

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Instituto de Biotecnología

RC-07-098
REV.00-03/09



**Diversidad de levaduras cultivables asociadas a ecosistemas
de la Sierra Madre Oriental en Nuevo León**

Tesis

POR

Biólogo Saúl Andrés Martínez Morales

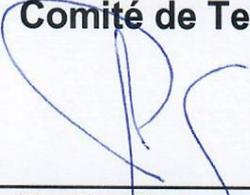
**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN
MICROBIOLOGÍA**

2024



**DIVERSIDAD DE LEVADURAS CULTIVABLES ASOCIADAS A
ECOSISTEMAS DE LA SIERRA MADRE ORIENTAL EN NUEVO LEÓN**

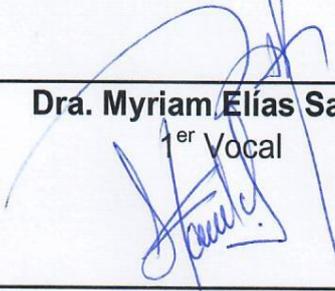
Comité de Tesis



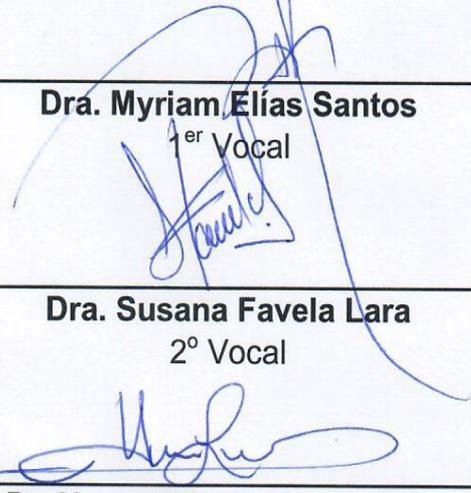
Dr. Benito Pereyra Alférez
Presidente



Dr. Jorge Hugo García García
Secretario



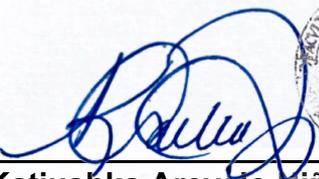
Dra. Myriam Elías Santos
1^{er} Vocal



Dra. Susana Favela Lara
2^o Vocal



Dr. Hugo Alberto Luna Olvera
3^{er} Vocal



Dra. Katiushka Arevalo 
Subdirectora de Posgrado
DIRECCIÓN
DE POSGRADO



**Diversidad de levaduras cultivables asociadas a ecosistemas
de la Sierra Madre Oriental en Nuevo León**

Director de Tesis

A handwritten signature in blue ink, consisting of a large, stylized 'B' and 'A' intertwined.

Dr. Benito Pereyra Alferez

DERECHOS RESERVADOS© PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta Tesis está protegido, el uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material contenido que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde se obtuvo mencionando al autor o autores.

AGRADECIMIENTOS

A mi familia que me brindo su apoyo incondicional y sin la cual no seria la persona que soy ahora.

Al Dr. Benito Pereyra Alferez y a la Dra. Susana Favela Lara quienes me han guiado a lo largo de mi desarrollo academico, por su paciencia y conocimientos que me han sido de gran apoyo en mi formacion profesional y humana.

A los amigos y colegas del L4 quienes siempre estuvieron dispuestos a apoyarme y con quienes comparto mi pasion por la ciencia.

ÍNDICE DE CONTENIDO

Sección	Página
Agradecimientos	I
Índice de Contenido	II
Índice de Tablas	IV
Índice de Figuras	V
Listado de Símbolos y Abreviaturas	VI
Resumen	VII
Abstract	VIII
1. Introducción	1
2. Antecedentes	3
3. Justificación	8
4. Hipótesis	9
5. Objetivo General	9
6. Objetivos Particulares	9
7. Materiales y Métodos	10
7.1. Áreas de estudio	10
7.2. Aislamiento de levaduras	12
7.3. Extracción de ADN	12
7.4. Amplificación del dominio D1/D2 del ADNr 28S (LSU)	12

7.5. Identificación molecular de los aislados	13
7.6. Construcción del cladograma	13
8. Resultados	14
8.1. Características de las áreas de estudio y muestras	14
8.2. Aislamiento e identificación de levaduras	17
8.3. Diversidad y distribución de las cepas aisladas	19
8.4. Análisis estadístico mediante el Índice de Jaccard	22
8.5. Construcción del cladograma	23
9. Discusión	26
9.1. Análisis de las secuencias	26
9.2. Método de aislamiento, enfoque y su impacto en la diversidad	28
9.3. Diversidad y distribución de los aislados	30
9.4. Biodiversidad y potencial biotecnológico	36
10. Conclusiones	42
11. Perspectivas	43
12. Referencias	44

INDICE DE TABLAS

Tabla	Descripción	Página
1	Sumario de los sitios de muestreo, tipo de muestras y las especies aisladas de cada una con su respectiva referencia de GenBank así como el porcentaje de identidad.	14
2	Matriz de similitud basada en el índice de Jaccard entre los 4 sitios de muestreo.	22

INDICE DE FIGURAS

Figura	Descripción	Página
1	Mapa de las ecorregiones del Estado de Nuevo Leon	7
2	Fotografías de algunas de las especies vegetales muestreadas en este trabajo.	11
3	Proporcion de filos correspondiente a las especies aisladas en las 4 localidades	23
4	Cladograma generado con las especies aisladas y las referencias de GenBank	24

LISTADO DE SIMBOLOS Y ABREVIATURAS

ADN	Acido Desoxirribonucleico
PCR	Reaccion en Cadena de la Polimerasa (Polymerase Chain Reaction)
YM	Extracto de malta-levadura (Yeast-Maltose extract)
ITS	Espaciador Transcrito Interno (Internal Transcribed Spacer)
ARNr	Ácido ribonucleico ribosomal
ADNr	Ácido desoxirribonucleico ribosomal
LSU	Subunidad mayor del ribosoma (Large Subunit)
NCBI	National Center for Biotechnology Information
SMO	Sierra Madre Oriental
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
rpm	Revoluciones por minuto
CONABIO	Comision Nacional para el Uso y Conocimiento de la Biodiversidad
RFLP	Fragmentos de Restricción de Longitud Polimórfica (Restriction Fragment Length Polymorphism)

RESUMEN

Las levaduras son hongos caracterizados por reproducirse de manera principalmente asexual por gemación o fisión, por lo cual se encuentran como organismos unicelulares. Éstas habitan en muchos ambientes, tanto naturales como influenciados por el hombre. Sin embargo, en Nuevo León el conocimiento de su diversidad es muy limitado, por lo cual se decidió explorar la diversidad de levaduras silvestres cultivables en algunas regiones de Nuevo León: El Cerro de Las Mitras en Monterrey, El Cerro de La Silla en Guadalupe, Icamole en García y La Trinidad en el municipio de Montemorelos. En base al polimorfismo de los dominios D1/D2 de la subunidad mayor del ribosoma 28S, logramos identificar 90 cepas agrupadas en 22 géneros y 47 especies, donde el género *Coniochaeta* sp. el más frecuente al encontrarse en todas las localidades estudiadas y *Candida* sp. el más diverso con 9 especies en total, la mayoría encontradas en el Cerro de Las Mitras. Este último fue el sitio con mayor diversidad de especies (18 en total). La diversidad de especies resultó ser muy distinta entre las 4 localidades según el índice de Jaccard, donde la más alta entre La Trinidad y el Cerro de La Silla, con un 15% de similitud representado por *Coniochaeta* y *Torulaspota delbrueckii*. En base a nuestros resultados, podemos observar una amplia biodiversidad de levaduras cultivables entre los sitios de La Trinidad, el Cerro de Las Mitras, Icamole y el Cerro de La Silla.

ABSTRACT

Yeasts are fungi characterized by reproducing mainly asexually by budding or fission, which is why they are found as unicellular organisms. These inhabit many environments, both natural and influenced by man. However, in Nuevo León the knowledge of their diversity is quite limited, which is why we decided to explore the diversity of cultivable wild yeasts in some regions of Nuevo León: El Cerro de Las Mitras in Monterrey, El Cerro de La Silla in Guadalupe, Icamole in García and La Trinidad in Montemorelos. Based on polymorphism sequence in the D1/D2 domains of the large subunit of the 28S ribosome, 90 strains grouped into 22 genera and 47 species were identified, with the genus *Coniochaeta* being the most frequent as it was found in all the sites and *Candida* the most diverse with 9 species in total, mostly found in Cerro de Las Mitras. The latter had the greatest diversity of species (18 in total). The diversity of species turned out to be very different between the 4 sites according to the Jaccard index, being the highest percentage between La Trinidad and Cerro de La Silla, with a 15% similarity represented by *Coniochaeta* and *Torulaspota delbrueckii*, concluding that there is a difference in the cultivable yeast diversity between all the four sites of La Trinidad, Cerro de Las Mitras, Icamole and Cerro de La Silla.

1. INTRODUCCIÓN

Las levaduras son los organismos eucariotas más pequeños. Son hongos que se caracterizan por su adaptación predominante a crecer como organismos unicelulares y reproducirse por gemación. Participan en la degradación de sustancias orgánicas complejas y además sintetizan, acumulan y liberan moléculas orgánicas al ambiente. También actúan como descomponedores secundarios y sirven como fuente de nutrientes para microorganismos en la cadena trófica (Buzzini *et al.*, 2017).

Desde que se descubrió que eran las responsables de la actividad fermentativa en cerveza y vinos, se han utilizado ampliamente en la industria alimenticia, como es el caso de *Saccharomyces cerevisiae*. También existen especies patógenas como *Candida*, causante de serias infecciones en el ser humano. Sin embargo, a diferencia de estas dos que son bastante utilizadas y estudiadas, otras especies de levaduras que tienen su hábitat en la naturaleza son poco menos conocidas.

Los registros de estas especies silvestres derivan de estudios de sus propiedades y fuentes de aislamiento, por lo cual muchas de las especies son documentadas a partir de un número limitado de cepas y su descripción generalmente no incluye su hábitat o sus interacciones bióticas y abióticas. Son pocos los estudios que han establecido una relación de las levaduras con sus ecosistemas (Jiménez *et al.*, 2016; Alba-Lois *et al.*, 2016; Dunthorn *et al.*, 2017; Paulino *et al.*, 2017), pero sí existen numerosos estudios sobre diversidad (Nasanit *et al.*, 2015; Aljohani *et al.*, 2018; Koricha *et al.*, 2019; Boonmak *et al.*, 2019; Into *et al.*, 2020).

Actualmente los estudios de diversidad y la identificación de levaduras radican en el análisis de las secuencias nucleotídicas de la región ITS (espaciador intergénico transcrito) y los dominios D1/D2 del ADNr. De esta manera se pueden identificar de manera rápida y en algunos casos establecer las relaciones entre comunidades (Paulino *et al.*, 2017; Into *et al.*, 2020).

Nuevo León cuenta con ecosistemas que van desde bosques de montaña en la zona de la SMO, desiertos y ambientes riparios y en algunos

casos se han aislado e identificado cepas silvestres de estos hábitats (Cisneros, 2019; Rodríguez, 2019; Treviño, 2019) utilizando marcadores moleculares de la región correspondiente al espaciador intergénico transcrito (ITS) y PCR-RFLP. Sin embargo, no se profundizó en las relaciones con su ecosistema ni en la diversidad, sino en sus capacidades fermentativas.

La gran riqueza de vegetación encontrada en el estado hace que sea factible el descubrimiento de nuevas cepas de levaduras y sus relaciones con su hábitat, por ejemplo, encontramos gran variedad de cactáceas, de donde se han encontrado especies cactofílicas como *Pichia cactophila* y *Candida sonorensis* (Ganter, 2011); también está el género *Quercus* (encinos) distribuído en parte de la SMO y con el cual ya se sabe que especies del género *Saccharomyces* están muy relacionadas (Buzzini *et al*, 2017).

Este trabajo tiene como objetivo explorar la diversidad de levaduras cultivables en algunas localidades de Nuevo León, mayormente aquéllas asociadas a la SMO, mediante la identificación molecular utilizando la región de los dominios D1/D2 del gen de la subunidad mayor del ADNr y la región ITS y así definir las relaciones entre las comunidades que habitan los diferentes sitios de muestreo mediante un análisis de similitud.

2. ANTECEDENTES

2.1 Clasificación de levaduras

Las levaduras se definen como aquellos hongos cuya reproducción asexual resulta de la gemación o fisión y que no forman sus estados sexuales dentro o sobre cuerpos fructíferos, dando como resultado un crecimiento mayormente unicelular (Kurtzman *et al*, 2011). Actualmente, las levaduras se encuentran incluidas dentro de los filos Ascomycota y Basidiomycota; en las primeras forman dos grandes subfilos: Saccharomycotina al que pertenecen *Saccharomyces* y *Candida*, y Taphrinomycotina donde encontramos a *Schizosaccharomyces pombe*, una levadura que se reproduce por fisión, pero también a *Neolelecta*, que produce cuerpos fructíferos y no es considerada como levadura (Buzzini *et al*, 2017; Naranjo-Ortiz *et al*, 2019).

La relación filogenética entre las especies de Saccharomycotina ya ha sido establecida por Kurtzman y Robnett en 2013, analizando los genes de la subunidad mayor (LSU) y menor (SSU) del ADNr, el factor de elongación 1 α (EF-1 α) y las subunidades 1 y 2 de la ARN polimerasa y se han dilucidado numerosos clados de los cuales sólo aquéllos formados por especies de *Candida* (con más de 400 especies) presenta el mayor problema en cuanto a su clasificación (Lachance *et al*, 2011; Daniel *et al*, 2014). El subfilo Taphrinomycotina se conoce menos, pero hasta ahora incluye algunos géneros como *Taphrina* y *Pneumocystis*, el primero patógeno de plantas y el segundo causante de neumonía en pacientes inmunosuprimidos (Kurtzman *et al*, 2011).

En los basidiomicetos, las formas unicelulares (levaduras) están clasificadas dentro de los 3 linajes del phylum: Agaricomycotina, Pucciniomycotina y Ustilago Mycotina, y contienen muchas especies que alternan entre su estado levaduriforme y filamentoso (Hibbet *et al*, 2007; Boekhout *et al*, 2011). Tal clasificación es apoyada y respaldada por estudios moleculares de las secuencias de los dominios D1/D2 de la subunidad mayor de ADNr (LSU), el espaciador interno transcrito (ITS) 1 y 2 o de la subunidad menor de ADNr (James *et al*, 2006; Liu *et al*, 2015a, b; Wang *et al*, 2014,

2015a, b, c). Dentro de estos 3 grupos encontramos géneros de importancia biotecnológica como *Rhodotorula* (Pucciniomycotina) y otras de importancia médica como *Cryptococcus*, *Trichosporum* (Agaricomycotina) y *Malassezia* (Ustilagomycotina) además de patógenos de plantas como *Pseudozyma* (Ustilagomycotina).

2.2 Hábitat de las levaduras

Las levaduras habitan todos los biomas del mundo: en ecosistemas terrestres (Dunthorn *et al*, 2017; Yurkov, 2017), acuáticos (Alba-Lois *et al*, 2016) e incluso en la atmósfera (Starmer & Lachance, 2011), y dentro de éstos se pueden hallar asociadas tanto a comunidades microbianas, plantas, animales, con otros hongos e incluso en condiciones extremas (Buzzini *et al*, 2017, 2018). Nuevo León cuenta con bosques, desiertos, ríos y presas en donde se podrían encontrar diversas especies de levaduras.

En ambientes terrestres, se han descrito especies habitantes del suelo y asociadas a plantas en ecosistemas naturales o agrícolas, como *Trichosporon*, *Sporobolomyces*, *Cyberlindnera*, *Candida* y *Meyerozyma*, por mencionar algunas (Yurkov, 2017; Dunthorn *et al*, 2017; Koricha *et al*, 2019; Into *et al*, 2020). Se sabe también que las levaduras pueden encontrarse asociadas como comensales en insectos en bosques lluviosos (Jiménez, *et al*, 2016) o dentro de otros hongos, como el caso de poblaciones silvestres de *Saccharomyces eubayanus*, una levadura de gran importancia en la industria cervecera (Sampaio, 2018), que se encuentra como parásita de *Cyttaria*.

Por otro lado, en ambientes marinos se han estudiado las poblaciones de *Debaryomyces* (Alba-Lois *et al*, 2016), una levadura osmotolerante que también se puede encontrar en ambientes terrestres (Into *et al*, 2020). Además, se han descubierto especies marinas de *Candida*, *Meyerozyma* y *Rhodotorula* en asociación con algunos corales de los géneros *Palythoa* y *Zoanthus* (Paulino *et al*, 2017). Por otro lado, en lo que respecta a la atmósfera se sabe de la existencia de *Dioszegia* y *Undeniomyces* como habitantes de las nubes (Vaitilingom *et al*, 2012).

Se tiene registrado que especies del género *Saccharomyces* están fuertemente asociadas con plantas de *Quercus* (Buzzini *et al*, 2017) las cuales abundan en los bosques de pino-encino en Nuevo León. También existen especies desérticas y cactófilas reportadas de *Pichia cactophila* y *Candida sonorensis* (Ganter, 2011). Nuevo León cuenta con ecosistemas desérticos, como la región de Icamole, de donde ya se han aislado e identificado cepas de *Saccharomyces* (Cisneros, 2019; Rodríguez, 2019) pero una búsqueda más minuciosa podría resultar en el descubrimiento de otras especies.

2.3 Identificación molecular y diversidad.

Hoy en día, la rápida identificación de hongos y particularmente de levaduras, se lleva a cabo mediante el análisis y comparación en las secuencias nucleotídicas de los dominios 1 y 2 (D1/D2) de la subunidad mayor del ADNr (LSU) y del espaciador interno transcrito (ITS) localizado entre los genes de la subunidad menor y subunidad mayor (Kurtzman & Robnett, 2003; Kurtzman *et al*, 2011; Into *et al*, 2020). La región ITS se encuentra dividida en dos secciones por el gen 5.8S, el cual no deberá incluirse al hacer comparaciones de esta región. Para fines prácticos, esta región puede obtenerse como un solo amplicón utilizando los iniciadores NS-7A y NL-4 o NL-5A pudiendo así lograr una identificación rápida al utilizar la herramienta BLAST (Kurtzman & Robnett, 2003).

Las secuencias nucleotídicas de la región ITS y LSU se han utilizado frecuentemente en estudios sobre diversidad de levaduras silvestres desde enfoques tanto independientes como dependientes de cultivo. En un enfoque independiente de cultivo, es decir, el análisis del ADN ambiental, Nasanit y cols. (2015) encontraron 314 clonas dentro de Basidiomycota correspondientes a los géneros de *Bullera*, *Pseudozyma* y *Sporobolomyces*; 15 clonas de Ascomycota incluyendo los géneros *Metschnikowia*, *Meyerozyma* y *Wickerhamomyces* y otras 122 como posibles nuevas especies.

Por otro lado, Aljohani y su grupo (2018) lograron aislar e identificar, a partir de suelos agrícolas en Camerún, 16 especies, incluidas 6 especies

nuevas pertenecientes a los géneros *Cyberlyndnera*, *Candida*, *Hanseniaspora* y *Saccharomyces*. Un reporte más reciente (Into *et al*, 2020), que analizó muestras de filoplano de plantas de maíz en Tailandia, demostró una diversidad abundante utilizando estos dos marcadores moleculares (ITS y LSU). En éste, se identificaron 10 especies dentro de Ascomycota y 32 en Basidiomycota, incluyendo a *Papiliotrema plantarum* como una nueva especie descrita. De igual forma se determinó la diversidad de levaduras en bosques pantanosos en la región de Kanthuli en el mismo país, utilizando los marcadores de LSU e ITS, encontrando posibles nuevas especies, incluidas del género *Candida*, *Pichia*, *Papiliotrema* y *Rhodotorula* (Boonmak *et al*, 2019).

2.4 Diversidad de levaduras silvestres en Nuevo León.

Nuevo León cuenta con una riqueza de ecosistemas (**Fig. 1**) definidos principalmente por la Sierra Madre Oriental (SMO) y comprendidos en su mayoría por el Parque Nacional Cumbres de Monterrey. Este abarca 177, 395 ha que ocupan territorio de los municipios de Allende, García, Montemorelos, Monterrey, Rayones, Santa Catarina, Santiago y San Pedro Garza García. Presenta desde zonas áridas con especies propias de las regiones desérticas, pasando por matorrales con diversos tipos de vegetación, hasta bosques principalmente de pinos y encinos en las partes más altas, así como pastizales y diversas composiciones florísticas a lo largo de los ríos y cañadas.

La diversidad de flora y fauna en esta zona está bastante caracterizada (CONABIO, 2020), pero los estudios que se han realizado sobre biodiversidad de hongos han sido de macromicetos en la región sur de la SMO (Cifuentes *et al*, 2004) y sin poner especial atención en levaduras.

Por otra parte, en otras regiones de Nuevo León sí se han aislado e identificado mediante algunas especies de *Saccharomyces* provenientes de zonas desérticas en Icamole (Cisneros, 2019; Rodríguez, 2019) y otras tantas cepas de *S. cerevisiae* provenientes de Galeana y Hualahuises, todo esto mediante PCR-RFLP utilizando la región del ITS. Sin embargo, éstos incluyen información sobre su potencial en la elaboración de productos fermentados

(Rodríguez, 2019; Cisneros, 2019) y su comportamiento dinámico en cuanto al consumo de azúcares (Treviño, 2019), dejando un poco de lado el aspecto ecológico y de biodiversidad. A pesar de ello, se remarca la importancia de las levaduras en el ámbito biotecnológico y las colocan como un recurso natural para tener en cuenta.

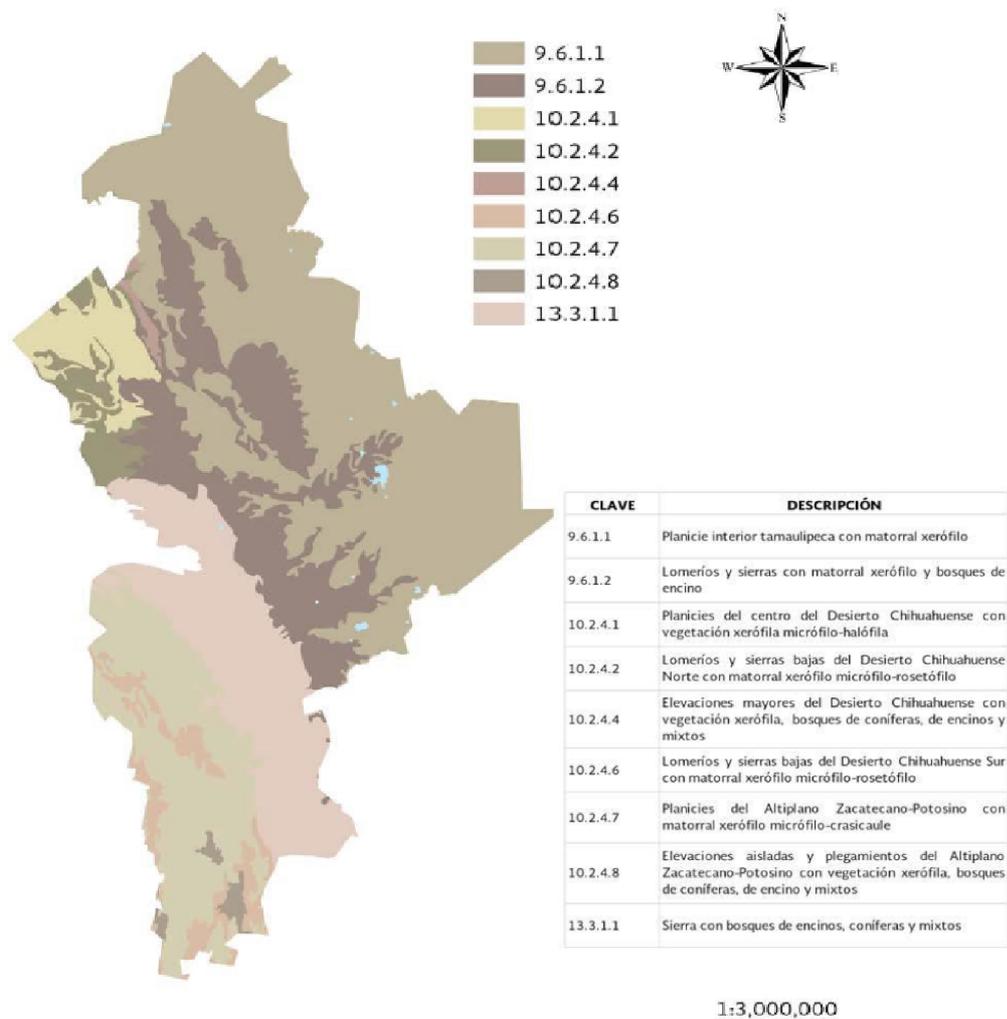


Figura 1. Mapa de las ecorregiones de Nuevo León. Los colores delimitan cada una y en las claves se indica la descripción de cada uno.

3. JUSTIFICACIÓN

Las levaduras se encuentran distribuidas en todos los biomas y establecen relaciones muy estrechas con otros organismos ya sea como mutualistas, competidoras, parásitas o patógenas (Starmer & Lachance, 2011). Debido a esta versatilidad, que implica una gran variedad de procesos metabólicos, la bioprospección de nuevas cepas es muy importante no solo en la búsqueda de levaduras con potencial fermentativo, sino aquéllas que pudieran tener aplicaciones biotecnológicas o en la investigación básica.

Existe escasa información sobre la diversidad de especies de levaduras silvestres en Nuevo León y su hábitat, por lo cual, cualquier esfuerzo capaz de enriquecer este conocimiento, es de gran interés. El conocimiento sobre la ecología y distribución de estos organismos sumaría un mayor peso en la conservación y protección de los ecosistemas de Nuevo León, y se puede esperar que los recursos biológicos resultantes de este trabajo se puedan aprovechar de manera sostenible, ya sea para la industria o la investigación.

4. HIPÓTESIS

Existe diferencia en la diversidad de especies de levaduras silvestres entre los sitios de muestreo.

5. OBJETIVO GENERAL

Explorar la diversidad de levaduras cultivables asociadas a algunos ecosistemas de la Sierra Madre Oriental en Nuevo León.

6. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Obtener de cultivos axénicos.
2. Identificar a nivel molecular las especies presentes utilizando la secuencia nucleotídica del gen RNAr 28S.
3. Evaluar la similitud en la diversidad de especies entre las áreas de estudio.
4. Determinar si existen cepas de importancia biotecnológica, médica o en investigación.

7. MATERIALES Y MÉTODOS:

7.1 Áreas de Estudio y Muestreo

El muestreo se adaptó de la metodología de Aljohani y cols. (2018) para suelo y de Koricha *et al.* (2019) e Into *et al.* (2020) para la vegetación. Se colectaron muestras en 4 localidades pertenecientes a la SMO en Nuevo León: La vereda hacia el Pico Norte en El Monumento Cerro de la Silla, la Cama de Piedra en Cerro de las Mitras, el mirador “La piedra parada” en La Trinidad, Montemorelos y una región a las afueras del pueblo de Icamole en el municipio de García. En cada sitio se registraron las coordenadas, temperatura, altitud y tipo de vegetación. Se prepararon cultivos *in situ* de cada muestra colocándola en 50ml de medio de enriquecimiento YM (extracto de levadura 0.3%, peptona 0.5%, extracto de malta 0.3%, glucosa 1%) suplementado con cloranfenicol al 0.02% y propionato de sodio al 0.025% que inhibe el crecimiento de bacterias y hongos filamentosos respectivamente, para luego ser transportadas al laboratorio.

Cuatro localidades fueron muestreadas en un lapso de poco más de 1 año: En agosto de 2020, la zona circundante al mirador “La Piedra Parada” en La Trinidad, Montemorelos (n=9); en Febrero de 2021, el sitio conocido como “La Cama de Piedra” en el Cerro de las Mitras, Monterrey (n=11); La ruta que lleva hacia el Pico Norte en el Cerro de La Silla en Marzo de 2021 (n=10) y finalmente las afueras del pueblo de Icamole en Octubre de 2021 (n=10). Se obtuvieron 40 muestras conformadas por 27 fuentes distintas, algunas de las cuales se ilustran en la **Figura 2**.

Dichas muestras consistieron en hojas, corteza o penca (en el caso de *Opuntia*), flores y frutos (dependiendo de su disponibilidad) de la vegetación predominante en la zona. En el caso de hojas, flores y frutos, una sola muestra consistió en 15 de estas estructuras (o partes de estas, según su tamaño) provenientes de 3 ejemplares. La corteza se colectó raspando la superficie de la misma utilizando una navaja previamente esterilizada en la que 3 ejemplares conformaron una sola muestra. Finalmente en el caso del suelo, se tomaron 2 muestras que consisten en aproximadamente 5 cm de la capa

superficial tomadas con un tubo de 50ml además de determinar el pH de las mismas *in situ* utilizando tiras indicadoras Whatman™.



Opuntia cacanapa



Amyris madrensis



Justicia spicigera



Fouquieria splendens



Cordia boissieri



Jatropha dioica



Opuntia microdasys



Cylindropuntia leptocaulis



Nama hispida

Figura 2. Fotografías de algunas de las especies vegetales muestreadas y sus estructuras. En el caso de *O. microdasys* y *C. leptocaulis* se tomaron muestras del fruto y tallo/superficie, mientras que, de otras como *N. hispida*, *J. spicigera* y *C. boissieri* se muestrearon las flores. Del resto de las plantas mostradas se tomo el tallo completo, la superficie o las hojas.

7.2 Aislamiento de levaduras

La obtención de cultivos axénicos fue realizada de acuerdo con lo descrito en el protocolo de Into y Cols. (2020). Los cultivos *in situ* fueron incubados por 7 días a temperatura ambiente (TA) seguido por diluciones seriadas. Las placas fueron monitoreadas durante 7 días para observar la aparición de colonias. Las colonias morfológicamente similares fueron tratadas como la misma cepa e inoculadas un máximo de 10 colonias de cada una en agar YM por estría cruzada. Las cepas obtenidas fueron conservadas en caldo YM con Glicerol al 30% y almacenadas a -20°C para su posterior uso.

7.3 Extracción de ADN

El ADN fue purificado según el protocolo de Amer y cols. (2011). A partir de un cultivo líquido de 24-48 h (dependiendo de la cepa), 2 ml fueron centrifugados. El paquete celular fue resuspendido en 400 µl de buffer de extracción (Tris-HCl 200 mM, EDTA 25 mM, NaCl 250 mM, SDS 0.5%, pH 8.5) e incubado durante 15 minutos a 65°C y posteriormente añadimos 130 µl de acetato de sodio 3M pH 5.2. La mezcla fue agitada vigorosamente (vórtex) durante 30 segundos para luego incubar a -20°C por 10 minutos, seguido de un ciclo de centrifugación de 13,000 rpm a 4°C durante 15 minutos. El sobrenadante fue incubado con 1 volumen de isopropanol durante 20 minutos a -20°C. Los tubos fueron centrifugados 20 minutos a 6,000 rpm a 4°C. La pastilla (ADN) fue lavada 2 veces con etanol absoluto y al 70% en ciclos de centrifugación de 5 minutos a 7,000 rpm. Finalmente, la pastilla de ADN se resuspendió en buffer TE (Tris-HCl 10mM pH 8, EDTA 1mM) y se cuantificó en un equipo NanoDrop 2000™ (ThermoFisher™).

7.4 Amplificación del dominio D1/D2 del ADNr 28S

La identificación molecular se llevó a cabo con base a la subunidad mayor del ADN ribosomal 28S, utilizando los cebadores NL1: 5' GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG 3' y NL4: 3' GGTCCG TGTTTCAAGACGG 5'. Las condiciones para la PCR fueron las especificadas

por la enzima utilizada (MyTaq™ DNA Polymerase, Meridian Bioscience®) comenzando con desnaturalización a 95°C durante 1 minuto, posteriormente 35 ciclos de 15 segundos a 94°C, 15 segundos a 52°C, 10 segundos a 72°C y una extensión final de 2 minutos a 72°C. Los productos se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% y finalmente se determinó la secuencia nucleotídica de cada uno siendo enviadas al Laboratorio de Servicios Genómicos, CINVESTAV en Irapuato, Guanajuato. Para este ensayo, se seleccionaron al azar un máximo de 3 clones de cada cepa.

7.5 Identificación molecular de los aislados

Las secuencias resultantes del dominio D1/D2 fueron procesadas con el software Geneious Prime versión 2022.1 y sometidas a alineamiento con la herramienta BLAST del NCBI y a la base de datos de Mycobank. Para definir el nivel taxonómico de especie se consideró un 100% de cobertura y al menos un 98% de identidad, de otro modo sólo se reportó a nivel de género. Adicionalmente, consideramos a los aislados de la misma especie que se obtuvieron de muestras diferentes como una cepas individuales.

7.6 Construcción del cladograma

El cladograma fue construido utilizando el software MEGA11 y la herramienta en línea iTOL versión 6.5.8, se realizó con el método UPGMA y un bootstrap de 5000 réplicas.

8. RESULTADOS

8.1 Características de las áreas de estudio y muestras

Las características, el tipo de muestras tomadas y las condiciones ambientales en cada una de las áreas de estudio se enlistan en las siguientes tablas:

Tabla 1. Diversidad de levaduras encontrada en cada localidad. A) La Trinidad; B) Cerro de las Mitras; C) Cerro de La Silla; D) Icamole. Se enlista la fuente de la cual fueron aisladas y el nombre que les fue asignado después de la comparación con la base de datos. En negritas se resaltan aquellas cepas cuya identidad fue menor al 98% o cuyo pariente más cercano no tiene asignada la categoría formal de especie.

A)

Mirador “La Piedra Parada”, La Trinidad, Montemorelos (25°12’56” N; 100° 07’11” W)					
Altitud: 1475 msnm Temperatura: 18°C n=9			Vegetación: Bosque Pino-Encino Fecha: Agosto 2020 pH del suelo: 6		
FUENTE	NOMBRE	CLAVE	REFERENCIA GenBank		% IDENTIDAD
Corteza de <i>Pinus</i>	<i>Coniochaeta sp.</i>	TM119	JX838854.1	<i>Lecytophora sp.</i> W3a2	98
	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	TM1016	KY109112.1	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> CBS:6469	98.47
Filoplano de <i>Pinus</i>	<i>Coniochaeta fibrosae</i>	TM521	MW750758.1	<i>Coniochaeta fibrosae</i> CX03C1	98.51
	<i>Coniochaeta sp.</i>	TM517	JX838854.1	<i>Lecytophora sp.</i> W3a2	98
	<i>Coniochaeta velutina</i>	TM912	EU999180.1	<i>Coniochaeta velutina</i> UAMH 10912	99.65
Corteza de <i>Quercus</i>	<i>Coniochaeta sp.</i>	TM241	JX838854.1	<i>Lecytophora sp.</i> W3a2	98
	<i>Debaryomyces fabryi</i>	TM611	AJ508560.1	<i>Debaryomyces hansenii</i> var. <i>fabryi</i>	100
	<i>Saccharomyces sp.</i>	TM212	KY109446.1	<i>Saccharomyces paradoxus</i> CBS:1026	100
			KY109236.1	<i>Saccharomyces cariocanus</i> CBS:7994	
			MH595054.1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> UCDFST:66-1051	
<i>Torulaspota delbrueckii</i>	TM216	NG_058413.1	<i>Torulaspota delbrueckii</i> CBS 1146	100	
Filoplano de <i>Quercus</i>	<i>Coniochaeta sp.</i>	TM331	JX838854.1	<i>Lecytophora sp.</i> W3a2	98
	<i>Coniochaeta taeniospora</i>	TM352	KU762324.1	<i>Coniochaeta taeniospora</i> LTA	98.57
	<i>Papiliotrema flavescens</i>	TM326	KY108734.1	<i>Papiliotrema flavescens</i> CBS:6475	100
	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	TM341	KY109071.1	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> CBS:12078	100
	<i>Yamadazyma mexicana</i>	TM313	KU316744.1	<i>Yamadazyma mexicana</i> HL2-4	99.81
Hojarasca	<i>Coniochaeta sp.</i>	TM412	AY219880.1	<i>Lecytophora sp.</i> UBCtra1453C	98.27
	<i>Coniochaeta sp.</i>	TM441	JX838854.1	<i>Lecytophora sp.</i> W3a2	97.86
	<i>Rhodotorula alborubescens</i>	TM432	NG_068967.1	<i>Rhodotorula alborubescens</i> CBS 482	100
	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	TM434	KY109112.1	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> CBS:6469	100

Suelo	<i>Cutaneotrichosporon moniliiforme</i>	TM824	KT895976.1	<i>Cutaneotrichosporon moniliiforme</i> 1G-2	100
			MT328058.1	<i>Debaryomyces hansenii</i>	
	<i>Debaryomyces sp.</i>	TM838	MK394103.1	<i>Debaryomyces fabryi</i> CBS 789	100
			NG_055701.1	<i>Debaryomyces prosopidis</i> JCM 9913	

B)

“Cama de Piedra”, Cerro de las Mitras, Monterrey (25°42'59" N; 100°24'34" W)

Altitud: 1140 msnm
Temperatura: 17°C
n=11

Vegetación: Matorral submontano /
Bosque de Encino
Fecha: Febrero 2021
pH del suelo: 7

FUENTE	NOMBRE	CLAVE	REFERENCIA	GenBank	% IDENTIDAD	
Corteza de Quercus	<i>Candida germanica</i>	CM111	NG_060807.1	<i>Candida germanica</i> CBS 4105	98.69	
	<i>Candida membranifaciens</i>	CM263	KY106568.1	<i>Candida membranifaciens</i> CBS:4430	100	
	<i>Candida oleophila</i>	CM223	NG_060820.1	<i>Candida oleophila</i> CBS 2219	100	
	<i>Candida parapsilosis</i>	CM215	MT001266.1	<i>Candida parapsilosis</i> MCZ30	100	
	<i>Candida saitoana</i>	CM121	KY106730.1	<i>Candida saitoana</i> CBS:940	100	
	<i>Candida sp.</i>	CM151	GQ340917.1	<i>Candida sp.</i> NCAIM Y.01939	89.38	
	<i>Coniochaeta sp.</i>	CM332	DQ523176.2	<i>Lecytophora sp.</i> NGV-1	95	
	<i>Debaryomyces nepalensis</i>	CM241	KY107576.1	<i>Debaryomyces nepalensis</i> CBS:7761	100	
	<i>Kluyveromyces lactis</i>	CM141	KY108048.1	<i>Kluyveromyces lactis</i> CBS:141	100	
	<i>Kluyveromyces lactis</i>	CM716	KY108048.1	<i>Kluyveromyces lactis</i> CBS:141	100	
	<i>Lachancea thermotolerans</i>	CM131	KY108274.1	<i>Lachancea thermotolerans</i> CBS:2860	100	
	<i>Lachancea thermotolerans</i>	CM312	KY108274.1	<i>Lachancea thermotolerans</i> CBS:2860	100	
	<i>Lachancea thermotolerans</i>	CM827	KY108274.1	<i>Lachancea thermotolerans</i> CBS:2860	100	
	<i>Torulasporea delbrueckii</i>	CM119	NG_058413.1	<i>Torulasporea delbrueckii</i> CBS 1146	100	
	<i>Torulasporea delbrueckii</i>	CM211	NG_058413.1	<i>Torulasporea delbrueckii</i> CBS 1146	100	
	<i>Torulasporea delbrueckii</i>	CM322	NG_058413.1	<i>Torulasporea delbrueckii</i> CBS 1146	100	
	<i>Torulasporea delbrueckii</i>	CM723	NG_058413.1	<i>Torulasporea delbrueckii</i> CBS 1146	100	
	<i>Torulasporea delbrueckii</i>	CM814	NG_058413.1	<i>Torulasporea delbrueckii</i> CBS 1146	100	
	Filoplano de Quercus	<i>Aureobasidium subglaciale</i>	CM421	MH874818.1	<i>Aureobasidium subglaciale</i> CBS:123387	100
		<i>Debaryomyces hansenii</i>	CM662	MH545920.1	<i>Debaryomyces hansenii</i> CBS 767	100
<i>Kluyveromyces marxianus</i>		CM1011	KY108091.1	<i>Kluyveromyces marxianus</i> CBS:7894	100	
<i>Naganishia albida</i>		CM633	NG_055717.1	<i>Naganishia albida</i> CBS 142	100	
<i>Papiliotrema laurentii</i>		CM641	KY108738.1	<i>Papiliotrema laurentii</i> CBS:7140	99.83	
<i>Rhodotorula alborubescens</i>		CM431	NG_068967.1	<i>Rhodotorula alborubescens</i> CBS 482	100	

Suelo	<i>Rhodotorula alborubescens</i>	CM651	NG_068967.1	<i>Rhodotorula alborubescens</i> CBS 482	100
	<i>Candida albicans</i>	CM542	MK026357.1	<i>Candida albicans</i> 7_6 5.8S	100
	<i>Candida oleophila</i>	CM511	KY106718.1	<i>Candida railenensis</i> CBS:2223	100
	<i>Candida railenensis</i>	CM522	FJ748669.1	<i>Candida railenensis</i> CJAX-Y35	100
	<i>Debaryomyces nepalensis</i>	CM541	NG_055700.1	<i>Debaryomyces nepalensis</i> JCM 2095	100
	<i>Kluyveromyces lactis</i>	CM531	KY108048.1	<i>Kluyveromyces lactis</i> CBS:141	100
	<i>Torulaspota delbrueckii</i>	CM517	NG_058413.1	<i>Torulaspota delbrueckii</i> CBS 1146	100
Phanerophlebia umbonata	<i>Aureobasidium melanogenum</i>	CM941	NG_056960.1	<i>Aureobasidium melanogenum</i> CBS 105.22	100
	<i>Candida oleophila</i>	CM932	KY106718.1	<i>Candida railenensis</i> CBS:2223	100
	<i>Candida railenensis</i>	CM913	FJ748669.1	<i>Candida railenensis</i> CJAX-Y35	100
	<i>Lachancea thermotolerans</i>	CM1112	KY108274.1	<i>Lachancea thermotolerans</i> CBS:2860	100
	<i>Naganishia globosa</i>	CM922	AB259916.1	<i>Naganishia globosa</i>	100
	<i>Rhodotorula alborubescens</i>	CM1121	NG_068967.1	<i>Rhodotorula alborubescens</i> CBS 482	100

C)

**Vereda hacia el Pico Norte, Cerro de La Silla, Guadalupe
(25°38'03" N; 100°15'22" W)**

Altitud: 996 msnm
Temperatura: 32°C
n=10

Vegetación: Matorral submontano
Fecha: Marzo 2021
pH del suelo: 7

FUENTE	NOMBRE	CLAVE	REFERENCIA GenBank	% IDENTIDAD
Filoplano de <i>Amyris madrensis</i>	<i>Coniochaeta sp.</i>	CS133	MW883809.1	<i>Coniochaeta sp.</i> CBS 551.75 97.35
	<i>Wickerhamomyces strasburgensis</i>	CS112	NG_057167.1	<i>Wickerhamomyces strasburgensis</i> NRRL Y-2383 100
	<i>Yamadazyma mexicana</i>	CS125	KU316744.1	<i>Yamadazyma mexicana</i> HL2-4 100
Corteza de <i>A. madrensis</i>	<i>Candida orthopsilosis</i>	CS228	KY106632.1	<i>Candida orthopsilosis</i> CBS:2212 100
	<i>Torulaspota delbrueckii</i>	CS211	NG_058413.1	<i>Torulaspota delbrueckii</i> CBS 1146 100
	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	CS233	MT623570.1	<i>Wickerhamomyces anomalus</i> SDBR-S2-10 100
Flor de <i>Justicia spicigera</i>	<i>Starmerella sorbosivorans</i>	CS315	NG_060827.1	<i>Starmerella sorbosivorans</i> CBS 8768 99.12
Agave sp.	<i>Ogataea naganishii</i>	CS513	KY108685.1	<i>Ogataea naganishii</i> CBS:6429 99.82
	<i>Thyronectria concentrica</i>	CS521	KX514387.1	<i>Thyronectria concentrica</i> ALLA 98.94
Flor de <i>Echinocereus viereckii</i>	<i>Kurtzmaniella cleridarum</i>	CS611	KY108193.1	<i>Kurtzmaniella cleridarum</i> CBS:10688 100
<i>Dasyliirion berlandieri</i>	<i>Coniochaeta sp.</i>	CS722	MW883809.1	<i>Coniochaeta sp.</i> CBS 551.75 97.33
<i>Opuntia cacanapa</i>	<i>Coniochaeta sp.</i>	CS823	DQ523176.2	<i>Lecytophora sp.</i> NGV-1 100
<i>Casimiroa gregii</i>	<i>Coniochaeta sp.</i>	CS921	DQ523176.2	<i>Lecytophora sp.</i> NGV-1 100
Suelo	<i>Torulaspota delbrueckii</i>	CS1031	NG_058413.1	<i>Torulaspota delbrueckii</i> CBS 1146 100

D)

Icamole (25°54'42" N; 100°42'55" W)					
Altitud: 667 msnm			Vegetación: Matorral desertico		
Temperatura: 30°C			Fecha: Octubre 2021		
n=10			pH del suelo: 8		
FUENTE	NOMBRE	CLAVE	REFERENCIA GenBank		% IDENTIDAD
<i>Cilindropuntia leptocaulis</i>	<i>Coniochaeta sp.</i>	IC215	DQ523176.2	<i>Lecythophora sp. NGV-1</i>	100
	<i>Coniochaeta sp.</i>	IC331	DQ523176.2	<i>Lecythophora sp. NGV-1</i>	100
<i>Jatropha dioica</i>	<i>Geosmithia lavendula</i>	IC311	AF033385.1	<i>Geosmithia lavendula</i> NRRL 2146	100
	<i>Saccharomycopsis fibuligera</i>	IC325	MH867402.1	<i>Saccharomycopsis fibuligera</i> CBS:214.37	100
<i>Nama hispida</i>	<i>Myrmaecium rubricosum</i>	IC412	LN907512.1	<i>Myrmaecium rubricosum</i> genomic DNA	99.63
	<i>Naganishia albidosimilis</i>	IC426	KY108603.1	<i>Naganishia albidosimilis</i> CBS:10184	100
Fruto de <i>Opuntia microdasys</i>	<i>Naganishia albida</i>	IC524	NG_055717.1	<i>Naganishia albida</i> CBS 142	100
	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	IC512	KY109112.1	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> CBS:6469	100
Penca de <i>O. microdasys</i>	<i>Naganishia albida</i>	IC613	NG_055717.1	<i>Naganishia albida</i> CBS 142	100
	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	IC621	KY109112.1	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> CBS:6469	100
Flor de <i>Cordia boissieri</i>	<i>Myllerozyma koratensis</i>	IC714	KY108828.1	<i>Myllerozyma koratensis</i> CBS:12092	100
	<i>Saccharomycopsis fibuligera</i>	IC727	MH867402.1	<i>Saccharomycopsis fibuligera</i> CBS:214.37	100
Filoplano de <i>C. boissieri</i>	<i>Candida corydali</i>	IC812	KC798422.1	<i>Candida corydali</i> MB1222	99.48
<i>Fouquieria splendens</i>	<i>Coniochaeta sp.</i>	IC922	DQ523176.2	<i>Lecythophora sp. NGV-1</i>	99.44
	<i>Saccharomycopsis fibuligera</i>	IC936	MH867402.1	<i>Saccharomycopsis fibuligera</i> CBS:214.37	99.13
	<i>Yamadazyma paraphyllophyla</i>	IC1033	AY562397.1	<i>Candida sp. TrB1-1</i>	98.5
	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	IC1042	KY109112.1	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> CBS:6469	98.85
Suelo	<i>Naganishia albida</i>	IC1015	NG_055717.1	<i>Naganishia albida</i> CBS 142	100
	<i>Myllerozyma koratensis</i>	IC1026	KY108828.1	<i>Myllerozyma koratensis</i> CBS:12092	100

8.2 Aislamiento e identificación de levaduras

De las 40 muestras, obtuvimos un total de 695 aislados que se agruparon según la morfología de la colonia. De esta forma, 90 cepas distintas fueron procesadas para su identificación molecular. El análisis de la secuencia nucleotídica del dominio D1/D2 del RNAr 28S, arrojó 47 especies diferentes (incluyendo 4 posibles especies distintas de *Coniochaeta* mencionadas más adelante), pertenecientes a 22 géneros. Asimismo, estos se agrupan en 4 grandes linajes: Pezizomycotina y Saccharomycotina representando al filo Ascomycota; mientras que Pucciniomycotina y Agaricomycotina dentro de Basidiomycota.

En el filo Basidiomycota se agrupan 8 especies que pertenecen a los géneros *Cutaneotrichosporon* (1 especie), *Naganishia* (3 especies), *Rhodotorula* (2 especies) y *Papiliotrema* (2 especies), mientras que en los 37 restantes del filo Ascomycota destacan *Candida*, *Coniochaeta* (antes *Lecythophora*), *Debaryomyces* y *Torulaspota delbrueckii*. Adicionalmente se reportan cepas de *Aureobasidium*, *Myrmaecium*, *Geosmithia*, *Saccharomyces*, *Thyronectria*, *Kurtzmaniella*, *Kluyveromyces*, *Yamadazyma*, *Millerozyma*, *Wickerhamomyces*, *Lachancea*, *Ogataea*, *Wickerhamomyces*, *Saccharomycopsis* y *Starmerella*. La **Tabla 1** enlista todas las especies y cepas identificadas en este trabajo.

Por otro lado, 17 de las 90 cepas tuvieron 97% o menos de identidad con alguna referencia de la base de datos, cumplía con el 98% mínimo pero la entrada aún no había sido asignada a una especie en particular, como en el caso de algunas cepas de *Coniochaeta* y *Candida* CM151; o bien, resultaron con un 100% de identidad con más de una especie, como fue el caso de *Debaryomyces* TM838 la cual resulto ser similar en un 100% con *D. hansenii*, *D. nepalensis* y *D. fabryi*, y *Saccharomyces* TM212 con *S. cariocanus*, *S. cerevisiae* y *S. paradoxus* (**Tabla 1**).

Con respecto a las 14 cepas de *Coniochaeta* que no cumplieron con el criterio para una identificación concluyente (**Tabla 1**), ya sea porque resultaron

en una identidad menor al 98% o con una identidad del 98% - 100% con entradas que no tienen asignadas la categoría de especie. El alineamiento mediante BLAST arrojó 4 entradas del GenBank como organismos más cercanos: siendo CM722 y CS133 similares en un ~97% con *Coniochaeta sp.* CBS 551.75 (GenBank: MW883809.1) y CM332 con *Lecythophora sp.* NGV-1 (GenBank: DQ523176.2) en un 95%; mientras que TM119, TM5217, TM241, TM331 y TM441 resultaron muy similares a *Lecythophora sp.* W3a2 (GenBank: GenBank:JX838854.1); TM412 a *Lecythophora sp.* UBCtra1453C (GenBank: AY219880.1) y CS823, CS921, IC215, IC331 y IC922 a *Lecythophora sp.* NGV-1, por lo cual se asume que estas cepas pertenecen al menos a 4 especies diferentes que no han sido identificadas del todo al menos con los métodos utilizados en este trabajo.

8.3 Diversidad y distribución de las cepas aisladas

La **Figura 3** muestra la proporción de las 47 especies encontradas en este trabajo, 39 pertenecen al filo Ascomycota (83%) y 8 al filo Basidiomycota (17), las cuales a su vez están representadas por 4 subfilos: el primero por Pezizomycotina y Saccharomycotina; y el segundo con Pucciniomycotina y Agaricomycotina. El género *Coniochaeta* fue el más frecuente dentro de los ascomicetos, distribuida en las 4 localidades y aislada a partir de una mayor variedad de fuentes: corteza y filoplano de *Pinus* y *Quercus*, hojarasca y filoplano de *A. madrensis*, así como *O. cacanapa*, *D. berlandieri*, *C. gregii*, *F. splendens*, *C. leptocaulis* y *J. dioica*. Solamente *Coniochaeta fibrosae*, *Coniochaeta taeniospora* y *Coniochaeta velutina*, provenientes de La Trinidad lograron ser aisladas exclusivamente a partir del filoplano de *Pinus* (TM521, TM912) y *Quercus* (TM352). Por otro lado, *Rhodotorula* representa la mayoría de cepas aisladas de basidiomicetos, y distribuyéndose en todas las localidades exceptuando el Cerro de La Silla, encontrándose sobre *Pinus*, *Quercus* y hojarasca en La Trinidad y el Cerro de Las Mitras y sobre *Opuntia microdasys* y suelo en Icamole.

Debaryomyces fue otro taxón relativamente bien representado, registrando 3 especies y una cepa a nivel de género en 2 localidades:

Debaryomyces fabryi y *Debaryomyces sp.* en La Trinidad, asociadas a corteza de encino y suelo respectivamente, y en el Cerro de las Mitras se encontró *D. hansenii* asociada a filoplano de *Quercus* y *D. nepalensis* en corteza de este (CM241) y suelo (CM541). Por otro lado, los basidiomicetos con mayor distribución fueron *Rhodotorula*, representado por *R. alborubescens* aislada a partir de hojarasca en La Trinidad (TM432) y en hojas de *Quercus* (CM432, CM651) y de *P. umbonata* (CM1121) en el Cerro de las Mitras; y *R. mucilaginosa* que se aisló en La Trinidad a partir de corteza de *Pinus* (TM1016), hojas de *Quercus* (TM341) y hojarasca (TM434), así como de *O. microdasys* (IC512, IC621) y suelo (IC1042) en Icamole. Finalmente, *Torulaspora delbrueckii* se reporta en La Trinidad, Cerro de las Mitras y Cerro de la Silla aislada a partir de corteza de *Quercus* (TM216, CM119, CM211, CM322, CM723, CM814), corteza de *A. madrensis* (CS211) y suelo (CM517, CS1031).

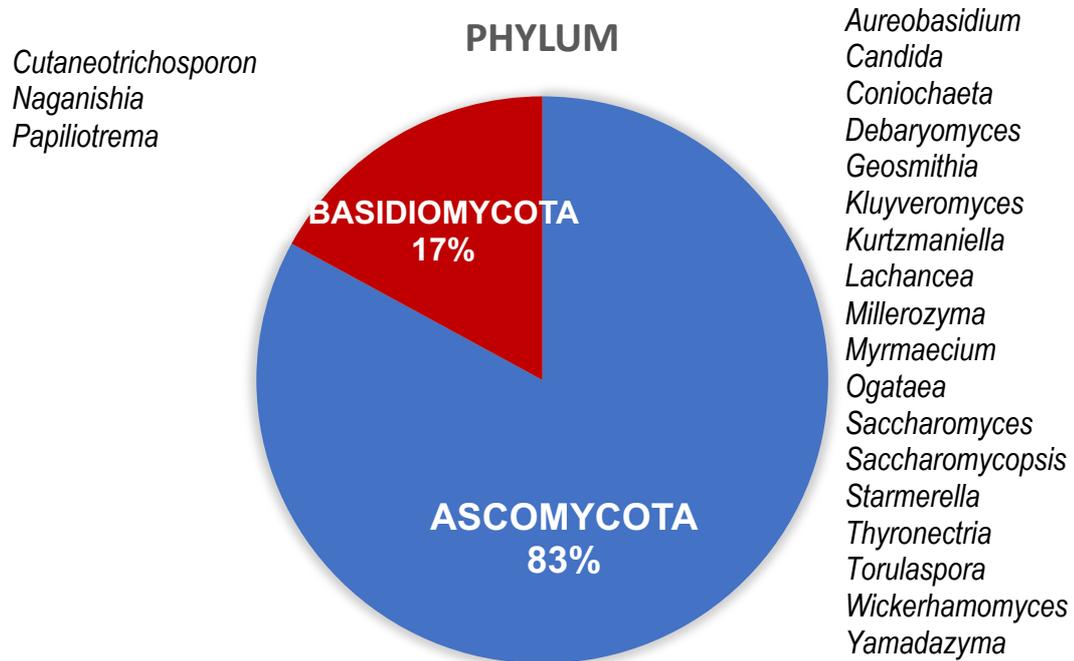


Figura 3. Proporción de Basidiomycota y Ascomycota en las cepas aisladas. Del lado izquierdo se enlistan los géneros dentro del filo Basidiomycota mientras que del lado derecho aquellos pertenecientes a Ascomycota.

Un grupo particularmente diverso entre nuestros aislados fue *Candida*, del cual se identificaron 10 especies en total, 8 de las cuales están limitadas al Cerro de las Mitras, siendo así esta localidad la que presentó un mayor número de especies de un solo género. En este caso, *Candida* se encontró en todas las muestras aunque cada muestra presentó una diversidad distinta. Así, *C. germanica*, *C. membranifaciens*, *C. parapsilosis*, *C. saitoana* y una cepa sin identificar (CM151) se aislaron exclusivamente de corteza de *Quercus*; *C. oleophila* también se encontró en corteza (CM223), pero también en suelo (CM511) y sobre *P. umbonata* (CM932). De manera similar ocurre con *C. railenensis* que se aisló a partir de suelo (CM522) y *P. umbonata* (CM913).

Adicionalmente, *Candida albicans* se encontró asociada exclusivamente al suelo en esta localidad y no se logró aislar de otras muestras. Por otro lado, las 2 cepas restantes que corresponden a *C. orthopsilosis* y *C. corydali* se encontraron en corteza de *A. madrensis* y hojas de *Cordia boissieri* en el Cerro de la Silla e Icamole, respectivamente.

Por otro lado, en dos localidades se encontraron las dos mismas especies: *Naganishia albida* y *Yamadazyma mexicana*. La primera asociada al filoplano de *Quercus* en el Cerro de las Mitras (CM633) y en Icamole aislada a partir de *Opuntia microdasys* (IC524, IC613) y suelo (IC1015), mientras que *Y. mexicana* se encontró en La Trinidad y el Cerro de La Silla sobre el filoplano de *Quercus* (TM313) y *A. madrensis* (CS125).

Por último, además de las ya indicadas, hubo especies en cada sitio de muestreo que no se encontraron en los demás, por ejemplo, *Coniochaeta fibrosae*, *C. velutina* y *C. taeniospora* en La Trinidad. En este mismo sitio, se aisló también *Cutaneotrichosporon moniliiforme* y una cepa de *Debaryomyces* (TM838) a partir del suelo del bosque; en el filoplano de *Quercus* encontramos a *Papiliotrema flavescens* y finalmente asociadas a la corteza del mismo, *Debaryomyces fabryi* y *Saccharomyces* (TM212).

En el Cerro de las Mitras, se lograron registrar, además de todas las especies de *Candida* antes mencionadas (**Tabla 1**), especies particularmente

asociadas a la corteza de los encinos presentes en este sitio: *Debaryomyces nepalensis*, *Kluyveromyces lactis*, y *Lachancea thermotolerans*, estas dos últimas presentes también en el suelo y sobre *Phanerophlebia umbonata*, respectivamente. Por otro lado, tenemos a *Aureobasidium subglaciale*, *Debaryomyces hansenii*, *Kluyveromyces marxianus* y *Papiliotrema laurentii* asociadas al filoplano de estos mismos encinos y finalmente, a partir de *P. umbonata*, se aisló *Aureobasidium melanogenum* y *Naganishia globosa*.

Siguiendo con las áreas de estudio restantes, en el Cerro de la Silla se encontró *Candida orthopsilosis* en la corteza de *A. madrensis* como ya se ha mencionado. También se registró *Kurtzmaniella cleridarum* en flores de *E. viereckii* y se aisló *Ogataea naganishii* y *Thyronectria concentrica* de la superficie de *Agave*. De las flores de *Justicia spicigera* se aisló *Starmerella sorbosivorans* y por último *Wickerhamomyces anomalus* y *W. strasburgensis* se encontraron asociadas a la corteza y filoplano de *A. madrensis*, respectivamente.

Finalmente, en Icamole, asociadas a anacahuita se encontró *Candida corydali*, *Millerozyma koratensis* (IC714) y *Saccharomycopsis fibuligera* (IC727), de estas dos últimas se aislaron otras cepas a partir de suelo en el caso de *Millerozyma* (IC1026) y de *Saccharomycopsis* se aislaron de ocotillo (IC936) y *Jatropha dioica* (IC325). De esta última planta (*J. dioica*) se aisló también *Geosmithia lavendula*. Por último, tenemos a *Myrmaecium rubricosum* y *Naganishia albidosimilis* encontradas sobre la planta herbácea *N. hispida* y *Yamadazyma paraphyllophyla* detectada en suelo.

8.4 Análisis estadístico mediante el índice de Jaccard

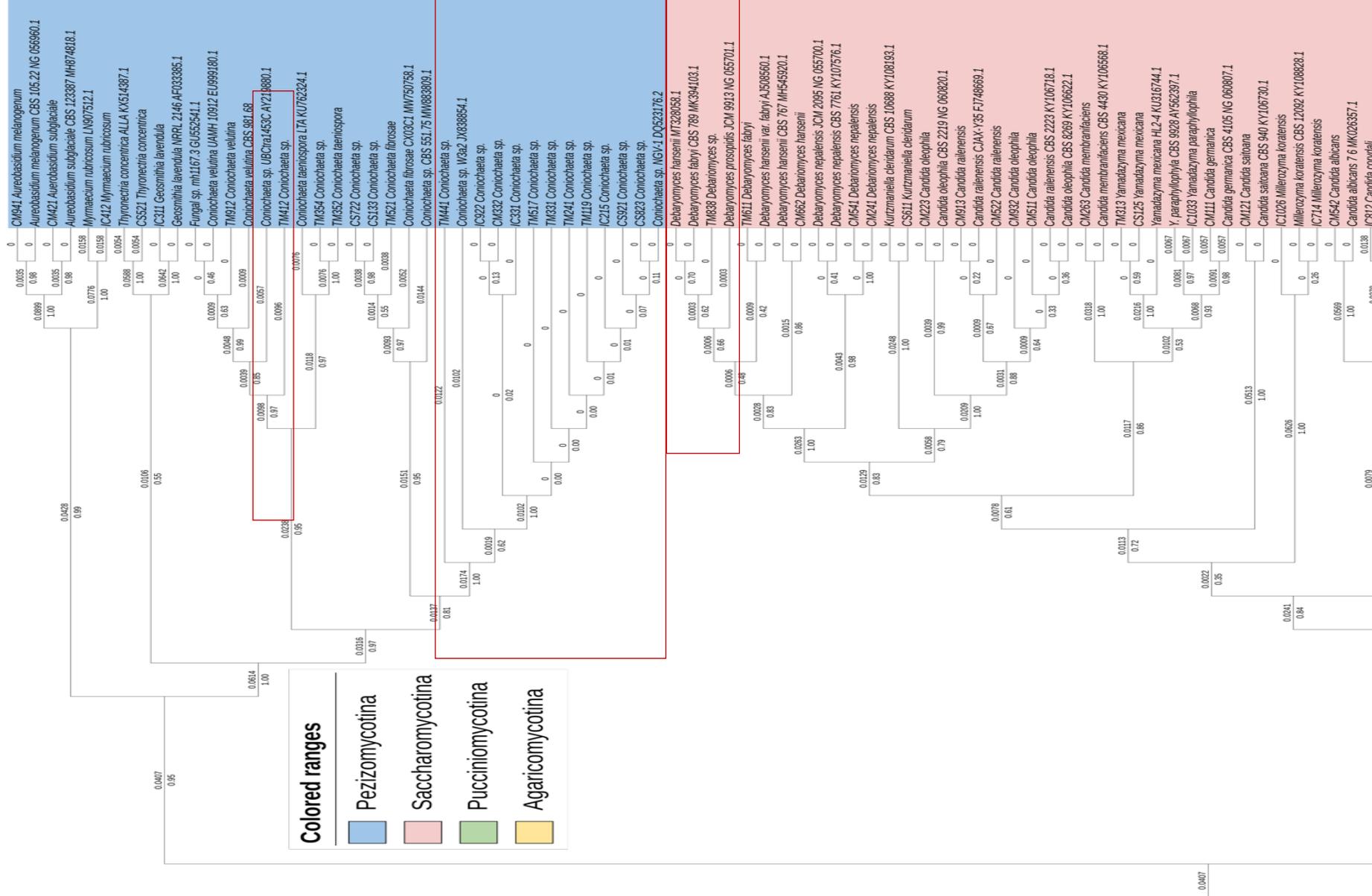
La Tabla 2 muestra la matriz de similitud en la diversidad entre cada localidad representada con base al índice de Jaccard. En esta se observa que las comunidades de levaduras de La Trinidad (TM) y el Cerro de La Silla (CS) comparten más especies entre sí (15%), siendo estas representadas por *Coniochaeta* y *Torulaspota delbrueckii* y *Yamadazyma mexicana*; mientras que el valor más bajo (5.26%) corresponde a el Cerro de La Silla (CS) e Icamole (IC) que comparten únicamente al género *Coniochaeta*.

Tabla 1. Matriz de similitud según el índice de Jaccard. En negritas se distingue el valor mas alto, el cual corresponde a los sitios de La Trinidad y el Cerro de La Silla y el mas bajo entre este ultimo e Icamole. TM = La Trinidad, CM = Cerro de Las Mitras, CS = Cerro de La Silla, IC = Icamole.

% SIMILITUD				
	TM	CM	CS	IC
TM	100.00%			
CM	9.68%	100.00 %		
CS	15.00%	6.90%	100.00 %	
IC	9.52%	6.90%	5.26%	100.00%

8.5 Construcción del Cladograma

La **Figura 4** muestra el cladograma construido con la herramienta iTOL y el software MEGAX a partir de las secuencias del dominio D1/D2. En él se observan cada una de las cepas aisladas y su pariente más cercano en las bases de datos. En la figura 3a se observa la proporción entre los filos Basidiomycota y Ascomycota, mientras que la 3b muestra cada uno de los subfilos en los que se agruparon nuestros aislados. Lo más destacado de este árbol es el clado formado en su mayoría por nuestras cepas de *Coniochaeta sp.* y *Coniochaeta sp. W3a2* (GenBank: JX838854.1) y *Coniochaeta sp. NGV-1* (GenBank: DQ523176.2) las cuales, evidentemente, no tienen asignadas formalmente un nombre de especie. Nuestra cepa de *Debaryomyces* TM838 parece estrechamente relacionada con *D. hansenii* (GenBank: MT320858.1), *D. fabryi* CBS 789 (GenBank: MK394103.1) y *D. prosopidis* JCM 9913 (GenBank: NG_055701.1) similar a lo que ocurre con *Saccharomyces* TM212 que forma su propio clado con *S. paradoxus* CBS 1026 (GenBank: KY109446.1), *S. cerevisiae* UCDFST 66-1051 (GenBank: MH595054.1) y *S. cariocanus* CBS 7994 (GenBank: KY109236.1). Debido a que ambas cepas tuvieron una identidad del 100% con más de una especie, no fue posible asignarle formalmente dicha categoría y ambas requerirán de estudios posteriores para tal fin.



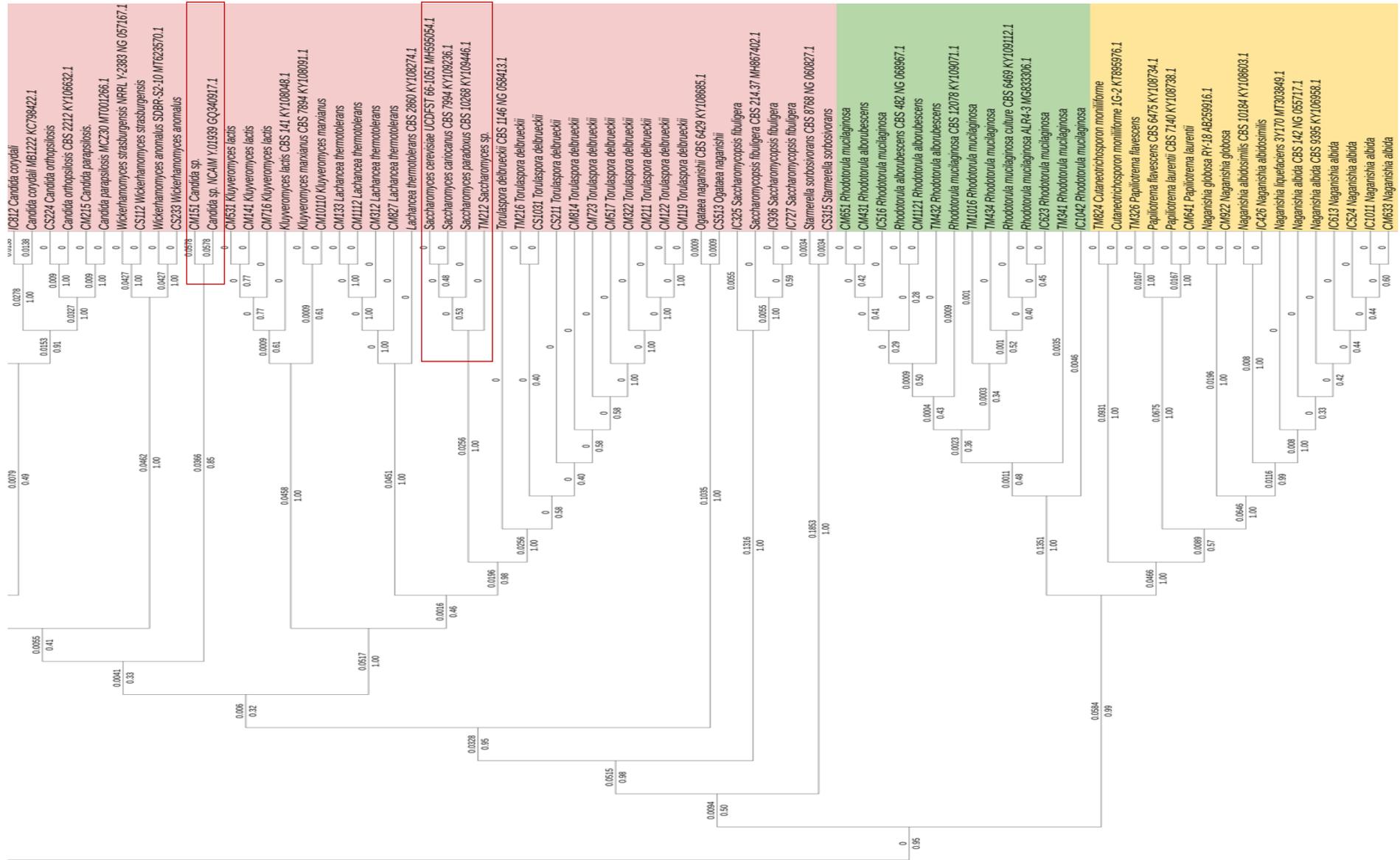


Figura 4. Cladograma donde se muestra los parientes más cercanos de cada cepa según los registros de la base de datos de GenBank. Los distintos subfilos en los que se agrupan se observan en colores, mientras que encerrados en rojo se indican aquellos clados que agrupan las cepas cuya identidad no pudo definirse por completo y su(s) respectivo(s) pariente(s). El bootstrap se muestra en la parte inferior de las ramas, mientras que la distancia genética se encuentra en la parte superior.

9. DISCUSIÓN

9.1 Analisis de secuencias y cladograma

En base a los resultados de la secuencia nucleotídica de los dominios D1/D2 de la subunidad mayor del ribosoma 28S, a partir de 90 muestras, lo cual arrojó un total de 47 especies diferentes pertenecientes a 22 géneros. La mayoría de las cepas pudieron ser identificadas a nivel de especie, ya que cumplieron con el criterio de identidad mayor al 98% e incluso 100% (Aljohani *et al*, 2018; Into *et al*, 2020). En caso contrario, es decir, cuando la identidad resultó ser menor al 98%, solo se identificaron hasta nivel de género.

El caso más drástico fue el de *Candida sp.* CM151 y *Candida sp.* NCAIM Y.01939 las cuales comparten un % 89.38 de identidad. Este alto grado de divergencia en la secuencia sumado al hecho que su pariente más cercano no está descrito del todo, nos hace inferir que la cepa CM151 se trata de una especie no descrita del género *Candida*.

En el cladograma se encuentran agrupadas en su propia rama, incluso alejadas de otros miembros de *Candida*, lo cual nos hace dudar si realmente tanto nuestra cepa como su homónimo de la base de datos pertenezcan al género *Candida*. Con el fin de resolver este dilema, se requerirá de un estudio más extenso para tener certeza de su posición taxonómica.

Por otro lado, tenemos aquellas cepas cuya identidad fue del 100% con más de una especie en la base de datos. En primer lugar tenemos a *Debaryomyces sp.* TM838 cuyos parientes más próximos son *Debaryomyces hansenii* (GenBank: MT328058.1), *D. fabryi* CBS 789 y *D. prosopidis* JCM 9913; en segundo lugar está *Saccharomyces sp.* TM212 quien exhibe lo propio con *Saccharomyces cerevisiae* UCDFST 66-1051, *S. cariocanus* CBS 7994 y *S. paradoxus* CBS 10268. Sin embargo, como se resalta en la **Figura 4**, la relación taxonómica dentro de ambas ramas queda un poco más clara, observando así que la cepa TM838 está más relacionada con *Debaryomyces hansenii* y *D. fabryi* CBS 789 que con *D. prosopidis* JCM 9913, la cual se encuentra relativamente excluida. Con esto podríamos asumir que nuestra cepa TM838 corresponde a *Debaryomyces hansenii* o *D. fabryi*. Con respecto

a *Saccharomyces sp.* TM212 la cual también se agrupa con otras 3 especies, se observa en el cladograma que esta está más estrechamente relacionada con *Saccharomyces paradoxus* CBS 10268 con un bootstrap de 0.53 a diferencia de las otras dos en el que este es de 0.48. Suponemos que esta cepa pertenece a la especie *S. paradoxus*, pero como ocurre con *Debaryomyces sp.* TM838, para tener certeza se requerirá un análisis con mayor profundidad.

Por último, tenemos al género *Coniochaeta* del cual algunas cepas no pudieron ser identificadas de manera concluyente. En la **Tabla 2** y en la **Figura 4** se encuentran en negritas y encerrados en rojo respectivamente. Por un lado, están las cepas CS722 y CS133, ambas con una identidad del 97% con *Coniochaeta sp.* CBS 551.75.

Esto las coloca fuera de los estándares para considerarse como la misma especie, pero además, siendo el pariente más cercano de estas, la cepa CBS 551.75 no está identificada por completo; además en el cladograma se encuentran agrupadas nuestras cepas mientras que la CBS 551.75 está alejada de estas, por lo cual podemos asumir como mínimo que las cepas CS722 y CS133 pertenecen a la misma especie (ambas fueron colectadas en el mismo sitio) la cual es distinta a la CBS 551.75 a pesar que esta sea su pariente más cercano. Además también se observó que *C. fibrosae* resultó más cercana a ellas que CBS 551.7 en el cladograma, a pesar que el alineamiento no arrojó a *C. fibrosae* como coincidencia con CS722 o CS133.

Por otro lado, tenemos a las cepas TM119, TM517, TM331, TM241, las cuales tienen una identidad del 98% con *Lecythophora sp.* W3a2 (ahora *Coniochaeta*), mientras que CS823, CS921, IC215, IC331, IC922 y CM332 están más relacionados con *Coniochaeta sp.* NGV-1 con un 98% - 100% de identidad. Sin embargo, en el cladograma no se agrupan de esta forma, por lo contrario, todas estas cepas formaron un solo clado, con excepción de CM332, IC331 y IC922 que se agruparon en un clado separado.

Debido a esto, podría ser que todas estas cepas, incluyendo a NGV-1 y W3a2 estén estrechamente relacionadas y no sea suficiente un solo marcador para resolver su taxonomía.

Si bien podríamos afirmar que tanto CBS 551.75 como NGV-1 y W3a2 son especies distintas, el hecho que no esten del todo identificadas nos permite asumir que todas las cepas relacionadas con estas pertenecen a especies no descritas anteriormente, pero como ocurre en el caso de *Saccharomyces sp.* TM212, *Debaryomyces sp.* TM838 y *Candida sp.* CM151 se requiera la comparacion de mas marcadores moleculares o incluso el genoma completo para determinar su verdadera posicion taxonomica y asignarles formalmente la categoria de especie.

9.2 Método de aislamiento, enfoque y su impacto en la diversidad

En este trabajo se utilizó un enfoque basado en el aislamiento de levaduras cultivables utilizando el método de enriquecimiento, es decir, en el que se utiliza un medio selectivo y rico en nutrientes para favorecer el crecimiento de los microorganismos de interés.

De este modo se aislaron e identificaron (en su mayoría) 90 cepas distintas agrupadas en 22 géneros y 47 especies, de las cuales un 83% (39) pertenecen al filo Ascomycota, mientras que el 17% restante (8), al filo Basidiomycota; sin embargo, se ha observado que esta proporción puede variar dependiendo del método de aislamiento y el enfoque del estudio. Por ejemplo, Nasanit y cols. (2015) reportaron una predominancia de Basidiomicetos al analizar la superficie de hojas de arroz (*Oryza sativa*) mediante un enfoque independiente de cultivo, es decir, analizaron directamente el ADN a partir de la superficie de las hojas.

Al analizar muestras de cacao fermentado mediante secuenciación masiva *Hanseniaspora sp.* mientras que, al aislar levaduras de las mismas muestras, *Saccharomyces cerevisiae* fue la levadura aislada con mayor frecuencia (Arana-Sanchez *et al*, 2015).

Más recientemente (Sha *et al*, 2018), se han comparado ambos métodos para evaluar la diversidad de levaduras y mohos presentes en fermentados tradicionales de la India, dando como resultado la predominancia de levaduras ascomycetas al utilizar métodos dependientes de cultivo.

Otra variable que influye en el resultado de la diversidad encontrada en este tipo de estudios, es el método de aislamiento, el cual se puede realizar con un enriquecimiento previo de las muestras y posterior siembra en un medio selectivo (como se hizo en este trabajo) o la siembra directa en el medio selectivo a partir de un lavado de las muestras. Por ejemplo, Koricha y su grupo (2019) aislaron levaduras a partir de distintos tejidos de plantas (hoja, fruto, corteza y raíz) utilizando el método de enriquecimiento y lograron identificar un mayor número de Ascomycetos en contraste con la única especie de Basidiomiceto que aislaron (*Rhodotorula mucilaginosa*); de igual forma Aljohani y cols. (2018) hicieron lo propio a partir de suelo agrícola, y encontraron mayor diversidad de especies de ascomicetos y solo una basidiomiceta (*Cryptococcus laurentii*).

Por lo contrario, se ha reportado que al aislar levaduras a partir de un lavado de las muestras (generalmente con solución salina) y sin un enriquecimiento previo, resulta en un mayor número de basidiomicetos que ascomicetos aislados, tal como lo reportó de Azeredo y cols. (1998) quienes aislaron un importante número de basidiomicetas (79.6% de sus aislados) a partir de caña de azúcar en comparación con los pocos ascomicetas que aislaron; Nasanit y su grupo obtuvieron resultados similares al analizar el filoplano de plantas de arroz (2015) y maíz (2016) y lo mismo se reportó más recientemente en plantas de maíz (Into *et al*, 2020).

Algunos autores atribuyen esta discrepancia a las propias levaduras, ya que aquellas que pertenecen al filo Basidiomycota son de crecimiento lento debido a que la mayoría metaboliza moléculas complejas en comparación con los miembros de Ascomycota, los cuales son más eficientes para metabolizar azúcares simples.

Es por eso que al utilizar un enriquecimiento previo al aislamiento, las levaduras ascomicetas tienen ventaja y se reproducen con más facilidad que las basidiomicetas, puesto que el medio de cultivo contiene glucosa y maltosa. Si bien en algunos de estos casos se investigaron matrices muy particulares (filoplano de arroz y maíz, caña de azúcar, *starters* de productos fermentados), se demuestra la influencia que el enfoque y método de

aislamiento tienen en la diversidad reportada, y este trabajo no es la excepción.

Este estudio reporta una mayor proporción de levaduras del filo Ascomycota con respecto a Basidiomycota empleando un enfoque hacia levaduras cultivables y con un enriquecimiento previo al aislamiento, lo cual es similar a lo que se ha reportado a partir de matrices similares (filoplano, corteza, frutos y suelo) (Aljohani *et al.*, 2018; Koricha *et al.*, 2019) con la excepción de haber encontrado más especies de basidiomicetos a diferencia de estos casos en los que solo encontraron una sola.

Finalmente, es importante considerar que un estudio de biodiversidad independiente de cultivo puede enriquecer la información sobre la comunidad microbiana al analizar el ADN ambiental pero no necesariamente nos indica la presencia de estos microorganismos, puesto que el material genético no permite inferir si los microorganismos (en nuestro caso, levaduras), realmente están vivos, muertos o inactivos. Sin embargo, ambas técnicas se complementan ya que también nos indica el estado fisiológico de las levaduras viables pero no cultivables en un nicho determinado.

9.3 Diversidad y distribución de los aislados

En este trabajo se identificaron especies del filo Ascomycota que incluyen los géneros *Aureobasidium*, *Candida*, *Coniochaeta*, *Debaryomyces*, *Geosmithia*, *Kluyveromyces*, *Kurtzmaniella*, *Lachancea*, *Millerozyma*, *Myrmaecium*, *Ogataea*, *Saccharomyces*, *Saccharomycopsis*, *Starmerella*, *Thyronectria*, *Torulasporea*, *Wickerhamomyces* y *Yamadazyma*; mientras que el filo Basidiomycota se halló representado por *Cutaneotrichosporon*, *Naganishia*, *Papiliotrema* y *Rhodotorula*.

La mayoría de las cepas provienen de sustratos y tejidos vegetales como la corteza (o la superficie en caso de las cactáceas), el filoplano, flores y frutos. Otras más se aislaron del suelo adyacente a estas plantas.

El género *Coniochaeta* incluye levaduras pleomórficas generalmente endófitas que consiste en especies húmicas, lignícolas e incluso coprofilas. Se han aislado a partir de briofitas, plantas vasculares, líquenes (Arnold *et al.*,

2021), suelo (Zhong *et al*, 2022) y hasta depósitos de uranio (Vazquez-Campos *et al*, 2014), indicando que son especies cosmopolitas capaces de proliferar en diversos ambientes. En nuestro caso se lograron aislar numerosas cepas de *Coniochaeta* de algunos tejidos de plantas vasculares.

Existen cepas que fueron descritas y/o se han aislado con éxito a partir de bosques de pino-encino y boreales, como *C. nivea*, *C. montana* y *C. elegans* (U'Ren, *et al.*, 2019; Arnold *et al*, 2021) y de coníferas en particular como *Platycladus orientalis* (Cupressaceae) de donde se aisló y describió *C. endophytica* (Harrington, A. *et al*, 2019).

En comparación, en este estudio se identificaron 3 especies a partir del filoplano y corteza de *Pinus* y *Quercus* en La Trinidad (*C. fibrosae*, *C. velutina* y *C. taeniospora*) mientras que el resto de las cepas, las cuales solo fue posible identificar a nivel de género, se obtuvieron de otras especies vegetales incluyendo algunas cactáceas en Icamole y el Cerro de la Silla. Esto último es interesante ya que no se han encontrado reportes sobre presencia de *Coniochaeta* en cactáceas.

En segundo lugar, tenemos al genero *Candida* del cual se aislo e identifico un mayor numero de especies. Cabe destacar que la mayor diversidad se registro en el Cerro de Las Mitras, encontrando *C. albicans*, *C. germanica*, *C. oleophila*, *C. membranifaciens*, *C. parapsilosis*, *C. saitoana* y *C. railenensis*; mientras que *C. orthopsilosis* y *C. corydali* se encontraron en el Cerro de La Silla e Icamole respectivamente.

La mayoría de estas cepas se encontraron asociadas a la corteza de los arboles (*Quercus sp.* en Las Mitras y *A. madrensis* en Anteriormente se ha reportado una relativa abundancia y diversidad del genero *Candida* en la region de Iquitos, Peru, en la selva amazonica (Vegas *et al*, 2020).

En dicho estudio, se prepararon aislados a partir de frutas tropicales y se lograron identificar 6 especies distintas: *C. tropicalis*, *C. quiercitrusa*, *C. intermedia*, *C. jaronii*, *C. carpophila*, *C. akabanensis* y *C. pseudohaemulonii*, representando ademas el segundo lugar en abundancia en el area de estudio despues del genero *Hanseniaspora*. Ademas en otros estudios se ha

reportado al genero *Candida* como el mas frecuente (Koricha *et al*, 2019), reportando *C. albicans*, *C. blattae*, *C. catenulate*, *C. humilis*, *C. glabrata*, *C. intermedia*, *C. melibiosica* y *C. pararugosa* en dos localidades de Etiopia: el distrito de Jimma y el bosque de Belete-Gera, siendo el primero una zona poblada de la cual se aislo *C. albicans*. Esto ultimo parece similar a nuestro reporte de *C. albicans* en la zona de “La Cama de Piedra” en el Cerro de Las Mitras, que es un sitio muy frecuentado con fines recreativos. Al ser ambos sitios lugares con actividad humana, no es improbable encontrar esta especie asociada a la zona, ya que *C. albicans* suele ser de origen antropogenico y ademas es un patogeno oportunista.

Por otro lado, tenemos nuestras cepas de *Torulaspota delbrueckii*. La mayoria de las cepas “domesticadas” de *Torulaspota* se han aislado con mayor frecuencia de ambientes vinicolas y es una de las levaduras mas utilizadas en esta industria (Michel *et al*, 2016) incluso recientemente, Cisneros y Rodríguez (2019) identificaron 2 cepas de *Torulaspota delbrueckii* (UV10-1A y UV6-1A, respectivamente) aisladas a partir de un fermentado de uva comercial. Sin embargo, tambien se han encontrado cepas silvestres en algunos frutos y superficies vegetales, incluyendo la porcion humeda o limo bacteriano en la corteza de encinos (*Quercus spp.*) o exudados de resina de algunas fagaceas como *Prosopis* (Buzzini *et al*, 2017).

La mayoría de nuestros aislados tambien fueron obtenidos de corteza de encino en La Trinidad y Cerro de las Mitras; adicionalmente tambien se reporta una cepa encontrada en una muestra de corteza de *Amyris madrensis* del Cerro de La Silla y una mas aislada a partir de suelo de La Trinidad. Por otra parte, se ha aislado *Torulaspota* a partir de suelo en zonas con arboles frutales (Vadkertiova *et al*, 2019) y ademas, Igharo y su grupo (2022) caracterizaron el genoma de una cepa de *T. quercuum* aislada de suelo adyacente a *Tilia* (Malvaceae), y tambien se ha descrito a *T. jiuxiensis* a partir de madera en descomposicion (Chu *et al*, 2022). Esto indica la variedad de habitats en donde se puede encontrar a este grupo y que no solamente se limita a ambientes vinicolas.

Debaryomyces es una levadura conocida por su capacidad halotolerante (Alba-Lois, 2017; otros) y por habitar ambientes marinos, de donde fue aislada

por primera vez. Sin embargo se ha demostrado su presencia en otros sustratos, por ejemplo plantas como *Helleborus foetidus* (Ranunculaceae) en donde se encontro *D. hansenii* y *D. maramus* en nectar (Brysch-Herzberg, 2004); *D. nepalensis* y *D. hansenii* asociadas a *Citrus medica* (Rutaceae) y *Garcinia macrophylla* (Clusiaceae) respectivamente (Vegas et al, 2020) y tambien en cactaceas (Rosa et al, 1994).

A diferencia de este estudio en donde reportamos *D. hansenii* exclusivamente en filoplano de *Quercus sp.* (Fagaceae), *D. nepalensis* en la corteza y suelo en el Cerro de las Mitras; *D. fabryi* tambien se encontro asociada a la corteza de *Quercus* en La Trinidad, mientras que en el suelo de la misma zona se aislo una cepa de *Debaryomyces sp.*

Otras cepas aisladas del suelo son reportadas por Duarte y su grupo (2016) y Menezes y cols (2019) en la antartida, estos ultimos logrando aislar *D. hansenii* directamente del permafrost.

El género *Saccharomyces* se encuentra habitando la superficie de arboles de la familia Fagaceae, como por ejemplo el genero *Quercus* (Buzzini, 2017). Entre nuestros muestreos en La Trinidad y el Cerro de las Mitras se aislaron algunas cepas provenientes de arboles de este genero; sin embargo, solo una fue identificada como *Saccharomyces sp.* (TM212), encontrada en una muestra de La Trinidad, especificamente aislada de corteza. Cisneros (2019) logró identificar algunas cepas de *S. cerevisiae* y *S. boulardii*, pero a diferencia de la nuestra, estas se aislaron de inflorescencias de cactaceas en Icamole.

Estos reportes hicieron que se seleccionara Icamole como area de estudio, esperando encontrar algunas levaduras del genero *Saccharomyces*, sin embargo, como lo demuestran los resultados, esto no fue asi. Cabe destacar que los muestreos realizados por Cisneros fueron durante la epoca de floracion (marzo-abril), mientras que los nuestros tuvieron lugar en octubre, cuando ya los frutos se han desarrollado.

Esto pudo haber impactado en la diversidad de las levaduras aisladas, ya que se ha reportado que la diversidad de levaduras varia según la temporada (Glushakova & Chernov, 2010; Gabor et al, 2017).

Otra levadura aislada con frecuencia en este trabajo fue *Rhodotorula*. Se sabe que es una levadura ubicua, y se ha encontrado en ecosistemas acuáticos desde fondo marino hasta costas (Nagahama *et al*, 2003; ab Ghani *et al*, 2014), ambientes terrestres (Into *et al*, 2020; Fernandez-Pacheco *et al*, 2021), alimentos (Bintsis Thomas, 2021) y como causante de infecciones en pacientes inmunocomprometidos (Jarros *et al*, 2020).

Incluso, se ha aislado *Rhodotorula* de la nieve en la antártida (de Menezes *et al*, 2019) lo cual indica su gran adaptabilidad a ambientes extremos. Esto último podría ser análogo a nuestro hallazgo en Icamole, del cual logramos aislar *R. mucilaginosa* a partir del suelo.

Otros autores reportan cepas de *Rhodotorula mucilaginosa* en bosque de pino (Allahkarami *et al*, 2021), específicamente del suelo y la hojarasca. En comparación, encontramos *Rhodotorula* en bosque de pino (La Trinidad) en donde se logró identificar *R. mucilaginosa* y *R. alborubescens* sobre *Pinus* (corteza y filoplano) y hojarasca, la cual estaba conformada mayormente por restos de acículas y corteza de pino.

También se ha logrado aislar *R. mucilaginosa* del suelo y hojarasca presentes en bosque de coníferas (Allahkarami *et al*, 2021). Por otro lado, en el Cerro de las Mitras donde abundaban árboles del género *Quercus* solamente se encontró *R. alborubescens* asociada a estos (filoplano y corteza) y a helechos del género *Phanerophlebia*.

En otros estudios se reportan cepas de *Rhodotorula* aisladas a partir de flores y frutos de plantas en bosques tropicales, así como del suelo de dichos bosques en donde se identificó *R. mucilaginosa* (Koricha *et al*, 2019; Fernandez-Pacheco *et al*, 2021) y *R. dairenensis* (Fernandez-Pacheco *et al*, 2021). Además, Into y su grupo (2020) aislaron *R. mucilaginosa*, *R. toruloides* y *R. paludigena* a partir del filoplano de maíz cultivado, y *R. diobovata* de hojas de algodón (Osman *et al*, 2022). Esto demuestra la variedad de especies y la diversidad de plantas sobre las cuales se puede encontrar a esta levadura.

Adicionalmente, Into y cols (2020) encontraron toda una gama de especies de levaduras en estas plantas de maíz, incluyendo algunas especies que también se reportan en este trabajo, como por ejemplo *Papillotrema*

(Basidiomycota) y *Wickerhamomyces anomalus* (Ascomycota) las cuales también reportamos en este estudio, siendo aisladas de filoplano de *Quercus* sp. (Fagaceae) y *Amyris madrensis* (Rutaceae) respectivamente.

La distribución de nuestras cepas de *Papiliotrema*, contrasta con lo reportado en la literatura, (Glushakova & Chernov, 2010; Glushakova & Kachalkin, 2023) en donde aislaron *P. laurentii* (reportada como *Cryptococcus laurentii*) a partir del filoplano en bosque de abeto (Glushakova & Chernov, 2010), mientras que nosotros la encontramos en el Cerro de las Mitras, una zona con impacto humano importante al ser un sitio utilizado con fines recreativos; y *P. flavescens* la cual en este estudio se aisló del filoplano en bosque de pino-encino, en La Trinidad, mientras que Glushakova y Kachalkin (2023) reportaron su presencia en filoplano de árboles en zonas urbanizadas.

A pesar de esta diferencia en la distribución, el nicho en el cual se detectan es el mismo: el filoplano, por lo cual se puede inferir que este género tiene preferencia por el follaje. *Wickerhamomyces* se ha encontrado en maíz cultivado (Into *et al*, 2020) y *Camellia sinensis* (Theaceae) (Kanpiengjai *et al*, 2023) mientras que aquí se reportan dos especies: *W. anomalus* y *W. starsburguensis* en corteza y filoplano de *Amyris madrensis* (Rutaceae) en el Cerro de la Silla.

Tomando en cuenta que ambas fueron encontradas en la misma planta y que solamente se comparó la secuencia LSU, consideramos que hacen falta estudios adicionales para determinar si se trata de una o de otra, ya que, a pesar de que el análisis nos arrojase dos cepas diferentes, pudiera ser que hubiese algún sesgo en las secuencias debido a la secuenciación.

Inferimos que es una situación similar con nuestras cepas de *Kluyveromyces*: *K. marxianus* y *K. lactis* las cuales se aislaron de filoplano y corteza de *Quercus* respectivamente, en el Cerro de las Mitras.

Entre nuestras muestras restantes, *Lachancea thermotolerans* destaca por haber sido aislada de un helecho, *Phanerophlebia umbonata* (Dryopteridaceae) en el Cerro de las Mitras y no de los árboles como se ha reportado antes en *Pseudotsuga* (Pinaceae) y *Prosopis* (Fabaceae) (Buzzini

et al, 2017). Dentro de nichos antropogénicos, ha sido aislada de uvas provenientes de viñedos de donde (Agarbatí *et al*, 2020).

Aureobasidium melanogenum, otra de nuestras cepas identificadas en este trabajo, fue aislada también del helecho antes mencionado, y adicionalmente, en el filoplano de los encinos presentes en esa zona encontramos a *A. subglaciale*.

Este género de carácter ubicuo pertenece a un grupo denominado “levaduras negras” que se caracterizan por la melanización de su pared; se ha encontrado en suelo y plantas (Vadkertiova *et al*, 2018; Salazar-Cerezo *et al*, 2020) como, por ejemplo, en filoplano de *Crataegus* (Rosaceae), pero también como comensal en colonias de hormigas del género *Atta* (Bizarria *et al*, 2021), lo cual resalta su naturaleza cosmopolita.

En nuestro caso no se optó por tomar muestras de insectos u otros animales, puesto que eso implicaría un estudio mucho más extenso y exhaustivo, pero se sabe que muchas levaduras forman parte del microbioma de un gran número de animales tanto invertebrados como vertebrados (Brysch-Herzberg, 2004; Mittelbach & Vannette, 2017; Bizarria *et al*, 2021).

Finalmente, también del mismo helecho y encinos, aislamos *Naganishia globosa* y *N. albida*, respectivamente. Esta última también la reportamos en la región de Icamole, particularmente de muestras que provienen de *Opuntia microdasys* (Cactaceae) (Tabla 2), en Icamole, la cual es una zona desértica, muy distinta al matorral submontano que se encuentra en el Cerro de las Mitras, lo cual indica una relativa adaptabilidad por parte de *N. albida* en cuanto a ecosistemas se refiere.

9.4 Potencial biotecnológico de los aislados

La evolución de las levaduras ha estado estrechamente relacionada con la actividad humana desde el desarrollo del pan, la cerveza y el vino. Actualmente son utilizadas tanto en la elaboración de alimentos y bebidas (tradicionales e industriales) como en otras aplicaciones biotecnológicas más sofisticadas e investigación.

El ejemplo más común es el de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* utilizada en la elaboración de pan y bebidas fermentadas. Hoy en día es la levadura más conocida y utilizada en biotecnología e investigación. Sin embargo, en los últimos años se ha ido descubriendo el potencial de muchas otras levaduras, que ahora son utilizadas para muchos procesos industriales, como la producción de ingredientes o aditivos para alimentos, polímeros, biocombustibles, biocontrol y agricultura. Algunos ejemplos son *Rhodotorula*, *Torulaspota* y *Candida* las cuales se encuentran representadas por algunas cepas en este trabajo.

Saccharomyces cerevisiae es la levadura más estudiada y la que más relación tiene con la sociedad humana. Es un organismo modelo en muchas áreas de investigación básica y en la industria. Gran parte de ello es por su capacidad de fermentar aun en condiciones aerobias, lo cual se conoce como efecto Crabtree (Pronk *et al*, 1996). Es por ello que *Saccharomyces cerevisiae* es la productora de cerveza por excelencia a nivel mundial además de haber sido la fuente de donde se aisló por primera vez.

A pesar de que esta es su aplicación más conocida, también se han aislado y actualmente se utilizan diversas cepas de *Saccharomyces* en la elaboración de otros alimentos y bebidas como el pan, vino, yogurt, quesos, salsa de soya y chocolate, e incluso en la producción de bioetanol (Hittinger *et al*, 2018; Parapouli *et al*, 2020). En este sentido, Cisneros (2019) y Rodríguez (2019) lograron aislar e identificar diversas cepas de *S. cerevisiae* a partir de otras fuentes como mosto tequilero, uvas, moras silvestres y algunas cactáceas en Icamole.

En contraste, no reportamos alguna otra cepa de *Saccharomyces* a partir de nuestras muestras de cactáceas (las cuales algunas pertenecían a la región de Icamole) ni de otra fuente que no haya sido *Quercus*.

Es probable que debido a la temporada las poblaciones de *Saccharomyces* se hayan visto atenuadas, al menos en las muestras de Icamole, pues la diversidad encontrada en este estudio difiere enormemente de la reportada por los autores antes mencionados, y se sabe que las comunidades de levaduras varía a través del año (Glushakova y Chernov, 2010); además en los trabajos de Cisneros (2019) y Rodríguez (2019) se

utilizo directamente un medio selectivo de mosto cervecero, a modo de seleccionar aquellas levaduras (particularmente *S. cerevisiae*) capaces de tolerar las condiciones del mismo (particularmente la presencia de lupulo) mientras que en nuestro caso se utilizo un medio de enriquecimiento sin la finalidad de seleccionar algun grupo en particular.

A pesar de todo esto, nuestra cepa de *Saccharomyces* TM212 podria poseer el potencial de ser utilizada en alguno de los campos de la industria alimenticia y/o biotecnológica, sin embargo, tendria que evaluarse para tales procesos.

Torulaspota ha sido investigada mayormente por sus propiedades organolepticas y fermentativas en la produccion de vino. *T. delbrueckii* normalmente se utiliza en cocultivo con *S. cerevisiae* para mejorar u optimizar la produccion y perfil de compuestos aromaticos en el vino (Steensels & Verstrepen, 2014).

También se han encontrado cepas de *T. delbrueckii* con la capacidad de fermentar mosto cervecero, consumiendo completamente los azucares del mosto (glucosa, maltosa y maltotriosa), produciendo una cerveza con contenido moderado de etanol y compuestos volatiles y sabores frutales, los cuales son consideradas como características deseables en una cerveza (Michel *et al*, 2016).

Mas recientemente, Cisneros (2019) evaluó la cepa UV10-1A de *T. delbrueckii* para fermentacion de mosto cervecero, sin embargo, esta resulto en un porcentaje de atenuacion (cantidad de azucares consumidos) de 5.5%, el cual fue muy bajo en comparacion a las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* con las cuales la comparo y que resultaron en porcentajes de atenuacion por encima del 30%. Sin embargo, muchas de las cepas de *Torulaspota* utilizadas para la produccion de bebidas alcoholicas, son utilizadas en cocultivo debido a que no fermentan muy bien los azucares, pero son capaces de producir otros compuestos deseables que aportan sabores y aromas al vinos y cervezas (Steensels & Verstrepen, 2014).

Además de *Torulaspota*, entre nuestro cepario resultante de este trabajo, se encuentra algunas cepas de *Lachancea thermotolerans* (CM1112, CM131, CM312, CM827), especie que también se ha estudiado por su potencial como fermentador secundario, siendo capaz de consumir una mayor cantidad de azúcares, pero con una menor producción de etanol que *Saccharomyces cerevisiae* o *Torulaspota*, debido a su efecto Crabtree reducido (Vicente *et al*, 2021).

Adicionalmente, *L. thermotolerans* es capaz de producir ácido láctico, lo cual incrementa la acidez de los vinos y limita la proliferación de microorganismos contaminantes como bacterias ácido lácticas y *Brettanomyces* evitando así la producción de sabores indeseables en el producto final (Morata *et al*, 2021).

Con la misma finalidad, se ha estudiado a *Saccharomycopsis fibuligera*, otra de las especies encontradas en nuestro trabajo, como productora de cerveza sin alcohol, debido a que posee transportadores activos de maltosa y es capaz de consumir casi todos los azúcares en el mosto, resultando en un producto final con un 0.8% de etanol (Methner *et al*, 2022). De hecho, es utilizada en la elaboración de vino de arroz en el sudeste de Asia, otorgando sabores florales, frutales y amielados debido a su alta producción de ésteres y alcoholes superiores (Xie *et al*, 2021).

Las levaduras son también una fuente de carotenoides naturales, que son terpenoides pigmentados con diversas aplicaciones en el mercado. Los pigmentos de origen biológico poseen propiedades antioxidantes y actúan como provitamina A, lo cual los convierte en una excelente alternativa a los colorantes químicos utilizados en alimentos (Kim *et al*, 1997).

Se conocen algunas levaduras mayormente basidiomicetas capaces de producir pigmentos carotenoides (Chreptowicz *et al*, 2019). De las que se conocen, *Rhodotorula* es la más estudiada y de la cual se ha logrado aislar un mayor número de cepas silvestres con potencial biotecnológico en este aspecto. Sharma y Ghoshal (2021) caracterizaron una cepa de *R. mucilaginosa* MTCC-1403 y evaluaron su producción de carotenoides para su uso en confitería. Determinaron que los pigmentos producidos estaban

formados en mayor parte por γ - y β -carotenos, torularhodina y toruleno los cuales incluso incrementaron la aceptabilidad de los consumidores al ser adicionados en una concentración del 0.1%.

En otro estudio se logró optimizar la producción de carotenoides en otra cepa de *R. mucilaginosa* para su producción en la industria, obteniendo un rendimiento de 223.5 $\mu\text{g/g}$ de peso seco (Allahkarami *et al*, 2021). También se han encontrado cepas de *R. diobovata* capaces de acumular lípidos, sobretodo ácidos grasos monoinsaturados, hasta en un 46.68%, con la finalidad de producir biodiesel de muy buena calidad (Osman *et al*, 2022).

Adicionalmente, se han caracterizado otras especies de levaduras capaces de producir enzimas y/o carotenoides, dentro de las cuales hay productoras de lipasas y celulasas con aplicación industrial (Chreptowickz *et al*, 2019), no solo del género *Rhodotorula*, sino también *Sporobolomyces* y *Cystobasidium*, con lo cual se respalda la necesidad de la bioprospección para la obtención de levaduras con potencial biotecnológico y comercial en este aspecto.

Otro grupo de levaduras de importancia científica e industrial encontradas en este trabajo son nuestras cepas de **Candida**: *C. oleophila*, *C. railenensis*, *C. membranifaciens*, *C. saitoana*, *C. corydali*, *C. germanica*, *C. parapsilosis*, *C. orthopsilosis* y *C. albicans*, de las cuales las tres últimas están reportadas como patógenas (Ortega-Riveros, 2015, Babamahmoodi *et al*, 2022).

Las infecciones por *Candida* son muy frecuentes en pacientes inmunocomprometidos y frecuentemente se descubren cepas nosocomiales resistentes a los antifúngicos, especialmente en unidades de cuidados intensivos (Aldejohann *et al*, 2021).

Es por esto por lo que nuestras cepas silvestres de *C. parapsilosis* CM215, *C. orthopsilosis* CS228 y *C. albicans* CM542 pueden ser una herramienta útil en el estudio de fármacos antifúngicos en este tipo de fungemias y así tener un mejor entendimiento de los mecanismos de resistencia en estas (y quizás otras) especies de levaduras, o incluso, probar la actividad que algún tipo de molécula biológica sobre estas. *C. albicans* es

un patógeno oportunista y el principal causante de las candidemias en el mundo.

Tras la reciente pandemia, se reportaron numerosos casos de candidiasis oral en pacientes de COVID-19 bajo tratamiento de antibióticos y corticosteroides en donde se identificaron diversas especies de *Candida*, principalmente *C. albicans* (Babamahmoodi *et al*, 2022). También se han aislado cepas de *C. parapsilosis* de pacientes hospitalizados (Papp *et al*, 2020), con las cuales se han hecho pruebas de resistencia cruzada a triazoles.

Si bien nuestras cepas fueron aisladas de ambientes completamente ajenos al nosocomio son una herramienta con potencial en la investigación clínica. Sin embargo, no todas las cepas de *Candida* son de importancia clínica, también las hay aquellas de interés biotecnológico, pues algunas especies, incluyendo cepas de *C. albicans* no patógenas son capaces de producir surfactantes, los cuales tienen aplicación en la industria cosmética, de la salud y alimenticia (da Silva *et al*, 2021).

Otras, por ejemplo, son capaces de fermentar D-xilosa, una característica que puede ser utilizada en la producción de bioetanol a partir de biomasa lignocelulósica, como se ha reportado para *C. tropicalis*, *C. ligosa*, *C. guilliermondii* y *C. famata* (Kaewwichian *et al*, 2019).

Aureobasidium pertenece a un grupo denominado “levaduras negras” debido a que la mayoría es capaz de producir melanina, lo cual les da ese color característico. Además de la melanina, también son capaces de sintetizar y secretar pululano, un α -D-glucano lineal compuesto de unidades de maltotriosa unidas por enlaces α -1,6, y cuya biosíntesis ha sido estudiada en *A. pullulans* y *A. melanogenum* (Xin *et al*, 2021; Fei *et al*, 2021). Se utiliza como aditivo en la producción de cápsulas, tabletas, esmaltes, películas comestibles en gaseosas, goma de mascar y en productos de higiene bucal.

Es por esto que se ha buscado producir este compuesto de manera más eficiente ya sea utilizando herramientas moleculares, o bien, mediante la bioprospección de nuevas cepas con mejores capacidades, como lo podrían ser nuestras 2 cepas de *Aureobasidium*: CM421 (*A. subglaciale*) y CM941 (*A. melanogenum*).

Además de pululano, existen cepas capaces de producir otro tipo de glucanos que tienen algún efecto beneficioso para la salud, como se describe en el estudio de Raghavan y cols. (2021) en donde se trató a pacientes de COVID-19 con glucanos β -1,3 y β -1,6 producidos por las cepas AFO-202 y N-163 de *A. pullulans* y se observó una disminución en los niveles de dímero D e interleucina-6, los cuales tienden a elevarse durante una infección de COVID-19.

Estos resultados indican una disminución en la generación de coágulos y en el riesgo de presentar lo que se conoce como “tormenta de citocinas”, la cual es la principal causa de muerte de esta enfermedad. Así, se podrían evaluar las cepas *A. subglaciale* CM421 y *A. melanogenum* CM941 que, si bien no son *A. pullulans*, al ser otra especie podría producir el mismo tipo de compuestos o incluso otros distintos que pudiesen presentar actividad biológica de algún tipo o propiedades que puedan ser de utilidad en la industria.

10. CONCLUSIONES

1. Se logro identificar exitosamente 73 cepas de un total de 90. Las 17 restantes, que pertenecen a los generos *Candida*, *Coniochaeta*, *Debaryomyces* y *Saccharomyces* requieren de analisis adicionales para poder clasificarlas correctamente; por ejemplo, comparar la region ITS o incluso el genoma completo.
2. El genero *Coniochaeta* tuvo una mayor distribucion, ya que se aislo de las 4 areas de estudio, ademas de encontrarse en una mayor variedad de sustratos que el resto, con lo cual se infiere su naturaleza ubicua.
3. El grupo mas diverso fue *Candida*, con un total de 9 especies mayormente representadas en el Cerro de las Mitras.
4. La mayoría de las especies reportadas en este trabajo tienen algun potencial biotecnologico, siendo las mas notorias de este trabajo *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Torulaspota* y *Candida*.

11. PERSPECTIVAS

Este trabajo da la pauta para el estudio de la biodiversidad de levaduras en nuestro estado y su potencial uso como un recurso biótico renovable. El conocer estos dos aspectos ayudara a comprender la importancia que tiene el conservar nuestras areas naturales al ser una fuente de microorganismos con aplicación biotecnologica. La colección resultante de este trabajo es un banco genético que puede ser aprovechado de manera importante, ya sea para la búsqueda de genes de interés o la optimización de las cepas para la producción de algún metabolito.

La secuenciación masiva es una opción para el tamizaje de genes importantes, o si se busca algo más directo, se puede proceder al diseño de cebadores específicos para los genes que estamos buscando. Por otro lado se podría evaluar la actividad biológica de algunas cepas, ya que se sabe que las levaduras producen el factor *killer* o incluso algunos péptidos con actividad antimicrobiana o antifúngica (Alba-Lois *et al*, 2016; Thyab Gddoa Al-sahlany *et al*, 2020).

Además, podrían probarse algunas como *Kluyveromyces*, *Saccharomyces* y *Torulaspota* para la producción de algunos alimentos y bebidas fermentadas (por ejemplo, queso, yogurth, cerveza o vino). Por otro lado, en las cepas de *Rhodotorula* se podría determinar la producción de carotenoides con posible aplicación industrial o en alimentos o evaluar nuestras cepas de *Aureobasidium* en la producción de glucanos y probar los mismos como tratamiento a algunas enfermedades virales como el SARS-Cov2.

Finalmente, y como ya se menciona anteriormente en este escrito, aquellas cepas cuya identidad quedo sin resolver, específicamente las que pertenecen al género *Coniochaeta*, *Candida sp.* CM151, *Debaryomyces sp.* TM838 y *Saccharomyces sp.* TM212 podrían analizarse más a profundidad, comparando otros marcadores como la región ITS, el factor de elongación 1α o incluso el genoma completo para una completa y certera categorización a nivel de especie.

12. REFERENCIAS

1. ab Ghani N, Sulaiman J, Ismail Z, Chan X, Yin W, Chan K. 2014. *Rhodotorula mucilaginosa* a quorum quenching yeast exhibiting lactonase activity isolated from a tropical shoreline. *Sensors* **14**:6463-6473. DOI: [10.3390/s140406463](https://doi.org/10.3390/s140406463).
2. Agarbati A, Canonico L, Marini E, Zannini E, Ciani M, Comitini F. 2020. Potential Probiotic Yeasts Sourced from Natural Environmental and Spontaneous Processed Foods. *Foods* **9**:287. DOI: [10.3390/foods9030287](https://doi.org/10.3390/foods9030287).
3. Alba-Lois L, Larralde CP, Ochoa JL, Segal C. 2016. Las otras levaduras: una ventana a la evolución. 1ª ed. Magaña P (ed). Universidad Nacional Autónoma de México. México, D. F. Pp. 156.
4. Aljohani R, Samarasinghe H, Ashu T, Xu J. 2018. Diversity and relationships among strains of culturable yeasts in agricultural soils in Cameroon. *Scientific Reports* **8**:15687. DOI: [10.1038/s41598-018-34122-2](https://doi.org/10.1038/s41598-018-34122-2).
5. Allahkarami S, Sepahi AA, Hosseini H, Razavi MR. 2021. Isolation and identification of carotenoid-producing *Rhodotorula* sp. from Pinaceae forest ecosystems and optimization of *in vitro* carotenoid production. *Biotechnology Reports* **3**:32. DOI: [10.1016/j.btre.2021.e00687](https://doi.org/10.1016/j.btre.2021.e00687).
6. Arana-Sanchez A, Segura-Garcia LE, Kirchamyr M, Orozco-Avila I, Lugo-Cervantes E, Gschaedler Mathis A. 2015. Identification of predominant yeasts associated with Mexican cocoa fermentations using culture-dependent and culture-independent approaches. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. **31**: 359-369. DOI: [10.1007/s11274-014-1788-8](https://doi.org/10.1007/s11274-014-1788-8).
7. Babamahmoodi F, Rezai MS, Ahangarkani F, Mohammadi Kali A, Alizadeh-Navaei R, Alishahi A, Najafi N, Haddadi A, Davoudi A, Azargon L, Daftarian Z, Kordi S, Abbasi K. 2022. Multiple *Candida* strains causing oral infection in COVID-19 patients under corticosteroids and antibiotic therapy: An observational study. *Frontiers*

- in Cellular and Infection Microbiology **12**:1103226. DOI: [10.3389/fcimb.2022.1103226](https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.1103226).
8. Bintsis T. 2021. Yeasts in different types of cheese. AIMS Microbiology **7(4)**:447-470.
 9. Bizarria R, Pagnocca F, Rodrigues A. 2021. Yeasts in the attine-fungus mutualism: Diversity, functional roles and putative biotechnological applications. Yeast 1-15. DOI: 10.1002/yea.3667. DOI: [10.3934/microbiol.2021027](https://doi.org/10.3934/microbiol.2021027).
 10. Boekhout T, Fonseca A, Sampaio JP, Bandoni. 2011. Discussion of teleomorphic and anamorphic genera of heterobasidiomycetous yeasts. In: Kurtzman CP, Fell JW, Boekhout T (eds) The yeasts, a taxonomic study, 5th ed. Elsevier, Amsterdam, pp 1339–1374. DOI: [10.1016/B978-0-444-52149-1.00100-2](https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52149-1.00100-2).
 11. Boonmak C, Khunnamwong P, Limtong S. 2019. Yeast communities of primary and secondary peat swamp forests in southern Thailand. Antonie van Leeuwenhoek. 113:55-69. DOI: [10.1007/s10482-019-01317-0](https://doi.org/10.1007/s10482-019-01317-0).
 12. Brysch-Herzberg M. 2004. Ecology of yeasts in plant-bumblebee mutualism in Central Europe. FEMS Microbiology Ecology **50**:87-100. DOI: [10.1016/j.femsec.2004.06.003](https://doi.org/10.1016/j.femsec.2004.06.003).
 13. Buzzini P, Lachance MA. 2017. Yeasts in Natural Ecosystems: Ecology. Springer. Suiza.
 14. Buzzini P, Turchetti B, Yurkov A. 2018. Extremophilic Yeasts: the toughest yeasts around? Yeasts. 35:487-497. DOI: [10.1002/yea.3314](https://doi.org/10.1002/yea.3314).
 15. Chu SB, Hu WT, Hui FL. *Torulaspora jixiensis* sp. nov., a novel yeast species isolated from rotting wood. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. **72(12)**. DOI: [10.1099/ijsem.0.005629](https://doi.org/10.1099/ijsem.0.005629).
 16. Cisneros-Cortes EA, 2019. Selección y caracterización de levaduras silvestres de interés en procesos fermentativos. Tesis. Universidad Autónoma de Nuevo León.
 17. Comisión Nacional Para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO) en

<https://www.biodiversidad.gob.mx/ecosistemas/ecosismex>.

Consultado en Marzo, 2020.

18. Convenio sobre la Diversidad Biológica. Protocolo de Nagoya. 2015. Comisión Nacional Para el Desarrollo de los Pueblos Indígenas. México, D. F. en <http://www.cdi.gob.mx>
19. da Silva FA, Banat IM, Giachini AJ, Robl D. 2021. Fungal biosurfactants, from nature to biotechnological product: bioprospection, production and potential applications. *Bioprocess and Biosystems Engineering* **44**:2003-2034. DOI: [10.1007/s00449-021-02597-5](https://doi.org/10.1007/s00449-021-02597-5).
20. Daniel HM, Lachance MA, Kurtzman CP. 2014. On the reclassification of species assigned to *Candida* and other anamorphic ascomycetous yeast genera based on phylogenetic circumscription. *Antonie van Leeuwenhoek* **106**:67–84. DOI: [10.1007/s10482-014-0170-z](https://doi.org/10.1007/s10482-014-0170-z).
21. de Menezes G, Amorim S, Goncalvez V, Godinho V, Simoes J, Rosa C, Rosa L. 2019. Diversity, Distribution and Ecology of Fungi in the Seasonal Snow of Antarctica. *Microorganisms* **7**:445. DOI: [10.3390/microorganisms7100445](https://doi.org/10.3390/microorganisms7100445).
22. Duarte AW, Passarini MR, Delforno TP, Pelizzari FM, Cipro CV, Montene RC, Petry MV, Putzke J, Rosa LH, Sette LD. 2016. Yeasts from macroalgae and lichens that inhabit the South Shetland Islands, Antarctica. *Environmental Microbiology* **8**:874–885. DOI: [10.1111/1758-2229.12452](https://doi.org/10.1111/1758-2229.12452).
23. Dunthorn M, Kauserud H, Bass D, Mayor J, Mahe F. 2017. Yeasts dominate soil fungal communities in three lowland Neotropical rainforests. *Environmental Microbiology Reports* **9(5)**: 668-675. DOI: [10.1111/1758-2229.12575](https://doi.org/10.1111/1758-2229.12575).
24. Fei L, Junhua Z, Linjun Z, Mengqi D, Peixue L, Fengshan W. 2021. Correlation between the synthesis of pullulan and melanin in *Aureobasidium pullulans*. *International Journal of Biological Macromolecules*. **177**:252-260. DOI: [10.1016/j.ijbiomac.2021.02.108](https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.02.108).
25. Fell JW, Boekhut T, Fonseca A, Scorzetti G, Statzell-Tallman A. 2000. Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by large-subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis. *International*

- Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 50:1351–1371. DOI: [10.1099/00207713-50-3-1351](https://doi.org/10.1099/00207713-50-3-1351).
26. Fernandez-Pacheco P, Zapparoli I, Arevalo-Villena M, Gomes E, Briones A, 2021. Study of potential probiotic and biotechnological properties of non-*Saccharomyces* yeasts from fruit Brazilian ecosystems. Brazilian Journal of Microbiology. 52:2129-2144. DOI: [10.1007/s42770-021-00541-z](https://doi.org/10.1007/s42770-021-00541-z).
27. Ganter PF. 2011. Everything is not everywhere: the distribution of cactophilic yeasts. In: Biogeography of microscopic organisms: is everything small everywhere? Fontaneto D (ed) Cambridge University Press, Cambridge, pp 130–174. 10.1017/CBO9780511974878.009.
28. Gardes, M, Bruns, TD. 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes-application to the identification of mycorrhizae and rusts. Molecular Ecology. 2:113–118. DOI: 10.1111/j.1365-294x.1993.tb00005.x.
29. Glushakova A, Chernov I. 2010. seasonal dynamics of the structure of epiphytic yeast communities. Microbiology. 79(6): 830-839. DOI: 10.1134/S00262617110060160.
30. Glushakova A, Kachalkin A. 2023. Yeasts associated with mines on tree leaves in the urban areas. International Microbiology. DOI: [10.1007/s10123-023-00370-0](https://doi.org/10.1007/s10123-023-00370-0).
31. Hibbett DS, Binder M, Bischoff J, Blackwell M, Cannon P, Eriksson O, Huhndorf S, James T, Kirk P, Lücking R, Lumbsch H, Lutzoni F, Matheny P, McLaughlin D, Powell M, Redhead S, Schoch C, Spatafora J, Stalpers J, Vilgalys R, Zhang N. 2007. A higher-level phylogenetic classification of the fungi. Mycological Research 111:509–547. DOI: 10.1016/j.mycres.2007.03.004.
32. Hittinger CT, Steele JL, Ryder DS. 2018. Diverse yeasts for diverse fermented beverages and foods. Current Opinion in Biotechnology 49:199-206. DOI: [10.1016/j.copbio.2017.10.004](https://doi.org/10.1016/j.copbio.2017.10.004).
33. Igharo B, Byrne KP, Ghnewa H, Davey RP, Fubara A, Welc J, Oubihi S, Moore L, Smith C, Ó Cinnéide E, Bergin SA, Hession C, Wolfe KH, Butler G. 2022. Draft Genome Sequence of the Yeast *Torulasporea quercuum* strain UCD657, Isolated from Soil in Ireland. Microbiological

Resource Announcements. **11(11)**: e0095222. DOI: [10.1128/mra.00952-22](https://doi.org/10.1128/mra.00952-22).

34. Into P, Pontes A, Sampaio JP, Limtong S. 2020. Yeast diversity associated with the phylloplane of corn plants cultivated in Thailand. *Microorganisms*. **8**:80. DOI: [10.3390/microorganisms8010080](https://doi.org/10.3390/microorganisms8010080).
35. James TY, Kauff F, Schoch C, Matheny P, Hofstetter V, Cox C, Celio G, Gueidan C, Fraker E, Miadlikowska J, Lumbsch HT, Rauhut A, Reeb V, Arnold AE, Amtoft A, Stajich JE, Hosaka K, Sung G, Johnson D, O'Rourke B, Crockett M, Binder M, Curtis JM, Slot JC, Vilgalys R. 2006. Reconstructing the early evolution of fungi using a six-gene phylogeny. *Nature* **443**:818–822. DOI: [10.1038/nature05110](https://doi.org/10.1038/nature05110).
36. Jarros IC, Veiga FF, Corrêa JL, Barros ILE, Gadelha MC, Voidaleski MF, Peralisi N, Pedroso RB, Vicente VA, Negri M, Svidzinski TIE. 2020. Microbiological and virulence aspects of *Rhodotorula mucilaginosa*. *EXCLI Journal* **19**:687-704.
37. Jimenez S, Carroll C, Babcock T, Derstine N, Hadwin A, Moore A, Gries G. 2016. Yeasts harbored by vespine wasps in the Pacific Northwest. *Environ. Entomol.* **46(2)**:217-225. DOI: [10.1093/ee/nvw173](https://doi.org/10.1093/ee/nvw173).
38. Kaewwichian R, Khunnamwong P, Am-In S, Jindamorakot S, Groenewald M, Limtong S. 2019. *Candida xylosifermentans* sp. nov., a D-xylose-fermenting yeast species isolated in Thailand. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. **69**:2674-2680. DOI: [10.1099/ijsem.0.003505](https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003505).
39. Kanpiengjai A, Kodchasee P, Unban K, Kumla J, Lumyong S, Khunnamwong P, Sarkar D, Shetty K, Khanongnuch C. 2023. Three new yeast species from flowers of *Camellia sinensis* var. *assamica* collected in Northern Thailand and their tannin tolerance characterization. *Frontiers in Microbiology* **14**:1043430. DOI: [10.3389/fmicb.2023.1043430](https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1043430)
40. Kim S-W, Seo W-T, Park Y-H. 1997. Enhanced synthesis of trisporic acid and b-carotene production in *Blakeslea trispora* by addition of a non-ionic surfactant, Span 20. *Journal of Fermentation and Bioengineering* **84**:330–332. DOI: [10.3390/foods10020327](https://doi.org/10.3390/foods10020327)

41. Koricha AD, Han D, Bacha K, Bai F. 2019. Occurrence and Molecular Identification of Wild Yeasts from Jimma Zone, Southwest Ethiopia. *Microorganisms*, **7**:633. DOI: [10.3390/microorganisms7120633](https://doi.org/10.3390/microorganisms7120633)
42. Kurtzman CP, Fell J, Boekhout T. 2011. Definition, Classification and Nomenclature of Yeasts. In: *The Yeasts, A Taxonomy Study*. 5th ed. Kurtzman CP, Fell JW, Boekhout T. (eds). Elsevier. Amsterdam. Pp. 3-5.
43. Kurtzman CP, Robnett CJ. 2003. Phylogenetic relationships among yeasts of the “*Saccharomyces* complex” determined from multigene sequence analyses. *FEMS Yeast Research* **3**:417–432. DOI: [10.1016/S1567-1356\(03\)00012-6](https://doi.org/10.1016/S1567-1356(03)00012-6)
44. Kurtzman CP, Robnett CJ. 2013. Relationships among genera of the Saccharomycotina (Ascomycota) from multigene phylogenetic analysis of type species. *FEMS Yeast Research* **13**:23–33. DOI: [10.1111/1567-1364.12006](https://doi.org/10.1111/1567-1364.12006)
45. Lachance MA, Boekhout T, Scorzetti G, Fell JW, Kurtzman CP. 2011. *Candida* Boekhout (1923). In: Kurtzman CP, Fell JW, Boekhout T (eds) *The yeasts, a taxonomic study*, 5th edn. Elsevier, Amsterdam, pp 987–1278.
46. Liu XZ, Wang QM, Goker M, Groenewald M, Kachalkin AV, Lumbsch HT, Millanes AM, Wedin M, Yurkov AM, Boekhout T, Bai FY. 2015b. Towards an integrated phylogenetic classification of the *Tremellomycetes*. Phylogeny of tremellomycetes yeasts and related dimorphic basidiomycetes reconstructed from multigene sequence analyses. *Stud Mycol* **81**:85–147. DOI: [10.1016/j.simyco.2015.12.001](https://doi.org/10.1016/j.simyco.2015.12.001)
47. Liu XZ, Wang QM, Theleen B, Groenewald M, Bai FY, Boekhout T. 2015a. Phylogeny of tremellomycetous yeasts and related dimorphic basidiomycetes reconstructed from multigene sequence analyses. *Studies in Mycology*. **81**:1–16. DOI: [10.1016/j.simyco.2015.08.001](https://doi.org/10.1016/j.simyco.2015.08.001)
48. Methner Y, Magalhaes F, Raihofer L, Zarnkow M, Jacob F, Hutzler M. 2022. Beer fermentation performance and sugar uptake of *Saccharomycopsis fibuligera* – A novel option for low-alcohol beer. *Frontiers in Microbiology* **13**:1011155. Doi:10.3389/fmicb.2022.1011155. DOI: [10.3389/fmicb.2022.1011155](https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1011155)

49. Michel M, Kopecka J, Meier-Dornberg T, Zamkov M, Jacob F, Hutzler M. 2016. Screening for new breeding yeasts in the non-*Saccharomyces* yeast sector with *Torulaspota delbrueckii* as model. *Yeast*. **33**:129-144. DOI: [10.1002/yea.3146](https://doi.org/10.1002/yea.3146)
50. Morata A, Loira I, Gonzales C, Escott C. 2021. Non-*Saccharomyces* as Biotools to Control the Production of Off-Flavors in Wines. *Molecules*. **26(15)**: 4571. DOI: [10.3390/molecules26154571](https://doi.org/10.3390/molecules26154571)
51. Nagahama T, Hamamoto M, Nakase T, Horikoshi K. 2003. *Rhodotorula benthica* sp. nov. and *Rhodotorula calyptogenae* sp. nov., novel yeast species from animals collected from the deep-sea floor, and *Rhodotorula lysiniphila* sp. nov., which is related phylogenetically. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **53**:897–903. DOI: [10.1099/ijs.0.02395-0](https://doi.org/10.1099/ijs.0.02395-0)
52. Naranjo-Ortiz MA, Gabaldón T. 2019. Fungal Evolution: Diversity, Taxonomy and Phylogeny of the Fungi. *Biological Reviews*. Cambridge Philosophical Society. **94**: 2101-2137. DOI: [10.1111/brv.12550](https://doi.org/10.1111/brv.12550)
53. Nasanit R, Krataithong K, Tantirungkij M, Limtong S. 2015. Assessment of epiphytic yeast diversity in rice (*Oryza sativa*) phyllosphere in Thailand by a culture-independent approach. *Anton Van Leeuwenhoek*. **107**: 1475-1490. DOI: [10.1007/s10482-015-0442-2](https://doi.org/10.1007/s10482-015-0442-2)
54. Ortega-Riveros M. 2015. Estudio de la patogenicidad de *Candida* y de la actividad de los fármacos antifúngicos en un modelo animal de *Caenorhabditis elegans*. Tesis. Universidad del País Vasco.
55. Osman ME, Abdel-Razik AB, Zaki KI, Mamdouh N, El-Sayed H. 2022. Isolation, molecular identification of lipid producing *Rhodotorula diobovata*: optimization of lipid accumulation for biodiesel production. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*. **20**: 32. DOI: [10.1186/s43141-022-00304-9](https://doi.org/10.1186/s43141-022-00304-9)
56. Papp C, Bohner F, Kocsis K, Varga M, Skezeres A, Bodai L, Willis JR, Gabaldon T, Toth R, Nosanchuk JD, Vagvolgyi C, Gacser A. 2020. Triazole evolution of *Candida parapsilosis* results in cross-resistance to other antifungal drugs, influences stress responses, and alters virulence in an antifungal drug-dependent manner. *mSphere*. **5(5)**:5. DOI: [10.1128/mSphere.00821-20](https://doi.org/10.1128/mSphere.00821-20)

57. Parapouli M, Vasileiadis A, Amalia-Sofia A, Efstathios H. 2020. *Saccharomyces cerevisiae* and its industrial applications. *AIMS Microbiology* **6(1)**: 1-31. DOI: [10.3934/microbiol.2020001](https://doi.org/10.3934/microbiol.2020001)
58. Paulino GVB, Felix CR, Broetto L, Fontes M. 2017. Diversity of culturable yeasts associated with zoanthids from Brazilian reefs and its relationship with anthropogenic disturbance. *Marine Pollution Bulletin*. **123**: 253-260. DOI: [10.1016/j.marpolbul.2017.08.050](https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.08.050)
59. Pronk JT, Yde Steensma H, Van Dijken JP. 1996. Pyruvate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **12**: 1607–1633. DOI: [10.1002/\(sici\)1097-0061\(199612\)12:16<1607::aid-yea70>3.0.co;2-4](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0061(199612)12:16<1607::aid-yea70>3.0.co;2-4)
60. Rodríguez-Iglesias AY. 2019. Selección y caracterización de levaduras silvestres asociadas al proceso cervecero. Tesis. Universidad Autónoma de Nuevo León.
61. Salazar-Cerezo S, de la Cruz Meneses-Sánchez M, Martínez-Contreras R y Martínez-Montiel N. 2020. Unraveling the Fungal Community Associated with Leaf Spot on *Crataegus* sp. *Microorganisms*. 8(459). DOI: [10.3390/microorganisms8030459](https://doi.org/10.3390/microorganisms8030459)
62. Sampaio JP. 2018. Microbe Profile: *Saccharomyces eubayanus*, the missing link to lager beer yeasts. *Microbiology*. **164(9)**: 1069–1071. DOI: [10.1099/mic.0.000677](https://doi.org/10.1099/mic.0.000677)
63. Sharma R, Ghoshal G. 2021. Characterization and cytotoxic activity of pigmented extracted from *Rhodotorula mucilaginosa* to assess its potential as biofunctional additive in confectionary products. *Journal of Food Science and Technology*. **58(7)**: 2688-2698. DOI: [10.1007/s13197-020-04775-x](https://doi.org/10.1007/s13197-020-04775-x)
64. Starmer, WT, Lachance MA. 2011. Yeast Ecology. In: *The Yeasts, A Taxonomic Study*. 5th ed. Kurtzman CP, Fell JW, Boekhout T. (eds). Elsevier. Amsterdam. pp. 65-83.
65. Steelsens J, Verstrepen KJ. 2014. Taming Wild Yeast: Potential of Conventional and Nonconventional Yeasts in Industrial Fermentations. *Annual Review of Microbiology*. **68**: 61-80. DOI: [10.1146/annurev-micro-091213-113025](https://doi.org/10.1146/annurev-micro-091213-113025)

66. Thyab Gddoa Al-sahlany S, Altemimi AB, Al-Manhel AJA, Niamah AK, Lakhssassi N, Ibrahim SA. 2020. Purification of bioactive peptide with antimicrobial properties produced by *Saccharomyces cerevisiae*. *Foods*, **9(3)**: 324. DOI: [10.3390/foods9030324](https://doi.org/10.3390/foods9030324)
67. Treviño-Aguilar P. 2019. Aislamiento y determinación del comportamiento dinámico de levaduras silvestres empleadas en el proceso de elaboración de cerveza. Tesis. Universidad Autónoma de Nuevo León.
68. U'Ren JM, Lutzoni F, Miadlikowska J, Zimmerman NB, Carbone I, May G, Arnold AE. 2019. Host availability drives distributions of fungal endophytes in the imperiled boreal realm. *Nature Ecology & Evolution*. **3**:1430–1437. DOI: [10.1038/s41559-019-0975-2](https://doi.org/10.1038/s41559-019-0975-2).
69. Vadkertiova R, Dudasova H, Stratilova E, Balascakova M. 2019. Diversity of yeast in the soil adjacent to fruit trees of the Rosaceae family. *Yeast*. **36**: 617-631. <https://doi.org/10.1002/yea.3430>
70. Vaitilingom M, Attard E, Gaiani N, Sancelme M, Deguillaume L, Flossmann AI, Amato P, Delort AM. 2012. Long-term features of cloud microbiology at the puy de Dome (France). *Atmosphere Environment* **56**: 88–100 <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2012.03.072>
71. Vazquez-Campos X, Kinsela AS, Waite TD, Collins RN, Neilan BA. 2014. *Fodinomyces uranophilus* gen. nov. sp. nov. and *Coniochaeta fodinicola* sp. nov., two uranium mine-inhabiting Ascomycota fungi from northern Australia. *Mycologia*. **106(6)**:1073-1089. DOI: [10.3852/14-013](https://doi.org/10.3852/14-013)
72. Vegas C, Zavaleta A, Canales P, Esteve-Zarzoso B. 2020. Yeasts Associated with Various Amazonian Native Fruits. *Polish Journal of Microbiology*. **69(3)**: 251-261. doi: [10.33073/pjm-2020-027](https://doi.org/10.33073/pjm-2020-027)
73. Vicente J, Navascues E, Calderon F, Santos A, Marquina D, Benito S. 2021. An Integrative View of the Role of *Lachancea thermotolerans* in Wine Technology. *Foods*. **10**: 2878. DOI: [10.3390/foods10112878](https://doi.org/10.3390/foods10112878)
74. Wang QM, Begerow D, Groenewald M, Liu XZ, Theelen B, Bai FY, Boekhout T. 2015c. Multigene phylogeny and taxonomic revision of

- yeasts and related fungi in the Ustilaginomycotina. *Studies in Mycology*. **81**:55–83 DOI: [10.1016/j.simyco.2015.10.004](https://doi.org/10.1016/j.simyco.2015.10.004)
75. Wang QM, Groenewald M, Takashima M, Theelen B, Han PJ, Liu XZ, Boekhut T, Bai FY. 2015a. Phylogeny of yeasts and related filamentous fungi within Pucciniomycotina determined from multigene gene sequence analyses. *Studies in Mycology*. **81**:27–53. DOI: [10.1016/j.simyco.2015.08.002](https://doi.org/10.1016/j.simyco.2015.08.002)
76. Wang QM, Yurkov AM, Goker M, Lumbsch HT, Leavitt SD, Groenewald M, Theelen B, Liu XZ, Boekhut T, Bai FY. 2015b. Phylogenetic classification of yeasts and related taxa within Pucciniomycotina. *Studies in Mycology*. **81**:27–53. DOI: [10.1016/j.simyco.2015.12.002](https://doi.org/10.1016/j.simyco.2015.12.002)
77. Xie Z, Zhang K, Kang Z, Yang J. 2021. *Saccharomycopsis fibuligera* in liquor production: a review. *European Food Research and Technology*. **247**:1569-1577. Doi: [10.1007/s00217-021-03743-9](https://doi.org/10.1007/s00217-021-03743-9).
78. Xin W, Guang-Lei L, Shu-Lei J, Zhe C, Zhong H, Zhen-Ming C. 2021. Pullulan biosynthesis and its regulation in *Aureobasidium spp.* *Carbohydrate Polymers*. 251. DOI: [10.1016/j.carbpol.2020.117076](https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.117076)
79. Yurkov AM. 2017. Yeasts of the soil-obscure but precious. *Yeast*. **35**:369-378. DOI: [10.1002/yea.3310](https://doi.org/10.1002/yea.3310)