



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES

LICENCIATURA EN BIOLOGÍA



Diversidad fúngica de alta montaña basada en
amplicones relacionada con el tamaño de los cuerpos
de agua de glaciares y lagos de los cráteres del
complejo volcánico Iztaccíhuatl (México)

TESIS INDIVIDUAL

PARA OBTENER EL GRADO DE

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

PRESENTA

FRANCO RAÚL HUERTA PADRÓN

DIRIGIDA POR

Dra. ROSA PAULINA CALVILLO MEDINA

Santiago de Querétaro, Querétaro, mayo 2021

Resumen

En México poco se conoce sobre la microbiota de los glaciares que se localizan en los glaciares de volcanes a más de 5000 msnm. El Iztaccíhuatl alberga tres glaciares y dos cuerpos de agua en sus cráteres con condiciones extremas. Dentro de la biodiversidad de los glaciares se ha reportado la presencia de hongos psicrófilos y psicotolerantes. Los cuales pueden sobrevivir a las condiciones extremas y proporcionar valiosas señales sobre el cambio climático. En el presente trabajo se analizó la diversidad de hongos de cuatro sitios del Iztaccíhuatl mediante amplicones del ITS 1-5.8S-ITS 2 del rRNA. Se realizó un análisis bioinformático de las secuencias obtenidas para asignar el nivel taxonómico y abundancia relativa por sitio. Así como la medición de los cuatro cuerpos de agua estudiados y su posible relación con la diversidad fúngica. Nuestros resultados mostraron que no existe una clara relación con el tamaño de los cuatro sitios aquí estudiados ni con la disponibilidad de agua (lago o glaciar). Los análisis de amplicones, revelaron un total de 738,310 secuencias, de las cuales, se trabajó con 597,138. Se identificaron 372,824 que se agruparon en 268 OTUs. Encontrando que perteneciera a 268 especies, 91 géneros, 108 familias, 52 órdenes, 17 clases y 4 divisiones de hongos. Basidiomycota resultó ser la división más abundante seguido de Ascomycota. El lago cráter "La Panza" presentó mayor riqueza, pero su área lo ubica en el tercer lugar y el lago cráter "Monte de Venus" el más pequeño presentó la menor riqueza. Los datos generados aquí contribuyen a generar conocimiento sobre los hongos que habitan estos sitios extremos poco estudiados y permiten conocer la majestuosidad de los glaciares tropicales antes de que perdamos la oportunidad de hacerlo debió al calentamiento global.

Palabras clave: Estratovolcán; Fungi; Extremófilos; Análisis de amplicones

ITSrRNA

Summary

In Mexico little is known about the microbiota of the glaciers that are located in the glaciers of volcanoes at more than 5000 meters above sea level. Iztaccíhuatl is home to three glaciers and two bodies of water in its craters with extreme conditions. Within the biodiversity of glaciers, the presence of psychrophilic and psychrotolerant fungi has been reported. Which can survive extreme conditions and provide valuable signals on climate change. In the present work, the fungal diversity of four Iztaccíhuatl sites was analyzed using amplicons of the ITS 1-5.8S-ITS 2 of the rRNA. A bioinformatic analysis of the obtained sequences was carried out to assign the taxonomic level and relative abundance per site. As well as the measurement of the four bodies of water studied and their possible relationship with fungal diversity. Our results showed that there is no clear relationship with the size of the four sites studied here or with the availability of water (lake or glacier). The amplicon analyzes revealed a total of 738,310 sequences, of which 597,138 were used. 372,824 were identified and grouped into 268 OTUs. Finding that it belonged to 268 species, 91 genera, 108 families, 52 orders, 17 classes and 4 divisions of fungi. Basidiomycota turned out to be the most abundant division followed by Ascomycota. The crater lake "La Panza" presented the greatest wealth, but its area places it in third place and crater lake "Monte de Venus" the smallest presented the least wealth. The data generated here contributes to generating knowledge about the fungi that inhabit these little-studied extreme sites and allows us to know the majesty of tropical glaciers before we lose the opportunity to do so due to global warming.

Keywords: Stratovolcano; Fungi; Extremophiles; ITSrRNA amplicon analysis

Comité tutorial

Directora:

Dra. Rosa Paulina Calvillo Medina

Asesores:

Dr. Juan Campos Guillén

Dr. Fidel Landeros Jaime

Dra. Mónica Cervantes Jiménez

Dirección General de Bibliotecas de la UAQ

Sinceros agradecimientos

A la Universidad Autónoma de Querétaro y la Facultad de Ciencias Naturales por el apoyo y aprendizaje.

A la Dra. Teresa García Gasca por todo el apoyo durante la licenciatura.

A la Dra. Rosa Paulina Calvillo Medina por su apoyo, paciencia y sabiduría.

A los Drs. Mónica Cervantes Jiménez por su ayuda en la figura 3, a Juan Campos Guillén Guillén y a Fidel Landeros Jaime por su apoyo y revisión.

Al Dr. Víctor Manuel Bautista de Lucio por impulsar este proyecto.

A mis padres por su incondicional apoyo.

A Mónica Huerta Padrón y Jessica Huerta Padrón por siempre estar ahí y ser las mejores.

A todas aquellas personas, familia y amigos que apoyaron directa o indirectamente en la culminación de este trabajo.

De corazón

¡Gracias!

Tabla de contenido

1	Introducción
2	Justificación
3	Hipótesis
4	Objetivos
5	Material y Métodos
6	Resultados
7	Discusión
8	Conclusión
9	Referencias
10	Apéndices

Dirección General de Bibliotecas de la UAQ

Índice

1.	Introducción.....	
	1	
1.1.	Cambio climático y el retraimiento de los glaciares.....	2
1.2.	Hongos extremófilos.....	4
1.3.	Extremófilos en el Iztaccíhuatl.....	5
2.	Justificación.....	
	9	
3.	Hipótesis.....	1
	0	
4.	Objetivos.....	10
3.2.	Objetivo general.....	10
3.3.	Objetivos específicos.....	10
5.	Materiales y métodos.....	11
5.1	Área de estudio.....	11
5.2	Extracción de DNA y viabilidad de las muestras	13
5.3	Amplificación y secuenciación del conjunto de datos de ITS1–5.8S–ITS2 rRNAS	14
5.4	Análisis bioinformático y estudio de la diversidad fúngica.....	14
6.	Resultados	15
7.	Discusión	22
8.	Conclusión.....	26
9.	Referencias	27
10.	Apéndice	1 34

Apéndice 2.....	44
Apéndice 3.....	45

Dirección General de Bibliotecas de la UAQ

Índice de figuras

Figura 1.....	6
Figura 2.....	7
Figura 3.....	12
Figura 4.....	15
Figura 5.....	17
Figura 6.....	18
Figura 7.....	20
Figura 8.....	21

Dirección General de Bibliotecas de la UJAQ

1. Introducción

Los hongos tienen un importante papel en la historia de los humanos, se han utilizado con fines alimenticios en la elaboración de numerosos productos como el queso, el pan y el vino, y además, para diversos grupos étnicos, tienen un alto valor medicinal y ceremonial. Los hongos además de ser parte importante en diferentes actividades humanas son organismos clave para el funcionamiento de los ecosistemas terrestres por las asociaciones mutualistas que forman con la mayoría de las plantas, por su actividad como patógenos, y por su participación en el ciclo de nutrientes al ser los principales degradadores de materia orgánica en selvas y bosques, pero en la mayoría de los casos se desconoce el papel de los hongos individuales en la naturaleza. (Lodge 1992, Schmit 2006).

Es difícil delimitar a los hongos como grupo en comparación a otros eucariotas. Los debates sobre la inclusión o exclusión de ciertos grupos se han desarrollado durante más de un siglo (Barr 1992). El número total de diferentes especies de hongos en la tierra es aún desconocido, pero casi excede un millón y algunos estimados son apreciablemente mayores. (Hawksworth, 2001). Claramente aún hay un enorme número de hongos por ser descubiertos. Los micólogos están de acuerdo en que este es en efecto el resultado de múltiples factores. Principalmente entre estos está el hecho de que hay grandes áreas del mundo, hábitats particulares y ciertos ejemplos de sustratos en estos hábitats, en los que los hongos lamentablemente no se han estudiado. Muchas regiones de los trópicos y subtrópicos son buenos ejemplos. En promedio, más de mil nuevas especies son descritas por los micólogos cada año, y quizá la mitad de estos hongos son de los trópicos y subtrópicos.

Incluso si la velocidad a la que se describen nuevas especies aumenta varias veces, es sumamente dudoso que la mayoría de los hongos con los que los humanos comparten este planeta alguna vez tengan nombres formales. Sin embargo, se podría argumentar que esto es irrelevante. Lo único que parece necesario es la conciencia de la tremenda diversidad de hongos que existe. (Stephenson, 2010). Se ha descrito ya una amplia diversidad de microhongos en distintos sitios con condiciones extremas, como los glaciares, que actualmente están en detrimento debido al calentamiento global.

1.1 Cambio climático y el retraimiento de los glaciares

La existencia, el crecimiento y la reducción de los glaciares y las capas de hielo se han producido en escalas de tiempo que van desde cientos de miles hasta millones de años. Geográficamente, los glaciares y las capas de hielo cubren alrededor de 15 millones de km², o aproximadamente el 10% de la superficie terrestre de la Tierra (Anesio 2012). La extensión de la cubierta de hielo durante el último máximo glacial está sujeta a debate, pero fue al menos tres veces mayor que la cobertura actual (Clark 2009). Desde inicios de siglo pasado la temperatura global promedio ha incrementado, lo que trae dramáticas consecuencias para el retraimiento de los glaciares (Stocker 2013). El retroceso global de los glaciares está recibiendo mucha atención, especialmente como una señal del cambio climático (Dyurgerov 2000). Mediciones realizadas desde 1961 muestran que la temperatura promedio del océano global ha aumentado a profundidades de al menos 3.000 metros y que los océanos han absorbido más del 80 por ciento del calor agregado al sistema

climático. Este calentamiento hace que el agua de mar se expanda, lo que contribuye al aumento del nivel del mar, ya que tienen descensos generalizados en los glaciares y las capas de hielo. Las estimaciones actuales indican que los niveles del mar aumentaron 0,17 m en el transcurso del siglo XX (Relman 2008).

Un sistema de clima global más cálido acelera el ciclo hidrológico, aumentando la probabilidad de fenómenos climáticos extremos, como sequías, fuertes precipitaciones, olas de calor, huracanes, tifones o ciclones. Las sequías más intensas y prolongadas que se han observado en áreas más amplias desde la década de 1970 y en particular en los trópicos y subtrópicos, se han asociado con temperaturas globales más altas, pero también con cambios en los patrones de viento y disminuciones en la capa de nieve (Relman 2008). El siglo XX ha visto cambios sorprendentes en las áreas glaciares de las cadenas montañosas y, por lo tanto, en la extensión de los cinturones de montañas glaciares y periglaciares de todo el mundo (Haeberli 1998). Los cambios en las condiciones del hielo en la superficie y en el suelo causa un cambio correspondiente en los procesos geomórficos (Tian 2017). Incluso si las concentraciones de todos los gases de efecto invernadero y los aerosoles (los cuales causan que la atmósfera atrape el calor) puedan mantenerse a los mismos niveles que en el año 2000, se esperaría que el calentamiento se produzca a aproximadamente la mitad de la tasa actual. Es muy probable que las continuas emisiones de gases de efecto invernadero en o por encima de las tasas actuales induzcan cambios en el sistema climático global durante el siglo XXI de una magnitud aún mayor que la observada a fines del siglo XX. (Relman 2008).

Los glaciares, las capas de hielo y la criosfera en general son un bioma dominado únicamente por microorganismos (autótrofos y heterótrofos) y procesos biogeoquímicos activos que tienen impactos locales y globales y deben ser reconocidos como tales (Anesio 2012). Comprender los patrones biogeográficos es un precursor para mejorar nuestro conocimiento de la función de los microbiomas y para predecir las respuestas de los ecosistemas al cambio ambiental (Ma 2017).

1.2 Hongos extremófilos

Los hongos se encuentran en todos los ecosistemas aeróbicos, colonizan una diversidad de sustratos y realizan una amplia diversidad de funciones, algunas de las cuales no se comprenden bien. Muchas especies de hongos son cosmopolitas y generalistas, pero otras son especialistas que se encuentran solo en sustratos o hábitats restringidos. Los nichos de hongos inusuales son hábitats donde se esperaría que las condiciones extremas impidieran el desarrollo de una micobiota (Cantrell 2011).

Los ambientes fríos representan la mayor parte de la biosfera de la Tierra y han sido colonizados con éxito por microorganismos psicrófilos que pueden prosperar a bajas temperaturas y sobrevivir e incluso mantener la actividad metabólica a temperaturas bajo cero. Estos microorganismos desempeñan funciones ecológicas clave en sus hábitats e incluyen una amplia diversidad de representantes de los tres dominios (Bacteria, Archaea, Eukarya) (Margesin 2011). La llegada de nuevas herramientas moleculares ha proporcionado una nueva perspectiva sobre la diversidad del mundo microbiano, particularmente para las especies que no hemos podido cultivar en el

laboratorio. Las comunidades microbianas en diferentes ecosistemas muestran una gran diversidad y redundancia funcional, lo que favorece la formación de consorcios que comprenden muchos microorganismos que comparten nichos en ecosistemas naturales. La redundancia en la función permite que los ecosistemas sean resistentes y se recuperen de las perturbaciones naturales y antropogénicas (Cantrell 2011).

La psicofilia fúngica se basa en mecanismos metabólicos para tolerar las bajas temperaturas y la congelación que implica la tolerancia al bajo potencial hídrico y la desecación. Algunos organismos producen enzimas activas en frío, proteínas anticongelantes y sustancias exopoliméricas que brindan protección celular contra los efectos potencialmente dañinos de las bajas temperaturas (Gilbert 2015, Siddiqui 2006, Cameron 2012).

1.3 Extremófilos del Iztaccíhuatl

Los sistemas montañosos cubren alrededor de una quinta parte continental del planeta. Las montañas brindan soporte vital directo para cerca del 10% de la población mundial e, indirectamente, a más del 50%. Las montañas también son un elemento clave del ciclo hidrológico, ya que son la fuente de muchos de los principales sistemas fluviales del mundo. La nieve, los glaciares y el permafrost de las zonas montañosas frías son especialmente sensibles a los cambios en las condiciones atmosféricas, debido a su proximidad a las condiciones de fusión. Además, la pérdida de masa es más intensa en zonas de alta montaña con pendientes pronunciadas. En consecuencia, los cambios climáticos provocan

efectos pronunciados en los cinturones glaciares y periglaciares de áreas montañosas (Haerberli 1998).

Los glaciares en México se limitan a sus tres montañas más altas, todas las cuales son volcanes: Volcán Pico de Orizaba (Volcán Citlaltépetl), Volcán Iztaccíhuatl y el activo (desde 1993) Volcán Popocatépetl. A 5,230 metros sobre el nivel del mar (msnm), el Iztaccíhuatl es el tercer pico más alto de México y el séptimo más alto del continente (Figura 1) (White 2002).

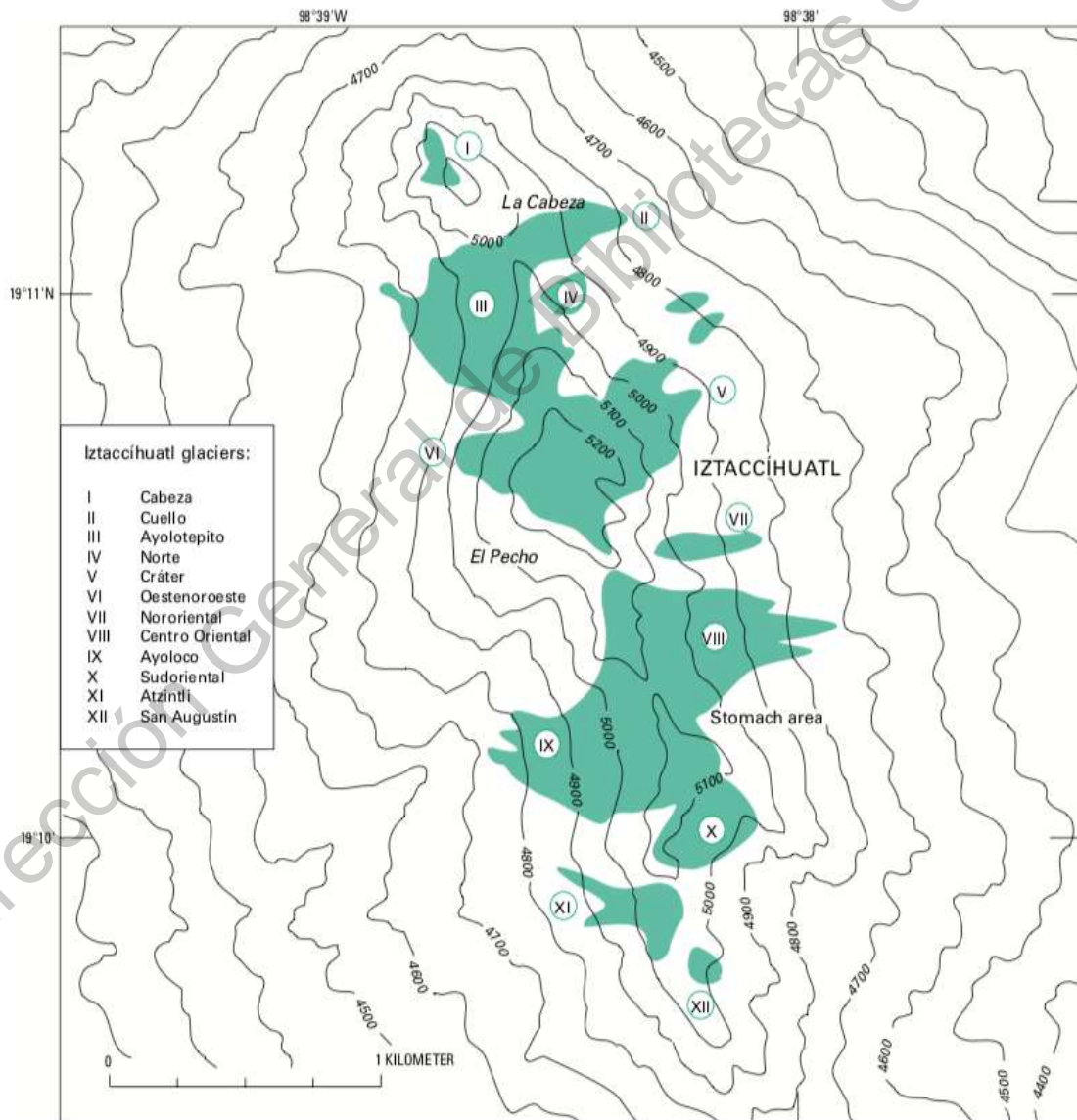


Figura 1. Distribución de los glaciares del Iztaccíhuatl en la época de 1980. Se muestra la distribución de los 11 antiguos glaciares del Iztaccíhuatl. En la actualidad, se ha descrito que solo tres de ellos: “El Pecho” (Nororiental), “La Panza” (Centro Oriental) y Ayoloco están presentes en los volcanes (White 2002).

El nombre Iztaccíhuatl, deriva de las palabras náhuatl Iztac (blanco) y cihuatl (mujer). Cuando se ve desde el oeste (Figura 2), el perfil largo de norte a sur evoca la cabeza, el cuello, el pecho, la panza (el vientre), las rodillas y los pies de una mujer dormida reclinada cubierta con un sudario blanco (White 2002). Es un gran estratovolcán del Pleistoceno, de hecho, es un complejo volcánico desarrollado desde hace 1,7 Ma. Una serie de coladas de lava y material piroclástico de composición dacítica y andesítica formaron el volcán. La última actividad eruptiva ocurrió hace 5000 años. La superposición del material volcánico y el desarrollo de los diferentes volcanes que componían el complejo resultó en una morfología muy particular (Álvarez 2011).



Figura 2. Vista del Iztaccíhuatl desde el Oeste. La silueta del conjunto volcánico el cual evoca la silueta de una mujer durmiente (White 2002).

La más alta de las tres cumbres, "El Pecho", está situada en la latitud 19°10'30" N. y en la longitud 98°38'30" W. Los 11 glaciares que existieron se encontraban dispersos a lo largo de una distancia norte-sur de aproximadamente 3 km. Iztaccíhuatl se puede ver desde la Ciudad de México, a solo 64 km al sureste. En la actualidad solo quedan tres glaciares: "El Pecho", "La Panza" y Ayoloco (White 2002).

Es importante comprender cómo la composición de la comunidad de hongos responde al retraimiento de los glaciares, pero los resultados existentes de la sucesión de la comunidad de hongos en el retraimiento de los glaciares son inconsistentes o nulos. Sin embargo, la llegada de las nuevas tecnologías de secuenciación está ayudando a dilucidar la diversidad microbiana en muchos ecosistemas, pero se necesitan más estudios para documentar el rol funcional de los hongos en las comunidades microbianas que prosperan en estos entornos inusuales y rápidamente cambiantes por el cambio climático.

2. Justificación

El cambio climático y el calentamiento global están modificando la composición de la atmósfera, el nivel del mar, y el retraimiento de los glaciares de todo el mundo es cada vez más rápido. Lo que está derivando en la pérdida de nichos ecológicos de microorganismos entre ellos Bacterias, Archaea y Fungi. Con esto la posibilidad de conocer la riqueza microbiológica se reduce. Aunado a esto, la dificultad que representa generar estudios de este tipo de organismos es basta. Debido a que pocos organismos son cultivables y es necesario aplicar técnicas moleculares avanzadas (“Next Generation”, secuenciación masiva y análisis de amplicones) para poder generar un acercamiento certero a la diversidad biológica de glaciares y lagos cráter.

Los miembros del reino Fungi, tienen un importante papel ecológico además participan en procesos biogeoquímicos hasta ahora muy poco estudiados principalmente en glaciares tropicales de gran altitud y lagos cráter de sitios fríos extremos particularmente en México. Otro aspecto poco estudiado es la relación

entre la diversidad biológica y del tamaño de los cuerpos de agua de sitios extremos como los descritos con anterioridad.

El presente estudio (para nuestro conocimiento) representará la primera referencia de un análisis de amplicones del RNA fúngico de glaciares y lagos de cráteres del Iztaccíhuatl. Este proyecto abrirá las puertas al conocimiento sobre la diversidad fúngica extremófila en glaciares tropicales y si existe una relación entre la diversidad y el tamaño de los cuerpos de agua donde se muestreo en los volcanes de gran altura mexicanos.

3. Hipótesis

Si se obtiene el análisis de amplicones del ITS 1-5.8S-ITS 2 del rRNA de dos glaciares y dos lagos de los cráteres del complejo volcánico Iztaccíhuatl, se observarán diferencias en la diversidad fúngica de acuerdo con el tamaño de los cuerpos de agua de los glaciares y los lagos cráter.

4. Objetivos

4.1 Objetivo general

- Describir la diversidad fúngica de alta montaña basada en amplicones así como encontrar las relaciones del tamaño de los cuerpos de agua de los lagos cráter “Monte de Venus” y “La Panza”; y de los glaciares “La Panza” y “El Pecho” del complejo volcánico Iztaccíhuatl

4.2 Objetivos específicos

- Extraer el ADN total de cuatro muestras de sitios del complejo volcánico Iztaccíhuatl; los lagos cráter; “Monte de Venus” y “La Panza” y los glaciares “La Panza” y “El Pecho”.
- Amplificar la región ITS1–5.8S–ITS2 rRNA de cada una de las muestras
- Secuenciar mediante plataforma Illumina con MiSeq los amplicones de ITS1–5.8S–ITS2 rRNA.
- Realizar un análisis bioinformático del conjunto de datos obtenido para estudiar la diversidad fúngica de los cuatro sitios.
- Medir y relacionar del tamaño de los cuerpos de agua de los glaciares y los lagos cráter con los resultados encontrados

5. Metodología

5.1 Área de estudio

En febrero del 2019 se recibieron muestras tomadas por personal del Laboratorio de Microbiología y Proteómica Ocular de la Unidad de Investigación del Instituto de Oftalmología Fundación de Asistencia Privada Conde de Valenciana® de dos glaciares y dos lagos cráter del Iztaccíhuatl. Las muestras fueron de cuatro sitios del complejo volcánico Iztaccíhuatl; los lagos cráter; “Monte de Venus” (S1) N 19° 09.810' O 098° 38.277' a 4950 msnm y “La Panza” (S2) N 19° 10.003' O 098° 38.203' a 5010 msnm y los glaciares “La Panza” (S3) N 19° 10.056' W 098° 38.327' a 5065 msnm y “El Pecho” (S4): N 19° 10.609 'O 098° 38.475' a 5200 msnm (Figura 3).

Para tomar las muestras se cavaron agujeros de 60 cm de profundidad utilizando un piolet estéril (flameado tres veces *in situ* con etanol 96°). Las muestras fueron

colocadas en recipientes de vidrio estériles por triplicado. Una vez en el laboratorio las muestras se almacenaron durante la noche a 4°C para su derretimiento y su posterior traslado y procesamiento al laboratorio de Microbiología Molecular de la Facultad de Química de la UAQ. Todos los residuos peligrosos biológicos infecciosos (RPBI) se procesaron de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-1995 y a la NOM-087-ECOL-SSA1-2002. Todos los experimentos que se realizaron en este trabajo se llevaron a cabo de acuerdo al manual de “Las buenas prácticas de laboratorio” establecido por la Food and Drug Administration (FDA) y La Agencia de Protección Ambiental (EPA).

Dirección General de Bibliotecas de la UAQ

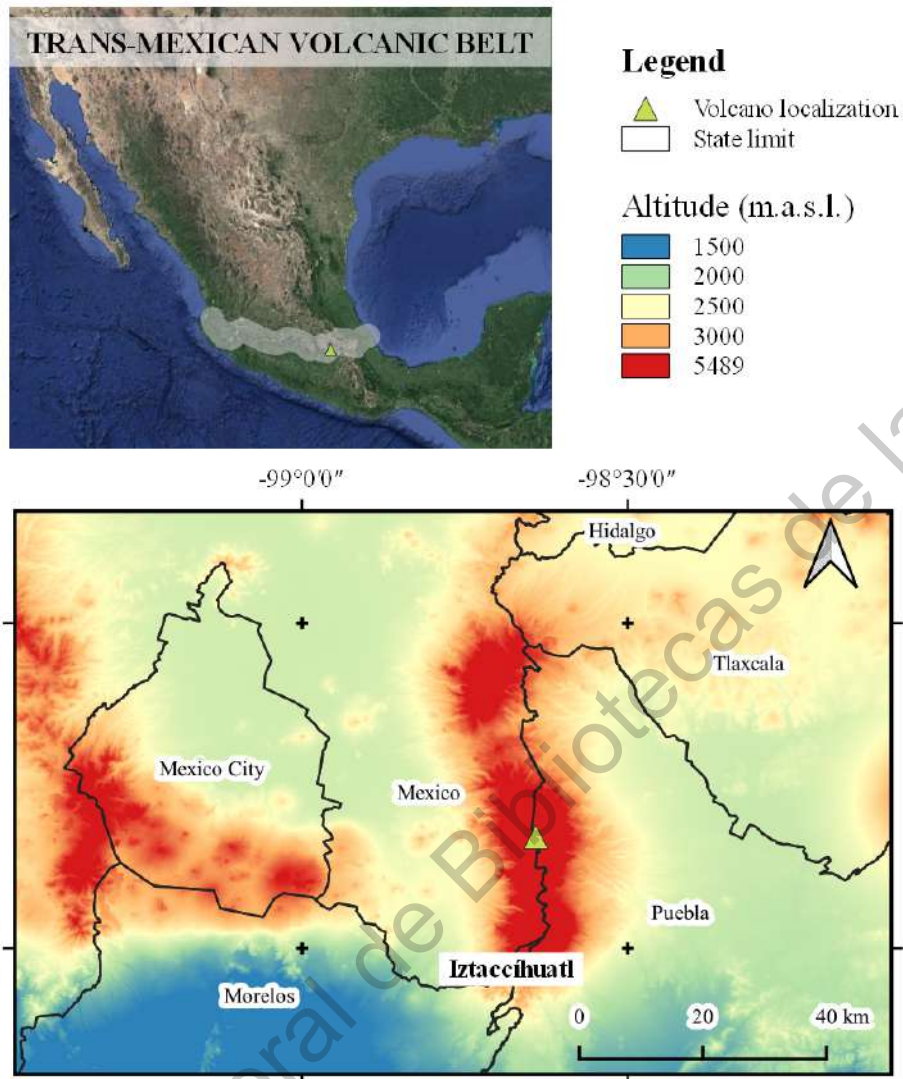


Figura 3. Localización del complejo volcánico Iztaccíhuatl en México. El mapa que muestra el Eje Neovolcánico Transversal Mexicano y la posición del complejo volcánico donde se realizaron los muestreos con una altitud de 5000 msnm en promedio en la latitud 19° norte.

Los tamaños de los cuerpos de agua fueron medios en el programa computacional Google Earth Pro (2021), donde se calcularon los polígonos de los cuatro sitios, los lagos cráter “Monte de Venus”, “La Panza” y los glaciares “La Panza” y “El Pecho” usando imágenes satelitales de 2016 debido a la poca nubosidad presentada, para apreciar los cuerpos de agua con mayor definición.

5.2 Extracción de DNA y viabilidad de las muestras

El agua del glaciar se filtró a través de filtros de 0,22 μm (Millipore) para recuperar las células fúngicas. Los filtros se cortaron en pequeños pedazos usando unas tijeras estériles y se procesaron usando el tampón de lisis de acuerdo a la metodología descrita en el kit comercial ZymoBIOMICS DNA Mini Kit, el cual es específico para la extracción de DNA de microorganismos de muestras de suelo y de agua. Para corroborar la integridad del DNA extraído se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1%. La cual consistió en preparar una solución tampón de corrimiento TAE al 1X (TRIS 40 mM, ácido acético 11.42 mL/ly EDTA 2 mM). En el TAE, se disolvió un gramo de agarosa en 100 mL de TAE y se homogeneizó la mezcla por ebullición. A 25 mL de esta solución de agarosa se agregó 25 μL de bromuro de etidio (0.625 mg/mL). La solución se colocó en el molde de la cámara de electroforesis hasta polimerizar. Después se llenó la cámara con TAE 1X, hasta que se cubrió completamente el gel. Se colocaron 5 μL de azul de bromofenol y 4 μL de muestra en los pozos del gel, se aplicó un voltaje de 80 volts por 60 min. El gel se observó en un fotodocumentador con luz ultravioleta (Gomes et al. 2018).

Por último, para para conocer si las muestras eran viables o no se realizó una PCR punto final la cual consistió en agregar 0.5 μL (20pm) de cada uno de los oligonucleótidos, 0.5 μL (50nm) del DNA de cada muestra, 0.8 μL (2nm) Mezcla de dNTP, 1 μL (2.58 U/ μL) de Taq polimerasa, 5 μL de solución tampón reguladora 10X y 41.7 μL de agua libre de endonucleasas. La metodología usada para la amplificación de la región ITS1–5.8S–ITS2 rRNA se basó en los métodos propuestos por White et al., (1990) usando termociclador un GeneAmp PCR System 9700 (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA). Para comprobar la correcta amplificación

de la región ITS1–5.8S–ITS2 rRNA, se realizó un gel de agarosa como el descrito con anterioridad. Una vez comprobada la viabilidad de DNA extraído se procedió a la secuenciación de la biblioteca de amplicones del RNA.

5.3 Amplificación y secuenciación del conjunto de datos de ITS1–5.8S–ITS2 rRNAS

Una vez realizada la extracción de DNA, se amplificó la región ITS1–5.8S–ITS2 rRNA usando los oligonucleótidos ITS1 (5'- TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (Dyavaiah et al., 2007). La purificación, cuantificación y secuenciación de la biblioteca de amplicones se realizó en Macrogen Inc. (Seúl, República de Corea) y se generará a través de la plataforma Illumina con MiSeq. Una vez obtenidas las librerías de cada set de amplicones, se subieron a la base de datos de GenBank del National Center for Biotechnology Information (NCBI) para obtener números de acceso universales.

5.4 Análisis bioinformático y estudio de la diversidad fúngica

Las secuencias crudas se procesaron para obtener lecturas de alta calidad y para eliminar secuencias de adaptadores, lecturas ambiguas, secuencias de baja calidad y lecturas más cortas que 50 pares de bases con el software Geneious v.9.1.8. Las secuencias editadas se subieron a la nube para realizar su análisis. La categorización de Unidades Taxonómicas Operacionales (OTU's) se realizó mediante la generación de bibliotecas genómicas usando las secuencias editadas. Se analizaron con la base de datos de GenBank del NCBI y se clasificaron usando la herramienta RDP tools version 2.12 usando como punto de corte el 95% de identidad de diversidad fúngica. El análisis bioinformático se llevó a cabo con el

software Geneious v.9.1.8. (12) Adicionalmente se calculó el índice de diversidad de Shannon para cada sitio.

6. Resultados

Los resultados de la medición satelital de los cuerpos de agua mostraron que el sitio con mayor tamaño es el glaciar “El Pecho” con un área de 152,082 m² y de perímetro 2,500 m² seguido por el glaciar “La Panza” con 40,822 m² de y 905 m² respectivamente. En tercer lugar, el lago cráter “La Panza” área de 6,360 m² y de perímetro 372 m² por último el lago cráter “Monte de Venus” con 671 m² y 96 m² respectivamente (Figura 4).



Figura 4. Área y perímetro de los cuatro cuerpos de agua del complejo volcánico Iztaccíhuatl. La imagen muestra la generación de polígonos, el cálculo del área y perímetro de los cuatro sitios donde se tomaron muestras en este

proyecto. Las flechas de color rojo indican, en A esta el glaciar “El Pecho”, B glaciar “La Panza”, C lago cráter “La Panza” y D lago cráter “Monte de Venus”.

Los números de acceso universales del NCBI para cada sitio corresponde al bio-proyecto aquí generado fueron: los lagos cráter “Monte de Venus” SRS3420169, y “La Panza” SRS3420166 y los glaciares “La Panza” SRS3420167 y “El Pecho” RS3420168. El análisis bioinformático arrojó 738,310 secuencias, el cual se redujo a 597,138 secuencias identificadas a nivel taxonómico de división de las que 372,824 se agruparon en 268 unidades taxonómicas operacionales (OTUs) (Apéndice 1). En total, de los 4 sitios se encontraron 268 especies, 91 géneros, 108 familias, 52 órdenes, 17 clases y 4 divisiones de hongos. La profundidad de secuenciación fue de 68,167 (S4), 72,807 (S2), 78,071 (S3) y 153,779 (S1). El número de OTU's obtenidos por muestra va de 30 (S1), 63 (S3), 73 (S4) a 197 (S2) siendo entonces S2 el sitio de muestreo con mayor riqueza y S1 el de menor riqueza, pero el sitio con mayor cantidad de registros, mientras que S4 obtuvo la menor cantidad de registros (Apéndice 2).

Basidiomycota resultó ser la división más abundante con un total de 329,772 lecturas, 55.23% del total de lecturas identificadas a nivel de división y una variación de 1541 (S3) a 154,961 (S4) lecturas entre sitios. Ascomycota, con el segundo lugar en riqueza (239,082 lecturas / 40.01%) mostró una abundancia más homogénea con variación entre 26,729 (S4) y 86,955 (S2) lecturas entre los sitios con menor y mayor riqueza respectivamente, Chytridiomycota con 28,206 lecturas (4.72%) varió de 10 (S2) a 21,304 (S4) lecturas y Mucoromycota con solo 78 de lecturas varió de 29 (S2) a 49 (S1) lecturas representando menos del 0.01% del total y apareciendo

solo en S1 y S2. Basidiomycota domina los sitios S1 y S4 mientras que S2 y S3 están dominados por Ascomycota (Figuras 5 y 6).

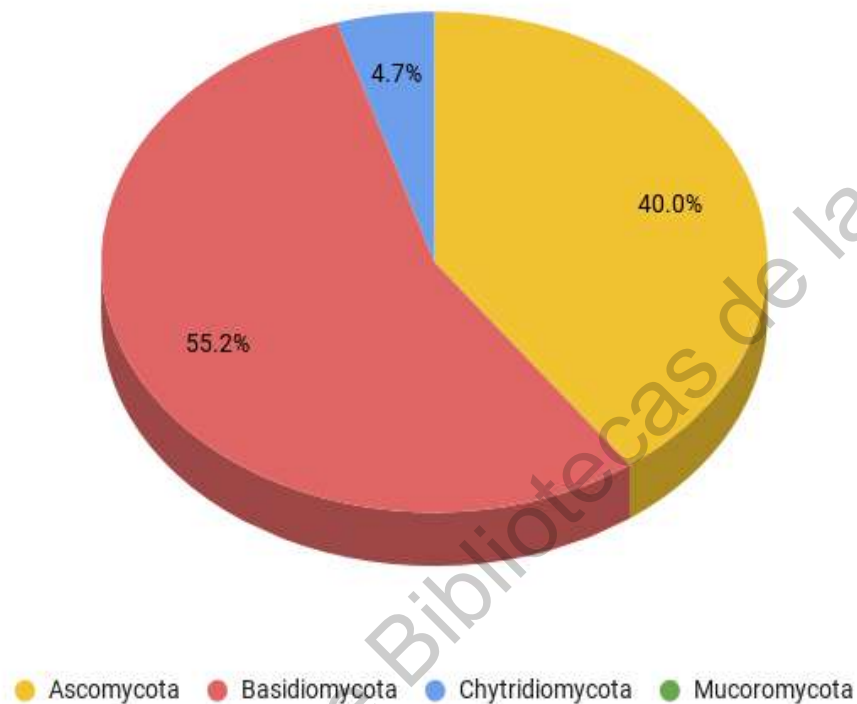


Figura 5. Porcentajes de secuencias identificadas a nivel taxonómico de división. Del total de secuencias identificadas a nivel taxonómico de división 55.2% pertenecen a la división Basidiomycota, 40.0% a Ascomycota, 4.7% a Chytridiomycota y menos del 0.01% a Mucoromycota.

De acuerdo con nuestros resultados encontramos que aparecieron únicamente tres divisiones, Basidiomycota (79.31%), Ascomycota (19.74%), y Mucoromycota con menos de 0.01% de secuencias. S2 (245,373 lecturas) resultó principalmente ocupado por Ascomycetes (35.44%), luego Basidiomycetes (10.53%) y al final Chytridiomycetes con menos del 0.01%. S3 (100,997) se encuentra dominado por Ascomycota (75.24%) seguido de Chytridiomycota (18.47%) y al final Basidiomycota con solo 1.34% de las secuencias. El sitio S4 (196,506) está dominado por

Basidiomycota (75.03%) luego Ascomycota (13.60%), y Chytridiomycota (10.84%) en ese orden (Figura 6).

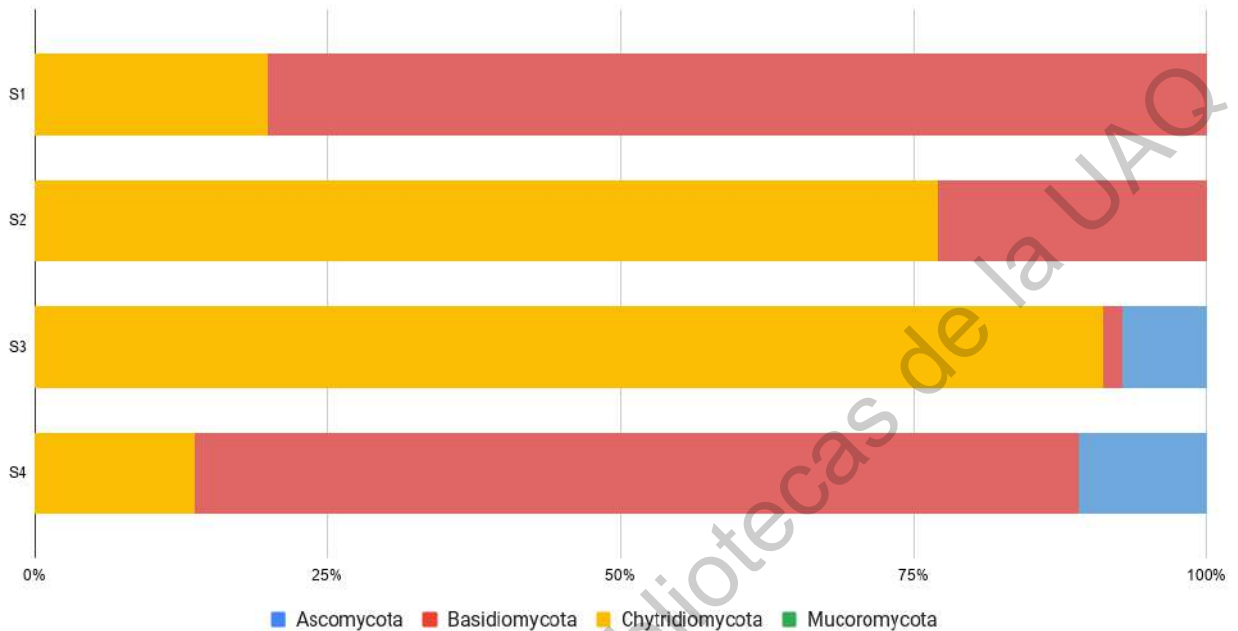


Figura 6. Porcentajes de los registros a nivel taxonómico de división en cada sitio. Basidiomycota domina S1 y S4, Ascomycota S2 y S3, Chytridiomycota apenas se muestra en S3 y S4 y Mucoromycota presente en S1 y S2 no se percibe por su escaso registro. En S1, con un total de 195,385 lecturas identificadas a nivel taxonómico de división,

De las 108 familias encontradas, en S1 se encontraron 18, en S2 85, en S3 50 y en S4 35. Las familias más abundantes fueron Kriegeriaceae, Glomerellaceae, Pleosporaceae y Mrakiaceae (Apéndice 2). En cuanto a géneros los más abundantes, por sitio, fueron *Phenoliferia*, *Trapelia*, *Curvularia* y *Mrakia* para S1, *Didymella*, *Curvularia*, *Cladosporium* y *Naganishia* para S2. *Colletotrichum*, *Catenomyces* y *Spiromastix*. Por último, en el sitio S4 los géneros mejor representados fueron: *Phenoliferia*, *Alphamyces*, *Leucosporidium* y *Curvularia* (Apéndice 3).

De acuerdo con nuestros resultados, no existe una clara relación entre los tamaños de los cuerpos de agua y la riqueza biológica descrita (Figuras 4,5,6). Con relación a los phyla aquí descritos, si hay una relación en cuanto a si son sitios con agua líquida o congelada. Los sitios lagos cráteres que fueron los dos más pequeños en tamaño (S1 y S2) muestran abundancia predominante de Basidiomycota y Chytridiomycota. Por otro lado, los glaciares muestran riqueza de los dos phyla ya mencionados, así como de Ascomycota. Los resultados a nivel taxonómico más específico mostraron que el sitio con mayor número de familias fue el S2, siendo este sitio el tercero más grande, seguido de S3, el segundo más grande, S4 siendo el más grande y por último S4 el de menos área. La única conciencia encontrada de acuerdo con el tamaño es el sitio S4 que es el menos diverso y el más pequeño. En relación con la presencia de agua congelada o de agua líquida no hay una relación en cuanto a la riqueza descrita aquí (S2 glacial>S3 lago>S1 glacial>S4 lago).

Aunque la diversidad entre muestras difiere sustancialmente, todos los sitios muestran OTUs compartidos con al menos uno de los otros sitios. Por otro lado, cada sitio muestra, en menor número, OTUs exclusivos (únicamente presentes en cada sitio), menos S2, que además de tener el mayor número de OTU's registrados, también muestra una cantidad particularmente mayor de OTUs exclusivos (Figura 7). En el lago cráter "Monte de Venus" (S1) *Phenoliferia glacialis* tuvo el mayor número de lecturas (103,625) o el 67.39% del total de registros identificados a nivel de especie en el sitio (153779), y también se encontró en los otros tres sitios siendo la especie mejor representada. También se encontró una cantidad considerable de registros de *Cryptococcus sp.* *Mrakia sp.* y *Naganishia randhawae*.

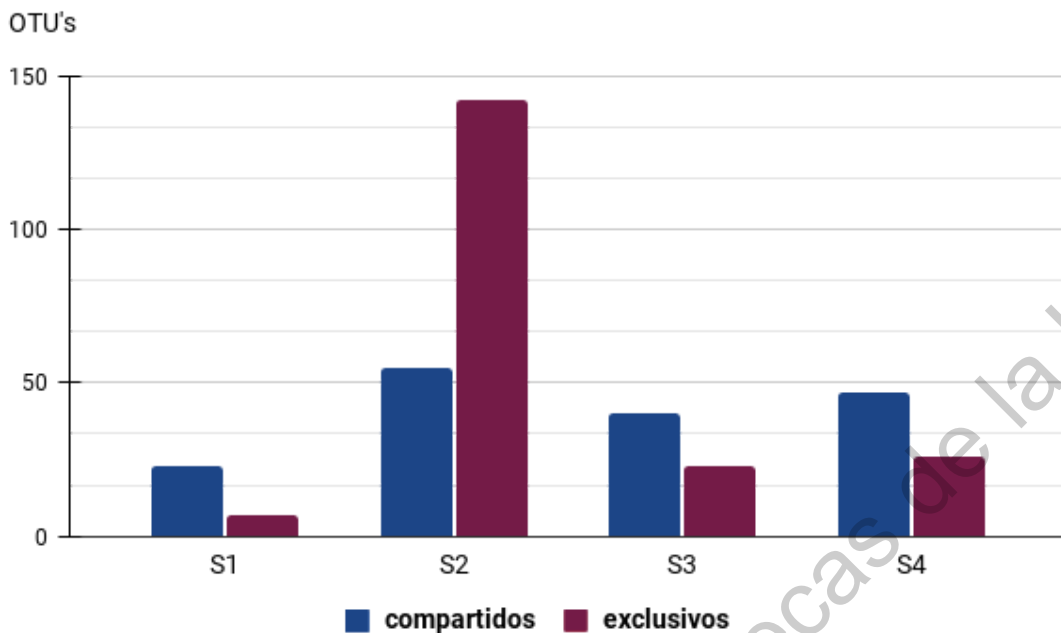


Figura 7. OTU's compartidos y exclusivos de cada sitio. Número de OTU's presentes en un sitio de muestreo que además están presentes en al menos otra localidad (barras azules) y número de OTU's exclusivamente presentes en el sitio correspondiente (barras en color púrpuras).

En el cráter "La Panza" (S2) con un total de 72807 lecturas se registró un número de OTU's particularmente mayor entre los 4 sitios (197), los más abundantes son *Colletotrichum acutatum*, *Epicoccum nigrum* y *Curvularia australiensis* en ese orden. El glaciar "La Panza" (S3) con un total de 63 OTU's, igual que S2, presenta a *Colletotrichum acutatum* como la especie de mayor abundancia con 74,659 lecturas o el 95.63% del total de registros de ese sitio (78071). S4 o el glaciar "El Pecho" registra 68167 lecturas agrupadas en 73 OTU's de los que se destacan en abundancia a *Phenoliferia psychrophila*, *Phenoliferia glacialis* y *Leucosporidium fellii*.

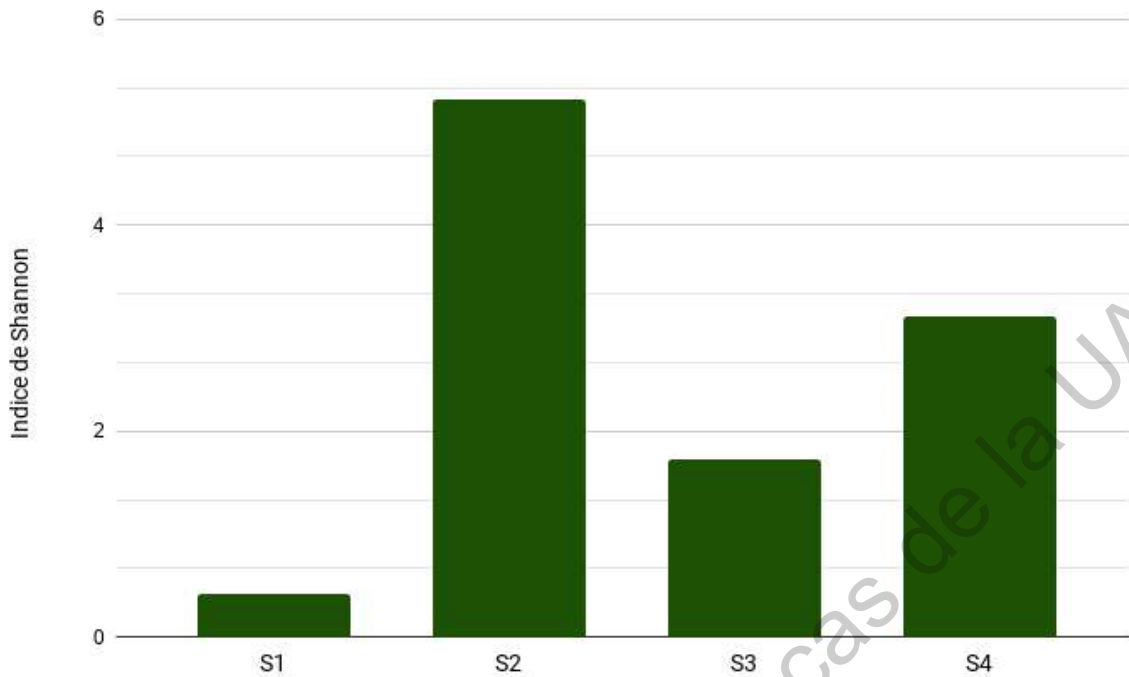


Figura 8 Índices de diversidad de Shannon. Se muestran los valores obtenidos para las muestras de cada sitio utilizando el índice de diversidad de Shannon.

El índice de diversidad de Shannon (Figura 8), indica que la diversidad de hongos para S2 es de 5.211 siendo este el sitio que muestra mayor diversidad mientras que el menor índice de diversidad es de S1 (0.42649) (Figura 8).

7. Discusión

El estudio de la riqueza de hongos en sitios no polares alrededor del globo es escaso, especialmente en México (Tapia-Vázquez et al. 2020). Poco se sabe sobre la vida microbiana que habita estos sitios únicos y poco explorados (Calvillo-Medina et al. 2020) descritos como ambientes frágiles. El presente estudio representa, según nuestro conocimiento, un primer acercamiento al análisis de abundancia y riqueza usando métodos de secuenciación con hongos extremófilos en áreas glaciares volcánicas en México y los trópicos.

Se han realizado estudios similares utilizando la región ITS1 en sitios como el Monte Gongga en China (Tian 2017), lagos en la península antártica (Gonçalves 2012), en el Glaciar Géant en el Mont Blanc en Francia, el Glaciar Miage, en Italia (glaciares alpinos adyacentes) (Turchetti 2013 B) y en un lago en la Patagonia (Argentina) (Luciana 2011) por ejemplo. En contraste con las tendencias generales en la distribución de comunidades de hongos en zonas templadas, que muestran la prevalencia de hongos ascomicetos filamentosos, revelamos aquí la presencia de una abundante y diversa población de hongos en muestras de hielo, la cual está compuesta por miembros de los phyla Ascomycota, Basidiomycota, Chytridiomycota y Mucoromycota, dominada por levaduras basidiomycetes. Los taxa dominantes fueron Ascomycota y Basidiomycota (40.04% y 55.23% del total de secuencias respectivamente) cada uno en dos sitios diferentes. Los géneros mejor representados fueron *Phenoliferia* y *Colletotrichum* además de *Curvularia*, *Mrakia*, *Alphamyces*, *Didymella*, *Cladosporium* y *Leucosporidium*. No se encontró respuesta significativa entre el índice de diversidad de Shannon y la altura (msnm) de cada sitio de muestreo.

Las OTUS's con las mayores densidades fueron *Colletotrichum acutatum*, *Leucosporidium fellii*, *Mrakia sp.*, *Naganishia randhawae*, *Phenoliferia glacialis* y *Phenoliferia psychrophila*. La estructura de las comunidades de hongos resultó variar de acuerdo con las diferentes localizaciones geográficas de los sitios muestreados demostrando una variación local marcada entre sitios. Como la ubicación geográfica varía, también lo hará la composición de las comunidades microbianas dentro del entorno local (Mueller 2001). Los índices de hongos para la diversidad y uniformidad de Shannon mostraron patrones unimodales a lo largo de la distancia desde el extremo del glaciar S1 a S4. La diversidad y uniformidad de Shannon alcanzaron su punto máximo a una altura de 5010 msnm (S2), y disminuyeron posteriormente para volver a subir en S4 a los 5200. Pueden desarrollarse comunidades únicas que son características de cada región. Sin embargo, es posible que los insumos biológicos no están restringidos únicamente al entorno vecino, sino que se puede transportar a distancias mucho mayores, en vientos alisios (Rousseau 2005; Price 2009). El hielo glaciar puede contener materia orgánica de origen eólico así como capas de arena y otras inclusiones. Se puede considerar como una excelente matriz de preservación de microorganismos a largo plazo y como tal, permite el estudio de la diversidad microbiana contemporánea y la antigua (Gunde-Cimerman 2003).

Algunas especies encontradas aquí, como *Glaciozyma antarctica*, *Rhodotorula mucilaginoso*, *Rhodotorula dairenensis*, *Penicillium chrysogenum*, también fueron aisladas por Menezes 2020. de fragmentos de hielo glaciar en la península Antártica. De las 263 especies encontradas solo *Phenoliferia glacialis* y *Trapelia*

antarctica se encontraron presentes en todos los sitios muestreados. *Phenoliferia glacialis* es una levadura psicrófila que exhibe una alta versatilidad metabólica, y junto con *P. psychrophenolica* (*Rhodotorula psychrophenolica*), se obtuvo originalmente del glaciar Etendard en Francia y del glaciar Stubaier y crioconita en Austria (de Menezes 2019). Recientemente, Ferreira et al. aislaron *P. glacialis* y *P. psychrophenolica* de las hojas de *Deschampsia antarctica*, musgos y diferentes biopelículas presentes en la Península Antártica. Las especies *Mrakia aquatica* y *Mrakia frigida* también fueron aisladas de suelos en China (Zhang 2020). Se han aislado cepas de *Mrakia* de otros ambientes fríos y también se ha informado de solubilización de fosfato para este género. Esto puede ser muy relevante para suelos volcánicos, donde el fosfato es escasamente biodisponible (Tapia-Vázquez et al. 2020). De acuerdo con nuestros resultados no existe una relación clara el nicho ecológico (tamaño del cuerpo de agua, altitud o disponibilidad de agua) y la diversidad fúngica. Para esclarecer las relaciones entre los sitios de muestreo y la diversidad y riqueza de hongos son necesarios más estudios donde, se tomen más muestras para análisis biológicos, así como estudiar los parámetros fisicoquímicos de cada sitio. Dichos parámetros van a influir en las capacidades de tolerancia a condiciones extremas de estos hongos psicrófilos (Ciccazzo et al. 2016).

Algunos estudios han determinado que estos microorganismos especializados en condiciones extremas son capaces de tolerar una amplia gama de estrés, incluyendo desecación, hipersalinidad, radiación solar y las bajas temperaturas, mediante el desarrollo de estrategias funcionales, como la producción de compuestos bioactivos (Godinho et al., 2013)., enzimas activas en frío y proteínas anticongelantes (Robinson, 2001; Krishnan et al., 2011, 2018).

El metabolismo heterotrófico de hongos psicrófilos en particular el de levaduras junto con su capacidad observada para degradar macromoléculas orgánicas a través de la secreción de enzimas hidrolíticas extracelulares adaptadas al frío puede sugerir su papel auxiliar potencial como recicladores de nutrientes biogeoquímicos en ambientes subglaciales (Turchetti 2008 A). La supervivencia de los hongos en ambientes extremos es una consecuencia tanto de la selección ecológica como de las adaptaciones evolutivas expresadas a nivel fisiológico, metabólico, estructural y genético (Cowan 2014).

Respecto a la importancia ecológica de la presencia de levaduras en comunidades microbianas subglaciales se refiere, quedan algunas preguntas, particularmente en consideración el hecho de que la mayoría de las especies microbianas no se pueden cultivar en condiciones de laboratorio. Como consecuencia, los resultados de este estudio podrían representar en el mejor de los casos una imagen parcial de la Biodiversidad de levaduras que se produce en los entornos glaciares del Iztaccíhuatl. La bioinformática la necesitamos porque la mayoría de los organismos no son cultivables. Uno de los desafíos de la microbiología en ambientes extremos es conocer los microorganismos desconocidos. Además, comprender los patrones biogeográficos es un precursor para mejorar nuestro conocimiento de la función de los microbiomas y para predecir las respuestas de los ecosistemas al cambio ambiental (Ma 2017).

8. Conclusión

Los análisis revelaron una amplia diversidad taxonómica hasta nivel de especie, la cual de acuerdo con nuestros resultados no muestra una clara relación con la disponibilidad de agua (lago o glaciar) ni con tamaño de los cuatro sitios aquí estudiados. Se necesitan más estudios de caracterización de los cuerpos de agua extremos para determinar si esta la diversidad descrita en este estudio se debe al aislamiento geográfico, a las condiciones ecológicas o un origen evolutivo independiente. Es necesario profundizar en el conocimiento y análisis de más proyectos como este para comprender el papel ecológico que juegan los integrantes psicrófilos del reino Fungi en su excepcional hábitat en nuestro país.

Los datos obtenidos en este estudio demuestran que los glaciares tropicales de México pueden ser un interesante reservorio de hongos que puede servir como modelo para futuros estudios ecológicos, evolutivos y biogeográficos. Es de suma importancia realizar proyectos que contribuyan a generar conocimiento y así evitar el deterioro de sitios tan particulares como los glaciares y los lagos cráter del Iztaccíhuatl antes de que perdamos la oportunidad de hacerlo debió al calentamiento global y la falta de apoyo a la ciencia en México.

9. Referencias

Álvarez R. and Delgado Granados H. (2011). Characterization of a tropical ice body on Iztaccíhuatl volcano, Mexico. Proceedings of SPIE - International Society for Optical Engineering. 4758. 10.1117/12.462267.

Anesio A.M. and Laybourn-Parry J. (2012). Glaciers and ice sheets as a biome. Trends in Ecology & Evolution. 27(4), 219–225. doi:10.1016/j.tree.2011.09.012

Barr D.J.S. (1992). Evolution and Kingdoms of Organisms from the Perspective of a Mycologist. Mycologia. 84(1):1. doi:10.2307/3760397

Brandão L.R., Libkind D., Vaz A.B., Espírito Santo L.C., Moliné M., de García V., van Broock M. and Rosa CA. (2011). Yeasts from an oligotrophic lake in Patagonia (Argentina): diversity, distribution and synthesis of photoprotective compounds and extracellular enzymes. FEMS Microbiol Ecol. 76(1):1-13. doi: 10.1111/j.1574-6941.2010.01030.x. Epub 2011 Jan 11. PMID: 21223324.

Cantrell S.A., Dianese JC., Fell J., Gunde-Cimerman N. and Zalar P. (2011). Unusual fungal niches. Mycologia. 103(6):1161-74. doi: 10.3852/11-108. PMID: 21700639.

Cicczazzo S., Esposito A., Borruso L., and Brusetti L. (2016). Microbial communities and primary succession in high altitude mountain environments. Ann Microbiol. 66:43–60. <https://doi.org/10.1007/s13213-015-1130-1>

Clark P.U., Dyke A.S., Shakun J. D., Carlson A. E., Clark J., Wohlfarth, B., et al. (2009). The Last Glacial Maximum. *Science*. 325(5941):710–714. doi:10.1126/science.1172873

Cowan D.A., Makhalanyane T.P., Dennis P.G., and Hopkins D.W. (2014). Microbial ecology and biogeochemistry of continental antarctic soils. *Front. Microbiol.* 5:154. doi: 10.3389/fmicb.2014.00154

De Menezes G.C.A., Porto B.A., Amorim S.S., Zani C.L., de Almeida Alves T.M., Junior PAS. and Rosa L.H. (2020). Fungi in glacial ice of Antarctica: diversity, distribution and bioprospecting of bioactive compounds. *Extremophiles*. doi:10.1007/s00792-020-01161-5

De Meneze G., Amorim S.S., Gonçalves V.N., Godinho V.M., Simões J. C., Rosa C.A. and Rosa L. H. (2019). Diversity, distribution, and ecology of Fungi in the seasonal snow of Antarctica. *Microorganisms*. 7(10):445. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7100445>

Dyavaiah M., Ramani D., Ritterband, M. K. Shah, W. A. Samsonoff S. Chaturvedi, and Chaturvedi V. (2007). Molecular characterization, biofilm analysis and experimental biofouling study of *Fusarium* isolates from recent cases of fungal keratitis in New York State. *BMC Ophthalmology*. 7:1-13.

Dyurgerov M.B. and Meier M.F. (2000). Twentieth century climate change: Evidence from small glaciers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 97(4):1406–1411. doi:10.1073/pnas.97.4.1406

Ferreira E.M.S., de Sousa F.M.P., Rosa L.H., Pimenta R.S., (2019). Taxonomy and richness of yeasts associated with angiosperms, bryophytes, and meltwater biofilms collected in the Antarctic Peninsula. *Extremophiles*. 23:151–159.

Gilbert J.A., Davies P.L. and Laybourn-Parry J. (2005). A hyperactive, Ca²⁺-dependent antifreeze protein in an Antarctic bacterium. *FEMS Microbiology Letters*. 245(1):67–72. doi:10.1016/j.femsle.2005.02.022

Godinho M., Furbino L.E., Santiago I.F., Pellizzari F.M., Zani C.L., Cantrell C.L., et al. (2013). Diversity and bioprospecting of fungal communities associated with endemic and cold-adapted macroalgae in Antarctica. *ISME J*. 7:1434–1451. doi:10.1038/ismej.2013.77

Gomes E.C.Q., Godinho V.M., Silva D.A.S., de Paula M.T.R. Vitoreli, G.A. and Zani CL. (2018). Cultivable fungi present in Antarctic soils: taxonomy, phylogeny, diversity, and bioprospecting of antiparasitic and herbicidal metabolites. *Extremophiles*. 3:381-393.

Gonçalves V.N., Vaz A.B., Rosa C.A. and Rosa L.H. (2012). Diversity and distribution of fungal communities in lakes of Antarctica. *FEMS Microbiol Ecol*.

82(2):459-71. doi: 10.1111/j.1574-6941.2012.01424.x. Epub 2012 Jun 25. PMID: 22671312.

Gunde-Cimerman N., Sonjak S., Zalar P., Frisvad J.C., Diderichsen B. and Plemenitaš A. (2003). Extremophilic fungi in arctic ice: a relationship between adaptation to low temperature and water activity. *Physics and Chemistry of the Earth*. 28(28-32):1273–1278. doi:10.1016/j.pce.2003.08.056

Haeberli W. and Beniston M. (1998). Climate change and its impacts on glaciers and permafrost in the Alps. *Ambio* Vol. 27(4):1-10.

Hawksworth D.L. (2001). The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. *Mycological Research*. 105:1422-1432.

Institute of Medicine. (2008). Global climate change and extreme weather events: Understanding the contributions to infectious disease emergence. Workshop summary. Washington, DC: The National Academies Press. <https://doi.org/10.17226/12435>.

Karen A., Cameron Andrew J., Hodson A. and Osborn M. (2012). Structure and diversity of bacterial, eukaryotic and archaeal communities in glacial cryoconite holes from the Arctic and the Antarctic, *FEMS Microbiology Ecology*. 82(2):254–267, <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2011.01277.x>

Kearse M., Moir R., Wilson A., Stones-Havas S., Cheung M., Sturrock S., et al. (2012). Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*. 28(12):1647-1649 doi: 10.1093/bioinformatics/bts199.

Krishnan A., Alias S.A., Won C.M. V.L., Pang K.-L. and Convey P. (2011). Extracellular hydrolase enzyme production by soil fungi from King George Island, Antarctica. *Polar Biol*. 34:1535–1542. doi: 10.1007/s00300-011-1012-3

Krishnan A., Convey P., Gonzalez M., Smykla J. and Alias S.A. (2018). Effects of temperature on extracellular hydrolase enzymes from soil microfungi. *Polar Biol*. 41:537–551. doi: 10.1007/s00300-017- 2215-z

Lodge D.J. (1992). Nutrient cycling by fungi in a wet tropical rainforest. En S. Isaac, J. C. Frankland, R. Watling y A. J. S. Whalley (eds.). *Aspects of tropical mycology*. Cambridge: Cambridge University Press.

Ma B., Dai Z., Wang H., Dsouza M., Liu,X., He Y., et al. (2017). Distinct Biogeographic Patterns for Archaea, Bacteria, and Fungi along the Vegetation Gradient at the Continental Scale in Eastern China. *mSystems*, 2.

Margesin R., and Miteva V. (2011) Diversity and ecology of psychrophilic microorganisms. *Res Microbiol*.162(3):346-61. doi: 10.1016/j.resmic.2010.12.004. Epub 25.PMID: 21187146.

Mueller DR., Vincent WF., Pollard WH. And Fritsen CH. (2001). Glacial cryoconite ecosystems: a bipolar comparison of algal communities and habitats. *Nova Hedwigia Beiheft.* 123:173–197.

Price P. (2009). Microbial genesis, life and death in glacier ice. *Can J Microbiol.* 55:1–11.

Robinson C.H. (2001). Cold adaptation in Arctic and Antarctic fungi. *New Phytol.* 151:341–353. doi: 10.1046/j.1469-8137.2001.00177.x

Rousseau D., Schevin P., Duzer D., Cambon G., Ferrier J., Jolly D., et al. (2005), Pollen transport to southern Greenland: new evidence of a late spring long distance transport. *Biogeosci Disc.* 2:1–19

Schmit J.P. and Mueller G.M. 2006. An estimate of the lower limit of global fungal diversity. *Biodiversity and Conservation.* 16:99-111.

Siddiqui K.S. and Cavicchioli R. (2006). Cold-Adapted Enzymes. *Annual Review of Biochemistry.* 75(1):403–433. doi:10.1146/annurev.biochem.75.103004.1

Stephenson S. L. (2010). *The Kingdom fungi: The biology of mushrooms, molds, and lichens.*

Stocker T. F., Qin,D., Plattner G.K., Tignor M., Allen K., Boschun J., et al. (2013). “Summary for policymakers,” in IPCC,,: *Climate Change 2013: The Physical science Basis, contribution of working group I to the fifth assessment report of the*

intergovernmental panel on climate change (Cambridge: Cambridge University Press). 710–719

Tian J., Qiao Y., Wu B., Chen H., Li W., Jiang N., et al. (2017). Ecological succession pattern of fungal community in soil along a retreating glacier. *Front. Microbiol.* 8:1028. doi: 10.3389/fmicb.2017.01028

Turchetti B., Buzzini P., Goretti M., Branda E., Diolaiuti G., D'Agata C., et al. (2008) A. Psychrophilic yeasts in glacial environments of Alpine glaciers. *FEMS Microbiol Ecol.* Jan. 63(1):73-83. doi: 10.1111/j.1574-6941.2007.00409.x. PMID: 18067577.

Turchetti B., Goretti M., Branda E., Diolaiuti G., D'Agata C., Smiraglia C., et al. (2013) B. Influence of abiotic variables on culturable yeast diversity in two distinct Alpine glaciers. *FEMS Microbiol Ecol.* 86(2):327-40. doi: 10.1111/1574-6941.12164. Epub 2013 Jul 2. PMID: 23772605.

White T., Bruns T., Lee S. and Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH., Sninsky SS., and White TJ. eds. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. New York, NY: Academic Press Inc; 1990:315-322.

White E.S. (2002) *Glaciers of México*. 383-389 U.S Geological survey professional paper 1386-j-3

Zhang K-H., Shi C-F., Chai C-Y. and Hui F-L. (2020). *Mrakia panshiensis* sp. nov. a new member of the Cystofilobasidiales from soil in China, and description of the teleomorphic-stage of *M. arctica*. MycoKeys. 74:75-90.

<https://doi.org/10.3897/mycokeys.74.53433>

10. Apéndices

Apéndice 1. Tabla a nivel de especie donde se muestra el número de veces que se registró una secuencia identificada para cada sitio de muestreo.

Especies/	Sitio S1	Sitio S2	Sitio S3	Sitio S4
<i>Acidea extrema</i>	-	-	5	-
<i>Agaricus blazei</i>	-	20	-	-
<i>Agaricus xanthodermus</i>	-	15	-	-
<i>Alphamyces chaetifer</i>	-	-	14	65
<i>Alternaria alternata</i>	-	-	2	-
<i>Alternaria botryospora</i>	-	118	-	-
<i>Alternaria daucifolii</i>	-	240	28	-
<i>Alternaria tenuissima</i>	-	-	168	4
<i>Amanita muscaria</i>	-	15	-	-
<i>Anthracoystis cenchri</i>	-	5	-	-
<i>Antrodiella pallasii</i>	-	24	-	-
<i>Aplosporella africana</i>	-	396	-	-
<i>Aplosporella hesperidica</i>	-	342	-	-
<i>Arthopyrenia sp.</i>	-	-	3	-
<i>Ascobolus carbonarius</i>	-	22	-	-
<i>Ascochyta sorghi</i>	-	157	-	-
<i>Ascochyta sp.</i>	-	21	-	-
<i>Aspergillus baeticus</i>	-	6	-	-
<i>Aspergillus clavatorphorus</i>	-	15	-	-

<i>Aspergillus hordei</i>	-	11	-	-
<i>Aspergillus ruber</i>	-	13	-	-
<i>Aspergillus vitricola</i>	-	-	-	5
<i>Aspicilia fluviatilis</i>	-	52	-	-
<i>Aureobasidium pullulans</i>	-	2743	39	10
<i>Bannozyma sp.</i>	213	51	-	34
<i>Betamyces americaemerdionalis</i>	-	-	-	24
<i>Bifusella camelliae</i>	-	-	8	218
<i>Botrytis californica</i>	14	249	12	-
<i>Bovista aestivalis</i>	-	15	-	-
<i>Bovista paludosa</i>	-	807	12	-
<i>Broomella vitalbae</i>	-	6	-	-
<i>Buckleyzyma aurantiaca</i>	-	14	-	-
<i>Buellia aethalea</i>	-	88	-	-
<i>Calvatia turneri</i>	-	20	-	-
<i>Candida parapsilosis</i>	-	75	-	3
<i>Candida sake</i>	-	1595	-	-
<i>Catenomyces persicinus</i>	-	-	661	45
<i>Cephalosporium sp. 1 TMS-2011</i>	-	49	-	-
<i>Cephalotrichum nanum</i>	-	32	-	-
<i>Ceriporiopsis aneirina</i>	-	-	100	-
<i>Chaetothyriales sp. NY392</i>	-	99	-	-
<i>Cladosporium allicinum</i>	-	335	93	8
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	-	312	8	-
<i>Cladosporium sp.</i>	39	-	253	20
<i>Cladosporium tenuissimum</i>	10	-	-	4
<i>Clydaea vesicula</i>	-	-	228	-
<i>Coccomyces dentatus</i>	-	-	-	133

<i>Colacogloea falcata</i>	-	-	-	4422
<i>Collariella virescens</i>	-	67	-	-
<i>Colletotrichum acutatum</i>	-	7103	74659	1
<i>Coniochaeta sp. UBCtra1453C</i>	-	-	-	3
<i>Coniothyriaceae sp.</i>	-	38	-	-
<i>Coprinellus cf. micaceus T-776</i>	-	161	-	-
<i>Coprinellus curtus</i>	-	13	4	-
<i>Coprinellus marculentus</i>	-	12	-	-
<i>Coprinellus sclerocystidiosus</i>	-	100	-	-
<i>Coprinopsis cinerea</i>	-	74	-	-
<i>Coprinopsis gonophylla</i>	-	31	-	-
<i>Coprinopsis radiata</i>	-	109	-	-
<i>Coprinus comatus</i>	-	25	-	-
<i>Coprinus sterquilinus</i>	-	-	3	-
<i>Cosmospora sp. AFCN604</i>	44	-	-	-
<i>Cryptococcus sp.</i>	9371	-	6	4
<i>Cryptococcus sp. T15Csp</i>	-	-	-	4
<i>Curvularia australiensis</i>	47	5794	-	8349
<i>Curvularia chlamydospora</i>	-	61	-	-
<i>Curvularia trifolii</i>	-	14	-	-
<i>Cystobasidium laryngis</i>	-	65	-	-
<i>Cystobasidium minutum</i>	9	19	-	-
<i>Cystobasidium ongulense</i>	-	24	-	-
<i>Cystobasidium sp.</i>	-	19	-	-
<i>Cystobasidium sp. CBS 8923</i>	-	8	-	-
<i>Cystoderma sp.</i>	-	7	-	-
<i>Cystofilobasidium infirmominiatum</i>	-	40	-	-
<i>Cystotheca lanestris</i>	-	391	4	-

<i>Debaryomyces hansenii</i>	-	336	-	-
<i>Deconica coprophila</i>	-	176	-	-
<i>Didymella sp.</i>	-	5678	494	15
<i>Dioszegia sp.</i>	-	52	-	-
<i>Dioszegia sp. DBVPG 10049</i>	-	-	-	4
<i>Dioszegia sp. YA-2016</i>	266	-	-	34
<i>Dioszegia statzelliae</i>	1246	41	-	1936
<i>Disciseda candida</i>	-	30	-	-
<i>Dothideales sp. P44C001</i>	-	45	-	-
<i>Dothiorella viticola</i>	-	252	6	-
<i>Dothistroma septosporum</i>	-	48	-	-
<i>Durella connivens</i>	-	-	2	-
<i>Elasticomyces elasticus</i>	-	6	-	-
<i>Emmia lacerata</i>	-	20	-	-
<i>Epicoccum nigrum</i>	-	6629	11	27
<i>Exophiala sp. 4-11c</i>	-	14	-	-
<i>Filobasidium magnum</i>	-	44	2	-
<i>Filobasidium wieringae</i>	-	326	-	2
<i>Fomitopsis pinicola</i>	-	-	1	-
<i>Fonsecazyma sp.</i>	-	-	5	-
<i>Friedmanniomyces endolithicus</i>	-	39	16	2
<i>Fusarium merismoides</i>	-	18	-	-
<i>Fusarium sp.</i>	-	-	11	-
<i>Fusicladium sp. V432</i>	-	14	-	-
<i>Galactomyces candidum</i>	-	35	-	-
<i>Ganoderma annulare</i>	-	12	-	-
<i>Ganoderma meredithae</i>	-	10	-	-
<i>Geosmithia sp. U418</i>	-	16	-	-

<i>Glaciozyma antarctica</i>	-	-	9	-
<i>Goffeauzyma gastrica</i>	700	1266	-	294
<i>Goffeauzyma gilvescens</i>	56	17	-	105
<i>Hagleromyces aurorensis</i>	-	626	-	164
<i>Hamamotoa singularis</i>	-	-	12	-
<i>Hannaella zeae</i>	-	-	-	8
<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	-	4	-	-
<i>Helotiales sp. SL11101</i>	-	40	-	-
<i>Helotiales sp. WMM-2012h</i>	590	-	-	-
<i>Holtermanniella festucosa</i>	40	-	-	109
<i>Holtermanniella wattica</i>	1093	4295	-	239
<i>Hyphozyma variabilis</i>	-	14	-	-
<i>Inocybe aurora var. inodorata</i>	-	169	-	-
<i>Kwoniella dendrophila</i>	-	26	-	-
<i>Lactarius thynos</i>	-	886	-	188
<i>Laetinaevia carneoflava</i>	69	-	-	2
<i>Latorua caligans</i>	-	-	3	-
<i>Leotiomyces sp. AFCN243</i>	-	413	-	-
<i>Leuconeurospora pulcherrima</i>	-	-	-	4
<i>Leucosporidium creatinivorum</i>	-	-	-	448
<i>Leucosporidium drummii</i>	15	-	-	-
<i>Leucosporidium fellii</i>	-	-	-	10010
<i>Leucosporidium scotii DSM 101914</i>	3	1227	-	3
<i>Leucosporidium scottii</i>	-	136	-	1
<i>Loratospora luzulae</i>	-	14	-	-
<i>Lycoperdon nigrescens</i>	-	19	-	-
<i>Malassezia globosa</i>	-	14	-	-
<i>Malassezia restricta</i>	-	88	-	-

<i>Meristemomyces frigidus</i>	-	-	-	1
<i>Microascales sp. SSR-2012a</i>	-	21	-	-
<i>Microbotryum violaceum</i>	-	74	-	-
<i>Microcyclospora sp. N3.3F1d</i>	-	34	-	-
<i>Monochaetia dimorphospora</i>	-	19	2	-
<i>Mortierella sp. 1PM5</i>	49	-	-	-
<i>Mrakia aquatica</i>	-	222	-	49
<i>Mrakia frigida</i>	-	4410	-	-
<i>Mrakia niccombsii</i>	-	39	-	5
<i>Mrakia sp.</i>	23964	3	-	255
<i>Myrmaecium rubricosum</i>	-	39	-	-
<i>Naganishia adeliensis</i>	-	338	-	-
<i>Naganishia albida</i>	-	1664	3	-
<i>Naganishia bhutanensis</i>	-	6	-	-
<i>Naganishia diffluens</i>	564	1207	-	-
<i>Naganishia randhawae</i>	6790	4332	-	1077
<i>Neocamarosporium sp.</i>	-	94	-	-
<i>Neomicrosphaeropsis sp.</i>	-	-	4	-
<i>Neosetophoma samarorum</i>	-	3	-	-
<i>Neurospora africana</i>	-	278	-	-
<i>Nigrospora oryzae</i>	-	410	17	-
<i>Nigrospora sp. BAB-5087</i>	-	56	-	-
<i>Nigrospora sphaerica</i>	-	22	-	-
<i>Oidiodendron sp. 23WI18</i>	-	18	-	-
<i>Oleoguttula mirabilis</i>	-	-	-	15
<i>Orbilina pleioaustraliensis</i>	-	64	-	-
<i>Panaeolus foenicicii</i>	-	41	-	-
<i>Panaeolus papilionaceus</i>	-	69	-	-

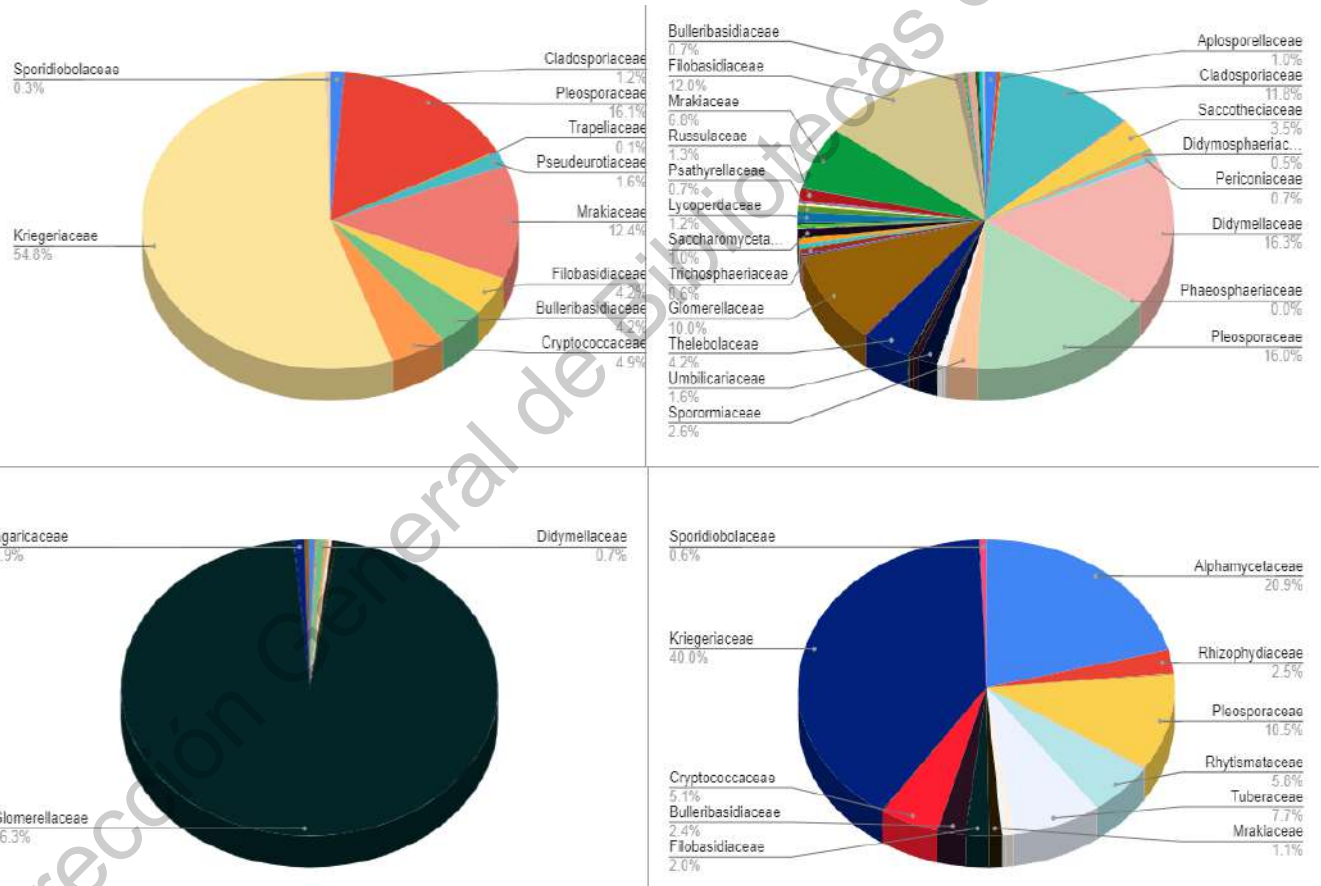
<i>Panaeolus retirugis</i>	-	122	4	-
<i>Papiliotrema flavescens</i>	-	38	-	-
<i>Paraconiothyrium sp. MC-2013</i>	-	132	-	-
<i>Paraphaeosphaeria sp. TMS-2011</i>	-	269	-	-
<i>Parasola schroeterii</i>	-	8	-	-
<i>Penicillium aurantiogriseum</i>	-	2	-	-
<i>Penicillium chrysogenum</i>	-	-	3	-
<i>Penicillium coprophilum</i>	-	14	-	-
<i>Penicillium crustosum</i>	-	13	-	-
<i>Penicillium digitatum</i>	-	7	-	-
<i>Penicillium sp.</i>	-	34	-	-
<i>Penicillium williamettense</i>	-	18	-	-
<i>Periconia pseudobyssoides</i>	-	451	29	9
<i>Periconia sp.</i>	-	-	6	-
<i>Periconia sp. CY198</i>	-	82	-	-
<i>Pestalotiopsis citrina</i>	-	10	-	-
<i>Pestalotiopsis sp. SH18KPN</i>	-	2	-	-
<i>Peyronellaea sp.</i>	-	-	15	3
<i>Peziza sp. HD S.85.41</i>	-	10	-	-
<i>Phaffia sp. CBS 11768</i>	-	-	-	2
<i>Phenoliferia glacialis</i>	103625	417	1	12094
<i>Phenoliferia psychrophenolica</i>	2	-	-	822
<i>Phenoliferia psychrophila</i>	-	-	-	19362
<i>Phialocephala bamuru</i>	-	7	-	-
<i>Phialocephala fluminis</i>	-	3	-	-
<i>Pholiota gallica</i>	-	14	-	-
<i>Pholiota lenta</i>	-	14	-	-
<i>Phoma sp.</i>	-	-	34	-

<i>Physcia aipolia</i>	-	-	1	-
<i>Pichia kudriavzevii</i>	-	33	-	-
<i>Piskurozyma fildesensis</i>	-	-	-	27
<i>Pithomyces chartarum</i>	-	216	21	-
<i>Pleotrichocladium opacum</i>	-	-	3	-
<i>Polysporina simplex</i>	-	24	-	-
<i>Polysporina subfuscescens</i>	-	-	5	-
<i>Preussia australis</i>	-	58	-	-
<i>Preussia cymatomera</i>	-	146	2	-
<i>Preussia lignicola</i>	-	1332	-	-
<i>Preussia similis</i>	-	311	-	4
<i>Preussia sp. (Sporormiaceae)</i>	-	187	-	-
<i>Protomyces inouyei</i>	-	44	4	-
<i>Psathyrella vestita</i>	-	18	-	-
<i>Pseudogymnoascus pannorum</i>	2436	36	-	-
<i>Pseudogymnoascus sp.</i>	-	8	-	9
<i>Pseudogymnoascus sp. APA-2015</i>	605	-	-	4
<i>Pseudomicrostroma phylloplanum</i>	-	10	-	-
<i>Psilogonium sp.</i>	-	157	-	-
<i>Rachicladosporium eucalypti</i>	-	695	2	13
<i>Rachicladosporium pini</i>	-	3	-	-
<i>Recurvomyces mirabilis</i>	-	21	-	-
<i>Retiarius bovicornutus</i>	-	-	-	93
<i>Rhizophydium patellarium</i>	-	-	-	34
<i>Rhodosporidiobolus ruineniae</i>	-	-	-	66
<i>Rhodotorula dairenensis</i>	-	28	-	-
<i>Rhodotorula glutinis</i>	-	-	-	4
<i>Rhodotorula mucilaginoso</i>	-	188	-	-

<i>Rhodotorula sp.</i>	532	-	22	7
<i>Rhodotorula sp. 'svalbardensis'</i>	-	-	-	302
<i>Rhodotorula sp. DBVPG 10048</i>	-	-	-	82
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	22	-	-
<i>Saitozyma aff. flava DSM 101939</i>	-	16	-	-
<i>Sarcinomyces crustaceus</i>	-	140	-	-
<i>Sarocladium sp. E31</i>	9	-	-	-
<i>Sarocladium zeae</i>	-	16	-	-
<i>Sclerostagonospora sp. CBS 118224</i>	-	2	-	-
<i>Serpula himantioides</i>	-	60	-	-
<i>Solicoccozyma terricola</i>	-	23	-	11
<i>Spegazzinia tessartha</i>	-	9	8	5
<i>Spiromastix asexualis</i>	-	-	611	-
<i>Sporisorium reilianum f. sp. zeae</i>	-	19	-	-
<i>Stachybotrys longispora</i>	-	56	-	-
<i>Stemphylium vesicarium</i>	-	26	2	-
<i>Stereocaulon vesuvianum</i>	-	114	-	-
<i>Talaromyces aculeatus</i>	-	182	-	-
<i>Tapinella panuoides</i>	-	20	-	-
<i>Tausonia pullulans</i>	-	621	-	600
<i>Tetracladium sp. WMM-2012e</i>	-	583	-	-
<i>Thelebolales sp.</i>	-	1702	-	-
<i>Thelebolus microsporus</i>	-	3237	-	-
<i>Thelebolus sp. CBS 137501</i>	-	1	-	-
<i>Thermomyces sp.</i>	-	55	3	-
<i>Tilletia barclayana</i>	-	12	-	-
<i>Torula herbarum</i>	-	-	2	-
<i>Trametes ochracea</i>	-	78	-	-

<i>Trapelia antarctica</i>	188	10	25	88
<i>Tremella sp. H-080.13</i>	-	-	-	16
<i>Trichaptum abietinum</i>	-	22	-	-
<i>Trichoderma koningiopsis</i>	-	81	-	-
<i>Trichophaea woolhopeia</i>	-	-	287	-
<i>Trichothecium roseum</i>	-	15	-	-
<i>Tuber pseudoexcavatum</i>	-	-	-	6122
<i>Umbilicaria aprina</i>	-	957	44	3
<i>Umbilicaria decussata</i>	-	176	-	-
<i>Umbilicaria esculenta</i>	-	2	-	-
<i>Umbilicaria nylanderiana</i>	-	122	23	-
<i>Ustilago nuda</i>	-	46	-	-
<i>Vanderbylia fraxinea</i>	-	15	-	-
<i>Vascellum curtisii</i>	-	19	-	-
<i>Venturia chinensis</i>	-	24	-	-
<i>Venturia fuliginosa</i>	-	-	1	-
<i>Verticillium sp. QLF8</i>	1190	-	-	-
<i>Vishniacozyma carnescens</i>	-	24	-	-
<i>Vishniacozyma dimennae</i>	-	-	-	4
<i>Vishniacozyma tephrensis</i>	-	303	-	-
<i>Vishniacozyma victoriae</i>	-	95	-	5
<i>Wojnowiciella viburni</i>	-	7	-	-
<i>Xylodon spathulatus</i>	-	18	-	-
<i>Zeroviella laxa</i>	-	-	5	23
TOTAL DE SECUENCIAS	153779	72807	78071	68167

Apéndice 2. Porcentajes de los registros identificados a nivel taxonómico de familia de cada sitio.



Apéndice 3. Porcentajes de registros identificados a nivel taxonómico de género en cada sitio.

