



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS
CARRERA DE INGENIERÍA BIOQUÍMICA

**Primer estudio sobre la diversidad de levaduras asociada a un volcán:
Tungurahua, Ecuador**

Proyecto de Trabajo de Titulación, modalidad Proyecto de Investigación, previa la obtención del Título de Ingeniera Bioquímica, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos.

Autora: Karen Cristina Hidalgo Escobar.

Tutora: Gloria Serrano Bueno Ph.D.

Ambato – Ecuador

2015

APROBACIÓN DEL TUTOR

En calidad de Tutora del trabajo de investigación: “PRIMER ESTUDIO SOBRE LA DIVERSIDAD DE LEVADURAS ASOCIADA A UN VOLCÁN: TUNGURAHUA, ECUADOR”, realizado por la egresada Karen Cristina Hidalgo Escobar, certifico que el trabajo fue realizado por la persona indicada. Considero que dicho informe investigativo reúne los requisitos y méritos suficientes para ser sometidos a la evaluación del Tribunal de Grado, que el Honorable Consejo Directivo designe para su correspondiente estudio y calificación.

Ambato, agosto del 2015.

Gloria Serrano Bueno, Ph.D
TUTORA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

AUTORÍA

El presente trabajo de investigación: “PRIMER ESTUDIO SOBRE LA DIVERSIDAD DE LEVADURAS ASOCIADA A UN VOLCÁN: TUNGURAHUA, ECUADOR”, es absolutamente original, auténtico y personal, en tal virtud, el contenido, efecto legales y académicos que se desprenden del mismo son de exclusiva responsabilidad de la autora.

Ambato, agosto de 2015

Karen Cristina Hidalgo Escobar

172241839-7

APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS
CARRERA DE INGENIERÍA BIOQUÍMICA

Los miembros del tribunal de grado aprueban el presente trabajo de graduación de acuerdo a las disposiciones reglamentarias emitidas por la Universidad Técnica de Ambato.

Ambato, agosto de 2015.

Para constancia firman:

Presidenta del Tribunal

Ing. Jacqueline Ortiz.; Ph.D

Miembro del Tribunal

Ing. Mirari Arancibia, Ph.D

Miembro del Tribunal

Ing. Yunis Pérez, M.Sc.

“Hay hombres que luchan un día y son buenos. Hay otros que luchan un año y son mejores. Hay quienes luchan muchos años, y son muy buenos. Pero hay los que luchan toda la vida, esos son los imprescindibles”

Bertolt Brecht

**Un agradecimiento muy especial a la Dra. Gloria Serrano, por su apoyo,
incentivo y constante motivación a investigar.**

ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS

PÁGINAS PRELIMINARES

Portada.....	I
Aprobación por el tutor.....	II
Autoría del trabajo de titulación.....	III
Aprobación del tribunal de grado	IV
Agradecimiento.....	V

TEXTO

CAPÍTULO I.....	4
------------------------	----------

EL PROBLEMA.....	4
-------------------------	----------

1.1. Tema de la investigación	4
-------------------------------------	---

1.2. Justificación	4
--------------------------	---

1.3. Objetivos.....	5
---------------------	---

1.3.1. Objetivo general	5
-------------------------------	---

1.3.2. Objetivos específicos	5
------------------------------------	---

CAPÍTULO II.....	6
-------------------------	----------

MARCO TEÓRICO	6
----------------------------	----------

2.1. Antecedentes investigativos	6
--	---

2.2. Hipótesis.....	7
---------------------	---

2.2.1 Diversidad de levaduras asociadas al volcán Tungurahua.	7
--	---

2.2.2 Comparación de la diversidad de levaduras asociada al volcán Tungurahua respecto a la diversidad asociada a otros ecosistemas volcánicos.....	7
---	---

2.2.3 Análisis del carácter extremófilo de las levaduras aisladas del volcán Tungurahua	8
--	---

2.3. Señalamiento de variables de la hipótesis	8
--	---

Caracterización fenotípica de levaduras aisladas del volcán Tungurahua.....	8
---	---

CAPÍTULO III.....	9
MATERIALES Y MÉTODOS	9
3.1. Materiales.....	9
3.2. Métodos.....	9
3.2.1. Estudio del área y toma muestras	9
3.2.2. Aislamiento y caracterización de levaduras.....	10
3.2.3. Extracción de ADN genómico.....	11
3.2.4. Amplificación de la región 5.8S-ITS y el dominio D1/D2 mediante PCR.....	12
3.2.5. Electroforesis de ADN en geles de agarosa.....	13
3.2.6. Secuenciación de la región 5.8S-ITS y el dominio D1/D2	14
3.2.7. Alineamiento y análisis filogenético.....	14
3.2.8. Efecto de la temperatura sobre el crecimiento de las levaduras	15
3.2.9. Efecto de la acidez sobre el crecimiento de las levaduras	15
3.3. Estadística	15
CAPÍTULO IV	16
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	16
4.1. Análisis y discusión de los resultados	16
4.1.1. Análisis filogenético de levaduras asociadas al volcán Tungurahua .	16
4.1.2. Análisis comparativo entre las especies de levaduras aisladas del volcán Tungurahua respecto a especies aisladas de otros ecosistemas volcánicos.....	29
4.1.3. Efecto de la temperatura y del pH sobre el crecimiento de levaduras	33
4.2. Verificación de hipótesis	37
4.2.1. Diversidad de levaduras asociadas al volcán Tungurahua.....	37
4.2.2. Comparación de la diversidad de levaduras asociada al volcán Tungurahua respecto a la diversidad asociada a otros ecosistemas volcánicos.....	37

4.2.3. Análisis del carácter extremófilo de las levaduras aisladas del volcán Tungurahua	39
CAPÍTULO VI	41
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	41
5.1. Conclusiones	41
5.2. Recomendaciones	42
MATERIALES DE REFERENCIA	
Referencias bibliográficas.....	43
Anexos	55

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I: Parámetros fisicoquímicos del volcán Tungurahua.....	16
Tabla II: Parámetros para la caracterización macroscópica y microscópica de levaduras.	17
Tabla III: Parámetros macroscópicos de levaduras aisladas del volcán Tungurahua.....	19
Tabla IV: Parámetros microscópicos de levaduras aisladas del volcán Tungurahua.....	21
Tabla V. Concentración y pureza del ADN genómico extraído de levaduras asociadas al volcán Tungurahua.	23
Tabla VI. Identificación de géneros y especies asociados a la base de datos NCBI	27
Tabla VII. Identificación de levaduras y su distribución en diferentes ecosistemas volcánicos.	31
Tabla VIII. Comparación de especies pertenecientes a las familias Basidiomicota y Ascomicota en cuatro ecosistemas volcánicos del mundo. 32	
Tabla IX. Frecuencia de la existencia de levaduras en el ecosistema del volcán Tungurahua en otros ecosistemas volcánicos.....	38
Tabla X. Valor calculado para la prueba X^2 y valor p	38
Tabla XI: Frecuencias del conteo del crecimiento de levaduras para el efecto de la temperatura.....	39
Tabla XII: Cantidad de levaduras con crecimiento a diferentes temperaturas	39
Tabla XIII: Frecuencias esperadas bajo independencia para el efecto de la temperatura.....	40
Tabla XIV: Valor calculado para la prueba X^2 y valor p para el efecto de la temperatura.....	40

Tabla XV: Frecuencias del conteo del crecimiento de levaduras para el efecto del pH.....	40
Tabla XVI: Cantidad de levaduras con crecimiento a diferentes valores de pH	41
Tabla XVII: Frecuencias esperadas bajo independencia para el efecto del pH	41
Tabla XVIII: Valor calculado para la prueba X^2 y valor p para el efecto del pH	41

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Localización y puntos de muestro del volcán Tungurahua.	10
Figura 2: Región 5.8S-ITS y dominio D1/D2 del ADN ribosómico de levaduras y posición de los primers utilizados para amplificarlas por PCR. 13	
Figura 3: Distribución de levaduras a lo largo del volcán Tungurahua.....	18
Figura 4. Morfología macroscópica de levaduras aisladas del volcán Tungurahua.....	19
Figura 5. Morfología microscópica de levaduras aisladas del volcán Tungurahua.....	21
Figura 6: Electroforesis en gel de agarosa del ADN genómico extraído de las levaduras aisladas del volcán Tungurahua.	24
Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa de los productos amplificados por PCR de la región ITS.	25
Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa de los productos amplificados por PCR del dominio D1/D2.....	26
Figura 9. Análisis filogenético de las diez especies aisladas del volcán Tungurahua.....	29
Figura 10. Efecto de la temperatura sobre el crecimiento de diez especies aisladas del volcán Tungurahua.	34
Figura 11. Efecto del pH sobre el crecimiento de diez especies aisladas del volcán Tungurahua.	37

RESUMEN

El volcán Tungurahua representa un ecosistema extremófilo en cuanto a sus características fisicoquímicas, las cuales deben ser soportadas por los organismos que lo habitan. Desde las faldas del volcán hasta zonas cercanas al cráter se establecieron trece puntos de muestreo, de los que se aislaron un total de doce levaduras. Estas fueron caracterizadas física y molecularmente, identificándose diez especies diferentes. El análisis filogenético las clasificó dentro de cinco órdenes distintos y, de forma equitativa, en dos familias (Basidiomycota y Ascomycota).

El análisis comparativo de la diversidad de especies de levaduras asociadas a ecosistemas volcánicos, mostró que ésta, no fue influenciada por el tipo de hábitat y, posiblemente exista mayor relación entre poblaciones geográficamente próximas. Las especies *Cryptococcus* sp. y *Rhodotorula mucilaginosa* destacan por haber sido aisladas también de otros ecosistemas volcánicos. Asimismo, ésta última se considera ubicua, pues es capaz de colonizar casi todo tipo de ambiente.

Los ensayos de temperatura y pH revelaron que estos factores influyentes en el crecimiento de las levaduras. Respecto a temperatura, se sugiere que el 90% pueden considerarse psicrófilas, cuya temperatura máxima de crecimiento no sobrepasa los 20 °C y, únicamente una especie, *Lecythophora* sp. fue capaz de crecer a 37 °C. En relación al crecimiento en medio acidificado, el 70% mostró un amplio rango de crecimiento en medio ácido (entre 2,5 y 6,5). *Rhodotorula mucilaginosa*, a pesar de presenta un amplio rango de crecimiento (entre 2,5 y 6,5), se puede identificar como acidófila, pues su pH óptimo de crecimiento está entre 2,5 y 4,5.

Debido a las características extremófilas, en cuanto a la resistencia a bajas temperaturas y pH de las levaduras aisladas del volcán Tungurahua, estas se proponen como potencialmente aplicables en la industria biotecnológica.

ABSTRACT

The Tungurahua volcano is an extremophile ecosystem due to its physicochemical features, which must be endured by organisms who live in it. Yeast diversity was studied at thirteen sampling points, from slopes to top of the volcano. Twelve yeast were isolated and, after physical (macro- and microscopic) and molecular characterization, only ten different strains were found. After phylogenetic analysis, strains were classified in five orders and, similarly, in two families: Basidiomycota and Ascomycota.

Cryptococcus and *Rhodotorula* genera were also isolated from others volcanic ecosystems. Likewise, *Rhodotorula mucilaginosa* is considered as ubiquitous yeast because it is able to growth in all kind of hábitats.

Assays of temperature and pH showed that yeast growth were influential by them. Regard to temperature, 90% of volcanic yeasts were classified as psicrophilic, with a maximum temperature value is 20 °C and, only one specie, *Lecythophora sp.* was capable to growth at 37 °C. Regarding to growth in acidic media, 70% of yeast had a wide growth pH range (among 2,5 – 6,5). Despite to *Rhodotorula mucilaginosa* showed a wide growth range, could be classified as acidophilic because its optimal growth is between pH 2,5 – 4,5.

Given extremophilic features of yeast isolated from Tungurahua volcano, resistance to low temperatures and pH, could be applied in the biotech industry.

INTRODUCCIÓN

La Cordillera Andina está formada por una cadena larga y continua de montañas de gran altitud, ubicada en la zona occidental de Suramérica. Uno de los países que forma parte de esta cordillera es Ecuador, el cual, pese a su limitado territorio (256 370 km²), es uno de los 17 países clasificados como megadiversos del mundo y, el más biodiverso si se considera el número de especies respecto a su extensión geográfica **(MAE, 2007)**. En este término se incluyen tanto la presencia de una elevada diversidad biológica y genética, como de una multitud de variedades de ecosistemas y microecosistemas **(Bravo, 2013)**. A grandes rasgos, Ecuador puede dividirse en cuatro regiones: Amazonía, Islas Galápagos, Costa Pacífica y Cordillera Andina. Dentro de esta última destaca el ecosistema de tipo volcánico, que se pone de manifiesto con la presencia de 84 volcanes (entre activos y extintos) **(IG, 2015)**.

Los volcanes, junto a géiseres, profundidades marinas, salares, desiertos y lagos alcalinos, conforman el conjunto de ecosistemas considerados extremos **(Vincent et al., 2004)**. Respecto a pH, los ecosistemas acuáticos acidificados directamente por la cercanía a algún volcán son interesantes para el entendimiento de la capacidad de ácido tolerancia de la biota y las características de ecosistemas ácidos **(Satake et al., 1995; Gadanho et al., 2006, Russo et al., 2008)**. Por otra parte, la Cordillera Andina comprende la mayor extensión con temperaturas bajas dentro del cinturón tropical de la Tierra. Estas temperaturas son características de zonas montañosas donde la temperatura anual promedio en zonas con más 3000 m.s.n.m. es menor a 5 °C, disminuyendo progresivamente conforme se incrementa la altura **(Satyanara et al., 2005)**. De acuerdo a **Morita, (2000)**, los ecosistemas que permanecen nevados por más de un año se consideran psicrófilos, como por ejemplo el volcán Tungurahua, cuya temperatura promedio durante 2015 (último reporte) fue de 3,9 °C **(IG, 2015)**. Indicando así que éste es un ecosistema idóneo para el estudio de microorganismos con mecanismos para soportar bajas temperaturas.

Como se comenta previamente, los ecosistemas extremos actúan como nichos perfectos para organismos caracterizados por su capacidad de adaptación a condiciones limitantes de pH, temperatura, salinidad, radiación (incluyendo radiación UV) y/o presencia de sustancias tóxicas, recibiendo por tal motivo la denominación de organismos extremófilos (**Mueller et al., 2002, Sittenfeld et al., 2002**). El estudio de microorganismos extremófilos ha despertado un gran interés en los últimos años, fundamentalmente por su elevado potencial en el área de la biotecnología, (**Niehaus et al., 1999, Margesin & Schinner 2001, González-Toril et al., 2003**) debido a las propiedades estructurales y fisiológicas propias de estos microorganismos que les permiten soportar condiciones ambientales extremas. Esta característica se debe fundamentalmente a la producción de biomoléculas específicas (lípidos, enzimas, osmolitos, etc.) que han sido estudiadas como nuevas fuentes con potencial biotecnológico (**Canganella et al., 2011**). Cuando se habla de microorganismos extremófilos, directamente se apunta hacia microorganismos de tipo procarionta, sin embargo, se puede encontrar vida microbiana eucariota asociada a cualquier condición, siempre que exista una fuente de energía para mantenerla (**Aguilera, 2013**). En este contexto, los avances en técnicas moleculares y su aplicación en microbiología, han puesto de manifiesto la diversidad eucariota asociada a numerosos entornos, incluyendo ecosistemas extremos (**Caron et al., 2004**). Entre los eucariotas extremófilos autótrofos destacan las algas fotosintéticas como *Chlamydomonas nivalis*, frecuentemente asociada a elevada altitud, la cual permanece fotosintéticamente activa frente a bajas temperaturas o altos niveles de radiación ultravioleta (**Stibal et al., 2006**). Aunque en menor medida, también existen estudios que identifican eucariotas heterótrofos asociados a ecosistemas extremos. Entre estos destacan las levaduras y hongos filamentosos, como por ejemplo *Rhodotorula* sp. frecuentemente asociada a aguas residuales de la minería. Existen varios trabajos sobre el estudio de la diversidad de levaduras asociada a ambientes extremos, **Boguslawska-Was et al., en 2001** aislaron e identificaron levaduras del Lago Szczecin (mar Báltico, Polonia), altamente contaminado por metales pesados. En cuanto a ecosistemas acidófilos, se han conseguido aislar levaduras

extremófilas del Lago Caviahue (Patagonia, Argentina) y de las minas de Río Tinto (España) (**Gadanho *et al.*, 2006, Russo *et al.*, 2008**).

El presente trabajo supone el primer estudio sobre la diversidad de levaduras asociada a un volcán: Tungurahua, Ecuador. Además, realiza un análisis comparativo con la diversidad de levaduras presente a otros ecosistemas volcánicos a lo largo del mundo. Finalmente, se determina el efecto del pH ácido y un amplio rango de temperaturas sobre el crecimiento microbiológico al fin de conocer la capacidad extremófila de dichas levaduras.

CAPÍTULO I

EL PROBLEMA

1.1. Tema de la investigación

Primer estudio sobre la diversidad de levaduras asociada a un volcán: Tungurahua, Ecuador.

1.2. Justificación

Ecuador está considerado uno de los países con mayor biodiversidad a nivel mundial, sin embargo, existen escasos estudios sobre especies autóctonas del país. Dentro de la multitud de ecosistemas, destaca el ecosistema volcánico, con presencia de 84 volcanes a lo largo de toda la cordillera andina ecuatoriana. Estos ambientes se consideran extremos por sus fluctuaciones de temperatura, rangos variables de pH, disponibilidad de agua, altos niveles de radiación, concentración de metales pesados y otras sustancias tóxicas. Estos hábitats están colonizados por microorganismos especialmente adaptados para sobrevivir en condiciones extremas, por lo que son denominados extremófilos. En este contexto, los volcanes se convierten en nichos idóneos para este tipo de organismos.

Desde el punto de vista biotecnológico, los organismos extremófilos ofrecen gran interés dada su aplicabilidad. En los últimos años, este estudio se ha centrado en extremófilos de tipo procariota, sin embargo, son pocos los dedicados a microorganismos eucariotas extremófilos, como levaduras.

Con la presente investigación se ofrece el primer estudio sobre la diversidad de levaduras asociada a un volcán, así como el análisis de su condición de extremófilas. Además, mediante recopilación bibliográfica, se presenta un análisis comparativo sobre diversidad de levaduras asociada a

ecosistemas volcánicos a lo largo del mundo. De esta manera, se completa un estudio preliminar, fundamental para fomentar la aplicabilidad biotecnológica de especies extremófilas de levaduras autóctonas de Ecuador, dando así valor agregado a la biodiversidad propia del país.

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo general

Aislar, identificar y caracterizar la comunidad de levaduras asociada al volcán Tungurahua, Ecuador.

1.3.2. Objetivos específicos

1. Analizar fisicoquímicamente las muestras recolectadas del volcán Tungurahua.
2. Identificar molecularmente las especies de levaduras asociadas al volcán.
3. Analizar filogenéticamente la comunidad de levaduras en el volcán Tungurahua y compararla con la presente en otros ecosistemas volcánicos.
4. Evaluar el efecto del pH y la temperatura sobre el crecimiento de las levaduras autóctonas del volcán.

CAPÍTULO II MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes investigativos

El suelo ha sido estudiado como fuente de levaduras por su importancia en los procesos ecológicos. Se han aislado levaduras de diferentes tipos de suelos y regiones climáticas, identificando que, los géneros *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Dioszegia*, *Kodamaea*, *Leucosporidium*, *Leucosporidiella*, *Metschnikowia*, *Nadsonia*, *Pichia*, *Rhodotorula*, y *Sporidiobolus* son típicos de ecosistemas terrestres (**Vaz et al., 2011**).

En el Ecuador se han realizado varios estudios sobre la diversidad de levaduras asociadas a ecosistemas terrestres. Por ejemplo, *Candida carvajalis* fue aislada por primera vez de escombros de hojas y raíces podridas de árboles de la región amazónica (**James et al., 2009**), mientras que, de la Reserva Ecológica y Bosque Nublado Maquipucuna se obtuvo la levadura *Saturnispora quitensis*, y también, *Candida ecuadorensis* proveniente de dos provincias del Ecuador, (Orellana y Bolívar) (**James, et al., 2013**). Asimismo *Kodamaea transpacifica* aislada de las Islas Galápagos y Malasia, evidenciando contacto humano entre estas dos culturas (**Freitas et al., 2013**) y, *Kazachstania yasuniensis*, la especie más recientemente, encontrada en el Ecuador continental y en las Islas Galápagos (**James et al., 2015**).

La Universidad Católica del Ecuador (PUCE) y la Secretaría Nacional de Educación Superior, Ciencia, Tecnología e Innovación (SENESCYT), fundaron en 2006, la Colección de Levaduras de la Universidad Católica del Ecuador (CLQCA) para el estudio y preservación de la biodiversidad de levaduras del país, donde reposa el material genético descubierto en territorio ecuatoriano (**Carvajal, 2014**).

Uno de los ambientes menos estudiados en el planeta son las zonas frías, especialmente las que permanecen cubiertas de hielo y nieve. Estos

ecosistemas únicos ocurren en montañas, especialmente en los Andes e Himalaya (**Schmidt *et al.*, 2012**).

A pesar de que existen estudios en ecosistemas volcánicos (río Agriolago Caviahue, Argentina, monte Erebus, Antártica, montaña submarina Vailulu'u, Samoa), no se ha reportado ninguna investigación sobre la diversidad de levaduras a lo largo de un volcán (desde las faldas hasta la cumbre). Es por esto que se considera relevante este estudio, debido al aporte del conocimiento de la diversidad de levaduras asociadas a ecosistemas volcánicos del Ecuador.

2.2. Hipótesis

2.2.1 Diversidad de levaduras asociadas al volcán Tungurahua.

Hipótesis Nula

No existen levaduras asociadas al volcán Tungurahua.

Hipótesis Alternativa

Existen levaduras asociadas al volcán Tungurahua.

2.2.2 Comparación de la diversidad de levaduras asociada al volcán Tungurahua respecto a la diversidad asociada a otros ecosistemas volcánicos

Hipótesis Nula

La diversidad de levaduras asociada al volcán Tungurahua no es similar a la de otros ecosistemas volcánicos.

Hipótesis Alternativa

La diversidad de levaduras asociada al volcán Tungurahua no es similar a la de otros ecosistemas volcánicos.

2.2.3 Análisis del carácter extremófilo de las levaduras aisladas del volcán Tungurahua

Hipótesis Nula

El pH y la temperatura no tienen influencia en el crecimiento de las levaduras aisladas del volcán Tungurahua.

Hipótesis Alternativa

El pH y la temperatura tienen influencia en el crecimiento de las levaduras aisladas del volcán Tungurahua.

2.3. Señalamiento de variables de la hipótesis

Caracterización fenotípica de levaduras aisladas del volcán Tungurahua

- Aislamiento y purificación de levaduras propias del volcán Tungurahua.
- Caracterización macro y microscópica de las levaduras aisladas.
- Efecto de la temperatura sobre el crecimiento de las levaduras.
- Influencia de la acidez sobre el crecimiento de las levaduras.

Análisis filogenético de levaduras aisladas del volcán Tungurahua

- Aislamiento de ADN genómico.
- Cuantificación de ADN genómico por espectrofotometría y electroforesis en gel de agarosa.
- Secuenciación de la región 5.8S-ITS y el dominio D1/D2 para la identificación de géneros y especies de levaduras.

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Materiales

PDA (agar papa dextrosa), (Difco™, Francia), caldo YM (yeast and moulds); microesferas de vidrio (ϕ 0,4 μ m) (Sigma-Aldrich, USA), ARNasa (Sigma®, USA); buffer para PCR, oligonucleótidos (ITS1, ITS2, NL2 Y NL4), dNTP mix, MgCl₂ (Invitrogen, Brasil); Taq polimerasa, kit PureLink® PCR Purification, ladder de 100 pb y 1 kb plus, SyberSafe (Invitrogen, USA).

3.2. Métodos

3.2.1. Estudio del área y toma muestras

El volcán Tungurahua (TNG), con 5020 m de altura, está ubicado en la Cordillera Andina del Ecuador a 33 km al sur-este de Ambato, entre las provincias de Tungurahua y Chimborazo (Figura 1). Desde el siglo XIII el Tungurahua ha estado en constante actividad, produciendo erupciones con flujos piroclásticos y caídas de ceniza al menos una vez por siglo (**LePennec et al., 2011**). El período eruptivo actual se inició en 1999, desde entonces el volcán ha mantenido episodios de actividad intermitentes que varían entre pocos días a semanas, con pausas en la actividad de hasta 3 meses (**IG, 2015**).

Con el fin de obtener un muestreo representativo del área de estudio, se delimitaron 13 puntos desde las faldas del volcán hasta zonas cercanas al cráter, codificados con las siglas TNG (TuNGurahua) y el número de punto. De cada uno de ellos se tomaron muestras, sólidas o líquidas, por triplicado (Figura 1), las cuales se trasladaron al laboratorio bajo refrigeración para iniciar con el aislamiento selectivo de levaduras.

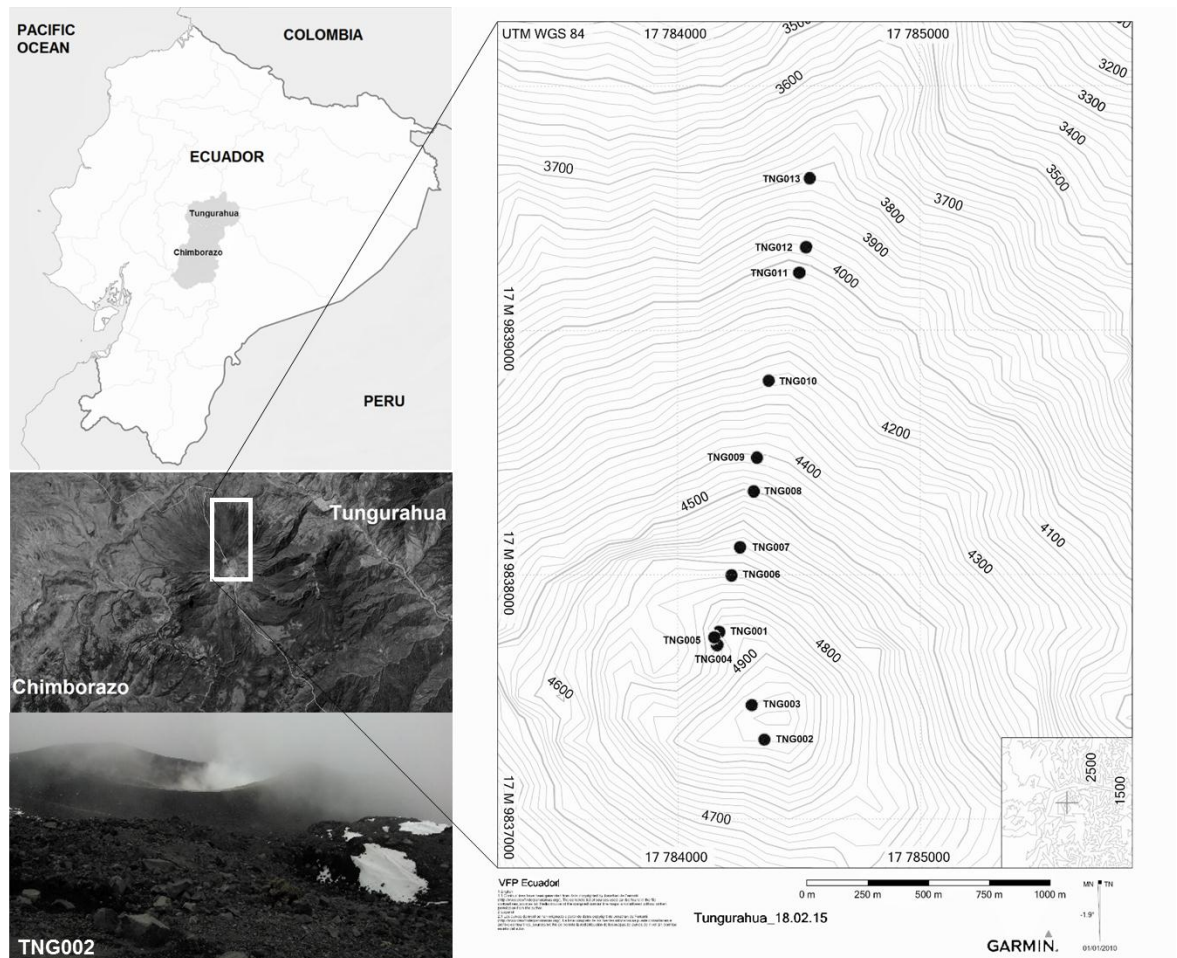


Figura 1. Localización y puntos de muestro del volcán Tungurahua.

3.2.2. Aislamiento y caracterización de levaduras

Cada muestra de suelo se suspendió en agua destilada estéril en una proporción 1:1,5 (p/p) mientras que, la muestra de agua se conservó en su forma original. Éstas se homogeneizaron a temperatura ambiente ($20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$) durante treinta minutos a 250 r.p.m. utilizando un agitador (New Brunswick, USA) para liberar los microorganismos de las partículas de suelo (**Mestre *et al.*, 2009**). A partir de estas mezclas se realizaron diluciones decimales hasta alcanzar el factor 1/10 en cajas Petri con medio de cultivo PDA (gL^{-1} : almidón de papa 4,0; dextrosa 20,0; agar 15,0) (Difco TM, Francia) suplementado con sulfato de estreptomina (SIGMA[®], USA) a una concentración de 50 $\mu\text{l/ml}$, con la finalidad de evitar el desarrollo de colonias bacteriana. Se inocularon 150 μl de la muestra original, así como de la primera

dilución y, se dispersó por la superficie mediante la técnica de difusión en placa. Este procedimiento se realizó por triplicado para cada muestra recolectada. Las cajas Petri fueron incubadas por un período de 48 horas a temperatura ambiente ($20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$). A partir de la diversidad microbiana obtenida se realizaron estrías simples en el mismo medio utilizado para el aislamiento. Las cajas Petri se incubaron bajo las condiciones iniciales, respecto a tiempo y temperatura.

Las colonias aisladas se examinaron en el microscopio de contraste de fases (EVOS XL Imaging System - Life Technologies) en fase brillante, con el lente de 400 aumentos para descartar colonias bacterianas que posiblemente sean resistentes al antibiótico utilizado. Del total de colonias aisladas mediante estría simple, las identificadas como levaduras se purificaron en estría compuesta en cajas Petri con PDA para la caracterización macroscópica y microscópica atendiendo a la base de datos del Centro de biodiversidad Fúngica, (CBS-KNAW, 2011).

(<http://www.cbs.knaw.nl/collections/Biolomics.aspx?Table=Yeasts%202011>).

Con la finalidad de preservar las muestras, una alícuota de cada cultivo se transfirió a tubos de dilución con 3 ml de medio YM líquido (gL^{-1} : glucosa 20,0; extracto de levadura 3,0; extracto de malta 3,0) los cuales se agitaron a 150 r.p.m. durante 24 horas a temperatura ambiente. Transcurrido este período, se almacenaron los cultivos en tubos eppendorf de 1,5 ml (700 μl del cultivo líquido en 300 μl de solución de glicerol al 50%) a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ y a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.2.3. Extracción de ADN genómico

Para la extracción de ADN se reprodujo el protocolo utilizado por **Serrano-Bueno et al., 2013**. Las levaduras se crecieron en medio líquido YM a temperatura ambiente durante 24 horas. Se recogió la biomasa en tubos eppendorf de 1,5 ml por centrifugación, a 13 000 r.p.m durante dos minutos. A continuación, se realizaron dos lavados con agua destilada estéril. Tras el último lavado se centrifugó nuevamente en las mismas condiciones y se retiró

el sobrenadante. El pellet resultante se resuspendió en 200 µl de reactivo Hoffman (Tris-HCl 10 mM (pH 8), Tritón X-100 2%, SDS 1%, NaCl 100 mM y EDTA 1 mM). A continuación, para la rotura celular, se adicionó el equivalente a un volumen de 100 µl de perlas de vidrio 0,4-0,6 mm de diámetro (Sigma-Aldrich, USA) y se agitaron en un vórtex dos veces durante un minuto cada una. Para la extracción de ADN se añadieron 200 µl de una mezcla 1:1 (v/v) de fenol: cloroformo y se agitó en un vórtex durante dos minutos. Seguidamente, se eliminó el sobrenadante y se adicionaron 200 µl de mezcla de Hoffman y 200 µl de fenol: cloroformo 1:1 (v/v). Para precipitar el ADN, se centrifugó la mezcla a 13 000 r.p.m durante diez minutos y se recuperó la fase acuosa a la que fueron incorporados 10µl de NaCl 3M y 500 µl de isopropanol. A continuación, se eliminó el sobrenadante y, se evaporó la fase líquida remanente en un temobloque (Labnet, Taiwán) a 65 °C durante diez minutos aproximadamente. Finalmente, el ADN se resuspendió en 20 µl de agua desionizada ultrapura (Invitrogen, USA) adicionando 0,05% (p/v) de ARNasa A (Sigma®, USA). El ADN fue conservado a -20 °C.

3.2.4. Amplificación de la región 5.8S-ITS y el dominio D1/D2 mediante PCR

Se amplificaron dos regiones de ADN ribosomal cuyas secuencias son ampliamente utilizadas en la identificación molecular de levaduras, la región 5.8S-ITS y el dominio D1/D2 (Figura 2).

La región 5.8S-ITS se amplificó mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los primers ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (**White et al., 1990**). El dominio D1/D2 se amplificó utilizando el oligonucleótido directo NL1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') y, como oligonucleótido reverso NL4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAG ACGG-3') (**EI-Latif Hesham et al., 2006**).

Todas las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un volumen final de 50 µl que contenía: 40 µl de agua ultrapura, en la cual se suspendieron 5

µl de buffer 10x para PCR (Invitrogen, Brasil), 0,5 µl de cada oligonucleótido, 1 µl de dNTP mix 10 mM (Invitrogen, Brasil), 1,5 µl de MgCl₂ 50 mM (Invitrogen, Brasil), 1 µg de ADN genómico y, 0,5 µl de Taq polimerasa (Invitrogen, USA). Las amplificaciones se realizaron en un termociclador MultiGene (Labnet, USA). Una vez desnaturalizado el ADN (94 °C por 5 minutos) se sometió a 35 ciclos sucesivos de denaturalización del ADN molde (94 °C, 30 segundos), seguida del alineamiento de los oligonucleótidos en los extremos correspondiente (55 °C, 30 segundos) y la elongación de la cadena (72 °C, 1 minuto) y, finalmente se incubó a 72 °C por diez minutos.

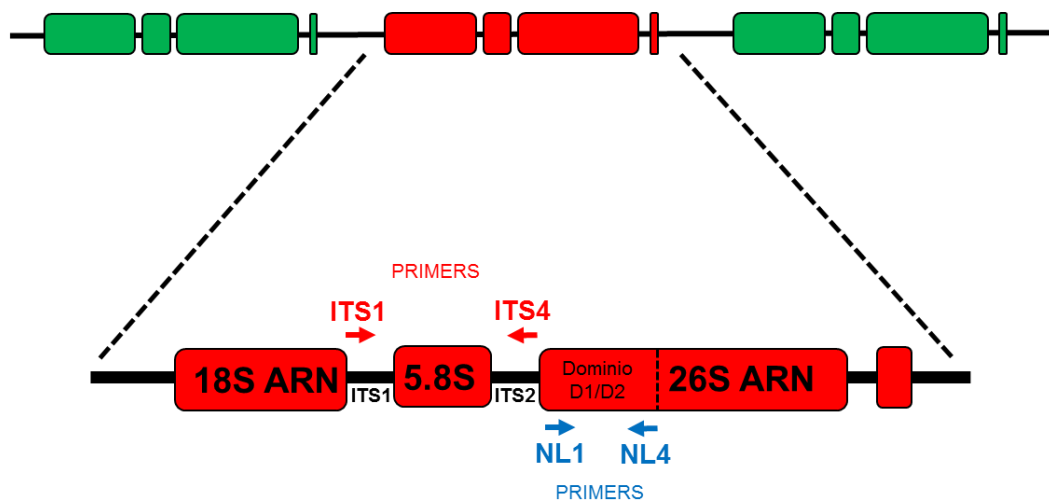


Figura 2: Región 5.8S-ITS y dominio D1/D2 del ADN ribosómico de levaduras y posición de los primers utilizados para amplificarlas por PCR.

3.2.5. Electroforesis de ADN en geles de agarosa

Los fragmentos amplificados fueron separados mediante electroforesis en geles de agarosa teñido con SyberSafe (Invitrogen, USA) para la detección y visualización de ADN. El gel se preparó con búfer TBE (Tris-H₃BO₃ 90 mM (pH8) y EDTA 2 mM). Cuando se necesitó separar fragmentos de 1 kb o mayores se utilizó un gel de agarosa al 1,0 % y, para fragmentos de peso molecular inferior a 1 kb se utilizaron geles de agarosa al 0,8 %. Las muestras se prepararon con 5 µl de ADN genómico o producto de PCR y 2 µl de tampón de carga (Invitrogen) que fueron colocados en los pocillos del gel. Como

marcador molecular se utilizó un ladder de 1 kb (Invitrogen, USA) para las bandas de ADN genómico mientras que, las bandas de los productos de PCR fueron comparadas con un ladder de 100 pb (Invitrogen, USA).

3.2.6. Secuenciación de la región 5.8S-ITS y el dominio D1/D2

Los productos de PCR, 5.8-ITS y D1/D2, fueron purificados utilizando el kit PureLink® PCR Purification (Invitrogen, USA) y directamente enviados a secuenciar a través de la empresa Macrogen USA, la cual utiliza el equipo Applied Biosystems 3730xl DNA Analyzer. Para las reacciones de secuenciación se utilizaron los mismos primers que para la amplificación por PCR, ITS1-ITS4 y NL1-NL4.

3.2.7. Alineamiento y análisis filogenético

Las secuencias obtenidas, se sometieron a un alineamiento utilizando la base de datos GenBank y el software de alineamiento local de secuencias BLAST. El análisis filogenético se realizó mediante la construcción de árboles filogenéticos utilizando el software MEGA versión 6.0.

3.2.8. Efecto de la temperatura sobre el crecimiento de las levaduras

Para evaluar el efecto de la temperatura sobre el crecimiento de levaduras aisladas previamente del volcán Tungurahua, se empleó el método de goteo en placa (**Serrano-Bueno et al., 2013**). Inicialmente se crecieron las levaduras en medio de cultivo YM a 150 r.p.m. durante 24 horas a temperatura ambiente. A continuación, de cada preinóculo se realizaron diluciones seriadas en agua estéril a 10^0 , 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4} células/ml. Finalmente, se sembraron 2,5 μ l de cada una de ellas sobre cajas Petri con medio PDA y se incubaron a 4 °C, 20 °C, 37 °C y 42 °C, tomando como control la temperatura de aislamiento (20 °C).

3.2.9. Efecto de la acidez sobre el crecimiento de las levaduras

Para evaluar el efecto de la acidez sobre el crecimiento de levaduras inicialmente se crecieron las levaduras en medio de cultivo YM a 150 r.p.m. durante 24 horas a temperatura ambiente. A continuación, se transfirió una alícuota a medio de cultivo YM acidificado con H₂SO₄ (10%) en un rango de pH desde 1,5 hasta 6,5, hasta obtener cultivos con D.O.₆₀₀ igual a 0,1 en todos los casos. Finalmente, se evaluó el crecimiento mediante el aumento de la D.O.₆₀₀ a lo largo del tiempo.

3.3. Estadística

Todos los experimentos planteados en este proyecto de trabajo de titulación se realizarán por triplicado. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba no paramétrica Chi-cuadrado (X^2) con $p \leq 0,05$.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Análisis y discusión de los resultados

4.1.1. Análisis filogenético de levaduras asociadas al volcán Tungurahua

4.1.1.1. Características fisicoquímicas del volcán Tungurahua

Con el fin de obtener un muestreo representativo de las levaduras asociadas al volcán Tungurahua, se establecieron trece puntos de muestreo, doce correspondientes a muestras sólidas (sedimentos) y uno, el de más baja altura (3800 m.s.n.m.), a una muestra líquida (Tabla I).

Tabla I: Parámetros fisicoquímicos del volcán Tungurahua

Punto de muestreo	Ubicación (coordenadas UTM)	Altitud (m.s.n.m)	Muestra	pH
TNG001	17 M 784170 9837765	4887	Sedimento	7,12±0,07
TNG002	17 M 784357 9837325	5018	Sedimento	4,61±0,13
TNG003	17 M 784302 9837466	4981	Sedimento	4,89±0,30
TNG004	17 M 784163 9837712	4927	Sedimento	4,62±0,14
TNG005	17 M 784149 9837743	4908	Sedimento	5,98±0,13
TNG006	17 M 784224 9837997	4751	Sedimento	5,35±0,04
TNG007	17 M 784256 9838112	4678	Sedimento	5,45±0,06
TNG008	17 M 784315 9838341	4533	Sedimento	4,66±0,16
TNG009	17 M 784331 9838479	4453	Sedimento	5,14±0,12
TNG010	17 M 784378 9838795	4299	Sedimento	5,38±0,38
TNG011	17 M 784503 9839235	4049	Sedimento	5,91±0,84
TNG012	17 M 784532 9839340	3988	Sedimento	5,42±0,25
TNG013	17 M 784546 9839622	3870	Agua	5,17±0,01

UTM: sistema de coordenadas universal transversal de Mercator.

Los valores de pH medidos *in-situ* se indican en la Tabla 1. El área del volcán Tungurahua corresponde a una zona con tendencia a pH ácido-neutro. Los valores más bajos (pH~5) se registraron a una altura entre 4500 y 4800 m.s.n.m., en los puntos TNG002, TNG003, TNG004, TNG008, en tanto que, el valor más alto (pH~7) se encontró a 4887 m.s.n.m. en el punto TNG001. Otras zonas volcánicas como Pisciarelli, Italia, el Parque Nacional Yellowstone, Estados Unidos, río Agrio y el lago Caviahue, Argentina también registran valores de pH bajos, entre 2,1 y 6,7 (**Gross, et al., 1998; Russo, et al., 2008**), por lo que se puede concluir que el pH del volcán Tungurahua no muestra diferencias con respecto al de otras áreas volcánicas alrededor del mundo.

4.1.1.2. Aislamiento y caracterización de levaduras

Tras aislar las colonias de cada punto de muestreo, según se describe en el apartado 3.2.2, se realizó la caracterización macro y microscópica con el fin de descartar microorganismos de origen bacteriano. Para tal fin, se utilizaron los parámetros establecidos por el Centro de Biodiversidad Fúngica (CBS-KNAW - <http://www.cbs.knaw.nl/>) (Tabla II).

Tabla II: Parámetros para la caracterización macroscópica y microscópica de levaduras.

TEXTURA		APARIENCIA		COLOR	MARGEN		FORMA CELULAR	
A	fluida	E	aracnooidea	blanco	K	entero	N	limón
B	mucoidea	F	harinosa	crema	L	erosionado	O	triangular
C	butirosa	G	suave	amarillo	M	otro	P	luna
D	membranosa	H	venosa	anaranjado			Q	alantoides
		I	verrugosa	rosado			R	redonda
		J	surcada	rojo			S	ovalada
				cuero			T	cilíndrica
				café oscuro-negro			U	fusiforme
							V	campana

Fuente: CBS-KNAW

Finalmente se lograron aislar un total de doce levaduras, distribuidas en siete de los trece puntos de muestreo (TNG001, TNG003, TNG004, TNG006, TNG008, TNG009, TNG012) (Figura 3) mientras que, en los restantes seis puntos (TNG002, TNG005, TNG007, TNG010, TNG011, TNG013) no se aisló ninguna. Por lo tanto, con respecto a la distribución de levaduras, existe variabilidad en los puntos de muestreo, es decir, la presencia de estos microorganismos no está ligada a factores como pH o altitud.

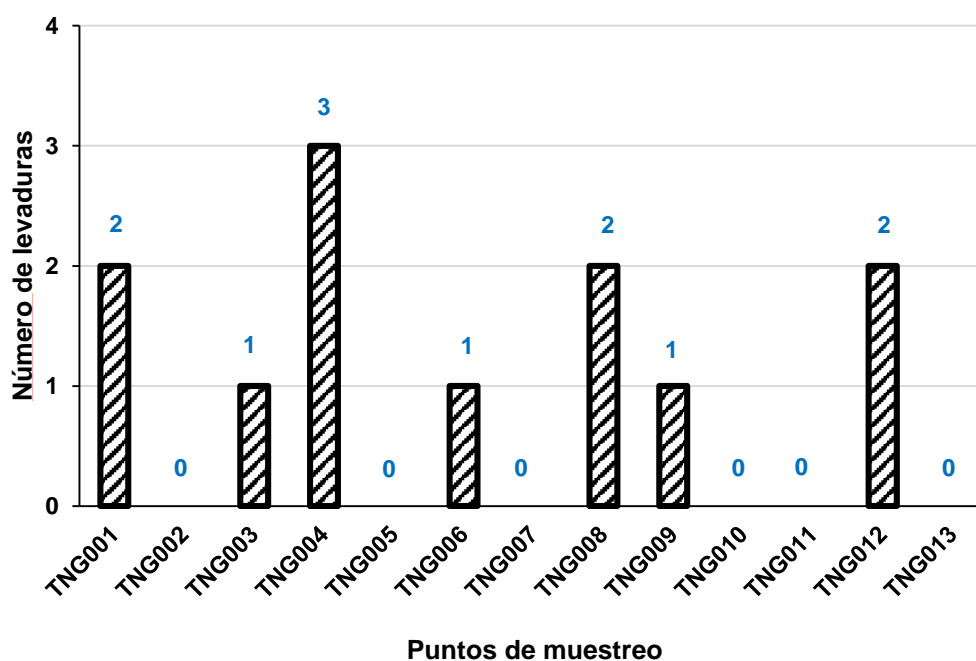


Figura 3: Distribución de levaduras a lo largo del volcán Tungurahua. En la figura se representa el número de levaduras aisladas a partir de cada punto de muestreo (azul).

Respecto a la textura de la colonia, nueve levaduras fue del tipo butirosa, dos de tipo membranosa y, tan solo una cepa presentó textura mucoidea, no encontrándose ninguna levadura con textura fluida. En cuanto a la apariencia de la colonia, nueve de las doce cepas aisladas presentaron apariencia suave, mientras que el resto fue del tipo surcada. El color de las colonias, fue un parámetro más diversificado entre las levaduras aisladas, obteniéndose tres cepas blancas, cinco cremas, una anaranjada y tres color cuero. Respecto al margen de la colonia, ocho cepas, presentaron margen entero, el resto se consideró con otro margen, puesto que no se adecuaba ni al margen entero ni al margen erosionado. Finalmente, como último parámetro

macroscópico, se analizó la difusión de pigmentos, observándose esta característica tan solo en dos cepas, (TNG001.1 y TNG001.3) ambas presentes en el primer punto de muestreo (TNG001).

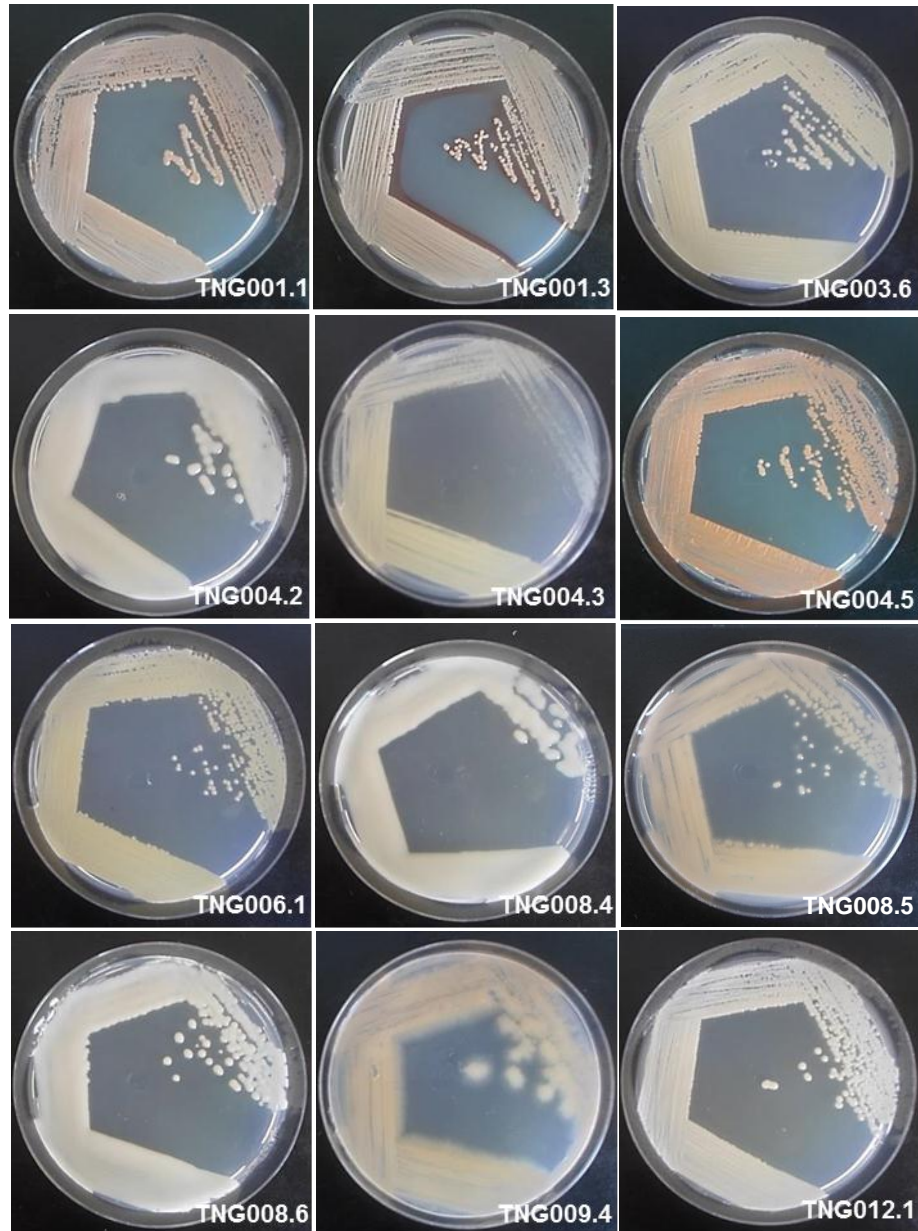


Figura 4. Morfología macroscópica de levaduras aisladas del volcán Tungurahua. Se muestran fotografías de estrías compuestas de cada cepa de levadura.

Tabla III: Parámetros macroscópicos de levaduras aisladas del volcán Tungurahua

CÓDIGO	TEXTURA				APARIENCIA							COLOR							MARGEN			PIGMENTO DIFUSIBLE
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J									K	L	M	
TNG001.1	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+							+	-	-	+
TNG001.3	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+							+	-	-	+
TNG003.6	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-							+	-	-	-
TNG004.2	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+								-	-	-	-
TNG004.3	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+							-	-	-	+
TNG004.5	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+								+	-	-	-
TNG006.1	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-							+	-	-	-
TNG008.4	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+								-	-	-	+
TNG008.5	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-							-	-	-	+
TNG008.6	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+							+	-	-	-
TNG009.4	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-							+	-	-	-
TNG012.1	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-							+	-	-	-

+: presencia, -: ausencia.

En cuanto a la caracterización microscópica se definió únicamente la forma celular de cada levadura. De las doce levaduras aisladas se encontraron cinco cepas, lo que representa el 42%, con forma celular cilíndrica mientras que, cuatro de ellas, el 33%, son células redondas y el 25% (tres levaduras) ovaladas (Tabla IV). Del resto de formas: limón, triangular, luna, alantoides, fusiforme y campana, no se identificó ninguna cepa.

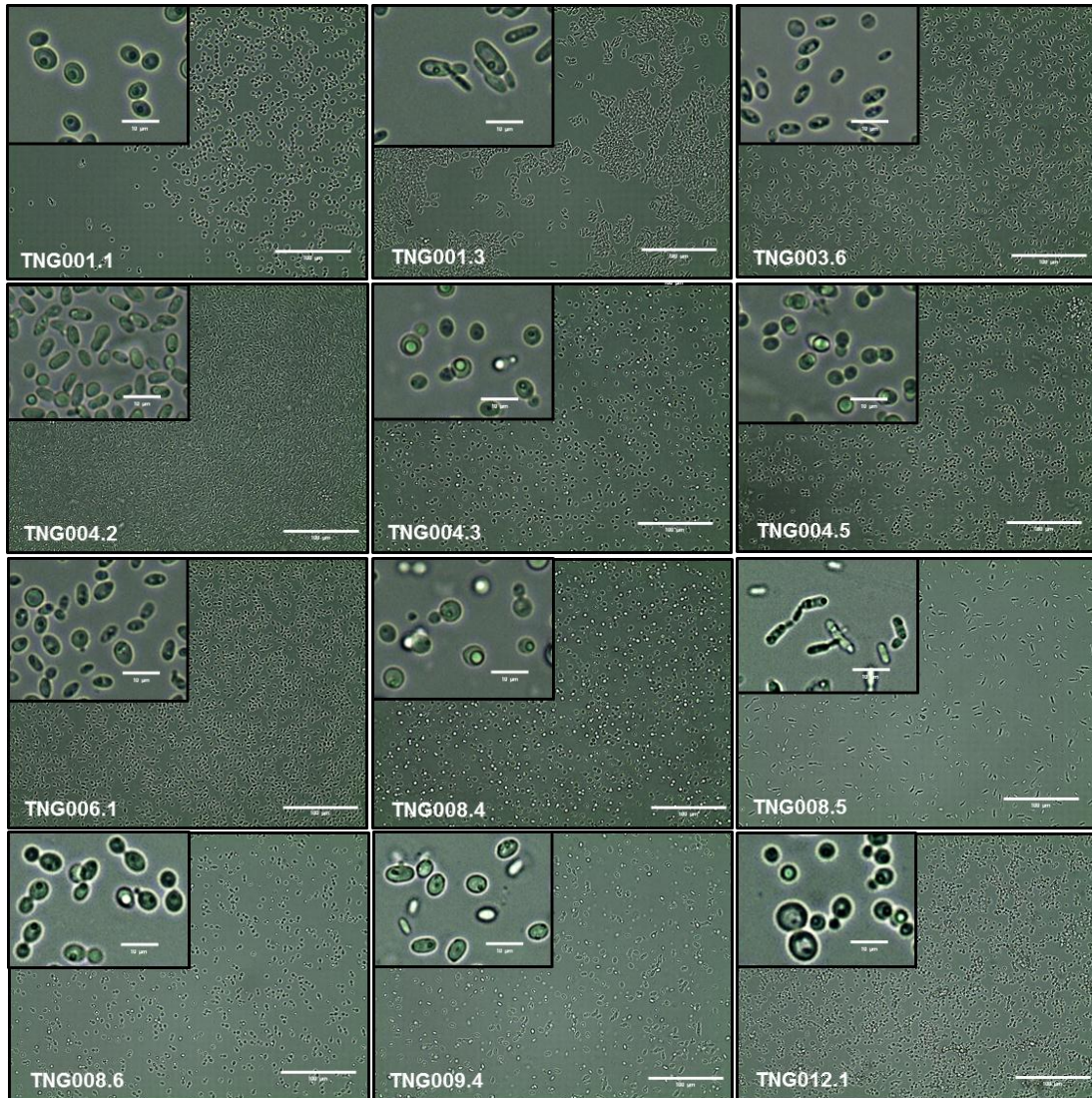


Figura 5. Morfología microscópica de levaduras aisladas del volcán Tungurahua. Se observan fotografías al microscopio de cada cepa de levadura aislada del volcán Tungurahua.

Tabla IV: Parámetros microscópicos de levaduras aisladas del volcán Tungurahua

CÓDIGO	FORMA CELULAR								
	N	O	P	Q	R	S	T	U	V
TNG001.1	-	-	-	-	-	+	-	-	-
TNG001.3	-	-	-	-	-	-	+	-	-
TNG003.6	-	-	-	-	-	-	+	-	-
TNG004.2	-	-	-	-	-	-	+	-	-
TNG004.3	-	-	-	-	+	-	-	-	-
TNG004.5	-	-	-	-	+	-	-	-	-
TNG006.1	-	-	-	-	-	-	+	-	-
TNG008.4	-	-	-	-	-	-	+	-	-
TNG008.5	-	-	-	-	+	-	-	-	-
TNG008.6	-	-	-	-	-	+	-	-	-
TNG009.4	-	-	-	-	-	+	-	-	-
TNG012.1	-	-	-	-	+	-	-	-	-

+: presencia, -: ausencia

4.1.1.3. Aislamiento de ADN genómico

Dada la escasa información ofrecida mediante el análisis macro- y microscópico de las cepas fúngicas pre-seleccionadas, en relación a la identificación de especies biológicas, se incluyó la identificación molecular como parte fundamental del presente trabajo. Para ello se inició con la extracción de ADN genómico de las doce cepas previamente aisladas según se describe en el apartado 3.2.2.

A continuación, se cuantificó por espectrofotometría la concentración ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) y pureza del ADN genómico extraído de doce levaduras (Tabla V). La concentración de ácidos nucleicos se determina a 260 nm debido a que los dobles anillos conjugados de las bases púricas y pirimídicas de las moléculas de ADN y ARN absorben luz ultravioleta en esta longitud de onda (**Martínez & Gragera, 2008**) y, en todos los casos fue igual o mayor a 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. De acuerdo a **Harju et al., 2004** a partir de 1,5 ml de cultivo líquido de levaduras se obtiene entre 1 y 3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de ADN. Únicamente en la levadura TNG001.3 se

obtuvo una concentración mayor (8,9 µg/µl), lo que produjo una banda más intensa en la visualización del ADN genómico por electroforesis en gel de agarosa (Figura 6).

Tabla V. Concentración y pureza del ADN genómico extraído de levaduras asociadas al volcán Tungurahua.

CÓDIGO	CONCENTRACIÓN [µg/µl]	PUREZA
TNG001.1	1,8	2,17
TNG001.3	8,9	1,67
TNG003.6	1,6	2,07
TNG004.2	4,5	2,06
TNG004.3	2,1	2,19
TNG004.5	1,0	1,93
TNG006.1	2,3	1,72
TNG008.4	1,6	1,99
TNG008.5	2,7	2,10
TNG008.6	2,9	2,13
TNG009.4	2,9	1,96
TNG012.1	2,0	2,08

La interferencia por contaminantes se indica por el cociente A_{260}/A_{280} que proporciona una estimación del grado de pureza del ADN o ARN. Este coeficiente se considera puro si está aproximadamente entre 1,8 y 2,0 (**Somma, s/f**). La mayoría de los valores de pureza correspondientes a ADN genómico extraído se encuentran dentro de este rango, obteniéndose bandas no degradadas en un gel de agarosa (Figura 6).

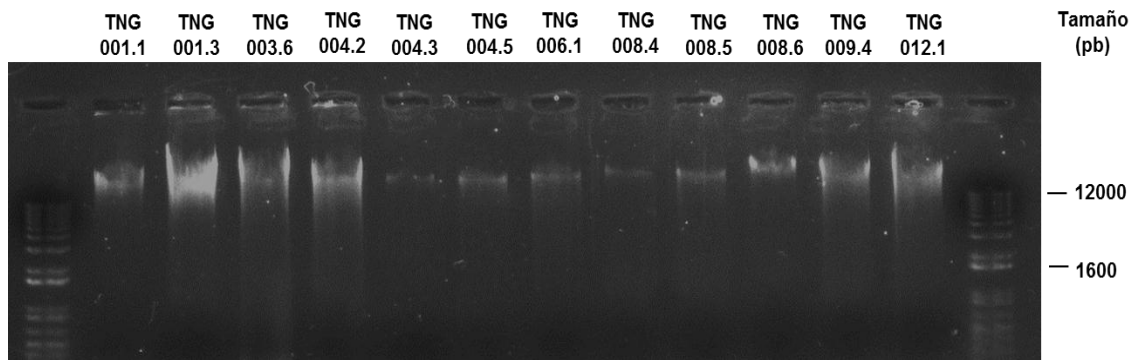


Figura 6: Electroforesis en gel de agarosa del ADN genómico extraído de las levaduras aisladas del volcán Tungurahua. Se utilizó un gel de agarosa al 0,9%. En la parte superior se muestra la codificación de cada cepa y a la derecha de la foto se indican los valores (pb) del ladder utilizado (1Kb).

Las bandas de ADN genómico extraído se ubican por encima de la primera banda de comparación (12 000 pb). Dado que está descrito que el genoma de las levaduras comprende una cantidad de alrededor de doce millones de pares de bases, los tamaños obtenidos mediante electroforesis en gel de agarosa concuerdan perfectamente, indicando que la extracción de genómico ha resultado exitosa en todos los casos (Pérez, 1997).

4.1.1.4. Amplificación de la región 5.8S-ITS y del dominio D1/D2

La región ITS (Espaciador Interno Transcrito) comprende 600 pb presentes en todas las especies de levaduras (**Kutzman & Dien, 1994**) por lo que puede ser fácilmente identificable con “primers universales” que son complementarios a las secuencias del ARNr. Esta región contiene dos sectores no codificantes que se encuentran entre la subunidad pequeña 5.8S y la subunidad grande 26S del ARNr (**Gardes & Bruns, 1993**). La región 5.8S es codificadora y conservada, por lo que no permite la delimitación entre especies, sin embargo, la zona de los ITS, que es una región no codificadora e hipervariable, permite el reconocimiento a nivel interespecífico (**Esteve-Zarzoso et al, 1999**) a partir de una muestra pequeña de ADN, diluida o altamente degradada (**Gardes & Bruns, 1991**).

Los productos amplificados por PCR de la región ITS visualizados en un gel de agarosa, presentaron diferentes longitudes de banda, comprendidas entre 350 y 650 pb (Figura 7). De forma general se pudieron identificar dos bandas con aproximadamente 400 pb (TNG001.1, TNG001.3) cuatro bandas con alrededor de 500 pb (TNG003.6, TNG004.2, TNG006.1, TNG012.1) y, seis bandas cercanas a los 600 pb (TNG004.3, TNG004.5, TNG008.4, TNG008.5, TNG008.6, TNG009.4).

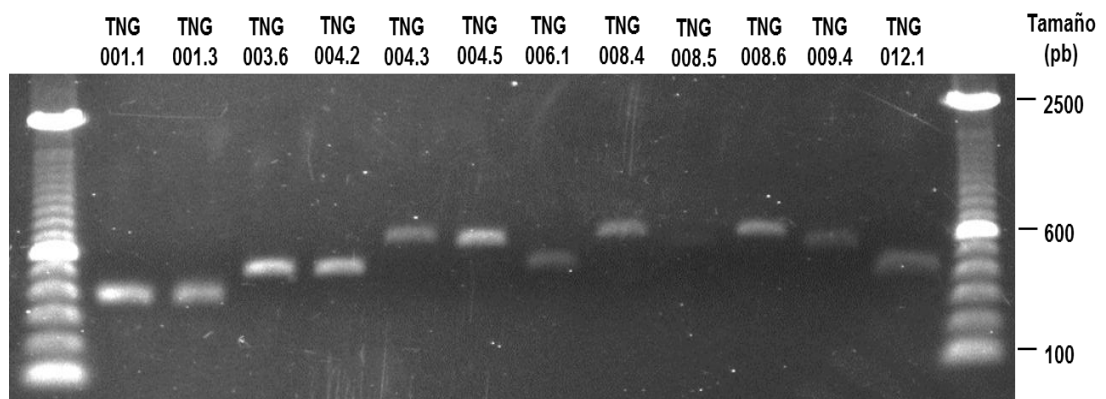


Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa de los productos amplificados por PCR de la región ITS. Codificación (arriba), ladder de comparación de 100 pb pares de bases (derecha).

Para la identificación de especies basada en el dominio D1/D2, tres o cuatro nucleótidos diferentes permiten el reconocimiento de la mayoría de especies estrechamente relacionadas (**Russo et al., 2008**).

Los productos amplificados por PCR del dominio D1/D2, visualizados en un gel de agarosa presentaron longitudes de banda entre 600 y 650 pb (Figura 8) (**Gandao et al., 2006**). Cinco de ellas, correspondientes a las levaduras: TNG001.1, TNG001.3, TNG008.6, TNG009.4 y TNG012.1, se alinean con el marcador molecular en 600 pb. El resto de bandas, (TNG 003.6, TNG004.2, TNG004.3, TNG004.5, TNG006.1, TNG008.3 y TNG008.4) presentan una longitud alrededor de 650 pb (Figura 8). En cualquier caso, se pudo verificar el tamaño y pureza del ADN con el fin de su envío para secuenciación.

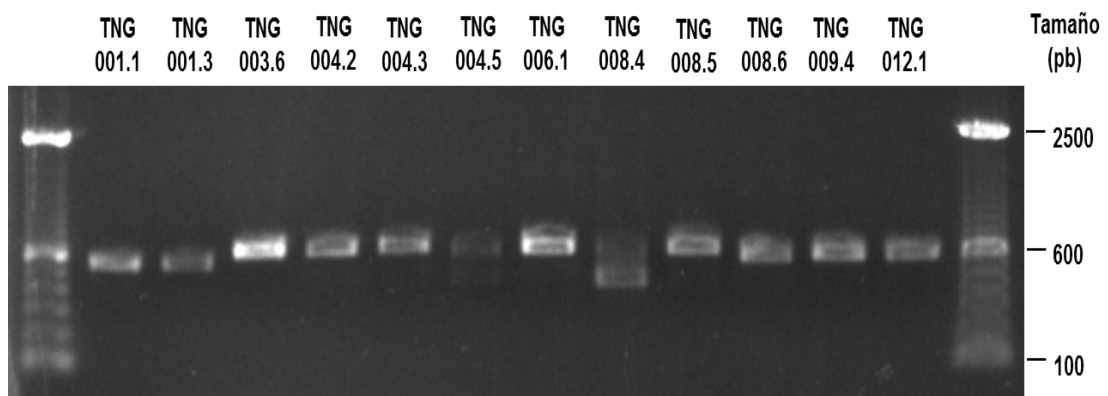


Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa de los productos amplificados por PCR del dominio D1/D2. Codificación (arriba), ladder de comparación de 100 pb pares de bases (derecha).

La secuenciación de los productos de PCR, tanto de la región ITS como del dominio D1/D2, permitieron la identificación género-especie de las doce cepas aisladas del volcán Tungurahua, obteniéndose un total de diez especies diferentes (Tabla VI), debido a que las levaduras codificadas como TNG003.6 y TNG006.1, se identificaron como *Cryptococcus* sp UFMG.BRO203, asimismo, TNG004.3 y TNG008.5 correspondieron a *Cryptococcus terricola*.

En la Tabla VI se muestran los géneros y especies con su respectivo número de acceso a la base de datos NCBI (National Center for Biotechnology Information) en la que se puede ampliar la información de cada una de las especies identificadas.

Tabla VI. Identificación de géneros y especies asociados a la base de datos NCBI

CÓDIGO	GÉNERO-ESPECIE	NÚMERO DE ACCESO NCBI
TNG001.1	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	JX423573.1
TNG001.3	<i>Metschnikowia sp11-578</i>	KM249366.1
TNG003.6	<i>Cryptococcus sp.</i> UFMG.BRO203	JX280387.1
TNG004.2	<i>Tremella sp.H.080.13</i>	AY188379.1
TNG004.3	<i>Cryptococcus terricola</i>	JX092254.1
TNG004.5	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	HM988694.1
TNG006.1	<i>Cryptococcus sp</i> UFMG.BRO203.	JX280387.1
TNG008.4	<i>Geotrichum fragrans</i>	GQ222355.1
TNG008.5	<i>Cryptococcus terricola</i>	JX092254.1
TNG008.6	<i>Cryptococcus gastricus</i>	GQ911495.1
TNG009.4	<i>Lecythophora sp.LE034</i>	JQ672613.1
TNG012.1	<i>Candida sake</i>	EF017662.1

Metschnikowia pulcherrima es una especie de origen enológico, frecuentemente utilizada por su alta actividad como agente de biocontrol contra diversos microorganismos (**Reid et al., 2012, Türkel et al., 2014**).

Metschnikowia sp., puede ser aislada del aparato digestivo de insectos, del néctar de muchas flores y de otros hábitats. La mayoría de ellas son fermentadoras. Algunas especies pueden ser patógenas de animales invertebrados marinos (**Seki & Fulton, 1969**).

Cryptococcus sp. UFMG-BRO203 es una especie aislada de diferentes ecosistemas como suelos, plantas o insectos. Frecuentemente utilizada en el tratamiento de aguas residuales y en la producción biotecnológica de lipasas (**Masaki et al., 2005**).

Tremella sp., coloniza madera podrida y líquenes. Se caracterizan por producir polisacáridos de interés médico (**De Baets & Vandamme, 2001**).

Cryptococcus terricola es una especie generalmente asociada a suelos. Recientemente reportada por su capacidad de producción de biodiesel a partir de almidón **(Tanimura et al., 2014)**.

Rhodotorula mucilaginosa se encuentra distribuida por todo el mundo, asociada a hábitat terrestre y acuático (incluido hábitat marino). Destaca la producción de carotenoides en la industria alimentaria **(Sadat Naghavi et al., 2013)**.

Geotrichum fragrans fue aislada previamente de queso, leche y frutas tropicales. El último trabajo sobre ella la relaciona con la producción de compuestos saborizantes **(Grondin et al., 2015)**.

Cryptococcus gastricus fue aislada previamente de suelo de Nueva Zelanda y del estómago de un enfermo de tuberculosis en Noruega **(Reiersol & Di Menna, 1958)**.

Lecythophora sp. LE034 se aisló previamente en Indonesia asociada a la planta *Alyxia reinwardtii*. Destaca la identificación de un nuevo glicósido (Lecythomycin), a partir de esta levadura **(Sugijanto et al., 2011)**.

Candida sake se ha encontrado en multitud de hábitats: suelo, océano, árboles, yemas de huevos, salmón congelado o uva, entre otros. Además está ampliamente distribuida y a lo largo de todo el mundo: Japón, Países Bajos, Chile, Francia, Bahía de Chesapeake (USA) y, en el océano Antártico **(CBS-KNAW, 2015)**.

4.1.1.5. Alineamiento y análisis filogenético

Las diez especies identificadas molecularmente se clasificaron equitativamente dentro de dos familias, Basidiomicota y Ascomicota. A pesar de la limitada cantidad de especies de levaduras aisladas, se identificaron cinco órdenes diferentes. A la primera familia pertenecen tres órdenes, Sporidiobolales, con una especie representante (*Rhodotorula mucilaginosa*), Filobasidiales y Tremellales con dos especies cada uno, *Cryptococcus terricola*, *Cryptococcus gastricus* y, *Cryptococcus* sp., *Tremela* sp., respectivamente. La segunda familia está compuesta por dos órdenes diferentes, Saccharomycetes, a la que pertenecen cuatro especies

(*Geotrichum fragrans*, *Candida sake*, *Metschnikowia pulcherrima* y *Metschnikowia* sp) y, Coniochaetales, con una especie (*Lecythophora* sp) (Figura 9).

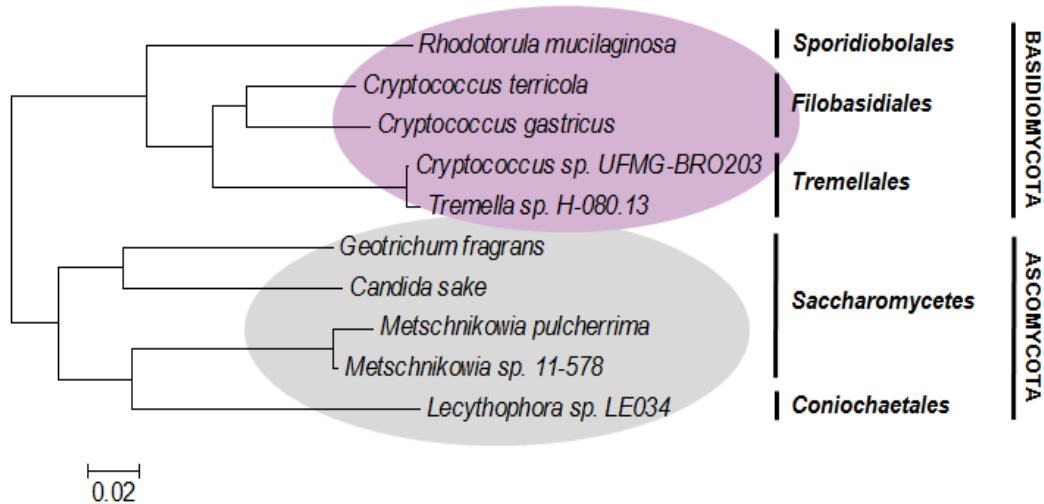


Figura 9. Análisis filogenético de las diez especies aisladas del volcán Tungurahua. La escala indica el número de sustituciones por cada 100 nucleótidos.

Dados los resultados obtenidos, se puede concluir que respecto a las familias, la diversidad de levaduras es homogénea, pues, el 50% de las especies son ascomicetes y el resto son basidiomicetes. Sin embargo, si se hace relación a niveles filogenéticos inferiores, como órdenes y especies, se encuentra una importante variedad que se resume en cinco órdenes (Sporidiobolales, Filobasidiales, Tremellales, Saccharomycetes, Coniochaetales) y diez especies (Figura 9).

4.1.2. Análisis comparativo entre las especies de levaduras aisladas del volcán Tungurahua respecto a especies aisladas de otros ecosistemas volcánicos

Se realizó un análisis comparativo bibliográfico del ecosistema volcánico del Tungurahua con respecto a otros tres ecosistemas volcánicos

del mundo (río Agrio-lago Caviahue, Argentina; monte Erebus, Antártica; montaña submarina Vailulu'u, Samoa).

La zona de río Agrio y el lago Caviahue se ubica en el noroeste de la Patagonia, al lado este del volcán Copahue (2900 m.s.n.m) y, representa un ambiente acuático ácido con un amplio rango de pH (1,5 - 6,7) causado por el H₂SO₄ liberado por la actividad geotermal al agua y las por altas cantidades de metales pesados como hierro (Fe) y arsénico (As) (**González-Toril et al., 2003**). De este ecosistema se aislaron un total de veinte y cinco levaduras, veinte y cuatro de ellas clasificadas como basidiomicetes y la restante como ascomicete (Tabla VIII).

El monte Erebus (Antártica) ubicado a 3795 m.s.n.m es el volcán activo más austral del mundo. Es un entorno único con cuevas de hielo y fumarolas cerca de la cumbre. Además representa un ecosistema volcánico cálido húmedo y carente de luz. Este ambiente tiene sistemas hidrotermales activos que permiten la circulación de agua de la superficie y gases atmosféricos al interior del volcán. La combinación de estos factores derivados de la superficie de rocas volcánicas proporciona condiciones óptimas para comunidades microbianas quimiolitotróficas capaces de prosperar sin energía fotosintética (**Connell & Staudigel, 2013**). La zona muestreada en este monte correspondió a un único sitio, la Cueva Warren, que se caracteriza por la ausencia de luz, la temperatura constante dentro del suelo (18,5 °C) y sobre éste (14,5 °C). En este ecosistema se aisló únicamente un basidiomicete (Tabla VIII).

La montaña Vailulu'u, es un volcán submarino activo en el extremo oriental de la cadena volcánica de Samoa. Tiene 593 metros de altura que se extienden desde cinco kilómetros a partir del fondo marino. Este ecosistema marino alberga una enorme biodiversidad y, los ambientes volcánicos en ellos generan un complejo hidrotermal que proporciona hábitats ricos en metales reducidos en los cuales se desarrollan comunidades microbianas capaces de reducir metales como hierro (FeII) y manganeso (MnII) (**Connell et al., 2009**).

En esta montaña se aislaron siete levaduras, dos de ellas fueron basidiomicetes y las cinco restantes ascomicetes (Tabla VIII).

Tabla VII. Identificación de levaduras y su distribución en diferentes ecosistemas volcánicos

Volcán Tungurahua , Ecuador	Río Agrio - lago Caviahue, Argentina	Monte Erebus, Antártica	Montaña submarina Vailulu'u Samoa
<i>Candida sake</i>	-	-	-
<i>Cryptococcus</i> sp.	+	-	-
<i>Cryptococcus gastricus</i>	-	-	-
<i>Cryptococcus terricola</i>	-	-	-
<i>Geotrichum fragrans</i>	-	-	-
<i>Lecythophora</i> sp.	-	-	-
<i>Metschnikowia</i> sp.	-	-	-
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	-	-	-
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	+	+	-
<i>Tremella</i> sp.	-	-	-

+ , presente; - , ausente.

La incidencia de las diez especies aisladas del volcán Tungurahua, comparada con la de otros tres ecosistemas volcánicos indicó que, dos especies de levaduras, *Cryptococcus* sp y *Rhodotorula mucilaginosa* también fueron aisladas del ambiente ácido volcánico de Río Agrio - Lago Caviahue (Argentina), mientras que, en el monte Erebus (Antártica), la única especie coincidente fue *Rhodotorula mucilaginosa*. En cuanto a la montaña Vailulu'u (Samoa), no se identificó ninguna especie presente en el ecosistema del Tungurahua (Tabla VII).

Al realizar una recopilación bibliográfica de especies de levaduras aisladas en ecosistemas volcánicos destaca *Rhodotorula mucilaginosa*, la cual se encontró presente en tres de los cuatro ecosistemas comparados (Tabla VI). Esta levadura se distribuye ampliamente en la naturaleza porque es capaz de colonizar todo tipo de ambientes, como aguas de desecho (Lahav *et al.*, 2002), muestras clínicas (Jiménez-Mejías *et al.*, 1992), lixiviados de uranio, destacando en este su capacidad de crecimiento en sustratos carentes de nutrientes, resistencia a metales y, tolerancia a ambientes ácidos (De Silóniz *et al.*, 2002).

En la tabla VIII se muestra la comparación de la diversidad de basidiomicetes y ascomicetes aislados de ecosistemas volcánicos. Las diez especies de levaduras aisladas del volcán Tungurahua se encuentran repartidas equitativamente en las familias Basidiomicota y Ascomicota. En referencia a los ecosistemas de Río Agrio-Lago Caviahue (Argentina) y el monte Erebus (Antártica) existen más basidiomicetes, destacando el ecosistema argentino, en el cual se reporta una mayor cantidad de levaduras respecto a los otros ecosistemas. En la montaña marina Vailulu'u se identifican mayor cantidad de ascomicetes. De manera que, a pesar de la limitada cantidad de levaduras aisladas del Tungurahua su diversidad es amplia y uniforme.

Tabla VIII. Comparación de especies pertenecientes a las familias Basidiomicota y Ascomicota en cuatro ecosistemas volcánicos del mundo.

	Volcán Tungurahua, Ecuador	Río Agrio - lago Caviahue, Argentina	Monte Erebus, Antártica	Montaña marina Vailulu'u, Samoa
Nº Basidiomicetes	5	24	1	2
Nº Ascomicetes	5	1	0	5
Total	10	25	1	7

4.1.3. Efecto de la temperatura y del pH sobre el crecimiento de levaduras

4.1.3.1. Influencia de la temperatura sobre el crecimiento de levaduras

La mayoría de levaduras son capaces de crecer a temperaturas entre 5 °C y 37 °C y, algunas a 45 °C, situándose su valor óptimo en 28 °C. Aunque estas temperaturas no son rigurosamente óptimas cuando se encuentran en sus ambientes naturales (**Uribe, 2007**). La temperatura máxima de crecimiento reportada para una levadura (*Hansenula polimorfa*) está alrededor de 50 °C. En ambientes fríos se han descrito levaduras psicrófilas con temperatura máxima de crecimiento alrededor de 20 °C (**Vidal-Leira et al., 1997**).

Con el fin de analizar el carácter extremo respecto a temperatura, de las levaduras previamente aisladas, se decidió llevar a cabo un experimento de crecimiento en gota a diferentes temperaturas: 4 °C, 20 °C, 37 °C y 42 °C, utilizando la temperatura de aislamiento (20 °C), como control positivo del crecimiento. *Candida sake*, *Cryptococcus* sp. *Cryptococcus gastricus*, *Cryptococcus terricola*, *Metschnikowia* sp., *Metschnikowia pulcherrima*, *Rhodotorula mucilaginosa* y *Tremella* sp. presentaron crecimiento similar, tanto en el ensayo a 4 °C como a 20 °C. Con estos resultados se puede sugerir cierto carácter psicrófilo en la mayoría de levaduras aisladas (**Hamid et al., 2014**). La resistencia de estas levaduras a temperaturas bajas puede explicarse ya que de manera natural deben soportar temperaturas glaciares propias del volcán Tungurahua. En cuanto a las especies, *Goetrichum fragrans* y *Tremella* sp. el crecimiento a 4 °C fue menor en comparación al control, por lo tanto, se puede sugerir que éstas podrían ser psicrófilos facultativos, pues su temperatura óptima de crecimiento se encuentra alrededor de los 20 °C (**Hamid et al., 2014**). *Lecythophora* sp. fue la levadura aislada del volcán Tungurahua, que mostró crecimiento a mayor temperatura. Su rango de crecimiento se extendió hasta 37 °C con un crecimiento mínimo a 4 °C. Bibliográficamente se reporta que *Lecythophora* sp. tiene una temperatura mínima de crecimiento de 5 °C, máxima de 30 °C y óptima a 20

°C (Damm *et al.*, 2010). En el ensayo a 42 °C no se registró el crecimiento de ninguna especie (Figura 10).

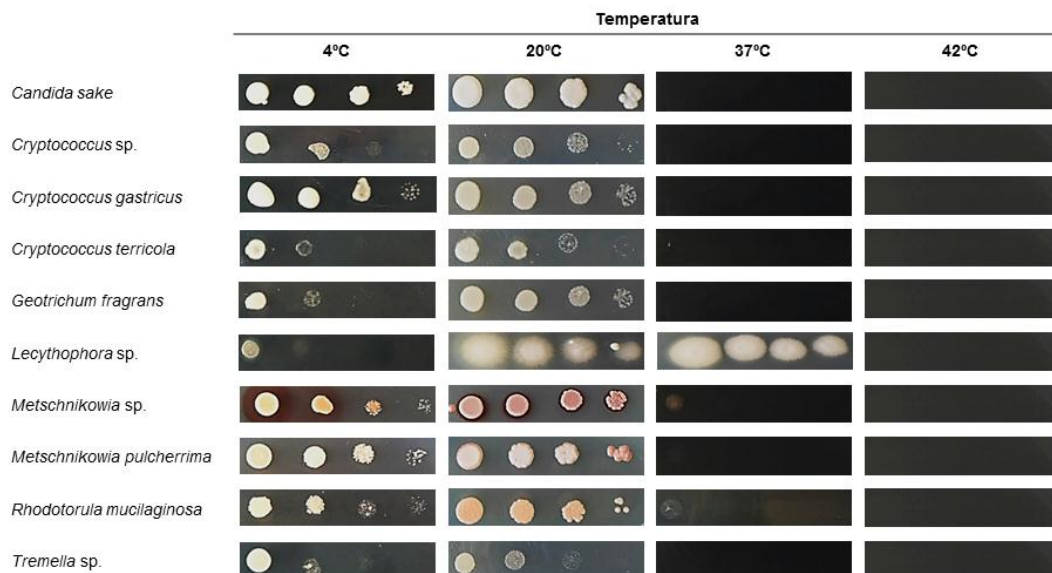


Figura 10. Efecto de la temperatura sobre el crecimiento de diez especies aisladas del volcán Tungurahua. Crecimiento comparativo a diferentes temperaturas de incubación (4 °C, 20 °C, 37 °C, 42 °C). Se realizaron diluciones seriadas de cada cultivo en agua estéril y, posteriormente, se sembraron 2,5 µl de cada una de ellas sobre placas Petri con medio PDA conteniendo aproximadamente 10⁴, 10³, 10² y 10 células respectivamente.

4.1.3.2. Influencia del pH sobre el crecimiento de las levaduras

Para determinar la influencia del pH en el crecimiento de levaduras se crecieron éstas en medio YM acidificado en un rango entre 1,5 y 6,5 de acuerdo al apartado 3.2.9. Un medio acidificado con un pH entre 4 a 7,5 favorece el crecimiento de la mayoría de levaduras mientras que, lo medios básicos no promueven su crecimiento (Sánchez, 1995; Martorell *et al.*, 2007).

El pH ácido en zonas volcánicas está asociada a la presencia de metales pesados, por lo que el estudio del comportamiento de las levaduras aisladas del volcán Tungurahua se hace interesante debido a sus aplicaciones en biorremediación, degradación de compuestos nocivos o como biosensores (González- Toril *et al.*, 2003; Gadanho *et al.*, 2006).

Las levaduras mantienen un gradiente de protones a través de la membrana plasmática contra un pH intracelular constante para el desarrollo óptimo de la actividad metabólica de los procesos de las células **(Deak, 2007)**.

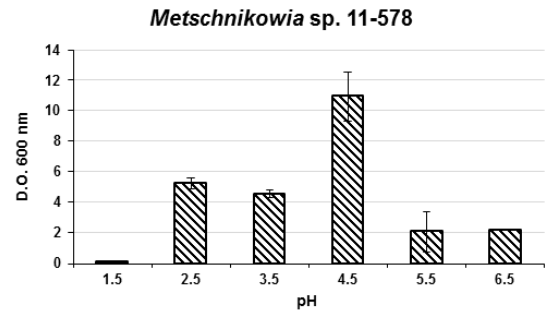
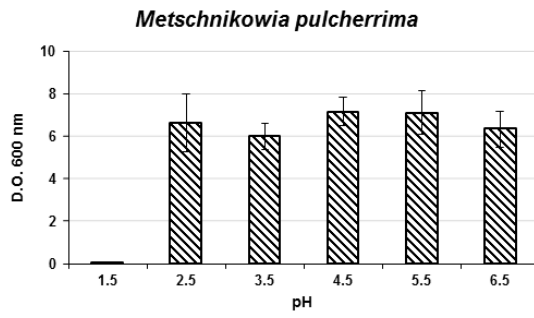
Se han reportado pocas cepas de levaduras capaces de desarrollarse a pH alrededor de 1,5; por ejemplo, *Hanseniaspora uvarum* y *Zygosaccharomyces rouxii*, ambas asociadas al deterioro de productos alimenticios **(Praphailong et al., 1997; Membré et al., 1999)**. De las diez especies aisladas del Tungurahua, ninguna presentó crecimiento a pH 1.5 (Figura 10).

En cuanto a las especies *Metschnikowia pulcherrima*, *Cryptococcus terricola*, *Tremella* sp., *Geotrichum fragrans*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Cryptococcus gastricus* y *Candida sake* el crecimiento en es similar en el rango de pH entre 2,5 y 6,5. *Metschnikowia* sp., *Cryptococcus* sp. y *Lecythophora* sp., registraron un pH óptimo de crecimiento en 4,5.

Atendiendo a los resultados obtenidos a este respecto, la mayoría de levaduras aisladas del volcán Tungurahua presentaron un amplio rango de crecimiento, proponiéndose esta versatilidad, como característica idónea para la aplicación biotecnológica de las mismas. A pesar de que *Rhodotorula mucilaginosa* también se desarrolla en rango de pH entre 2,5 y 6,5; su pH óptimo se identificó entre 2,5 y 4,5; por lo que puede considerarse como levadura acidófila (Figura 11F).

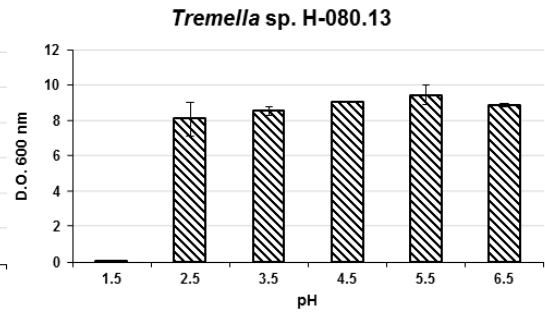
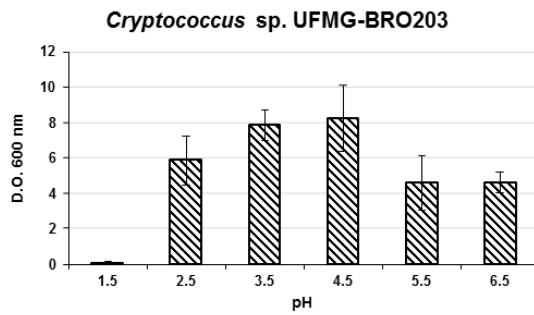
A)

B)



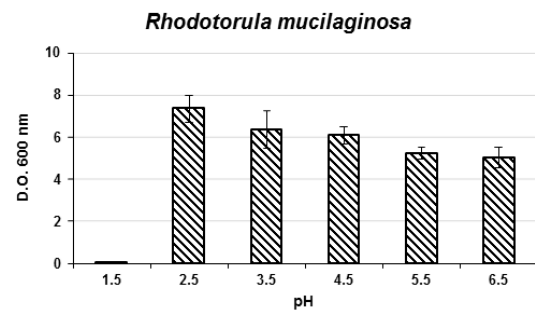
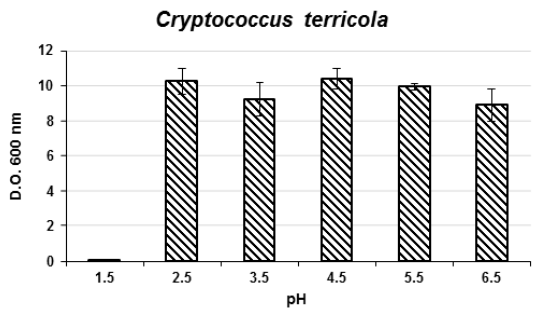
C)

D)



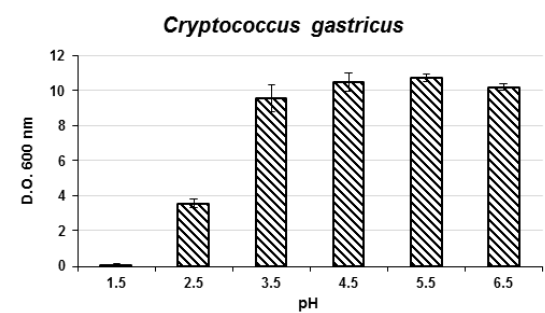
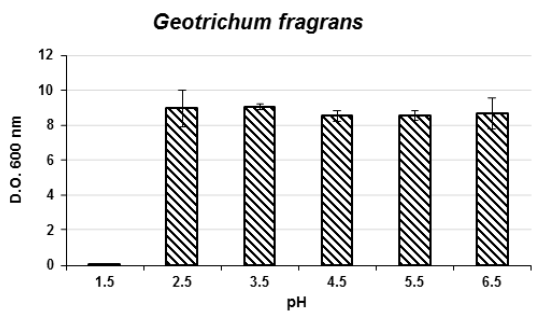
E)

F)



G)

H)



I)

J)

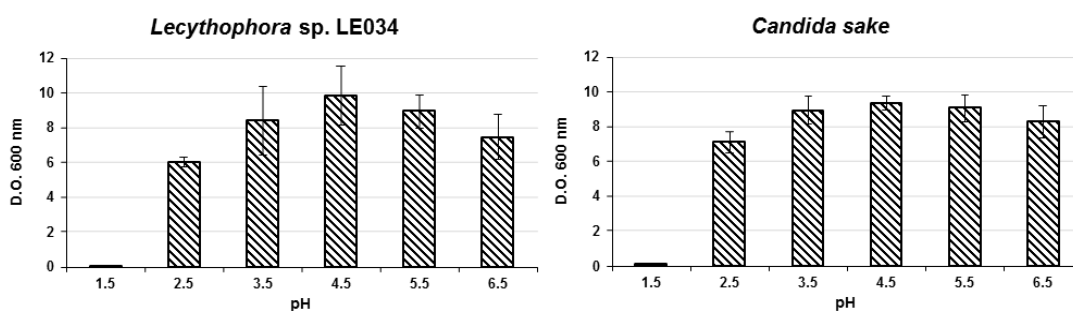


Figura 11. Efecto del pH sobre el crecimiento de diez especies aisladas del volcán Tungurahua. A) *Metschnikowia pulcherrima* B) *Metschnikowia* sp. C) *Cryptococcus* sp. D) *Tremella* sp. E) *Cryptococcus terricola* F) *Rhodotorula mucilaginosa* G) *Geotrichum fragrans* H) *Cryptococcus gastricus* I) *Lecythophora* sp. J) *Candida sake*.

4.2. Verificación de hipótesis

4.2.1. Diversidad de levaduras asociadas al volcán Tungurahua

Hipótesis Nula

No existen levaduras asociadas al volcán Tungurahua.

Hipótesis Alternativa

Existen levaduras asociadas al volcán Tungurahua.

Después de realizar el análisis filogenético a las doce levaduras aisladas del volcán Tungurahua, se identificaron diez especies distintas asociadas a este ecosistema volcánico (Tabla VI). Por lo tanto, se acepta la hipótesis alternativa que indica que existe diversidad de levaduras en el Tungurahua.

4.2.2. Comparación de la diversidad de levaduras asociada al volcán Tungurahua respecto a la diversidad asociada a otros ecosistemas volcánicos

Hipótesis Nula

La diversidad de levaduras asociada al volcán Tungurahua no es similar a la de otros ecosistemas volcánicos.

Hipótesis Alternativa

La diversidad de levaduras asociada al volcán Tungurahua no es similar a la de otros ecosistemas volcánicos.

Tabla IX. Frecuencia de la existencia de levaduras en el ecosistema del volcán Tungurahua en otros ecosistemas volcánicos.

Volcán Tungurahua, Ecuador	Monte Erebus, Antártica	Río Agrio - lago Caviahue, Argentina	Montaña submarina Vailulu'u	Total
<i>Cryptococcus</i> sp.	0	1	0	1
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	1	1	0	2
Total	1	2	0	3

1: presencia de la especie; 0: ausencia de la especie

Tabla X. Valor calculado para la prueba X^2 y valor p

Estadístico	Valor	gl	p
Chi Cuadrado Pearson	0.75	1	0.3865
Chi Cuadrado MV-G2	1.05	1	0.3063

Del análisis bibliográfico comparativo, entre el ecosistema del volcán Tungurahua y otros tres ecosistemas volcánicos, para la prueba Chi-cuadrado (X^2), el valor p calculado es mayor a 0,05; por lo tanto, se acepta la hipótesis

nula, la cual indica que la diversidad de levaduras asociada al volcán Tungurahua no es similar a la de otros ecosistemas volcánicos.

4.2.3. Análisis del carácter extremófilo de las levaduras aisladas del volcán Tungurahua

Hipótesis Nula

El pH y la temperatura no tienen influencia en el crecimiento de las levaduras aisladas del volcán Tungurahua.

Hipótesis Alternativa

El pH y la temperatura tienen influencia en el crecimiento de las levaduras aisladas del volcán Tungurahua.

Tabla XI: Frecuencias del conteo del crecimiento de levaduras para el efecto de la temperatura

<u>Género-especie</u>	<u>Temperaturas</u>				<u>Total</u>
	<u>4 °C</u>	<u>20 °C</u>	<u>37 °C</u>	<u>42 °C</u>	
<i>Candida sake</i>	2	2	0	0	4
<i>Cryptococcus gastricus</i>	2	2	0	0	4
<i>Cryptococcus</i> sp	2	2	0	0	4
<i>Cryptococcus terricola</i>	1	2	0	0	3
<i>Geotrichum fragrans</i>	1	2	0	0	3
<i>Lecythophora</i> sp	1	2	2	0	5
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	2	2	0	0	4
<i>Metschnikowia</i> sp	2	2	0	0	4
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	2	2	0	0	4
<i>Tremella</i> sp	1	2	0	0	3
Total	16	20	2	0	38

2: control; 1: crecimiento menor que el control; 0: no existe crecimiento

Tabla XII: Cantidad de levaduras con crecimiento a diferentes temperaturas

<u>CRECIMIENTO</u>	<u>Temperatura</u>				<u>Total</u>
	<u>4 °C</u>	<u>20 °C</u>	<u>37 °C</u>	<u>42 °C</u>	

0	0	0	9	10	19
1	4	0	0	0	4
2	6	10	1	0	17
Total	10	10	10	10	40

2: control; 1: crecimiento menor que el control; 0: no existe crecimiento

Tabla XIII: Frecuencias esperadas bajo independencia para el efecto de la temperatura

	Temperatura				Total
	CRECIMIENTO 4 °C	20 °C	37 °C	42 °C	
2	4.25	4.25	4.25	4.25	17.00
0	4.75	4.75	4.75	4.75	19.00
1	1.00	1.00	1.00	1.00	4.00
Total	10.00	10.00	10.00	10.00	40.00

2: control; 1: crecimiento menor que el control; 0: no existe crecimiento

Tabla XIV: Valor calculado para la prueba X^2 y valor p para el efecto de la temperatura

Estadístico	Valor	gl	p
Chi Cuadrado Pearson	46.34	6	<0.0001
Chi Cuadrado MV-G2	55.84	6	<0.0001

Tabla XV: Frecuencias del conteo del crecimiento de levaduras para el efecto del pH

	pH						Total
	1,5	2,5	3,5	4,5	5,5	6,5	
<i>Candida sake</i>	0	1	2	2	2	1	8
<i>Cryptococcus gastricus</i>	0	1	2	2	1	1	7
<i>Cryptococcus sp</i>	0	1	2	2	2	2	9
<i>Cryptococcus terricola</i>	0	2	2	2	2	2	10
<i>Geotrichum fragrans</i>	0	2	2	2	2	2	10
<i>Lecythophora sp</i>	0	1	1	2	1	1	6
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	0	1	1	2	1	1	6
<i>Metschnikowia sp</i>	0	2	2	2	2	2	10
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	0	2	1	1	1	1	6
<i>Tremella sp</i>	0	2	2	2	2	2	10
Total	0	15	17	19	16	15	82

2: control; 1: crecimiento menor que el control; 0: no existe crecimiento

Tabla XVI: Cantidad de levaduras con crecimiento a diferentes valores de pH

pH							
<u>CRECIMIENTO</u>	<u>1,5</u>	<u>2,5</u>	<u>3,5</u>	<u>4,5</u>	<u>5,5</u>	<u>6,5</u>	<u>Total</u>
0	10	0	0	0	0	0	10
1	0	5	7	9	6	5	32
2	0	5	3	1	4	5	18
Total	10	10	10	10	10	10	60

2: control; 1: crecimiento menor que el control; 0: no existe crecimiento

Tabla XVII: Frecuencias esperadas bajo independencia para el efecto del pH

pH							
<u>CRECIMIENTO</u>	<u>1,5</u>	<u>2,5</u>	<u>3,5</u>	<u>4,5</u>	<u>5,5</u>	<u>6,5</u>	<u>Total</u>
0	1.67	1.67	1.67	1.67	1.67	1.67	10.00
1	5.33	5.33	5.33	5.33	5.33	5.33	32.00
2	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	18.00
Total	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00	60.00

2: control; 1: crecimiento menor que el control; 0: no existe crecimiento

Tabla XVIII: Valor calculado para la prueba X^2 y valor p para el efecto del pH

<u>Estadístico</u>	<u>Valor</u>	<u>gl</u>	<u>p</u>
Chi Cuadrado Pearson	65.83	10	<0.0001
Chi Cuadrado MV-G2	59.50	10	<0.0001

Tras haber realizado el ensayo de goteo para cuatro temperaturas (4°C, 20 °C, 37 °C y 42 °C) y, el crecimiento de las levaduras en medio líquido acidificado, en un rango de pH entre 1.5 y 6.5, el valor p calculado en la prueba de Chi-cuadrado (X^2) es menor a 0,05. Por lo tanto se acepta la hipótesis alternativa, concluyendo que, la temperatura y el pH son parámetros influyentes sobre el crecimiento de levaduras aisladas del volcán Tungurahua.

CAPÍTULO VI

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

- La diversidad de levaduras asociadas al volcán Tungurahua, es homogénea respecto a basidiomicetes y ascomicetes. Sin embargo, muestra una elevada riqueza en cuanto a órdenes y especies de levaduras.
- La biodiversidad de levaduras asociadas a ecosistemas volcánicos es heterogénea, encontrándose mayor similitud por proximidad geográfica que por el hecho de pertenecer a un ecosistema volcánico.
- Por lo general, las levaduras asociadas al volcán Tungurahua, presentan crecimiento óptimo bajo condiciones extremas de pH ácido y bajas temperaturas, por lo que pueden considerarse potencialmente aplicables en la industria biotecnológica.

5.2.Recomendaciones

- Ampliar el estudio sobre el efecto de la temperatura en el crecimiento de las levaduras aisladas del volcán.
- Potenciar la aplicación biotecnológica de las levaduras aisladas.

Referencias Bibliográficas

Aguilera, A. (2013). Eukaryotic Organisms in Extreme Acidic Environments, the Río Tinto Case. *Life* 3: pp 363-374.

Boguslawska-Was, E., & Dabrowski, W. (2001). The seasonal variability of yeasts and yeast-like organisms in water and bottom sediment of the Szczecin Lagoon. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 203: pp 451-458.

Bravo, E. (2013). Apuntes sobre la biodiversidad del Ecuador. Universidad Politécnica Salesiana. Cuenca-Ecuador. 58: pp 1-12.

Canganella, F., Wiegel, J. (2011). Extremophiles: from abyssal to terrestrial ecosystems and possibly beyond. *Naturwissenschaften*. 98: pp 253–279. Recuperado de: doi: 10.1007/s00114-011-0775-2.

Caron, D., Countway, P., & Brown, M. (2004). The growing contributions of molecular biology and immunology to protistan ecology: Molecular signatures as ecological tools. *J. Euk. Microbiol* 51: pp 38–48.

Carvajal, J. (2014). Yeasts biodiversity in Ecuador: Amazonia, Andes, Pacific Coast and Galápagos Archipelago and the CLQCA role as the repository of the Ecuadorian yeasts biodiversity. Pontificia Universidad Católica del Ecuador, pp 1-17.

CBS-KNAW (Fungal Biodiversity Center). (2015). Yeast species. Recuperado de: <http://www.cbs.knaw.nl/collections/BioloMICS.aspx?Table=Yeasts%20species&Name=Candida%20sake&ExactMatch=T>

- Connell, L., Barret, A., Templeton, A., & Staudigel, H. (2009). Fungal Diversity Associated with an Active Deep Sea Volcano: Vailulu'u Seamount, Samoa. *Geomicrobiology Journal*, 26: pp 597–605. Recuperado de: doi: 10.1080/01490450903316174
- Connell, L., & Staudigel, H. (2013). Fungal Diversity in a Dark Oligotrophic Volcanic Ecosystem (DOVE) on Mount Erebus. *Antarctica. Biology*, 2, pp 798-809. Recuperado de: doi:10.3390/biology2020798.
- Damm, U., Fourie, P., & Crous, P. (2010). *Coniochaeta (Lecythophora) Collophora* gen.nov.and *Phaeomoniella* species associated with wood necroses of *Prunus* tres. *Persoonia*. 24:60-80.
- De Baets, S., Vandamme, E. (2001). Extracellular Tremella polysaccharides: structure, properties and applications. *Biotechnology Letters*. 23: 1361-1366.
- De Silóniz, M., Pay, E., Callejo, M., Marquina, D., Peinado, J.(2002). Environmental adaptation factors of two yeasts isolated from the leachate of a uranium mineral heap. *FEMS Microbiol Lett*. 7; 210(2): pp 233-7.
- Deak, T. (2007). Handbook of Food Spoilage Yeasts. Recuperado de: [https://books.google.com.ec/books?id=RR21g8_2OXIC&dq=Distributi on+of+the+Maximum+Temperature+for+Growth+among+Yeast&source=gbs_navlinks_s](https://books.google.com.ec/books?id=RR21g8_2OXIC&dq=Distributi+on+of+the+Maximum+Temperature+for+Growth+among+Yeast&source=gbs_navlinks_s).

- El-Latif Hesham, A., Khan, S., Liu, X., Zhang, Y., Wang, Z., & Yang, M. (2006). Application of PCR-DGGE to analyse the yeast population dynamics in slurry reactors during degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in weathered oil. *Yeast* 23(12,) pp 879-887.
- Esteve-Zarzoso, E., Belloch, C., Uruburu, F., Querol, A. (1999). Identification of yeast by RFLP analyse of the 5.8S rRNS gene and the two ribosomal *Internal transcribed spacers*. *International Journal of Sistematic Bacteriology*. 49, pp 329-337.
- Freitas, L., Carvajal, E., Lachance, M. & Rosa, C. (2013). *Kodamaea transpacifica* f.a., sp. nov., a yeast species isolated from ephemeral flowers and insects in the Galapagos Islands and Malaysia: further evidence for ancient human transpacific contacts. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* , 63: pp 4324-9. Recuperado de: doi: 10.1099/ijs.0.052282-0
- Gadanho, M., Libkind, D., & Sampaio, J. (2006). Yeast diversity in the extreme acidic environments of the Iberian Pyrite Belt. *Microb Ecol* 52: pp 552–563.
- Gardes, M., & Bruns, T. (1991). Rapid characterization of ectomycorrhizae using RFLP pattern of their PCR amplified-ITS. *Mycological Society Newaletter*. 41, pp 14.

- Gardes, M., & Bruns, T. (1993). ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes-application to the identification of mycorrhizae. *Molecular Ecology*. 2, 113-118.
- González-Toril, E., Llobet-Brossa, E., Casamayor, E., Amann, R., & Amils, R. (2003). Microbial ecology of an extreme environment, the Tinto River. *Appl Environ Microbiol* 69: pp 4853–4865.
- Grondin, E., Sing, S., Caro, Y., Raherimandimby, M., Randrianierenana, A., James, S., Nueno-Palop, C.,...& Petit, T. (2015). A comparative study on the potential of epiphytic yeasts isolated from tropical fruits to produce flavoring compounds. *Int J Food Microbiol*, 16; 203: pp 101-8. Recuperado de: doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.
- Gross, W., Küver, J., Tischendorf, G., Bouchaala, N., & Busch, W. (1998). Cryptoendolithic growth of the red alga *Galdieria sulphuraria* in volcanic áreas. *European Journal of Phycology*. 33: pp 25–31.
- Harju, S., Fedosyuk, H., Peterson, K. (2004). Rapid isolation of yeast genomic DNA: Bust n' Grab. *BMC Biotechnolo*. Recuperado de: doi: 10.1186/1472-6750-4-8.
- Instituto Geofísico (IG). (2015). Volcanes: Tungurahua. Recuperado de: <http://www.igepn.edu.ec/index.php/tungurahua>

James, S., Carvajal, E. Bond, C., Cross, K., Níñez, N., Portero, P., & Robertis, I. (2009). *Candida carvajalis* sp. nov., an ascomycetous yeast species from the Ecuadorian Amazon jungle. *FEMS Yeast research*. 9(5):pp 784-8. Recuperado de: doi: 10.1111/j.1567-1364.2009.00518.x.

James, S., Carvajal, E. Barahona, P., Cross, K., Bond, C., & Roberts, I. (2013). *Candida ecuadorensis* sp. nov., an ascomycetous yeast species found in two separate regions of Ecuador. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63:393-7. Recuperado de: doi: 10.1099/ijs.0.047555-0.

James, S., Carvajal, E. Barahona, P., Nueno-Palop, C., Cross, K., Bond, C., & Roberts, I. (2015). *Kazachstania yasuniensis* sp. Nov., an Ecuador and on the Galápagos, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 65: pp 1304-1309. Recuperado de: doi:10.1099/ijs0.000102.

Jiménez-Mejías, M., Ortíz, C., Jiménez, F., del Nozal, M., Campos, T., & Jiménez-Jiménez, F. (1992) Fungemia caused by *Rhodotorula mucilaginosa* in relation to total parenteral nutrition. *Enfern Infec Microbiol Clin*. 10(9): pp 543-6.

Kutzman, C., & Dien, B. (1994). *Candida arabinofermentans*, a new L-arabnose fermenting yeast. 10: 1727-1740.

- Lahav, R., Fareleira, P., Nejdat, A., & Abeliovich, A. (2002). The identification and characterization of osmotolerant yeast isolates from chemical wastewater evaporation ponds. *Microbiology Ecology*. 43(3), pp 388-96.
- LePennec, J., Ruiz, A., Ramón, P., & Palacios, E. (2011). Impact of tephra falls on Andean communities: The influences of eruption size and weather conditions during the 1999–2001 activity of Tungurahua volcano, Ecuador. *Journal of Volcanology and Geothermal Research*, pp 217–218. Recuperado de: doi:10.1016/j.jvolgeores.2011.06.011
- Margesin, R., & Schinner, F., (2001) Potential of halotolerant and halophilic microorganisms for biotechnology. *Extremophiles* 5: 73-83.
- Martínez, R., & Gragera, R. (2008). Fundamentos teóricos y prácticos de la histoquímica. Recuperado de: https://books.google.com.ec/books?id=q5piMcoVEr4C&pg=PA527&lpg=PA527&dq=longitud+de+onda+a+la+que+absorben+los+%C3%A1cidos+nucleicos&source=bl&ots=gV_kLoP-QG&sig=3s8eq_IUJ67kjwhMVfqK-IrWPys&hl=es-419&sa=X&ved=0CD8Q6AEwBWoVChMI9uKx7bT5xglVi5INCh1JMgb9#v=onepage&q=longitud%20de%20onda%20a%20la%20que%20absorben%20los%20%C3%A1cidos%20nucleicos&f=false.
- Masaki, K., Kaminit, N., Ikeda, H. & Iefuji, H. (2005). Cutinase-Like Enzyme from the Yeast *Cryptococcus* sp. Strain S-2 Hydrolyzes Polylactic Acid and Other Biodegradable Plastics. *American Society for Microbiology*. Recuperado de: doi: 10.1128/AEM.71.11.7548-7550.

Membré, J., Kubaczka, M., & Chéné, C. (1999). Combined effects of pH and sugar on growth rate of *Zygosaccharomyces rouxii*, a bakery product spoilage yeast. *Applied and Environmental Microbiology*, 65: pp4921-4925.

Mestre, M., Libkind, D., & Fontanela, S. (2009). Comparación de condiciones de cultivo para el aislamiento y recuento simultáneo de levaduras de suelos de bosques nativos de *Nothofagus* spp. (Fagaceae) de la Patagonia Argentina. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*. 13(3-4). Recuperado de base de datos Scielo.

Ministerio de Ambiente (MAE). (2007). Biodiversidad. Recuperado de: www.ambiente.gob.ec

Mueller, D., Vincent, W., Bonilla, S., & Laurion, I. (2004). Extremotrophs, extremophiles and broadband pigmentation strategies in a high arctic ice shelf ecosystem. *FEMS Microbiology Ecology*. 53: pp 73–87. Recuperado de: doi:10.1016/j.femsec.2004.11.001.

Morita, R. (2000). Low-temperature environments. En *Encyclopedia Microbiology*. 3: pp 93-98.

NCBI (National Center for Biotechnology). (2015). Recuperado de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

- Niehaus, F., Bertoldo, C., Kähler, M., & Antranikian, G. (1999). Exolotremophiles as a source of novel enzymes for industrial application. *Appl. Microbiol. Biotechnol* 51: 711-729.
- Pérez, J. (1997). Organización Molecular del Genoma de Levadura. Universitat de Valencia e Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos, C.S.I.C. pp 100.
- Praphailong, M., Van Gestel, M., Fleet, G., & Heard, G. (1996). Evaluation of the Biolog system for the identification of food and beverage yeast. *Letters in Applied Microbiology*, 24: pp 455-459.
- Reid, V., Theron, L., du Toit, M. & Divol, B. (2012). Identification and Partial Characterization of Extracellular Aspartic Protease Genes from *Metschnikowia pulcherrima* IWBT Y1123 and *Candida apicola* IWBT Y1384. *American Society for Microbiology*. Recuperado de: doi:10.1128/AEM.00505-12.
- Reiersol, S., & Di Menna, M. (1958). A new *Cryptococcus* species. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 24(1), pp 27-30.
- Russo, G., Libkind, D., Sampaio, J., & VanBrock, M. (2008). Yeast diversity in the acidic Río Agrio-Lake Caviahue volcanic environment (Patagonia, Argentina). *FEMS Microbiol. Ecol* 65: pp 415–424.
- Sadat Naghavi, E., Hanachi, P., Reza-Soudi, M., Saboora, A., & Ghorbani, A. (2013). Evaluation of the Relationship between the Incubation Time and

Carotenoid Production in *Rhodotorula Slooffiae* and *R. mucilaginosa* Isolated from Leather Tanning Wastewater. *Iran Journal of Basic Medical Sciences*. 16(10), pp 1114-1118.

Sánchez, R. (1995). Purificación y caracterización de la UPDglucosa 4-epimerasa de *Saccharomyces carlsbergensis*. Universidad de Oviedo, pp15-16.

Satake, K., Oyagi, A., & Iwao, Y. (1995). Natural acidification of lakes and rivers in Japan: The ecosystem of Lake Usoriko (pH3.4-3.8). Kluwer Academic Publishers, Netherlands, pp 511-515.

Satyanara, T., Raghukumar, C., & Shivaji, S. (2005). Extremophilic microbes: Diversity and perspectives. *Microbial Diversity* 89 (1), pp 78-90.

Seki, H., Fulton, J. (1969). Infection of marine copepods by *Metschnikowia* sp. *Mycopathologia et mycologia applicata*. 38, pp 61-70.

Serrano-Bueno, G., Hernández, A., López-Lluch, G., Pérez-Castiñeira, J., Navas, P., & Serrano, A. (2013). Inorganic pyrophosphatase defects lead to cell cycle arrest and autophagic cell death through NAD⁺ depletion in fermenting yeast. *J Biol Chem*, 288(18), pp 82-92.

Sittenfeld, A., Mora, A., Ortega, J., Albertazzi, F., Cordero, A., Roncel, M., Sánchez, E., Vargas, M., Fernández, M., Weckesser, J., & Serrano, S. (2002). Characterization of a photosynthetic *Euglena* strain isolated from an acidic hot mud pool of a volcanic area of Costa Rica. *FEMS Microbiol. Ecol* 42, pp 151-161.

- Schmidt, S., Naff, C., Lynch, R. (2012). Fungal communities at the edge: Ecological lessons from high alpine fungi. *Fungal Ecology*. 5: pp 443-452.
- Somma, M. (s/f). Análisis de la Presencia de Organismos Genéticamente Modificados en Muestras de Alimentos: Extracción y purificación de ADN. *World Health Organization Regional Office for Europe*, pp 9-11.
- Stibal, M., Elster, J., Šabacká, M., & Kaštovská, K. (2006). Seasonal and diel changes in photosynthetic activity of the snow alga *Chlamydomonas nivalis* (Chlorophyceae) from Svalbard determined by pulse amplitude modulation fluorometry. *FEMS Microbiol. Ecol* 59, pp 265–273.
- Sugijanto, N., Diesel, A., Rateb, M., Pretsch, A., Gogalic, S., & Zaini, N. (2011). Lecythomycin, a new macrolactone glycoside from the endophytic fungus *Lecythophora* sp. *Nat. Prod. Commun.* 6(5): 677– 678.
- Tanimura., A., Takashima, M., Sugita, T., Endoh, R., Kikukawa, M., Yamaguchi., S., Sakuradani, E...& Shima, J. (2014). *Cryptococcus terricola* is a promising oleaginous yeast for biodiesel production from starch through consolidated bioprocessing. *Scientific reports*, pp 4776. Recuperado de: doi:10.1038/srep04776.

Türkel, S., Korukluoğlu, M. & Yavuz, M. (2014). Biocontrol Activity of the Local Strain of *Metschnikowia pulcherrima* on Different Postharvest Pathogens. *Biotechnology Research International*. Recuperado de: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/397167>.

Uribe, L. (2007). Caracterización fisiológica de levaduras aisladas de la filósfera de moras. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá-Colombia, pp 33.

Vaz, A., Rosa, L., Vieira, M., Garcia, V., Brandão, L., Teixeira, L., Moliné. M., Libkind, D., van Broock, M., & Rosa, C. (2011). The diversity, extracellular enzymatic activities and photoprotective compounds of yeasts isolated in Antarctica. *Braz. J. Microbiol.*, In Press. Recuperado de: doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822011000300012>.

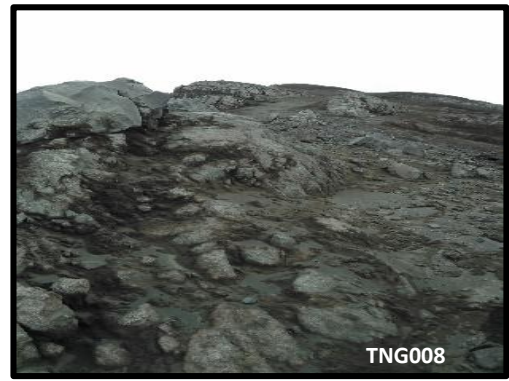
Vidal-Leira, M., Buckley, H., & van Uden, N. (1997). Distributios of máximum temperatura for growth among yeast. *Mycological Society of America*. 71(3) pp 493-501. Recuperado de: doi: 10.2307/3759059.

Vincent, W., Mueller, A., & Bonilla, S. (2004). Ecosystems on ice: the microbial ecology of Markham Ice Shelf in the high Arctic. *Cryobiology* 48: pp 103–112. Recuperado de: doi:10.1016/j.cryobiol.2004.01.006

White, T., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, pp 315-322.

Anexos

Anexo A: Fotografías de siete puntos de muestreo



Anexo B: Alineamiento filogenético de las diez especies de levaduras aisladas del volcán Tungurahua

```

Metschnikowia_pulcherrima -----
Metschnikowia_sp -----
Candida_sake -----
Lecythosphora_sp -----
Geotrichum_fragans -----
Cryptococcus_sp -----
Tremella_sp CACTTGTCTTCATACACCTGTGCACCGTGGTCTCCGGACCTACAAACTT 50
Cryptococcus_terricola -----
Cryptococcus_gastricus -----
Rhodotorula_mucilaginosa -----

```

```

Metschnikowia_pulcherrima -----
Metschnikowia_sp -----
Candida_sake -----
Lecythosphora_sp -----
Geotrichum_fragans -----
Cryptococcus_sp -----
Tremella_sp GAAGTCATGAACGCTCTTTATTATAACAAATAAACTTTCAACAACGGAT 100
Cryptococcus_terricola -----
Cryptococcus_gastricus -----
Rhodotorula_mucilaginosa -----

```

```

Metschnikowia_pulcherrima -----
Metschnikowia_sp -----
Candida_sake -----
Lecythosphora_sp -----
Geotrichum_fragans -----
Cryptococcus_sp -----
Tremella_sp CTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGACGCGAAATGCGATAAGTAATG 150
Cryptococcus_terricola -----
Cryptococcus_gastricus -----
Rhodotorula_mucilaginosa -----

```

```

Metschnikowia_pulcherrima -----
Metschnikowia_sp -----
Candida_sake -----
Lecythosphora_sp -----
Geotrichum_fragans -----
Cryptococcus_sp -----
Tremella_sp TGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCATCTTGCGCC 200
Cryptococcus_terricola -----
Cryptococcus_gastricus -----
Rhodotorula_mucilaginosa -----

```

Metschnikowia_pulcherrima -----
Metschnikowia_sp -----
Candida_sake -----
Lecythosphora_sp -----
Geotrichum_fragans -----
Cryptococcus_sp -----
Tremella_sp CTTTGGTATTCCGAAGGGCATGCCTGTTTGAGTGTCATGAAAACATCATC 250
Cryptococcus_terricola -----
Cryptococcus_gastricus -----
Rhodotorula_mucilaginosa -----

Metschnikowia_pulcherrima -----
Metschnikowia_sp -----
Candida_sake -----
Lecythosphora_sp -----
Geotrichum_fragans -----
Cryptococcus_sp -----
Tremella_sp CCATCGGGTTCCGATGGCATGGACTTGGGTGTTGCCGTCTGGCTCGCCT 300
Cryptococcus_terricola -----
Cryptococcus_gastricus -----
Rhodotorula_mucilaginosa -----

Metschnikowia_pulcherrima -----
Metschnikowia_sp -----
Candida_sake -----
Lecythosphora_sp -----
Geotrichum_fragans -----
Cryptococcus_sp -----
Tremella_sp CAAAAGCCTTAGTGGTTCGAGTCGAATCTGGCGTAATAAGTTTCGCTGGC 350
Cryptococcus_terricola -----
Cryptococcus_gastricus -----
Rhodotorula_mucilaginosa -----

Metschnikowia_pulcherrima -----
Metschnikowia_sp -----
Candida_sake -----
Lecythosphora_sp -----
Geotrichum_fragans -----
Cryptococcus_sp -----
Tremella_sp CTAGACGAAAGACTGCTTTACCCGTCTTCTGACATCTTTTGCTCTGACCT 400
Cryptococcus_terricola -----
Cryptococcus_gastricus -----
Rhodotorula_mucilaginosa -----

```

Metschnikowia_pulcherrima -----GGCGG 5
Metschnikowia_sp -----CGGAGG 6
Candida_sake -----CAACGG 6
Lecythosphora_sp -----TGCATATCAGCGGAGG 16
Geotrichum_fragans -----AATAAGCGGAGG 12
Cryptococcus_sp -----
Tremella_sp CAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACCTTAAGCATATCAATAAGCGGAGG 450
Cryptococcus_terricola -----TAGCATATCAATAAGCGGAGG 21
Cryptococcus_gastricus -----
Rhodotorula_mucilaginosa -----

```

```

Metschnikowia_pulcherrima AGAC-----ATTGCCTCAG-TACGGCGAGTG-AGCGGCAAAA 40
Metschnikowia_sp AAAAGAACCACAGGGATTGCCTCAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAAAA 56
Candida_sake AGAAAG--ACCACCGGGATTGCCTCAG-TACGGCGAGTGAAGCGGCAAAA 53
Lecythosphora_sp AAAAGAACCACAGGGATTGCCCAAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAACA 66
Geotrichum_fragans AAAAGAACCACAGGGATTGCCTTAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAAAA 62
Cryptococcus_sp -----GGATTCCCCTAGTAACGGCGAGTGAACCGGGATGA 35
Tremella_sp AAAAGAAACTAACAGGATTCCCCTAGTAACGGCGAGTGAACCGGGATGA 500
Cryptococcus_terricola AAAAGAAACTAACAGGATTCCCCTAGTAACGGCGAGTGAAGCGGGAAGA 71
Cryptococcus_gastricus -----CGAGTGAAGCGGGAAGA 17
Rhodotorula_mucilaginosa -----ATTCCTAGTAGCGGCGAGCGAG-CGGGAAGA 31
                      **** * , *** *; *

```

```

Metschnikowia_pulcherrima GCTCAAATTTGAAATCC-----CCCGG-----GAATTGTAATTTGA 76
Metschnikowia_sp GCTCAAATTTGAAATCC-----CCCGG-----GAATTGTAATTTGA 92
Candida_sake GCTCAAATTTGAAATCT-----GCGTAA----GCCGAGTTGTAATTTGA 93
Lecythosphora_sp GCTCAAATTTGAAATCTGG---CCTCGG---CCCGAGTTGTAATTTGC 108
Geotrichum_fragans GCTCAATTT-GAAATCG-----CTTCGG-----CGAGTTGTAAG-TGA 98
Cryptococcus_sp GCTCAAATTTGAAATCTG---GCCCTTGG--GTCCG-AGTTGTAATCTAT 79
Tremella_sp GCTCAAATTTGAAATCTG---GCCCTTGG--GTCCGAGTTTGTATCTAT 545
Cryptococcus_terricola GCTCAAATTTGAAATCTGATGGCCTCAGGCTATCCG-AGTTGTAATCTAT 120
Cryptococcus_gastricus GCTCAAATTTGAAATCTAGTAGCCTTCGGCTGCTCG-AGTTGTAATCTAT 66
Rhodotorula_mucilaginosa GCTCAAATTTATAATCTGG-CACCTTCGG-TGTCCG-AGTTGTAATCTCT 78
*****:** ;:**** , . ** ;* *

```

```

Metschnikowia_pulcherrima AGAG----ATTTGGGTCCGGCCGGCGGGGGTTAAGTCCACTGGAAAGTG 121
Metschnikowia_sp AGAG----ATTTGGGTCCGGCCGGCGGGGGTTAAGTCCACTGGAAAGTG 137
Candida_sake AGATGGCTACTTTGGTAATGGCTCTTG---TCTATGTTCCCTTGAACAGG 140
Lecythosphora_sp AGAGGATGCTTTTGGGTGCGGTGCCTT----CTGAGTTCCTTGAACAGG 154
Geotrichum_fragans AGTG----GTTAAGCTTTG----ATG----TAAGTTTCCCTTGAACAGG 134
Cryptococcus_sp AG-AGGCGTTTTCCGCGCCGGACCGTG---TCCAAGTCCCTTGAATAGG 125
Tremella_sp AAGAGGCGTTTTCCGCGCCGGACCGTG---TCCAAGTCCCTTGAATAGG 592
Cryptococcus_terricola AG-AAACATTTTCCGCGTTGGCCCATG---TACAAGTCTCTTGAATAGA 166
Cryptococcus_gastricus AG-AAATGTTTTCCGCGTGGCTCATG---TACAAGTCCCTTGAACAGG 112
Rhodotorula_mucilaginosa AG-AAATGTTTTCCGCGTTGGACCGCA---CACAAGTCTGTTGAATACA 124
* , ** * * ,:** ***** . .

```

Metschnikowia_pulcherrima	GCGCCACAGAGGGTGACAGCCCCGTGAG---CCCC---TTCAAAGCCTC	164
Metschnikowia_sp	GCGCCACAGAGGGTGACAGCCCCGTGAA---CCCC---TTTAAAGCCCT	180
Candida_sake	ACGTACAGAGGGTGAGAAATCCCGTGCG---ATGAGATGTCCATTACCGT	187
Lecythosphora_sp	ACGCCGGAGAGGGTGAGAGCCCCGTACA---GTTGG-ACACCAAGCCCTT	200
Geotrichum_fragans	ACGCCATAGAGGGTGATAGCCCCGTG---CTTTG--CTTAATGTGCTA	179
Cryptococcus_sp	GTATCAAAGAGGGTGACAATCCCGTACTTGACACG-ACGACCGGGGCTAT	174
Tremella_sp	GTATCAAAGAGGGTGACAATCCCGTACTTGACACG-ACGACCGGGGCTAT	641
Cryptococcus_terricola	GCGTCATAGAGGGTGAGAAATCCCGTCTTGACATGGACTACCAAGTGTCTT	216
Cryptococcus_gastricus	GCGTCATAGAGGGTGAGAAATCCCGTACTTGACATGAATTACCAAGTGTCTT	162
Rhodotorula_mucilaginosa	GCGGCATAGTGG-TGAGACCCCCGTATATGGTGCGGACGCCACGCGCTTT	173
	. . *. **: ** * * * * *	.
Metschnikowia_pulcherrima	CACCCAGATCTCCAAGAGTCGAGTTGTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGG	214
Metschnikowia_sp	CATCCAGATCTCCAAGAGTCGAGTTGTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGG	230
Candida_sake	GTAAAGTGCTTTCGAAGAGTCGAGTTGTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGG	237
Lecythosphora_sp	GTAAAGTCTCTTCGACGAGTCGAGTGTGGGAATGCTGCTCTAAATGG	250
Geotrichum_fragans	CTTCAGAG-----CGAGTCGAGTTGTTGGGAATGCAGCTCTAATAGG	222
Cryptococcus_sp	GTGATACGTCTTCGACGAGTCGAGTTGTTGGGAATGCAGCTCAAAATGG	224
Tremella_sp	GTGATACGTCTTCGACGAGTCGAGTTGTTGGGAATGCAGCTCAAAATGG	691
Cryptococcus_terricola	GTGATATGTTTTCAACGAGTCGAGTTGTTGGGAATGCAGCTCAAAATGG	266
Cryptococcus_gastricus	GTGATACATTTTCAAAGAGTCGAGTTGTTGGGAATGCAGCTCAAAATGG	212
Rhodotorula_mucilaginosa	GTGATACATTTTCAAGAGTCGAGTTGTTGGGAATGCAGCTCAAAATGG	223
	: .	.*****:*****:***:** :*
Metschnikowia_pulcherrima	GTGGTAAATTCATCTAAAGCTAAATACCGCGAGAGACCGATAGCGAAC	264
Metschnikowia_sp	GTGGTAAATTCATCTAAAGCTAAATACCGCGAGAGACCGATAGCGAAC	280
Candida_sake	GTGGTAAATTCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAAC	287
Lecythosphora_sp	GAGGTATATCTCTTCTAAAGCTAAATATAGGCCAGAGACCGATAGCGCAC	300
Geotrichum_fragans	-TGTTAACTCCATCTAAGGCTAAATATTGCTGGGAGACCGATAGCGAAC	271
Cryptococcus_sp	GTGGTAAATTCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAAC	274
Tremella_sp	GTGGTAAATTCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAAC	741
Cryptococcus_terricola	GTGGTAAATTCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAAC	316
Cryptococcus_gastricus	GTGGTAAATTCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAAC	262
Rhodotorula_mucilaginosa	GTGGTAAATTCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAAC	273
	:***:* * :****,***** * ,*****,**	
Metschnikowia_pulcherrima	AAG-TACAGTGATGGAAAGATGAAAAGCACTTTGAAAAGAGAGTGAAAAA	313
Metschnikowia_sp	AAG-TACAGTGATGGAAAGATGAAAAGCACTTTGAAAAGAGAGTGAAAAA	329
Candida_sake	AAG-TACAGTGATGGAAAGATGAAAAGCACTTTGAAAAGAGAGTGAAAAA	336
Lecythosphora_sp	AAG-TAGAGTGATCGAAAGATGAAAAGCACTTTGAAAAGAGGGTTAAAAA	349
Geotrichum_fragans	AAG-TACAGTGATGGAAAGATGAAAAGCACTTTGAAAAGAGAGTGAAATA	320
Cryptococcus_sp	AAG-TACCGTGAGGGAAAGATGAAAAGCACTTTGAAAAGAGAGTTAAACA	323
Tremella_sp	AAGTTACCGTGAGGGAAAGATGAAAAGCACTTTGAAAAGAGAGTTAAACA	791
Cryptococcus_terricola	AAG-TACCGTGAGGGAAAGATGAAAAGCACTTTGAAAAGAGAGTTAAACA	365
Cryptococcus_gastricus	AAG-TACCGTGAGGGAAAGATGAAAAGCACTTTGAAAAGAGAGTTAAACA	311
Rhodotorula_mucilaginosa	AAG-TACCGTGAGGGAAAGATGAAAAGCACTTTGAAAAGAGAG-TTAAACA	321
	*** ** ,*** ***** ,***** ,***** ,* :* * *	


```

Metschnikowia_pulcherrima    GTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGCTTGCAAGCAGACAC----- 355
Metschnikowia_sp             GTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGCTTGCAAGCAGACAC----- 371
Candida_sake                  GTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGCTTGAGATCAGACTTGGTATTTT 386
Lecythosphora_sp             GTACGTGAAATTGTTGCAAGGGAACGGCTTGTGACCAGACTTG-----C 393
Geotrichum_fragans           GCGTGTGAAATTGTTGGAGGGGAAGG----- 346
Cryptococcus_sp              GTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAACGATTGAAGTCAGTCGTG-TCGGTC 372
Tremella_sp                   GTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAACGATTGAAGTCAGTCGTG-TCGGTC 840
Cryptococcus_terricola       GTATGTGAAATTGTTGAAAGGGAACGATTGAAGTCAGTCGTG-TCTATT 414
Cryptococcus_gastricus       GTATGTGAAATTGTTAAAAGGGAACGATTGAAGTCAATCATG-TCCTTG 360
Rhodotorula_mucilaginosa     GTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAACGCTTGAAGTCAGACTTG-CTTGCC 370
* , ***** , * ,*****

Metschnikowia_pulcherrima    -----TTAACTGG----- 363
Metschnikowia_sp             -----TTAACTGG----- 379
Candida_sake                  GTATGGCTTGCTTTCGGGCGGGTCTCTGCAGTTTACTGG----- 426
Lecythosphora_sp             GCCGGGTGATCATCCG--CGGTTCTCCGCGGTGCACTCGGCCCCGGCGCA 441
Geotrichum_fragans           ----- 441
Cryptococcus_sp              GGATTACGCGGGTCTCCCGGTGTATTTCTTCCGACGGG----- 412
Tremella_sp                   GGATTACGCGGGTCTCCCGGTGTATTTCTTCCGACGGG----- 880
Cryptococcus_terricola       GGACTACGCGGGTCTGCCGGTGTACTTCTTTAGACGGGG----- 455
Cryptococcus_gastricus       GGTCT-----TACCACCTTGGATGGGG----- 383
Rhodotorula_mucilaginosa     G-----AGCAATCGGTTTGCAGG----- 388

Metschnikowia_pulcherrima    -GCCAGCATCGGGGCGGCGGGGAGCAAAACCACCGGGG-AATGTACCT-- 409
Metschnikowia_sp             -GCCAGCATCGGGGCGGCGGGGAGCAAAACCACCGGGG-AATGTACCT-- 425
Candida_sake                  -GCCAGCATCGGTTTGGGTGGCAGGATAATAGCATAGG-AATGTGGCTCT 474
Lecythosphora_sp             GGCCAGCGTCGGTTCTAGCAGGGGGACAAAAGCTTGGGGAACGTGGCT-- 489
Geotrichum_fragans           --CGATGATAGGAATAGGAGG-----CTGCGG----- 371
Cryptococcus_sp              --TCAACATCAGTTTGGATCGGCGGATAAAGATGGAGGGAAGGTGGCAT- 459
Tremella_sp                   --TCAACATCAGTTTGGATCGGCGGATAAAGATGGAGGGAAGGTGGCAT- 927
Cryptococcus_terricola       --TCAACATCAGTTTGTATCGCTGGAAAAGGGCAGGAGGAATGTAGCAC- 502
Cryptococcus_gastricus       --TCAACATCAGTTTGTATCGGTGGATAAAGGATAGGAGGGAAGGTAGCAC- 430
Rhodotorula_mucilaginosa     --CCAGCATCAGTTTCCGGGATGGATAATGGTAGAGAGAAGGTAGCAG- 435
* ,*,* * ..

Metschnikowia_pulcherrima    --TTCG---AGGATTATAACCCCG-GCCCTTACTCCCATAACCGCCCCGA 452
Metschnikowia_sp             --TTCG---AGGATTATAACCCCG-GCCCTTACTCCCATACTGCCCCGA 468
Candida_sake                  ACTTCGGTGGAGTGTATAGCCTTT-GTTGATACTGCCTGCCTAGACCGA 523
Lecythosphora_sp             CCTCCG--GGAGTGTATAGCCCCTGCCCAGATGCCCTGCCGGGACCGA 537
Geotrichum_fragans           --TTTG-----AAATAATTGTTTT-----CGGGCCAC 397
Cryptococcus_sp              -CCTCGG-ATGTG-TTATAGCCCTCTGTTGCATACGCTGGTTCAGACTGA 506
Tremella_sp                   -CCTCGG-ATGTG-TTATAGCCCTCTGTTGCATACGCTGGTTCAGACTGA 974
Cryptococcus_terricola       -TCTCGG-GTGAACCTTATAGCCTCTTGTGATACAGTGGTTGGGACTGA 550
Cryptococcus_gastricus       -TCTCGG-GTGAACCTTATAGCCTCTGTCGATACACTGGTTCAGACTGA 478
Rhodotorula_mucilaginosa     -TTTCGG-CTGTG-TTATAGCTCTGCTGGATACATCTGGGGGACTGA 482
* *:*:* . * ..

```

Metschnikowia_pulcherrima	G-----GCCTGCAATCT-----AAGG	468
Metschnikowia_sp	G-----GCCTGCAATCT-----AAGG	484
Candida_sake	G-----GACTGCGTCTTT-----GACTAGG	544
Lecythosphora_sp	G-----GTCTGCGCTCCG-----GCAAGG	556
Geotrichum_fragans	G-----GTCT-----	402
Cryptococcus_sp	GGCATGCAGCTCGCCTTTATGGCCGGGGTTCGCCACGTTTCGAGCTTAGG	556
Tremella_sp	GGCATGCAGCTCGCCTTTATGGCCGGGGTTCGCCACGTTTCGAGCTTAGG	1024
Cryptococcus_terricola	GGAACGCAGCTTGCCCTTTATGGCCGGGATTTATCCACGTACAAGCTTAGG	600
Cryptococcus_gastricus	G-----GTCTGCTATTAC-----AGG	494
Rhodotorula_mucilaginosa	GGAACGCAGTGTGCCTTTGG--CGGGGGTTTCGACCTCTTCACACTTAGG	530
	* * *	
Metschnikowia_pulcherrima	ATGCTGGCGTAATGGTTGCAAGTCGCCCGTCTTAAAAAA-----	508
Metschnikowia_sp	ATGCTGGCGTAATGGTTGCAAGTCGCCCGTCT-----	516
Candida_sake	ATGCTGGCATAATGATCCTAAGCCGCCCGTCTTGAAACACGGACCAAGGA	594
Lecythosphora_sp	ACGCTGGCGTAATGGTCCACGACCCCGTCTTGAAACACG-----	597
Geotrichum_fragans	---CTG--GTGCCTATTTTCG--CACCCGTCTTGAAA-----	432
Cryptococcus_sp	ATGTTGACGTA-----	567
Tremella_sp	ATGTTGACGTAATGGCTTTAAATG-----	1041
Cryptococcus_terricola	ATGTTGACATAATGGCTTTAAACGACCCGTCTTGAAACACGGACCAAGGA	650
Cryptococcus_gastricus	ATGTTGACATAATGGCTTTAAACGACCCGTCTTGA-----	529
Rhodotorula_mucilaginosa	ATGCTG--GTGGTGGCTTTAAACGACCCGTCTTGAAACCCACGGACC----	574
	** .*	
Metschnikowia_pulcherrima	-----AAAACCCAA-----	517
Metschnikowia_sp	-----	
Candida_sake	GTCTAACGTCTATGCGAGTGTTGGGTGTA AAAACCCGTACGCGGAATGAA	644
Lecythosphora_sp	-----	
Geotrichum_fragans	-----	
Cryptococcus_sp	-----	
Tremella_sp	-----	
Cryptococcus_terricola	GTCTAACATATCTGCGAGTATTG-----	674
Cryptococcus_gastricus	-----	
Rhodotorula_mucilaginosa	-----	
Metschnikowia_pulcherrima	-----	
Metschnikowia_sp	-----	
Candida_sake	AGTGAACGTAGATGAGAGYCTTTTAGGCGCATCATCGACCGATCCTGATG	694
Lecythosphora_sp	-----	
Geotrichum_fragans	-----	
Cryptococcus_sp	-----	
Tremella_sp	-----	
Cryptococcus_terricola	-----	
Cryptococcus_gastricus	-----	
Rhodotorula_mucilaginosa	-----	

Metschnikowia_pulcherrima -----
Metschnikowia_sp -----
Candida_sake TCTTCGGATGGATTTGAGTAACAGCATAGCTGTTGGGACCCGAAAGATGG 744
Lecythosphora_sp -----
Geotrichum_fragans -----
Cryptococcus_sp -----
Tremella_sp -----
Cryptococcus_terricola -----
Cryptococcus_gastricus -----
Rhodotorula_mucilaginosa -----

Metschnikowia_pulcherrima -----
Metschnikowia_sp -----
Candida_sake TGAACATGCGCTGAATAGGGTGAAGCCAGAGGAAACTCTGGTCGAGGGCTC 794
Lecythosphora_sp -----
Geotrichum_fragans -----
Cryptococcus_sp -----
Tremella_sp -----
Cryptococcus_terricola -----
Cryptococcus_gastricus -----
Rhodotorula_mucilaginosa -----

Metschnikowia_pulcherrima -----
Metschnikowia_sp -----
Candida_sake GTAGCGGTTCTGACGTGCAAATCGATCGTCTAATTTGCGTATAGGGGCGA 844
Lecythosphora_sp -----
Geotrichum_fragans -----
Cryptococcus_sp -----
Tremella_sp -----
Cryptococcus_terricola -----
Cryptococcus_gastricus -----
Rhodotorula_mucilaginosa -----

Metschnikowia_pulcherrima -----
Metschnikowia_sp -----
Candida_sake AAGACTAATCGAACATCTAGTAGCTGGTTCTGCGAAAATTTCCCCCCAG 894
Lecythosphora_sp -----
Geotrichum_fragans -----
Cryptococcus_sp -----
Tremella_sp -----
Cryptococcus_terricola -----
Cryptococcus_gastricus -----
Rhodotorula_mucilaginosa -----