

**UNIVERSIDAD NACIONAL
TORIBIO RODRÍGUEZ DE MENDOZA DE AMAZONAS**



**FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGRARIAS
ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA FORESTAL**

**TESIS PARA OBTENER
EL TÍTULO PROFESIONAL DE
INGENIERA FORESTAL**

**DIVERSIDAD DE LEVADURAS EPÍFITAS ASOCIADAS A
LOS GÉNEROS *Theobroma* Y *Herrania* DEL PARQUE
NACIONAL ICHIGKAT MUJA-CORDILLERA DEL
CÓNDOR**

Autora: Bach. Eryka Gaslac Zumaeta

Asesores: PhD. Jorge Ronny Díaz Valderrama

Registro: (.....)

CHACHAPOYAS – PERÚ

2023

AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN DE LA TESIS EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL DE LA UNTRM



UNTRM

REGLAMENTO GENERAL
PARA EL OTORGAMIENTO DEL GRADO ACADÉMICO DE
BACHILLER, MAESTRO O DOCTOR Y DEL TÍTULO PROFESIONAL

ANEXO 3-H

AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN DE LA TESIS EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL DE LA UNTRM

1. Datos de autor 1

Apellidos y nombres (tener en cuenta las tildes): Gaslac Zumaeta Eryka
DNI N°: 73352859
Correo electrónico: 7335285981@untrm.edu.pe
Facultad: Ingeniería y Ciencias Agrarias
Escuela Profesional: Ingeniería Forestal

Datos de autor 2

Apellidos y nombres (tener en cuenta las tildes): _____
DNI N°: _____
Correo electrónico: _____
Facultad: _____
Escuela Profesional: _____

2. Título de la tesis para obtener el Título Profesional

Diversidad de Levaduras epífitas asociadas a los géneros Theobroma y Herrania del Parque Nacional Ichigka+Huja-Cordillera del Cóndor.

3. Datos de asesor 1

Apellidos y nombres: Díaz Valderrama Jorge Ronny
DNI, Pasaporte, C.E N°: 70205149
Open Research and Contributor-ORCID (<https://orcid.org/0000-0002-9670-0970>) <https://orcid.org/0000-0002-1015-3751>

Datos de asesor 2

Apellidos y nombres: _____
DNI, Pasaporte, C.E N°: _____
Open Research and Contributor-ORCID (<https://orcid.org/0000-0002-9670-0970>) _____

4. Campo del conocimiento según la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos- OCDE (ejemplo: Ciencias médicas, Ciencias de la Salud-Medicina básica-Inmunología)

https://catalogos.concytec.gob.pe/vocabulario/ocde_ford.html
4.01.02 - Forestal

5. Originalidad del Trabajo

Con la presentación de esta ficha, el(la) autor(a) o autores(as) señalan expresamente que la obra es original, ya que sus contenidos son producto de su directa contribución intelectual. Se reconoce también que todos los datos y las referencias a materiales ya publicados están debidamente identificados con su respectivo crédito e incluidos en las notas bibliográficas y en las citas que se destacan como tal.

6. Autorización de publicación

El(los) titular(es) de los derechos de autor otorga a la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas (UNTRM), la autorización para la publicación del documento indicado en el punto 2, bajo la *Licencia creative commons* de tipo BY-NC: Licencia que permite distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir de su obra de forma no comercial por lo que la Universidad deberá publicar la obra poniéndola en acceso libre en el repositorio institucional de la UNTRM y a su vez en el Registro Nacional de Trabajos de Investigación-RENATI, dejando constancia que el archivo digital que se está entregando, contiene la versión final del documento sustentado y aprobado por el Jurado Evaluador.

Chachapoyas, 19 / Enero / 2024

Firma del autor 1

Firma del Asesor 1

Firma del autor 2

Firma del Asesor 2

DEDICATORIA

A mis padres Panfilo y Luz Esperanza, a mis hermanos Ludvit, Iris, Jeison y Gleidiz, por su apoyo incondicional en cada momento de mi vida, por el ejemplo y la fortaleza que recibo de ellos y por ser parte fundamental en cada proyecto, cariño y amor infinito para ellos.

Eryka Gaslac Zumaeta

AGRADECIMIENTO

Doy gracias a Dios por guiarme y protegerme todos los días y por haberme concedido una familia estupenda, quienes me brindan soporte y amor incondicional, dándome fuerzas para lograr cada objetivo propuesto.

Al Instituto de Investigación para el Desarrollo Sustentable de Ceja de Selva (INDES-CES) de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas (UNTRM-A) por haberme abierto sus puertas para realizar este trabajo de investigación en las instalaciones del Laboratorio de Investigación en Sanidad Vegetal (LABISANV).

A mi asesor, Ph.D. Jorge Ronny Díaz Valderrama y al Ing. Kelvin James Llanos Gómez, por su paciencia, orientaciones, apoyo y compartir sus conocimientos para la ejecución y culminación de este trabajo de investigación.

Al excelente personal del Laboratorio de Investigación en Sanidad Vegetal, por brindarme su apoyo, amistad y compartirme sus conocimientos y sugerencias, ellos que formaron parte fundamental en la ejecución del presente proyecto, gracias por inspirarme a seguir adelante.

Eryka Gaslac Zumaeta

**AUTORIDADES DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL TORIBIO RODRÍGUEZ
DE MENDOZA DE AMAZONAS**

Ph.D. JORGE LUIS MAICELO QUINTANA

Rector

Dr. OSCAR ANDRÉS GAMARRA TORRES

Vicerrector Académico

Dra. MARÍA NELLY LUJÁN ESPINOZA

Vicerrectora de Investigación

Dr. ERIK ALDO AUQUIÑIVIN SILVA

Decano de la Facultad de Ingeniería y Ciencias Agrarias

VISTO BUENO DEL ASESOR DE LA TESIS



UNTRM

REGLAMENTO GENERAL
PARA EL OTORGAMIENTO DEL GRADO ACADÉMICO DE
BACHILLER, MAESTRO O DOCTOR Y DEL TÍTULO PROFESIONAL

ANEXO 3-L

VISTO BUENO DEL ASESOR DE TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL

El que suscribe el presente, docente de la UNTRM ()/Profesional externo (), hace constar que ha asesorado la realización de la Tesis titulada "Diversidad de Levaduras epifitas asociadas a los géneros Theobroma y Herrania del Parque Nacional Ichigkat Muja - Cordillera del Cóndor" del egresado Eryka Gastac Zumaeta de la Facultad de Ingeniería y Ciencias Agrarias Escuela Profesional de Ingeniería Forestal de esta Casa Superior de Estudios.

El suscrito da el Visto Bueno a la Tesis mencionada, dándole pase para que sea sometida a la revisión por el Jurado Evaluador, comprometiéndose a supervisar el levantamiento de observaciones que formulen en Acta en conjunto, y estar presente en la sustentación.

Chachapoyas, 11 de diciembre de 2023

Firma y nombre completo del Asesor
Ph.D. Jorge Ronny Díaz Valderrama

JURADO EVALUADOR DE LA TESIS



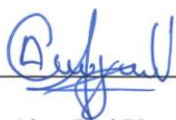
Ing. Mg.Sc. Eli Pariente Mondragón

Presidente



Ing. Ms. Ingrid Aracelli Cassana Huaman

Secretario



Ing. Mg.Sc. Alex Joel Vergara Anticona

Vocal

CONSTANCIA DE ORIGINALIDAD DE LA TESIS



UNTRM

REGLAMENTO GENERAL
PARA EL OTORGAMIENTO DEL GRADO ACADÉMICO DE
BACHILLER, MAESTRO O DOCTOR Y DEL TÍTULO PROFESIONAL

ANEXO 3-Q

CONSTANCIA DE ORIGINALIDAD DE LA TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL

Los suscritos, miembros del Jurado Evaluador de la Tesis titulada:

"Diversidad de levaduras epífitas asociadas a los géneros Theobroma y Herrania del Parque Nacional Ichigkat Huja - Cordillera del Cóndor"

presentada por el estudiante () /egresado (X) Eryka Gaslac Zumaeta

de la Escuela Profesional de Ingeniería Forestal

con correo electrónico institucional 7335285981@untrm.edu.pe

después de revisar con el software Turnitin el contenido de la citada Tesis, acordamos:

- La citada Tesis tiene 24 % de similitud, según el reporte del software Turnitin que se adjunta a la presente, el que es menor (X) / igual () al 25% de similitud que es el máximo permitido en la UNTRM.
- La citada Tesis tiene _____ % de similitud, según el reporte del software Turnitin que se adjunta a la presente, el que es mayor al 25% de similitud que es el máximo permitido en la UNTRM, por lo que el aspirante debe revisar su Tesis para corregir la redacción de acuerdo al Informe Turnitin que se adjunta a la presente. Debe presentar al Presidente del Jurado Evaluador su Tesis corregida para nueva revisión con el software Turnitin.



Chachapoyas, 14 de diciembre del 2023


SECRETARIO


PRESIDENTE


VOCAL

OBSERVACIONES:

.....
.....

ACTA DE SUSTENTACION DE LA TESIS



ANEXO 3-5

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL

En la ciudad de Chachapoyas, el día 21 de diciembre del año 2023, siendo las 16:00pm horas, el aspirante: Eryka Gastac Zumaeta, asesorado por Ph.D. Jorge Ronny Díaz Valderrama defiende en sesión pública presencial () / a distancia () la Tesis titulada: Diversidad de Levaduras epífitas asociadas a los géneros Theobroma y Herrania del Parque Nacional Ichigkat Mujía- Cordillera del Cóndor., para obtener el Título Profesional de Ingeniera Forestal, a ser otorgado por la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas; ante el Jurado Evaluador, constituido por:



Presidente: Ing. Mg. Sc. Eli Pariente Mondragón
Secretario: Ing. Ms. Ingrid Araceli Cassana Huamán.
Vocal: Ing. Mg. Sc. Alex Joel Veigara Anticona.

Procedió el aspirante a hacer la exposición de la Introducción, Material y métodos, Resultados, Discusión y Conclusiones, haciendo especial mención de sus aportaciones originales. Terminada la defensa de la Tesis presentada, los miembros del Jurado Evaluador pasaron a exponer su opinión sobre la misma, formulando cuantas cuestiones y objeciones consideraron oportunas, las cuales fueron contestadas por el aspirante.

Tras la intervención de los miembros del Jurado Evaluador y las oportunas respuestas del aspirante, el Presidente abre un turno de intervenciones para los presentes en el acto de sustentación, para que formulen las cuestiones u objeciones que consideren pertinentes.

Seguidamente, a puerta cerrada, el Jurado Evaluador determinó la calificación global concedida a la sustentación de la Tesis para obtener el Título Profesional, en términos de:

Aprobado () por Unanimidad () / Mayoría () Desaprobado ()

Otorgada la calificación, el Secretario del Jurado Evaluador lee la presente Acta en esta misma sesión pública. A continuación se levanta la sesión.

Siendo las 17:00pm horas del mismo día y fecha, el Jurado Evaluador concluye el acto de sustentación de la Tesis para obtener el Título Profesional.


SECRETARIO


VOCAL


PRESIDENTE

OBSERVACIONES:
.....

ÍNDICE O CONTENIDO GENERAL

AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN DE LA TESIS EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL DE LA UNTRM.....	ii
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTO	iv
AUTORIDADES DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL TORIBIO RODRÍGUEZ DE MENDOZA DE AMAZONAS	v
VISTO BUENO DEL ASESOR DE LA TESIS	vi
JURADO EVALUADOR DE LA TESIS	vii
CONSTANCIA DE ORIGINALIDAD DE LA TESIS.....	viii
ACTA DE SUSTENTACION DE LA TESIS.....	ix
ÍNDICE O CONTENIDO GENERAL	x
ÍNDICE DE TABLAS	xii
ÍNDICE DE FIGURAS	xiii
ÍNDICE DE ANEXOS.....	xiv
RESUMEN	xv
ABSTRACT.....	xvi
I. INTRODUCCIÓN	17
II. MATERIAL Y MÉTODOS.....	19
2.1. Área de estudio.....	19
2.2. Población y Muestra.....	19
2.2.1. Población	19
2.2.2. Muestra	19
2.2.3. Muestreo	20
2.3. METODOLOGÍA	20
2.3.1. Recolección de las hojas muestreadas	20
2.3.2. Aislamiento de levaduras epífitas	20
2.3.3. Conservación de las cepas aisladas.....	21
2.3.4. Caracterización molecular de levaduras	21
2.3.5. Caracterización morfológica de levaduras.....	24
2.3.6. Estimación de los índices de diversidad de las levaduras epífitas	25
III. RESULTADOS.....	27
3.1. Caracterización molecular de levaduras.....	27
3.1.1. <i>Meyerozyma guilliermondii</i>	27

3.1.2.	<i>Rhodsporidiobolus ruineniae</i>	29
3.1.3.	<i>Wickerhamomyces edaphicus</i>	30
3.1.4.	<i>Hannaella</i>	31
3.1.5.	<i>Sporobolomyces japonicus</i>	32
3.1.6.	<i>Kwoniella heveanensis</i>	33
3.1.7.	<i>Debaryomyces hansenii</i>	34
3.1.8.	<i>Candida</i> aff. <i>insectorum</i>	35
3.1.9.	<i>Moesziomyces</i> cf. <i>antarticus</i>	36
3.2.	Caracterización morfológica de levaduras	37
3.3.	Índices de diversidad.....	46
3.3.1.	Índice de diversidad	46
IV.	DISCUSIÓN	53
V.	CONCLUSIONES	55
VI.	RECOMENDACIONES	56
VII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57
ANEXOS	66

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. <i>Distribución de las especies de plantas por parcela</i>	20
Tabla 2. <i>Descripción de la caracterización morfológica de las especies identificadas de levaduras</i>	37
Tabla 3. <i>Número de cepas identificadas por especie</i>	46
Tabla 4. <i>Número de especies por parcela (PAR)</i>	46
Tabla 5. <i>Valores de índice de Shannon-Weiner por parcela</i>	47
Tabla 6. <i>Índice de disimilitud o distancia entre parcelas</i>	47
Tabla 7. <i>Abundancia de especies por parcela</i>	48
Tabla 8. <i>Equitatividad de las especies por parcela</i>	49
Tabla 9. <i>Número de especies por hospedero</i>	50
Tabla 10. <i>Valores de índice de Shannon-Weiner por Hospedero</i>	51
Tabla 11. <i>Índice de disimilitud entre hospederos</i>	51
Tabla 12. <i>Abundancia de especies por hospedero</i>	52
Tabla 13. <i>Equitatividad de especies por hospedero</i>	52

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mapa de ubicación donde se llevó a cabo la investigación.....	19
Figura 2. Árbol filogenético del taxón <i>Meyerozyma</i>	28
Figura 3. Árbol filogenético del taxón <i>Rhodosporidiobolus</i>	29
Figura 4. Árbol filogenético del taxón <i>Wickerhamomyces</i>	30
Figura 5. Árbol filogenético del taxón <i>Hannaella</i>	31
Figura 6. Árbol filogenético del taxón <i>Sporobolomyces</i>	32
Figura 7. Árbol filogenético del taxón <i>Kwoniella</i>	33
Figura 8. Árbol filogenético del taxón <i>Debaryomyces</i>	34
Figura 9. Árbol filogenético del taxón <i>Candida</i>	35
Figura 10. Árbol filogenético del taxón <i>Moesziomyces</i>	36
Figura 11. Morfología de la especie <i>Meyerozyma guilliermondii</i> (EGZ-43). (A) Morfología de la colonia; (B) morfología de las células, escala referente a 20 μm	42
Figura 12. Morfología de la especie <i>Rhodosporidiobolus ruineniae</i> (EGZ-21). (A) Morfología de la colonia; (B) Morfología de las células, escala referente a 20 μm	42
Figura 13. Morfología de la especie <i>Wickerhamomyces edaphicus</i> (EGZ-38). (A) Morfología de la colonia; (B) Morfología de las células, escala referente a 20 μm	42
Figura 14. Morfología de <i>Hannaella phetchabunensis</i> (EGZ-06). (A) Morfología de la colonia; (B) Morfología de las células, escala referente a 20 μm	43
Figura 15. Morfología de <i>Hannaella taiwanensis</i> (EGZ-48). (A) Morfología de la colonia; (B) Morfología de las células, escala referente a 20 μm	43
Figura 16. Morfología de la especie <i>Hannaella</i> sp. (EGZ-51). (A) Morfología de la colonia; (B) Morfología de las células, escala referente a 20 μm	43
Figura 17. Morfología de <i>Sporobolomyces japonicus</i> (EGZ-49). (A) Morfología de la colonia; (B) Morfología de las células, escala referente a 20 μm	44
Figura 18. Morfología de <i>Kwoniella heveanensis</i> (EGZ-07). (A) Morfología de la colonia; (B) Morfología de las células, escala referente a 20 μm	44
Figura 19. Morfología de <i>Debaryomyces hansenii</i> (EGZ-31). (A) Morfología de la colonia; (B) Morfología de las células, escala referente a 20	44
Figura 20. Morfología de <i>Candida</i> aff. <i>insectorum</i> (EGZ-03). (A) Morfología de la colonia; (B) Morfología de las células, escala referente a 20.	45
Figura 21. Morfología de <i>Moesziomyces</i> cf. <i>antarcticus</i> (EGZ-20). (A) Morfología de la colonia; (B) morfología de las células, escala referente a 20.....	45
Figura 22. Dendrograma de similitud de especies por parcela.....	48
Figura 23 Dendrograma de similitud entre hospederos	51

ANEXOS

Anexo 1. Data base de los aislados.....	66
Anexo 2. A. Identificación de los hospederos. B. Referenciación de las parcelas.....	72
Anexo 3. Recolección de las muestras de hojas para el aislamiento de levaduras.....	72
Anexo 4. Cortes de 1 x 1 cm a las hojas para el aislamiento.....	73
Anexo 5. Aislamiento por diluciones seriadas	73
Anexo 6. Aislamiento de levaduras en medio PDA. A. Método de diluciones seriadas. B. Método de pegado.....	73
Anexo 7. Reaislamiento de levaduras hasta que estas estén en cultivo puro	74
Anexo 8. Levaduras en cultivo puro.....	74
Anexo 9. Conservación de cepas de levaduras a corto y largo plazo.	74
Anexo 10. Actividades de laboratorio. A. Extracción de ADN. B. Cuantificación de ADN.....	
Anexo 11. A. Proceso de PCR. B. Técnica de electroforesis	75
Anexo 12. Amplificación de muestras, visualización de productos de PCR en gel de agarosa al 1%.....	76
Anexo 13. búsqueda en la base de datos de secuencias de ADN de NCBI.....	76
Anexo 14. Alineamiento de secuencias	77
Anexo 15. Análisis filogenético en el portal CIPRES.....	77
Anexo 16. Visualización de los árboles filogenéticos en el software FigTree.....	78
Anexo 17. Caracterización morfológica. A. Caracterización macroscópica. B. Caracterización microscópica	78
Anexo 18. Montajes de muestras de levaduras.....	79
Anexo 19. Cálculo de los índices de diversidad en el programa R	79

RESUMEN

Theobroma spp. se originó en la cuenca del Amazonas de América del Sur. Sin embargo, las especies de hongos epífitos asociados a estos importantes árboles estrechamente relacionados nunca han sido estudiados en el Perú, especialmente en áreas naturales protegidas. Este estudio tuvo como objetivo identificar levaduras epífitas asociadas a especies silvestres de los géneros *Theobroma* y *Herrania* en el Parque Nacional Ichigkat Muja-Cordillera del Cóndor. Se muestrearon hojas de *T. cacao*, *T. bicolor* y *Herrania nycterodendron* en 5 parcelas distribuidas de manera estandarizada. El aislamiento se realizó mediante dilución seriada, lográndose el aislamiento de un total de 60 cepas de levadura. Estos se caracterizaron macro (forma, color y tamaño de colonia) y micro morfológicamente (forma y tamaño de las células, color, presencia de pseudohifas y forma de reproducción). Además, la caracterización molecular se basó en la secuenciación de las regiones D1/D2 e ITS. Se identificaron un total de 11 especies de levaduras, distribuidas en 9 géneros diferentes, tales como: *Meyerozyma* (1), *Rhodospordiobolus* (1), *Wickerhamomyces* (1), *Hannaella* (3), *Sporobolomyces* (1), *Kwoniella* (8), *Debaryomyces* (1), *Candida* (1) y *Moesziomyces* (1). El género más representativo fue *Meyerozyma* con 46 aislados pertenecientes a la especie *M. guilliermondii*. Los índices de diversidad alfa y beta mostraron valores bajos. Los hospederos con mayor abundancia de especies fueron *H. nycterodendron* y *T. cacao*, con 6 especies cada uno. La equitatividad fue baja, siendo *M. guilliermondii* la especie dominante. Este es un estudio pionero que revela la diversidad de levaduras asociadas con *Theobroma* spp. en la región Amazonas.

Palabras clave: Amazonas, levaduras, molecular

ABSTRACT

Theobroma spp. originated in the Amazon basin of South America. However, the epiphytic fungal species associated with these important trees or closely related genera have never been studied in Peru, especially in protected natural areas. This study aimed to characterize and identify epiphytic yeasts associated with wild species of the genera *Theobroma* and *Herrania* in the Ichigkat Muja-Cordillera del Cóndor National Park. Leaves of *T. cacao*, *T. bicolor* and *Herrania nycterodendron* were sampled in 5 plots distributed in a standardized manner. The isolation of microorganisms was carried out using the serial dilution methodology, achieving the isolation of a total of 60 yeast strains. The isolates were characterized macro (shape, color and colony size) and micro morphologically (shape and size of cells, color, presence of pseudohyphae and reproduction structure formation). Additionally, molecular characterization was based on the sequencing of the D1/D2 and ITS regions. A total of 11 yeast species were identified, distributed in 9 different genera, such as: *Meyerozyma* (1), *Rhodospordiobolus* (1), *Wickerhamomyces* (1), *Hannaella* (3), *Sporobolomyces* (1), *Kwoniella* (8), *Debaryomyces* (1), *Candida* (1), and *Moesziomyces* (1). The most representative genus was *Meyerozyma* with 46 isolates belonging to the species *M. guilliermondii*. The alpha and beta diversity indices showed low values. The hosts with the highest species abundance were *H. nycterodendron* and *T. cacao*, with 6 species each. Equitability was low, with *M. guilliermondii* as the dominant species. This is a pioneer study on unveiling the diversity of yeasts associated with *Theobroma* spp. in the Amazonas region.

Key words: Amazonas, yeast, molecular

I. INTRODUCCIÓN

Las plantas mantienen relaciones mutualistas con múltiples microorganismos. Estas pueden desarrollarse de manera endófitas, que son microorganismos que habitan dentro del tejido vegetal de su hospedero (Knapp *et al.*, 2012) o epífitas que se encuentran en la superficie del tejido vegetal del hospedero.

La mayoría de los microorganismos epífitos brindan múltiples beneficios a las plantas. Por ejemplo, son la primera línea de defensa de las plantas frente a la llegada de agentes patógenos (Cano, 2011; Buck, 2002). Esta biodiversidad de microorganismos puede ser aprovechada para la innovación biotecnológica, y últimamente los hábitats epífitos están siendo estudiados con el fin de encontrar microorganismos de importancia biotecnológica para ayudar a solucionar problemáticas frente a patógenos en plantas de importancia (Bhadra *et al.*, 2008; Junior *et al.*, 2022).

Los microorganismos epífitos son indispensables en cualquier planta. El filoplano de todas las especies vegetales está asociada a una microfunga exclusiva de una diversidad de microorganismos. Los microorganismos epífitos más comunes son las levaduras que habitan el filoplano de tejidos vegetales. Las levaduras son hongos unicelulares que generalmente no presentan hifas, estas habitan diversas superficies o dentro del tejido de su hospedero en el ambiente. Las levaduras representan un porcentaje considerable de la diversidad presente, en algunos estudios se demostró que están representadas por una gran diversidad de especies, encontradas en suelo y en superficies de especies vegetales (Di Menna, 1959). Además, gracias a su adaptabilidad, las levaduras han desarrollado múltiples mecanismos, y pueden ser usados en campos industriales y biotecnológicos (Uribe, 2007). Sin embargo, existe muy pocas investigaciones para documentar la diversidad de levaduras, especialmente en nuestro país. Por lo tanto, identificar las especies de levaduras epífitas asociadas a cultivos de importancia es la base para encaminar futuros estudios de innovación biotecnológica aprovechando estos microorganismos.

El departamento de Amazonas se caracteriza por producir un cacao nativo de fino aroma, y por ubicarse en el centro de diversidad del cultivo de cacao (*Theobroma cacao*) y del género *Theobroma* (Bustamante *et al.*, 2022). Sin embargo, el cultivo de cacao y otras especies cultivadas de *Theobroma* en nuestra Amazonía, como *T. bicolor* y *T. grandiflorum*, sufren de diversas enfermedades (Díaz-Valderrama *et al.*, 2020). Entre estas enfermedades destaca la moniliasis, causada por el hongo *Moniliophthora roreri*

(Díaz-Valderrama *et al.*, 2022). Además, especies de *Herrania*, género hermano de *Theobroma* (Richardson *et al.*, 2015), también son infectadas por *M. roreri* (Phillips-Mora & Wilkinson, 2007).

Esta y otras enfermedades son combatidas tradicionalmente con la aplicación de fungicidas y prácticas culturales (Ríos-ruiz, 2017). Una de las alternativas emergentes es la aplicación de enemigos naturales como las levaduras que habitan naturalmente el filoplano del cacao, como se está desarrollando últimamente en Brasil (Neto *et al.*, 2021; Junior *et al.*, 2022).

Los más altos índices de diversidad genética de *Theobroma* se encuentra en las regiones fronterizas de Perú, Brasil y Colombia y desde el sur del Perú hasta el Amazonas de Ecuador (Thomas *et al.*, 2012). En esta área se encuentra ubicado el Parque Nacional Ichigkat Muja-Cordillera del Cóndor (PNIMCC), área de conservación que alberga el único ecosistema de Boque Montañoso de la Cordillera Real Oriental, así como una gran diversidad de flora, entre ellos *Theobroma* y *Herrania* (SERNANP, 2019). Por lo tanto, el PNIMCC es un área idónea para buscar levaduras epífitas que habitan los filoplanos de *Theobroma* y *Herrania* ubicados en zonas protegidas y por ende no intervenidas por el hombre.

La exploración de la diversidad de levaduras, en ambientes naturales como el PNIMCC puede aportar datos importantes y valiosos sobre su función en estos ambientes, y en futuras investigaciones explorar sus potencialidades de control, contra las enfermedades de importancia que afectan principalmente al cultivo de cacao y especies de *Herrania*. De esta manera ayudar principalmente a los pequeños agricultores a recuperar su producción y al desarrollo social y económico en general. Por lo tanto, este estudio tuvo como objetivos específicos: 1) identificar molecularmente las levaduras epífitas aisladas, 2) caracterizar morfológicamente las levaduras epífitas aisladas, y 3) estimar los índices de diversidad alfa y beta, abundancia y equitatividad de las levaduras epífitas aisladas. Con esto tendremos un primer reporte de la diversidad de levaduras epífitas que existen en esta área natural protegida, para que más adelante en futuras investigaciones sean evaluadas y usados como agentes controladores de patógenos. Esto será un primer acercamiento para encontrar levaduras con potencial de biocontrol de patógenos de cacao como *M. roreri*.

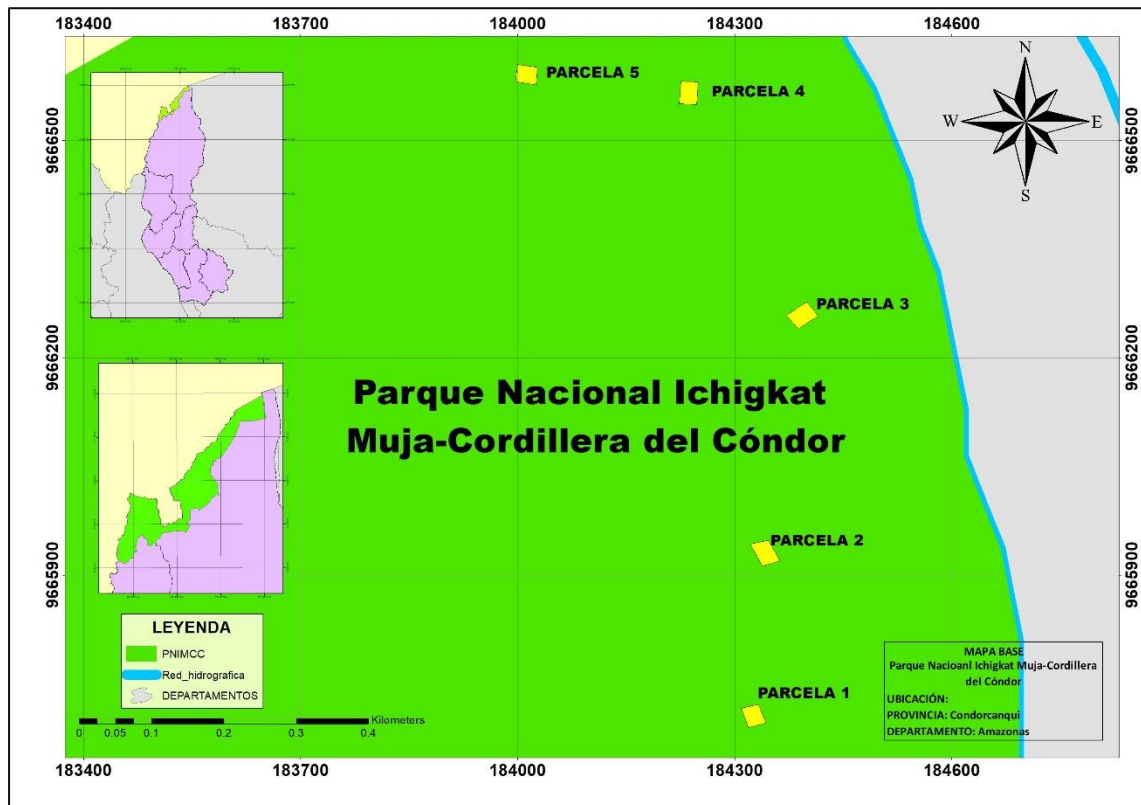
II. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Área de estudio

La investigación se realizó, en el área de conservación Parque Nacional Ichigkat Muja-Cordillera del Cóndor. Esta área se ubica en los distritos de El Cenepa y Río Santiago, perteneciente a la provincia de Condorcanqui, en el departamento de Amazonas.

Figura 1

Mapa de ubicación donde se llevó a cabo la investigación



2.2. Población y Muestra

2.2.1. Población

La población estuvo conformada por las especies de levaduras que habitan el filoplano de plantas silvestres de los géneros *Theobroma* y *Herrania*, dentro del Parque Nacional Ichigkat Muja-Cordillera del Cóndor.

2.2.2. Muestra

La muestra estuvo conformada por cepas de levaduras que habitaban el filoplano de hojas de los cinco árboles pertenecientes a los géneros *Theobroma* y *Herrania* (Tabla 1). Estos árboles muestreados se ubicaron en parcelas estratégicamente distribuidas.

2.2.3. Muestreo

El muestreo fue no probabilístico. Se identificó los árboles de las especies de los géneros de interés en cada parcela, teniendo una planta por parcela. En cada árbol identificado se muestrearon seis hojas de cada árbol, hojas en buen estado fitosanitario, obteniendo un total de 30 hojas muestreadas.

Tabla 1

Distribución de las especies de plantas por parcela

Parcelas	Especies muestreadas	N° de hojas muestreadas	Coordenadas (UTM)	
Parcela 1	<i>Theobroma cacao</i>	6	184325	9665707
Parcela 2	<i>Theobroma cacao</i>	6	184355	9665935
Parcela 3	<i>Herrania nycterodendron</i>	6	184396	9666246
Parcela 4	<i>Herrania nycterodendron</i>	6	184236	9666567
Parcela 5	<i>Theobroma bicolor</i>	6	184018	9666592

2.3. METODOLOGÍA

La investigación se desarrolló en dos fases: la primera fase se realizó en campo, en el Parque Nacional Ichigkat Muja-Cordillera del Cóndor y la segunda fase se desarrolló en el Laboratorio de Sanidad Vegetal (LABISANV), del Instituto de Investigación para el Desarrollo Sustentable de Ceja de Selva (INDES-CES) de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas (UNTRM). La metodología que se utilizó se detalla de acuerdo a los objetivos específicos que se plantearon en la investigación.

2.3.1. Recolección de las hojas muestreadas

En cada parcela con la ayuda de una podadora de mano desinfectada, se recolectaron las hojas de cada árbol. Las 30 hojas colectadas de los cinco árboles fueron procesadas para el aislamiento de las levaduras epífitas el mismo día de colecta.

2.3.2. Aislamiento de levaduras epífitas

El aislamiento de levaduras se realizó a partir de las hojas muestreadas, para lo cual se siguió dos metodologías.

- En la primera metodología se realizaron cortes a las hojas en pequeños pedazos de aproximadamente 1.5 cm x 1.5 cm, los cuales fueron adheridos con vaselina

en la tapa interior de las placas Petri que contenían Agar Papa Dextrosa (PDA) con antibiótico (Clorafenicol al 5 %). De esta manera, las esporas producidas por las levaduras epífitas cayeran al medio de cultivo y puedan crecer hasta observarse colonias individuales de levaduras.

- Paralelamente, se realizó el aislamiento por el método de diluciones seriadas. Se extrajeron pequeñas secciones de 1 cm x 1 cm de hojas estratégicamente extraídas de lo largo de toda la hoja. Estos fueron colocados en tubos Falcon de plástico estéril con 35 ml de solución salina (cloruro de sodio al 0.9 %). Con la ayuda de un vortex se agitaron los tubos para poner las levaduras epífitas de los cortes de hojas en suspensión. Se realizaron tres diluciones en serie (10^{-1} ; 10^{-2} y 10^{-3}) y se procedió a inocular 100 μ l de cada solución en placas Petri con PDA. Las placas se incubaron a 28 C°, durante un promedio de 48 horas, hasta observarse el crecimiento de colonias individuales de levaduras.

Las colonias de levaduras que estaban en crecimiento en medio PDA de ambas metodologías fueron transferidas a nuevas placas PDA. Este proceso de re-aislamiento se realizó en una cámara de flujo para evitar contaminación y tener éxito en el proceso. Se repitieron los re-aislamientos hasta obtener cultivos puros de las levaduras aisladas. Por ser cultivos procedentes de colonias individuales, se consideraron a estos aislados como cultivos monospóricos.

2.3.3. Conservación de las cepas aisladas

Una vez que las cepas de levaduras se encontraron en cultivo puro, fueron conservadas a mediano plazo en tubos de ensayo con medio de cultivo PDA a una temperatura de 4 °C, y a largo plazo en pequeños tubos criogénicos de 2 ml con glicerol al 30 % a una temperatura de -80 °C.

2.3.4. Caracterización molecular de levaduras

2.3.4.1. Extracción de ADN

La extracción de ADN se realizó a partir de cultivos puros de las cepas de levaduras aisladas utilizando el kit de extracción de ADN genómico Wizard® (Promega, Winconsin, EE.UU), siguiendo las instrucciones del fabricante (Promega, 2019).

- Se colocó parte del tejido de la cepa en un tubo Eppendorf de 2 ml, al cual se agregó perlitas de zirconio de 0.5 mm de diámetro y 600 μ l de solución Nuclei Lysis, el primer buffer del kit de extracción.

- Luego las muestras se homogenizaron en un vortex durante 15 minutos.
- Posteriormente se incubó las muestras a 65 °C durante 30 minutos en un Termobloque.
- Estas se centrifugaron a 1500 rpm por 3 minutos.
- En nuevos tubos se agregó 200 µl de la solución “Protein Precipitation” y a ello con la ayuda de una pipeta agregamos el líquido sobrenadante de las muestras centrifugadas.
- Se mezcló en el vortex y se centrifugó a 1500 rpm durante 3 minutos.
- Se vertió el sobrenadante en nuevos tubos y añadimos 600 µl de isopropanol. Mezclamos en el vortex y centrifugamos a 1500 rpm por 3 minutos.
- Desechamos el líquido sobrenadante.
- Añadimos 600 µl de alcohol al 70% para lavar el pellet de ADN obtenido en el paso anterior.
- Mezclamos y centrifugamos durante 3 minutos a 1500 rpm.
- Desechamos el líquido sobrenadante y dejamos secar el pellet durante 30 minutos.
- Luego de que el pellet se haya secado rehidratamos el ADN con 50 µl del buffer “DNA Rehydration Solution”.
- Por último, se dejó que el ADN se ponga en solución durante una noche a 4 °C.

2.3.4.2. Cuantificación

Para la cuantificación de ADN se utilizó el Espectrofotómetro (BioSpectrometer® basic – Eppendorf, Nueva Jersey, EE. UU). Se cuantificó colocando 2 µl de cada muestra en el espectrofotómetro en donde se realizó las lecturas de la cantidad de ADN de las muestras extraídas.

2.3.4.3. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Para el proceso de amplificación la concentración del ADN fue diluido a una concentración de 1 ng/µl para las reacciones de PCR. Se utilizó 2 marcadores. Se utilizó la región ITS (*Internal Transcriber Spacer*), la cual comprende las subunidades ITS2, 5.8S y el ITS1 del ADN ribosomal (Quijada *et al.*, 1997), considerada como el código de barras estándar para la identificación de hongos y también aceptado para levaduras (Schoch *et al.*, 2012). Para este marcador se trabajó con los cebadores ITS4/ITS1F. Además, se amplificó la región LSU (*Large SubUnit*), con los cebadores NL1/NL4, siendo esta región la que ofrece una mayor poder de identificación de levaduras a nivel de especie (Kurtzman & Robnett, 1998; Kurtzman *et al.*, 2015). La amplificación de estos

marcadores fue mediante PCR, con una solución mezcla de volumen final de 10 μ l conformada por: 5 μ l de dNTP Máster mix, 2.6 μ l de agua ultrapura, 0.2 μ l de primer forward, 0.2 μ l primer reverse y 2 μ l de ADN genómico.

Los ciclos de amplificación y las condiciones de termociclado de la PCR se realizaron tal como lo especifican White *et al.* (1990) y Kurtzman & Robnett (1998). Para la amplificación de la región ITS, hubo un precalentamiento a 94°C durante 5 minutos, seguido por 35 ciclos de calentamiento a 94°C durante 30 segundos, anillamiento a 50°C durante 45 segundos; elongación a 72°C durante 1 minuto; y un paso final de post elongación a 72°C durante 7 minutos (Manter & Vivanco, 2007). Por su parte, para la región LSU, hubo un paso de precalentamiento a 95°C durante 5 minutos, seguido por 35 ciclos de calentamiento a 95°C durante 25 segundos, anillamiento a 52°C durante 1 minuto, elongación a 72°C durante 1 minuto, y un paso final de post elongación a 72°C durante 10 minutos

2.3.4.4. Electroforesis

Para conocer si tuvimos éxito en la amplificación y conocer si el ADN extraído está íntegro, se realizó la técnica de electroforesis, donde las muestras fueron cargadas en un gel de agarosa al 1 % teñido con SYBR Safe®, se colocó en cada pocillo del gel nuestra muestra y se dejó correr por 25 minutos a 100 voltios y 300 mA. Luego de concluida la migración del producto de PCR en el gel, el resultado se observó bajo una luz azul ultravioleta de alta energía, este proceso se realizó en un tanque y transluminador Cleaver RunView.

2.3.4.5. Purificación y secuenciación

La purificación de los productos de PCR y la secuenciación bajo el método Sanger estuvo a cargo de una empresa externa (Macrogen, Corea del Sur). La secuenciación se realizó con ambos cebadores de amplificación para cada región.

2.3.4.6. Análisis filogenético

Las secuencias generadas se editaron y se ensamblaron mediante el software Sequencher v.5.4 (Gene Codes, EE. UU.). En este proceso las colas de las secuencias que usualmente tienden a ser de baja calidad se recortaron y se seleccionaron las partes de las secuencias de buena calidad. Se ensamblaron las secuencias de cada uno de los cebadores para cada muestra y se generó un archivo en formato FASTA para proceder con su análisis.

En el primer paso para la identificación de cada cepa, se realizó una búsqueda en la base de datos de secuencias no redundantes de ADN de NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). Para ello se empleó el programa BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) (Camacho *et al.*, 2009; Johnson *et al.*, 2008). La búsqueda en este programa nos brindó una primera aproximación del género y la especie de la cepa analizada. Se tomó en cuenta el porcentaje de similitud y cobertura para asignar la especie de referencia (Altschul *et al.*, 1997). Con la información adquirida se buscó literatura relevante de los géneros y especies asociadas a cada una de las cepas. Se descargaron secuencias curadas para ambas regiones de dichas especies y otras relacionadas filogenéticamente. Asimismo, se descargaron otras secuencias que nos sirvieron para delimitar la raíz de los árboles filogenéticos.

Las secuencias se alinearon en el programa MUSCLE (Edgar, 2004), implementado en el software MEGA-X (Kumar *et al.*, 2018). Se concatenaron las secuencias de las regiones ITS y LSU, con SeaView 4.7 (Gouy *et al.*, 2010). Las secuencias alineadas y concatenadas se procesaron en el portal Web CIPRES Science Gateway v3.3 (Miller *et al.*, 2011), con el algoritmo de Máxima Verosimilitud (Stamatakis, 2014). Luego del análisis filogenético realizado, los árboles filogenéticos fueron visualizados y editados en el programa FigTree (Rambaut A, 2006).

2.3.5. Caracterización morfológica de levaduras

La caracterización morfológica se realizó a partir de cepas en cultivo puro, tanto a nivel macro como microscópico a los 7 días de crecimiento en medio PDA).

- Caracterización macroscópica.

La caracterización macroscópica se realizó a partir de cepas frescas. Describimos el color, margen, elevación de colonia, brillo, textura, aspecto de la colonia y presencia de pseudomicelio.

- Caracterización microscópica.

La caracterización microscópica se realizó a partir de cepas frescas. Primero se tomó cuidadosamente una pequeña cantidad de células y se colocó en un portaobjetos de microscopio. Aplicamos Lactofenol, colocamos un cubreobjetos sobre la muestra y la observamos sobre un microscopio. Se observó y describió la forma de las células, tamaño, color, presencia de pseudohifas y la forma de reproducción.

2.3.6. Estimación de los índices de diversidad de las levaduras epífitas

Con las especies identificadas se calcularon los índices de diversidad. Para ello se utilizó el software R con los paquetes “vegan” y "BordiversityR", en donde se calculó la diversidad alfa a nivel de parcelas y hospedero del cual ha sido aislado el microorganismo.

Para calcular la diversidad alfa, se usó el índice de Shannon–Weiner, que nos permite observar la diversidad de especies encontradas dentro de cada categoría (parcela y hospedero). Los valores van de 0 a 5, siendo de 0 – 1,35, diversidad baja; de 1,36 – 3.5, representa una diversidad media; y mayores a 3.5, se considera una diversidad alta (Moreno *et al.*, 2006).

La fórmula empleada para calcular este índice fue:

$$H = - \sum p_i \ln p_i$$

En donde:

H = Índice de Shannon-Weiner

Ln = Logaritmo natural

p_i = Número de individuos de la especie, dividido entre el número total de la muestra.

La diversidad beta se calculó usando el índice de similitud/disimilitud, con datos cualitativos, en donde se utilizó el coeficiente de similitud de Jaccard. Para este índice, el intervalo de valores va de 0 a 1, donde 0 indica que no hay especies compartidas entre ambos sitios evaluados y 1 cuando los dos sitios evaluados tienen la misma composición de especies (Magurran, 1998).

La fórmula empleada para calcular este índice fue:

$$I_j = \frac{c}{a + b - c}$$

Donde:

a = número de especies presentes en el sitio A

b = número de especies presentes en el sitio B

c = número de especies presentes en ambos sitios A y B

Se evaluó la abundancia de las especies, por parcela y por hospedero.

La equitatividad se calculó empleando el Índice de equidad de Pielou, que mide la proporción de la diversidad observada con relación a la máxima diversidad posible. El intervalo de medida va de 0 – 1, en donde 1 representa a situaciones en donde todas las especies son igualmente abundantes (Iannacone *et al.*, 2016).

La fórmula empleada fue la siguiente:

$$J = \frac{H}{\text{Log}_2 S}$$

En donde:

S = Número máximo de especies en la muestra

H = Índice de Shannon-Weiner

III. RESULTADOS

3.1. Caracterización molecular de levaduras.

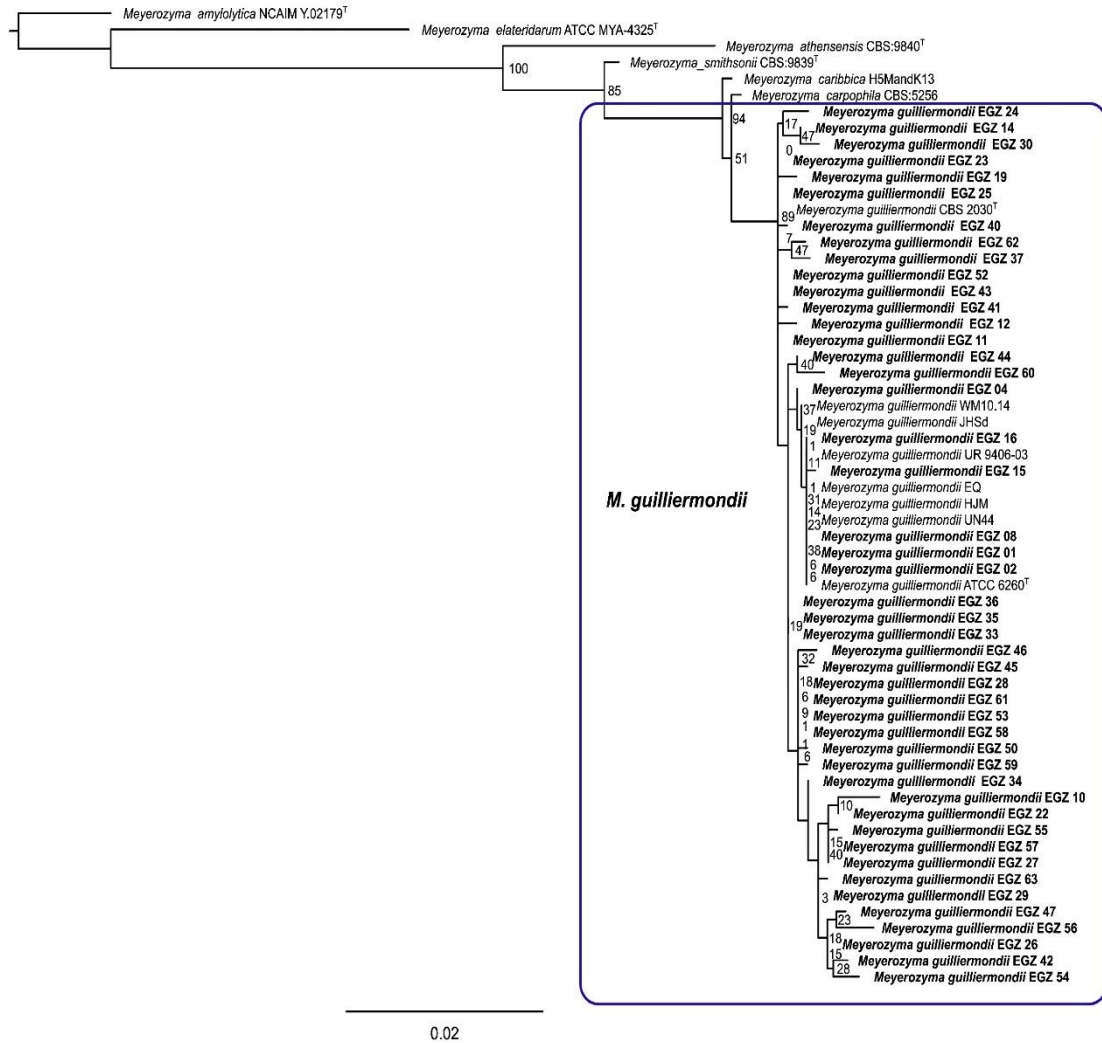
La caracterización molecular fue conformada por la comparación de secuencias de especies relacionadas mediante un análisis filogenético, para el cual se descargaron secuencias de cepas tipo y de referencia para cada especie. Se realizó el árbol filogenético con las secuencias concatenadas de las regiones ITS y LSU del ADNr, dichos arboles fueron realizados por cada género.

3.1.1. *Meyerozyma guilliermondii*

De las 60 cepas obtenidas, 46 fueron asociadas a la especie *Meyerozyma guilliermondii*. Por lo tanto, se obtuvieron secuencias de esta y otras especies cercanas relacionadas filogenéticamente para determinar con exactitud la especie de acuerdo a literatura (de Lima Targino *et al.*, 2022; Romi *et al.*, 2014). Se utilizaron las secuencias de ITS y LSU concatenadas. Luego del análisis filogenético se determinó que las 46 cepas se asocian estrechamente a la especie *Meyerozyma guilliermondii*, con un alto soporte (89% de soporte *Bootstrap*), esto se muestra en la Figura 2.

Figura 2

Árbol filogenético del taxón Meyerozyma

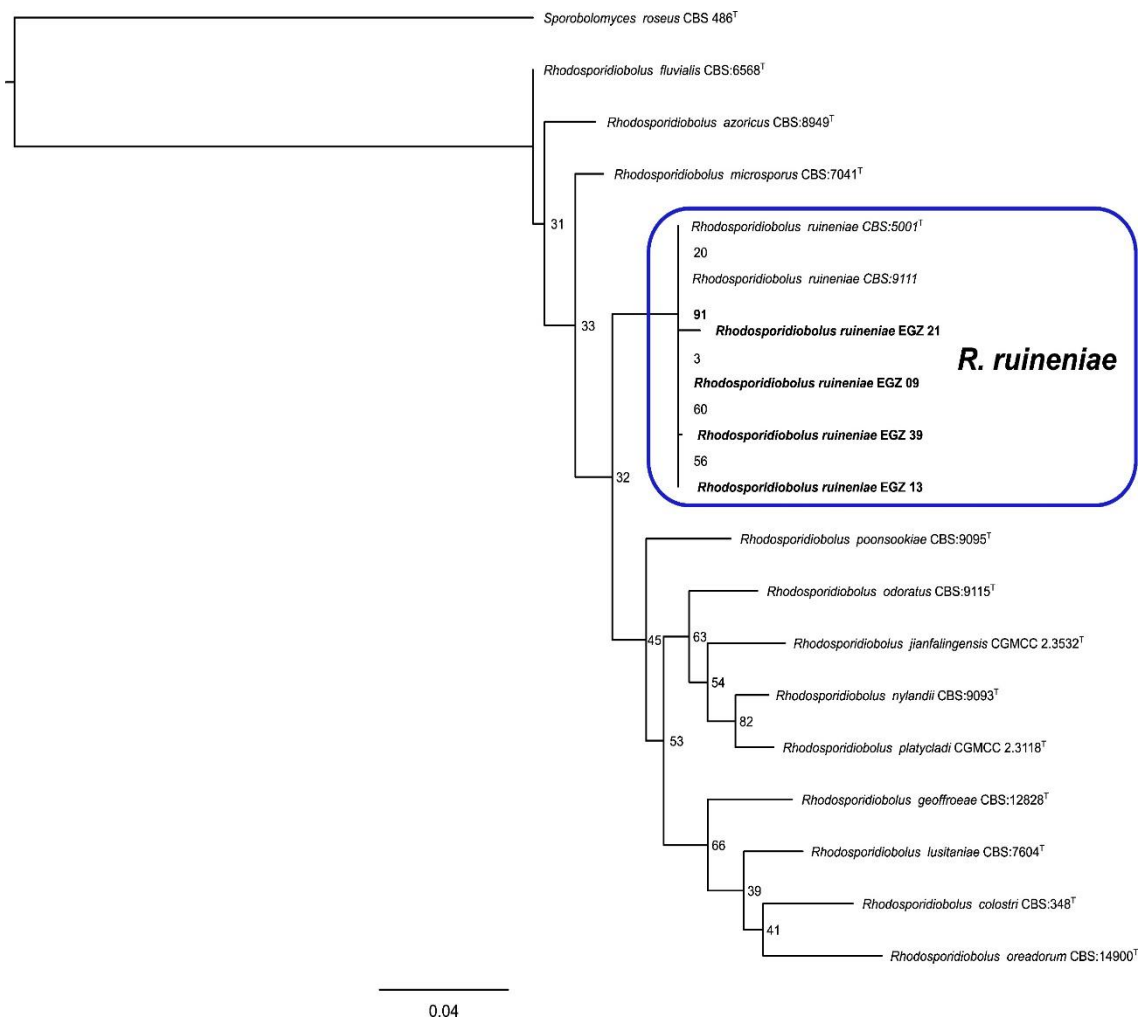


3.1.2. *Rhodosporidiobolus ruineniae*

De las cepas aisladas, cuatro de ellas fueron asociadas a la especie *Rhodosporidiobolus ruineniae*, por lo que se utilizaron secuencias de cepas tipo y referencia de esta y otras especies filogenéticamente relacionadas de acuerdo a la literatura (Masiulionis & Pagnocca, 2017). Se utilizaron las secuencias de ITS y LSU concatenadas, al realizar el análisis filogenético se determinó que las cuatro cepas están asociadas estrechamente con un alto porcentaje de soporte (91% de soporte *Bootstrap*) a la especie *Rhodosporidiobolus ruineniae*, lo cual se muestra en la Figura 3.

Figura 3

Árbol filogenético del taxón *Rhodosporidiobolus*

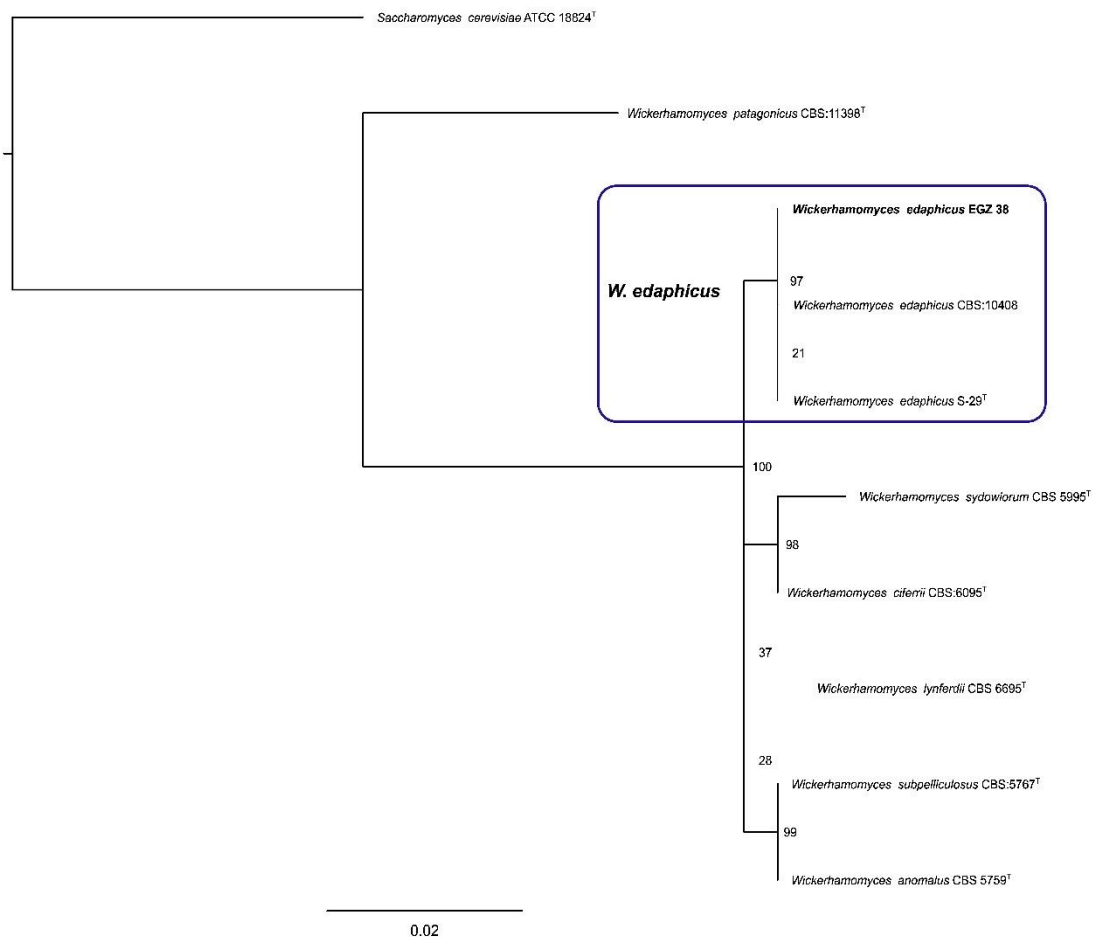


3.1.3. *Wickerhamomyces edaphicus*

De todos los aislamientos, una cepa fue asociada a la especie *Wickerhamomyces edaphicus*, comparamos a la especie con las secuencias tipo relacionadas filogenéticamente de las especies del mismo taxón de acuerdo a la literatura (Limtong *et al.*, 2009; De García *et al.*, 2010), . Se utilizaron las secuencias de LSU concatenadas, al realizar el análisis filogenético se determinó que la cepa está asociada estrechamente con un porcentaje aceptable de soporte (97% de soporte *Bootstrap*) a la especie *Wickerhamomyces edaphicus*, se muestra en la Figura 4.

Figura 4

Árbol filogenético del taxón *Wickerhamomyces*

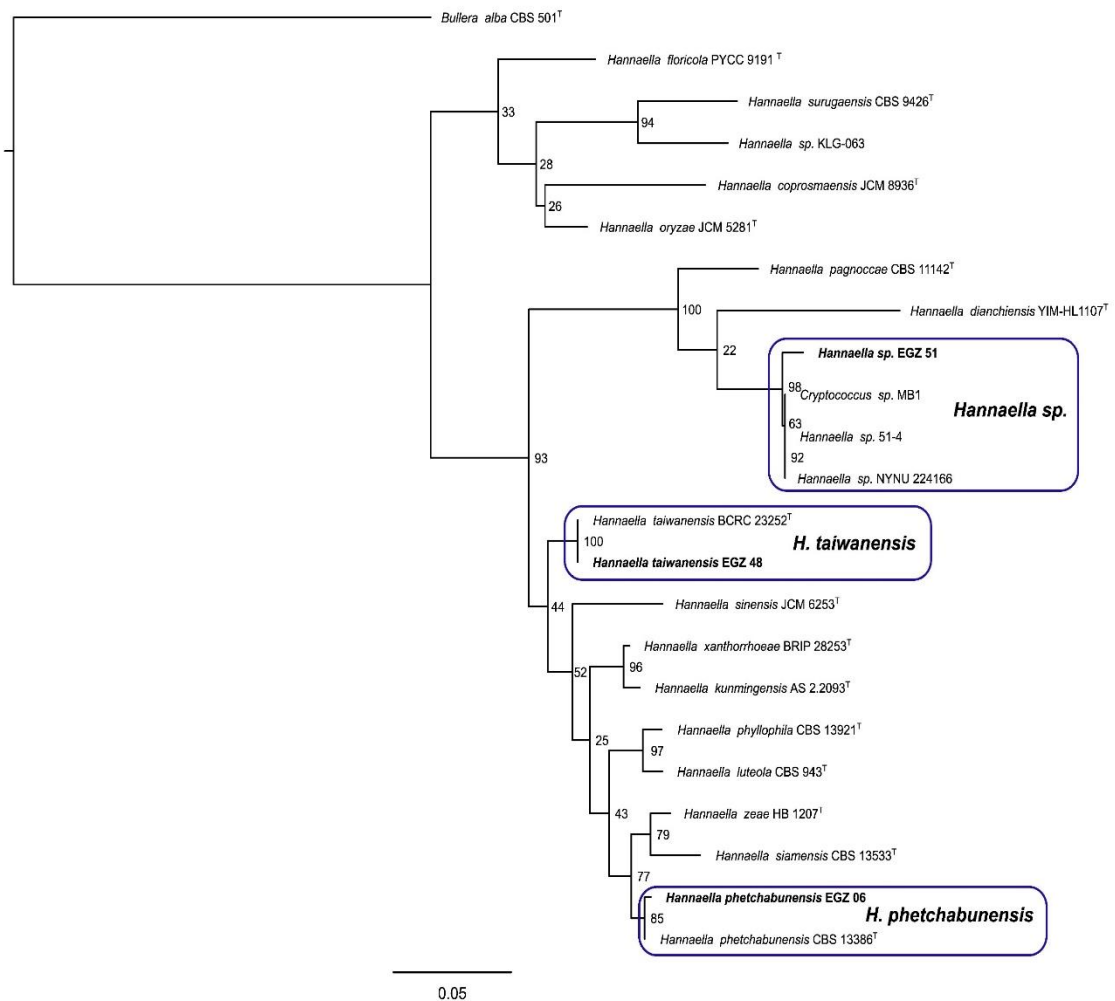


3.1.4. *Hannaella*

De los aislamientos, tres de las cepas fueron asociadas al género *Hannaella*, estas a especies diferentes, las secuencias de estas cepas se las asocio a especies estrechamente relacionadas filogenéticamente según literatura (Han *et al.*, 2017; Kaewwichian *et al.*, 2015; Landell *et al.*, 2014) , luego del análisis filogenético se encontró 3 especies *Hannaella phetchabunensis*, *Hannaella taiwanensis* y *Hannaella sp*, esta última estrechamente a la secuencia de una cepa no identificada a nivel de especie, aislada del pico de colibrí (Belisle *et al.*, 2014), y a otras secuencias de aislados no publicados de *Hannaella*, por lo tanto se le clasifica como una especie no reportada. Se utilizaron las secuencias de ITS y LSU concatenadas, al realizar el análisis filogenético se determinó que la cepa está asociada estrechamente con un alto porcentaje de soporte (85%, 100% y 98% de soporte *Bootstrap*) respectivamente, lo cual se muestra en la Figura 5.

Figura 5

Árbol filogenético del taxón *Hannaella*

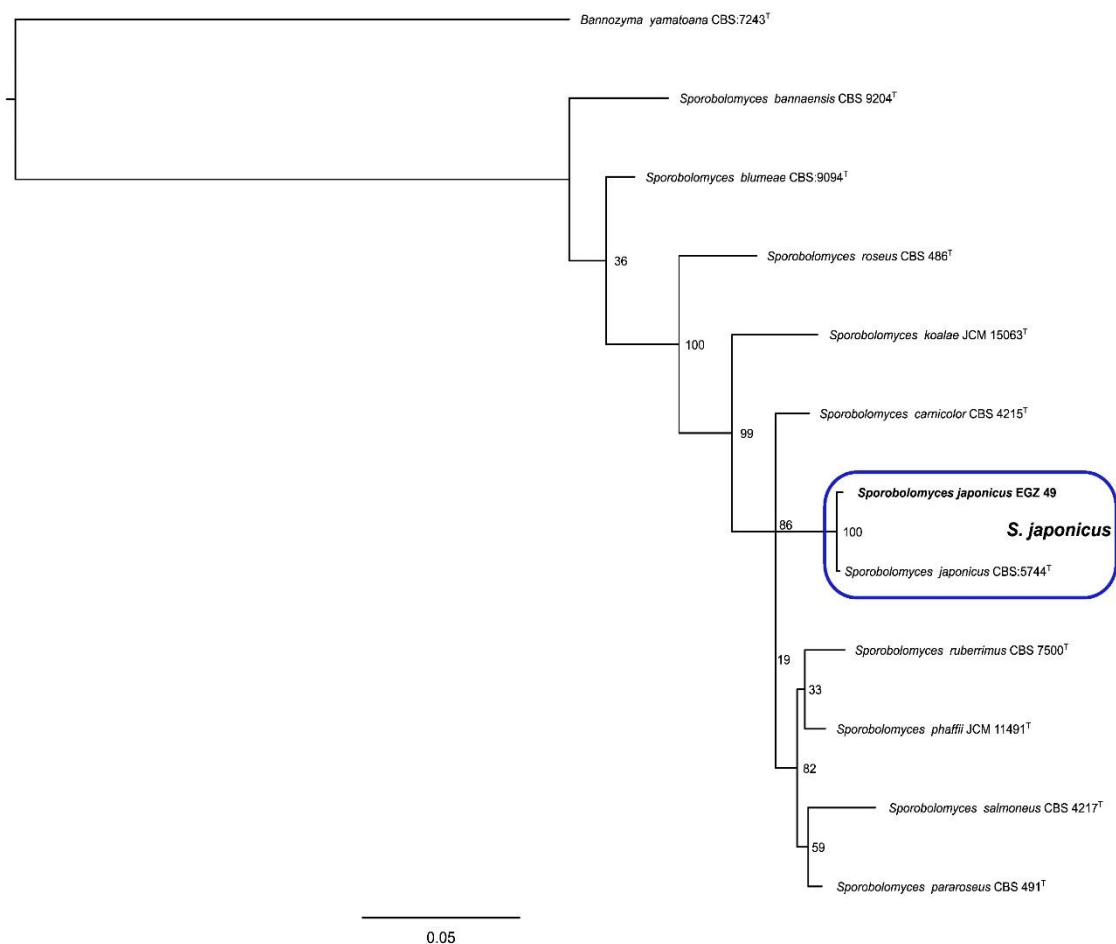


3.1.5. *Sporobolomyces japonicus*

De las cepas aisladas, una cepa fue asociada a la especie *Sporobolomyces japonicus*. Comparamos a la secuencia con las secuencias tipo de las especies del mismo taxón que se encuentran estrechamente relacionadas filogenéticamente de acuerdo a la literatura (Sato & Makimura, 2008; Libkind *et al.*, 2003). Se utilizaron las secuencias de ITS y LSU concatenadas, al realizar el análisis filogenético se determinó que la cepa está asociada estrechamente con un alto porcentaje de soporte (100% de soporte *Bootstrap*) a la especie *Sporobolomyces japonicus*, como se muestra en la Figura 6.

Figura 6

Árbol filogenético del taxón Sporobolomyces

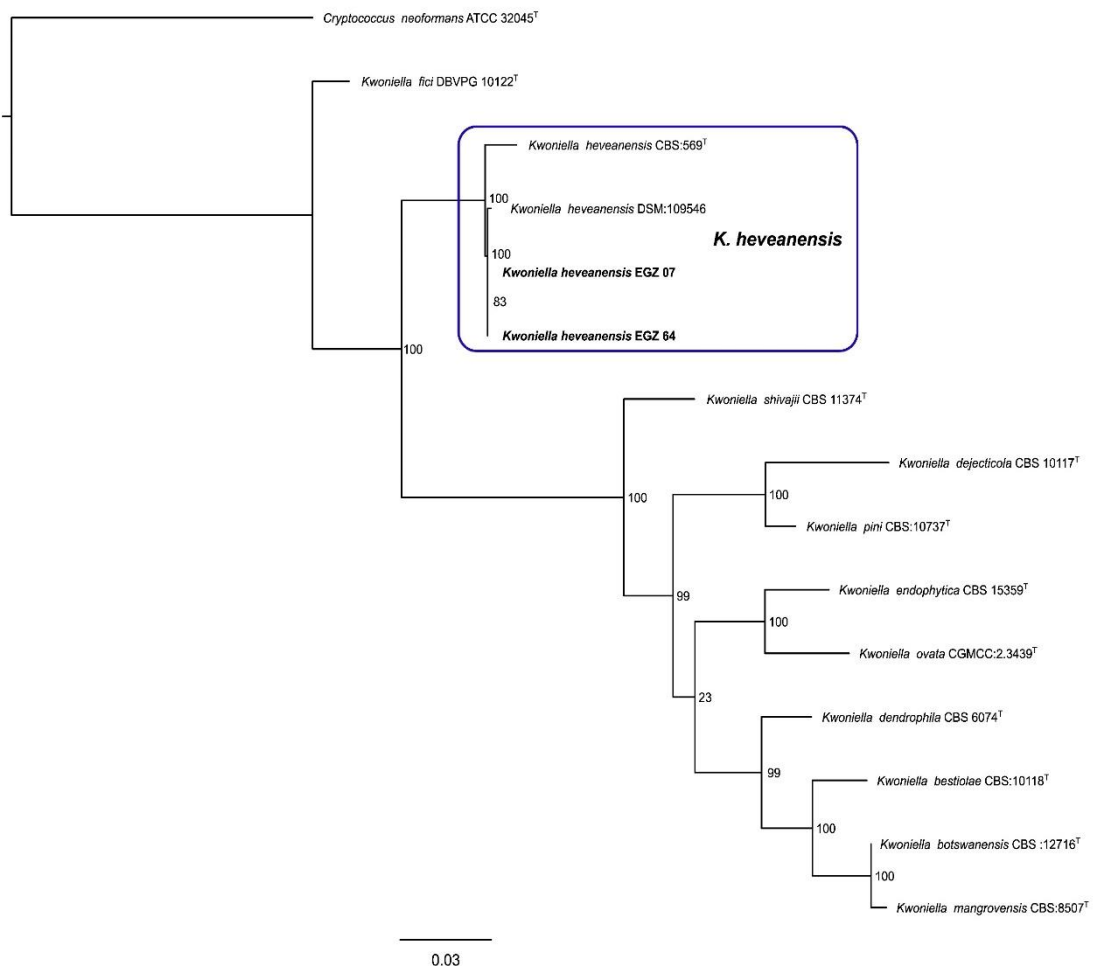


3.1.6. *Kwoniella heveanensis*

De las cepas aisladas, 2 cepas fueron asociadas a la especie *Kwoniella heveanensis*, se comparó las secuencias con las secuencias tipo de las especies que están relacionadas filogenéticamente según literatura (Statzell-Tallman & Fell, 2011; Sun *et al.*, 2011). Se utilizaron las secuencias de ITS y LSU concatenadas, a realizar el análisis filogenético se determinó que la cepa está asociada estrechamente con un alto porcentaje de soporte (100% de soporte *Bootstrap*) a la especie *Kwoniella heveanensis*, se muestra en la Figura 7.

Figura 7

Árbol filogenético del taxón Kwoniella

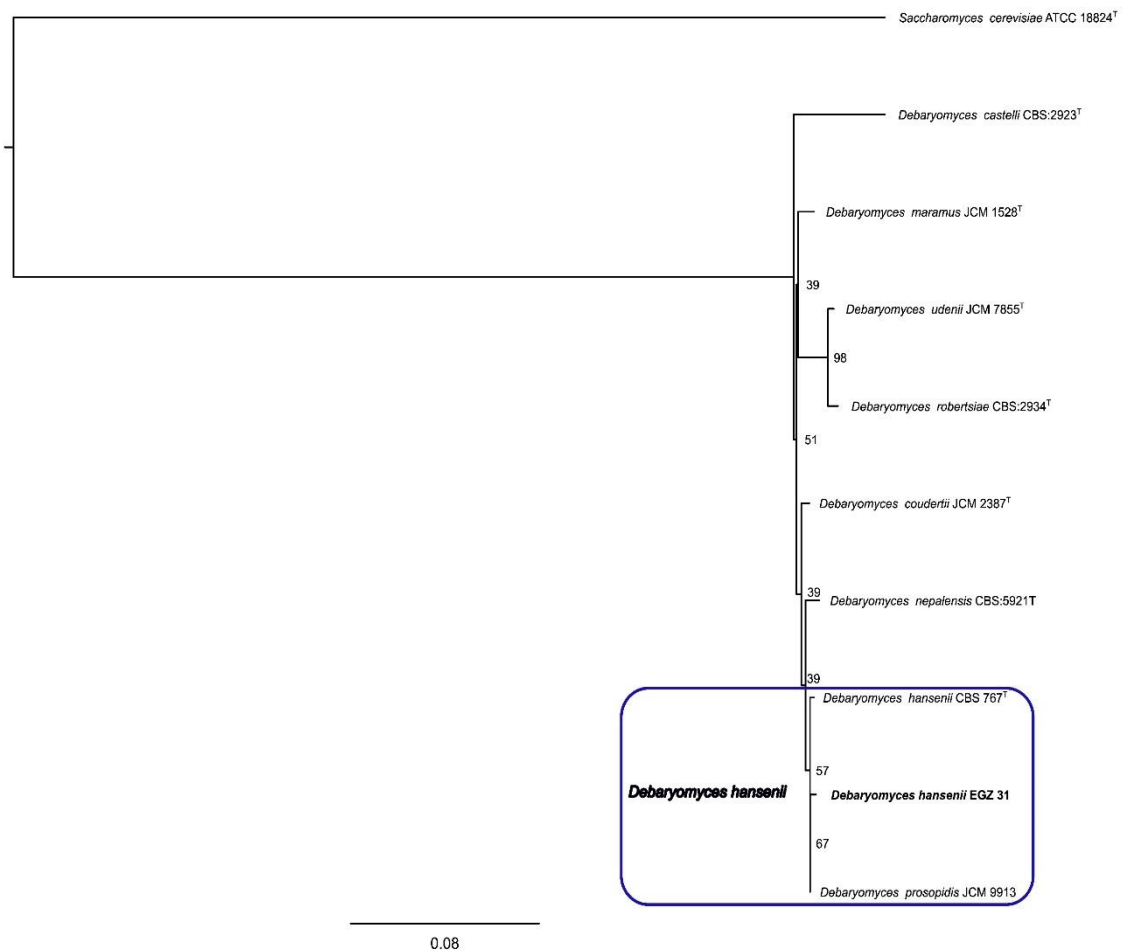


3.1.7. *Debaryomyces hansenii*

De las cepas aisladas, una cepa fue asociada al género *Debaryomyces*. La secuencia generada se comparó con especies del mismo taxón, resultando que la cepa se asocia a *Debaryomyces hansenii* y *Debaryomyces prosopidis*, siendo estas especies genéticamente muy cercanas (Phaff *et al.*, 1998). Se utilizaron las secuencias de LSU concatenadas, al realizar el análisis filogenético se determinó que esta cepa está relacionado a estas dos especies mencionadas, por lo cual en este caso se consideró como *Debaryomyces hansenii*, por ser la especie identificada más antigua, se muestra en la Figura 8.

Figura 8

Árbol filogenético del taxón *Debaryomyces*

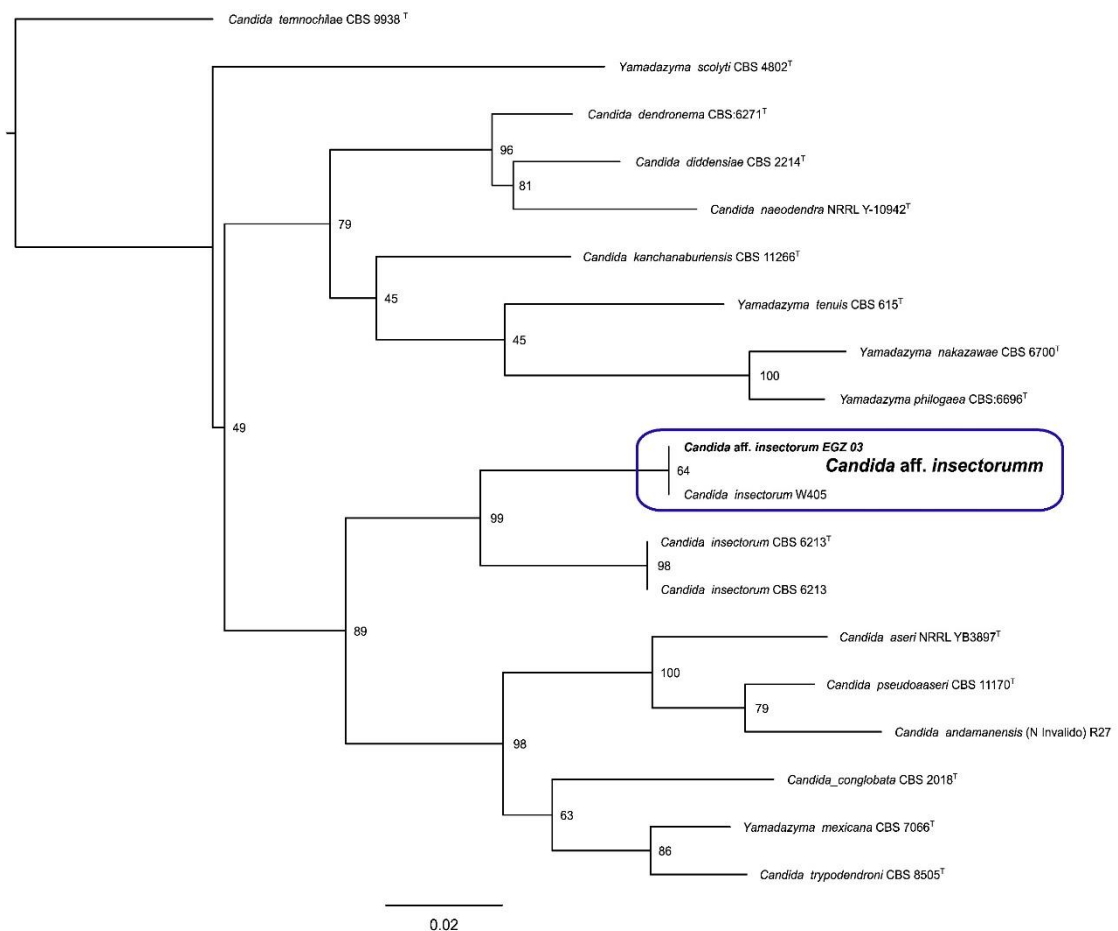


3.1.8. *Candida* aff. *insectorum*

De las cepas aisladas, una cepa fue asociada al género *Candida*, la secuencia generada de la cepa, se comparó con especies relacionadas filogenéticamente según el BLAST y la literatura (Groenewald *et al.*, 2011a), Se utilizaron las secuencias de ITS y LSU concatenadas, al realizar el análisis filogenético, se encontró que es una especie cercana a la especie *Candida insectorum*, pero no se asocia con la secuencia tipo de dicha especie, pero se asocia con una secuencia de la misma especie pero que no se encuentra publicada, por lo cual se identificó como *Candida* aff. *insectorum*, porque los rasgos observados coinciden con el taxón indentificado, pero las observaciones son insuficientes para definirlo como nueva especie, se muestra en la Figura 9.

Figura 9

Árbol filogenético del taxón Candida

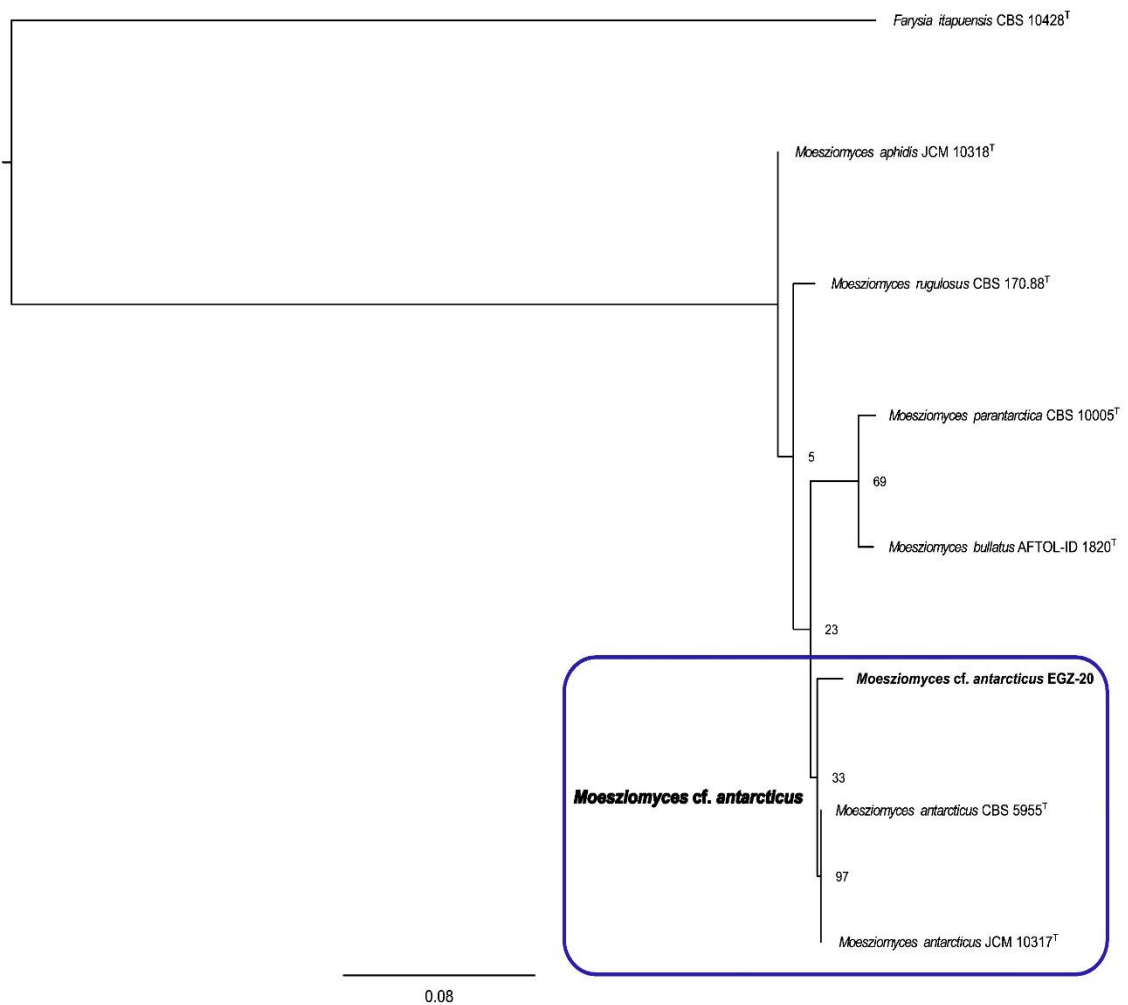


3.1.9. *Moesziomyces cf. antarcticus*

De los aislados, una cepa fue asociada al género *Moesziomyces*. La secuencia generada de la cepa, se comparó con especies relacionadas filogenéticamente según el BLAST y la literatura (Seo *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2019), Se utilizaron las secuencias de ITS y LSU concatenadas, al realizar el análisis filogenético, en donde se encontró que nuestra cepa es cercana a la especie *Moesziomyces antarcticus*, pero no tiene considerable porcentaje de soporte en el árbol filogenético, por lo cual se le consideró como *Moesziomyces cf. antarcticus*, porque no se puede afirmar con seguridad, pero morfológicamente parece que pertenece a esta especie, se muestra en la Figura 10.

Figura 10

Árbol filogenético del taxón *Moesziomyces*



3.2. Caracterización morfológica de levaduras

Se aislaron un total de 60 cepas clasificadas en 11 especies (Tabla 2). Las especies mostraron diferencias a nivel macroscópico (color, margen, elevación de colonia, brillo, textura, aspecto de la colonia y presencia de pseudomicelio) y a nivel microscópico en la forma de las células, tamaño, color, presencia de pseudohifas y la forma de reproducción (Tabla 2).

Tabla 2

Descripción de la caracterización morfológica de las especies identificadas de levaduras

Especie	N° de cepas	Código de las cepas	Descripción macro morfológica	Descripción micro morfológica
<i>Meyerozyma guilliermondii</i> (Figura 11)	46	EGZ-01; EGZ-02; EGZ-04; EGZ-08; EGZ-10; EGZ-11; EGZ-12; EGZ-14; EGZ-15; EGZ-16; EGZ-19; EGZ-22; EGZ-23; EGZ-24; EGZ-25; EGZ-26; EGZ-27; EGZ-28; EGZ-29; EGZ-30; EGZ-33; EGZ-34; EGZ-35; EGZ-36; EGZ-37; EGZ-40; EGZ-41; EGZ-42; EGZ-43; EGZ-44; EGZ-45; EGZ-46; EGZ-47;	Colonia de color blanca cremosa, superficie lisa, borde rizoide, elevación planoconvexa, textura butirosa, aspecto húmedo y presencia de pseudomicelio.	Células con forma elipsoidales y ovoides, con tamaño promedio de 7.0 μm x 2.0 μm (3.0 – 14.9 μm de largo; 1.4 – 3.4 μm de ancho, $n = 50$), hialinas, reproducción asexual por gemación y presencia escasa de pseudohifas.

Espece	N° de cepas	Código de las cepas	Descripción macro morfológica	Descripción micro morfológica
		EGZ-50; EGZ-52; EGZ-53; EGZ-54; EGZ-55; EGZ-56; EGZ-57, EGZ-58; EGZ-59; EGZ-60; EGZ-61; EGZ-62; EGZ-63		
<i>Rhodosporeidiobolus ruineniae</i> (Figura 12)	4	EGZ-09; EGZ-13; EGZ-21; EGZ-39	Colonia de color roja a rosada, superficie rugosa, borde ondulado, elevación convexa, textura rasgada y de aspecto seco.	Células con forma elipsoidales, ovoides y alargadas, con tamaño promedio de 10.0 µm x 5.0 µm (6.4 – 16.2 µm de largo; 2.4 – 8.3 µm de ancho, $n = 50$), hialinas, reproducción asexual por gemación.
<i>Wickerhamomyces edaphicus</i> (Figura 13)	1	EGZ-38	Colonia de color blanca, superficie rugosa surcada con pliegues, borde ondulado, elevación plana, aspecto seco y escasa presencia de pseudomicelio.	Células con forma cilíndrica y ovoide, con tamaño promedio de 5.0 µm x 5.0 µm (2.8 – 8.0 µm de largo; 2.6 – 7.5 µm de ancho, $n = 50$), hialinas, reproducción asexual por gemación.

Especie	N° de cepas	Código de las cepas	Descripción macro morfológica	Descripción micro morfológica
<i>Hannaella phetchabunensis</i> (Figura 14)	1	EGZ-06	Colonia de color mostaza, superficie lisa, borde ondulado, elevación convexa, textura butirosa, brillante, y aspecto húmedo.	Células con forma cilíndrica y alargada, con tamaño promedio de 6.0 μm x 4.0 μm (2.9 – 6.1 μm de largo; 3.8 – 10.5 μm de ancho, $n = 50$), hialinas, reproducción asexual por gemación.
<i>Hannaella taiwanensis</i> (Figura 15)	1	EGZ-48	Colonia de color mostaza claro, superficie rugosa fisurada, borde ondulado, elevación planoconvexa, textura butirosa, brillante y de aspecto húmedo	Células con forma cilíndrica y alargada, con tamaño promedio de 5.0 μm x 4.0 μm (2.8 – 7.5 μm de largo; 3 – 8.9 μm de ancho, $n = 50$), hialinas, reproducción asexual por gemación.
<i>Hannaella</i> sp. (Figura 16)	1	EGZ-51	Colonia de color mostaza, superficie lisa, borde ondulado, elevación convexa, textura butirosa, brillante y de aspecto húmedo.	Células con forma ovoide y alargadas, con tamaño promedio de 7.0 μm x 4.0 μm (4.9 – 10.0 μm de largo; 2.7 – 7.9 μm de ancho, $n = 50$), hialinas, reproducción asexual por gemación.

Especie	N° de cepas	Código de las cepas	Descripción macro morfológica	Descripción micro morfológica
<i>Sporobolomyces japonicus</i> (Figura 17)	1	EGZ-49	Colonia de color anaranjado, superficie rugosa, fisurada, surcada, borde ondulado, elevación planoconvexa y de aspecto seco.	Células con forma ovoide, con tamaño promedio de 8.0 μm x 4.0 μm (3.8 – 17.6 μm de largo; 2.2 – 7.3 μm de ancho, $n = 50$), hialinas y con reproducción asexual por gemación.
<i>Kwoniella heveanensis</i> (Figura 18)	2	EGZ-07; EGZ-64	Color blanco amarillento, superficie rugosa, poco fisurada, borde ondulado, elevación planoconvexa, brillante y de aspecto húmedo.	Células con forma cilíndrica y ovoide, con tamaño promedio de 6.0 μm x 5.0 μm (2.8 – 8.4 μm de largo; 2.5 – 5.9 μm de ancho, $n = 50$), hialinas y presenta reproducción asexual por gemación.
<i>Debaryomyces hansenii</i> (Figura 19)	1	EGZ-31	Color blanco, algodonoso, superficie lisa, borde ondulado, elevación convexa y de aspecto húmedo.	Células con forma cilíndrica y ovoide, con tamaño promedio de 4.0 μm x 3.0 μm (1.9 – 4.8 μm de largo; 3.2 – 6.3 μm de ancho, $n = 50$), hialinas y presenta reproducción asexual por gemación.
			Color blanco, algodonoso, de superficie de lisa a fisurada, borde	Células con forma ovoide, con tamaño promedio de 4.0 μm x 3.0 μm

Especie	N° de cepas	Código de las cepas	Descripción macro morfológica	Descripción micro morfológica
<i>Candida</i> aff. <i>insectorum</i> (Figura 20)	1	EGZ-03	espiculado, elevación planoconvexa, presencia escasa de pseudomicelio, opaca y de aspecto seco.	(1.9 – 4.6 μm de largo; 2.8 – 7.3 μm de ancho, $n = 50$), hialinas, presencia de pseudohifas y presenta reproducción asexual por gemación.
<i>Moesziomyces</i> cf. <i>antarticus</i> (Figura 21)	1	EGZ-20	Color rosado claro, superficie rugosa, parcialmente fisurada, borde ondulado, presencia cuerpo fructífero, de aspecto opaco y seco.	Células con forma alargada, de tamaño promedio de 10.0 μm x 3.0 μm (1.8 – 4.2 μm de largo; 3.7 – 17.4 μm de ancho, $n = 50$), hialinas, presenta reproducción asexual por gemación.

Figura 11

Morfología de la especie *Meyerozyma guilliermondii* (EGZ-43). (A) Morfología de la colonia; (B) morfología de las células, escala referente a 20 μm

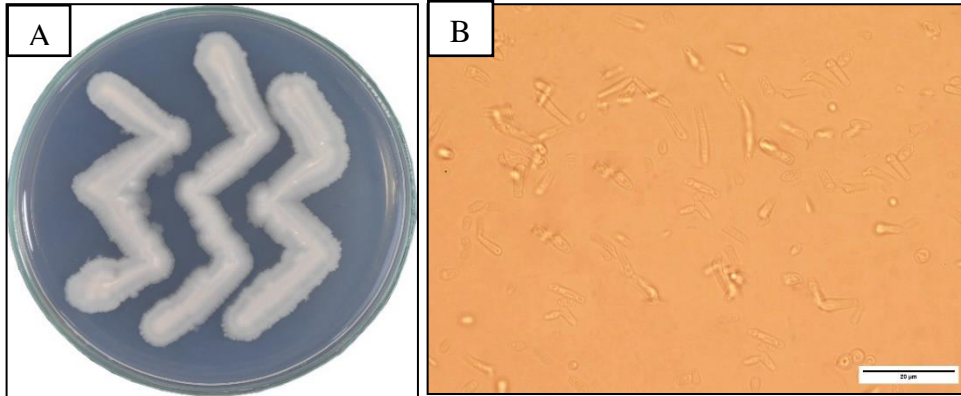


Figura 12

Morfología de la especie *Rhodosporidiobolus ruineniae* (EGZ-21). (A) Morfología de la colonia; (B) Morfología de las células, escala referente a 20 μm

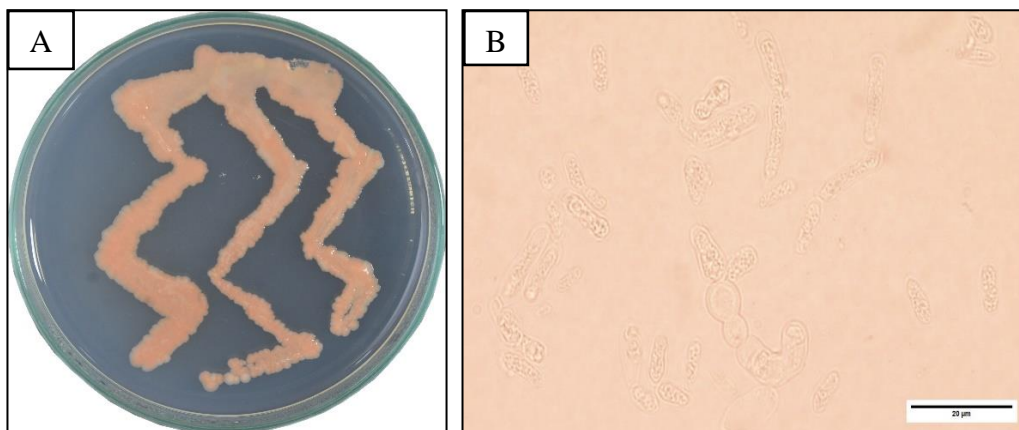


Figura 13

Morfología de la especie *Wickerhamomyces edaphicus* (EGZ-38). (A) Morfología de la colonia; (B) Morfología de las células, escala referente a 20 μm

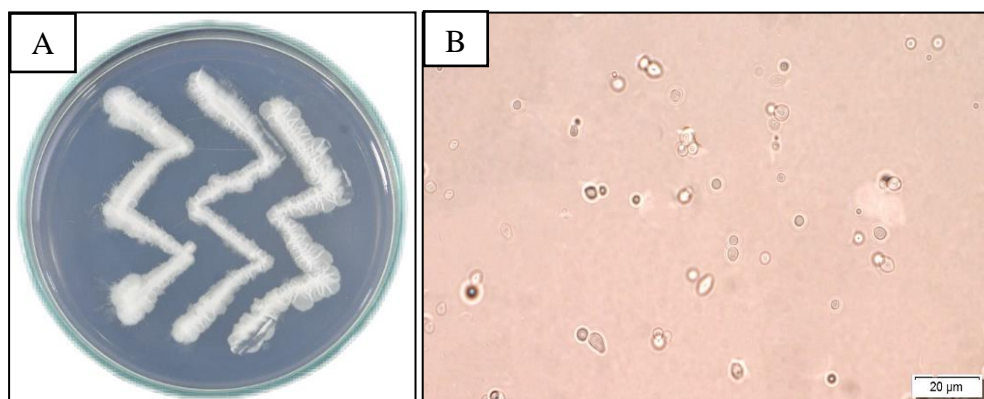


Figura 14

Morfología de Hannaella phetchabunensis (EGZ-06). (A) Morfología de la colonia; (B) Morfología de las células, escala referente a 20 µm

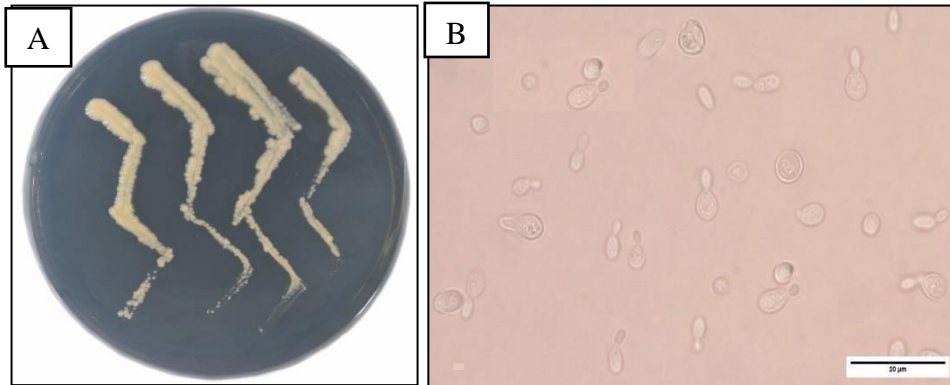


Figura 15

Morfología de Hannaella taiwanensis (EGZ-48). (A) Morfología de la colonia; (B) Morfología de las células, escala referente a 20 µm.

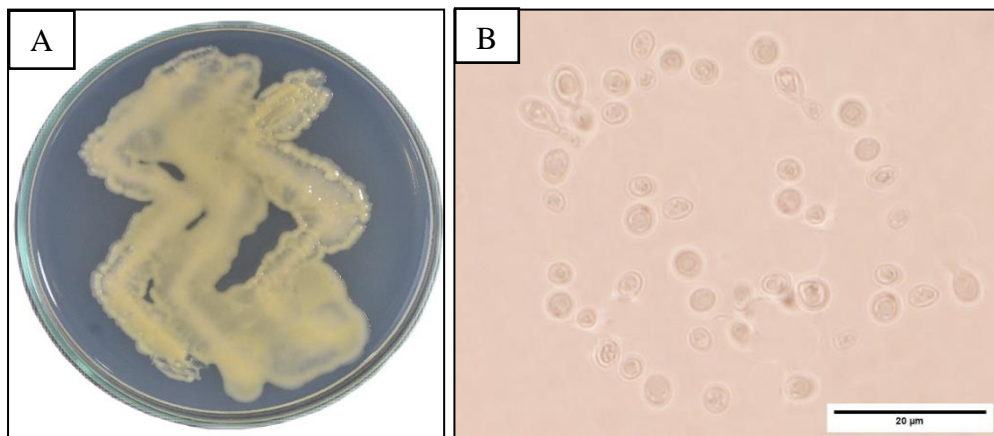


Figura 16

Morfología de la especie Hannaella sp. (EGZ-51). (A) Morfología de la colonia; (B) Morfología de las células, escala referente a 20 µm

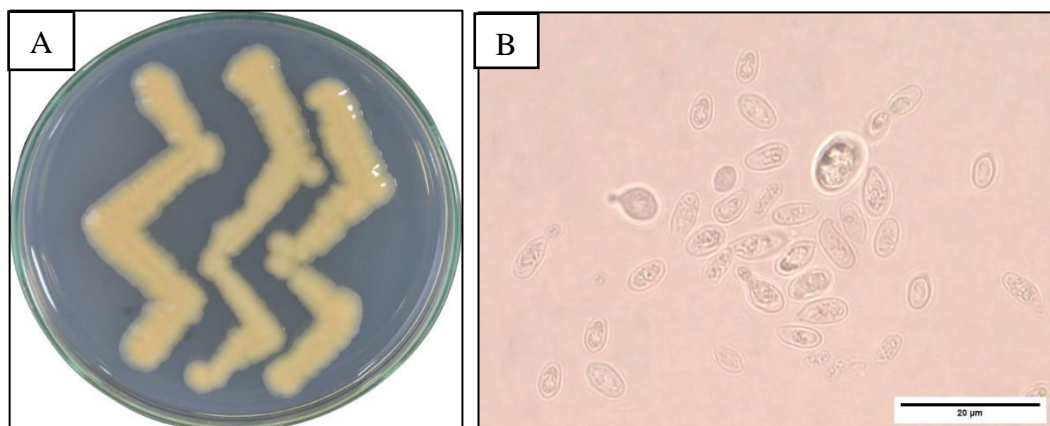


Figura 17

Morfología de Sporobolomyces japonicus (EGZ-49). (A) Morfología de la colonia; (B) Morfología de las células, escala referente a 20 µm

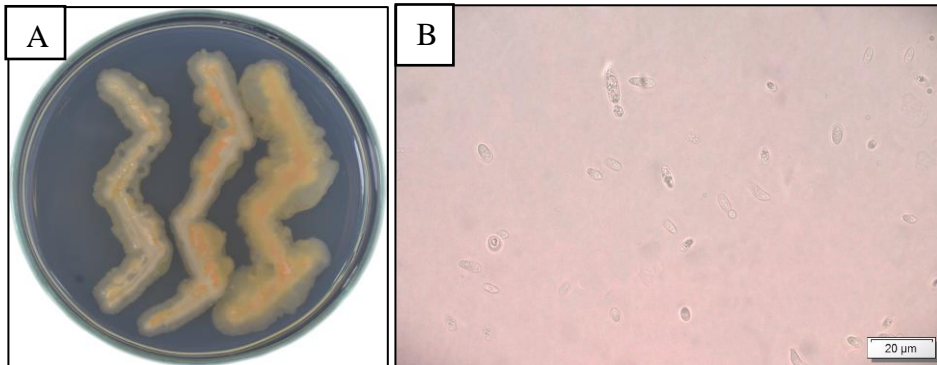


Figura 18

Morfología de Kwoniella heveanensis (EGZ-07). (A) Morfología de la colonia; (B) Morfología de las células, escala referente a 20 µm



Figura 19

Morfología de Debaryomyces hansenii (EGZ-31). (A) Morfología de la colonia; (B) Morfología de las células, escala referente a 20 µm

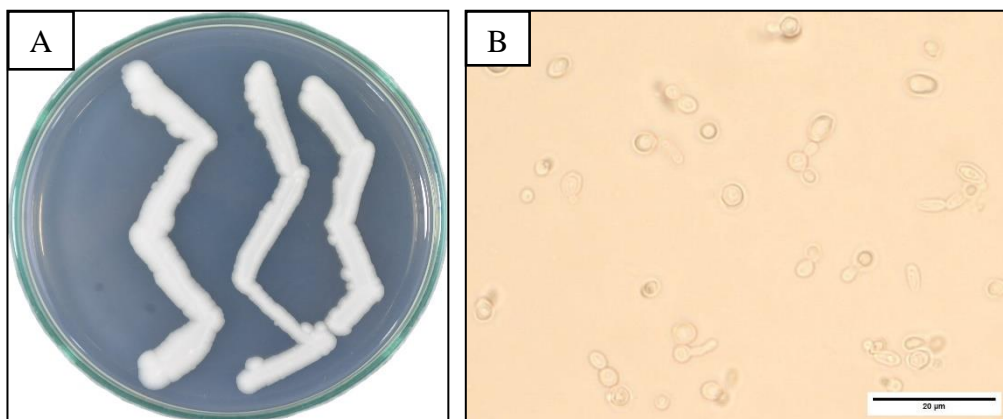


Figura 20

Morfología de Candida aff. insectorum (EGZ-03). (A) Morfología de la colonia; (B) Morfología de las células, escala referente a 20 μm .

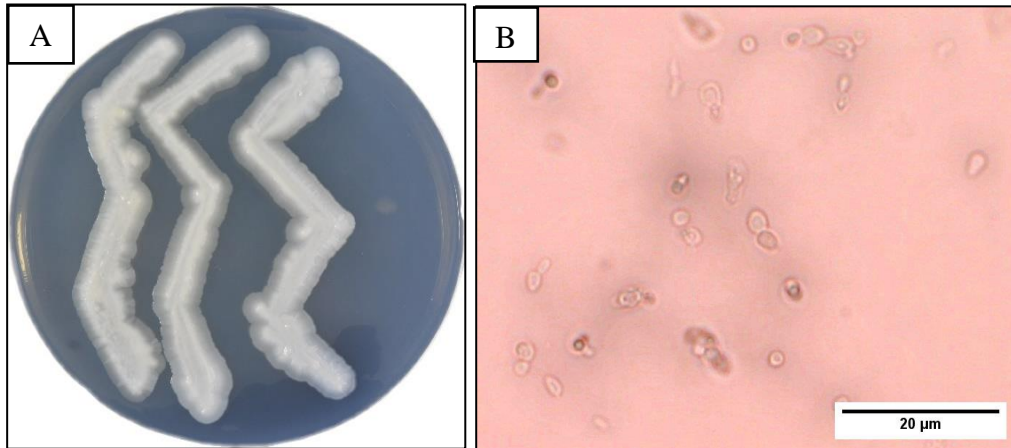


Figura 21

Morfología de Moesziomyces cf. antarcticus (EGZ-20). (A) Morfología de la colonia; (B) morfología de las células, escala referente a 20 μm



Especies de levaduras identificadas molecularmente y caracterizados morfológicamente de todos los aislados obtenidos.

Tabla 3

Número de cepas identificadas por especie

Especies	N° de cepas
<i>Candida</i> aff. <i>insectorum</i>	1
<i>Debaryomyces hansenii</i>	1
<i>Hannaella phetchabunensis</i>	1
<i>Hannaella</i> sp.	1
<i>Hannaella taiwanensis</i>	1
<i>Kwoniella heveanensis</i>	2
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	46
<i>Moesziomyces</i> cf. <i>antarticus</i>	1
<i>Rhodospordiobolus ruineniae</i>	4
<i>Sporobolomyces japonicus</i>	1
<i>Wickerhamomyces edaphicus</i>	1

3.3. Índices de diversidad

3.3.1. Índice de diversidad

- a) Diversidad en base a parcelas

Tabla 4

Número de especies por parcela (PAR).

	PAR-I	PAR-II	PAR-III	PAR-IV	PAR-V	TOTAL
<i>Candida</i> aff. <i>insectorum</i>	1	0	0	0	0	1
<i>Debaryomyces hansenii</i>	0	0	1	0	0	1
<i>Hannaella phetchabunensis</i>	1	0	0	0	0	1
<i>Hannaella</i> sp.	0	0	0	0	1	1
<i>Hannaella taiwanensis</i>	0	0	0	1	0	1
<i>Kwoniella heveanensis</i>	1	0	0	0	1	2
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	10	5	10	8	13	46
<i>Moesziomyces</i> cf. <i>antarticus</i>	0	1	0	0	0	1
<i>Rhodospordiobolus ruineniae</i>	2	1	0	1	0	4
<i>Sporobolomyces japonicus</i>	0	0	0	1	0	1
<i>Wickerhamomyces edaphicus</i>	0	0	0	1	0	1
TOTAL	15	7	11	12	15	60

- Diversidad alfa

Luego de la identificación de las especies de levaduras, se calculó el índice de Shannon-Weiner. En general, el PNIMCC posee una diversidad baja de levaduras epífitas, donde la parcela cuatro, cuenta con una mayor diversidad entre todas con un valor de 1.099 y la parcela tres, con una diversidad mínima de 0.3046, estos datos se muestran en la tabla 5.

Tabla 5

Valores de índice de Shannon-Weiner por parcela

Parcelas	Valor de Índice de Shannon-Weiner
PAR-I	1.081
PAR-II	0.7963
PAR-III	0.3046
PAR-IV	1.099
PAR-V	0.4851

- Diversidad beta

Se calculó el índice de Jaccard para conocer la diversidad beta de especies de levaduras entre parcelas. Se calculó la distancia entre parcelas o el índice de disimilitud, por lo cual se elaboró el dendrograma en donde nos indica la similitud entre las misma. Según el índice de Jaccard, la Parcela I y II, tienen un mayor índice de similaridad, así mismo como la parcela III y V, sin embargo, la parcela IV, tiene especies con mayor diversidad diferente a las demás, estos datos se muestran en la tabla 6.

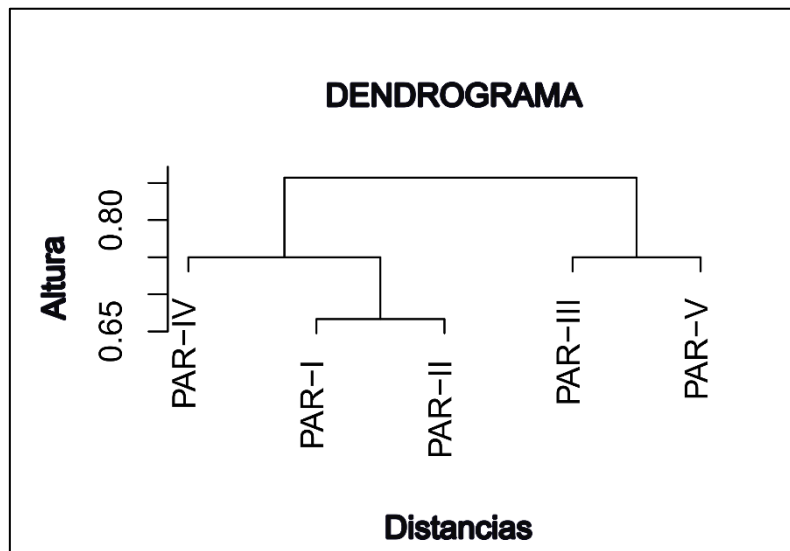
Tabla 6

Índice de disimilitud o distancia entre parcelas

	PAR-I	PAR-II	PAR-III	PAR-IV
PAR-II	0.667			
PAR-III	0.833	0.750		
PAR-IV	0.750	0.667	0.833	

Figura 22

Dendrograma de similitud de especies por parcela



- Abundancia de especies por parcela

Se calculó la abundancia de especies por parcela, en donde las parcelas I y IV, tienen la mayor abundancia de especies con un total de 5 especies de levaduras epífitas, como se evidencia en la Tabla 7.

Tabla 7

Abundancia de especies por parcela

Parcelas	Abundancia de especies	Especies
PAR-I	5	<i>Candida</i> aff. <i>insectorum</i> , <i>Hannaella phetchabunensis</i> , <i>Kwoniella heveanensis</i> , <i>Meyerozyma guilliermondii</i> , <i>Rhodosporidiobolus ruineniae</i> , <i>Meyerozyma guilliermondii</i> , <i>Moesziomyces</i> cf. <i>antarticus</i> , <i>Rhodosporidiobolus ruineniae</i> ,
PAR-II	3	<i>Debaryomyces hansenii</i> ,
PAR-III	2	<i>Meyerozyma guilliermondii</i> ,

PAR-IV	5	<i>Hannaella taiwanensis</i> , <i>Meyerozyma guilliermondii</i> , <i>Rhodosporidiobolus ruineniae</i> , <i>Sporobolomyces japonicus</i> , <i>Wickerhamomyces edaphicus</i> .
PAR-V	3	<i>Hannaella sp.</i> , <i>Kwoniella heveanensis</i> , <i>Meyerozyma guilliermondii</i>

- Equitatividad de especies por parcela

Las parcelas muestran un valor del índice variado, en donde las parcelas I, II y IV, demuestran una equitatividad promedio, pero en general se observa un índice de equitatividad baja, probablemente debida a la dominancia de cepas de una misma especie como lo es en este estudio la presencia de la especie *Meyerozyma guilliermondii*, los datos se observan en la Tabla 8.

Tabla 8

Equitatividad de las especies por parcela

Parcelas	Equitatividad
PAR-I	0.6713983
PAR-II	0.7248341
PAR-III	0.439497
PAR-IV	0.6826062
PAR-V	0.4415517

b) Diversidad en base a Hospedero.

Tabla 9

Número de especies por hospedero

	<i>Herrania nycterodendron</i>	<i>Theobroma bicolor</i>	<i>Theobroma cacao</i>	TOTAL
<i>Candida aff. insectorum</i>	0	0	1	1
<i>Debaryomyces hansenii</i>	1	0	0	1
<i>Hannaella</i>				
<i>phetchabunensis</i>	0	0	1	1
<i>Hannaella sp.</i>	0	1	0	1
<i>Hannaella taiwanensis</i>	1	0	0	1
<i>Kwoniella heveanensis</i>	0	1	1	2
<i>Meyerozyma</i>				
<i>guilliermondii</i>	18	13	15	46
<i>Moesziomyces cf.</i>				
<i>antarticus</i>	0	0	1	1
<i>Rhodosporidiobolus</i>				
<i>ruineniae</i>	1	0	3	4
<i>Sporobolomyces</i>				
<i>japonicus</i>	1	0	0	1
<i>Wickerhamomyces</i>				
<i>edaphicus</i>	1	0	0	1
TOTAL	23	15	22	60

- Diversidad alfa

En general, el área muestreada posee una diversidad baja de levaduras epífitas, siendo el hospedero *Theobroma cacao* el de mayor diversidad. Sin embargo, esta diversidad es baja con un índice de Shannon de 1.09 (Tabla 10).

Tabla 10

Valores de índice de Shannon-Weiner por Hospedero

Hospedero	Valor de Índice de Shannon-Weiner
<i>Herrania nycterodendron</i>	0.8735
<i>Theobroma bicolor</i>	0.4851
<i>Theobroma cacao</i>	1.0948

- Diversidad beta

Existe una mayor similitud de especies encontradas en los hospederos *Theobroma cacao* y *Theobroma bicolor*, a diferencia de *Herrania nycterodendron*, que albergó diferentes especies de levaduras, pero en general las similitudes son bajas (Tabla 11).,

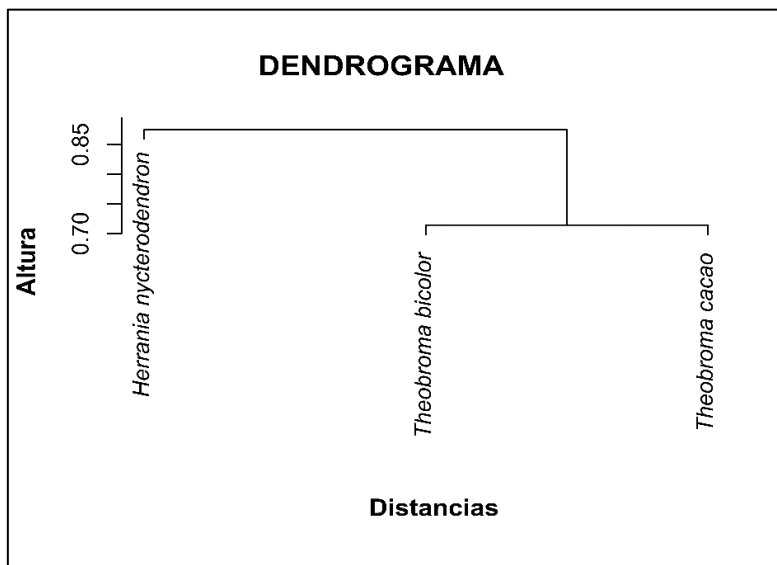
Tabla 11

Índice de disimilitud entre hospederos

	<i>Herrania nycterodendron</i>	<i>Theobroma bicolor</i>
<i>Theobroma bicolor</i>	0.88	
<i>Theobroma cacao</i>	0.80	0.71

Figura 23

Dendrograma de similitud entre hospederos



- Abundancia de especies por hospedero

Las especies *Herrania nycterodendron* y *Theobroma cacao*, tienen la mayor abundancia de especies con un total de 6 especies, siendo estos los hospederos con mayor abundancia, como se muestra en la Tabla 12.

Tabla 12

Abundancia de especies por hospedero

Hospedero	Abundancia de especies	Especies
		<i>Debaryomyces hansenii</i> , <i>Hannaella taiwanensis</i> , <i>Meyerozyma guilliermondii</i> , <i>Rhodsporidiobolus</i>
<i>Herrania nycterodendron</i>	6	<i>ruineniae</i> , <i>Sporobolomyces japonicus</i> , <i>Hannaella sp.</i> , <i>Kwoniella heveanensis</i> ,
<i>Theobroma bicolor</i>	3	<i>Meyerozyma guilliermondii</i> .
		<i>Candida aff. insectorum</i> , <i>Hannaella phetchabunensis</i> , <i>Kwoniella heveanensis</i> , <i>Meyerozyma guilliermondii</i> , <i>Moesziomyces cf. Antarticus</i> , <i>Rhodsporidiobolus</i>
<i>Theobroma cacao</i>	6	<i>ruineniae</i> ,

- Equitatividad de las especies por hospedero

El hospedero *Theobroma cacao* albergó una mayor equitatividad de especies. Sin embargo, la equitatividad de especies en general es bajo, como se evidencia en la Tabla 13.

Tabla 13

Equitatividad de especies por hospedero

Hospedero	Equitatividad
<i>Herrania nycterodendron</i>	0.49
<i>Theobroma bicolor</i>	0.44
<i>Theobroma cacao</i>	0.61

IV. DISCUSIÓN

Actualmente la biodiversidad de las levaduras epífitas es poco estudiada y se conoce muy poco de sus propiedades y el papel que cumplen en su hábitat y con su hospedero. Este estudio es uno de las primeras investigaciones de levaduras epífitas asociadas a especies vegetales en la región Amazonas y en el Perú.

En este estudio se identificó la diversidad de especies de levaduras epifitas asociadas al filoplano de las hojas en especies de *Theobroma* y *Herrania*, en el Parque Nacional Ichigkat Muja-Cordillera del Cóndor, un área natural protegida que alberga gran diversidad de ecosistemas y especies de flora, fauna y microorganismos (SERNANP, 2019).

La biología molecular es una herramienta eficiente, que en conjunto con la caracterización morfológica, nos permite alcanzar la identificación de microorganismos como las levaduras a nivel de especie (Pérez-Trallero, 2003).

Meyerozyma guilliermondii se encuentra distribuido ampliamente en la naturaleza y puede ser aislado de diversas superficies como suelo, plantas, insectos, agua de mar, exudados de árboles, además de encontrarse en la microflora humana (Rosales-López *et al.*, 2018; Castellani, 1912; J. & Burton, 1954; Kurtzman & Suzuki, 2010), coincidiendo con nuestro estudio el cual fue aislada de tejido vegetal, siendo esta especie la más abundante.

Por su parte el género *Candida* ha sido aislada de diversas superficies como frutas (Feoli *et al.*, 1997), cuerpo de insectos (Amy *et al.*, 2007), especies vegetales (Nagatsuka *et al.*, 2009) y como endófitos en hojas (Lopes *et al.*, 2015), esta información corrobora con encontrado en la presente investigación, donde la cepa que corresponde a la especie del género *Candida* fue aislado a partir de la superficie del tejido vegetal de árboles.

Otro género obtenido en este estudio fue *Hannaella* (Basidiomycota). La mayoría de especies del género *Hannaella* han sido aisladas de hojas, es decir es un género de levaduras predominantemente epífitas (Kaewwichian *et al.*, 2015; Landell *et al.*, 2014; Surussawadee *et al.*, 2015; Surussawadee *et al.*, 2015). De igual modo especies del género *Sporobolomyces*, aislado de diversas superficies y también de hojas de especies vegetales (Ponzoni *et al.*, 2008; Bai *et al.*, 2002). El género *Debaryomyces* ha sido aislado también como endófito (Bertini, 2018), confirmando su supervivencia como un microorganismo endófito y epífito en sus hospederos. Por su parte, especies del género *Wickerhamomyces*

han sido aisladas de diversos hábitats como insectos, aves, sabia de árboles, suelo (Francesca *et al.*, 2013; Ninomiya *et al.*, 2013; Limtong *et al.*, 2009; De García *et al.*, 2010) y de hojas (Groenewald *et al.*, 2011b). El género *Rhodosporidiobolus* se encuentra presente en diversas superficies y también en hojas de especies vegetales (Statzell-Tallman *et al.*, 2008). Levaduras del género *Kwoniella* se han encontrado en diversas superficies como superficies de plantas (Statzell-Tallman *et al.*, 2008; Statzell-Tallman *et al.*, 2008) y el género *Moesziomyces*, aislado de diversas superficies como microbiota humana y del agua (Liu *et al.*, 2019)Vánky, 1986; Vánky, 1986; Vánky, 1986). Coincidiendo con este estudio que estas especies de levaduras fueron aisladas de la superficie de especies vegetales.

En este estudio de un total de 60 aislados de levaduras epífitas del PNIMCC, se identificó 11 especies, que corresponden a 9 géneros. La especie *Meyerozyma guilliermondii* fue sorprendentemente la más abundante. Otras especies que destacan son *Rhodosporidiobolus ruineniae* y *Kwoniella heveanensis*, pero en general se encontró una diversidad media de levaduras según el índice de Shannon. En Brasil se aislaron 225 cepas de levaduras de la superficie de hojas, flores y frutos del árbol de cacao en donde encontraron 20 especies distribuidos en 11 géneros. En este caso el género *Hannaella* fue el más abundante, y predominó la clase Basidiomycota en comparación con Ascomycota (Neto *et al.*, 2021). Similares resultados fueron obtenidos por Estrela Junior *et al.* (2022). Esto difiere con nuestro estudio, en donde de todos los aislados predominó la especie *Meyerozyma guilliermondii* (Ascomycota). Esto coincide con otros estudios de aislados de la misma especie, que la consideran una especie ubicua (Wickerham, 1966).

Los microorganismos como las levaduras se encuentran en diversas superficies, pueden ser aisladas de diversas fuentes, muchas de estas pueden ser de gran beneficio para con su hospedero, así como también causante de enfermedades para los mismos, por lo cual su estudio para conocer sus potencialidades es indispensable, en este estudio se logró la identificación de especies de levaduras asociadas a arboles de importancia económica en nuestro país, para que en futuras investigaciones estos microorganismos sean evaluados frente a patógenos de estas especies vegetales.

V. CONCLUSIONES

- Se identificaron 11 especies de levaduras, distribuidas en 9 géneros: *Meyerozyma* (1), *Rhodosporidiobolus* (1), *Wickerhamomyces* (1), *Hannaella* (3), *Sporobolomyces* (1), *Kwoniella* (8), *Debaryomyces hansenii* (1), *Candida* aff. *insectorum* (1) y *Moesziomyces* cf. *antarticus* (1).
- Se caracterizó morfológicamente todas las cepas de levaduras aisladas en donde se encontró diferencias a nivel macroscópica y microscópica en las 11 especies identificadas molecularmente.
- Se obtuvo una diversidad alfa baja de especies por parcela y por hospedero.
- La diversidad beta también fue baja, es decir, no existió mucha similitud de las especies entre parcela y hospedero, ya que su índice de similitud entre ellas es menor al 40%.
- Las parcelas con más abundancia de especies fueron las parcelas I y IV con especies cada una, los hospederos *Herrania nycterodendron*, con 6 especies y *Theobroma cacao*, con 6 especies.
- La equitatividad de las especies encontradas en general fue baja, lo cual se debe a la dominancia de alguna especie como *Meyerozyma guilliermondi*, sobre otras especies encontradas.

VI. RECOMENDACIONES

- Realizar un muestreo más representativo y equitativo del PNIMCC, con la finalidad de identificar mayor diversidad de especies de levaduras y estas sean evaluadas para el control biológico de patógenos.
- Realizar un muestreo no solo de hojas, si no también incluir frutos, flores, y demás tejidos de las especies vegetales muestreadas, para evaluar diferencias o potencialidades de las levaduras aisladas.
- De las levaduras identificadas en este estudio, realizar una investigación de antagonismo contra *Moniliophthora roreri* y otros fitopatógenos, para identificar las levaduras identificadas con potencial antagónico frente a este patógeno, causante de problemas fitosanitarios en especies de *Theobroma* y *Herrania*.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., & Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 25(17), 3389–3402. <https://doi.org/10.1093/nar/25.17.3389>
- Amy, B., Julie, F., Jacinta, S., Mary, Nk., & Pedro, C. (2007). Yeasts Isolated from Neotropical Wood-Boring Beetles in SE Peru on JSTOR. *BOITROPICA*, 39, 530–538. <https://www.jstor.org/stable/30043280>
- Bai, F.-Y., Zhao, J.-H., Takashima, M., Jia, J.-H., Boekhout, T., & Nakase, T. (2002). Reclassification of the *Sporobolomyces roseus* and *Sporidiobolus pararoseus* complexes, with the description of *Sporobolomyces phaffii* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52(6), 2309–2314. <https://doi.org/10.1099/00207713-52-6-2309>
- Belisle, M., Mendenhall, C. D., Oviedo Brenes, F., & Fukami, T. (2014). Temporal variation in fungal communities associated with tropical hummingbirds and nectarivorous bats. *Fungal Ecology*, 12(C), 44–51. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2014.02.007>
- Bertini, E. V. (2018). *Relevance of the quorum sensing mechanisms in the interactions between endophytic microorganisms*. UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUCUMÁN.
- Bhadra, B., Rao, R. S., Singh, P. K., Sarkar, P. K., & Shivaji, S. (2008). Yeasts and yeast-like fungi associated with tree bark: Diversity and identification of yeasts producing extracellular endoxylanases. *Current Microbiology*, 56(5), 489–494. <https://doi.org/10.1007/S00284-008-9108-X>
- Buck, J. W. (2002). In vitro antagonism of *Botrytis cinerea* by phylloplane yeasts. *Canadian Journal of Botany*, 80(8), 885–891. <https://doi.org/10.1139/B02-078>
- Bustamante, D. E., Motilal, L. A., Calderon, M. S., Mahabir, A., & Oliva, M. (2022). Genetic diversity and population structure of fine aroma cacao (*Theobroma cacao* L.) from north Peru revealed by single nucleotide polymorphism (SNP) markers. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 10(July), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fevo.2022.895056>

- Camacho, C., Coulouris, G., Avagyan, V., Ma, N., Papadopoulos, J., Bealer, K., & Madden, T. L. (2009). BLAST+: architecture and applications. *BMC Bioinformatics*, *10*. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-10-421>
- Cano, M. A. (2011). Interacción de microorganismos benéficos en plantas: Micorrizas, *Trichoderma* spp. y *Pseudomonas* spp. una revisión. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*, *14*(2), 15–31. <https://doi.org/10.31910/rudca.v14.n2.2011.771>
- Castellani, A. (1912). Nota sobre la importancia de los hifomicetos y otros hongos en la patología tropical. *The British Medical Journal*. <https://www.jstor.org/stable/25299182>
- De García, V., Brizzio, S., Libkind, D., Rosa, C. A., & Van Broock, M. (2010, July 1). *Wickerhamomyces patagonicus* sp. nov., an ascomycetous yeast species from Patagonia, Argentina. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*; Microbiology Society. <https://doi.org/10.1099/IJS.0.015974-0>
- de Lima Targino, H. M., Silva, V. S. L., Escobar, I. E. C., Ribeiro, P. R. de A., Gava, C. A. T., & Fernandes-Júnior, P. I. (2022). Maize-associated *Meyerozyma* from the Brazilian semiarid region are effective plant growth-promoting yeasts. *Rhizosphere*, *22*(May). <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2022.100538>
- Di Menna, M. E. (1959). Some physiological characters of yeasts from soils and allied habitats. *Journal of General Microbiology*, *20*(1), 13–23. <https://doi.org/10.1099/00221287-20-1-13>
- Díaz-Valderrama, J. R., Leiva-Espinoza, S. T., & Catherine Aime, M. (2020). The history of cacao and its diseases in the Americas. *Phytopathology*, *110*(10), 1604–1619. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-05-20-0178-RVW>
- Díaz-Valderrama, J. R., Zambrano, R., Cedeño-Amador, S., Córdova-Bermejo, U., Casas, G. G., García-Zurita, N., Sánchez-Arévalo, J. A. J., Arévalo-Gardini, E., Dávila, D., Ruiz, J., Pinchi-Dávila, X., Quispe-Chacón, Z. R., Chia-Wong, J. A., Hurtado-Gonzales, O. P., Rodríguez-Callañaupa, C. A., Maldonado-Fuentes, C., Pérez-Callizaya, E., Leiva-Espinoza, S., Oliva-Cruz, M., ... Aime, M. C. (2022). Diversity in the invasive cacao pathogen *Moniliophthora roreri* is shaped by agriculture. *Plant Pathology*, *June*, 1721–1734. <https://doi.org/10.1111/ppa.13603>

- Edgar, R. C. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*, 32(5), 1792. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKH340>
- Feoli, M., Gómez, Z., & Muñoz, A. (1997). Aislamiento y caracterización de microorganismos con actividad pectinolítica a partir de *Magifera indica*. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*, 26(1), 33–37. <https://revistas.unal.edu.co/index.php/rccquifa/article/view/56455>
- Francesca, N., Carvalho, C., Almeida, P. M., Sannino, C., Settanni, L., Sampaio, J. P., & Moschetti, G. (2013). *Wickerhamomyces sylviae* f.a., sp. nov., an ascomycetous yeast species isolated from migratory birds. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63(12), 4824–4830. <https://doi.org/10.1099/IJS.0.056382-0>
- Gouy, M., Guindon, S., & Gascuel, O. (2010). SeaView Version 4: A Multiplatform Graphical User Interface for Sequence Alignment and Phylogenetic Tree Building. *Molecular Biology and Evolution*, 27(2), 221–224. <https://doi.org/10.1093/MOLBEV/MSP259>
- Groenewald, M., Robert, V., & Smith, M. T. (2011a). The value of the D1/D2 and internal transcribed spacers (ITS) domains for the identification of yeast species belonging to the genus *Yamadazyma*. *Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 26, 40–46. <https://doi.org/10.3767/003158511X559610>
- Groenewald, M., Robert, V., & Smith, M. T. (2011b). Five novel *wickerhamomyces*- and *metschnikowia*-related yeast species, *wickerhamomyces chaumierensis* sp. nov., *candida pseudofloscolorum* sp. nov., *candida danieliae* sp. nov., *candida robnettieae* sp. nov. and *candida eppingiae* sp. nov., isolated from plants. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61(8), 2015–2022. <https://doi.org/10.1099/IJS.0.026062-0>
- Han, L., Li, Z. Y., Guo, X. F., Tan, J. L., He, S. Z., Cui, X. L., & Li, S. L. (2017). *Hannaella dianchiensis* sp. Nov., a basidiomycetous yeast species isolated from lake water. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 67(6), 2014–2018. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001908>
- Iannacone, J., Mansilla, J., & Ventura, K. (2016). Macroinvertebrados En Las Lagunas

- De Puerto Viejo, Lima – Perú. *Ecología Aplicada*, 2(1–2), 116.
<https://doi.org/10.21704/rea.v2i1-2.258>
- Wickerham, L. J., & Burton, K. A. (1954). A clarification of the relationship of *Candida guilliermondii* to other yeasts by a study of their mating types. *Journal of Bacteriology*, 68(5), 594–597. <https://doi.org/10.1128/JB.68.5.594-597.1954>
- Johnson, M., Zaretskaya, I., Raytselis, Y., Merezhuk, Y., McGinnis, S., & Madden, T. L. (2008). NCBI BLAST: a better web interface. *Nucleic Acids Research*, 36(suppl_2), W5–W9. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKN201>
- Junior, E. A. da S., Solís, K., Pimenta Neto, A. A., Vera, D. I., Garzón, I., Peñaherrera, S., Diorato, V. S., Gramacho, K. P., & Laranjeira, D. (2022). Effect of antagonistic yeasts from cacao tissues on controlling growth and sporulation of *Moniliophthora roreri*. *Biological Control*, 172, 104956. <https://doi.org/10.1016/J.BIOCONTROL.2022.104956>
- Kaewwichian, R., Jindamorakot, S., Am-In, S., Sipiczki, M., & Limtong, S. (2015). *Hannaella siamensis* sp. nov. and *Hannaella phetchabunensis* sp. nov., two new anamorphic basidiomycetous yeast species isolated from plants. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 65, 1297–1303. <https://doi.org/10.1099/IJS.0.000101>
- Knapp, D. G., Pintye, A., & Kovács, G. M. (2012). The Dark Side Is Not Fastidious – Dark Septate Endophytic Fungi of Native and Invasive Plants of Semiarid Sandy Areas. *PLOS ONE*, 7(2), e32570. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0032570>
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6), 1547. <https://doi.org/10.1093/MOLBEV/MSY096>
- Kurtzman, C. P., Mateo, R. Q., Kolecka, A., Theelen, B., Robert, V., & Boekhout, T. (2015). *Advances in yeast systematics and phylogeny and their use as predictors of biotechnologically important metabolic pathways*. FEMS Yeast Research. <https://doi.org/10.1093/femsyr/fov050>
- Kurtzman, C. P., & Robnett, C. J. (1998). Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial

- sequences. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 73(4), 331–371.
<https://doi.org/10.1023/A:1001761008817>
- Kurtzman, C. P., & Suzuki, M. (2010). Phylogenetic analysis of ascomycete yeasts that form coenzyme Q-9 and the proposal of the new genera *Babjeviella*, *Meyerozyma*, *Millerozyma*, *Priceomyces*, and *Scheffersomyces*. *Mycoscience*, 51(1), 2–14.
<https://doi.org/10.1007/S10267-009-0011-5>
- Landell, M. F., Brandão, L. R., Barbosa, A. C., Ramos, J. P., Safar, S. V. B., Gomes, F. C. O., Sousa, F. M. P., Morais, P. B., Broetto, L., Leoncini, O., Ribeiro, J. R., Fungsin, B., Takashima, M., Nakase, T., Lee, C. F., Vainstein, M. H., Fell, J. W., Scorzetti, G., Vishniac, H. S., ... Valente, P. (2014). *Hannaella pagnoccae* sp. nov., a tremellaceous yeast species isolated from plants and soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64(PART 6), 1970–1977.
<https://doi.org/10.1099/ijms.0.059345-0>
- Libkind, D., Brizzio, S., Ruffini, A., Gadanho, M., van Broock, M., & Sampaio, J. P. (2003). Molecular characterization of carotenogenic yeasts from aquatic environments in Patagonia, Argentina. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 84(4), 313–322.
<https://doi.org/10.1023/A:1026058116545/METRICS>
- Limtong, S., Yongmanitchai, W., Kawasaki, H., & Fujiyama, K. (2009). *Wickerhamomyces edaphicus* sp. nov. and *Pichia jaronii* sp. nov., two ascomycetous yeast species isolated from forest soil in Thailand. *FEMS Yeast Research*, 9(3), 504–510. <https://doi.org/10.1111/J.1567-1364.2009.00488.X>
- Liu, Y., Zou, Z., Hu, Z., Wang, W., & Xiong, J. (2019). Morphology and molecular analysis of *Moesziomyces antarcticus* isolated from the blood samples of a Chinese patient. *Frontiers in Microbiology*, 10(FEB), 432626.
<https://doi.org/10.3389/FMICB.2019.00254>
- Lopes, M. R., Ferreira, M. C., Carvalho, T. F. C., Pagnocca, F. C., Chagas, R. A., Morais, P. B., Rosa, L. H., Lachance, M. A., & Rosa, C. A. (2015). *Yamadazyma riverae* sp. Nov., a yeast species isolated from plant materials. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 65(12), 4469–4473.

<https://doi.org/10.1099/IJSEM.0.000597>

- Magurran, A. E. (1998). *Ecological Diversity and Its Measurement_LIVRO*.
- Manter, D. K., & Vivanco, J. M. (2007). Use of the ITS primers, ITS1F and ITS4, to characterize fungal abundance and diversity in mixed-template samples by qPCR and length heterogeneity analysis. *Journal of Microbiological Methods*, 71(1), 7–14. <https://doi.org/10.1016/J.MIMET.2007.06.016>
- Masiulionis, V. E., & Pagnocca, F. C. (2017). *Rhodospordiobolus geoffroae* sp. Nov., a basidiomycetous yeast isolated from the waste deposit of the attine ant *Acromyrmex lundii*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 67(4), 1028–1032. <https://doi.org/10.1099/IJSEM.0.001738>
- Miller, M. A., Pfeiffer, W., & Schwartz, T. (2011). *The CIPRES science gateway: A community resource for phylogenetic analyses*. Proceedings of the TeraGrid 2011 Conference: Extreme Digital Discovery, TG'11. <https://doi.org/10.1145/2016741.2016785>
- Moreno, C., Zuria, I., García-Zenteno, M., Sánchez-Rojas, G., Castellanos, I., Martínez-Morales, M., & Rojas-Martínez, A. (2006). Trends in the measurement of alpha diversity in the last two decades. *Interciencia*, 31(1), 67–71. http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-18442006000100013&lng=es&nrm=iso&tlng=en
- Nagatsuka, Y., Kiyuna, T., Kigawa, R., Sano, C., Miura, S., & Sugiyama, J. (2009). *Candida tumulicola* sp. nov. and *Candida takamatsuzukensis* sp. nov., novel yeast species assignable to the *Candida membranifaciens* clade, isolated from the stone chamber of the *Takamatsuzuka tumulus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59(1), 186–194. <https://doi.org/10.1099/IJS.0.65830-0>
- Neto, A. A. P., Santos, T. R., Duarte, E. A. A., de Oliveira, T. A. S., de Andrade Silva, E. M., Uetanabaro, A. P. T., da Costa, A. M., Luz, E. D. M. N., & Laranjeira, D. (2021). Yeasts associated with aerial parts of *Theobroma cacao* L. in southern Bahia, Brazil, as prospective biocontrol agents against *Moniliophthora perniciosa*. *Tropical Plant Pathology*, 46(1), 109–128. <https://doi.org/10.1007/S40858-020-00418-W>
- Ninomiya, S., Mikata, K., Kajimura, H., & Kawasaki, H. (2013). Two novel ascomycetous yeast species, *Wickerhamomyces scolytoplatypi* sp. nov. and

- Cyberlindnera xylebori sp. nov., isolated from ambrosia beetle galleries. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63(PART7), 2706–2711. <https://doi.org/10.1099/IJS.0.050195-0>
- Pérez-Trallero, E. (2003). El futuro es la (micro)biología molecular. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 21(Supl.2), 61–63. <https://doi.org/10.1157/13059087>
- Phaff, H. J., Vaughan-Martini, A., & Starmer, W. T. (1998). *Debaryomyces prosopidis* sp. nov., a yeast from exudates of mesquite trees. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 48(4), 1419–1424. <https://doi.org/10.1099/00207713-48-4-1419>
- Phillips-Mora, W., & Wilkinson, M. J. (2007). Frosty pod of cacao: A disease with a limited geographic range but unlimited potential for damage. *Phytopathology*, 97(12), 1644–1647. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-97-12-1644>
- Ponzoni, C., Gasparetti, C., Goretti, M., Turchetti, B., Pagnoni, U. M., Cramarossa, M. R., Forti, L., & Buzzini, P. (2008). Biotransformation of Acyclic *Monoterpenoids* by *Debaryomyces* sp., *Kluyveromyces* sp., and *Pichia* sp. Strains of Environmental Origin. *Chemistry & Biodiversity*, 5(3), 471–483. <https://doi.org/10.1002/CBDV.200890046>
- Promega. (2019). *Wizard® Genomic DNA Purification Kit*.
- Quijada, A., Méndez-Cárdenas, G., Hernández-Baños, B., & Álvarez-Buylla, E. (1997). La región de los ITS del ADN ribosomal del núcleo (nrADN), fuente de caracteres moleculares en la sistemática de las gimnospermas. *Botanical Sciences*, 60(60), 159–168. <https://doi.org/10.17129/BOTSCI.1527>
- Rambaut A. (2006). *FigTree*. Institute of Evolutionary Biology, Univ. of Edinburgh. FigTree. <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>
- Richardson, J. E., Whitlock, B. A., Meerow, A. W., & Madriñán, S. (2015). The age of chocolate: A diversification history of *Theobroma* and *Malvaceae*. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 3(NOV), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fevo.2015.00120>
- Ríos-ruiz, R. A. (2017). *Fitosanización como Estrategia Principal de Manejo Integrado de Enfermedades en Cacao en el Perú: Tres Décadas y Media de Estudios de Epidemiología y Eficiencia de Control*. November, 13–17.

- Romi, W., Keisam, S., Ahmed, G., & Jeyaram, K. (2014). Reliable differentiation of *Meyerozyma guilliermondii* from *Meyerozyma caribbica* by internal transcribed spacer restriction fingerprinting. *BMC Microbiology*, 14(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2180-14-52>
- Rosales-López, C., Valerín-Berrocal, K., & Jiménez-Bonilla, V. (2018). Crecimiento dimórfico y caracterización molecular de *Candida guilliermondi* aislado de *Panicum maximum*. 31. <https://doi.org/10.18845/tm.v31i1.3502>
- Satoh, K., & Makimura, K. (2008). *Sporobolomyces koalae* sp. nov., a basidiomycetous yeast isolated from nasal smears of Queensland koalas kept in a Japanese zoological park. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58(12), 2983–2986. <https://doi.org/10.1099/IJS.0.2008/000307-0>
- Schoch, C. L., Seifert, K. A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J. L., Levesque, C. A., & Chen. (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. <https://doi.org/10.1073/pnas.1117018109>
- Seo, H. S., Um, H. J., Min, J., Rhee, S. K., Cho, T. J., Kim, Y. H., & Lee, J. (2007). *Pseudozyma jejuensis* sp. nov., a novel cutinolytic ustilaginomycetous yeast species that is able to degrade plastic waste. *FEMS Yeast Research*, 7(6), 1035–1045. <https://doi.org/10.1111/J.1567-1364.2007.00251.X>
- SERNANP. (2019). *Parque Nacional Ichigkat Muja - Cordillera del Condor - Informes y publicaciones - Servicio Nacional de Áreas Naturales Protegidas por el Estado - Plataforma del Estado Peruano*. <https://www.gob.pe/institucion/sernanp/informes-publicaciones/1949358-parque-nacional-ichigkat-muja-cordillera-del-condor>
- Stamatakis, A. (2014). RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics*, 30(9), 1312. <https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTU033>
- Statzell-Tallman, A., Belloch, C., & Fell, J. W. (2008). *Kwoniella mangroviensis* gen. nov., sp. nov. (Tremellales, Basidiomycota), a teleomorphic yeast from mangrove habitats in the Florida Everglades and Bahamas. *FEMS Yeast Research*, 8(1), 103–113. <https://doi.org/10.1111/J.1567-1364.2007.00314.X>
- Statzell-Tallman, A., & Fell, J. W. (2011). Diagnosis of the genus. *The Yeasts*, 3, 1481–

1484. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52149-1.00119-1>

- Sun, S., Metin, B., Findley, K., Fonseca, A., & Heitman, J. (2011). *Validation of Kwoniella heveanensis, teleomorph of the basidiomycetous yeast Cryptococcus heveanensis*. *116*, 227–229. <https://doi.org/10.5248/116.227>
- Surussawadee, J., Jindamorakot, S., Nakase, T., Lee, C. F., & Limtong, S. (2015). *Hannaella phyllophila* sp. nov., a basidiomycetous yeast species associated with plants in Thailand and Taiwan. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *65*(7), 2135–2140. <https://doi.org/10.1099/IJS.0.000231>
- Thomas, E., van Zonneveld, M., Loo, J., Hodgkin, T., Galluzzi, G., & van Etten, J. (2012). Present Spatial Diversity Patterns of *Theobroma cacao* L. in the Neotropics Reflect Genetic Differentiation in Pleistocene Refugia Followed by Human-Influenced Dispersal. *PLOS ONE*, *7*(10), e47676. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0047676>
- Uribe, L. A. (2007). *Caracterización fisiológica de levaduras aisladas de la filósfera de mora* [Pontificia Universidad Javeriana]. <http://hdl.handle.net/10554/8298>
- Vánky, K. (1986). The genus *Moesziomyces* (Ustilaginales). *Nordic Journal of Botany*, *6*(1), 67–73. <https://doi.org/10.1111/j.1756-1051.1986.tb00860.x>
- Wickerham, L. J. (1966). Validation of the Species *Pichia guilliermondii*. *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*.

ANEXOS

Anexo 1. Data base de los aislados

CLASE	GÉNERO	ESPECIE	AISLADO	PARCELA	COORDENADAS (UTM)		ALTITUD	ACCESIÓN	
								ITS	LSU
Ascomycota	<i>Meyerozyma</i>	<i>M. guilliermondii</i>	EGZ-01	PAR-I	184325	9665707	226	-	-
Ascomycota	<i>Meyerozyma</i>	<i>M. guilliermondii</i>	EGZ-02	PAR-I	184325	9665707	226	-	-
Ascomycota	<i>Meyerozyma</i>	<i>M. guilliermondii</i>	EGZ-04	PAR-I	184325	9665707	226	-	-
Ascomycota	<i>Meyerozyma</i>	<i>M. guilliermondii</i>	EGZ-08	PAR-I	184325	9665707	226	-	-
Ascomycota	<i>Meyerozyma</i>	<i>M. guilliermondii</i>	EGZ-10	PAR-I	184325	9665707	226	-	-
Ascomycota	<i>Meyerozyma</i>	<i>M. guilliermondii</i>	EGZ-11	PAR-I	184325	9665707	226	-	-
Ascomycota	<i>Meyerozyma</i>	<i>M. guilliermondii</i>	EGZ-12	PAR-I	184325	9665707	226	-	-
Ascomycota	<i>Meyerozyma</i>	<i>M. guilliermondii</i>	EGZ-14	PAR-I	184325	9665707	226	-	-
Ascomycota	<i>Meyerozyma</i>	<i>M. guilliermondii</i>	EGZ-15	PAR-I	184325	9665707	226	-	-
Ascomycota	<i>Meyerozyma</i>	<i>M. guilliermondii</i>	EGZ-16	PAR-I	184325	9665707	226	-	-
Ascomycota	<i>Meyerozyma</i>	<i>M. guilliermondii</i>	EGZ-19	PAR-II	184355	9665935	360	-	-

CLASE	GÉNERO	ESPECIE	AISLADO	PARCELA	COORDENADAS (UTM)		ALTITUD	ACCESIÓN	
								ITS	LSU
Ascomycota	<i>Meyerozyma</i>	<i>M. guilliermondii</i>	EGZ-22	PAR-II	184355	9665935	360	-	-
Ascomycota	<i>Meyerozyma</i>	<i>M. guilliermondii</i>	EGZ-23	PAR-II	184355	9665935	360	-	-
Ascomycota	<i>Meyerozyma</i>	<i>M. guilliermondii</i>	EGZ-24	PAR-II	184355	9665935	360	-	-
Ascomycota	<i>Meyerozyma</i>	<i>M. guilliermondii</i>	EGZ-25	PAR-II	184355	9665935	360	-	-
Ascomycota	<i>Meyerozyma</i>	<i>M. guilliermondii</i>	EGZ-26	PAR-III	184396	9666246	242	-	-
Ascomycota	<i>Meyerozyma</i>	<i>M. guilliermondii</i>	EGZ-27	PAR-III	184396	9666246	242	-	-
Ascomycota	<i>Meyerozyma</i>	<i>M. guilliermondii</i>	EGZ-28	PAR-III	184396	9666246	242	-	-
Ascomycota	<i>Meyerozyma</i>	<i>M. guilliermondii</i>	EGZ-29	PAR-III	184396	9666246	242	-	-
Ascomycota	<i>Meyerozyma</i>	<i>M. guilliermondii</i>	EGZ-30	PAR-III	184396	9666246	242	-	-
Ascomycota	<i>Meyerozyma</i>	<i>M. guilliermondii</i>	EGZ-33	PAR-III	184396	9666246	242	-	-
Ascomycota	<i>Meyerozyma</i>	<i>M. guilliermondii</i>	EGZ-34	PAR-III	184396	9666246	242	-	-
Ascomycota	<i>Meyerozyma</i>	<i>M. guilliermondii</i>	EGZ-35	PAR-III	184396	9666246	242	-	-

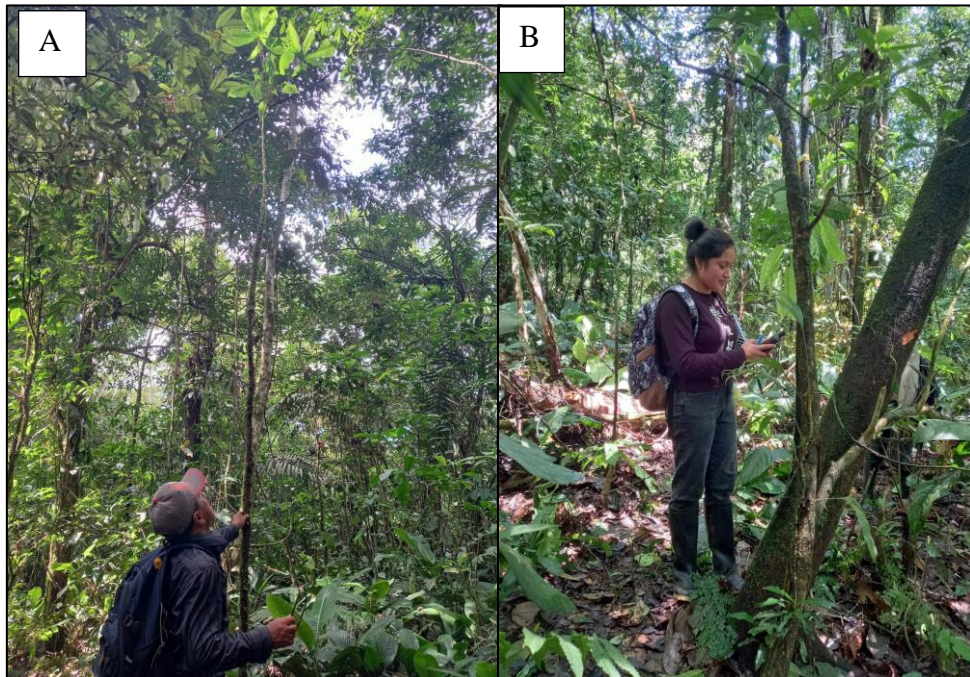
CLASE	GÉNERO	ESPECIE	AISLADO	PARCELA	COORDENADAS (UTM)		ALTITUD	ACCESIÓN	
								ITS	LSU
Ascomycota	<i>Meyerozyma</i>	<i>M. guilliermondii</i>	EGZ-36	PAR-III	184396	9666246	242	-	-
Ascomycota	<i>Meyerozyma</i>	<i>M. guilliermondii</i>	EGZ-37	PAR-III	184396	9666246	242	-	-
Ascomycota	<i>Meyerozyma</i>	<i>M. guilliermondii</i>	EGZ-40	PAR-IV	184236	9666567	281	-	-
Ascomycota	<i>Meyerozyma</i>	<i>M. guilliermondii</i>	EGZ-41	PAR-IV	184236	9666567	281	-	-
Ascomycota	<i>Meyerozyma</i>	<i>M. guilliermondii</i>	EGZ-42	PAR-IV	184236	9666567	281	-	-
Ascomycota	<i>Meyerozyma</i>	<i>M. guilliermondii</i>	EGZ-43	PAR-IV	184236	9666567	281	-	-
Ascomycota	<i>Meyerozyma</i>	<i>M. guilliermondii</i>	EGZ-44	PAR-IV	184236	9666567	281	-	-
Ascomycota	<i>Meyerozyma</i>	<i>M. guilliermondii</i>	EGZ-45	PAR-IV	184236	9666567	281	-	-
Ascomycota	<i>Meyerozyma</i>	<i>M. guilliermondii</i>	EGZ-46	PAR-IV	184236	9666567	281	-	-
Ascomycota	<i>Meyerozyma</i>	<i>M. guilliermondii</i>	EGZ-47	PAR-IV	184236	9666567	281	-	-
Ascomycota	<i>Meyerozyma</i>	<i>M. guilliermondii</i>	EGZ-50	PAR-V	184018	9666592	287	-	-
Ascomycota	<i>Meyerozyma</i>	<i>M. guilliermondii</i>	EGZ-52	PAR-V	184018	9666592	287	-	-

CLASE	GÉNERO	ESPECIE	AISLADO	PARCELA	COORDENADAS (UTM)		ALTITUD	ACCESIÓN	
								ITS	LSU
Ascomycota	<i>Meyerozyma</i>	<i>M. guilliermondii</i>	EGZ-53	PAR-V	184018	9666592	287	-	-
Ascomycota	<i>Meyerozyma</i>	<i>M. guilliermondii</i>	EGZ-54	PAR-V	184018	9666592	287	-	-
Ascomycota	<i>Meyerozyma</i>	<i>M. guilliermondii</i>	EGZ-55	PAR-V	184018	9666592	287	-	-
Ascomycota	<i>Meyerozyma</i>	<i>M. guilliermondii</i>	EGZ-56	PAR-V	184018	9666592	287	-	-
Ascomycota	<i>Meyerozyma</i>	<i>M. guilliermondii</i>	EGZ-57	PAR-V	184018	9666592	287	-	-
Ascomycota	<i>Meyerozyma</i>	<i>M. guilliermondii</i>	EGZ-58	PAR-V	184018	9666592	287	-	-
Ascomycota	<i>Meyerozyma</i>	<i>M. guilliermondii</i>	EGZ-59	PAR-V	184018	9666592	287	-	-
Ascomycota	<i>Meyerozyma</i>	<i>M. guilliermondii</i>	EGZ-60	PAR-V	184018	9666592	287	-	-
Ascomycota	<i>Meyerozyma</i>	<i>M. guilliermondii</i>	EGZ-61	PAR-V	184018	9666592	287	-	-
Ascomycota	<i>Meyerozyma</i>	<i>M. guilliermondii</i>	EGZ-62	PAR-V	184018	9666592	287	-	-
Ascomycota	<i>Meyerozyma</i>	<i>M. guilliermondii</i>	EGZ-63	PAR-V	184018	9666592	287	-	-
Ascomycota	<i>Candida</i>	<i>C. aff. insectorum</i>	EGZ-03	PAR-I	184325	9665707	226	-	-

CLASE	GÉNERO	ESPECIE	AISLADO	PARCELA	COORDENADAS (UTM)		ALTITUD	ACCESIÓN	
								ITS	LSU
Ascomycota	<i>Debaryomyces</i>	<i>D. hansenii</i>	EGZ-31	PAR-III	184396	9666246	242	-	-
Ascomycota	<i>Wickerhamomyces</i>	<i>W. edaphicus</i>	EGZ-38	PAR-IV	184236	9666567	281	-	-
Basidiomycota	<i>Hannaella</i>	<i>H. phetchabunensis</i>	EGZ-06	PAR-I	184325	9665707	226	-	-
Basidiomycota	<i>Hannaella</i>	<i>H. taiwanensis</i>	EGZ-48	PAR-IV	184236	9666567	281	-	-
Basidiomycota	<i>Hannaella</i>	<i>H. sp.</i>	EGZ-51	PAR-V	184018	9666592	287	-	-
Basidiomycota	<i>Kwoniella</i>	<i>K. heveanensis</i>	EGZ-07	PAR-I	184325	9665707	226	-	-
Basidiomycota	<i>Kwoniella</i>	<i>K. heveanensis</i>	EGZ-64	PAR-V	184018	9666592	287	-	-
Basidiomycota	<i>Rhodosporidiobolus</i>	<i>R. ruineniae</i>	EGZ-09	PAR-I	184325	9665707	226	-	-
Basidiomycota	<i>Rhodosporidiobolus</i>	<i>R. ruineniae</i>	EGZ-13	PAR-I	184325	9665707	226	-	-
Basidiomycota	<i>Rhodosporidiobolus</i>	<i>R. ruineniae</i>	EGZ-21	PAR-II	184355	9665935	360	-	-
Basidiomycota	<i>Rhodosporidiobolus</i>	<i>R. ruineniae</i>	EGZ-39	PAR-IV	184236	9666567	281	-	-
Basidiomycota	<i>Moesziomyces</i>	<i>M. cf. antarcticus</i>	EGZ-20	PAR-II	184355	9665935	360	-	-

CLASE	GÉNERO	ESPECIE	AISLADO	PARCELA	COORDENADAS (UTM)		ALTITUD	ACCESIÓN	
								ITS	LSU
Basidiomycota	<i>Sporobolomyces</i>	<i>S. japonicus</i>	EGZ-49	PAR-IV	184236	9666567	281	-	-

Anexo 2. A. Identificación de los hospederos. B. Referenciación de las parcelas



Anexo 3. Recolección de las muestras de hojas para el aislamiento de levaduras



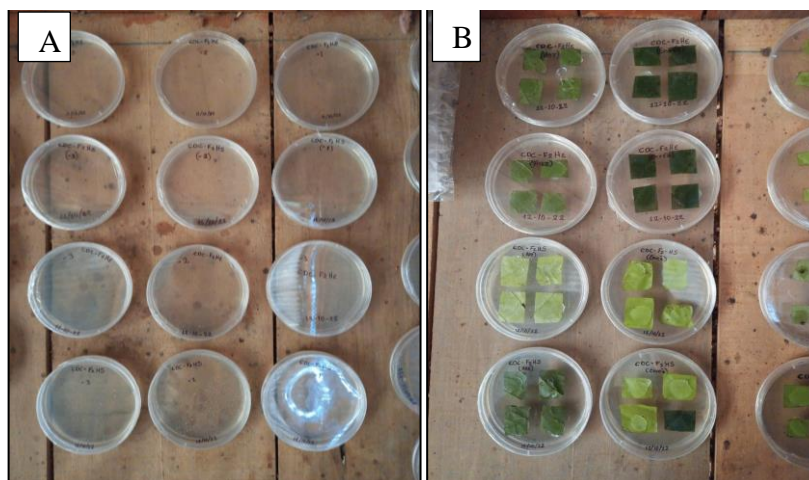
Anexo 4. Cortes de 1.5 x 1.5 cm a las hojas para el proceso de aislamiento



Anexo 5. Aislamiento por diluciones seriadas



Anexo 6. Aislamiento de levaduras en medio PDA. A. Método de diluciones seriadas.
B. Método de pegado.



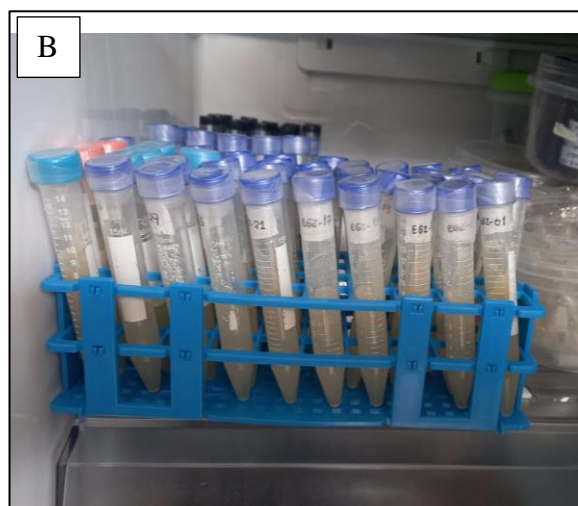
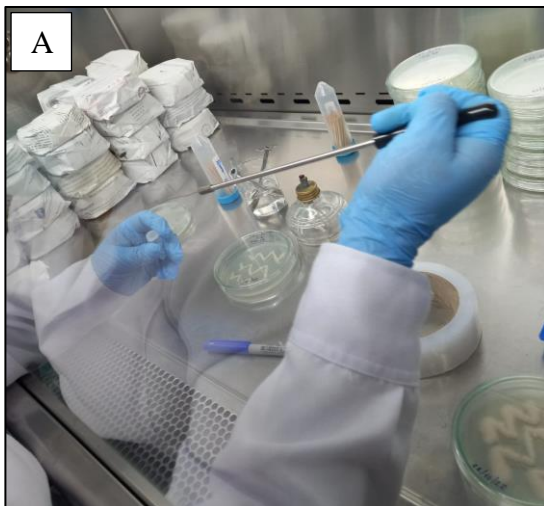
Anexo 7. Reaislamiento de levaduras hasta que estas estén en cultivo puro



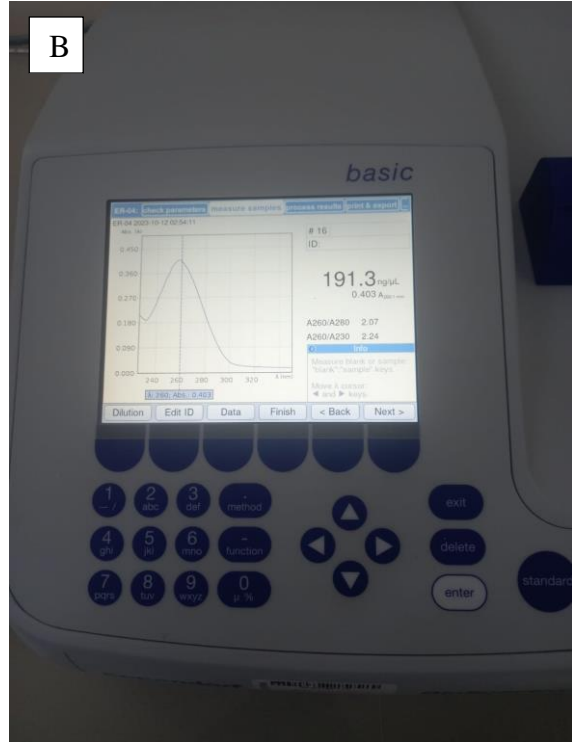
Anexo 8. Levaduras en cultivo puro



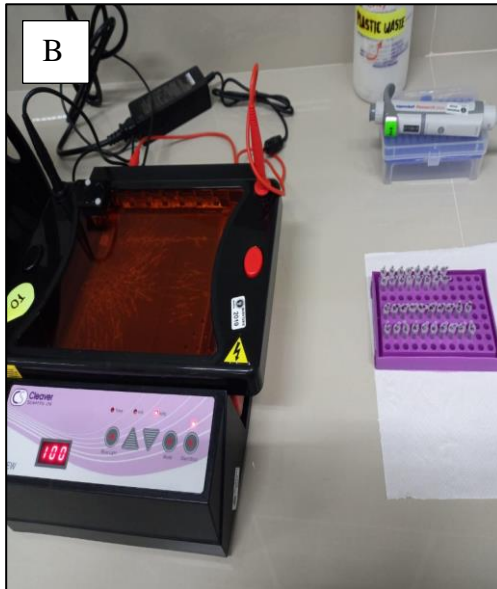
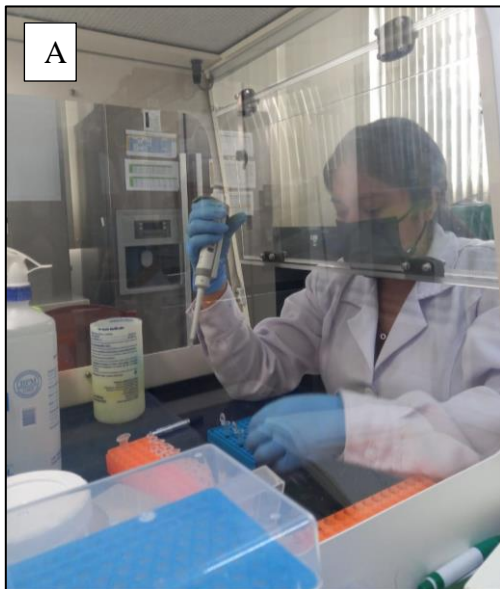
Anexo 9. Conservación de cepas de levaduras a corto y largo plazo.



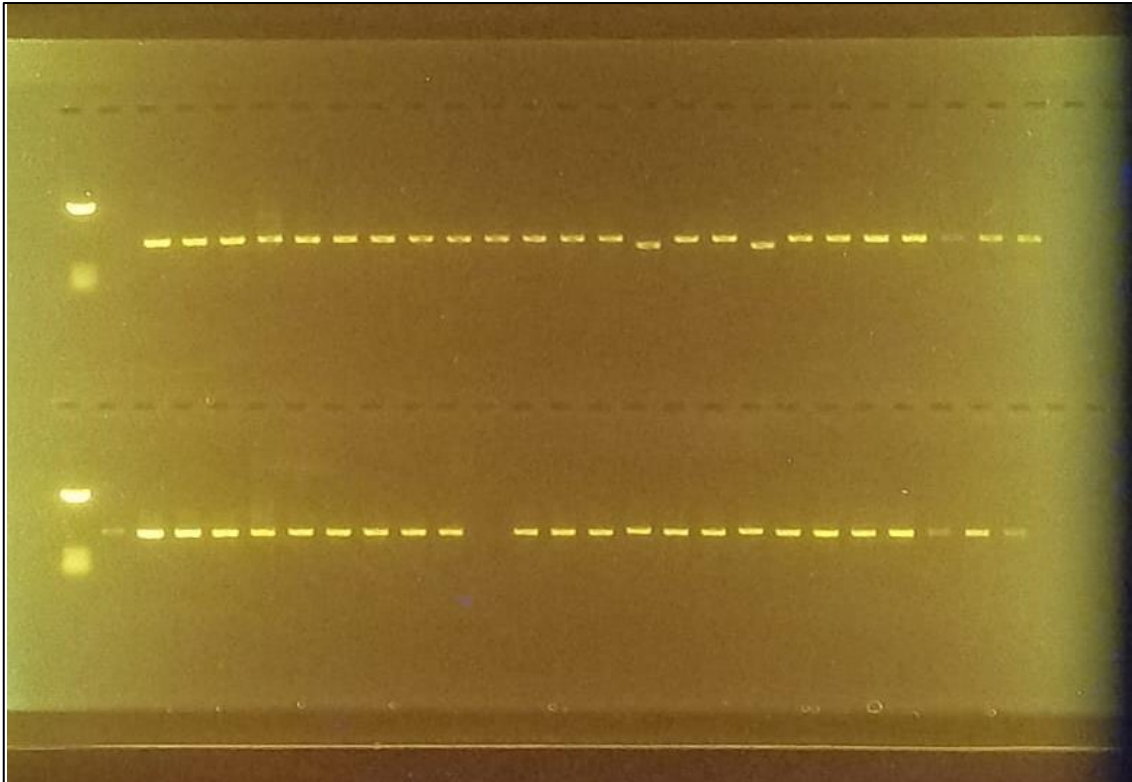
Anexo 10. Actividades de laboratorio. A. Extracción de ADN. B. Cuantificación de ADN



Anexo 11. A. Proceso de PCR. B. Técnica de electroforesis



Anexo 12. Amplificación de muestras, visualización de productos de PCR en gel de agarosa al 1%.



Anexo 13. búsqueda en la base de datos de secuencias de ADN de NCBI

The screenshot displays the NCBI BLAST search results for the query 'EGZ-01_JTS'. The search parameters are as follows:

- Job Title: EGZ-01_JTS
- RID: KS4Z03EX016
- Program: BLASTN
- Database: nt
- Query ID: lc|Query_115499
- Description: EGZ-01_JTS
- Molecule type: dna
- Query Length: 616

The 'Filter Results' section includes options for Organism, Percent Identity, E value, and Query Coverage. The 'Sequences producing significant alignments' table is shown below:

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Meverozyma quilliermondii culture CBS:12037 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal trans...	Meverozyma quill...	1138	1138	100%	0.0	100.00%	904	KY104257.1
Meverozyma quilliermondii culture CBS:12072 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal trans...	Meverozyma quill...	1138	1138	100%	0.0	100.00%	750	KY104240.1
Meverozyma quilliermondii strain AFMSU5 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spac...	Meverozyma quill...	1138	1138	100%	0.0	100.00%	1713	KT282394.1
Meverozyma quilliermondii isolate LMICRO181 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed s...	Meverozyma quill...	1138	1138	100%	0.0	100.00%	928	KJ451705.1

Anexo 14. Alineamiento de secuencias

The screenshot displays the M11: Alignment Explorer interface. The main window shows a multiple sequence alignment of 31 ITS regions, labeled from 1 to 31. The sequences are aligned in a grid format, with each row representing a different ITS region and each column representing a specific nucleotide position. The sequences are color-coded by base: Adenine (A) in green, Guanine (G) in red, Cytosine (C) in blue, and Thymine (T) in yellow. The alignment shows high conservation across the regions, with some gaps indicated by dashes. The interface includes a menu bar (Data, Edit, Search, Alignment, Web, Sequencer, Display, Help) and a toolbar with various icons for file operations and alignment management. The bottom status bar shows the site number (41), alignment options (with/without gaps), and the selected genetic code (Standard).

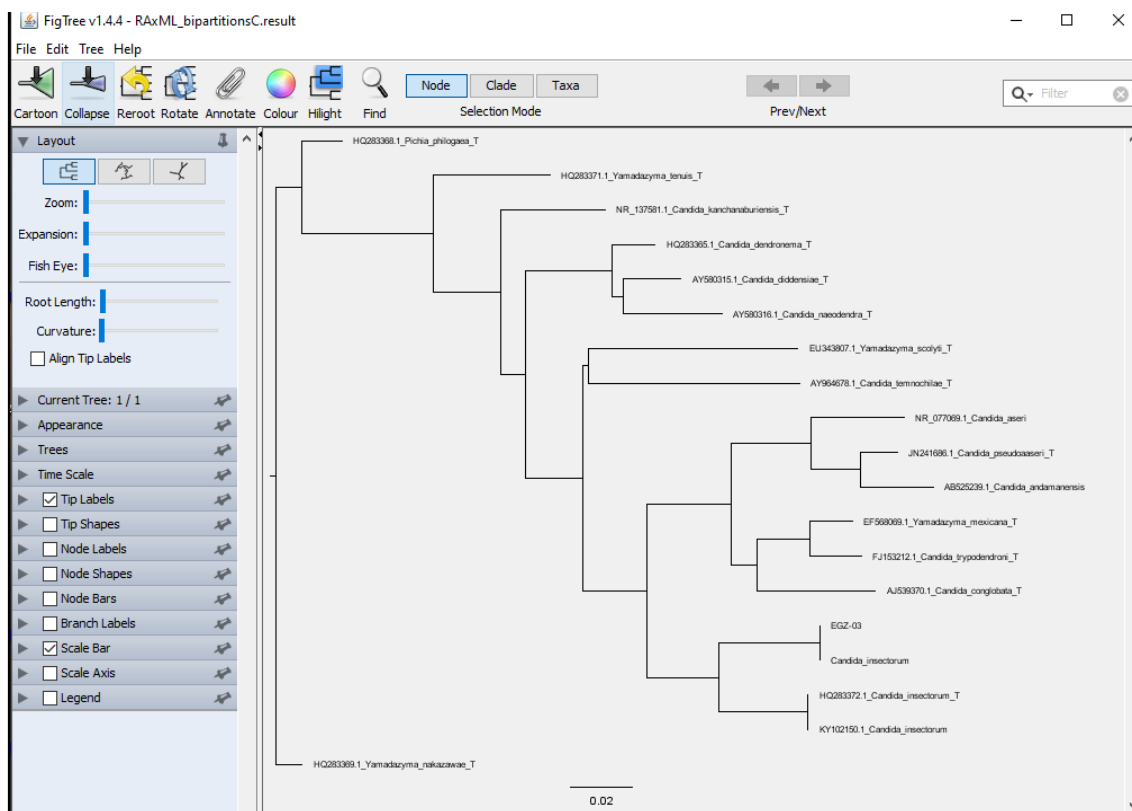
Anexo 15. Análisis filogenético en el portal CIPRES

The screenshot shows the CIPRES portal interface. The main content area displays a list of data items under the heading "All Data". The list includes columns for "User Data ID", "Label", "Size", "Data Format", "Date Created", and "Parse Status". The data items are listed as follows:

User Data ID	Label	Size	Data Format	Date Created	Parse Status
3321616	Alignment_C_3_FAS	20.19 KB	FASTA	10/15/23, 12:46	Succeeded
3321615	Alignment_LSU_3.fas	9.82 KB	FASTA	10/15/23, 12:46	Succeeded
3321614	Alignment_LITSsinvacio_8.fas	10.11 KB	FASTA	10/15/23, 12:46	Succeeded
3321597	Alignment_C_2_FAS	8.56 KB	FASTA	10/15/23, 11:13	Succeeded
3320652	AlignmentC_17.FAS	10.46 KB	FASTA	10/12/23, 15:57	Succeeded
3320648	AlignmentC_16.FAS	10.00 KB	FASTA	10/12/23, 15:32	Succeeded
3320644	AlignmentLSU_12.fas	4.78 KB	FASTA	10/12/23, 15:18	Succeeded
3320643	AlignmentITS_11.fas	5.34 KB	FASTA	10/12/23, 15:17	Succeeded
3319366	AlignmentI_SU-FGZ20.fas	4.18 KB	FASTA	10/10/23, 14:16	Succeeded

The interface also shows a "Folders" section on the left with "Total Storage: 2.06 GB" and a list of folders: "ESPECIES_LEVADURAS", "Data (191)", "Tasks (191)", and "Curso Biotecnología". The "All Data" section includes an "Upload Data" button, a "Page 1 of 10" indicator, and a "Refresh to show data imported from Globus" button.

Anexo 16. Visualización de los árboles filogenéticos en el software FigTree



Anexo 17. Caracterización morfológica. A. Caracterización macroscópica. B. Caracterización microscópica



Anexo 18. Montajes de muestras de levaduras



Anexo 19. Cálculo de los índices de diversidad en el programa R

```
RStudio
File Edit Code View Plots Session Build Debug Profile Tools Help
- - - - - Go to file/function - - - - - Addins - Project: (None)
EGZ_Parcels
20 diversidad <- diversity(EGZ_Parcels)
21 diversidad
22
23 #Índice de Shannon
24 shannon <- diversity(EGZ_Parcels, index = "shannon")
25 shannon
26 #Índice de Simpson
27 simpson <- diversity(EGZ_Parcels, index = "simpson")
28 simpson
29
30 #Equitatividad
31 Equitatividad <- shannon/log(Riqueza)
32 Equitatividad
33
34 #Dominancia
35
36
37
38:1 (Top Level) R Script
Console Terminal Background Jobs
R 4.3.1 - ~/11PROYECTO Eryka/Data-Diversidad/
wicker@hainomyces.euapitillus
PAR-I 0
PAR-II 0
PAR-III 0
PAR-IV Inf
PAR-V 0
Total Inf
> View(Ep)
> Equitatividad
PAR-I PAR-II PAR-III PAR-IV PAR-V Total
0.6713983 0.7248341 0.4394970 0.6826062 0.4415517 0.4351851
> View(Ep)
> View(EGZ_Parcels)
> |
```

Environment	History	Connections	Tutorial
R - Global Environment			
Data			
EGZ_Parcels		6 obs. of 11 variables	
Ep		6 obs. of 11 variables	
Values			
diversidad	Named num [1:6]	1.081 0.796 0.305 1.099 0.485 ...	
Equitatividad	Named num [1:6]	0.671 0.725 0.439 0.683 0.442 ...	
Riqueza	Named int [1:6]	3 3 2 5 3 11	
shannon	Named num [1:6]	1.081 0.796 0.305 1.099 0.485 ...	
simpson	Named num [1:6]	0.524 0.449 0.165 0.528 0.24 ...	

Files Plots Packages Help Viewer Presentation

Zoom Export

20°C ESP 12:06 31/10/2023