

IDENTIFICACIÓN MOLECULAR Y MÉTODOS DE CONSERVACIÓN DE
LEVADURAS Y HONGOS FILAMENTOSOS DE MUESTRAS PROVENIENTES
DE ANTÁRTIDA.

Tesis de grado de Licenciatura en Ciencias Biológicas.

Amalia González Pombo.

Directoras de Tesis: Dra. Silvana Alborés y Dra. Gabriela Garmendia.

Cátedra de Microbiología, Departamento de Biociencias, Facultad de Química.

Universidad de la República.

2014

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer a mis tutoras, Dra. Silvana Alborés y Dra. Gabriela Garmendía, por darme la oportunidad de realizar mi pasantía en su laboratorio, por todo lo que me enseñaron y sobre todo por la paciencia y buena disposición que tuvieron cada día.

Agradezco a la Dra. Ana Acevedo por su lectura exhaustiva de este trabajo, por las correcciones y sugerencias, que me sirvieron y me aportaron mucho.

También quiero agradecer a mis compañeras de laboratorio, Adalgisa, Luciana, Gabriela, Mariana y Eloisa por hacer el mejor ambiente de trabajo que he tenido.

A mi familia, mis padres y mi hermano por el apoyo de todos estos años y la fe que me tuvieron siempre en el emprendimiento de la carrera.

A Gabriel, mi amor y compañero de vida, por apoyarme, acompañarme, y saber darme su visión de las cosas, aunque diferente a la mía, pero que me complementa, sin duda.

A mis amigas de siempre, Ceci, Flo, Lei, Carla, Sofi y Lourdes, porque me acompañaron en todo el proceso de la carrera, y celebraron conmigo cada paso.

Y a Dios, porque es quien le da sentido a todas las cosas, es a quien le debo todo, y sin Él no soy nada.

ÍNDICE

1.	Introducción.....	1
1.1	Generalidades de levaduras y hongos filamentosos.	2
1.2	Adaptación al ambiente y aplicaciones biotecnológicas de levaduras y hongos filamentosos de Antártida.	2
1.3	Identificación molecular de levaduras y hongos filamentosos.....	5
1.3.1	Identificación molecular mediante amplificación y secuenciación.	8
1.4	Métodos de conservación de levaduras y hongos filamentosos.....	11
2.	Objetivos	15
2.1	Objetivos generales.....	16
2.2	Objetivos específicos.....	16
3.	Materiales y Métodos.....	17
3.1	Cepas.....	18
3.2	Identificación de hongos filamentosos.....	20
3.2.1	Extracción de ADN de hongos filamentosos.	20
3.2.2	Amplificación de la región ITS1-5.8SrADN-ITS2	21
3.2.3	Identificación mediante secuenciación de la región ITS1-5.8SrADN-ITS2... ..	21
3.3	Identificación de levaduras.	22
3.3.1	Extracción de ADN de levaduras.	22
3.3.2	Amplificación de la región ITS1-5.8SrADN-ITS2.	22
3.3.3	Amplificación de la región D1/D2.	23
3.3.4	Identificación mediante secuenciación de las región ITS1-5.8SrADN-ITS2 y D1/D2.....	23
3.3.5	Construcción de árbol filogenético de similitud.	24
3.4	Métodos de conservación de hongos filamentosos.	24
3.4.1	Tubos de PDA con tapa rosca.....	24
3.4.2	Tubos de PDA con vaselina.	25
3.4.3	Agua estéril.	25
3.4.4	Papel de filtro.	26
3.5	Método de conservación de levaduras.	27

3.5.1 Criotubos de cerebro-corazón con glicerol.	27
4. Resultados	28
4.1 Identificación molecular de hongos filamentosos.	29
4.2 Identificación molecular de levaduras.	31
4.3 Formas de conservación de hongos filamentosos.....	34
4.3.1 Tubo de PDA con tapa rosca a temperatura ambiente.....	34
4.3.2 Tubos de PDA inclinado cubiertos con vaselina.....	34
4.3.3 Agua estéril.	35
4.3.4 Papel de filtro.	35
4.4 Forma de conservación de levaduras.....	36
4.4.1 Caldo glicerol-cerebro-corazón.	36
5. Discusión.....	38
5.1 Identificación molecular.	39
5.2 Formas de conservación de hongos filamentosos.	41
5.3 Forma de conservación de levaduras.	43
5.4 Conclusiones y perspectivas.	43
6. Bibliografía.....	44
Bibliografía.....	45
Anexo	49
Medios de cultivo y buffers.	50
Abreviaturas.....	52

1. Introducción

1.1 Generalidades de levaduras y hongos filamentosos.

Los hongos son partes ubicuas de comunidades y ecosistemas microbianos globales. Ellos ocupan diversos nichos y proveen importantes servicios al ecosistema, tales como descomposición de la materia orgánica, mineralización e inmovilización de nutrientes. En general, los hongos son miembros de simbiosis mutualistas y mediadores de la producción primaria (Cantrell *et al.* 2011).

Por otra parte, las levaduras y los hongos filamentosos tienen una amplia aplicación en la biotecnología tradicional y moderna. Desde la antigüedad se han reconocido como protagonistas en la producción de alimentos y bebidas por fermentación y actualmente son utilizados como fuentes de obtención de vitaminas del complejo B, pigmentos, cofactores, proteínas de organismos unicelulares, biomasa y otros productos con valor añadido. En las últimas décadas se han venido utilizando como hospederos para la obtención de proteínas heterólogas de organismos eucariotas por vías de la ingeniería genética (Orberá Ratón 2004).

1.2 Adaptación al ambiente y aplicaciones biotecnológicas de levaduras y hongos filamentosos de Antártida.

Si bien las aplicaciones en el campo de la biotecnología que se le atribuyen a microorganismos ya descritos son variadas, aún quedan muchos hábitats naturales por explorar en busca de nuevas especies, de forma tal que puedan diseñarse tecnologías novedosas protagonizadas por estos microorganismos (Orberá Ratón 2004).

Los ambientes permanentemente fríos están ampliamente distribuidos en la Tierra e incluyen las regiones polares, las montañas y las profundidades marinas. Las condiciones dominantes en Antártida de baja temperatura, fuertes vientos, baja disponibilidad de agua y alta radiación ultravioleta, juntas comprenden factores limitantes para la vida de plantas y animales. A pesar de presentar condiciones adversas para la vida, estos ambientes han sido exitosamente colonizados por los tres dominios de la vida principalmente por microorganismos con un alto nivel de adaptación a estas condiciones extremas (Friedmann 1993; Carrasco *et al.* 2012). Se han cultivado hongos de un amplio rango de hábitats Antárticos, incluyendo suelo, musgo, y lagos congelados permanentemente (Slemmons *et al.* 2013).

El aislamiento geográfico junto al estrés ambiental hacen de Antártida el primer lugar donde buscar organismos endémicos con el fin de explicar los procesos evolutivos que generan especiación microbiana (Ruisi *et al.* 2007).

El advenimiento de herramientas moleculares ha dado una nueva visión sobre la diversidad del mundo microbiológico, particularmente para especies que no se han podido cultivar en el laboratorio. Las comunidades microbianas en diferentes ecosistemas muestran alta diversidad y redundancia funcional, lo cual favorece la formación de consorcios que comprenden muchos microorganismos compartiendo nichos en ecosistemas naturales. La redundancia en la función permite a los ecosistemas ser resistentes y recuperarse de alteraciones naturales y antropogénicas. En particular estudios basados en secuencias moleculares demostraron una extensa diversidad de hongos en los suelos antárticos (Cantrell *et al.* 2011).

Los microorganismos adaptados al frío pueden crecer a 0°C y se clasifican en psicrófilos si sus temperaturas óptima y máxima de crecimiento son $\leq 15^{\circ}\text{C}$ y $\leq 20^{\circ}\text{C}$, respectivamente, o psicrotolerantes (psicrótrofos) si su temperatura máxima de crecimiento está por encima de los 20°C (Carrasco *et al.* 2012).

En gran parte por su potencial en aplicaciones biotecnológicas, los microorganismos adaptados al frío han sido cada vez más estudiados en los últimos años, y aún permanecen pobremente comprendidos. La mayoría de los aislamientos en los estudios de ambientes fríos corresponden a bacterias, mientras que las levaduras constituyen una baja proporción (Carrasco *et al.* 2012).

Hay varias razones para el continuo interés en hongos tolerantes a bajas temperaturas. Una es la importancia de estos organismos como agentes de deterioro en alimentos refrigerados y congelados, y la segunda es su valor comercial potencial como fuentes de enzimas activas en frío. Los mecanismos fisiológicos y ecológicos en hongos tolerantes al frío que permiten su crecimiento a baja temperatura, no han sido aun totalmente comprendidos (Robinson 2001). No hay un único mecanismo que conduce a la tolerancia a bajas temperaturas en los hongos. Todos los componentes celulares de un psicrófilo o psicrótrofo deben ser funcionales para el hongo a bajas temperaturas, y la adaptación al frío debe ser un

fenómeno celular global (Robinson 2001).

Durante los últimos 20-30 años, el interés en la microflora glacial ha aumentado debido a la investigación de nuevos compuestos bioactivos, especialmente antibióticos y enzimas activas a bajas temperaturas (Nedialkova & Naidenova 2005). Tales microorganismos han adaptado sus procesos celulares vitales para prosperar en ambientes fríos. Ellos hacen contribuciones esenciales para el reciclado de nutrientes y la mineralización de materia orgánica mediante una clase especial de enzimas extracelulares, conocidas como enzimas “adaptadas al frío” o “activas en frío”. Dado que estas enzimas tienen una mayor eficiencia catalítica a temperaturas por debajo de los 20°C que sus contrapartes mesófilas y muestran una inusual especificidad de sustrato, son candidatas atractivas para procesos industriales que requieren una alta actividad enzimática a bajas temperaturas. Las enzimas adaptadas al frío incluyen amilasas, celulasas, invertasas, inulinasas, proteasas, lipasas e isomerasas, las cuales se utilizan en la industria de alimentos, de biodiesel y de detergentes (Carrasco *et al.* 2012).

Por otra parte, algunas cepas de *Penicillium* spp. aisladas de sedimentos de estanques de Antártida, producen metabolitos con actividad antibacteriana similar a la actividad de los antibióticos β -lactámicos (Montemartini Corte *et al.* 2000). En este sentido, es importante continuar con la búsqueda de nuevos compuestos bioactivos, dado que el número de microorganismos resistentes a los antibióticos existentes crece cada año. Es necesario seguir investigando con el fin de encontrar nuevos antibióticos en ambientes naturales inexplorados, tales como el continente Antártico.

Otra potencial aplicación de microorganismos provenientes de Antártida puede ser su uso como biocontroladores de enfermedades de post-cosecha, representando una alternativa efectiva a la aplicación de fungicidas químicos (Kurtzman & Droby 2001). Un número de antagonistas microbianos han sido patentados y evaluados para uso comercial en tratamiento de post-cosecha (Nunes *et al.* 2008). El uso de levaduras como agentes de biocontrol de patógenos en manzana de post-cosecha, ha sido sujeto de una gran cantidad de investigaciones. Dado que las manzanas cosechadas se almacenan en frío durante períodos de tiempo que varían, un

atributo importante en la selección de levaduras como agentes de biocontrol de enfermedades en manzanas de post-cosecha, es la habilidad de ser efectivas a bajas temperaturas. En este sentido, el uso de levaduras psicrótrofas puede ser una clara ventaja (Vero *et al.* 2013).

Todas estas propiedades y aplicaciones características de estos microorganismos presentes en estos ambientes extremos justifican el aislamiento, identificación y conservación de los mismos.

1.3 Identificación molecular de levaduras y hongos filamentosos.

La identificación molecular de levaduras, posee valor práctico para el desarrollo de métodos y herramientas para la identificación rápida y precisa en muestras heterogéneas procedentes de la industria, de origen clínico y ambiental (Orberá Ratón 2004).

En particular en la industria alimenticia, dado que las levaduras son esenciales en la producción de alimentos fermentados (vino, cerveza, sidra, productos de panadería, quesos y carnes congeladas) se requiere frecuentemente la identificación de cepas individuales para mejorar la calidad de estos alimentos. Las prácticas modernas de fermentación de alimentos han incluido el uso de levaduras seleccionadas en la forma de levaduras secas activas. En este sentido, la disponibilidad de técnicas de tipificación que permiten la diferenciación a nivel de cepa es muy interesante para ambos, usuarios y productores de levaduras, para asegurar que la levadura seca comercializada sea idéntica a la cepa seleccionada originalmente (López *et al.* 2001).

Por otro lado, en los laboratorios de control de calidad de alimentos se está haciendo necesaria la identificación de levaduras y hongos filamentosos que causan deterioro, tanto para la detección del origen de la contaminación, como para la solución de litigios relacionados con la propiedad industrial (Orberá Ratón 2004).

En los últimos años, los datos obtenidos del estudio del genoma, han generado cambios importantes en la taxonomía de géneros y especies y han contribuido al esclarecimiento de las relaciones filogenéticas entre los grupos taxonómicos de estos microorganismos (Orberá Ratón 2004).

La taxonomía de levaduras y hongos filamentosos ha transitado por dos períodos, el primero caracterizado por un fuerte estudio de la morfología comparativa, la fisiología y la genética convencional y una segunda etapa, que se extiende hasta la actualidad, identificada por una ampliación en los estudios de morfología al nivel ultramicroscópico, la aplicación de criterios bioquímicos y la introducción de los estudios de la Biología Molecular. Entre los principales aportes de la segunda etapa se destacan la diferenciación por microscopía electrónica de transmisión de las fases levaduriformes de los ascomicetes y basidiomicetes y la aplicación de los perfiles de ácidos nucleicos para la identificación de géneros, especies y cepas, mediante las técnicas de secuenciación de ADN/ARN, cariotipado y el estudio de los patrones de restricción de los ARNs (Orberá Ratón 2004).

La taxonomía de hongos se apoya en técnicas convencionales, basadas en la descripción morfológica y fisiológica de especies y géneros, pero éstas dependen de las condiciones de cultivo de las cepas, por lo que han introducido errores en la ubicación taxonómica y han dado origen al fenómeno de la dualidad de la nomenclatura que no es más que una misma especie sea nombrada de una forma en el estado vegetativo (anamorfo) y de otra en el estado sexual (teleomorfo). Estas dificultades se han solucionado con la aplicación de las técnicas moleculares, basadas en el análisis de fragmentos de las moléculas de ácidos nucleicos (Orberá Ratón 2004).

La taxonomía de hongos puede ser desafiante por la plasticidad morfológica y fisiológica intraespecíficas, así como por un número limitado de marcadores morfológicos. Además, el proceso de identificación basado en rasgos morfológicos y fisiológicos, puede consumir mucho tiempo. La secuenciación de los genes ribosomales (ADNr) y de sus espacios transcriptos internos, ITS (Internal Transcribed Spacer) u otras regiones variables dentro de genes conservados (por ejemplo: gen de actina) es frecuentemente necesaria para la identificación taxonómica precisa (Slemmons *et al.* 2013).

Resultados previos han demostrado que las regiones complejas ITS (no codificantes y variables) son útiles para medir relaciones genealógicas cercanas de hongos, dado que exhiben grandes diferencias interespecíficas (Esteve-Zarzoso *et al.* 1999).

En hongos, el ADN que codifica para el ARN ribosomal está organizado en unidades

que se repiten cientos de veces a lo largo del genoma. Cada unidad está formada por tres genes, uno que codifica para la subunidad 18S, uno que codifica para la subunidad 5.8S y otro que codifica para la subunidad 26S. Estos genes están intercalados por secuencias no codificantes, denominadas ITS 1 e ITS 2. A su vez, cada unidad está separada de la otra por una región denominada IGS (Inter Genic Spacer), intercalada por el gen 5S. En la Figura 1 se puede observar un esquema de esta zona. Estas regiones son lo suficientemente variables para ser utilizadas como una región blanco específica de especie (Slemmons *et al.* 2013).

Dado que las regiones ribosomales evolucionan de una manera concertada, muestran un bajo polimorfismo intraespecífico, y una gran variabilidad interespecífica, se ha probado que son muy útiles para la clasificación de especies de géneros como *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* y recientemente para la identificación de una pequeña colección de levaduras del vino (Esteve-Zarzoso *et al.* 1999).

A su vez, el dominio D1/D2 del ARNr 26S es una región altamente variable, con diferencias entre especies de hasta una única base. Esta región ha permitido separar todas las especies de ascomicetes de fase levaduriforme existentes, incluso las altamente relacionadas (Orberá Ratón 2004).

La secuencia de la subunidad mayor 26S ADNr, especialmente la región D1/D2, ha sido aplicada al estudio de la filogenia de diferentes grupos de levaduras como una importante herramienta en la identificación de levaduras (Baleiras Couto *et al.* 2005).

En el caso de levaduras está establecido que diferencias mayores al 1% en la región D1/D2 determinan que dos cepas pertenecen a especies diferentes (Valverde 2003). No existen datos similares para hongos filamentosos. En general, para asegurar la identificación se analiza más de un gen y se espera que los resultados sean concordantes, o se utiliza una identificación polifásica. La taxonomía polifásica, término acuñado por Colwell (1970), es la herramienta comúnmente utilizada en la delimitación de los taxones a todos los niveles, siendo su característica distintiva la utilización de diversas técnicas, tanto moleculares como fenotípicas, que permiten llevar a cabo dicha delimitación (Valverde 2003). Dentro de los criterios genéticos, la taxonomía polifásica incluye, en particular, la secuenciación de la subunidad

pequeña del ARN ribosómico y la hibridación genómica (Madigan *et al.* 2003).

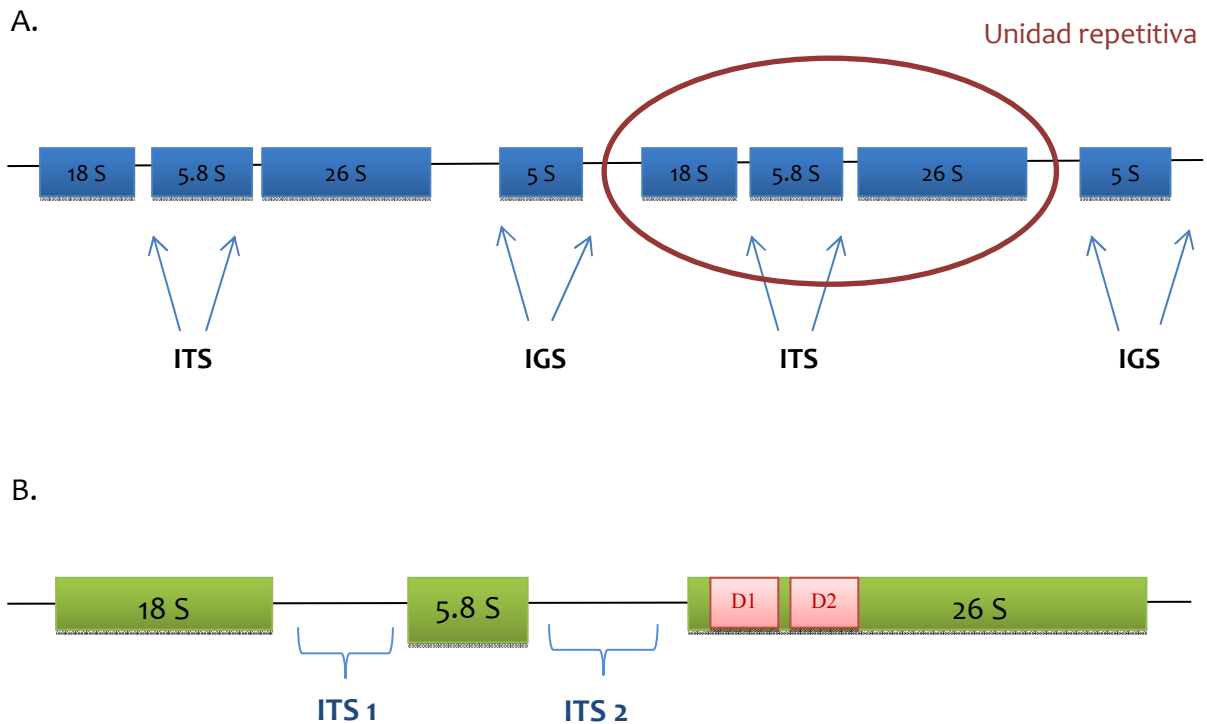


Figura 1: A- Región de ADN que codifica para el ARN ribosomal. B- Detalle de una unidad repetitiva.

1.3.1 Identificación molecular mediante amplificación y secuenciación.

Una metodología de identificación molecular consiste en la extracción de ADN, amplificación por PCR de la región de interés y secuenciación de los productos de amplificación.

Extracción de ADN.

La extracción de ADN consta básicamente de tres etapas. La primera etapa de lisis celular, la segunda de purificación y la tercera de recuperación. La lisis celular en hongos implica la ruptura de la pared celular y de la membrana plasmática (Sambrook & Russell 2001).

La estructura de la pared fúngica es altamente compleja comparada con la

membrana celular de los mamíferos y la pared bacteriana. Consiste de gruesas capas de quitina (1-3)- β -D-glucano, (1-6)- β -glucano, lípidos y proteínas. Una dura capa superficial de melanina puede estar presente, que es altamente resistente a la luz UV, a la digestión enzimática y a la descomposición química. Estas características físicas de la pared fúngica, han impedido el desarrollo de un método único y universal de extracción de ADN para hongos (Karakousis *et al.* 2006).

En general para la ruptura de pared se emplean métodos físicos o enzimáticos y métodos químicos para la ruptura de membrana.

Se han descrito diferencias significativas en el grado de lisis entre especies, dependiendo del método de ruptura de pared celular utilizado. La lisis completa en todas las especies sólo se alcanzó utilizando congelamiento con nitrógeno líquido y molienda con mortero (Karakousis *et al.* 2006).

En la etapa de purificación se realizan uno o dos lavados con solventes orgánicos (fenol, cloroformo) para separar proteínas, como las nucleasas.

Finalmente, la recuperación del ADN se logra mediante precipitación en condiciones adecuadas. El agregado de sales neutraliza la carga negativa del ADN favoreciendo su precipitación, y volviéndolo insoluble en etanol o isopropanol.

Varios factores además de la recuperación de ADN deben ser considerados al seleccionar un método de extracción de ADN, por ejemplo: el costo por muestra, el tiempo de procesamiento, el volumen de muestra, reactivos adicionales y el equipamiento necesario (Fredricks *et al.* 2005).

Amplificación de ADN mediante PCR.

La Reacción en Cadena de la Polimerasa, PCR (Polymerase Chain Reaction) es un método de síntesis enzimático que se utiliza para amplificar fragmentos específicos de ADN *in vitro*. Utiliza un ADN molde, dos cebadores oligonucleótidos (primers), desoxinucleótidos y una enzima termoestable con actividad polimerasa. La reacción transcurre a través de una serie de ciclos repetitivos que consisten en tres pasos:

1. Desnaturalización del ADN molde.
2. Hibridación de las cadenas simples de ADN con los primers.
3. Polimerización o elongación del complejo ADN-iniciador realizado por la polimerasa termoestable.

En la Figura 2 se puede ver un esquema que facilita la comprensión del método.

La PCR es una herramienta altamente sensible que ha permitido a los investigadores detectar e identificar especies fúngicas en muestras clínicas, en alimentos así como en aire, agua y suelo (Karakousis *et al.* 2006).

La sensibilidad final de cualquier ensayo de PCR para la detección de hongos depende de la lisis eficiente de las células fúngicas en la muestra y de la purificación del ADN que esté libre de inhibidores de la PCR.

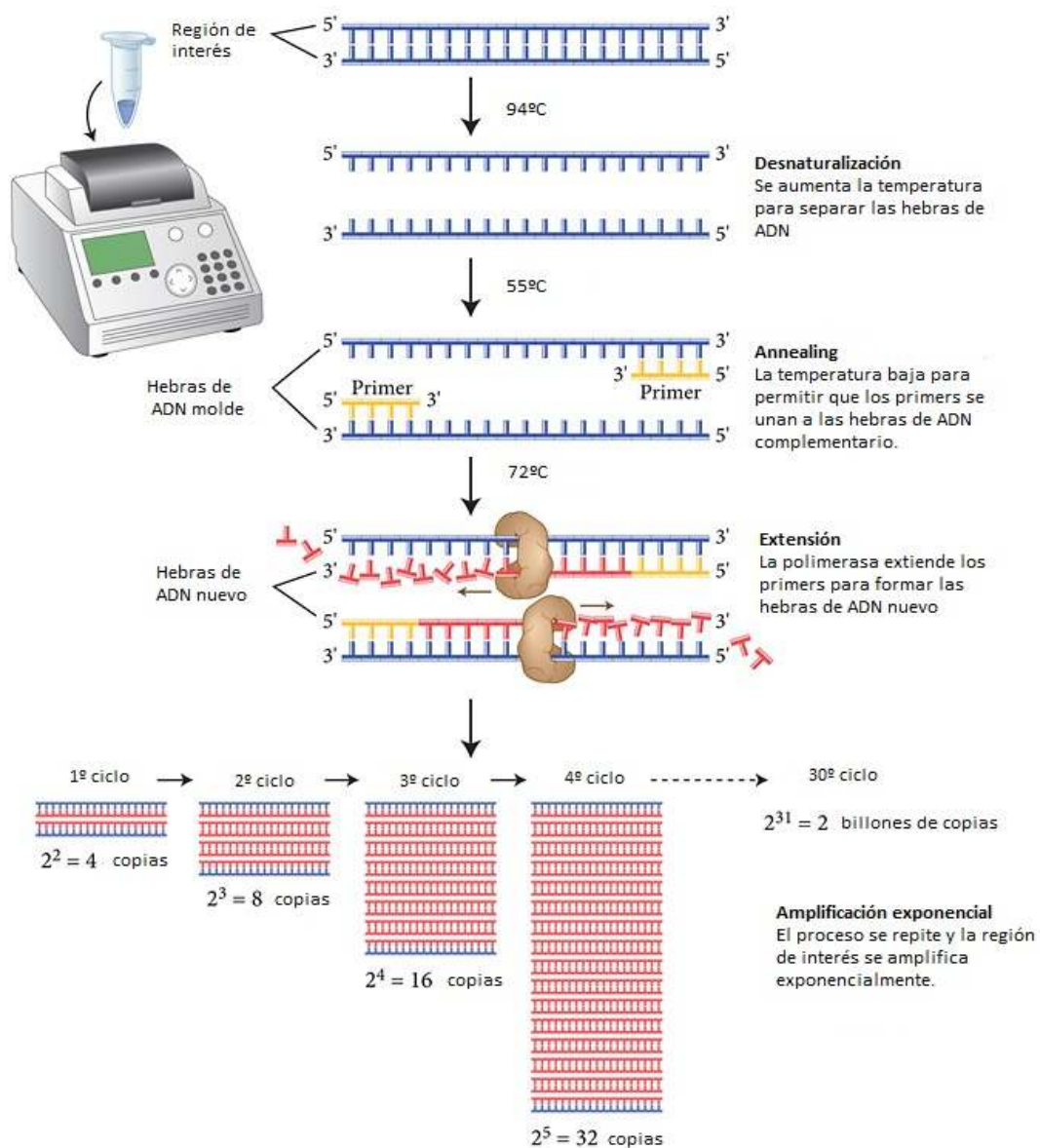


Figura 2: Diagrama de los diferentes pasos de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Modificado de New England BioLabs Inc.

1.4 Métodos de conservación de levaduras y hongos filamentosos.

Con el objetivo de obtener productos fúngicos de alta calidad, se hace necesario el mantenimiento y conservación de cultivos fúngicos, lo cual tiene primordial importancia para garantizar las características originales de las cepas de producción, manteniendo sus características genéticas y fenotípicas (Gato Cárdenas 2010).

El daño fisiológico o genético a cepas económicamente importantes, inducido por condiciones de estrés que ocurren durante la preservación y el almacenamiento, podrían potencialmente resultar en una considerable pérdida de ingresos para la industria biotecnológica, o de inversión en un programa de investigación (Ryan *et al.* 2000).

Mantener y conservar en buenas condiciones una colección de hongos es una tarea que demanda constante atención y vigilancia. Se debe conocer no sólo lo que concierne a las características morfológicas, crecimiento, propiedades bioquímicas y fisiológicas de los hongos, sino también los requerimientos en cuanto a los métodos de preservación más favorables para su conservación y mantenimiento posterior. Esto es sumamente importante, ya que los objetivos primordiales que persigue la conservación de cepas de hongos son: pureza, viabilidad y estabilidad morfológica y genética (Panizo *et al.* 2005).

El desarrollo de la biotecnología de hongos ha coincidido con la necesidad de proveer protocolos de preservación y almacenamiento confiables y seguros, para levaduras y hongos filamentosos (Ryan *et al.* 2000).

Algunos estudios han demostrado que el almacenamiento de hongos *in vitro* por largos períodos de tiempo, puede inducir cambios morfológicos, alteraciones en los componentes de la pared celular y pérdida o atenuación de la virulencia. La preservación de hongos patógenos para el hombre y animales, es importante en investigación y en biotecnología. Así, la determinación del método de preservación correcto para cada especie fúngica y el monitoreo periódico para chequear la morfología, patogenicidad y estabilidad genética, se ha vuelto un requerimiento (De Lima & De Moraes Borba 2001).

La conservación de los hongos filamentosos varía en dependencia del tipo y el grado de esporulación (Gato Cárdenas 2010).

Se han evaluado numerosos métodos para el almacenamiento de cultivos fúngicos, y se ha encontrado que varios son adecuados para almacenamiento de alta calidad de determinadas cepas fúngicas, pero ningún método es de utilización general. Los métodos más comúnmente utilizados, incluyen almacenamiento en agua destilada estéril, suero fisiológico, grano o suelo, a temperatura ambiente, almacenamiento bajo aceite mineral o parafina, congelación a -20°C ó -80°C , liofilización, criopreservación en nitrógeno líquido con o sin vehículos en partículas sólidas o el secado controlado de organismos puros como lentículas (Borman *et al.* 2006).

Cada uno es escogido tomando en cuenta el tipo de hongo que se quiere preservar, la cantidad de cepas que se quieren mantener, con qué finalidad serán utilizadas y cuáles son los recursos, tanto humanos como materiales, que dispone el laboratorio para dedicarse a esta tarea (Panizo *et al.* 2005).

Los métodos de conservación se pueden clasificar en métodos a largo o corto plazo.

Métodos de conservación a largo plazo. Con estos métodos se garantiza al máximo la estabilidad genética por evitarse la aparición de generaciones sucesivas. Los métodos que pertenecen a este grupo son congelación y liofilización (Gato Cárdenas 2010).

Congelación (criopreservación): Consiste en el almacenamiento de células a muy bajas temperaturas. En estas condiciones el agua, mayor componente de las células vivientes, pasa de fase líquida a sólida. Las temperaturas utilizadas pueden ser de -20°C a -70°C , y temperatura de nitrógeno líquido (-196°C). La temperatura de almacenamiento seleccionada depende de las facilidades disponibles pero las temperaturas más bajas favorecen la viabilidad y la estabilidad genética por períodos de tiempo prolongados, incluso un autor ha descrito períodos de tiempo superiores a treinta años (Gato Cárdenas 2010).

Liofilización: La liofilización consiste en la eliminación del agua de una sustancia congelada por sublimación del hielo bajo vacío.

Este procedimiento es un método de elección para muchos hongos que forman gran número de esporas de diámetro menor a $10\mu\text{m}$. Las esporas de mayor tamaño tienden a colapsar durante el proceso de liofilización, y el daño estructural causado

no es reversible por hidratación. Un número significativo de esporas de tamaño adecuado también son dañadas físicamente, y mueren durante la etapa inicial de congelación por la formación de cristales de hielo (Gato Cárdenas 2010).

Estudios recientes sobre las técnicas de preservación a largo plazo han evidenciado que estas técnicas no cubren algunos efectos preocupantes sobre la estabilidad genética y las características fenotípicas de algunas de las cepas fúngicas estudiadas (Gato Cárdenas 2010).

Métodos de conservación a corto plazo.

Subcultivo: Es el método tradicional para la preservación de los microorganismos pero tiene algunas desventajas, el riesgo de contaminación y de cambios genéticos que se incrementa a mayor número de transferencias, el peligro de pérdida del cultivo, sobre todo cuando se trabaja con microorganismos delicados y no se realizan transferencias periódicas a medios frescos. Además, cuando hay muchos microorganismos el trabajo es muy intenso y se requiere un espacio grande para el almacenamiento.

Conservación por suspensión en agua destilada estéril: Es un método muy utilizado y que da altos porcentajes de viabilidad en los hongos filamentosos, en períodos a veces superiores a cinco años (Gato Cárdenas 2010).

El agua suprime cambios morfológicos en muchos hongos. Es un método simple, económico y seguro, capaz de garantizar la supervivencia de los cultivos fúngicos por períodos prolongados, y evita el pleomorfismo y la contaminación con ácaros.

La estabilidad para caracteres morfológicos y fisiológicos es buena, pero no se ha comprobado para caracteres específicos como la virulencia y el poder fermentativo (Gato Cárdenas 2010).

Conservación en capa de aceite mineral: Este método consiste en cubrir el cultivo bien desarrollado sobre medio nutritivo líquido o agarizado con el aceite mineral no tóxico y estéril, como la parafina o vaselina; también se usa petrolato líquido. Se ha demostrado que los cultivos pueden mantenerse por varios años, o en casos excepcionales por más de treinta y dos, entre 15 y 20°C (Nakasone *et al.* 2004). Este método está especialmente recomendado para conservar micelio u hongos no esporulados, donde la congelación puede ser adversa para ellos. Es un método fácil de realizar y no requiere de equipos caros. Su mayor desventaja es que el hongo

puede continuar su crecimiento, al menos durante los primeros períodos, y así ocurrir que sobrevivan mutantes capaces de crecer bajo las condiciones adversas que implica la conservación (Gato Cárdenas 2010).

Además de los anteriores, se han desarrollado métodos prácticos, efectivos e ingeniosos para preservar hongos sobre varios sustratos orgánicos como astillas de madera, granos de cereal, paja, papel de filtro y tejidos de insectos y plantas (Gato Cárdenas 2010).

Varios factores, tales como el económico, deben ser considerados cuando se deben preservar hongos. El subcultivo continuo, almacenamiento bajo aceite o en agua, en suelo o en sílica gel, son rentables pero su conveniencia como protocolos para almacenamiento a largo plazo es dudosa y no se puede garantizar la estabilidad de las características. Liofilización y criopreservación en nitrógeno líquido son los métodos de los cuales disponen en todas las colecciones nacionales de cultivos y muchas colecciones industriales y universitarias también cuentan con las facilidades apropiadas para disponer de ellos. Sin embargo, la adquisición de liofilizadores requiere un desembolso inicial importante y los métodos son laboriosos. La criopreservación demanda un suministro constante de nitrógeno líquido.

Ningún método de preservación puede ser universalmente aplicado a todos los hongos y la variabilidad intraespecífica hace imposible la aplicación de protocolos estándar, aún al nivel de especie. Es por ello que no debe asumirse que un método de preservación garantizará la estabilidad fisiológica y genética de un aislamiento. Una estrategia es el uso de más de una técnica de conservación para reducir la chance de deterioro y muerte de las cepas (Ryan *et al.* 2000).

2.Objetivos

2.1 Objetivos generales.

- Identificar levaduras y hongos filamentosos aislados de muestras de Antártida.
- Evaluar distintos métodos de conservación para las cepas obtenidas.

2.2 Objetivos específicos.

- Identificar a nivel de especie las cepas de levaduras aisladas de muestras de agua y suelo mediante métodos moleculares, a través de estudios de secuencia de las regiones ITS y D1/D2.
- Identificar las cepas de hongos filamentosos aislados, mediante estudios de la región ITS y complementar dicha identificación molecular con observación macro y microscópica de las colonias fúngicas.
- Evaluar la conservación de levaduras por el método de congelación.
- Evaluar la conservación de los hongos filamentosos a través de los siguientes métodos: tubo de PDA inclinado, tubo de PDA inclinado cubierto con vaselina, suspensión de esporas en agua estéril y papel de filtro.

3. Materiales y Métodos

3.1 Cepas.

Se trabajó con 44 aislamientos obtenidos de muestras (cedidas por la Dra. Silvana Vero) de suelo y agua (continental y oceánica), provenientes de Antártida, tomadas entre el 19 y el 23 de enero de 2012, de diversos puntos de la isla Rey Jorge (Figuras 3 y 4, y Tabla 1).

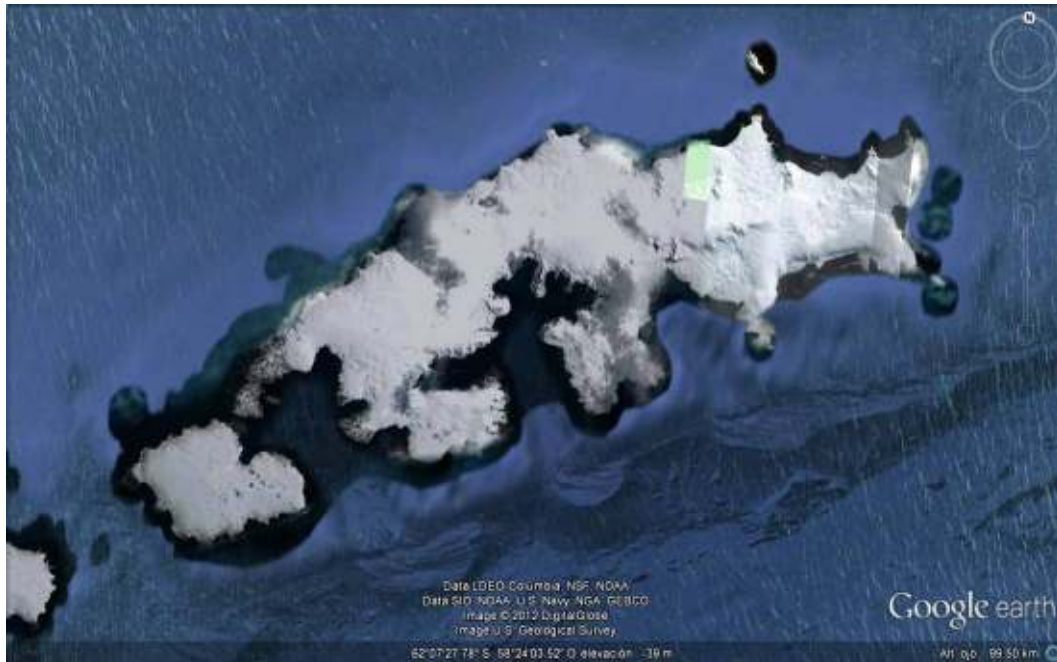


Figura 3: Foto satelital de la isla Rey Jorge.

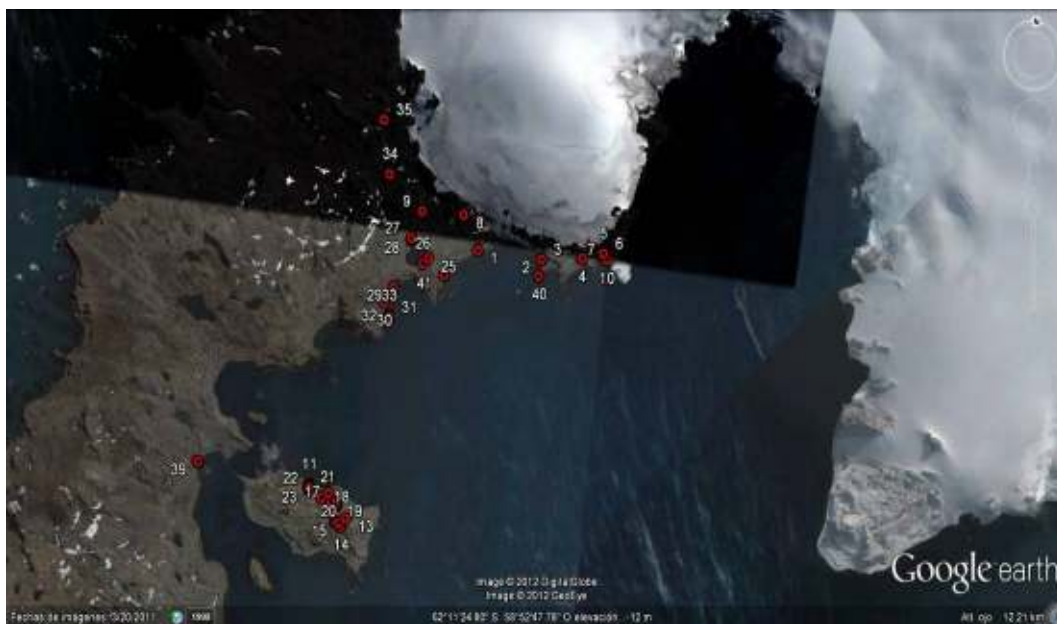


Figura 4: Foto satelital de las zonas de la Isla Rey Jorge donde se tomaron las muestras.

Tabla 1: Detalle del muestreo realizado en la isla Rey Jorge y aislamientos obtenidos de levaduras y hongos filamentosos.

Lugar	Muestra	Descripción	Temp.(°C)*	Cepas**
Glaciar Collins y Bahía Maxwell	2	Lago deshielo del Collins estancado, con sedimento verde-rojizo.	12,1	FA2
	4	Clavel antártico.	4,1	4E; 4BE; 4CE
	5	Sedimento negro al final de cañada de deshielo.	7	5E
	7	Líquén sobre roca.	3,5	7AE; 7BE
	8	Matas beige-marrón al pie del glaciar Collins.	7,6	8E
	9	Lago del ionosférico.	3,7	FA9
	10	Clavel antártico.	3,5	10E
	12	Materia fecal (blanca) de pingüino y algo de musgo.	12,6	FA12; 12D; 12R
	13	Algas semi húmedas.	7,5	13R
	14	Agua cañadita y algas.	7,5	14BE; 14E
Isla Ardley	15	Restos de pingüino muerto.	7,5	15E
	17	Sedimento debajo de algas terrestres.	7,7	17E
	19	Materia fecal de pingüino.	7	19DA; 19DB; 19R
	20	Agua de la bahía Maxwell junto a la costa de la Isla Ardley.	8	20E
	21	Musgo.	7,8	21R
	22	Clavel antártico.	7,8	22AE; 22BE
	24	Suelo húmedo.	9,2	24E
	27	Líquén naranja, postrado, duro.	7,7	FA27
	29	Agua de bahía Maxwell.	3,1	29AE; 29BE
	30	Cañada de deshielo con muchas algas, matas bordeau y verde.	7,5	FA30
Lago Uruguay y Caleta Norma	32	Algas de agua de pequeña bahía en Caleta Norma.	5,2	32R
	33	Agua estancada entre rocas, con algas, espuma en superficie.	11,1	33AE; 33BE
	34	Muestra de sedimento, superficie rojiza.	8,1	34E
	35	Agua lago camino al Drake.	5,5	35E
	36	Materia fecal de ave sobre musgo.	2,9	36E
	37	Agua del mar de Drake.	3,1	37BE; 37E; FA37
	38	Agua del mar de Drake.	3	FA38
	39	Agua de la bahía Maxwell frente a la base China.	2,3	39E; FA39
	41	Suelo junto a bahía Maxwell a 50 mt de la base.	6,1	41E
	43	Agua bahía Maxwell a 100 mts de la base.	4,5	FA43
Mar de Drake y Base China	34	Muestra de sedimento, superficie rojiza.	8,1	34E
	35	Agua lago camino al Drake.	5,5	35E
	36	Materia fecal de ave sobre musgo.	2,9	36E
	37	Agua del mar de Drake.	3,1	37BE; 37E; FA37
	38	Agua del mar de Drake.	3	FA38
	39	Agua de la bahía Maxwell frente a la base China.	2,3	39E; FA39
	41	Suelo junto a bahía Maxwell a 50 mt de la base.	6,1	41E
	43	Agua bahía Maxwell a 100 mts de la base.	4,5	FA43

* La columna Temp (°C) indica la temperatura de las muestras en el momento de la toma.

** Las cepas denominadas con FA corresponden a hongos filamentosos. Todas las demás corresponden a levaduras. Dentro de este grupo, las denominadas con E se aislaron a partir de medio YNB + glucosa; las denominadas con D se aislaron en medio Dicloran Rosa Bengala Agar; y las denominadas con R se aislaron en medio R2A.

Treinta y cinco aislamientos correspondieron a levaduras, mientras que nueve correspondieron a hongos filamentosos.

Veintisiete cepas de levaduras fueron aisladas a partir de un enriquecimiento en medio YNB (Yeast Nitrogen Base) suplementado con 0,5% de glucosa, mientras que las demás cepas fueron obtenidas directamente por aislamiento en medio R2A (Reasoner's 2A Agar) o DRBA (Dichloran Rose Bengal Agar). En el caso de las cepas de hongos filamentosos se realizaron cultivos monospóricos, la mayoría se obtuvo por aislamiento directo en PDA (Potato Dextrose Agar), y en algunos casos se obtuvieron a partir de enriquecimientos en medio YNB con glucosa. Todos los cultivos fueron realizados a temperatura ambiente durante 4-7 días.

Actualmente todas las cepas están almacenadas en tubos de PDA inclinado con tapa rosca a 4°C.

3.2 Identificación de hongos filamentosos.

3.2.1 Extracción de ADN de hongos filamentosos.

Las cepas fueron cultivadas en 5 mL de medio YES (Yeast Extract Sucrose) compuesto por 2% de extracto de levadura y 15% de sacarosa, a 25°C durante 5 días. Luego del tiempo de incubación, el micelio fue retirado con una pinza estéril y secado con papel estéril. Una porción del micelio de aproximadamente 150 mg fue trasvasado a un tubo estéril de 2 mL y fue molido hasta polvo fino, en presencia de nitrógeno líquido utilizando una varilla de vidrio. A partir del micelio molido, se realizó la extracción de ADN de acuerdo a Accensi *et al.* (Accensi *et al.* 1999) con modificaciones. Al micelio contenido en un tubo de 2 mL se le agregaron 500 µL de buffer de lisis. Se incubó a 65°C durante una hora y posteriormente se agregó un volumen de la mezcla fenol:cloroformo:isoamílico (25:24:1). Se centrifugó a 10.000 rpm durante 10 minutos y se trasvasó el sobrenadante a un nuevo tubo. Se agregó 150 µL de 1M NaCl y 150 µL 3M NaOAc. Se precipitó el ADN con un volumen de isopropanol frío. Se dejó a -20°C durante toda la noche. Se centrifugó a 10.000 rpm durante 10 minutos y se descartó el sobrenadante. Luego se agregó 100 µL de 70% etanol, se centrifugó a 10.000 rpm durante 10 minutos y se descartó el sobrenadante. El precipitado fue secado en estufa a 45°C y fue resuspendido en 50

µL de agua miliQ estéril. Y se conservó a 4°C hasta su utilización.

La presencia o ausencia de ADN fue determinada mediante electroforesis en gel de agarosa (Promega Corporation, Madison, USA) al 0,8%, con bromuro de etidio como indicador a una concentración final de 0,5 µg/mL. En algunas ocasiones se utilizó Gel Red como indicador a una concentración final de 5X. El gel se reveló bajo una lámpara UV (Sambrook & Russell 2001).

3.2.2 Amplificación de la región ITS1-5.8SrADN-ITS2.

La amplificación de la región ITS1-5.8SrADN-ITS2 se realizó según Magnani *et al.* (Magnani *et al.* 2005). Los primers utilizados fueron ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'), ambos sintetizados por BYO.SYNTHESIS Company (Lewisville, TX). La reacción de amplificación se realizó en un volumen final de 25 µL conteniendo 2,5 µL Buffer 10X (Fermentas International Inc., Canadá), 16,9 µL de agua miliQ estéril, 1 µL de cada primer 25 µM, 2,5 µL de dNTP 2 mM, 0,1 µL de Taq polimerasa (Fermentas International Inc., Canada) 5U/µL y 1 µL de ADN de concentración aproximada 100 ng/µL. La amplificación comenzó con un paso de desnaturalización de 5 minutos a 94°C, seguido por 35 ciclos de 95°C 1 minuto, 55°C 1 min, 72°C 2 min y una extensión final de 72°C 10 minutos. La amplificación fue realizada en un termociclador MultiGene Mini Labnet International, Inc. (Edison, NJ, USA).

El producto de PCR fue detectado mediante electroforesis en gel de agarosa (Promega Corporation, Madison, USA) al 0,8%, con bromuro de etidio como indicador a una concentración final de 0,5 µg/mL. En algunas ocasiones se utilizó Gel Red como indicador a una concentración final de 5X. El gel se reveló bajo una lámpara UV (Sambrook & Russell 2001). El tamaño del amplicón fue estimado por comparación con un marcador de peso molecular (GeneRuler™ 1Kb DNA ladder, ready to use, Fermentas International Inc., Canadá).

3.2.3 Identificación mediante secuenciación de la región ITS1-5.8SrADN-ITS2.

Los amplicones de 500-600 pb fueron secuenciados de forma unidireccional en el laboratorio Macrogen Inc. (Seul, Corea). Las secuencias parciales obtenidas fueron comparadas con la base de datos del GenBank

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>) mediante la herramienta Nucleotide Blast del NCBI, USA (National Center for Biotechnology Information <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>).

Para complementar dicha identificación molecular se realizó la observación macroscópica de las colonias en medio PDA, así como la observación microscópica en fresco (mediante microscopio óptico, 40X) de las estructuras fúngicas.

3.3 Identificación de levaduras.

3.3.1 Extracción de ADN de levaduras.

La extracción de ADN de las levaduras se realizó de acuerdo a Schena *et al.* (Schena *et al.* 1999). Para ello se realizó una suspensión de cada levadura en 100 µL de buffer de lisis contenido en un tubo, hasta alcanzar una concentración de $10^7 - 10^8$ células/mL. Se agregaron perlas de vidrio de 0,5mm de diámetro (BioSpec Products Inc.), 50 µL de fenol, 48 µL de cloroformo y 2 µL de alcohol isoamílico. Se agitó en vórtex durante 5 minutos, enfriando cada minuto en baño de hielo. Se centrifugó a 10.000 rpm durante 10 minutos. Se transfirió la fase acuosa a un nuevo tubo y se le agregó un volumen de isopropanol. Se dejó a -20°C durante 2 horas. Se centrifugó a 11.000 rpm durante 15 minutos y se descartó el sobrenadante. El precipitado se secó en estufa a 45°C y se resuspendió en 30 µL de agua miliQ estéril. Se conservó a 4°C hasta su utilización.

La presencia o ausencia de ADN se determinó mediante electroforesis en gel de agarosa (Promega Corporation, Madison, USA) al 0,8%, con bromuro de etidio como indicador a una concentración final de 0,5 µg/mL. En algunas ocasiones se utilizó Gel Red como indicador a una concentración final de 5X. El gel se reveló bajo una lámpara UV (Sambrook & Russell 2001).

3.3.2 Amplificación de la región ITS1-5.8SrADN-ITS2.

Se amplificó la región ITS1-5.8SrADN-ITS2 de acuerdo a Magnani *et al.* (Magnani *et al.* 2005) como se indicó anteriormente en la sección 3.2.2.

3.3.3 Amplificación de la región D1/D2.

La amplificación de la región D1/D2 se realizó según Kurtzman y Droby (Kurtzman & Droby 2001) con algunas modificaciones. Los primers utilizados fueron ITS1 (5' - TCCGTAGGTGAACCTGCGG - 3') y NL-4 (5' - GGTCCGTGTTTCAAGACGG- 3'), ambos sintetizados por BYO.SYNTHESIS Company (Lewisville, TX). La reacción de amplificación se realizó en un volumen final de 25 µL conteniendo 2,5 µL Buffer 10X (Fermentas International Inc., Canadá), 16,9 µL de agua miliQ estéril, 1 µL de cada primer 10 µM, 2,5 µL de dNTP 2 µM, 0,1 µL de Taq polimerasa (Fermentas International Inc., Canada) 5 U/µL y 1 µL de ADN de concentración aproximada 100 ng/µL. La amplificación comenzó con un paso de desnaturalización de 5 minutos a 94°C, seguido por 45 ciclos de 94°C 1 minuto, 52°C 1 minuto y 72°C 1,5 minutos con una extensión final de 72°C durante 5 minutos. La amplificación se realizó en un termociclador MultiGene Mini Labnet International, Inc. (Edison, NJ, USA).

El producto de PCR fue detectado mediante electroforesis en gel de agarosa (Promega Corporation, Madison, USA) al 0,8%, con bromuro de etidio como indicador a una concentración final de 0,5 µg/mL. En algunas ocasiones se utilizó Gel Red como indicador a una concentración final de 5X. El gel se reveló bajo una lámpara UV (Sambrook & Russell 2001). El tamaño del amplicón fue estimado por comparación con un marcador de peso molecular (GeneRuler™ 1Kb DNA ladder, ready to use, Fermentas International Inc., Canadá).

3.3.4 Identificación mediante secuenciación de las región ITS1-5.8SrADN-ITS2 y D1/D2.

Los amplicones de 500-600 pb para la región ITS1-5.8SrADN-ITS2 y los amplicones de 1200 pb para la región D1/D2 fueron secuenciados de forma unidireccional en el laboratorio Macrogen Inc. (Seul, Corea). Las secuencias parciales obtenidas fueron comparadas con la base de datos del GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>) mediante la herramienta Nucleotide Blast del NCBI, USA (National Center for Biotechnology Information <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>).

3.3.5 Construcción de árbol filogenético de similitud.

A partir de las secuencias D1/D2 obtenidas se construyó un árbol de similitud utilizando el software MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) versión 4 (<http://www.megasoftware.net/>). Para la construcción del árbol se utilizaron secuencias de dicha región génica de las especies en estudio almacenadas en la base de datos GenBank (*Candida glabrata* ATCC 22016^T; *Cryptococcus aerius* CBS 155^T; *Cryptococcus albidosimilis* CBS 7711^T; *Cryptococcus gastricus* CBS 2288^T; *Cryptococcus tephrensensis* CBS 8935^T; *Cryptococcus victoriae* CBS 8685^T; *Debaryomyces hansenii* NRRL Y-7426^T; *Leucosporidiella fragaria* CBS 6254^T; *Metschnikowia australis* NRRL Y-17414^T; *Rhodotorula laryngis* CBS 2221^T). Las secuencias se alinearon utilizando Clustal W v.1.6 (Higgins 1994) como parte del programa MEGA versión 4 (Tamura et al. 2007). El árbol filogenético se construyó por Neighbour-Joining (Saitou & Nei 1987) y las distancias evolutivas fueron computadas con el método de Jukes Cantor (Jukes & Cantor 1969). Todas las posiciones con datos faltantes fueron eliminadas previo al análisis (complete deletion option).

3.4 Métodos de conservación de hongos filamentosos.

3.4.1 Tubos de PDA con tapa rosca.

Las cepas de hongos filamentosos fueron sembradas en tubos de PDA (Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, England) inclinado con tapa rosca. Se incubaron a temperatura ambiente hasta observar aparición de micelio. Luego del tiempo de incubación se conservaron a temperatura ambiente (Figura 5). Se estudió la viabilidad de los hongos filamentosos resembrando periódicamente cada cepa en PDA en placa a los 2, 3, 4, 5, 6 y 11 meses.



Figura 5: Método de conservación en tubo de PDA inclinado con tapa rosca.

3.4.2 Tubos de PDA con vaselina.

Las cepas de hongos filamentosos fueron sembradas en tubos con PDA en pico de flauta. Se incubaron a temperatura ambiente hasta observar crecimiento de micelio. Luego del tiempo de incubación, cuando hubo crecimiento de micelio, se cubrieron con vaselina, y se conservaron a temperatura ambiente (Figura 6). Este método se realizó por duplicado y se estudió la viabilidad de los hongos filamentosos resemebrando periódicamente cada cepa en PDA en placa a los 2, 4, 5, 6, 7, 8, 10 y 13 meses para la primera tanda, y a los 2, 3, 4, 5, 7 y 10 meses para la segunda tanda.



Figura 6: Método de conservación en tubo de PDA inclinado cubierto con vaselina.

3.4.3 Agua estéril.

Las cepas de hongos filamentosos fueron sembradas en tubos con PDA en pico de flauta. Se incubaron a temperatura ambiente hasta observar crecimiento de micelio y esporulación. Luego se hizo una suspensión de esporas en tubos conteniendo agua estéril hasta observar turbidez (correspondiente a aproximadamente 10^6 - 10^7 esporas/mL). Los tubos se conservaron a temperatura ambiente (Figura 7). Se estudió la viabilidad de los hongos filamentosos resemebrando periódicamente (10 μ L) cada cepa en PDA en placa a los 2, 4, 5, 6, 7, 9 y 12 meses.



Figura 7: Método de conservación en suspensión en agua estéril.

3.4.4 Papel de filtro.

Cada cepa fue sembrada en forma puntual, en el centro de una placa de Petri conteniendo PDA. Alrededor de la siembra, se colocaron trozos pequeños de papel de filtro estéril. Se incubaron a temperatura ambiente hasta observar crecimiento de micelio. Luego del tiempo de incubación, cuando el micelio alcanzó los trozos de papel, éstos se retiraron con pinza y se guardaron en sobres de papel estériles. Los sobres se conservaron a temperatura ambiente (Figura 8). Se estudió la viabilidad de los hongos filamentosos resemebrando periódicamente cada cepa en PDA en placa a los 3, 6, 10 y 12 meses. No se estudiaron todas las cepas en todas las instancias de evaluación.



Figura 8: Método de conservación en papel de filtro.

3.5 Método de conservación de levaduras.

3.5.1 Criotubos de cerebro-corazón con glicerol.

Cada cepa de levadura fue sembrada en tubos de PDA en pico de flauta. Se incubaron a temperatura ambiente hasta observar crecimiento. Se prepararon criotubos conteniendo caldo cerebro-corazón (Becton Dickinson Microbiology Systems, USA) y 15% glicerol (Carlo Erba Reactifs SA). Luego del tiempo de incubación cada levadura fue resuspendida en el caldo contenido en los criotubos. Los criotubos se conservaron a -80°C en freezer.

Se estudió la viabilidad, resembrando cada cepa en PDA en placa a los dos meses.

4. Resultados

4.1 Identificación molecular de hongos filamentosos.

En la Tabla 2 se muestran los resultados obtenidos en la identificación molecular de los hongos filamentosos obtenida por comparación de secuencias de la región ITS.

Tabla 2: Identificación molecular de los hongos filamentosos con la región ITS1-5.8SrADN-ITS2 mediante comparación con la base de datos del GenBank utilizando la herramienta BLAST.

Cepas	Especie	Código acceso GenBank	% similitud
FA2	<i>Penicillium italicum</i>	JF772180.1	100%
	<i>Penicillium expansum</i>	FJ463031.1	100%
FA9	<i>Penicillium citrinum</i>	JQ070088.1	99%
FA12	<i>Penicillium expansum</i>	FJ463031.1	100%
FA27	<i>Penicillium citrinum</i>	JQ070088.1	99%
FA30	<i>Geomyces pannorum</i>	KC485437.1	100%
FA37	<i>Aspergillus tubingensis</i>	JQ812710.1	100%
	<i>Aspergillus niger</i>	KF753944.1	100%
FA38	<i>Penicillium expansum</i>	FJ463031.1	100%
FA39	<i>Aspergillus flavus</i>	KJ175473.1	100%
FA43	<i>Trichoderma atroviride</i>	JQ745258.1	100%

El 55,5% de los resultados correspondió al género *Penicillium*, el 22,2% al género *Aspergillus*, y los géneros *Geomyces* y *Trichoderma* representaron un 11,1% cada uno. Estos datos de porcentajes se representan en la Figura 9.

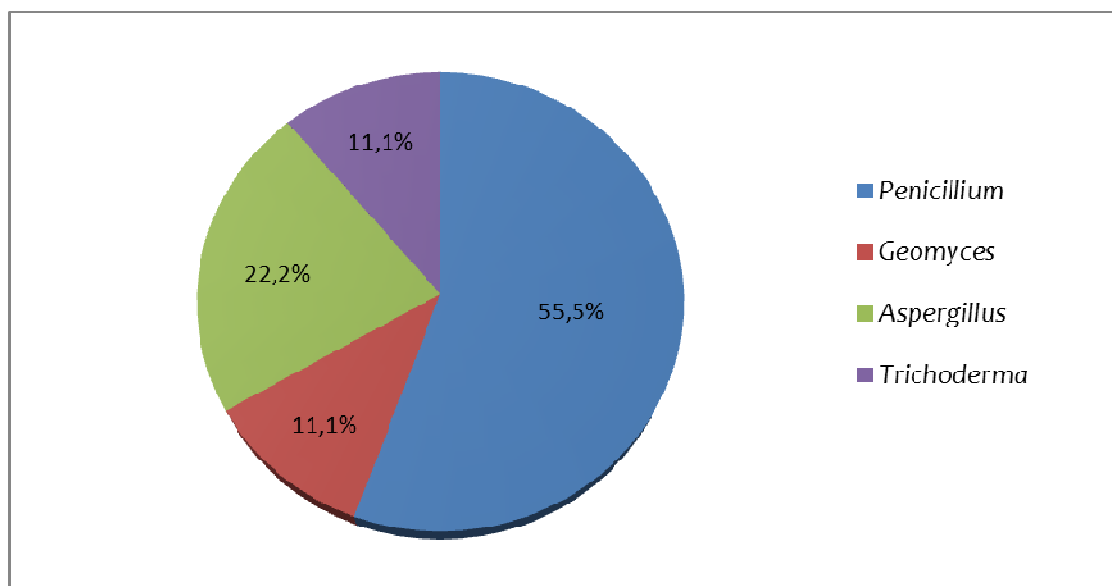


Figura 9: Distribución de géneros obtenidos en la identificación de los hongos filamentosos.

Estos resultados se correlacionaron con la observación macro y microscópica de las colonias. En la Figura 10 se muestran tres ejemplos de cepas pertenecientes a distintos géneros. En las fotos de microscopía (Figura 10: B, D y F) se observa la morfología de las hifas conidióforas correspondientes a cada hongo, que coinciden con cada uno de los géneros.

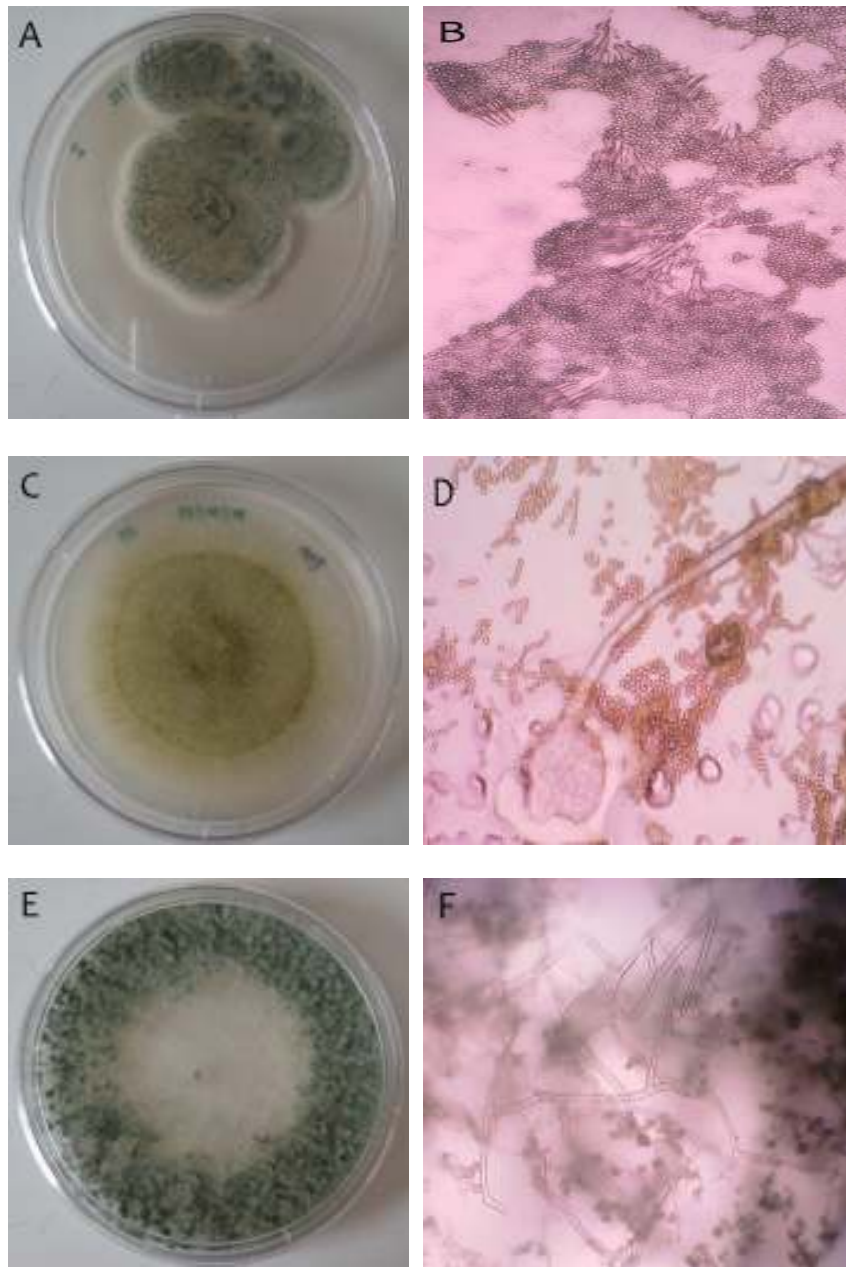


Figura 10: A-B: Cepa FA2 observación macroscópica y microscópica respectivamente (Género *Penicillium*). C-D: Cepa FA39 observación macroscópica y microscópica respectivamente (Género *Aspergillus*). E-F: Cepa FA43 observación macroscópica y microscópica respectivamente (Género *Trichoderma*).

4.2 Identificación molecular de levaduras.

De las 35 cepas de levaduras fue posible identificar 26 mediante comparación de las secuencias de las regiones ITS y D1/D2 con la base de datos del GenBank. Los resultados se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3: Identificación molecular a nivel de especie de las levaduras con las regiones ITS1-5.8SrADN-ITS2 y D1/D2 mediante comparación con la base de datos del GenBank utilizando la herramienta BLAST.

Cepa	Especie	ITS % similitud	D1/D2 % similitud
4CE	<i>Cryptococcus aerius</i>	99%	99%
4E	<i>Cryptococcus aerius</i>	99%	99%
5E	<i>Leucosporidiella fragaria</i>	98%	-
7AE	<i>Rhodotorula laryngis</i>	99%	99%
8E	<i>Guehomyces pullulans</i>	100%	99%
10E	<i>Cryptococcus victoriae</i>	100%	100%
12D	<i>Candida glabrosa</i>	99%	99%
13R	<i>Leucosporidiella fragaria</i>	98%	100%
14BE	<i>Cryptococcus victoriae</i>	100%	-
15E	<i>Candida glabrosa</i>	99%	99%
19DA	<i>Cryptococcus victoriae</i>	-	100%
19DB	<i>Leucosporidiella fragaria</i>	-	100%
19R	<i>Cryptococcus victoriae</i>	-	99%
20E	<i>Metschnikowia australis</i>	-	100%
22AE	<i>Cryptococcus gastricus</i>	-	100%
22BE	<i>Cryptococcus gilvescens</i>	-	100%
29AE	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	-	100%
29BE	<i>Debaryomyces hansenii</i>	-	100%
32R	<i>Metschnikowia australis</i>	-	100%
33AE	<i>Rhodotorula laryngis</i>	99%	99%
33BE	<i>Cryptococcus victoriae</i>	100%	100%
35E	<i>Debaryomyces hansenii</i>	-	100%
36E	<i>Cryptococcus albidosimilis</i>	-	100%
37E	<i>Metschnikowia australis</i>	-	100%
37BE	<i>Cryptococcus tephrensensis</i>	-	100%
39E	<i>Metschnikowia australis</i>	100%	-

Seis cepas pudieron identificarse sólo a nivel de género (Tabla 4). Mientras que las tres cepas restantes (14E; 34E; 41E) no pudieron identificarse ya que no se obtuvo producto de amplificación en la PCR, probablemente debido a una extracción de ADN insuficiente.

Tabla 4: Identificación molecular a nivel de género de seis cepas de levaduras con las regiones ITS1-5.8SrADN-ITS2 y D1/D2 mediante comparación con la base de datos del GenBank utilizando la herramienta BLAST.

Cepa	Especie	ITS % similitud	D1/D2 % similitud
12R	<i>Candida glabrosa</i>	99%	99%
	<i>Candida pseudoglabrosa</i>	99%	99%
17E	<i>Candida saitoana</i>	-	99%
	<i>Candida glabrosa</i>	-	99%
	<i>Candida pseudoglabrosa</i>	-	99%
21R	<i>Candida saitoana</i>	-	99%
	<i>Candida glabrosa</i>	-	99%
	<i>Candida pseudoglabrosa</i>	-	99%
24E	<i>Candida glabrosa</i>	-	99%
	<i>Candida saitoana</i>	-	99%
4BE	<i>Cryptococcus</i> sp.	-	98%
7BE	<i>Candida</i> sp.	100%	100%

En el caso de las levaduras el 37,5% de los resultados correspondió al género *Cryptococcus*; el 21,9% al género *Candida*; el 12,5% al género *Metschnikowia*; a los géneros *Leucosporidiella* y *Rhodotorula*, correspondió un 9,4% a cada uno; y el 9,3% restante se reparte entre los géneros *Guehomyces* y *Debaryomyces* (Figura 11).

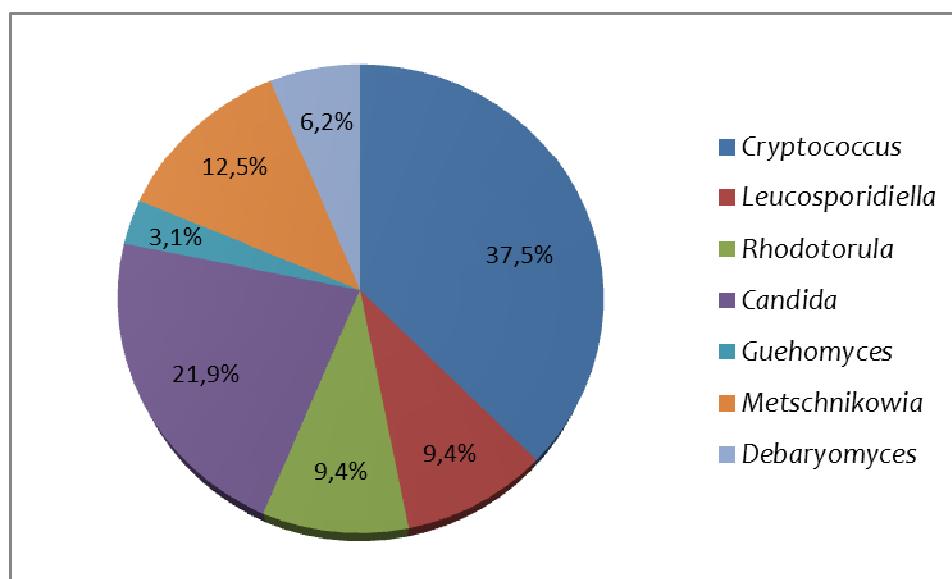


Figura 11: Distribución de géneros encontrada en la identificación molecular de las levaduras.

Con las secuencias de la región D1/D2 de las cepas que fueron identificadas a nivel de especie, se construyó un árbol filogenético de similitud, el cual se muestra en la Figura 12.

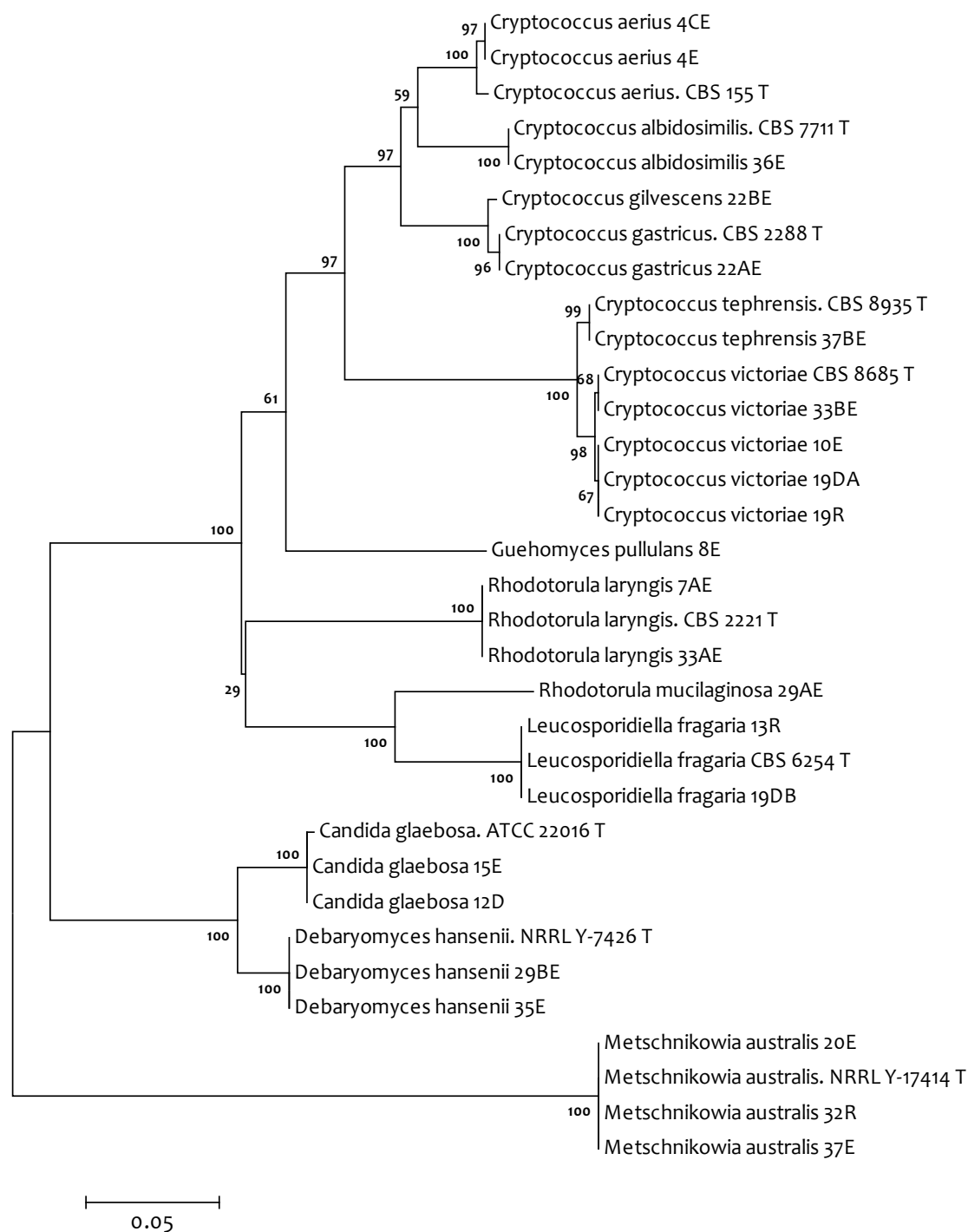


Figura 12: Árbol filogenético de similitud con las secuencias D1/D2 de las cepas de levaduras identificadas a nivel de especie y secuencias tipo de la base de datos GenBank.

4.3 Formas de conservación de hongos filamentosos.

4.3.1 Tubo de PDA con tapa rosca a temperatura ambiente.

A los once meses, todos los hongos mantuvieron viabilidad excepto las cepas FA2 FA12, FA30 y FA38 que no crecieron.

En la Figura 13 se muestran fotografías, a modo de ejemplo, de la cepa FA12 a los seis meses, en que creció correctamente y a los once meses en que no se observó crecimiento.

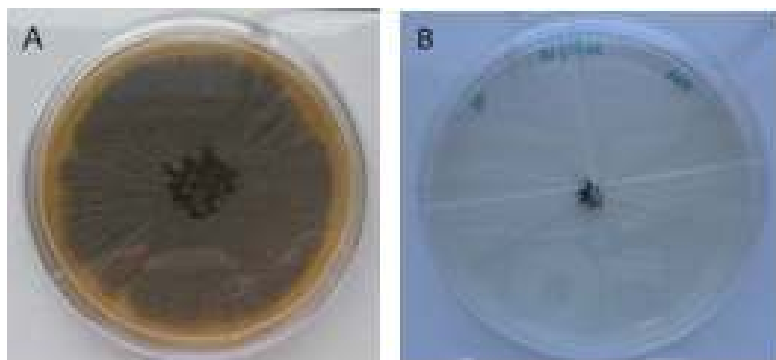


Figura 13: A- Cepa FA12 a los 6 meses; B- Cepa FA12 a los 11 meses, no creció.

4.3.2 Tubos de PDA inclinado cubiertos con vaselina.

En la primera tanda realizada, cinco de las nueve cepas evaluadas mostraron crecimiento en placa de PDA hasta los trece meses. En la Figura 14 se muestra un ejemplo a los dos, cinco, siete y trece meses.

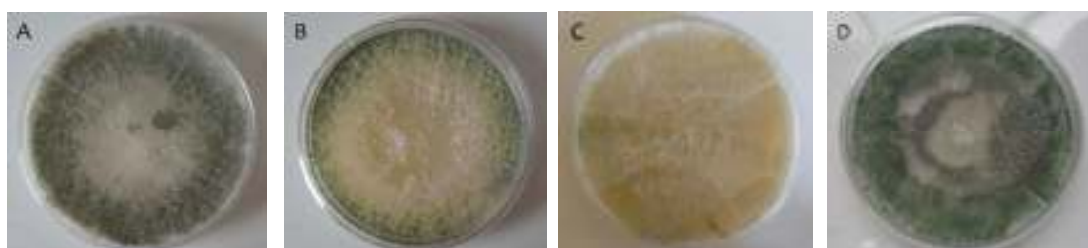


Figura 14: Cepa FA43 en las evaluaciones de viabilidad de la primera tanda del método de tubo de PDA cubierto con vaselina a los 2 meses (A); 5 meses (B); 7 meses (C); y 13 meses (D).

En la segunda tanda, cuatro de las nueve cepas se mantuvieron viables hasta los diez meses. En la Figura 15 se muestra también un ejemplo a los dos, tres, cinco y diez meses.

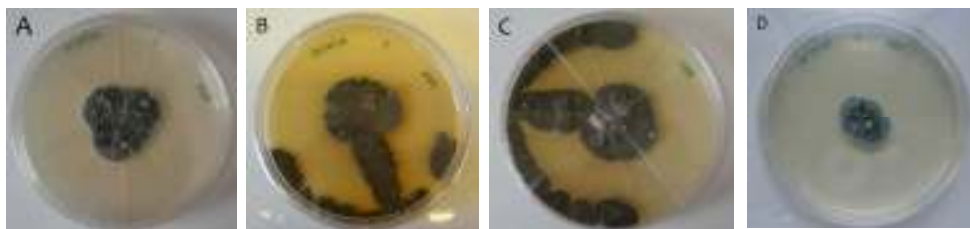


Figura 15: Ceba FA9 en las evaluaciones de viabilidad en la segunda tanda del método de conservación en tubo de PDA cubierto con vaselina a los 2 meses (A), 3 meses (B), 5 meses (C) y 10 meses (D).

4.3.3 Agua estéril.

En este método siete de las nueve cepas evaluadas se mantuvieron viables durante todo el período de tiempo evaluado. En la Figura 16 se muestra un ejemplo.

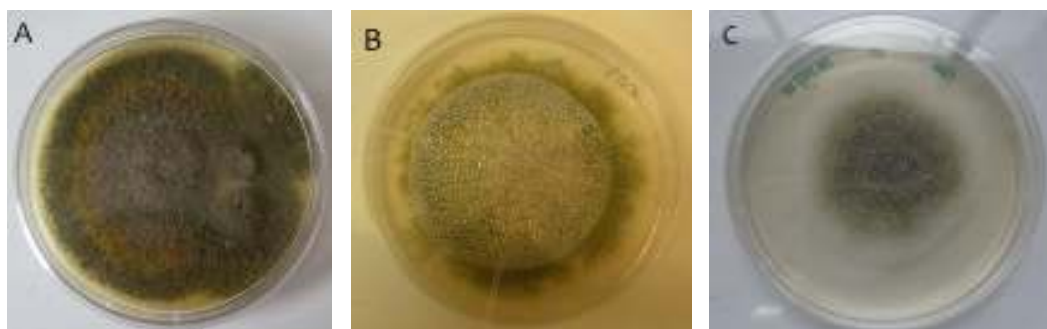


Figura 16: Ceba FA39 en las evaluaciones de viabilidad del método de suspensión en agua estéril a los 2 meses (A); 6 meses (B) y 12 meses (C).

4.3.4 Papel de filtro.

De las seis cepas evaluadas durante doce meses, cuatro se mantuvieron viables durante todo el período. En la Figura 17 se muestra un ejemplo.

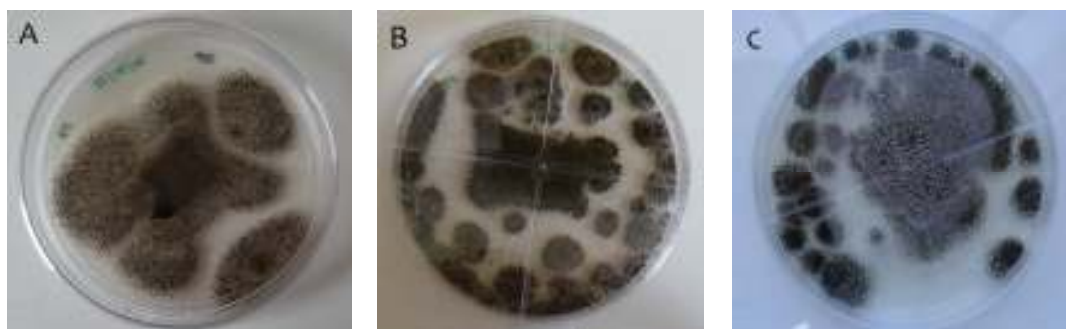


Figura 17: Ceba FA37 en las evaluaciones de viabilidad del método de conservación en papel de filtro a los 3 meses (A); 6 meses (B) y 12 meses (C).

En la Tabla 5 se presentan todos los resultados de viabilidad de los hongos filamentosos en los distintos métodos de conservación evaluados para facilitar su comparación.

4.4 Forma de conservación de levaduras.

4.4.1 Caldo glicerol-cerebro-corazón.

A los dos meses el 100% de las cepas fueron viables al ser sembradas en placa de PDA.

Tabla 5: Resultados de viabilidad de los hongos filamentosos evaluada en todos los métodos de conservación estudiados. Los valores están expresados en meses.

Cepa	Tubo PDA con tapa rosca		Vaselina 1º tanda		Vaselina 2º tanda		Agua estéril		Papel de filtro	
	Evaluaados	Viabilidad	Evaluaados	Viabilidad	Evaluaados	Viabilidad	Evaluaados	Viabilidad	Evaluaados	Viabilidad
FA2	11	6	13	10	4	3	12	9	12	6
FA9	11	11	13	13	10	10	12	12	10	10
FA12	11	6	13	10	5	4	12	12	12	6
FA27	11	11	13	13	10	7	12	12	10	10
FA30	11	6	7	6	2	0	6	5	10	3
FA37	11	11	13	13	10	10	12	12	12	12
FA38	11	6	13	10	5	4	12	12	12	12
FA39	11	11	13	13	10	10	12	12	12	12
FA43	11	11	13	13	10	10	12	12	12	12

5. Discusión

5.1 Identificación molecular.

La identificación molecular mediante la amplificación de la región ITS1-5.8SrADN-ITS2 del gen del ARN ribosomal permitió la identificación a nivel de género de todos los hongos filamentosos aislados de las muestras. Los resultados obtenidos corresponden a los géneros *Penicillium*, *Geomyces*, *Aspergillus* y *Trichoderma*.

Estos resultados fueron corroborados con la observación macro y microscópica de las colonias.

La región ITS del gen nuclear del ARNr ha sido utilizada como blanco para la identificación de especies microbianas porque es lo suficientemente variable para ser usada como región específica de especie (Slemmons et al. 2013). Sin embargo, para lograr la correcta identificación de muchos hongos filamentosos es necesario analizar más de un gen, esperando que los resultados sean concordantes y permitan identificar a nivel de especie y además se utiliza una identificación polifásica.

Si bien los porcentajes de similitud obtenidos en la base de datos del GenBank fueron del 99% y 100%, este resultado no es suficiente para asegurar la identificación a nivel de especie. En el caso de las cepas FA2 y FA37 se obtuvo un 100% de similitud para *Penicillium expansum* y *Penicillium italicum* y 100% para *Aspergillus tubingensis* y *Aspergillus niger*, respectivamente. Por lo tanto, es necesario complementar el estudio realizado con pruebas fenotípicas u otras pruebas moleculares. Dentro de las pruebas fenotípicas a realizar se encuentra el crecimiento de la cepa a identificar a diferentes temperaturas en diferentes medios de cultivo. Para discriminar entre las dos especies encontradas dentro del género *Penicillium* debería analizarse el crecimiento en medios CYA (Czapek Yeast extract Agar), MEA (Malt Extract Agar) y CSN (Creatine Sucrose Neutral Agar). Se deberían estudiar caracteres fenotípicos como tamaño, textura y color de las colonias; tamaño y distribución de las conidias, y luego con la información de estas características y la utilización de una clave sería posible identificar a nivel de especie (Pitt & Hocking 1999). La identificación a nivel de especie del agregado *A. niger* formado, entre otras, por las especies *A. niger* y *A. tubingensis*, es muy difícil de realizar por métodos fenotípicos, por lo que se debe recurrir a métodos de biología molecular (Abarca et al. 2004). Mediante el estudio del gen que codifica para la calmodulina, es posible identificar a nivel de especie las

integrantes del agregado *A. niger* (Garmendia 2011).

En el caso de las levaduras, se amplificaron dos regiones, la región ITS1-5.8SrADN-ITS2 y la región D1/D2 del gen del ARNr 26S, lo que permitió identificar a nivel de especie a 26 de las 35 cepas aisladas. La divergencia de secuencia del dominio D1/D2 es generalmente suficiente para resolver especies individuales. Sin embargo, este resultado sólo debería ser utilizado como una guía y el valor de 1% de divergencia en la región D1/D2 para separar especies no es un valor estricto (Baleiras Couto et al. 2005).

Esta salvedad se pudo observar en el caso de las cuatro cepas que fueron identificadas a nivel de género pero no de especie: 12R; 17E; 21R y 24E (Tabla 4). Estas cepas presentaron un 99% de similitud con dos o tres especies, según la cepa, dentro del género *Candida*. Para lograr separar estas tres especies (*C. glabrosa*, *C. pseudoglabrosa*, *C. saitoana*) es necesario estudiar perfiles de asimilación. De acuerdo a Kurtzman (Kurtzman 2011) la diferenciación entre estas especies utilizando tests fisiológicos tradicionales es difícil. Sin embargo, *C. glabrosa* puede distinguirse de *C. pseudoglabrosa* mediante la ausencia de crecimiento en melecitosa y en L-sorbose; y de *C. saitoana* por la ausencia de crecimiento en inulina y a 30°C.

Las secuencias de las cepas 4BE y 7BE (Tabla 4) al ser comparadas mediante la herramienta BLAST con la base de datos del GenBank presentaron diferencias mayores al 3% con las especies existentes. Es de interés continuar trabajando en la identificación de estas cepas ya que podría tratarse de especies nuevas. Para ello deberían estudiarse otras regiones génicas, profundizando en estudios genotípicos y fenotípicos que demostraran que efectivamente estas cepas son suficientemente diferentes a las pertenecientes a otras especies y por lo tanto definir una especie nueva.

El agrupamiento obtenido en el árbol filogenético fue concordante con la identificación realizada a nivel de especie.

Finalmente para las tres cepas que no fueron identificadas (denominadas 14E; 34E; 41E), no fue posible obtener producto de amplificación en la PCR, probablemente

debido a una extracción de ADN insuficiente. Hay investigaciones que demuestran que diferentes métodos de extracción de ADN pueden producir rendimientos dramáticamente distintos de ADN y que ningún método de extracción de ADN es óptimo para todos los organismos (Fredricks *et al.* 2005). De manera que para estas tres cepas, es recomendable evaluar otro método de extracción de ADN, con el objetivo de obtener material suficiente para luego obtener producto de amplificación en la PCR que permita la identificación de las mismas. Por otra parte, es interesante destacar que una de estas tres cepas, la denominada 34E, al ser cultivada en tubo de PDA, luego de unos días mostraba un cambio de fenotipo con producción de pseudomicelio.

5.2 Formas de conservación de hongos filamentosos.

En el subcultivo de los hongos filamentosos realizado en tubos de PDA con tapa rosca a temperatura ambiente, las cepas fueron viables hasta los once meses, exceptuando cuatro de ellas.

El método de conservación en tubo de PDA cubierto con vaselina se hizo dos veces, porque en la primera tanda la vaselina no cubría totalmente el micelio crecido sobre el agar, entonces se decidió hacer una segunda tanda con las mismas cepas de manera que quedara todo el micelio cubierto con la vaselina. Se obtuvieron resultados diferentes en las dos tandas realizadas, obteniéndose mejor recuperación en la primera tanda.

De acuerdo a algunos estudios realizados con aceite mineral, una capa de 0,2 a 0,5 cm previene la deshidratación del medio y permite suficiente oxigenación, mientras que una capa de 1 cm ó más crea condiciones de relativa anaerobiosis que pueden conducir a daño celular (De Lima & De Moraes Borba 2001). Esta podría ser una explicación plausible de los resultados diferentes obtenidos en las dos tandas realizadas. Según (Gato Cárdenas 2010) la mayor desventaja de este método es que los hongos pueden continuar su crecimiento, al menos durante los primeros períodos, y así ocurrir que sobrevivan mutantes capaces de crecer bajo las condiciones adversas que implica la conservación.

El método de suspensión en agua destilada estéril es un método muy utilizado y que

da altos porcentajes de viabilidad en los hongos filamentosos, en períodos a veces superiores a cinco años (Gato Cárdenas 2010). Al utilizarlo con las cepas de hongos filamentosos todas fueron viables hasta el año, exceptuando dos cepas (FA2 y FA30). En otros estudios que han utilizado este método, el noventa por ciento de los organismos conservados demostraron viabilidad durante diferentes períodos de almacenamiento. Sin embargo, la viabilidad varió aparentemente en cierto grado de una manera específica de cada organismo (Borman *et al.* 2006). Es necesario tener en cuenta que hay cepas que son más difíciles de conservar que otras; y en el caso particular de la suspensión en agua estéril, como se trata de una suspensión de esporas, tener en cuenta que sólo se puede utilizar con hongos que esporulen.

Cuando hay muchos microorganismos el método de subcultivo requiere de trabajo muy intenso y un espacio grande para el almacenamiento (Gato Cárdenas 2010). El método de conservación en papel de filtro, es un método económico y que permite optimizar el uso del espacio en el laboratorio. Dada la metodología de sembrar el hongo en el centro de una placa de Petri con PDA y esperar a que el micelio alcance los trozos de papel de filtro dispuestos alrededor en el agar, fueron pocos los trozos de papel que se pudieron guardar posteriormente para evaluar, ya que las placas se contaminaban más que en otros procedimientos. Esto también influyó en el hecho de que no fue posible estudiar la viabilidad de todas las cepas, en todas las instancias de evaluación. Es recomendable volver a realizar el procedimiento, de forma de obtener mayor cantidad de trozos de papel para cada cepa, para poder evaluarlas adecuadamente.

Algunas especies son notoriamente difíciles de preservar, mientras que otros hongos pueden ser preservados mediante casi cualquier método (Ryan *et al.* 2000). De acuerdo a los resultados obtenidos en todos los métodos de conservación estudiados, se puede observar que las cepas FA9; FA37; FA39 y FA43 fueron viables durante todo el período evaluado, independientemente del método de conservación utilizado y del tiempo transcurrido.

Si se compara la cantidad de cepas que se mantuvieron viables durante todo el período evaluado en cada método, se puede ver que el método de suspensión en

agua estéril, y el de papel de filtro, fueron los que tuvieron menor cantidad de cepas que perdieron viabilidad.

La cepa FA30 es un caso particular, ya que tuvo el menor número de recuperaciones en cada método evaluado; incluso en la segunda tanda de vaselina no fue posible recuperarla ninguna de las veces en que se evaluó viabilidad.

5.3 Forma de conservación de levaduras.

El método de conservación empleado con las levaduras fue la conservación en caldo glicerol-cerebro-corazón a -80°C y se realizó una evaluación de viabilidad a los dos meses, en la que hubo un 100% de recuperación. La criopreservación, junto a la liofilización, es considerada uno de los métodos de almacenamiento que mejor minimiza las alteraciones genéticas de los microorganismos (Borman *et al.* 2006). En este sentido, sería recomendable continuar con las evaluaciones de viabilidad por mayores períodos de tiempo.

5.4 Conclusiones y perspectivas.

La amplificación de la región ITS y D1/D2 del ADNr, permitió la identificación a nivel de especie de 7 cepas de hongos filamentosos y 26 cepas de levaduras, aislados de las muestras de Antártida. Para algunas cepas que no pudieron identificarse a nivel de especie quedaría pendiente la realización de pruebas fenotípicas y moleculares.

Los resultados obtenidos en la identificación para dos cepas de levaduras pertenecientes a los géneros *Candida* y *Cryptococcus* justifican la continuación de estudios para determinar si se trata de especies nuevas.

Dentro de los métodos de conservación evaluados, los que dieron mejores resultados, al mostrar la mayor cantidad de cepas viables durante todo el período evaluado, fueron el de suspensión en agua estéril y el de papel de filtro. Aunque no se puede generalizar para todas las cepas y deberían continuarse los estudios de viabilidad por períodos más largos.

6. Bibliografía

Bibliografía.

- Abarca M.L., Accensi F., Cano J. & Cabañes F.J. (2004) Taxonomy and significance of black aspergilli. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology* **86**, 33-49.
- Accensi F., Cano J., Figuera L., Abarca M.L. & Cabañes F.J. (1999) New PCR method to differentiate species in the *Aspergillus niger* aggregate. *FEMS Microbiology Letters* **180**, 191-6.
- Baleiras Couto M.M., Reizinho R.G. & Duarte F.L. (2005) Partial 26S rDNA restriction analysis as a tool to characterise non-*Saccharomyces* yeasts present during red wine fermentations. *International Journal of Food Microbiology* **102**, 49-56.
- Borman A.M., Szekely A., Campbell C.K. & Johnson E.M. (2006) Evaluation of the viability of pathogenic filamentous fungi after prolonged storage in sterile water and review of recent published studies on storage methods. *Mycopathologia* **161**, 361-8.
- Cantrell S.A., Dianese J.C., Fell J., Gunde-Cimerman N. & Zalar P. (2011) Unusual fungal niches. *Mycologia* **103**, 1161-74.
- Carrasco M., Rozas J.M., Barahona S., Alcaíno J., Cifuentes V. & Baeza M. (2012) Diversity and extracellular enzymatic activities of yeasts isolated from King George Island, the sub-Antarctic region. *BMC Microbiology* **12**.
- De Lima R.F. & De Moraes Borba C. (2001) Viability, morphological characteristics and dimorphic ability of fungi preserved by different methods. *Viabilidad, características morfológicas y capacidad dimórfica de hongos conservados según diferentes métodos* **18**, 191-6.
- Esteve-Zarzoso B., Belloch C., Uruburu F. & Querol A. (1999) Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *International Journal of Systematic Bacteriology* **49**, 329-37.
- Fredricks D.N., Smith C. & Meier A. (2005) Comparison of six DNA extraction methods for recovery of fungal DNA as assessed by quantitative PCR. *Journal of Clinical Microbiology* **43**, 5122-8.

- Friedmann E.I. (1993) *Antarctic microbiology*, New York.
- Garmendia G. (2011) Estudio de la presencia de ocratoxina A en vinos uruguayos. Tesis de Doctorado en Química. *Facultad de Química*. Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.
- Gato Cárdenas Y. (2010) Métodos de conservación y formulación de *Trichoderma harzianum rifai*. *Fitosanidad* **14**, pp. 189-95.
- Higgins D.G. (1994) CLUSTAL V: multiple alignment of DNA and protein sequences. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **25**, 307-18.
- Jukes T.H. & Cantor C.R. (1969) Evolution of protein molecules. In: *Mammalian Protein Metabolism* (ed. by HN IM), pp. pp.21-132. Academic Press, New York.
- Karakousis A., Tan L., Ellis D., Alexiou H. & Wormald P.J. (2006) An assessment of the efficiency of fungal DNA extraction methods for maximizing the detection of medically important fungi using PCR. *Journal of Microbiological Methods* **65**, 38-48.
- Kurtzman C.P. & Droby S. (2001) *Metschnikowia fructicola*, a new ascosporic yeast with potential for biocontrol of postharvest fruit rots. *Systematic and Applied Microbiology* **24**, 395-9.
- Kurtzman C.P.F., Jack W.; Boekhout, Teun (2011) *The yeasts, a taxonomic study*. Elsevier.
- López V., Querol A., Ramón D. & Fernández-Espinar M.T. (2001) A simplified procedure to analyse mitochondrial DNA from industrial yeasts. *International Journal of Food Microbiology* **68**, 75-81.
- Madigan M.T., Martinko J.M. & Parker J. (2003) *Brock Biología de los microorganismos*.
- Magnani M., Fernandes T., Cavenahi Prete C., Homechim M., Sataque E., Vilas-Boas L., Sartori D., Furlaneto M. & Pelegrinelli M.H. (2005) Molecular identification of *Aspergillus spp.* isolated from coffee beans. *Sci. Agric. (Piracicaba Braz.)* **62**, 45-9.
- Montemartini Corte A., Liotta M., Venturi C.B. & Calegari L. (2000) Antibacterial activity of *Penicillium spp.* strains isolated in extreme environments. *Polar Biology* **23**, 294-7.
- Nakasone K., Peterson S. & Jong S. (2004) Preservation and distribution of fungal

- cultures. *Biodiversity of fungi*, 37-47.
- Nedialkova D. & Naidenova M. (2005) Screening the antimicrobial activity of actinomycetes strains isolated from Antarctica. *Journal of Culture Collections* **4**, pp. 29-35.
- Nunes C., Bajji M., Stepien V., Manso T., Torres R., Usall J. & Jijakli M.H. (2008) Development and application of a SCAR marker to monitor and quantify populations of the postharvest biocontrol agent *Pantoea agglomerans* CPA-2. *Postharvest Biology and Technology* **47**, 422-8.
- Orberá Ratón T. (2004) Molecular identification methods of yeasts of biotechnological interest. *Métodos moleculares de identificación de levaduras de interés biotecnológico* **21**, 15-9.
- Panizo M.M., Reviakina V., Montes W. & González G. (2005) Mantenimiento y preservación de hongos en agua destilada y aceite mineral. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología* **25**, pp. 35-40.
- Pitt J.I. & Hocking A.D. (1999) *Fungi and food spoilage*, Gaithersburg, Maryland.
- Robinson C.H. (2001) Cold adaptation in Arctic and Antarctic fungi. *New Phytologist* **151**, 341-53.
- Ruisi S., Barreca D., Selbmann L., Zucconi L. & Onofri S. (2007) Fungi in Antarctica. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* **6**, 127-41.
- Ryan M.J., Smith D. & Jeffries P. (2000) A decision-based key to determine the most appropriate protocol for the preservation of fungi. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **16**, 183-6.
- Saitou N. & Nei M. (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* **4**, 406-25.
- Sambrook J. & Russell D.W. (2001) *Molecular cloning a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, New York.
- Schena L., Ippolito A., Zahavi T., Cohen L., Nigro F. & Droby S. (1999) Genetic diversity and biocontrol activity of *Aureobasidium pullulans* isolates against postharvest rots. *Postharvest Biology and Technology* **17**, 189-99.
- Slemmons C., Johnson G. & Connell L.B. (2013) Application of an automated ribosomal intergenic spacer analysis database for identification of cultured Antarctic fungi. *Antarctic Science* **25**, 44-50.

- Tamura K., Dudley J., Nei M. & Kumar S. (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* **24**, 1596-9.
- Valverde A. (2003) Taxonomía polifásica de poblaciones de microorganismos que establecen simbiosis con *Phaseolus vulgaris*.
- Vero S., Garmendia G., González M.B., Bentancur O. & Wisniewski M. (2013) Evaluation of yeasts obtained from Antarctic soil samples as biocontrol agents for the management of postharvest diseases of apple (*Malus × domestica*). *FEMS Yeast Research* **13**, 189-99.

Anexo

Medios de cultivo y buffers.

Buffer de lisis para extracción de ADN de hongos filamentosos:

- 100mM Tris
- 20mM EDTA
- 250mM NaCl
- 2% SDS

Autoclavar, 121°C, 15 min.

Buffer de lisis para extracción de ADN de levaduras:

- 2% Triton X-100
- 1% SDS
- 100mM NaCl
- 10mM Tris pH 8
- 1mM EDTA

Autoclavar, 121°C, 15 min.

Caldo glicerol-cerebro-corazón:

- 37g de medio
- 1L de agua destilada
- 15% de glicerol

Autoclavar, 121°C, 15 min.

Medio DRBA:

- 30g de medio
- 1L de agua destilada

Autoclavar, 121°C, 15 min.

Medio PDA:

- 39g de medio
- 1L de agua destilada

Autoclavar, 121°C, 15 min.

Medio R2A:

- 18,2g de medio
- 1L de agua destilada

Autoclavar, 121°C, 15 min.

Medio YES:

- 15% sacarosa
- 2% extracto de levadura
- 1L de agua destilada

Autoclavar, 121°C, 15 min.

Medio YNB:

- 17g de medio
- 1L de agua destilada

Autoclavar, 121°C, 15 min.

Abreviaturas.

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

ADNr: ADN ribosomal.

ARN: Ácido ribonucleico.

ARNr: ARN ribosomal.

IGS: Intergenic Spacer.

ITS: Internal Transcribed Spacer.

dNTP: desoxinucleótidos.

DRBA: Dichloran Rose Bengal Agar.

PDA: Potato Dextrose Agar.

PCR: Polymerase Chain Reaction.

R2A: Reasoner's 2A Agar.

YES: Yeast Extract Sucrose.

YNB: Yeast Nitrogen Base.