levadura *W. anomalus*; 3, extracto incubado previamente por 15 min a 70°C. La fecha indica el halo de muerte (precipitado azul de metileno).

Tabla 9. Ensayos de actividad antibacteriana a 22°C.

Levadura ensayada	Césped				
	<i>S.aer</i>	<i>P.vul</i>	<i>M.mor</i>	<i>KSP.Kleb</i>	<i>K.gey</i>
<i>S.sal</i>	-	+	+	+	+
<i>Cr.gas</i>	-	+	-	-	+
<i>Cr.vic</i>	-	-	-	-	-
<i>Cr.gil</i>	+	++	++	+	++
<i>Cr.sp</i>	-	-	-	-	-
<i>H.wat</i>	-	-	-	-	-
<i>C.sak</i>	-	-	+	-	-
<i>D.fri</i>	-	+	+	+	+
<i>R.lar</i>	-	+	+	-	+
<i>L.cre</i>	+	+++	+++	+++	+++
<i>L.fra</i>	-	-	-	-	-
<i>G.ant</i>	-	-	-	-	-
<i>W.ano</i>	-	+	+	-	+
<i>M.sp1</i>	-	-	-	-	-
<i>M.blo</i>	-	-	-	-	-
<i>M.psy</i>	-	-	-	-	-
<i>R.gla1</i>	-	-	+	-	+
<i>R.gla2</i>	+	+	+	+	+
<i>Le.sp1</i>	-	+	++	+	++
<i>Le.sp2</i>	-	-	-	-	-
<i>M.bic</i>	-	-	-	-	+

-: No se observó halo de muerte; +: Halo entre 0,5 y 1,9mm; ++: Halo entre 2 y 4,9mm; +++: Halo >5mm.
S.sal: *Sporidiobolus salmonicolor*; *Cr.gas*: *Cryptococcus gastricus*; *D.fris*: *Dioszegia fristingensis*; *L.fra*:
Leucosporidiella fragaria; *R.lar*: *Rhodotorula laryngis*; *L.cre*: *Leucosporidiella creatinivora*; *C.sak*:
Candida sake; *Cr.vic*: *Cryptococcus victoreae*; *Cr.gil*: *Cryptococcus gilvescens*; *Cr.sp*: *Cryptococcus sp*
G.ant: *Glaciozyma antártica*; *H.wat*: *Hotermaniella watticus*; *Mr.sp*: *Mrakia.sp*; *Mr.blo*: *Mrakia*
blollopis; *Mr.psy*: *Mrakia psychrophila*; *R.gla1*: *Rhodotorula glacialis 1*; *R.gla2*: *Rhodotorula glacialis*
2; *Le.sp1*: *Leuconeurospora.sp1*; *Le.sp2*: *Leuconeurospora.sp2*; *W.ano*: *Wickerhamomyces anomalus*;
M.bic: *Metschnikowia bicuspidata*; *S.aer*: *Staphylococcus aerous*; *P.vul*: *Proteus vulgaris*; *M.mor*:
Morganella morganii; *KSP.Kleb*: *KSP Klebsella*; *K.gey*: *Klebsella geyteca*.

3.2.4 Análisis de extractos de proteínas extracelulares y actividad antibacteriana

Se obtuvieron extractos proteicos extracelulares desde algunos cultivos líquidos de levaduras que presentaron actividad antibiótica, con el fin de relacionar si este efecto antibacteriano se deba a algún factor proteico secretado al medio extracelular. Además para descartar cualquier efecto de inhibición de crecimiento que pudiera provocar la temperatura de los ensayos (22°C) y el medio de cultivo (YM), los ensayos con los extractos de proteínas extracelulares se realizaron en medio de cultivo LB y a 30 y 37°C. Los extractos de proteínas obtenidos generaron halos de muerte al ser sembrados sobre los césped bacterianos, en cambio los extractos proteicos denaturados (15 min a 70°C) no generaron estos halos (Figura 8). Los resultados obtenidos para todos los extractos proteicos extracelulares ensayados a 30 y 37°C, se observan en la tabla 10. Estos resultados son consistentes con respecto a los ensayos en placa ya que cinco de los seis extractos de proteínas extracelulares presentaron actividad a 30°C. Sin embargo la mayoría de los extractos no presentaron actividad cuando fueron ensayados a 37°C, con excepción del extracto obtenido desde cultivos de la levadura *L. creatinivora* que mantuvo su actividad. Todos estos resultados sugieren que existe un factor de naturaleza proteica, secretado por estas levaduras, que es capaz de matar e inhibir el crecimiento de bacterias, principalmente Gram (-).

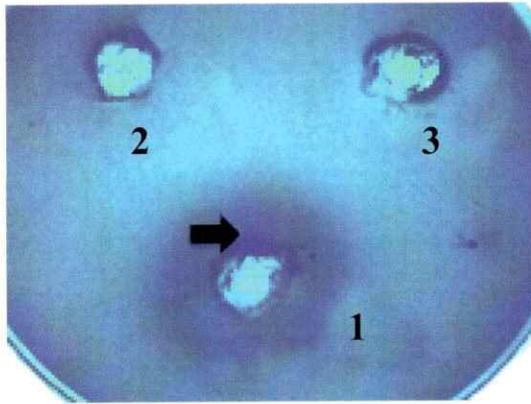


Figura 8. Actividad antibacteriana de extractos proteicos extracelulares de la levadura *L. creatinivora*, en ensayos de placa. Ensayo de extracto de proteico extracelular (100 μ l en un pocillo de 1 cm de diámetro) sobre el césped bacteriano. 1, extracto sin tratar; 2, extracto incubado previamente por 15 min a 70°C; 3, control sin extracto. La fecha indica el halo de muerte (precipitado azul de metileno).

Tabla 10. Ensayos de actividad antibacteriana de extractos proteicos extracelulares de levaduras.

Extracto Proteínas	Temperatura (°C)	Césped Bacteriano					
		<i>C. violaceum</i>	<i>KSP Klebsella</i>	<i>P.midalens</i>	<i>P.vulgari</i>	<i>M.morganii</i>	<i>Klebsella geyteca</i>
<i>C.gilvescens</i>	30	-	-	++	+	+	+
	37	-	-	-	-	-	-
<i>S.salmonicolor</i>	30	-	+	+	+	+	+
	37	-	-	-	-	-	-
<i>L.creatinivora</i>	30	-	++	+++	+	+	+
	37	-	++	+++	+	+	+
<i>R.laryngis</i>	30	-	-	-	-	-	-
	37	-	-	-	-	-	-
<i>G.antarctica</i>	30	-	-	+	-	-	-
	37	-	-	++	-	-	-
<i>C.gastricus</i>	30	-	+	-	+	-	+
	37	-	-	-	-	-	-

-: No se observó halo de muerte; +: Halo entre 0,5 y 1,9mm; ++: Halo entre 2 y 4,9mm; +++: Halo >5mm.
S.sal: *Sporidiobolus salmonicolor*; *C.gas*: *Cryptococcus gastricus*; *R.lar*: *Rhodotorula laryngis*; *L.crea*:
Leucosporidiella creatinivora; *C.gil*: *Cryptococcus gilvescens*; *G.ant*: *Glaciozyma antártica*; *P.vul*:
Proteus vulgaris; *M.mor*: *Morganella morganii*; *KSP.Kleb*: *KSP Klebsella*; *K.gey*: *Klebsella geyteca*;
P.midalens: *Proteus midalens*; *C*: *Chromobacterium violaceum*.

3.3 Determinación de la existencia de dsRNA en las levaduras.

Se realizaron extracciones de dsRNA a partir de “pellet” celulares obtenidos desde medios de cultivo líquido, para todas las especies de levaduras antárticas con las que hemos trabajado. Los resultados de los perfiles de dsRNA obtenidos para cada levadura se resumen en la Tabla 11. Las extracciones de RNA total desde las levaduras *M.psychrophila*, *M.blollopis*, *H.watticus*, *S.salmonicolor* y *R.glacialis2*, muestran una banda de aproximadamente 5 kb que podría corresponder a un EGE del tipo dsRNA en esas levaduras. Las muestras fueron tratadas con las enzimas RNAsa y Nucleasa S1, con el fin de determinar la naturaleza de los RNAs presentes. Como se observa en la figura 9, los RNAs extraídos desde las levaduras *R.glacialis2*, *S.salmonicolor* y *M.psychorphila* fueron resistentes al tratamiento con Nucleasa S1. Esta enzima degrada ácidos nucleicos de hebra simple (DNA o RNA), por lo tanto probablemente correspondan a dsRNAs.

Tabla 11. Perfiles de dsRNA de levaduras antárticas.

Levaduras	dsRNAs
<i>G. antarctica</i>	-
<i>M. psychrophila</i>	+
<i>Mrakia.sp1</i>	-
<i>M. blolloptis</i>	+
<i>W. anomalus</i>	-
<i>C. sake</i>	-
<i>Cr. sp</i>	-
<i>Cr. gastricus</i>	-
<i>Cr. victoriae</i>	-
<i>C. gilvescens</i>	-
<i>H. waticus</i>	+
<i>R. laryngis</i>	-
<i>Sp. salmonicolor</i>	+
<i>Le. creatinivora</i>	-
<i>L. fragaria</i>	-
<i>Metschnikowia.sp</i>	-
<i>R. Glacialis1</i>	-
<i>R. glacialis2</i>	+
<i>Leuconeurospora sp1</i>	-
<i>Leuconeurospora sp2</i>	-
<i>D. fristingensis</i>	-

-: No se observó presencia de dsRNA; +: Se observó presencia de dsRNA

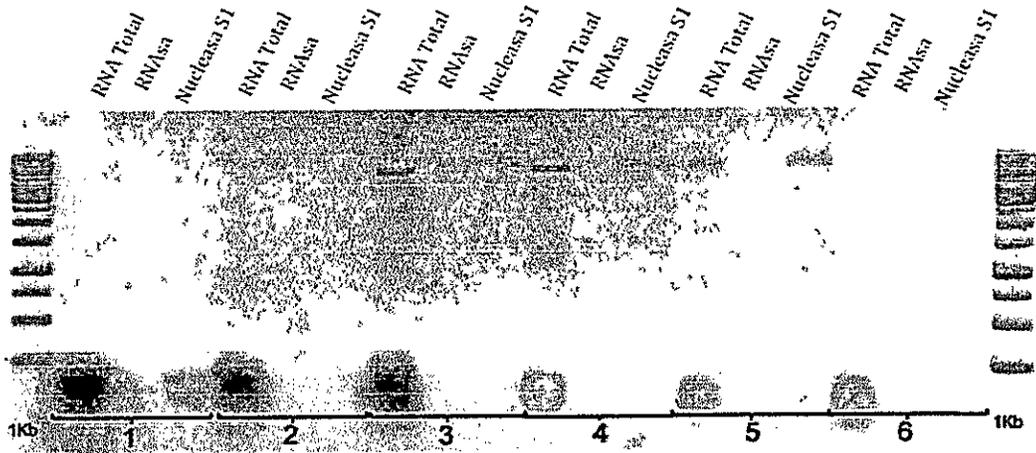


Figura 9. Perfiles de dsRNA de levaduras antárticas. Se aisló RNA total desde cultivos líquidos, para cada levadura y se realizaron tratamientos con RNAsa y Nucleasa S1. 1: RNA total aislado desde *M.blollopis* 2: RNA total aislado desde *R.glacialis1*, 3: RNA total aislado desde *R.glacialis2*, 4: RNA total aislado desde *S.salmonicolor*, 5: RNA total aislado desde *M.psychrophila*, 6: RNA total aislado desde *H.waticcus*. El estándar de peso molecular fue 1kb.

Los análisis de perfiles de dsRNA no son útiles para tipificar las levaduras ensayadas pertenecientes al género *Cryptococcus*, ya que ninguno de los aislados presentaron moléculas de dsRNA. Por la misma razón, este tipo de análisis tampoco fue exitoso para diferenciar las levaduras pertenecientes al género *Leuconeuropa*. En cambio, este tipo de análisis serían útiles para diferenciar la levadura *M. psychrophila* de las levaduras *Mrakia sp* y *M. blollopis*, debido a que fue la única levadura dentro de su género que presentó una molécula de dsRNA. Por último, los aislados identificados como *R. glacialis1* y *R. glacialis2* si se pueden diferenciar ya que el primer aislado no posee dsRNA, en cambio la levadura *R. glacialis2* posee un dsRNA de aproximadamente 5kb. Por lo tanto en este caso el análisis de perfiles de dsRNA para ambos aislados resulta útil para poder discriminar entre ambos.

4. DISCUSION

Una de las grandes dificultades en la identificación de microorganismos ambientales mediante marcadores moleculares, es la elección de un marcador que presente regiones conservadas para el diseño de partidores que sean capaces de amplificar una gran cantidad de especies, pero que también posea regiones variables que permitan identificar y/o diferenciar distintos organismos. A lo largo del texto ya se ha mencionado las dificultades que presentan los marcadores moleculares convencionales en identificación de levaduras (ITS y dominios D1/D2), por lo que continuamente se está en la búsqueda de marcadores que tengan una mayor resolución taxonómica. Uno de los marcadores que se ha evaluado para su utilización en identificación de organismos que pertenecen al reino *Fungi* es el gen que codifica para la enzima citocromo oxidasa 1 (*COI*). Si bien no existen muchos reportes de trabajos realizados en hongos, Sfeiter y colaboradores (2007) realizaron un análisis de la estructura de la región *COI* en hongos. Los autores desarrollaron partidores con los que lograron amplificar y secuenciar una región de 545 pb del gen *COI* desde 58 especies del género *Penicillium* encontrando intrones solo en 2 de las 370 cepas de *Penicillium* analizadas, demostrando que la probabilidad de encontrar intrones dentro de esta región de "Barcoding" es baja. Este resultado es muy importante, ya que se ha reportado presencia de intrones móviles dentro de genomas mitocondriales de distintos hongos, los cuáles interferirían para su posible utilización como marcador molecular en estos organismos (Seifert, 2009). Además, en ese mismo estudio, demostraron que la variación nucleotídica intra-específica de esta región fue sólo de un 0,06%, lo que resulta adecuado para su

utilización en identificación de hongos a nivel de especie. Si bien estos resultados (baja presencia de intrones y baja variación nucleotídica intraespecífica) demuestran la posible utilidad de emplear esta región en identificación de hongos, en otros géneros no se han obtenido los mismos resultados. Por ejemplo, los análisis de secuencia obtenidas para especies del género *Aspergillus* (Geiser y cols., 2007), demuestran que este gen posee variación nucleotídica insuficiente entre diferentes especies, no permitiendo identificarlas. Gilmore y colaboradores en el año 2009 reportaron la existencia de parálogos para este gen en cepas pertenecientes al género *Fusarium*, demostrando que existe más de una secuencia para este gen en algunas especies de hongos. Esta característica no sería favorable en cualquier marcador molecular, ya que en algunos casos una diferencia nucleotídica podría dificultar su diferenciación con respecto a otras especies cercanas filogenéticamente. En levaduras, los trabajos realizados son escasos y por lo tanto es necesario aumentar el número de secuencias *COI* disponibles para poder evaluar su utilidad. Para esto, realizamos un análisis informático de las secuencias aminoacídicas *COI* de levaduras y hongos filamentosos disponibles en la base de datos del NCBI y diseñamos partidores degenerados en zonas conservadas de *COI* para obtener amplicones de 200 a 900 pb. Lamentablemente, ninguno de los partidores diseñados cumplió con los requisitos para utilizarse en identificación de levaduras, por lo tanto se optó por evaluar la capacidad de los partidores Uni-minibar, descritos previamente y que se ha demostrado su utilidad para amplificar una región de 130 pb, del gen *COI* desde diferentes grupos de organismos (Meusnier y cols., 2008). Utilizando estos partidores se obtuvieron 21 secuencias nucleotídicas, las cuáles fueron analizadas mediante el algoritmo blastx. De este análisis se desprende que 4 secuencias presentaron

similitud con citocromos oxidasas, 2 secuencias no presentaron similitud (<30% de identidad) con proteínas de la base de datos, 10 secuencias presentaron similitud con otras proteínas no relacionadas y 5 secuencias presentaron similitud con proteínas hipotéticas. Posteriormente, las secuencias obtenidas fueron comparadas entre las distintas especies, evaluándose la capacidad de diferenciar entre ellas, lo que fue contrastado a su vez con los transcritos internos y los dominios D1/D2, obtenidos previamente para estas mismas especies. Basado en este análisis, la región minibar presentó siempre valores de identidad nucleotídica inferiores con respecto a los ITS para las especies dentro de los géneros *Cryptococcus*, *Mrakia*, *Rhodotorula* y *Leuconeuropa*. Estos valores se contrastan a lo reportado por Seifert y colaboradores, que demostraron que las secuencias obtenidas para el gen *COI* de las especies del género *Penicillium* no presentaron una divergencia inter-específica significativa (5,6%), en comparación a los espaciadores transcritos internos (5,1%) (Seifert y cols., 2007). Cabe destacar que las secuencias obtenidas previamente para la región ITS, abarcan las zonas ITS1, 5.8S e ITS2, siendo la región 5.8S muy conservada dentro del rDNA. Por lo tanto al no eliminar esta región dentro del análisis de secuencia, estamos subestimando la resolución taxonómica que poseen los espaciadores transcritos internos por sí solos. En cambio, al comparar los resultados de identidad nucleotídica entre los dominios D1/D2 y la región minibar entre estos mismos géneros de levaduras, observamos que entre algunas especies de levaduras los dominios D1/D2 poseen mayor resolución inter-específica que esta región, pero entre otras especies fue al contrario. Al comparar los cladogramas obtenidos para los tres marcadores, se observa que tanto el cladograma de las secuencias ITS como el de los dominios D1/D2 del rDNA, son capaces de agrupar

levaduras que pertenecen a un mismo género de levaduras, pero en algunos casos no son capaces de separar distintas especies. De forma general, los resultados obtenidos en este trabajo nos indican que no existe un marcador molecular único y exclusivo para poder diferenciar todas las especies de levaduras con las que se trabajó. Si bien la región minibar dentro del gen *COI* presentó los menores valores de identidad nucleotídica entre las diferentes levaduras ensayadas y por ende posee una mayor resolución taxonómica, al observar el cladograma obtenido (figura 3) para cada una de las secuencias, se observa que las diferentes especies de levaduras pertenecientes a un mismo género se encuentran muy dispersas dentro del cladograma. Estos resultados sugieren que este marcador no sería útil para identificar levaduras a nivel de especie ya que este marcador pierde resolución interespecífica al tener tanta variabilidad de secuencia para una misma región. En cambio, este marcador sería útil en tipificación de levaduras ya que detectó diferencias intraespecíficas entre diferentes aislados como ya se ha mencionado a lo largo de este escrito.

Para validar los resultados obtenidos en este trabajo, se intentó comparar la identificación entregada por la región minibar con respecto a algún árbol filogenético establecido, que se hace en base a los genomas disponibles de diferentes levaduras. Sin embargo esta comparación no fue posible, ya que el árbol filogenético establecido disponible contenía una gran cantidad de genomas de hongos y muy pocas especies de levaduras, en donde sólo el genoma de una de las especies de este trabajo estaba disponible (Fitzpatrick y cols., 2006).

Por último, para que un marcador sea universal en identificación de algún grupo de organismos, es necesario que el marcador seleccionado sea robusto (Armstrong y Ball., 2005), es decir, que presente las siguientes características. En primer lugar, se deberá evaluar si este marcador presenta suficiente variación nucleotídica que permita diferenciar especies distintas. Para evaluar si la región minibar cumple con este requisito, será necesario ampliar el número de secuencias disponibles para este marcador, tanto para levaduras ambientales, como para levaduras de colección y para cepas tipos. En segundo lugar, este marcador no debería presentar gran divergencia intra-específica dentro de especies cercanas geográficamente, ya que diferencias a nivel de secuencia nucleotídica en un gen de vital importancia como *COI* representan cambios evolutivos o diferentes adaptaciones (Armstrong y Ball., 2005). Por lo tanto si dos aislados pertenecientes a una misma especie presentan gran polimorfismo para esta región, este gen no sería un buen candidato para su utilización en identificación de levaduras.

Una vez evaluado si este marcador presenta estas características, será necesario depositar la información de este conjunto de levaduras en la principal base de datos de “barcoding” (www.barcodinglife.com), dejando la información disponible a toda la comunidad científica. Además, será necesario evaluar la concordancia entre la identificación dada por esta región en comparación con otros métodos de tipificación tradicional, como lo son los criterios fisiológicos y bioquímicos.

4.1 Actividad micocida y perfiles de dsRNA

Se evaluó la actividad micocida cruzada entre las 21 especies distintas de levaduras antárticas, para determinar si esta es una forma de competencia entre ellas en ecosistemas antárticos y para determinar los diferentes perfiles de actividad micocida para todas ellas. De todas las levaduras analizadas, sólo la levadura *L. fragaria* no presentó actividad contra ninguna otra levadura. Estos resultados son muy interesantes ya que en diversos hábitats, la secreción de micotoxinas es una manera eficiente para eliminar levaduras que compiten con ellos por recursos nutricionales limitantes (Cavicchioli y Cols., 2002). Sin embargo, sólo una micotoxina ha sido descrita desde regiones frías del planeta (Hua y cols, 2010). Estos autores postularon que las levaduras psicrotolerantes y/o psicrófilas que producen micotoxinas podrían cumplir un rol importante en ecosistemas a bajas temperaturas y que estas micotoxinas podrían tener características únicas. Debido a la escasa publicación de trabajos sobre micotoxinas antárticas y a que la mayoría de las levaduras analizadas en este trabajo presentaron al menos un tipo de actividad contra céspedes sensibles, nos incentiva a futuro a estudiar las propiedades de distintas toxinas y eventualmente encontrar alguna aplicación biotecnológica para algunas de ellas. Dentro de los géneros de levaduras que presentaron actividad en este trabajo, se ha reportado previamente la producción de micotoxinas desde los géneros *Cryptococcus* (Staib F, 1999), *Mrakia* (Hua y cols., 2010), *Candida*, *Rhodotorula*, *Sporidiobolus* y *Wickerhamomyces* (Marquina y cols., 2002), no reportándose producción de micotoxinas activas a bajas temperaturas. El fenómeno micocida se ha descrito como: “Las micotoxinas son glicoproteínas o proteínas de bajo peso molecular, producidas por algunas levaduras, las cuales matan células sensibles de

otras especies de levaduras del mismo género o cercanas filogenéticamente” (Marquina y cols, 2002). Sin embargo, algunas de las levaduras antárticas ensayadas en este trabajo presentaron actividad micocida contra otras que no pertenecían al mismo género y a su vez no son cercanas filogenéticamente a ellas. Específicamente, las levaduras *S.salmonicolor* y *D.fristingensis* (Basidiomicetes), presentaron actividad micocida contra la levadura *C.sake* (Ascomicete) y a su vez ésta levadura presentó actividad contra diferentes levaduras basidiomocetes. Por lo tanto sería interesante reevaluar el fenómeno micocida y determinar si las micotoxinas producidas por nuestras levaduras son diferentes a las micotoxinas descritas con anterioridad.

Por otra parte, demostramos que los análisis de los perfiles de actividad micocida son útiles para diferenciar intraespecíficamente las levaduras de los géneros *Cryptococcus*, *Mrakia*, *Rhodotorula* y *Leuconeuospora*, ya que los perfiles de actividad para las especies ensayadas fueron distintos. Específicamente, se logró diferenciar la levadura *Cryptococcus sp* de las restantes especies dentro de este género, que no se había logrado diferenciar a través de los espaciadores transcritos internos y de los dominios D1/D2 del rDNA (Carrasco y cols., 2012). De la misma forma se logró diferenciar la levadura *Mrakia sp* de las restantes especies dentro de este género, *R.glacialis 1* de la levadura *R.glacialis 2* y por último, se logró diferenciar los aislados *Leuconeuospora sp1* y *Leuconeuospora sp2*. Estos resultados sugieren la utilidad de este método de identificación en tipificación de levaduras, al igual que lo demostrado en trabajos previos (Buzzini y cols., 2007; Golubev, 2006). Además, sería interesante determinar si este marcador fisiológico es útil para identificar otro tipos de levaduras y de esta forma ampliar su uso en taxonomía.

Los análisis de perfiles de dsRNA no fueron útiles para diferenciar los aislados pertenecientes al género *Cryptococcus* y *Leuconeuospora*, ya que ninguna de las especies dentro de estos géneros presentó algún elemento del tipo dsRNA. Por otra parte, las levaduras *M. psychrophila* y *R. glacialis* presentaron un dsRNA de aproximadamente 5 kb, logrando diferenciarse de las restantes especies dentro de sus géneros, las cuáles no presentaron ninguna molécula de dsRNA. Estos resultados sugieren la utilización de los perfiles de actividad micocida y de dsRNA en tipificación de levaduras, ya que levaduras que no se lograron diferenciar anteriormente, se lograron diferenciar mediante esta aproximación.

Los aislados que presentaron los espectros de actividad más amplios fueron las levaduras *C. sake* y *W. anomalus*, contra 11 y 10 levaduras, respectivamente. Se ha descrito que especies de ambos géneros son capaces de secretar toxinas al medio extracelular, en particular muchas especies del género *Wickerhamomyces* (ex *Pichia*) se han descrito como productoras de diferentes toxinas (Marquina y cols., 2002). El fenotipo micocida observado para estas levaduras correspondería a un factor proteico extracelular. Para determinar si estas proteínas corresponden a toxinas no descritas con anterioridad y que puedan presentar alguna potencial aplicación, será necesario profundizar su caracterización en trabajos futuros.

4.2 Actividad antibacteriana

Una vez determinadas las bacterias que fueron capaces de crecer en las condiciones de ensayo, se evaluó la producción de antibacterianos sobre céspedes

sensibles inoculados con estas especies bacterianas. Las levaduras *D. fristingensis*, *L. creatinivora*, *C. gilvescenes* y *R. glacialis* presentaron los espectros de actividad más amplios contra las bacterias Gram (-) ensayadas, incluso las tres últimas presentaron actividad antibacteriana contra *S.aureus*, Gram (+). Sería interesante evaluar si un mismo compuesto antibacteriano es capaz de ejercer este efecto antibacteriano sobre estos dos tipos de bacterias y si es así analizar la naturaleza de éste o éstos. El primer y único reporte de producción de antibacterianos por levaduras se realizó en el año 1986, en donde se determinó que levaduras de los géneros *Hansenula*, *Pichia*, *Saccharomyces*, y *Candida*, presentaron actividad contra diferentes bacterias actinomicetes (Polonelli y Morace, 1986). En aquel trabajo ellos hipotetizaron que el efecto antibacteriano observado fue producto de la acción de micotoxinas secretadas por las diferentes levaduras que ellos ensayaron, sin embargo, con el conocimiento actual que poseemos sobre el mecanismo de acción de diferentes micotoxinas, sería poco probable ya que los receptores que reconocen a las distintas toxinas no se encuentran en la pared celular bacteriana (Golubev, 2006). Para responder a esta pregunta se tendría que purificar las diferentes micotoxinas que poseen las levaduras con actividad antibacteriana positiva, para luego ensayar éstas contra diferentes céspedes bacterianos sensibles. Para avanzar en esa dirección, se ensayaron extractos de proteínas extracelulares sobre céspedes sensibles. Los resultados obtenidos sugieren que este efecto antibacteriano estaría dado por la secreción de alguna proteína, al igual que la actividad micocida señalada anteriormente. La levadura *L. creatinivora* presentó los halos de inhibición de mayor tamaño a 30°C y también mantuvo la actividad a 37°C, aunque no fue capaz de crecer a esta temperatura. Sería interesante determinar que proteína es la que produce este efecto

antibacteriano y el rango de temperatura a la cuál es activa, para poder evaluar su actividad antibacteriana sobre diferentes patógenos de interés clínico e industrial.

Por último, las levaduras *S.salmonicolor*, *C.gilvescens*, *C.gastricus* presentaron actividad a 30°C pero perdieron totalmente su actividad cuando los extractos fueron ensayados a 37°C. Sólo el extracto de proteínas extracelulares de la levadura *R. laryngis* no presentó actividad contra ningún césped sensible ensayado a 30 y 37°C, indicando que el efecto antibacteriano observado probablemente no sea producido por alguna proteína.

5. CONCLUSIONES

- 1.- La región minibar presentó un nivel de resolución taxonómico similar al de los dominios D1/D2 del rDNA y superior al de los espaciadores transcritos internos.

- 2.- La producción de micotoxinas y antibacterianos se observó en 20 y 12 de las 21 levaduras antárticas ensayadas, respectivamente. Los perfiles obtenidos fueron útiles en la tipificación de levaduras antárticas.

- 3.- Sólo cuatro de las veinte y un levaduras analizadas presentaron un elemento genético extracromosómico del tipo dsRNA, de aproximadamente 5 kb. Por lo tanto, los análisis de estos perfiles no fueron útiles para la identificación de la mayoría de las levaduras, logrando diferenciar sólo a las levaduras *M. psychrophila* de las restantes de su género y a las levaduras *R. glacialis 1* y *R. glacialis 2*.

6. BIBLIOGRAFIA

- Armstrong K y Ball S.** 2005. DNA barcodes for biosecurity: invasive species identification. *Phil. Trans. R. Soc. B.* **360**: 1813–1823.
- Baeza M, Flores O, Carrasco M, Rozas JM, Oviedo V, Barahona S y Cifuentes V.** 2010. The inter-generic fungicidal activity of *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *J Microbiol.* **48**: 822-8.
- Baeza M, Bravo N, Sanhueza M, Flores O, Villarreal P y Cifuentes V.** 2012. Molecular characterization of totiviruses in *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Virology Journal.* **9**:140.
- Bajaj B, Raina S y Singh S.** 2012. Killer toxin from a novel killer yeast *Pichia kudriavzevii* RY55 with idiosyncratic antibacterial activity. *J Basic Microbiol.* **52**: 1–11.
- Bevan E y Makower M.** 1963. The physiological basis of the killer character in yeast. *Proc. XIth Int. Congr. Genet.* **1**: 202–203.
- Boyle J y Lew.** 1995. A: An inexpensive alternative to glassmilk for DNA purification. *Trends Genet.* **11**:8.
- Buzdar M, Chi Z, Wang Q, Hua MX y Chi ZM.** 2011. Production, purification, and characterization of a novel killer toxin from *Kluyveromyces siamensis* against a pathogenic yeast in crab. *Appl Microbiol Biotechnol.* **91**:1571–1579.
- Buzzini P, Turchetti B y Vaughan-Martini A.** 2007. The use of killer sensitivity patterns for biotyping yeast strains: the state of the art, potentialities and limitations. *FEMS Yeast Res.* **7**: 749–760.

Carrasco M, Rozas J, Barahona B, Alcaíno J, Cifuentes V y Baeza M. 2012. Diversity and extracellular enzymatic activities of yeasts isolated from King George Island, the sub-Antarctic region. *BMC Microbiology*.

Comitini F y Ciani M. 2010. *Kluyveromyces wickerhamii* killer toxin: purification and activity towards *Brettanomyces/Dekkera* yeasts in grape must. *FEMS Microbiol Lett*. **316**: 77–82.

Esteve-Zarzoso R, Belloch C, Uruburul F y Querol A. 1999. Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *Int J Syst Bacteriol*. **49**: 329-337.

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.

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. *BMC Evol Biol*. **6**:99.

Fitzpatrick D, Logue M, Stajich J, y Butler G. 2006. A fungal phylogeny based on 42 complete genomes derived from supertree and combined gene analysis.

Geiser D, Klich M, Frisvad J, Peterson S, Varga J y Samson R. 2007. The current status of species recognition and identification in *Aspergillus*. *Studies in Mycology*. **59**: 1–10.

Gilmore S, Gräfenhan T, Louis-Seize G y Seifert K. 2009. Multiple copies of cytochrome oxidase 1 in species of the fungal genus *Fusarium*. *Mol Ecol Res.* **9**: 90–98.

Golubev W. 2006. Antagonistic interactions among yeasts. En Rosa C y P'eter G (eds.). *The Yeast Handbook. Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts.* Pp 197-219. Springer, Berlin, Germany.

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.

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

Guo FJ, Ma Y, Xu YM, Wang XH y Chi ZM. 2012. A novel killer toxin produced by the marine-derived yeast *Wickerhamomyces anomalus* YF07b. *Antonie van Leeuwenhoek.*

Hajibabaei M, Janzen D, Burns J, Hallwachs W y Hebert P. 2006. DNA barcodes distinguish species of tropical Lepidoptera. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **103**: 968-971.

Hajibabaei M, Singer G, Clare E y Hebert P. 2007. Design and applicability of DNA arrays and DNA barcodes in biodiversity monitoring. *BMC Biol.* **5**:24.

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.

Hebert P, Stoeckle M, Zemplak T y Francis C. 2004. Identification of birds through DNA barcodes. *PLoS Biology*. **10**:E312.

Hua MX, Chi Z, Liu GL, Buzdar M y Chi ZM. 2010. Production of a novel and cold-active killer toxin by *Mrakia frígida* 2E00797 isolated from sea sediment in Antarctica. *Extremophiles*. **14**:515–521.

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.

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

Maqueda M , Zamora E, Rodríguez-Cousiño N, Ramírez M. 2010. Wine yeast molecular typing using a simplified method for simultaneously extracting mtDNA, nuclear DNA and virus dsRNA. *Food Microbiology*. **27**: 205–209.

Marquina D, Santos A y Peinado JM. 2002. Biology of killer yeasts. *Int Microbiol*. **5**: 65–71.

Meusnier I, Singer G, Landry JF, Hickey D, Hebert P y Hajibabaei M. 2008. A universal DNA mini-barcode for biodiversity analysis. *BMC Genomics*. **9**: 214.

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,

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

Pfeiffer I, Kucsera J, Gácsér A, Litter J y Golubev WI. 2002. Diversity of extrachromosomal genetic elements in yeasts (a review). *Acta Microbiol Immunol Hung.* **49:** 315-9.

Polonelli L y Morace G.1986. Reevaluation of the Yeast Killer Phenomenon. *J Clinic Microbiol.* **24:** 866-869.

Puchkov E, Yurkova T, Golubev W. 1998. Effects of *Cryptococcus humicola* killer toxin upon *Cryptococcus terreus* envelope: combined fluorometric and microscopic studies. *Biochim Biophys Acta.* **1381:** 61-67.

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.

Routhier E y Bruenn J. 1998. Functions of conserved motifs in the RNAdependent RNA polymerase of a yeast double-stranded RNA virus. *J Virol.* **72:** 4427.

Sambrook J y Russell D. 2001. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor, N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Santos A, Navascués E, Bravo E y Marquina D. 2011. *Ustilago maydis* killer toxin as a new tool for the biocontrol of the wine spoilage yeast *Brettanomyces bruxellensis*. *Int J Food Microbiol.* **145:** 147-154.

Schmitt M y Breinig F. 2002. The viral killer system in yeasts. From molecular biology to application. *FEMS Microbiol Rev.* **26**: 257–276.

Scorzetti G, Fell J, Fonseca A y Statzell-Tallman A. 2002. Systematics of basidiomycetous yeasts: a comparison of large subunit D1/D2 and internal transcribed spacer rDNA regions. *FEMS Yeast Research.* **2**: 495-517.

Seifert K, Samson R, DeWaard J, Houbraken J, Le' vesque C, Moncalvo JM, Louis-Seize G, y Hebert P. 2007. Prospects for fungus identification using CO1 DNA barcodes, with *Penicillium* as a test case. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **104**: 3901–3906.

Seifert K. 2009. Progress towards DNA barcoding of fungi. *Mol Ecol Res.* **9**: 83-89.

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

Staib F. 1999. The green colour effect (GCE) of the killer strain *Cryptococcus laurentii* CBS 139 on Staib agar. *Mycoses.* 103-106.

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 Evol* doi:10.1093/molbev/msr121. [www.megasoftware.net].

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.

Ward R, Zemlak T, Innes B, Last P y Hebert P. 2005. DNA barcoding Australia's fish species. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* **360**:1847-1857.

Xie J, Wei D, Jiang D, Fu Y, Li G, Ghabrial S y Peng Y. 2006. Characterization of debilitation-associated mycovirus infecting the plant-pathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. *J Gen Virol.* **87**: 241-249.

7. Anexo

7.1 Porcentajes de identidad nucleotídica entre las secuencias COI para las levaduras con las que se trabajó

Lev.	Chds	Cr.sp	Cr.gas	Cr.vict	Cr.gil	H.wat	D. Fris	Mr.sp	Mr.bio	Mr.psy	R.gla1	R.gla2	R.lar	L.crea	L.fra	Le.sp1	Le.sp2	G.ant	W. Ano	S.Sal	M.bic
Chds	-	66,3	62,7	57,8	59,8	51,8	61,9	65,8	69,7	63,1	59,9	72,1	51,8	58	64,1	57,1	58,2	56	59,8	62,8	59,9
Cr.sp		-	48,3	39,9	48,5	43,8	58	48,7	66	57,5	42,2	62,9	47,6	38,4	50,7	39	42,7	51,6	45,5	42	41,7
Cr.gas			-	50,7	98,5	51,5	58,8	51,2	49	60	50,8	44,1	60	79,8	42,1	50,5	56,1	80,7	43,8	46,5	55,1
Cr.vict				-	51,7	56	56,8	46,3	57,9	58,4	59,5	57	53,5	51,1	45,5	99,5	44,4	50,5	36,7	43,2	58,9
Cr.gil					-	51	60	51,9	47,4	61,2	51,8	50,6	65,7	79,9	42,4	51,5	57,1	81,3	43,5	48,7	55,1
H.wat						-	46,3	48,4	58,3	47,5	54,1	55,5	57,5	53,1	52,6	55,2	51,4	48,8	49,7	40,9	55,8
D. Fris							-	51,9	74,6	99,3	58,2	68,9	50,9	53,2	59,3	56,5	56,2	51,5	63,5	58,3	58,2
Mr.sp								-	64,6	67,4	41,2	58,2	42,1	39,5	52,4	46,3	41,9	40,2	46,7	50,8	42,3
Mr.bio									-	75,1	59	49,8	59,5	59	49,6	60,9	52,2	56,3	53,8	57	58,6
Mr.psy										-	58,2	68,5	52,1	53,2	59,8	58,2	57,5	50,9	64,7	66,5	57,1
R.gla1											-	51,9	53,8	45,9	45,5	59,3	44,4	52,7	39,3	50,5	99,4
R.gla2												-	58,8	57,1	53,4	57,2	52,9	61,2	58,3	58,4	51,9
R.lar													-	59,4	53,8	54,6	53,5	60,5	50,5	46,8	53,8
L.crea														-	50,7	51,6	56,6	84,6	50,7	47,1	46,5
L.fra															-	45	50,9	53,1	50,2	52,2	46
Le.sp1																-	44,1	50,8	37,2	43,4	58,7
Le.sp2																	-	52,9	42,6	46,9	43,9
G.ant																		-	53,7	48,4	52,2
W. Ano																			-	45,5	47,6
S.Sal																				-	50
M.bic																					-

7.2 Porcentajes de identidad nucleotídica entre las secuencias ITS para las levaduras con las que se trabajó

Lev	Cnds	Cr.sp	Cr.gas	Cr.vict	Cr.gil	H.wat	D. Fris	Mr.sp	Mr.bio	Mr.psy	R.gla1	R.gla2	R.lar	L.crea	L. Fra	Le.sp1	Le.sp2	G.ant	W. Ato	S.Sal	M.bic
Cnds	-	72,6	73,1	67,6	73,6	67	70,1	72,3	72	70,1	72,4	72,8	71,2	73,8	73,3	65,7	64,7	72,2	73,4	68,7	71,2
Cr.sp	-	-	72,2	65,7	73,3	72,5	64,3	72,4	72	72,6	66,5	66,6	66,9	66,3	66,9	59,8	59	63,2	63,3	69,2	72,3
Cr.gas	-	-	-	66,7	99,7	70,4	66,2	69,8	70	68,9	65,3	67,2	68,3	65,5	63,2	62,6	60,6	64,6	60,5	66,5	74,2
Cr.vict	-	-	-	-	62,4	68,3	70,7	65,4	61	65,1	62,5	62,8	62,6	63,2	61,5	65,8	65,3	63	56,5	61,8	63,4
Cr.gil	-	-	-	-	-	70,4	68,6	70	70,1	69,2	65,8	67	68,5	65	63,4	62,4	60,4	65	62,3	66,5	74,4
H.wat	-	-	-	-	-	-	71,1	68,7	68,7	71,3	64,5	65,7	64,4	64,9	63,4	59,6	62,9	64,2	62	64,6	70,7
D. Fris	-	-	-	-	-	-	-	67,9	65,4	67,6	60,4	60	63,4	63,4	62,1	60,9	64,4	65,2	57,5	66,9	66,1
Mr.sp	-	-	-	-	-	-	-	-	97,3	97	67,5	67,8	69,9	66,6	67,5	61,8	60,4	65,6	63,2	68,9	74,9
Mr.bio	-	-	-	-	-	-	-	-	-	98,9	67,8	67,4	68,4	66	66,5	61,8	60,6	67	62,6	68,4	73,6
Mr.psy	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	66,7	67,1	68,2	64,1	66,3	62,4	61,7	65,4	60,5	66,7	72,5
R.gla1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	99,3	69,6	87,3	86,4	63,1	61,3	76,9	61,5	76,6	69,1
R.gla2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	69,8	87,8	87,3	62,7	61,9	77,4	63,2	77,1	71
R.lar	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	70,3	68,5	62,1	61,2	64,1	63,5	69,4	70,9
L.crea	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	93,2	61,1	60,6	76,6	62,5	77,5	73,9
L. Fra	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	60,5	59,6	78,7	60,4	75,7	73,7
Le.sp1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	99,1	61,1	61,8	64,1	70,7
Le.sp2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	58,6	61,1	63,2	68,8
G.ant	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	62,3	69,3	71,2
W. Ato	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	62,2	71,1
S.Sal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	68,9

7.3 Porcentajes de identidad nucleotídica entre los dominios D1/D2 del rDNA para las levaduras con las que se trabajó

Lev	Chds	Cr.sp	Cr.gas	Cr.vict	Cr.gil	H.wat	D. Fris	Mr.sp	Mr.blo	Mr. psy	R.gla1	R.gla2	R.lar	L.crea	L. Fra	Le.sp1	Le.sp2	G.ant	W. Ano	S.Sal	M.bic
Chds	-	67,4	60,3	60,3	86,8	43,1	85,2	64,5	90	87,4	85,7	67,5	84,6	68,1	85,3	64,9	64,1	85,2	92,9	86,8	85,9
Cr.sp	-	-	87,3	47,5	48	93,5	52,4	84,1	44,5	45,6	43,7	77	47,5	77,1	39,3	70,9	69,9	42,6	46,4	39,4	46,6
Cr.gas	-	-	-	46,9	43,8	89,8	47,9	83	43,4	47,2	47,6	80,5	41,3	80,5	47,8	73,6	73,3	46,3	46,6	46,5	44,7
Cr.vict	-	-	-	-	76,9	63,8	89,4	40,7	82,3	81,2	77,7	45,1	77,8	40	78,5	44,2	42,3	78,3	68,8	77,4	62,2
Cr.gil	-	-	-	-	-	59,8	85,3	43,5	78,2	77,5	74,5	47	76,3	47,6	75	40,5	40,6	76,2	70,8	76,7	66
H.wat	-	-	-	-	-	-	52,1	89,7	59	63,3	59	86,5	58	85	58,5	83,2	83,4	58,3	62,2	66,0	56,1
D. Fris	-	-	-	-	-	-	-	49,7	86	86	84	52,6	82,6	69,8	83,7	51	51,1	84	77,4	81,1	67,7
Mr.sp	-	-	-	-	-	-	-	-	41,3	40	40,2	80,4	43,1	79,3	41,9	71,7	71,4	45,3	39,5	44	41,8
Mr.blo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	99,7	81,3	45	79,2	46	79,6	43,6	45,6	83,2	70,2	80	63,2
Mr. psy	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	80,7	39,3	79,3	41,3	79,7	43,7	44	82,4	68,3	79,4	64,7
R.gla1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	39	80,1	39,7	94,3	42,8	43,7	94,6	72	89,1	63,5
R.gla2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	46,1	95,1	40,2	69,9	69,9	82,4	40,4	41,3	47,3
R.lar	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	43,8	79,2	45,8	45,3	79,4	71,2	79,4	67,7
L.crea	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	41,1	70,1	69,8	43,2	37,9	40,9	47,6
L. Fra	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	40,3	39,7	93,9	70	87,6	63,3
Le.sp1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	99,3	42,3	45,1	44,4	42,4
Le.sp2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	41,4	42,3	45,2	42,1
G.ant	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	68,6	87,1	63
W. Ano	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	69,4	63
S.Sal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	67,8
M.bic	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Lev: Levaduras; Chds: *Candida sakei*; Cr.sp: *Cryptococcus sp.*; Cr.gas: *Cryptococcus gastricus*; Cr.vict: *Cryptococcus victoreae*; Cr.gil: *Cryptococcus gihescens*; H.wat: *Hotermaniella waticus*; D.fris: *Dioszegia fristingensis*; Mr.sp: *Mrakia sp.*; Mr.blo: *Mrakia bloilopsis*; Mr. psy: *Mrakia psychrophila*; R.gla1: *Rhodotorula glacialis 1*; R.gla2: *Rhodotorula glacialis 2*; R.lar: *Rhodotorula laryngis*; L.crea: *Leucosporidiella creatinivora*; L.fra: *Leucosporidiella fragaria*; Le.sp1: *Leuconurospora. sp1*; Le.sp2: *Leuconurospora.sp2*; G.ant: *Glaciozyma antarctica*; W.ano: *Wickerhamomyces anomalus*; S.sal: *Sporidiobolus salmonicolor*; M.bic: *Metschnikowia bicuspidata*.

7.4 Temperaturas óptimas de crecimiento de todas levaduras con las que se trabajó

Espece	Rango	Temperatura óptima
<i>C. sake</i>	4-22	22
<i>C. gastricus</i>	4-22	22
<i>C. gilvescens</i>	4-22	22
<i>C. victoriae</i>	4-15	22
<i>Cryptococcus.sp</i>	4-22	15
<i>D.fristingensis</i>	4-22	22
<i>G.antarctica</i>	4-15	10
<i>H.watticus</i>	4-37	30
<i>L.creatinivora</i>	4-22	22
<i>L.fragaria</i>	4-22	22
<i>Leuconeurospora sp1</i>	4-22	15
<i>Leuconeurospora sp2</i>	4-22	15
<i>M. blollopis</i>	4-22	15
<i>M.psychrophila</i>	4-15	10
<i>Metschnikowia sp</i>	4-22	10
<i>Mrakia sp</i>	4-15	15
<i>R. glacialis1</i>	4-15	15
<i>R.glacialis2</i>	4-22	10
<i>R.laryngis</i>	4-30	30
<i>S.salmonicolor</i>	4-30	22
<i>W.anomalus</i>	4-37	30