



**EVALUACIÓN DE LA ACCIÓN ANTAGÓNICA *in vitro* DE LEVADURAS
FRENTE A HONGOS FITOPATÓGENOS EN CULTIVOS COLOMBIANOS DE
ARÁNDANOS**

DAYANN LORENA VELANDIA GUILLÉN

PhD. MARTHA LUCÍA POSADA BUITRAGO

Asesora interna

Mg. LIGIA CONSUELO SÁNCHEZ LEAL

Asesora externa

UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO

TRABAJO DE GRADO

BOGOTÁ D.C.

2026-I

DEDICATORIA

A mis padres, por ser mi ejemplo y por todo lo que han hecho para que yo pudiera llegar hasta aquí. Este logro también es de ustedes.

A mi hermano, por creer en mí, incluso cuando yo no lo hacía.

Y a mi gatito, que ya no está en la faz de la tierra, pero sigue siendo ese amor puro y fiel que marcó mi vida.

AGRADECIMIENTOS

A ti, Sam, por acompañarme durante todo este proceso. Por estar en mis noches de desvelo, por escucharme, por ser mi “alumno” cuando necesitaba practicar, incluso sin entender del todo. Gracias por dejarte abrazar cuando la frustración y la ansiedad aparecían, por quedarte ahí, simplemente estando. Fuiste el mejor gato que llegó a mi vida. Te amé durante toda tu vida, y te voy a extrañar por el resto de la mía.

A mis asesoras, Ligia Consuelo y Martha Lucía, gracias por guiarme en este proceso. A la profe Ligia Consuelo, por creer en mí desde el inicio. A la profe Martha Lucía, por enseñarme que la vida no es solo trabajo, sino también saber vivirla. Gracias a ambas, no solo por lo académico, sino por lo que queda más allá.

A mi mamá, por enseñarme a ser fuerte, por ser mi amiga y por estar siempre. Por tu amor incondicional y por todo lo que eres.

A mi papá, por estar cuando más lo necesito, por ser mi guía y mi apoyo. Gracias por creer en mí y por sostenerme cuando me siento inestable.

A mi hermano, por hacerme ver que todo es posible, y por recordarme que la vida también puede ser más ligera, incluso cuando no todo está bien.

A mi pareja, José, por mostrarme la vida desde la realidad, por enseñarme que no todo es fácil, pero que hay que seguir adelante. Gracias por tu apoyo.

Y, finalmente, a mí, por haber atravesado este proceso sin detenerme, aun cuando no todo estaba claro. Aquí está el fruto de todo lo que implicó llegar hasta este punto.

Tabla de contenido

ÍNDICE DE FIGURAS	6
ÍNDICE DE TABLAS	8
RESUMEN	9
INTRODUCCIÓN	10
OBJETIVOS	11
1. ANTECEDENTES	12
2. MARCO REFERENCIAL	17
2.1. Cultivo de arándanos	17
2.2. Hongos fitopatógenos de arándanos	18
2.3. Levaduras biocontroladoras	18
2.4. Antagonismo in vitro	19
2.5. Identificación fenotípica y genotípica	19
3. DISEÑO METODOLÓGICO	20
3.1. Universo, población, muestra	20
3.2. Hipótesis, variables, indicador	21
3.4. Técnicas y procedimientos.	22
3.4.1. Recolección de muestras:	22
3.4.2. Lavado, desinfección y siembra de muestras	24
3.4.3. Pruebas bioquímicas API para la identificación de levaduras.	25
3.4.4. Antagonismo dual in vitro	25
3.4.5. Identificación molecular de hongo Botrytis spp. y levaduras	26
4. RESULTADOS	27
4.1. Aislamiento de levaduras a partir de tejido vegetal	27
4.2. Aislamiento e identificación de hongos filamentosos de tejido vegetal con signos y síntomas de enfermedad	30
4.3. Identificación fenotípica de levaduras antagónicas	33
4.4. Antagonismo in vitro de levaduras frente a hongos fitopatógenos	35
4.5. Identificación molecular de levaduras antagónicas y hongos del género Botrytis	38
5. DISCUSIÓN	40
6. CONCLUSIONES	45
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46
9. ANEXOS	51

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Toma de muestras A. Muestreo de tejido de planta de arándano. B. Cultivo de plantas de arándano. C. Planta de arándano. D. Transporte de muestras. E. Rotulado de muestras	23
Figura 2. Tejidos de planta de arándanos A. Tallos e inflorescencias. B. Hojas. C. Frutos y flores. D Raíz. Fuente: Elaboración propia	24
Figura 3. Elementos y procedimientos de lavado de muestras. A. Soluciones de lavado para tejido enfermo. B. Soluciones de lavado para tejido sano. C. Lavado de raíz. D. Lavado de tallo. E. Lavado de hojas. F. Lavado de flores e inflorescencias. G. Lavado de frutos. H. Agitación de tejidos sanos en soluciones con Tween 80. I. Tejidos sanos en soluciones con Tween 80. Fuente: Elaboración propia	25
Figura 4. Medios de cultivo. A. Preparación. B. Incubación después de tejidos y soluciones sembradas. C.PDA. D. Agar Sabouraud. E. Agar Rosa de Bengala. Fuente: Elaboración propia	25
Figura 5. Colonias blancas cremosas.	28
Figura 6. Observación microscópica 100x.	28
Figura 7. Colonias blancas cremosas.	28
Figura 8. Observación microscópica 100x.	28
Figura 9. Colonias blancas cremosas.	28
Figura 10. Observación microscópica 100x.	28
Figura 11. Colonias rojas mucoides.	29
Figura 12. Observación microscópica 100x.	29
Figura 13. Colonias rojas mucoides.	29
Figura 14. Observación microscópica 100x.	29
Figura 15. Colonias rojas mucoides.	29
Figura 16. Observación microscópica 100x.	29
Figura 17. Colonias blancas cremosas.	29
Figura 18. Observación microscópica 100x.	29
Figura 19. Colonias rojas mucoides.	30
Figura 20. Observación microscópica 100x.	30
Figura 21. Colonia blanca aterciopelada anverso	30
Figura 22. Colonia blanca reverso	30
Figura 23. Hifas hialinas septadas con presencia de macroconidios y microconidios 40X 30	30
Figura 24. Colonia blanca algodonosa anverso	31
Figura 25. Colonia blanca reverso	31
Figura 26. Hifas hialinas sin presencia de estructuras reproductivas 40X	31
Figura 27. Colonia de aspecto polvoso con coloración verde en la periferia y café en la zona central	31
Figura 28. Colonia sin pigmentación en reverso	31
Figura 29. Conidióforos con presencia de cabeza aspergilar 40X	31

Figura 30. Colonia blanca algodonosa con presencia de pústulas	31
Figura 31. Colonia blanca en reverso	31
Figura 32. Hifas hialinas septadas con presencia de conidióforos ramificados, fiálides y conidios subglobosos agrupados en el ápice de las fiálides en 40X	31
Figura 33. Colonia blanca aterciopelada anverso	32
Figura 34. Colonia café reverso	32
Figura 35. Hifas hialinas septadas con ramificaciones en ángulos de 90° en 40X.	32
Figura 36. Colonia café aterciopelada anverso	32
Figura 37. Colonia café oscuro reverso	32
Figura 38. Hifas dematiáceas septadas, presencia de macroconidios con septos transversales que se forman a partir de conidióforos 40X	32
Figura 39. Colonia blanca a gris algodonosa anverso.	33
Figura 40. Colonia blanca reverso.	33
Figura 41. Hifas hialinas septadas, conidióforos ramificados y conidias ovaladas agrupadas en el extremo, formando estructuras en “racimos de uva” 40X	33
Figura 42. Enfrentamientos contra <i>Botrytis cinerea</i> ATCC 36635 A. Gráfico de barras con porcentajes de inhibición radial. B. Mejor antagonismo C. Segundo mejor antagonismo. D. Tercer mejor antagonismo	36
Figura 43. Enfrentamientos contra <i>Botrytis</i> spp. nativo A. Gráfico de barras con porcentajes de inhibición radial. B. Mejor antagonismo C. Segundo mejor antagonismo D. Tercer mejor antagonismo	36
Figura 44. Enfrentamientos contra <i>Fusarium</i> spp. A. Gráfico de barras con porcentajes de inhibición radial. B. Mejor antagonismo C. Segundo mejor antagonismo D. Tercer mejor antagonismo	37
Figura 45. Enfrentamientos contra <i>Rhizoctonia</i> spp. A. Gráfico de barras con porcentajes de inhibición radial. B. Mejor antagonismo C. Enfrentamiento con <i>Rhodotorula</i> spp 3. D. Enfrentamiento con <i>Rhodotorula</i> spp. 2	38
Figura 46. Enfrentamientos contra <i>Curvularia</i> spp. A. Gráfico de barras con porcentajes de inhibición radial. B. Mejor antagonismo C. Segundo mejor antagonismo. D. Tercer mejor antagonismo	38
Figura 47. Electroforesis de PCR punto final. A. Levaduras 01, 02, 03, 05, 06, 07. B. Levadura 04. C. Levadura 08 y <i>Botrytis cinerea</i> Nativo	39

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Fincas de muestreo, ubicación y tipo de muestra	22
Tabla 2. Primers para la amplificación de región ITS de hongos. Fuente: Elaboración propia basada en la literatura referenciada (33).	27
Tabla 2. Crecimiento de microorganismos levaduriformes primer aislamiento. Elaboración propia	28
Tabla 3. Aislamiento e identificación de hongos filamentosos por claves dicotómicas. Elaboración propia	30
Tabla 4. Resultados de pruebas bioquímicas API de levaduras	34
Tabla 5. Características de las secuencias obtenidas.	39



EVALUACIÓN DE LA ACCIÓN ANTAGÓNICA *in vitro* DE LEVADURAS FRENTE A HONGOS FITOPATÓGENOS EN CULTIVOS COLOMBIANOS DE ARÁNDANOS

RESUMEN

La producción de arándanos en Colombia ha aumentado en los últimos años, compitiendo con países de alta producción, debido a la alta demanda por su efecto benéfico en la salud por su valor antioxidante. Sin embargo, esta es una planta susceptible a enfermedades fúngicas y no se deberían utilizar productos químicos para minimizar el impacto por el efecto sobre la salud del consumidor y el ambiente. Adicionalmente, las pérdidas pueden ser muy altas para el productor. En la presente investigación, el objetivo fue establecer la posibilidad de usar levaduras epífitas de plantas de arándano recolectadas de diferentes cultivos colombianos como una alternativa de control biológico frente a hongos fitopatógenos del arándano. Para ello, se confirmó la presencia de hongos que actuaban como fitopatógenos que estaban reportados para esta planta, principalmente del género *Botrytis*, pero también otros géneros como *Fusarium*, *Rhizoctonia* y *Curvularia* y se identificaron 8 levaduras antagónicas identificadas con el género *Hanseniaspora* spp., *Meyerozyma* spp. y *Rhodotorula* spp., las cuales han sido establecidas en otras investigaciones como posibles controladoras. A futuro será necesario verificar en campo, en condiciones controladas, la eficiencia de las levaduras.

Palabras clave: Plantas de arándano, control biológico, hongos fitopatógenos, *Hanseniaspora* spp. *Rhodotorula* spp., *Meyerozyma* spp.

INTRODUCCIÓN

Actualmente, el cultivo de arándanos en Colombia reporta ganancias significativas debido a la demanda que se presenta a nivel mundial. Sin embargo, como en cualquier arbusto frutal, se desarrollan enfermedades que limitan la producción y disminuyen su rentabilidad (1). En su gran mayoría, los fitopatógenos que se desarrollan en la planta de arándano son hongos filamentosos, los cuales crecen con facilidad por las condiciones de producción que necesita el arándano en cuanto a humedad y temperatura principalmente. Uno de los hongos fitopatógenos que se encuentran en la planta de arándano es *Botrytis cinerea* o moho gris, el cual se ha reportado en diferentes cultivos a nivel nacional. Generalmente, puede manifestarse post cosecha, pero cuando compromete el tallo, el daño puede ser irreversible (2).

Para evitar la manifestación y progresión de enfermedades aún se utiliza el control químico con productos de alta toxicidad, que al degradarse forman compuestos residuales que quedan presentes en el ambiente e indican efectos nocivos. Por lo tanto, es necesario buscar otras alternativas de manejo integrado que puedan sustituir los controles químicos (3). Recientemente, los controles biológicos se han implementado en otros cultivos, pero son limitados debido a la baja investigación, no son registrados y no presentan formulaciones estables para su comercialización. Además, solo se usan de manera preventiva contra enfermedades o como fitoestimulantes (2).

En el presente estudio se consideró como posible producto de biocontrol el uso de levaduras porque investigaciones anteriores han reportado su efectividad sobre hongos fitopatógenos y porque hay escasa investigación relacionada con el control biológico con levaduras. De acuerdo con recomendaciones de estudios anteriores, se decidió que las levaduras evaluadas tenían que ser de origen epífita y de la misma planta de arándano con dos fines, para que no hubiese un efecto antagónico de microorganismo-planta o frente al microbioma de la planta y para garantizar que, si se aplica, pueda tener un mejor efecto porque puede adaptarse

mejor a la fisiología de la planta. El control biológico debe seguir unos parámetros concretos como no inducir daño al cultivo, al medio ambiente ni al consumidor, y para poder formularlo se deben realizar pruebas antes de comercializarlo que garanticen su seguridad, eficacia y efectividad. Igualmente, deberán realizarse estudios *in vitro* e *in vivo*. Teniendo en cuenta estas recomendaciones, en este estudio se evaluó la acción antagonista *in vitro* de levaduras frente a hongos filamentosos fitopatógenos, todos aislados de cultivos colombianos de arándanos.

OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar la acción antagónica *in vitro* de levaduras frente a hongos fitopatógenos en cultivos colombianos de arándanos.

Objetivos específicos

- Realizar técnicas microbiológicas de aislamiento y cultivo para obtener hongos filamentosos potencialmente fitopatógenos a partir de plantas de arándano enfermas.
- Aplicar técnicas microbiológicas de aislamiento y cultivo para recuperar levaduras epífitas presentes en la filósfera de plantas sanas de cultivos colombianos de arándano.
- Determinar la capacidad inhibitoria de las levaduras aisladas frente a hongos filamentosos fitopatógenos del arándano.
- Identificar las levaduras con mayor actividad antagónica frente a hongos filamentosos fitopatógenos, mediante la interpretación de pruebas bioquímicas y la aplicación de técnicas moleculares.

1. ANTECEDENTES

La producción de arándanos en Colombia se implementó aproximadamente hace 12 años, y en los últimos 7 años se identificó que su capacidad de adaptación es alta debido a sus propiedades agroecológicas, por esta razón, su producción ha ido en aumento (1). Desafortunadamente, al igual que cualquier frutal, puede presentar enfermedades provocadas por fitopatógenos si no se controlan debidamente durante el cultivo, en la cosecha y la postcosecha, impactando negativamente la producción y calidad del fruto por el daño o la pérdida del producto final, la planta y/o todo el cultivo.

Uno de los grandes retos es evitar la pérdida postcosecha del fruto. Al respecto, Bell *et al.* (2021), muestran una revisión de las principales afectaciones del arándano y mencionan los métodos que existen para inhibir el crecimiento de los fitopatógenos; dentro de los controles que mencionan estos investigadores se encuentran los químicos como los fungicidas, los físicos con temperatura, humedad, radiación UV, atmósferas modificadas y controladas y, finalmente, el control biorracional con el uso de microorganismos benéficos que generen antagonismo con los fitopatógenos, de aceites esenciales o de extractos de plantas (2).

Dentro de las estrategias más usadas en el manejo de enfermedades se encuentran los fungicidas, controles químicos en donde su efectividad es bastante alta en comparación con otros métodos. Abbey *et al.* (2024) determinaron la movilidad y persistencia de fungicidas en el manejo de *Botrytis cinerea* en cultivos de arándano. Se llevaron a cabo diferentes tratamientos con formulaciones combinadas con diferentes fungicidas. Se demostró que los fungicidas tuvieron movilidad limitada en las partes del sistema reproductivo de la planta de arándanos. En cuanto a la persistencia, se consideró que la vida media de los fungicidas oscilaba entre los nueve y veinte días. Transcurridos los 65 días de su aplicación y al momento de la cosecha de los arándanos, no se encontraron

residuos detectables en los frutos (3). A pesar de que el estudio sugiere que la presencia de estos fungicidas tiene la capacidad de inhibir el crecimiento de *Botrytis cinerea* y que su aplicación no representa un riesgo para el consumidor final, si tienen efectos negativos en el ambiente, debido a su volatilidad y sus productos intermedios que se incorporan en el ambiente. Adicionalmente, no se conocen reportes del efecto por el consumo de frutos con presencia de estos fungicidas. Por su parte, *Botrytis cinerea* es un fitopatógeno con una alta capacidad de generar resistencia y limita la efectividad de los fungicidas a largo plazo (4).

Para reducir el uso de fungicidas, se han implementado estrategias de control biorracional (5) para la eliminación de fitopatógenos en los cultivos. Vieira *et al.* (2016) realizaron un estudio con un extracto de *Aloe vera* por su efecto protector contra enfermedades fúngicas e implementaron la combinación de quitosano para el recubrimiento del fruto del arándano, permitiendo una protección contra fitopatógenos que generalmente aparecen en la postcosecha; así mismo, se identificó que al usar el extracto de *Aloe vera* y quitosano hay menor pérdida de agua extendiendo la vida útil del arándano (6).

Además de la acción directa frente a patógenos, se han llevado a cabo estrategias desde el punto de vista fisiológico de las plantas de arándano, con el fin de aumentar la resistencia a infecciones por patógenos, al estrés abiótico y al ataque de plagas. Roveda *et al.* (2022) incorporaron *Glomus* spp. y *Acaulospora* spp. como hongos micorrícicos arbusculares (HMA) en plántulas de arándano ubicados en Tabio-Cundinamarca, con el fin de mejorar el crecimiento vegetativo y nutricional debido a la carencia de pelos radiculares que posee *Vaccinium corymbosum*, estructuras que contribuyen en la absorción de nutrientes. Identificaron que *Acaulospora* spp. aumentó el número de ramas basales, mientras que, *Glomus* spp. manifestaba una mayor colonización en dependencia micorrizal, por lo tanto, presentó un aumento en la masa seca, altura de planta,

número de ramas basales, área foliar y relación raíz/parte aérea, con incrementos en la concentración de clorofila (7).

En la búsqueda de métodos biológicos, se ha evaluado el antagonismo de microorganismos epífitos de las plantas frente a patógenos. Sanhueza *et al.* (2023) aislaron microorganismos en la filósfera de plantas ericáceas andinas nativas de Chile (*Gaultheria pumila* y *Empetrum rubrum*), para evaluar su potencial como agentes de control biológico frente a *Botrytis cinerea* en plántulas de arándano. Este estudio aisló trece microorganismos y realizaron antagonismo *in vitro* e *in vivo*, analizaron la producción de enzimas de los microorganismos, formación de biopelículas, rasgos promotores de crecimiento vegetal, oxidación lipídica por medio del contenido de malondialdehído (MDA) para identificar que los microorganismos no produjeran daño en las hojas, y de manera conjunta la concentración de clorofila. Las cepas bacterianas de *Bacillus mycoides*, *Pseudomonas fluorescens* y la cepa fúngica *Epicoccum layuense* mostraron porcentajes de inhibición de *B. cinerea* que van del 60 al 80%. Sin embargo, la cepa de la levadura *Aureobasidium pullulans* demostró rasgos promotores de crecimiento, menor contenido de MDA, mayor contenido de clorofila, a pesar de que la inhibición de *B. cinerea* fue del 56,3% (8).

El enfrentamiento de levaduras epífitas de los cultivos de arándanos como *Papiliotrema terrestris*, *Hanseniaspora uvarum* y *Rhodosporidium glutinis* frente a patógenos no son tan estudiadas, pero sí se han destacado porque tienen la capacidad de sobrevivir en ambientes desfavorables, tienen bajas demandas nutricionales, resisten a diversos patógenos, inducen la resistencia al huésped y crecen en sustratos económicos. Li *et al.* (2024) mencionan que cada levadura posee mecanismos especiales para controlar los fitopatógenos como *Botrytis cinerea* y *Alternaria alternata*. La levadura *P. terrestris* presentó secreción de enzimas líticas exocelulares, *H. uvarum* compitió por los nutrientes, el espacio, además tuvo producción de compuestos orgánicos volátiles antifúngicos, *R. glutinis* tuvo mayor capacidad para generar biopelículas (9).

Se ha demostrado que las levaduras epífitas presentes en los frutos y otras partes de las plantas tienen potencial como agentes de control biológico contra *Botrytis cinerea*; de hecho, se demuestra que levaduras aisladas de frutos son capaces de ejercer antagonismo en los mismos frutos, esta información es relevante ya que un primer acercamiento sería lograr aislar las levaduras epífitas del filósfera de la planta de arándanos, particularmente de los tallos, hojas, flores y frutos de plantas sanas para comprobar si podrían servir como potenciales biocontroladoras.

Acero en 2022 (10), encontró que 72 especies de levaduras han sido reportadas como controladoras biológicas para el hongo *Botrytis cinerea* en diferentes tipos de cultivo, entre las cuales hay 18 especies de *Candida* spp. 9 de *Pichia* spp. 4 de *Saccharomyces* spp. 2 de *Meyerozyma* spp. y 3 de *Rhodotorula* spp., entre otras. Esta información sugiere que las levaduras epífitas que albergan distintos frutos u otras partes de las plantas podrían ser beneficiosas y mitigar la incidencia de patógenos. En esta revisión, también se encontró que se han realizado ensayos *in vitro* e *in vivo*. Acero afirma que, de las 24 referencias relacionadas con control biológico, 3 utilizaron sólo ensayo *in vitro*, y 5 de las referencias utilizaron ensayo *in vivo*. Con relación a la acción que ejercen las levaduras, se ha encontrado que puede hacerse por competencia por nutrientes, producción de compuestos o enzimas que inhiben el desarrollo del patógeno, o de forma indirecta, como la estimulación de defensa en las plantas (11).

Otro trabajo realizado en manzanas y naranjas en Sudáfrica evaluó el uso de cinco especies de levaduras no pertenecientes a *Saccharomyces* (*Suhamyces pyralidae*, *Meyerozyma guilliermondii*, *Pichia kluyveri*, *Zygoascus helenicus* y *Aureobasidium melanogenum*) como agentes de biocontrol contra *Penicillium expansum*, *P. digitatum* y *P. italicum*. *Aureobasidium melanogenum* mostró la inhibición más significativa del crecimiento en el ensayo de inhibición radial, alcanzando una inhibición del 60%, 100% y 70% contra *P. expansum*, *P. digitatum* y *P. italicum*, respectivamente. Se identificaron siete compuestos volátiles:

isobutanol, 2-feniletanol, acetato de isoamilo, alcohol isoamílico y acetato de 2-fenetilo, asociados con la inhibición de *P. expansum*. En ensayos postcosecha, los tratamientos con levadura mostraron una actividad de inhibición limitada en manzanas (aprox. 15%). Sin embargo, en naranjas, *M. guilliermondii* demostró una inhibición sustancial, alcanzando una inhibición del 72% y 77% contra *P. digitatum* y *P. italicum*, respectivamente. Estos hallazgos sugieren que las especies de levadura seleccionadas tienen potencial como agentes de control biológico contra *P. expansum*, *P. digitatum* y *P. italicum*, aunque se requiere más investigación para comprender completamente y optimizar su aplicación. Se observa que la levadura de la especie *Meyerozyma* presentó una inhibición contra otro hongo fitopatógeno y su actividad demuestra su potencial biocontrol (12).

Adicionalmente, otro estudio evaluó la eficacia de la levadura de la filosfera *Meyerozyma caribbica* YDP-27 en el manejo de enfermedades postcosecha causadas por seis hongos patógenos: *Colletotrichum musae*, *Colletotrichum capsici*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Alternaria alternata*, *Curvularia alcornii* y *Pestalotiopsis* sp. La levadura demostró un fuerte potencial de biocontrol, con una inhibición promedio del crecimiento micelial (MGI) del 31.1% en todos los patógenos probados. El estudio exploró más a fondo los efectos del estrés ambiental, incluyendo fluctuaciones de temperatura, estrés oxidativo y estrés osmótico, en la viabilidad y morfología de la levadura. Estos hallazgos subrayan la robustez de *M. caribbica* YDP-27 como agente de biocontrol, distinguiéndose de otras levaduras por su amplia supresión de patógenos, tolerancia al estrés y adaptabilidad a la formulación. El estudio proporciona nuevos conocimientos para optimizar las estrategias de biocontrol basadas en levadura, mejorando la vida útil y la eficacia contra patógenos fúngicos poscosecha. Esos resultados visualizan al género *Meyerozyma* como una levadura potencial para el control de hongos fitopatógenos (13).

Con relación a *Rhodotorula*, se realizó una investigación con *Rhodotorula glutinis*, como antagonista en donde mostró un buen rendimiento de biocontrol contra diversas enfermedades poscosecha en frutas. En el estudio, se observó una fuerte capacidad de adhesión de *R. glutinis* a esporas e hifas de *Botrytis cinerea*. Análisis posteriores mostraron que ciertos componentes proteicos en la superficie celular de la levadura desempeñaron un papel crítico durante la interacción entre *R. glutinis* y *B. cinerea* (14). Al igual que en el presente trabajo, *Rhodotorula* demostró capacidad antagónica contra *Botrytis cinerea*.

Existen estudios de antagonismo como método de control biológico en cultivos, no obstante, no hay muchos que se enfoquen en levaduras epífitas en arándanos especialmente en el contexto colombiano. Por consiguiente, se da la posibilidad de realizar estudios con esas variables para contribuir y fomentar nuevos conocimientos y estrategias para el manejo de fitopatógenos.

2. MARCO REFERENCIAL

2.1. Cultivo de arándanos

El arándano pertenece a la clase dicotiledónea de la familia Ericaceae, su género es *Vaccinium* spp. que alberga a 250 especies, siendo *Vaccinium corymbosum* la planta del arándano (15,16). Es un arbusto perenne, es decir, que su vida se extiende a más de dos años. Su crecimiento es lento y la primera producción del fruto se ve reflejada a los dos o tres años de la siembra de la plántula. Para el crecimiento y desarrollo de la planta del arándano se requieren condiciones agroecológicas, como los metros sobre el nivel del mar (msnm) que oscilan entre 2200m y 2800m (17), la temperatura entre 8-20°C (18) y una humedad relativa alta (65% - 85%) (19). En cuanto a las condiciones edáficas, el arándano se adapta al suelo de textura limosa o franco-arenosa con un pH ácido (4,5 – 5,5), drenaje rápido y rico en nitrógeno, potasio y fósforo (19).

El cultivo del arándano tiene un potencial significativo debido a la demanda internacional, considerándose una fruta saludable por sus antioxidantes. La producción de arándanos en Colombia se implementó aproximadamente hace 10 años, y en los últimos 5 años se identificó que su capacidad de adaptación es alta debido a sus propiedades agroecológicas, por esta razón, su producción ha ido en aumento (1). El arándano se encuentra en mayor medida en el altiplano cundiboyacense y teniendo en cuenta las condiciones agroecológicas que presenta, el cultivo tiene una producción continúa porque no hay estaciones climáticas que influyen en sus etapas de crecimiento y desarrollo. Por lo tanto, el arándano se establece como un cultivo de ciclo anual (19,20)

2.2. Hongos fitopatógenos de arándanos

En Colombia, se han registrado hongos fitopatógenos cuando no hay un control y monitoreo del fruto de arándano en la postcosecha, y se pueden generar pérdidas económicas, los hongos más asociados a enfermedades son *Botrytis cinerea* conocido como moho gris, *Colletotrichum acutatum* (antracnosis), *Godronia cassandrae* (cancro godronia), *Botryosphaeria corticis* (cancro), *Diaporthe* spp., *Alternaria tenuissima*, *Phomopsis vaccinii* (pudrición de la fruta), *Hainesia lythri*, *Pestalotiopsis clavispora*, *Aspergillus* spp. y *Penicillium* spp. (21,22).

2.3. Levaduras biocontroladoras

Las levaduras son microorganismos que han demostrado un excelente comportamiento como antagonistas de hongos fitopatógenos. Son un grupo de hongos eucariotas y la mayoría se reproduce por gemación, lo que hace que la levadura sea idónea para ejercer un control biológico, pues debe ser estable genéticamente, tener requisitos nutricionales relativamente simples, tener eficacia en diferentes condiciones ambientales, y ser versátil, es decir funcionar como antagonista contra diferentes patógenos (23). Desde el descubrimiento del potencial de las levaduras como agentes de biocontrol,

se ha analizado a profundidad cómo se podría desarrollar bioplaguicidas a base de levaduras (24).

Este tipo de microorganismo puede tener diferentes mecanismos de acción frente a patógenos, entre ellos se encuentran: competencia por espacio y nutrientes, producción de compuestos orgánicos volátiles (COV) y producción de toxinas e inducción de resistencia al huésped (24). Con relación a la aplicación de las levaduras, se ha reportado que como método preventivo es mucho más eficaz que como tratamiento curativo (25). Adicionalmente, algunos investigadores recomiendan que se deben incrementar los ensayos a nivel *in vivo* con el fin de demostrar su eficacia, probar que no sea un producto tóxico, para poder comercializarlo y que sea aceptado en las industrias y por los cultivadores (26).

A pesar de haber 72 especies de levaduras reportadas como biocontroladores de *Botrytis cinerea* (10), solamente se han identificado las levaduras *Filobasidium* sp. y *Sporobolomyces* sp. en Estados Unidos en plantas de arándano (27).

2.4. Antagonismo *in vitro*

El antagonismo *in vitro* es el enfrentamiento de dos o más microorganismos para evaluar y observar la inhibición o reducción de crecimiento y determinar el microorganismo con potencial para controlar al otro en medios de cultivo (28). Se han logrado identificar diferentes microorganismos que tienen la característica de ser antagonistas contra algunos patógenos, entre ellos bacterias, hongos y levaduras; se podría considerar que las levaduras tienen ventajas sobre otras especies de microorganismos debido a que los requerimientos nutricionales son simples y no son tóxicos para el hombre, siendo opción como control biológico (29).

2.5. Identificación fenotípica y genotípica

La identificación fenotípica de hongos consta de características macroscópicas por el aspecto de las colonias, microscópicas con claves dicotómicas y según sus perfiles metabólicos, este último tiene un método de identificación rápida de pruebas bioquímicas denominado índice de perfil analítico o Analytical Profile Index (API) en donde al inocular los microorganismos, metabolizan los sustratos que generan viraje de color y se interpretan después de la inoculación. Los resultados obtenidos generan un perfil numérico y se comparan con bases de datos establecidos (30,31).

La identificación genotípica es el resultado de la extracción y secuenciación del ADN obtenido mediante el método de PCR o reacción en cadena de la polimerasa, que es una técnica de biología molecular que se basa en amplificar un fragmento específico de ADN de una matriz generando millones de copias por medio de una enzima polimerasa termoestable (32). Y el fragmento o región a amplificar para la identificación de ADN de hongos es Internal Transcribed Spacer (ITS) que es una región del ADN nuclear (ADNnr), que comprende la región ITS1 e ITS2, que están separados por el gen 5.8S(33).

3. DISEÑO METODOLÓGICO

El presente estudio es de enfoque cualitativo con un alcance semicuantitativo. Es cualitativo ya que busca evaluar la acción antagónica *in vitro* de aislamientos de levaduras frente a hongos filamentosos fitopatógenos. Asimismo, posee un componente semicuantitativo debido a que se mide numéricamente a través del Porcentaje de Inhibición del Crecimiento Radial (PICR).

3.1. Universo, población, muestra

Universo: Cultivos de arándanos ubicado en Cundinamarca

Población: Tejidos sanos y enfermos de plantas de arándano. Filósfera comprendida en tallo, hojas, inflorescencias, flor y fruto. Rizósfera comprendida en raíz.

Muestra: Levaduras epífitas de tejidos sanos de arándano, y hongos posibles fitopatógenos aislados de tejidos enfermos de arándano.

3.2. Hipótesis, variables, indicador

Hipótesis nula: Las levaduras no tienen acción antagónica *in vitro* contra los hongos fitopatógenos encontrados en el arándano.

Hipótesis alternativa: Las levaduras tienen la capacidad antagónica *in vitro* de hongos fitopatógenos del arándano.

Variables dependientes:

Capacidad antagónica de las levaduras.

Características fenotípicas y genotípicas de las levaduras.

Variables independientes:

Partes de las plantas para la obtención de aislamientos.

Técnicas de enfrentamiento dual.

Medios de cultivo para evaluar la capacidad antagónica.

Temperatura y tiempo de incubación.

Método de caracterización genotípica para identificar levaduras.

Indicador: El Porcentaje de Inhibición de Crecimiento Radial (PICR) teniendo en cuenta la siguiente fórmula:

$$PICR = \frac{(R1-R2)}{R1} \times 100$$

Donde R1 es el radio del hongo fitopatógeno control y R2 es el radio del hongo fitopatógeno en enfrentamiento con la levadura antagonista.

3.3. Selección de hongos

Levaduras epífitas observadas y caracterizadas microscópicamente por tinción de gram y azul de lactofenol. Se descartaron las colonias bacterianas.

Hongos filamentosos posibles fitopatógenos identificados por claves dicotómicas, se descartaron hongos que se consideran ambientales y micelios sin rasgos morfológicos característicos considerados como “micelio estéril”.

3.4. Técnicas y procedimientos.

3.4.1. Recolección de muestras:

Se visitaron 28 fincas de producción de arándano en el altiplano cundiboyacense, solamente en 8 permitieron la recolección de muestras con restricciones de información establecidas por los productores. Por esta razón, la recolección no fue uniforme entre predios. Se obtuvieron muestras de diferentes tejidos vegetales, incluyendo hojas, tallos y frutos. La distribución de los puntos de muestreo y las características de las muestras recolectadas se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1. Fincas de muestreo, ubicación y tipo de muestra

N°	FINCA O VIVERO	UBICACIÓN	TIPO DE MUESTRA OBTENIDA
1	Arándanos del Monte: Finca La Esperanza	Gama - Cundinamarca	Tallos, hojas, frutos (1 planta)
2	Arándanos El Oasis	Chocontá, Cundinamarca	Tallos y hojas (1 planta)
3	Finca El Lago Arándano	Guasca, Cundinamarca	Tallos, hojas y frutos enfermos (1 planta)
4	Finca Viro San Francisco Arándanos	Guasca, Cundinamarca	Tallos, hojas y frutos (1 planta)
5	Grangea: Granja orgánica Integral	Tabio, Cundinamarca	Aportaron las muestras – Finca del Convenio (Partes sanas y enfermas en 10 plantas)

6	Arándanos Huerta Montechelo	Subachoque, Cundinamarca	Frutos empacados (Compra) (1 caja de 1 libra)
7	Arándanos Arantina	Usaquen, Bogotá	Frutos empacados (Compra) (1 caja de 1 libra)
8	Arándanos de la Sabana	Chía, Cundinamarca	Tallos, hojas y frutas (1 planta)

Se clasificaron los tejidos vegetales en filósfera (tallo, hoja, flor, inflorescencia y fruto) y raíz de la planta. Cada tejido se categorizó en sano y enfermo, según los criterios de signos y síntomas de enfermedad por hongos filamentosos:

- Hojas con presencia de halos cloróticos y necróticos definidos, y signos en el haz y envés de esta.
- Tallos con coloración oscura distintiva en el corte transversal.
- Flores y frutos con observación de micelio.
- Raíces con coloraciones oscuras al corte transversal.
- Los tejidos sanos se consideraron con ausencia de signos y síntomas.

Cada tejido se guardó en bolsas ziploc y se rotuló con el nombre de la planta, el tipo de tejido, especificando si se trataba de tejido sano o enfermo, procedencia geográfica y fecha.



Figura 1. Toma de muestras A. Muestreo de tejido de planta de arándano. B. Cultivo de plantas de arándano. C. Planta de arándano. D. Transporte de muestras. E. Rotulado de muestras

3.4.2. Lavado, desinfección y siembra de muestras

El tejido enfermo se ubicó en un área estéril, se desinfectó sumergiéndose en etanol al 70%, hipoclorito de sodio al 2% y finalmente se realizaron dos lavados con agua destilada estéril, cada procedimiento con las diferentes soluciones se efectuó durante dos minutos.

El tejido sano, de igual manera, se dispuso en un área estéril, se lavó con agua destilada estéril y se dejó en frasco Scott con una solución de Tween 80 al 0,5%, posteriormente se colocó en un agitador a 100 rpm durante 30 minutos.

Para ambos procedimientos se utilizaron medios de cultivo sólidos Agar Sabouraud, PDA y Agar Rosa de Bengala. Los tejidos enfermos se sembraron directamente en los agares después del lavado y desinfección, mientras que en los tejidos sanos se sembró 100 μ L de la solución. Tras este proceso, se incubaron los medios de cultivo de tejidos sanos a 28°C por 24 horas y los medios de cultivo con tejido enfermo a 28°C por 7 días.



Figura 2. Tejidos de planta de arándanos A. Tallos e inflorescencias. B. Hojas. C. Frutos y flores. D. Raíz. Fuente: Elaboración propia



Figura 3. Elementos y procedimientos de lavado de muestras. A. Soluciones de lavado para tejido enfermo. B. Soluciones de lavado para tejido sano. C. Lavado de raíz. D. Lavado de tallo. E. Lavado de hojas. F. Lavado de flores e inflorescencias. G. Lavado de frutos. H. Agitación de tejidos sanos en soluciones con Tween 80. I. Tejidos sanos en soluciones con Tween 80. Fuente: Elaboración propia

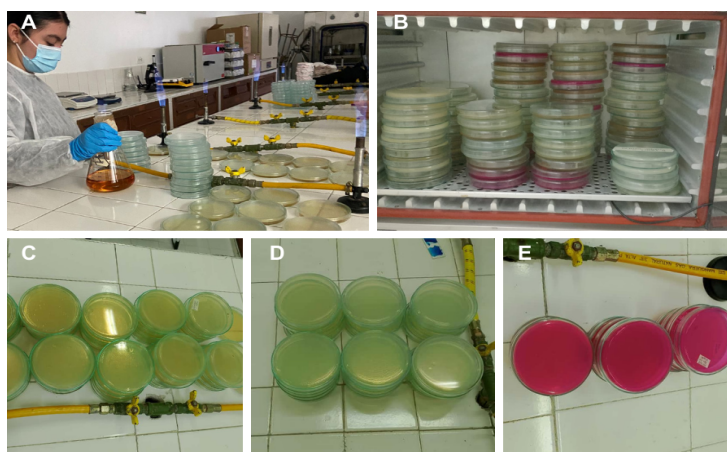


Figura 4. Medios de cultivo. A. Preparación. B. Incubación después de tejidos y soluciones sembradas. C. PDA. D. Agar Sabouraud. E. Agar Rosa de Bengala. Fuente: Elaboración propia

3.4.3. Pruebas bioquímicas API para la identificación de levaduras.

Se utilizaron las galerías de API® 20 C AUX de la casa comercial bioMérieux y se realizó el procedimiento como indicó el inserto. Posteriormente, en la hoja de resultados se determinó el perfil numérico y se comparó con el porcentaje de positividad de la tabla de identificación.

3.4.4. Antagonismo dual *in vitro*

Luego de la identificación fenotípica de levaduras antagónicas y hongos filamentosos fitopatógenos, se realizó el enfrentamiento de estos microorganismos en medios de cultivo Agar Sabouraud. Se colocaron las muestras así: Se dividió por la mitad la caja de Petri con el medio sin romper el agar, y se coloca en la región central un plug de 6 mm del hongo filamentoso y en la otra parte se sembró masivamente la levadura antagónica. Cada hongo filamentoso contó con un control de crecimiento, el plug de hongo se colocó en la mitad de la caja para realizar la medición del diámetro de crecimiento. La evaluación se comparó mediante el crecimiento radial (cm) del hongo filamentoso frente crecimiento radial con antagonistas, teniendo en cuenta 3 mediciones del micelio en cada repetición, y de cada enfrentamiento se realizaron tres repeticiones. Previo al análisis, se calculó la media y la desviación estándar. Asimismo, se calculó el porcentaje de inhibición de crecimiento radial (PICR).

3.4.5. Identificación molecular de hongo *Botrytis* spp. y levaduras

Para la identificación molecular de levaduras y hongos con características del género *Botrytis* se hizo transferencia de levaduras en caldo Luria-Bertani (LB) y se incubaron a 28°C por 24 horas en agitación constante. Para la extracción de ADN se aplicó la metodología de “boiling lysis”, siguiendo el protocolo de “células en ebullición” propuesto por Araújo *et al.* (34, 35). Después del procedimiento, se evaluó la pureza y la integridad de las extracciones de ADN mediante espectrofotometría con el sistema NanoDrop (Thermo Scientific), siguiendo los parámetros de absorbancia A260/280, A260/230 y la concentración de la matriz por ng/ μ L.

La técnica que se utilizó para la identificación de ADN fue PCR de punto final. Las reacciones se llevaron a cabo con productos de QuantaBio Acustart II que indicaron la concentración de los reactivos, el volumen final deseado y los parámetros de amplificación con el uso de termociclador, para los primers específicos de hongos se utilizaron las regiones ITS1 e

ITS4 que anteriormente se han incorporado en otros estudios. La amplificación se confirmó al usar electroforesis de gel agarosa al 1% con el intercalante de bromuro de etidio, evidenciándose en cada matriz la presencia de una única banda, bien definida y correspondiente al tamaño del amplicón sin observarse dímeros de primers y productos inespecíficos.

Tabla 2. *Primers para la amplificación de región ITS de hongos. Fuente: Elaboración propia basada en la literatura referenciada (33).*

Gen	Región	Secuencia del primer (5' – 3')	Tamaño (pb)	G-C (%)	TM (°C)	Tamaño promedio de amplicón (pb)
SSU	ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	19	63.16	61.64	500-600
LSU	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	20	45.00	55.09	

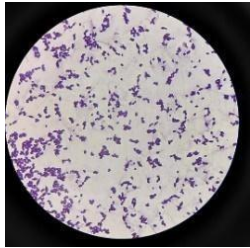
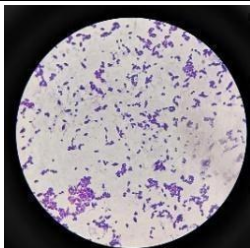
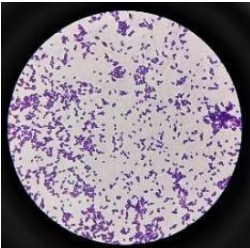
Los productos de PCR de la región ITS fueron secuenciados en MacroGen (Korea), las secuencias obtenidas se editaron con el programa Chromas 2.6.6 (Technelysium, Australia). Las secuencias editadas fueron comparadas con la base de datos “nr” de nucleótidos del Genbank mediante el algoritmo BLASTn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi/>). Como control positivo de PCR y de secuenciación se utilizó la cepa *Botrytis cinerea* ATCC 36635 proporcionada por el docente Jesús David Rueda Villabona, obtenida previamente por la Universidad Industrial de Santander.

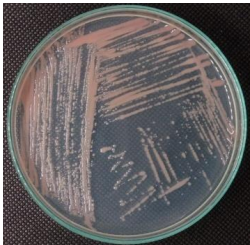
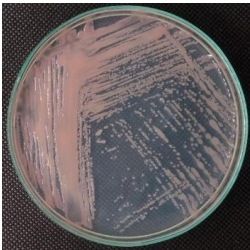
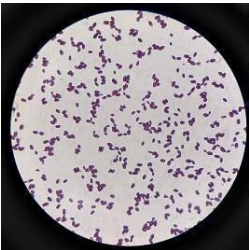
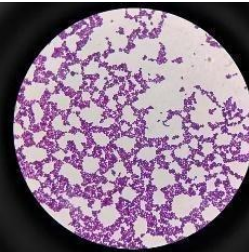
4. RESULTADOS

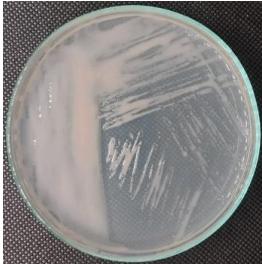
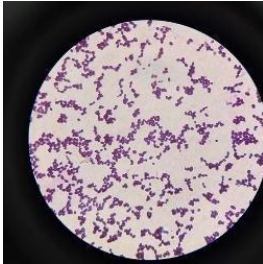
4.1. Aislamiento de levaduras a partir de tejido vegetal

En la presente investigación, se recuperaron 14 microorganismos con aspecto cremoso y mucoso, al confirmar su morfología con tinción de gram y azul de lactofenol, se identificaron que 8 eran levaduras. De los cuales, 4 tenían aspecto blanco cremoso y 4 de aspecto rosa mucoide. Así mismo, se identificó que 7 se aislaron de fruto y 1 de raíz. No se recuperaron levaduras en flores, inflorescencias y tallo. En la tabla 2 se observan los resultados descritos.

Tabla 2. Crecimiento de microorganismos levaduriformes primer aislamiento.
Elaboración propia

Tejido	Código inicial	Tipo de Microorganismo	Código asignado	Observación macroscópica	Observación microscópica
Raíz	001	Bacteria	Eliminada		
Hoja	002	Bacteria	Eliminada		
Tallo	003	Bacteria	Eliminada		
Fruto con signos	004	Levadura	01	 <i>Figura 5. Colonias blancas cremosas.</i>	 <i>Figura 6. Observación microscópica 100x.</i>
Fruto con signos	005	Levadura	02	 <i>Figura 7. Colonias blancas cremosas.</i>	 <i>Figura 8. Observación microscópica 100x.</i>
Fruto con signos	006	Levadura	03	 <i>Figura 9. Colonias blancas cremosas.</i>	 <i>Figura 10. Observación microscópica 100x.</i>

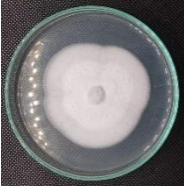
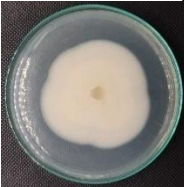
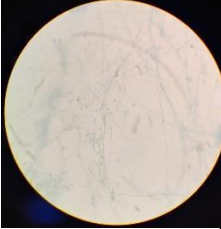
Raíz	007	Levadura	04	 <i>Figura 11. Colonias rojas mucoides.</i>	 <i>Figura 12. Observación microscópica 100x.</i>
Fruto sano	008	Levadura	05	 <i>Figura 13. Colonias rojas mucoides.</i>	 <i>Figura 14. Observación microscópica 100x.</i>
Fruto sano	009	Bacteria	Eliminada		
Fruto sano	010	Bacteria	Eliminada		
Fruto sano	011	Levadura	06	 <i>Figura 15. Colonias rojas mucoides.</i>	 <i>Figura 16. Observación microscópica 100x.</i>
Fruto sano	012	Levadura	07	 <i>Figura 17. Colonias blancas cremosas.</i>	 <i>Figura 18. Observación microscópica 100x.</i>
Fruto sano	013	Bacteria	Eliminada		

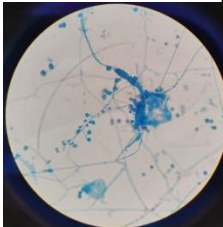
Fruto sano	014	Levadura	08	 <i>Figura 19. Colonias rojas mucoides.</i>	 <i>Figura 20. Observación microscópica 100x.</i>
------------	-----	----------	----	--	---

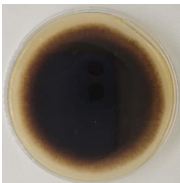
4.2. Aislamiento e identificación de hongos filamentosos de tejido vegetal con signos y síntomas de enfermedad

Se recuperaron 10 hongos posibles fitopatógenos que se presentaban en los tejidos con signos y síntomas de enfermedad, al realizar la identificación dicotómica de cada uno, se clasificaron 4 hongos como fitopatógenos, en donde 1 se recuperó de tallo, 1 de raíz, 1 de hoja y 1 de fruto. En la tabla 3 se presenta la recuperación de hongos filamentosos posibles fitopatógenos que fueron identificados por claves dicotómicas.

Tabla 3. Aislamiento e identificación de hongos filamentosos por claves dicotómicas. *Elaboración propia*

Tejido	Código inicial	Tipo de Microorganismo	Código asignado	Observación macroscópica		Observación microscópica	Género
				Anverso	Reverso		
Tallo	001	Hongo filamentos	001	 <i>Figura 21. Colonia blanca aterciopelada anverso</i>	 <i>Figura 22. Colonia blanca reverso</i>	 <i>Figura 23. Hifas hialinas septadas con presencia de macroconidios y microconidios 40X</i>	<i>Fusarium</i> spp.

Tallo	002	Hongo filamentoso	Eliminado	 <i>Figura 24. Colonia blanca algodonosa anverso</i>	 <i>Figura 25. Colonia blanca reverso</i>	 <i>Figura 26. Hifas hialinas sin presencia de estructuras reproductivas 40X</i>	Micelio estéril
Hoja	003	Hongo filamentoso	Eliminado	 <i>Figura 27. Colonia de aspecto polvoso con coloración verde en la periferia y café en la zona central</i>	 <i>Figura 28. Colonia sin pigmentación en reverso</i>	 <i>Figura 29. Conidióforos con presencia de cabeza aspergilar 40X</i>	<i>Aspergillus</i> spp.
Fruto	004		Eliminado	 <i>Figura 30. Colonia blanca algodonosa con presencia de pústulas</i>	 <i>Figura 31. Colonia blanca en reverso</i>	 <i>Figura 32. Hifas hialinas septadas con presencia de conidióforos ramificados, fiálides y conidios subglobosos agrupados en el ápice de las fiálides en 40X</i>	<i>Trichoderma</i> spp.

Raíz	005		002	 <i>Figura 33. Colonia blanca aterciopelada anverso</i>	 <i>Figura 34. Colonia café reverso</i>	 <i>Figura 35. Hifas hialinas septadas con ramificaciones en ángulos de 90° en 40X.</i>	<i>Rhizoctonia</i> spp.
Hoja	006		Eliminado				<i>Rhizopus</i> spp.
Hoja	007		Eliminado				<i>Rhizopus</i> spp.
Hoja	008		Eliminado				<i>Rhizopus</i> spp.
Hoja	009		003	 <i>Figura 36. Colonia café aterciopelada anverso</i>	 <i>Figura 37. Colonia café oscuro reverso</i>	 <i>Figura 38. Hifas dematiáceas septadas, presencia de macroconidios con septos transversales que se forman a partir de conidióforos 40X</i>	<i>Curvularia</i> spp.

Fruto	010		<i>Botrytis cinerea</i>	 Figura 39. Colonia blanca a gris algodonosa anverso.	 Figura 40. Colonia blanca reverso.	 Figura 41. Hifas hialinas septadas, conidióforos ramificados y conidias ovaladas agrupadas en el extremo, formando estructuras en "racimos de uva" 40X	<i>Botrytis cinerea</i>
-------	-----	--	-------------------------	---	--	---	-------------------------

4.3. Identificación fenotípica de levaduras antagónicas

De las levaduras recuperadas de los tejidos de plantas de arándanos, se les realizó pruebas bioquímicas donde se evaluaron de acuerdo con el patrón de asimilación de sustratos, teniendo en cuenta la tabla de identificación (Anexo 1), siendo las levaduras 01, 02 y 03 concordando con *Kloeckera* spp. Las levaduras 04 y 08 con *Rhodotorula mucilaginosa* 1. Levadura 05 con *Rhodotorula mucilaginosa* 2. Levadura 06 con *Rhodotorula glutinis* y levadura 07 con *Candida guilliermondii* (Tabla 4) (Anexo 2).

Tabla 4. Resultados de pruebas bioquímicas API de levaduras

Cepa ID	Perfil API	ID preliminar	ID asignada	0	GLU	GLY	2KG	ARA	XYL	ADO	XLT	GAL	INO	SOR	MDG	NAG	CEL	LAC	MAL	SAC	TRE	MLZ	RAF	Hifa/Pseudo hifa
Lev 01	2100200	<i>Kloeckera</i> spp.	<i>Kloeckera</i> spp. 1	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Lev 02	2100200	<i>Kloeckera</i> spp.	<i>Kloeckera</i> spp. 2	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Lev 03	2100200	<i>Kloeckera</i> spp.	<i>Kloeckera</i> spp. 3	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Lev 04	2410022	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> 1	<i>Rhodotorula</i> spp. 1	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-
Lev 05	2670073	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> 2	<i>Rhodotorula</i> spp. 2	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-
Lev 06	2142073	<i>Rhodotorula glutinis</i>	<i>Rhodotorula</i> spp. 3	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-
Lev 07	6776373	<i>Candida guilliermondii</i>	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-
Lev 08	2010022	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> 1	<i>Rhodotorula</i> spp. 4	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-

Se determinó que Lev 01, 02 y 03 asimilaron la D-glucosa y 2-ceto-gluconato cálcico y la D-celobiosa, donde en la tabla de identificación se clasifica como *Kloeckera* spp. 1, 2 y 3 respectivamente. En cuanto a Lev 04, asimiló D-glucosa, D-xilosa, adonitol, D- sacarosa y D-rafinosa, donde en la tabla de identificación se clasifica como *Rhodotorula mucilaginosa* 1 y en este trabajo se denominó *Rhodotorula* spp. 1.

Lev 05, asimiló los carbohidratos D-glucosa, L-arabinosa, D-xilosa, adonitol, xilitol, D-galactosa, D-maltosa, D-sacarosa, D-trehalosa, D-melezitosa y D-rafinosa, donde la tabla le confiere el nombre a *Rhodotorula mucilaginosa* 2 y en este trabajo se denominó *Rhodotorula* spp.2. Por otro lado, Lev 06 asimiló D-glucosa, 2-ceto-gluconato cálcico, D-galactosa, D-sorbitol D-maltosa, D-sacarosa, D-trehalosa, D-melezitosa y D-rafinosa, donde en la tabla de identificación se denomina *Rhodotorula mucilaginosa* 2 y en este proyecto se le nombró *Rhodotorula* spp. 3. Lev 07 asimiló D-glucosa, glicerol, 2-ceto-gluconato cálcico, L-arabinosa, D-xylosa, adonitol, xilitol, D-galactosa, D-sorbitol, Metil-alfaD-glucopiranosida, N-acetil-glucosamina, D-celobiosa, D-maltosa, D-sacarosa, D-trehalosa, D-melezitosa y D-rafinosa, donde en la tabla de identificación se nombra como *Candida guilliermondii*, y teniendo en cuenta la actualización de su nombre en la base de datos Index Fungorum(36), en este trabajo se denominó *Meyerozyma guilliermondii*. Y Lev 08 asimiló D-glucosa, adonitol, D- sacarosa y D-rafinosa, preclasificada como *Rhodotorula mucilaginosa* 2 y en este trabajo se denominó *Rhodotorula* spp. 4.

4.4. Antagonismo *in vitro* de levaduras frente a hongos fitopatógenos

Para el enfrentamiento de levaduras frente a hongos fitopatógenos, se presentan los gráficos e imágenes de los mejores tres enfrentamientos de levaduras frente a cada uno de los hongos fitopatógenos.

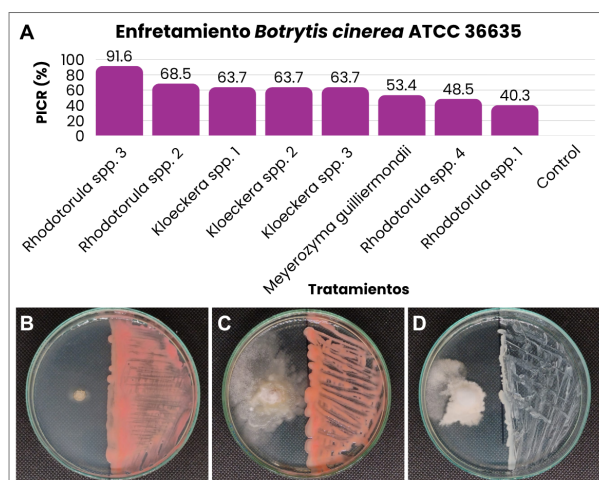


Figura 42. Enfrentamientos contra *Botrytis cinerea* ATCC 36635 A. Gráfico de barras con porcentajes de inhibición radial. B. Mejor antagonismo C. Segundo mejor antagonismo. D. Tercer mejor antagonismo

La evaluación antagónica de *Botrytis cinerea* ATCC 36635 frente a las levaduras muestra que con *Rhodotorula* spp. 3 tuvo menor crecimiento con un 91,6% de inhibición, el segundo mejor antagonismo fue contra *Rhodotorula* spp. 2 con un 68,52% de inhibición y el tercer mejor antagonismo frente a *Kloeckera* spp. con un 63,7% de inhibición.

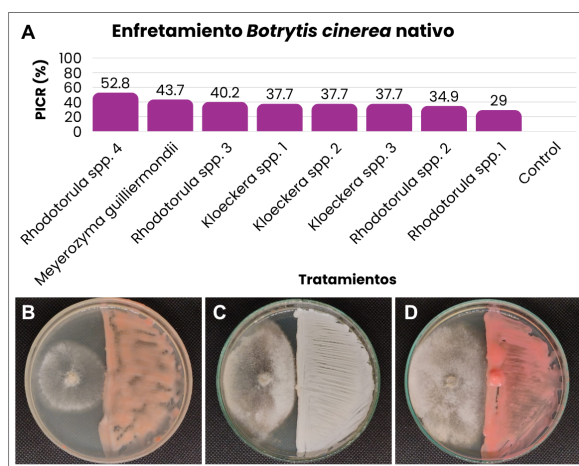


Figura 43. Enfrentamientos contra *Botrytis* spp. nativo A. Gráfico de barras con porcentajes de inhibición radial. B. Mejor antagonismo C. Segundo mejor antagonismo D. Tercer mejor antagonismo

Para la evaluación antagónica de *Botrytis cinerea* nativo frente a las levaduras, se muestra que con *Rhodotorula* spp. 4 tuvo menor crecimiento con un 52,94% de inhibición, el segundo mejor antagonismo fue contra *Meyerozyma guilliermondii*

con un 43,7% de inhibición y el tercer mejor antagonismo frente a *Rhodotorula* spp. 3 con un 40,25% de inhibición.

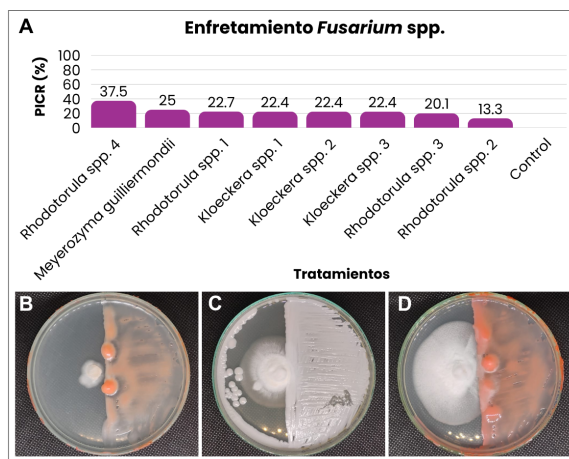


Figura 44. Enfretamientos contra *Fusarium* spp. A. Gráfico de barras con porcentajes de inhibición radial. B. Mejor antagonismo C. Segundo mejor antagonismo D. Tercer mejor antagonismo

La evaluación antagónica de *Fusarium* spp. frente a las levaduras muestra que con *Rhodotorula* spp. 4 tuvo menor crecimiento con un 37,59% de inhibición, el segundo mejor antagonismo fue contra *Meyerozyma guilliermondii* con un 25% de inhibición y el tercer mejor antagonismo frente a *Rhodotorula* spp.1 con un 22,78% de inhibición.

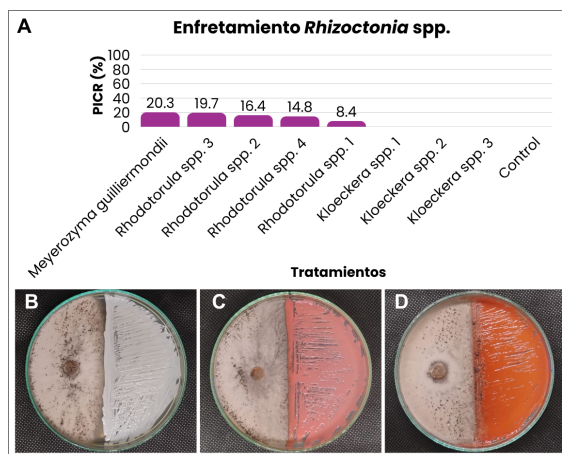


Figura 45. Enfrentamientos contra *Rhizoctonia* spp. A. Gráfico de barras con porcentajes de inhibición radial. B. Mejor antagonismo C. Enfrentamiento con *Rhodotorula* spp. 3. D. Enfrentamiento con *Rhodotorula* spp. 2

En la evaluación antagónica de *Rhizoctonia* spp. frente a las levaduras muestra que con *Meyerozyma guilliermondii* tuvo menor crecimiento con un 20,37% de inhibición, el segundo enfrentamiento fue contra *Rhodotorula* spp. 3 con un 19,75% de inhibición y el tercer enfrentamiento fue contra *Rhodotorula* spp. 2 con un 16,42 % de inhibición.

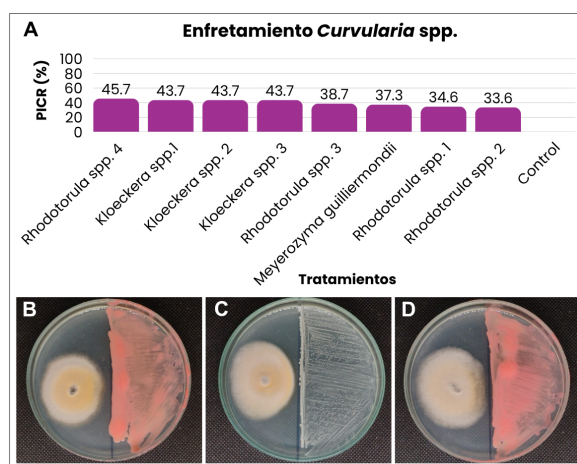


Figura 46. Enfrentamientos contra *Curvularia* spp. A. Gráfico de barras con porcentajes de inhibición radial. B. Mejor antagonismo C. Segundo mejor antagonismo. D. Tercer mejor antagonismo

La evaluación antagónica de *Curvularia* spp. frente a las levaduras muestra que con *Rhodotorula* spp. 4 tuvo menor crecimiento con un 45,78% de inhibición, el segundo mejor antagonismo fue contra *Kloeckera* spp. con un 43,7% de inhibición y el tercer mejor antagonismo frente a *Rhodotorula* spp. 3 con un 38,37% de inhibición.

4.5. Identificación molecular de levaduras antagónicas y hongos del género *Botrytis*

Para las pruebas de identificación molecular, se escogieron los resultados que se indican en verde en el Anexo 4. También se realizó extracción de ADN del control positivo *Botrytis cinerea* ATCC 36635 y *Botrytis cinerea* nativo aislado del tejido enfermo de arándano.

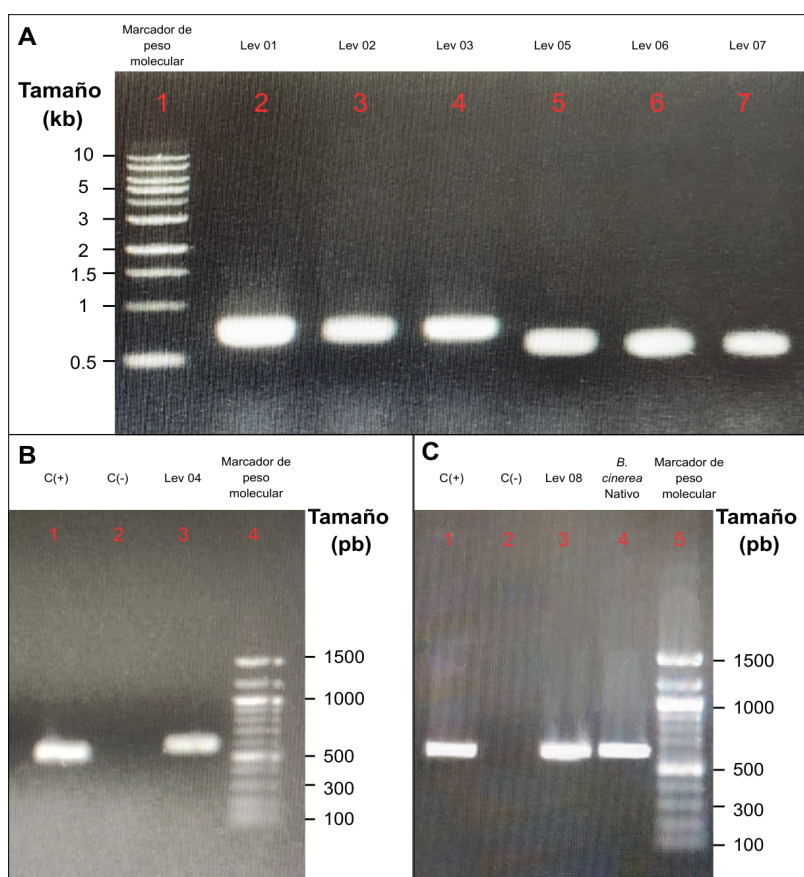


Figura 47. Electroforesis de PCR punto final. A. Levaduras 01, 02, 03, 05, 06, 07. B. Levadura 04. C. Levadura 08 y *Botrytis cinerea* Nativo

A continuación, se presentan las características de las secuencias obtenidas de la región ITS y la identificación obtenida por BLASTn, cuyo porcentaje de identidad fue mayor al 98% y el porcentaje de cobertura mayor al 85%.

Tabla 5. Características de las secuencias obtenidas.

ID Muestra	Microorganismo identificado	Longitud (pb)	Contenido GC (%)	Secuencia completa (Ubicación)
<i>Botrytis cinerea</i> ATCC 36635	<i>Botrytis cinerea</i>	372	45%	Ver Anexo 8 . Sec 1
<i>Botrytis cinerea</i> nativo	<i>Botrytis cinerea</i>	385	45%	Ver Anexo 8 Sec 2
<i>Kloeckera</i> spp. 1	<i>Hanseniaspora</i> spp.	522	33%	Ver Anexo 8. Sec 3

<i>Kloeckera</i> spp. 2	<i>Hanseniaspora</i> spp.	563	33%	Ver Anexo 8. Sec 4
<i>Kloeckera</i> spp. 3.	<i>Hanseniaspora</i> spp.	641	34%	Ver Anexo 8. Sec 5
<i>Rhodotorula</i> spp. 1	<i>Rhodotorula</i> spp.	539	42%	Ver Anexo 8. Sec 6
<i>Rhodotorula</i> spp. 2	<i>Rhodotorula</i> spp.	508	43%	Ver Anexo 8. Sec 7
<i>Rhodotorula</i> spp. 3	<i>Rhodotorula</i> spp.	508	43%	Ver Anexo 8. Sec 8
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	519	42%	Ver Anexo 8. Sec 9
<i>Rhodotorula</i> spp. 4	<i>Rhodotorula</i> spp.	554	42%	Ver Anexo 8. Sec 10

5. DISCUSIÓN

Si bien, hay estudios que identifican el microbioma de *Vaccinium corymbosum*, en donde la mayoría está enfocado a la parte radicular de la planta debido a la captación de nutrientes por parte del arbusto para poder crecer. No hay estudios exhaustivos que mencionen el microbioma de toda la estructura de la filósfera de plantas de arándanos específicamente en un contexto colombiano, dada la variabilidad de los cultivos teniendo en cuenta las condiciones edafoclimáticas y los elementos para su cuidado, como el uso de fertilizantes o control químico que pueda cambiar ese microbioma.

En la presente investigación, se encontró mayor prevalencia de levaduras en los frutos. En general, se ha identificado mayor prevalencia de levaduras en frutos que en el resto de las partes de plantas de diferentes cultivos como Sperandio *et al.*, donde demuestran que la densidad poblacional de levaduras es mayor en frutos que en hojas en plantas de *Sabicea brasiliensis* y *Anacardium humile* (37); Jones *et al.* (38) demostraron mayor abundancia de levaduras en frutos de bayas especialmente los maduros de fresa, cereza, frambuesa y arándano, y Chacón *et al.* (39), que para aislar posibles biocontroladores frente a *Botrytis cinerea* y *Alternaria alternata* en *Vaccinium corymbosum*, encontraron mayor población de levaduras en frutos que en flor, esa prevalencia en frutos puede ser debido a las

propiedades nutricionales en comparación con el resto de la filósfera hospedándose un mayor consorcio (40).

Del mismo modo, también se identificaron levaduras en frutos con signos y síntomas de enfermedad, aunque el lavado inicialmente tuvo como objetivo la recuperación de hongos posibles fitopatógenos, porque estos microorganismos ingresan por acción mecánica o por sus estructuras y se hospedan dentro del tejido, también se pueden aislar microorganismos endófitos que hacen parte del microbioma de la planta. Así mismo, el estudio de Sánchez *et al.*, recuperaron microorganismos en la carposfera de manzanas, donde encontraron mayor cantidad microorganismos epífitos que endófitos (41).

Para el aislamiento de hongos fitopatógenos, se tuvieron en cuenta los signos y síntomas de enfermedad que presentaban los tejidos y las claves dicotómicas de los hongos, donde se recuperó *Botrytis cinerea* nativo debido a la aparición del micelio en los frutos, además se ha demostrado que *Botrytis cinerea* puede ingresar al tallo generando marchitamiento y muerte de la planta. *Botrytis cinerea* no solo ataca a la planta del arándano, sino que este hongo es considerado el segundo fitopatógeno más prevalente a nivel mundial, generando pérdidas en diferentes cultivos especialmente las consideradas bayas (42).

También, se recuperó *Fusarium* spp. considerado como fitopatógeno por generar enfermedad vascular reduciendo la capacidad para translocar agua y nutrientes ocasionando marchitamiento y finalmente la muerte en diferentes cultivos (43), *Rhizoctonia* spp. se ha detectado como fitopatógeno en diferentes cultivos generando necrosis radicular (44). *Curvularia* spp. no se ha reportado como fitopatógeno de plantas de arándano en Colombia, sin embargo, se ha identificado como causante de necrosis en tallos y mancha foliar (45,46).

En la recuperación de hongos, también se identificó *Trichoderma* spp. que puede deberse al uso de biofungicidas a base de este microorganismo o que hace parte del microbiota nativo de la planta y no genera ninguna patología (47). Se recomienda evaluar el efecto antagónico con las levaduras que pueden ser

candidatas a controles biológicos para evaluar posibles interferencias con el implemento de controles biológicos entre sí. También, se recuperaron otros hongos como *Aspergillus* spp. y *Rhizopus* spp. que se consideraron como hongos saprófitos ambientales que pueden aparecer en postcosecha debido al deterioro natural del fruto.

En las pruebas bioquímicas API, se tomó en cuenta la asimilación de NAG (N-acetil-glucosamina) debido a la capacidad de generar enzimas hidrolíticas como quitinasas y que pueden degradar la pared celular de los hongos filamentosos (48), por tanto, es un componente para lisar el hongo. Del mismo modo, se identificaron las levaduras que presentaban un amplio espectro de asimilación de carbohidratos que pueden limitar el crecimiento de otros microorganismos por la competición de nutrientes (49). Otra característica de levaduras posibles biocontroladoras, es la producción de compuestos volátiles (COV) en donde se tuvo en cuenta la asimilación de xilitol (XLT), adonitol (ADO) y sorbitol (SOR) que al metabolizarse pueden generar ésteres y alcoholes los cuales inhiben el crecimiento micelial de hongos, germinación de esporas y la producción de micotoxinas (50). De igual manera, se consideró la producción de pigmento de los microorganismos del género *Rhodotorula* spp. los cuales son producto de los carotenoides que se han descrito como posibles antifúngicos importantes para el biocontrol (51). En ese sentido, en este estudio se evidenció que las levaduras que tuvieron mayor asimilación de carbohidratos fueron *Meyerozyma guilliermondii* seguido de *Rhodotorula* spp. 2.

Tras la evaluación de la acción antagónica de levaduras frente a hongos fitopatógenos, se evidenció que *Botrytis cinerea* nativo a diferencia de *Botrytis cinerea* ATCC 36635 tuvo mayor crecimiento en los enfrentamientos. Abbey *et al.* sustenta esta idea al evaluar la resistencia de *Botrytis cinerea* en cultivos de arándano en Michigan que han generado resistencia a fungicidas como a la piraclostrobina y boscalid (52). La levadura que más inhibió el crecimiento frente a *Botrytis cinerea* nativo fue *Rhodotorula* spp. 4 y se observó que hubo menor cantidad de crecimiento de micelio en el lado que se encuentra la levadura, así

Zapata *et al.* mencionan que *Rhodotorula mucilaginosa* es una alternativa en control biológico de *Botrytis cinerea* en cultivos de Uchuva (53). Asimismo, González *et al.* demostraron que al usar *Rhodotorula mucilaginosa* frente a *Botrytis* en una presentación de polvo seco para manzanas, redujo el crecimiento en un 94,8% y tuvo mejor eficacia que otro producto comercial que contenía *Trichoderma* spp. que inhibió en menor medida a *Botrytis cinerea* con un 44,4% (54). También se encontró como segundo mejor antagonista de *Botrytis cinerea* a *Meyerozyma guilliermondii* donde se evidencia que *Botrytis cinerea* nativo tiene una respuesta de defensa por el mayor contenido de micelio en el lado que se encuentra la levadura, no obstante, no es suficiente para atacar a la levadura, como lo menciona Ding *et al.* Esto puede ser efecto de la producción de COV por parte de *Meyerozyma guilliermondii* y otros mecanismos de defensa como la secreción de metabolitos difusibles, competencia por nutrientes y espacio (55).

Fusarium spp. tuvo mayor inhibición con *Rhodotorula* spp. 4 que concuerda con Mohamed *et al.* que evaluaron el antagonismo *in vivo* de levaduras frente a *Fusarium* spp. en plantas de tomate e identificaron que, de las 11 levaduras recuperadas, *Rhodotorula mucilaginosa* tuvo mayor efectividad en la inhibición de *Fusarium* spp. Además, *Rhodotorula* contribuyó con la reducción del marchitamiento causado por el estrés hídrico generado por *Fusarium* spp. (56). En segundo lugar, el mejor antagonismo contra *Fusarium* spp., fue con *Meyerozyma guilliermondii* en donde se observó la reducción de micelio alrededor de *Fusarium* spp.; Kthiri *et al.* han determinado que *Meyerozyma guilliermondii* no solo es antagonista frente a *Fusarium* spp. sino que también produce ácido indol-3-acético (IAA) que es una fitohormona que influye en el crecimiento de las plantas (57).

En cuanto a *Rhizoctonia* spp., en todos los enfrentamientos tuvo crecimiento, sin embargo, se observó que con la levadura *Meyerozyma guilliermondii* hubo una inhibición del crecimiento del 20%, esto puede deberse a la habilidad de *Meyerozyma* de utilizar todos los componentes nutricionales entrando en competencia con *Rhizoctonia* spp. por los nutrientes (58). Para *Curvularia* spp. el menor crecimiento fue con *Rhodotorula* spp. 4 y *Kloeckera* spp. donde se presentó

inhibición del crecimiento micelial en la zona del medio de cultivo contigua a la levadura, sugiriendo que puede deberse a la capacidad de producción de COV por algunas levaduras (58) y de carotenoides por *Rhodotorula* spp. que pueden actuar como antifúngicos (51).

En los resultados obtenidos con PCR, se identificó en el programa BLASTn que las secuencias de las levaduras anteriormente clasificadas como *Kloeckera* spp. corresponden molecularmente como *Hanseniaspora* spp. Cadez *et al.* sustenta que tanto *Hanseniaspora* spp. y *Kloeckera* spp. hacen parte de un grupo monofilético, es decir, comparten un ancestro común, y *Kloeckera* spp. es la forma anamorfa dentro del género *Hanseniaspora* (59).

Así mismo, al verificar la similitud de cada una de las secuencias de los 3 aislamientos de las levaduras *Hanseniaspora* spp. la identidad entre cada una era del 100%, sin embargo, al buscar en BLAST hay una región específica que difiere de las otras *Hanseniasporas* reportadas en el banco genético con una variabilidad de 100pb (Anexo 9), por lo tanto, se considera importante realizar otros primers específicos para la determinación de diferentes *Hanseniasporas* y descartar o incluir una nueva especie de las levaduras del género *Hanseniaspora*.

Al igual que las levaduras del género *Rhodotorula* spp. también se deben identificar con otros primers específicos para determinar el género y la especie para no inferir en la identificación de cada una. Por otro lado, *Meyerozyma guilliermondii* y el hongo fitopatógeno *Botrytis cinerea* nativo tuvieron una concordancia del 100% de cada una de sus secuencias lo que confirma su identificación.

6. CONCLUSIONES

1. A partir de plantas de arándano enfermas se pudieron aislar los siguientes hongos fitopatógenos: *Fusarium* spp., *Curvularia* spp., *Rhizoctonia* spp. y *Botrytis cinerea*.

2. Se logró recuperar 3 levaduras endófitas y 5 levaduras epífitas procedentes de plantas de arándanos, a las cuales se les realizaron pruebas bioquímicas y fueron identificadas como *Kloeckera* spp., *Rhodotorula* spp. y *Meyerozyma guilliermondii*.
3. El aislamiento *Rhodotorula* spp. 4 presentó el mayor porcentaje de inhibición contra *Botrytis cinerea* 52,84%, contra *Fusarium* spp. 37,59% y frente a *Curvularia* spp. 45,78%. El aislamiento de *Meyerozyma guilliermondii* presentó el mayor porcentaje de inhibición frente a *Rhizoctonia* spp. 20,37%.
4. Se identificaron molecularmente 3 levaduras pertenecientes al género *Hanseniaspora* spp., 4 del género *Rhodotorula* spp. y una del género y especie *Meyerozyma guilliermondii*.
5. Adicionalmente, se realizó una identificación del hongo fitopatógeno *Botrytis cinerea* que fue confirmada mediante métodos moleculares.

7. RECOMENDACIONES

- Estudiar el microbioma rizosférico y de la filósfera de *Vaccinium corymbosum* en el altiplano cundiboyacense.
- Identificar hongos fitopatógenos por técnicas de biología molecular y comparar resistencia frente a fungicidas.
- Identificar hasta especie todos los aislamientos de las levaduras consideradas posibles biocontroladoras.
- Identificar los compuestos orgánicos volátiles (COV) que generan cada una de las levaduras posibles biocontroladoras.
- Evaluar la acción de las levaduras posibles biocontroladoras aisladas en este estudio, frente a otros productos de control biológico a base de microorganismos en condiciones controladas.
- Estudiar el impacto que ocasiona *Botrytis cinerea* en la salud pública.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. International Blueberry Organization (IBO). El crecimiento del cultivo de arándanos en Colombia una realidad [Internet]. 2025 [cited 2025 Feb 13]. Available from: <https://www.internationalblueberry.org/2025/01/28/el-crecimiento-del-cultivo-de-arandanos-en-colombia-ya-es-una-realidad/>
2. Bell SR, Hernández Montiel LG, González Estrada RR, Gutiérrez Martínez P. Main diseases in postharvest blueberries, conventional and eco-friendly control methods: A review. LWT. 2021 Sep 1;149:112046. doi:10.1016/J.LWT.2021.112046
3. Abbey J, Percival D, Jaakola L, Asiedu SK. Efficacy, persistence and residue levels of fungicides for Botrytis control in wild blueberry. Crop Protection. 2024;179. doi:10.1016/j.cropro.2024.106633
4. Sautua FJ, Baron C, Pérez-Hernández O, Carmona MA. First report of resistance to carbendazim and procymidone in Botrytis cinerea from strawberry, blueberry and tomato in Argentina. Crop Protection. 2019;125. doi:10.1016/j.cropro.2019.104879
5. Chavarro LYB, Leal Ligia Consuelo Sánchez. Control biorracional de hongos del género Fusarium. Biociencias (UNAD) [Internet]. 2020 Nov 26 [cited 2026 Apr 7];2(1):1–19. Available from: <https://hemeroteca.unad.edu.co/index.php/Biociencias/article/view/4336>
6. Vieira JM, Flores-López ML, de Rodríguez DJ, Sousa MC, Vicente AA, Martins JT. Effect of chitosan–Aloe vera coating on postharvest quality of blueberry (*Vaccinium corymbosum*) fruit. Postharvest Biol Technol. 2016 Jun 1;116:88–97. doi:10.1016/J.POSTHARVBIO.2016.01.011
7. Roveda Hoyos G, Venegas Gómez Julian Felipe, Moreno Fonseca Liz Patricia. Efecto de la inoculación con Acaulospora y Glomus en el crecimiento y nutrición de arándanos (*Vaccinium corymbosum*) con diferentes niveles de fertilización | Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas [Internet]. 2022 [cited 2025 Feb 12]. Available from: https://revistas.uptc.edu.co/index.php/ciencias_hortícolas/article/view/13561/11675
8. Sanhueza T, Herrera H, Arriagada C. Contribution of Leaf-Associated Microorganisms from Native Andean Ericaceae against Botrytis cinerea in Vaccinium corymbosum Cultivars. J Soil Sci Plant Nutr. 2023;23(2). doi:10.1007/s42729-023-01220-8
9. Li J, Yang T, Yuan F, Lv X, Zhou Y. Inhibitory Effect and Potential Antagonistic Mechanism of Isolated Epiphytic Yeasts against Botrytis cinerea and Alternaria alternata in Postharvest Blueberry Fruits. Foods. 2024 May 1;13(9). doi:10.3390/FOODS13091334/S1
10. Alejandra Acero Montoya. Revisión sistemática de actividad antagonista y posible control biológico con levaduras sobre Botrytis cinerea, hongo que afecta los cultivos de Cannabis sativa L. 2022 Sep.
11. Raspor P, Mikli M, Milek D, Avbelj M, ^adè NA. Biocontrol of Grey Mould Disease on Grape Caused by Botrytis cinerea with Autochthonous Wine Yeasts.
12. Gomomo Z, Fanadzo M, Mewa-Ngongang M, Hoff J, van der Rijst M, Mokwena L, et al. Biocontrol Potential of Non-Saccharomyces Yeasts Against Post-Harvest Penicillium Species in Apples and Oranges. Agricultural Research. 2025. doi:10.1007/S40003-025-00890-3
13. Baral D, Saha J, Thapa S, Koshariya AK, Ali S. Meyerozyma caribbica YDP-27: Biocontrol Agent Tolerance to Oxidative, Osmotic and Temperature Stress for Postharvest Applications. Plant Pathol. 2025 Jun 1;74(5):1376–88. doi:10.1111/ppa.14100

14. Li B, Peng H, Tian S. Attachment capability of antagonistic yeast *Rhodotorula glutinis* to *Botrytis cinerea* contributes to biocontrol efficacy. *Front Microbiol.* 2016 May 3;7(MAY):187725. doi:10.3389/fmicb.2016.00601
15. Prada-Muñoz J, Coy-Barrera E. Targeted Anthocyanin Profiling of Fruits from Three Southern Highbush Blueberry Cultivars Propagated in Colombia. *Molecules* 2024, Vol 29, Page 691. 2024 Feb 2;29(3):691. doi:10.3390/MOLECULES29030691 PubMed PMID: 38338435.
16. Rashidinejad A. Blueberries. Nutritional Composition and Antioxidant Properties of Fruits and Vegetables. 2020 Jan 1;467–82. doi:10.1016/B978-0-12-812780-3.00029-5
17. Fischer G, Parra-Coronado A, Balaguera-López HE. Altitude as a determinant of fruit quality with emphasis on the Andean tropics of Colombia. A review. *Agron Colomb.* 2022 Aug 30;40(2):212–27. doi:10.15446/agron.colomb.v40n2.101854
18. Zydlik Z, Cieśliński S, Mai VC, Kafkas NE, Morkunas I, Zydlik Z, et al. Soil Preparation, Running Highbush Blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) Plantation and Biological Properties of Fruits. *Modern Fruit Industry.* 2019 Sep 18. doi:10.5772/INTECHOPEN.89071
19. Cleves Leguizamo JA. Fundamentos técnicos del cultivo del arándano (*Vaccinium corymbosum* L.) en la región central de Colombia. Fundamentos técnicos del cultivo del arándano (*Vaccinium corymbosum* L) en la región central de Colombia. 2021. doi:10.19053/9789586604895.9789586604901
20. Ribeiro P, Barbosa MI, Sousa C, Rodrigues PM. Near-Infrared Spectroscopy Machine-Learning Spectral Analysis Tool for Blueberries (*Vaccinium corymbosum*) Cultivar Discrimination. *Foods* 2025, Vol 14, Page 1428. 2025 Apr 21;14(8):1428. doi:10.3390/FOODS14081428
21. Ochmian I, Błaszak M, Lachowicz S, Piwowarczyk R. The impact of cultivation systems on the nutritional and phytochemical content, and microbiological contamination of highbush blueberry. *Scientific Reports* 2020 10:1. 2020 Oct 7;10(1):1–14. doi:10.1038/s41598-020-73947-8 PubMed PMID: 33028946.
22. France A, Ortiz M. Radiografía de las enfermedades del arándano en América - Redagícola [Internet]. 2020 [cited 2025 Feb 12]. Available from: <https://redagricola.com/radiografia-de-las-enfermedades-del-arandano-en-america/>
23. Zhang X, Li B, Zhang Z, Chen Y, Tian S. Antagonistic yeasts: A promising alternative to chemical fungicides for controlling postharvest decay of fruit. *Journal of Fungi.* 2020 Sep 1;6(3):1–15. doi:10.3390/JOF6030158
24. Pretscher J, Fischkal T, Branscheidt S, Jäger L, Kahl S, Schlander M, et al. Yeasts from different habitats and their potential as biocontrol agents. *Fermentation.* 2018 Apr 24;4(2). doi:10.3390/FERMENTATION4020031
25. Wang Y, Bao Y, Shen D, Feng W, Yu T, Zhang J, et al. Biocontrol of *Alternaria alternata* on cherry tomato fruit by use of marine yeast *Rhodospiridium paludigenum* Fell & Tallman. *Int J Food Microbiol.* 2008 Apr 30;123(3):234–9. doi:10.1016/J.IJFOODMICRO.2008.02.002 PubMed PMID: 18378348.
26. Di Canito A, Mateo-vargas MA, Mazziere M, Cantoral J, Foschino R, Cordero-Bueso G, et al. The Role of Yeasts as Biocontrol Agents for Pathogenic Fungi on Postharvest Grapes: A Review. *Foods.* 2021 Jul 1;10(7). doi:10.3390/FOODS10071650

27. Szymanski SL, Miles TD. Temporal dynamics and tissue-specific variations of the blueberry phyllosphere mycobiome. *Hortic Res.* 2025 Apr 3;12(5). doi:10.1093/HR/UHAF042
28. Gabrielly A, Lima R, De Figueiredo A, Mesquita N, Lima Bandeira2 L, Cavalcante2 FG, et al. IN VITRO ANTAGONISM OF ACTINOBACTERIA AGAINST RHIZOBIA FROM THE SOIL. doi:10.18677/EnciBio_2022C15
29. Díaz MA, Pereyra MM, Picón-Montenegro E, Meinhardt F, Dib JR. microorganisms Killer Yeasts for the Biological Control of Postharvest Fungal Crop Diseases [Internet]. doi:10.3390/microorganisms8111680
30. Artati D, Oman M, Sukarta D, Robisalmi A. Validation of Analytical Method for *Aeromonas hydrophila* Identification using Analytical Profile Index (API) 20E KIT Method. *Jurnal Medik Veteriner.* 2024 Apr 1;7(1):88–104. doi:10.20473/JMV.VOL7.ISS1.2024.88-104
31. API® | Pioneering Diagnostics [Internet]. [cited 2025 Oct 30]. Available from: <https://www.biomerieux.com/es/es/our-offer/productos-industria/api-identificacion-microbiana-manual.html>
32. Gupta N. DNA extraction and polymerase chain reaction. *J Cytol.* 2019 Apr 1;36(2):116–7. doi:10.4103/JOC.JOC_110_18 PubMed PMID: 30992648.
33. Bellemain E, Carlsen T, Brochmann C, Coissac E, Taberlet P, Kauserud H. ITS as an environmental DNA barcode for fungi: an in silico approach reveals potential PCR biases. *BMC Microbiology* 2010 10:1. 2010 Jul 9;10(1):1–9. doi:10.1186/1471-2180-10-189 PubMed PMID: 20618939.
34. Araújo LW, Attili De Angellis D, Azevedo JL. Direct RAPD Evaluation of Bacteria without Conventional DNA Extraction. *Brazilian Archives of Biology and Technology.* 2004;47:375–80.
35. da Silva GA, Bernardi TL, Schaker PDC, Menegotto M, Valente P. Rapid yeast DNA extraction by boiling and freeze-thawing without using chemical reagents and DNA purification. *Brazilian Archives of Biology and Technology.* 2012;55(2):319–27. doi:10.1590/S1516-89132012000200020
36. Index Fungorum - Search names [Internet]. [cited 2026 May 7]. Available from: <https://www.indexfungorum.org/names/names.asp>
37. Sperandio EM, Reis JBA dos, Coelho LGF, Vale HMM do. Occurrence and Diversity of Yeast Associated with Fruits and Leaves of Two Native Plants from Brazilian Neotropical Savanna. *Diversity* 2023, Vol 15, Page 1010. 2023 Sep 12;15(9):1010. doi:10.3390/D15091010
38. Jones R, Fountain MT, Andreani NA, Günther CS, Goddard MR. The relative abundances of yeasts attractive to *Drosophila suzukii* differ between fruit types and are greatest on raspberries. *Scientific Reports* 2022 12:1. 2022 Jun 20;12(1):10382-. doi:10.1038/s41598-022-14275-x PubMed PMID: 35725889.
39. Chacón FI, Sineli PE, Guiñazú SB, Alvarez FM, Poehlein A, Daniel R, et al. Unveiling the potential of native Blueberry-derived yeasts as biocontrol agents against *Botrytis cinerea* and *Alternaria alternata*. *Biological Control.* 2025 Oct 1;209:105870. doi:10.1016/J.BIOCONTROL.2025.105870
40. Vadkertiová R, Molnárová J, Vránová D, Sláviková E. Yeasts and yeast-like organisms associated with fruits and blossoms of different fruit trees. *Can J Microbiol.* 2012;58(12):1344–52. doi:10.1139/CJM-2012-0468 PubMed PMID: 23210991.
41. Sánchez AM, Oliva J, Solsona C, Abdelfattah A, Teixidó N. Culturomics Reveals Microbial Dynamics in the Apple Carposphere Across Developmental Stages, Altitude and Tissue Types. *Journal of Sustainable Agriculture and Environment.* 2025 Jun 1;4(2):e70074.

doi:10.1002/SAE2.70074;REQUESTEDJOURNAL:JOURNAL:2767035X;WGROU:STRING:PUBLICATION

42. Bolivar-Anillo HJ, González-Rodríguez VE, Cantoral JM, García-Sánchez D, Collado IG, Garrido C. Endophytic bacteria *Bacillus subtilis*, isolated from maize, as potential biocontrol agent against *Botrytis cinerea*. *Biology (Basel)*. 2021 Jun 1;10(6):492. doi:10.3390/BIOLOGY10060492/S1
43. Méndez Díaz RC, MEDR890603HMNNZB06. Caracterización de *Fusarium* spp., fitopatógeno de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.) [Internet]. 2019 [cited 2026 Apr 19]. Available from: http://bibliotecavirtual.dgb.umich.mx:8083/xmlui/handle/DGB_UMICH/2080
44. Quiroz Ojeda CM, Betancourth García CA, Salazar González CE. Revisión del estado actual de las investigaciones sobre *Rhizoctonia solani* Kühn [Internet]. 2022 [cited 2026 Apr 19]. Available from: <https://revistas.umng.edu.co/index.php/rfcb/article/view/6523/5749>
45. Zakaria L. Fungal and Oomycete Diseases of Minor Tropical Fruit Crops. *Horticulturae* 2022, Vol 8, Page 323. 2022 Apr 11;8(4):323. doi:10.3390/HORTICULTURAE8040323
46. Zhou Y, Wu L, Ren K, Wang M, Wang N, Tangtrakulwanich K, et al. Three New Records of Pathogens Causing Stem Blight on *Vaccinium corymbosum* in China. *Plants*. 2025 Mar 1;14(5):647. doi:10.3390/PLANTS14050647/S1
47. Guzmán-Guzmán P, Kumar A, de los Santos-Villalobos S, Parra-Cota FI, Orozco-Mosqueda M del C, Fadji AE, et al. *Trichoderma* Species: Our Best Fungal Allies in the Biocontrol of Plant Diseases—A Review. *Plants* 2023, Vol 12, Page 432. 2023 Jan 17;12(3):432. doi:10.3390/PLANTS12030432
48. Mahajan G, Sharma N, Kaur M, Gupta R. Chitinases: Key players in plant defense mechanisms against fungal pathogens. *Physiol Mol Plant Pathol*. 2025 Jul 1;138:102664. doi:10.1016/J.PMPP.2025.102664
49. Dikmetas DN, Özer H, Karbancioglu-Guler F. Biocontrol Potential of Antagonistic Yeasts on In Vitro and In Vivo *Aspergillus* Growth and Its AFB1 Production. *Toxins (Basel)*. 2023 Jun 1;15(6):402. doi:10.3390/TOXINS15060402/S1 PubMed PMID: 37368702.
50. Zou X, Wei Y, Zhu J, Sun J, Shao X. Volatile Organic Compounds of *Scheffersomyces spartinae* W9 Have Antifungal Effect against *Botrytis cinerea* on Strawberry Fruit. *Foods* 2023, Vol 12, Page 3619. 2023 Sep 28;12(19):3619. doi:10.3390/FOODS12193619
51. Badmos A, Emmanuel P, Adeleye T. Antifungal and biocontrol potential of *Rhodotorula* carotenoid pigments against mycotoxigenic *Aspergillus* species in cereal-based infant foods. *Sustainable Microbiology*. 2025 Oct 7;2(4):28. doi:10.1093/SUMBIO/QVAF028
52. Abbey JA, Alzohairy SA, Neugebauer KA, Hatlen RJ, Miles TD. Fungicide resistance in *Botrytis cinerea* and identification of *Botrytis* species associated with blueberry in Michigan. *Front Microbiol*. 2024 Jul 22;15:1425392. doi:10.3389/FMICB.2024.1425392/TEXT
53. Zapata-Narváez YA, Díaz-García A, Beltrán-Acosta CR. Alternativas para el control del moho gris (*Botrytis cinerea*) en el cultivo de uchuva (*Physalis peruviana*). *Revista mexicana de fitopatología*. 2023 Jul 31;41(3):372–90. doi:10.18781/R.MEX.FIT.2302-5
54. González-Esparza A, Gentina JC, Ah-Hen KS, Alvarado R, Stevenson J, Briceño E, et al. Survival of spray-dried *Rhodotorula mucilaginosa* isolated from natural microbiota of murta berries and antagonistic effect on *Botrytis cinerea*. *Food Technol Biotechnol*. 2019 Apr 1;57(2):222–9. doi:10.17113/FTB.57.02.19.6139

55. Ding G, Zhou F, Mu P, Zhang L, Zhang Y, Zheng Y, et al. Volatile organic compounds from *Meyerozyma guilliermondii* JY19 trigger apoptosis-like cell death in *Botrytis cinerea* and control postharvest gray mold of ginseng berries. *Postharvest Biol Technol*. 2026 May 1;235:114176. doi:10.1016/J.POSTHARVBIO.2026.114176
56. Abd El-Wahed MH, Almasoudi NM, Abo-Elyousr KAM, Bagy HMMK. The mitigating effect of *Rhodotorula mucilaginosa* on *Fusarium* wilt-induced stress in tomato plants under different irrigation levels. *Journal of Plant Pathology*. 2024 Feb 1;106(1):139–51. doi:10.1007/S42161-023-01528-5
57. Kthiri Z, Jabeur M Ben, Chairi F, López-Cristoffanini C, López-Carbonell M, Serret MD, et al. Exploring the potential of *Meyerozyma guilliermondii* on physiological performances and defense response against *Fusarium* crown rot on durum wheat. *Pathogens*. 2021 Jan 1;10(1):1–14. doi:10.3390/PATHOGENS10010052
58. Oztekin S, Dikmetas DN, Devecioglu D, Acar EG, Karbancioglu-Guler F. Recent Insights into the Use of Antagonistic Yeasts for Sustainable Biomanagement of Postharvest Pathogenic and Mycotoxigenic Fungi in Fruits with Their Prevention Strategies against Mycotoxins. *J Agric Food Chem*. 2023 Jul 5;71(26):9923–50. doi:10.1021/ACS.JAFC.3C00315 PubMed PMID: 37351616.
59. Cadez N, Raspor P, de Cock AWAM, Boekhout T, Smith MT. Molecular identification and genetic diversity within species of the genera *Hanseniaspora* and *Kloeckera*. *FEMS Yeast Res*. 2002 Jan 1;1(4):279–89. doi:10.1111/J.1567-1364.2002.TB00046.X PubMed PMID: 12702331.

9. ANEXOS

Anexo 1

Tabla de identificación de levaduras de API® 20 C AUX

api® 20 C AUX

07628G - xl - 2007/03

TABLEAU D'IDENTIFICATION / IDENTIFICATION TABLE / PROZENTABELLE /
 TABLA DE IDENTIFICACION / TABELLA DI IDENTIFICAZIONE / QUADRO DE IDENTIFICAÇÃO /
 ΠΙΝΑΚΑΣ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ / IDENTIFIERINGSTABELL / IDENTIFIKATIONSTABEL /
 TABELA IDENTYFIKACJI

% de réactions positives après 48-72 h (± 6 h) à 29°C ± 2°C / % of reactions positive after 48-72 hrs. (± 6 hrs) at 29°C ± 2°C /
 % der positiven Reaktionen nach 48-72 Std. (± 6 Std) bei 29°C ± 2°C / % de las reacciones positivas después de 48-72 H (± 6 H) a 29°C ± 2°C /
 % di reazioni positive dopo 48-72 ore (± 6 ore) a 29°C ± 2°C / % das reacções positivas após 48-72 H (± 6 H) a 29°C ± 2°C /
 % θετικών αντιδράσεων μετά από 48-72 ώρες (± 6 ώρες) στους 29°C ± 2°C / % positiva reaktioner efter 48-72 h. (± 6 h) vid 29°C ± 2°C /
 % af positive reaktioner efter 48-72 timer ved 29°C ± 2°C / % pozytywnych reakcji po 48-72 godzinach (± 6 godzin) w 29°C ± 2°C

API 20 C AUX	V4.0	0	GLU	GLY	2KG	ARA	XYL	ADO	XLT	GAL	INO	SOR	MDG	NAG	CEL	LAC	MAL	SAC	TRE	MLZ	RAF	HYPH
Candida albicans 1	0	100	14	99	2	88	94	90	99	0	94	85	99	0	0	99	97	97	5	0	99	
Candida albicans 2	0	100	1	99	1	90	1	75	99	0	70	1	99	0	0	90	1	5	1	0	99	
Candida boldinii	0	100	55	1	0	89	70	89	25	0	95	1	55	0	0	1	1	1	0	0	100	
Candida colliculosa	0	100	96	100	0	0	0	5	13	0	60	1	0	0	0	3	99	60	0	96	25	
Candida dubliniensis	0	100	96	99	0	1	99	50	100	1	99	0	40	0	0	100	60	1	0	0	99	
Candida famata	0	100	96	98	60	60	98	75	99	0	100	99	99	89	70	100	100	96	78	75	1	
Candida glabrata	0	100	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	94	0	0	1	
Candida guilliermondii	0	100	99	97	79	85	97	92	99	0	97	88	99	95	0	94	100	99	90	95	46	
Candida kefyr	0	100	27	0	1	18	1	25	100	0	34	0	0	1	95	1	100	1	1	96	75	
Candida krusei/Inconspicua	0	99	73	0	0	0	0	0	6	0	2	0	64	0	0	0	0	0	0	0	79	
Candida lusitanae	0	100	90	95	1	65	95	20	30	0	99	60	95	80	0	100	99	100	99	0	75	
Candida magnoliae	0	100	32	50	0	0	0	0	10	0	60	0	0	0	0	2	97	10	1	75	1	
Candida norvegensis	0	100	85	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	25	0	0	0	0	0	0	93	
Candida parapsilosis	0	100	94	88	89	89	93	3	99	0	99	89	99	0	0	100	100	93	99	1	99	
Candida pelliculosa	0	100	99	0	0	67	1	1	56	0	70	95	1	70	0	97	99	87	96	30	70	
Candida rugosa	0	100	74	0	1	70	1	26	99	0	94	0	59	0	0	0	0	0	0	0	99	
Candida sphaerica 1	0	100	31	2	0	2	0	62	99	0	99	68	0	35	1	95	100	99	29	76	99	
Candida sphaerica 2	0	100	88	1	0	1	0	36	94	0	99	50	0	31	99	80	100	53	80	64	1	
Candida tropicalis	0	100	9	99	1	96	99	12	99	0	99	69	99	17	1	99	73	100	72	5	99	
Candida utilis	0	100	99	0	0	60	0	1	5	0	1	3	0	37	0	98	96	16	72	79	69	
Candida zeylanoides	0	100	100	87	0	0	1	0	1	0	99	0	99	0	0	0	0	74	0	0	75	
Cryptococcus albidus	0	100	0	98	80	81	0	0	6	30	60	65	0	99	10	98	100	82	81	51	1	
Cryptococcus humicola	0	100	82	100	100	100	36	64	100	100	95	100	100	98	100	100	99	99	95	99	99	
Cryptococcus laurentii	0	100	6	92	99	99	69	76	99	84	53	76	92	96	99	92	99	92	96	99	25	
Cryptococcus neoformans	0	100	0	100	14	91	71	1	93	97	100	99	88	10	0	99	99	75	97	88	25	
Cryptococcus terreus	0	100	0	100	87	100	0	0	45	50	99	0	96	96	36	0	0	54	0	0	1	
Cryptococcus uniguttulatus	0	100	3	99	99	99	3	0	1	99	50	99	100	0	0	100	100	75	100	7	25	
Geotrichum capitatum	0	95	92	0	0	0	0	0	25	0	10	0	2	0	0	0	0	0	0	0	95	
Geotrichum klebahnii	0	100	100	0	0	92	0	0	75	0	88	0	0	0	0	0	0	0	0	0	92	
Kloeckera spp	0	100	0	50	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	96	0	0	0	0	0	1	
Kodamaea ohmeri	0	100	99	96	0	0	66	0	84	0	93	98	99	56	0	99	99	93	0	80	84	
Pichia angusta	0	100	84	0	1	1	66	36	0	0	90	1	1	20	0	94	90	46	97	0	2	
Prototheca wickerhamii	0	100	100	0	0	0	0	0	55	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	1	
Rhodotorula glutinis	0	100	15	91	0	0	8	0	50	0	84	3	0	1	0	91	100	59	84	96	1	
Rhodotorula minuta	0	100	100	100	98	95	3	0	0	0	5	0	85	60	1	0	95	95	95	0	1	
Rhodotorula mucilaginosa 1	0	100	5	4	15	33	92	61	10	0	5	0	0	0	0	33	100	5	1	87	25	
Rhodotorula mucilaginosa 2	0	100	60	1	80	80	64	52	80	0	60	1	0	1	0	98	100	95	86	98	25	
Saccharomyces cerevisiae 1	0	100	8	0	0	0	0	0	78	0	1	13	0	0	0	75	90	2	1	62	30	
Saccharomyces cerevisiae 2	0	100	1	0	0	0	0	0	99	0	1	29	0	0	0	99	99	99	85	81	25	
Sporobolomyces salmonicolor	0	100	1	0	0	0	0	0	5	0	80	0	0	0	0	0	100	85	0	70	90	
Stephanosporum ciferrii	0	100	80	80	100	100	71	60	100	100	43	0	99	60	0	99	100	99	0	99	100	
Trichosporon asahii	0	100	20	100	100	100	0	5	100	0	1	94	100	100	100	98	66	20	0	95	95	
Trichosporon inkin	0	100	4	100	0	98	0	0	95	98	0	100	57	100	95	100	100	95	89	0	95	
Trichosporon mucoides	0	100	40	99	74	100	53	65	100	92	78	100	94	100	100	100	100	78	82	99	95	

Anexo 2

Resultado de las galerías de API® 20 C AUX

API® 20 C AUX	REF.: Lev. 01	BIOMÉRIEUX
Origine / Source / Herkunft / Origin / Origen / Provenienza / Ursprung / Ursprungs / Provenienza Autres tests / Other tests / Andere Tests / Other practices / Other tests / Autres tests / Autres pratiques / Autres tests / Autres tests / Other tests Mark / Taux de réussite <i>Kleiner 1</i>		
API® 20 C AUX REF.: Lev. 02 BIOMÉRIEUX Origine / Source / Herkunft / Origin / Origen / Provenienza / Ursprung / Ursprungs / Provenienza Autres tests / Other tests / Andere Tests / Other practices / Other tests / Autres tests / Autres pratiques / Autres tests / Autres tests / Other tests Mark / Taux de réussite <i>Kleiner 2</i>		
API® 20 C AUX REF.: Lev. 03 BIOMÉRIEUX Origine / Source / Herkunft / Origin / Origen / Provenienza / Ursprung / Ursprungs / Provenienza Autres tests / Other tests / Andere Tests / Other practices / Other tests / Autres tests / Autres pratiques / Autres tests / Autres tests / Other tests Mark / Taux de réussite <i>Kleiner 3</i>		
API® 20 C AUX REF.: Lev. 04 BIOMÉRIEUX Origine / Source / Herkunft / Origin / Origen / Provenienza / Ursprung / Ursprungs / Provenienza Autres tests / Other tests / Andere Tests / Other practices / Other tests / Autres tests / Autres pratiques / Autres tests / Autres tests / Other tests Mark / Taux de réussite <i>Kleiner 4</i>		
API® 20 C AUX REF.: Lev. 05 BIOMÉRIEUX Origine / Source / Herkunft / Origin / Origen / Provenienza / Ursprung / Ursprungs / Provenienza Autres tests / Other tests / Andere Tests / Other practices / Other tests / Autres tests / Autres pratiques / Autres tests / Autres tests / Other tests Mark / Taux de réussite <i>Kleiner 5</i>		
API® 20 C AUX REF.: Lev. 06 BIOMÉRIEUX Origine / Source / Herkunft / Origin / Origen / Provenienza / Ursprung / Ursprungs / Provenienza Autres tests / Other tests / Andere Tests / Other practices / Other tests / Autres tests / Autres pratiques / Autres tests / Autres tests / Other tests Mark / Taux de réussite <i>Kleiner 6</i>		
API® 20 C AUX REF.: Lev. 07 BIOMÉRIEUX Origine / Source / Herkunft / Origin / Origen / Provenienza / Ursprung / Ursprungs / Provenienza Autres tests / Other tests / Andere Tests / Other practices / Other tests / Autres tests / Autres pratiques / Autres tests / Autres tests / Other tests Mark / Taux de réussite <i>Kleiner 7</i>		
API® 20 C AUX REF.: Lev. 08 BIOMÉRIEUX Origine / Source / Herkunft / Origin / Origen / Provenienza / Ursprung / Ursprungs / Provenienza Autres tests / Other tests / Andere Tests / Other practices / Other tests / Autres tests / Autres pratiques / Autres tests / Autres tests / Other tests Mark / Taux de réussite <i>Kleiner 8</i>		

Anexo 3

Protocolo de extracción de ADN “Boiling lysis” (34)

1. Las muestras deben estar previamente aisladas en un medio fresco. Las levaduras se mantienen en tubos eppendorf con 500 μ L de caldo LB (seguir paso 2), mientras que los hongos filamentosos pueden conservarse en medio sólido (seguir paso 3).
2. Centrifugar a 10000 rpm por 5 minutos las muestras provenientes de medios de cultivo líquido y descartar sobrenadante (seguir paso 4).
3. Recolectar el micelio del cultivo mediante raspado y transferirlo a un tubo eppendorf.
4. Agregar a las muestras 500 μ L de Tris-Etanol (TE).
5. Colocar a 90°C por 30 minutos y mezclar muestra con vórtex.
6. Centrifugar a 10000 rpm por 5 minutos.
7. Recolectar sobrenadante a un tubo eppendorf nuevo.

Anexo 4

Resultados de cuantificación de ADN en Nanodrop de hongos y levaduras

	Muestra	[] ng/ μ L	260/280	260/230	HF	Lev.
1	01-1	29,12	1,81	0,74		x
2	01-2	34,4	1,82	0,72		x
3	02-1	138,5	1,45	0,55		x
4	02-2	49,4	1,76	0,61		x
5	03-1	35,3	1,78	1,45		x
6	03-2	81,2	2,02	1,39		x
7	04-1	6,5	1,68	0,44		x
8	04-2	7,8	1,37	0,32		x

9	05-1	9,7	1,76	0,36		x
10	05-2	12,7	1,84	0,58		x
11	06-1	13,8	1,56	0,15		x
12	06-2	6,3	1,52	0,21		x
13	07-1	23,5	1,95	0,68		x
14	07-2	30,1	1,75	0,62		x
15	04-3	11,2	1,79	0,35		x
16	04-4	9,2	1,59	31,75		x
17	06-3	13,2	1,80	0,43		x
18	06-4	13,4	1,82	0,42		x
19	<i>Botrytis</i> Nativo- a	10,3	2,05	5,9	x	
20	<i>Botrytis</i> Nativo - b	17,9	1,84	1,12	x	
21	<i>Botrytis</i> ATCC - a	1,2	-165,7	-0,9	x	
22	<i>Botrytis</i> ATCC- b	19,9	2,04	1,42	x	
23	08-1	27,1	1,63	0,38		x
24	08-2	10,6	1,64	0,5		x

Anexo 5.

Mezcla para PCR de punto final empleando Accustart II de Quanta Bio

Elemento	1mx VT 50µL
AccuStart II 2X	25,0 µL
ITS 1	1 µL
ITS4	1 µL
DNA	(4,0 µL)

H ₂ O mili Qest	19 µL
TOTAL	50,0 µL

Anexo 6.

Programa de termociclador

Desnaturalización inicial	Desnaturalización	Anillamiento	Extensión	Extensión final
94°C/3min	94°C/30seg	55°C/30seg	72°C/50seg	72°C/10min
30 ciclos				

Anexo 7.

Resultados Enfrentamientos

Hongo filamentoso	Enfrentamiento	Repetición	Medida 1	Medida 2	Medida 3	Promedio	Media general	Desviación estándar	PIC R (%)
<i>Botrytis</i> ATCC	Control	Placa 1	9,0	9,0	9,0	9,00	9,00	0,00	N/A
		Placa 2	9,0	9,0	9,0	9,00			
		Placa 3	9,0	9,0	9,0	9,00			
	<i>Kloeckera</i> spp. 1	Placa 1	0,0	0,0	0,0	0,00	3,27	3,52	63,70
		Placa 2	5,7	8,0	7,3	7,00			
		Placa 3	3,6	1,6	3,2	2,80			
	<i>Kloeckera</i> spp. 2	Placa 1	0,0	0,0	0,0	0,00	3,27	3,52	63,70
		Placa 2	5,7	8,0	7,3	7,00			
		Placa 3	3,6	1,6	3,2	2,80			
	<i>Kloeckera</i> spp. 3	Placa 1	0,0	0,0	0,0	0,00	3,27	3,52	63,70
		Placa 2	5,7	8,0	7,3	7,00			
		Placa 3	3,6	1,6	3,2	2,80			
	<i>Meyerozyma</i> spp.	Placa 1	0,9	0,9	0,6	0,80	4,19	3,01	53,46
		Placa 2	4,3	5,6	5,7	5,20			
		Placa 3	5,2	8,0	6,5	6,57			
	<i>Rhodotorula</i> spp. 1	Placa 1	4,5	7,3	8,7	6,83	5,37	2,72	40,37
		Placa 2	4,6	8,2	8,3	7,03			
		Placa 3	2,1	2,3	2,3	2,23			
	<i>Rhodotorula</i> spp. 2	Placa 1	1,0	1,0	0,9	0,97	2,83	3,23	68,52
		Placa 2	1,0	1,0	0,9	0,97			

	<i>Rhodotorula</i> spp. 3	Placa 3	3,6	8,3	7,8	6,57	0,76	0,46	91,6 0
		Placa 1	0,0	0,7	0,0	0,23			
		Placa 2	1,3	0,8	1,2	1,10			
		Placa 3	1,2	0,6	1,0	0,93			
	<i>Rhodotorula</i> spp. 4	Placa 1	1,0	0,5	0,8	0,77	4,63	3,36	48,5 2
		Placa 2	4,3	8,3	7,8	6,80			
		Placa 3	4,5	7,8	6,7	6,33			
<i>Botrytis</i> spp. nativo	Control	Placa 1	9,0	9,0	9,0	9,00	9,00	0,00	N/A
		Placa 2	9,0	9,0	9,0	9,00			
		Placa 3	9,0	9,0	9,0	9,00			
	<i>Kloeckera</i> spp. 1	Placa 1	4,4	6,6	5,1	5,37	5,60	0,25	37,7 8
		Placa 2	4,2	5,7	6,8	5,57			
		Placa 3	4,5	6,6	6,5	5,87			
	<i>Kloeckera</i> spp. 2	Placa 1	4,4	6,6	5,1	5,37	5,60	0,25	37,7 8
		Placa 2	4,2	5,7	6,8	5,57			
		Placa 3	4,5	6,6	6,5	5,87			
	<i>Kloeckera</i> spp. 3	Placa 1	4,4	6,6	5,1	5,37	5,60	0,25	37,7 8
		Placa 2	4,2	5,7	6,8	5,57			
		Placa 3	4,5	6,6	6,5	5,87			
	<i>Meyerozyma</i> spp.	Placa 1	4,5	4,3	4,2	4,33	5,07	0,66	43,7 0
		Placa 2	4,3	7,1	5,4	5,60			
		Placa 3	4,4	5,8	5,6	5,27			
	<i>Rhodotorula</i> spp. 1	Placa 1	4,5	7,9	6,7	6,37	6,39	0,02	29,0 1
		Placa 2	5,2	7,6	6,4	6,40			
		Placa 3	4,5	7,5	7,2	6,40			
	<i>Rhodotorula</i> spp. 2	Placa 1	4,5	6,4	6,0	5,63	5,86	0,20	34,9 4
		Placa 2	5,2	6,6	6,0	5,93			
		Placa 3	4,5	7,8	5,7	6,00			
	<i>Rhodotorula</i> spp. 3	Placa 1	4,5	7,0	6,9	6,13	5,38	1,58	40,2 5
		Placa 2	4,5	7,4	7,4	6,43			
		Placa 3	3,7	3,4	3,6	3,57			
	<i>Rhodotorula</i> spp. 4	Placa 1	4,5	4,3	4,3	4,37	4,24	0,16	52,8 4
		Placa 2	4,0	4,0	4,2	4,07			
		Placa 3	4,5	4,2	4,2	4,30			
<i>Curvularia</i> spp.	Control	Placa 1	7,5	7,5	7,5	7,50	7,50	0,00	N/A
		Placa 2	7,5	7,5	7,5	7,50			
		Placa 3	7,5	7,5	7,5	7,50			
	<i>Kloeckera</i> spp. 1	Placa 1	3,7	4,0	4,0	3,90	4,22	0,28	43,7 0
		Placa 2	4,9	3,9	4,5	4,43			
		Placa 3	4,8	4,0	4,2	4,33			
	<i>Kloeckera</i> spp. 2	Placa 1	3,7	4,0	4,0	3,90	4,22	0,28	43,7 0
		Placa 2	4,9	3,9	4,5	4,43			

		Placa 3	4,8	4,0	4,2	4,33			
	<i>Kloeckera</i> spp. 3	Placa 1	3,7	4,0	4,0	3,90	4,22	0,28	43,7 0
		Placa 2	4,9	3,9	4,5	4,43			
		Placa 3	4,8	4,0	4,2	4,33			
	<i>Meyerozyma</i> spp.	Placa 1	5,3	4,1	5,0	4,80	4,70	0,17	37,3 3
		Placa 2	5,0	3,7	4,8	4,50			
		Placa 3	5,3	3,9	5,2	4,80			
	<i>Rhodotorula</i> spp. 1	Placa 1	5,2	4,5	4,5	4,73	4,90	0,35	34,6 7
		Placa 2	4,4	6,0	5,5	5,30			
		Placa 3	5,3	3,7	5,0	4,67			
	<i>Rhodotorula</i> spp. 2	Placa 1	6,0	4,2	5,4	5,20	4,98	0,20	33,6 3
		Placa 2	5,4	4,0	5,1	4,83			
		Placa 3	4,2	5,0	5,5	4,90			
	<i>Rhodotorula</i> spp. 3	Placa 1	6,0	4,0	5,5	5,17	4,62	0,49	38,3 7
		Placa 2	5,0	4,0	4,4	4,47			
		Placa 3	4,5	3,9	4,3	4,23			
	<i>Rhodotorula</i> spp. 4	Placa 1	5,5	3,9	5,4	4,93	4,07	1,42	45,7 8
		Placa 2	5,3	4,1	5,1	4,83			
		Placa 3	2,9	1,9	2,5	2,43			
<i>Fusarium</i> spp.	Control	Placa 1	6,0	5,9	5,7	5,87	6,00	0,38	N/A
		Placa 2	6,7	6,6	6,0	6,43			
		Placa 3	5,7	5,7	5,7	5,70			
	<i>Kloeckera</i> spp. 1	Placa 1	4,7	4,6	4,6	4,63	4,66	0,04	22,4 1
		Placa 2	4,7	4,6	4,6	4,63			
		Placa 3	5,0	4,6	4,5	4,70			
	<i>Kloeckera</i> spp. 2	Placa 1	4,7	4,6	4,6	4,63	4,66	0,04	22,4 1
		Placa 2	4,7	4,6	4,6	4,63			
		Placa 3	5,0	4,6	4,5	4,70			
	<i>Kloeckera</i> spp. 3	Placa 1	4,7	4,6	4,6	4,63	4,66	0,04	22,4 1
		Placa 2	4,7	4,6	4,6	4,63			
		Placa 3	5,0	4,6	4,5	4,70			
	<i>Meyerozyma</i> spp.	Placa 1	3,5	4,2	4,2	3,97	4,50	0,46	25,0 0
		Placa 2	4,1	5,3	4,8	4,73			
		Placa 3	5,1	4,2	5,1	4,80			
	<i>Rhodotorula</i> spp. 1	Placa 1	6,0	4,2	5,5	5,23	4,63	0,64	22,7 8
		Placa 2	5,7	4,0	4,4	4,70			
		Placa 3	4,2	3,5	4,2	3,97			
	<i>Rhodotorula</i> spp. 2	Placa 1	3,7	5,3	5,3	4,77	5,20	0,40	13,3 3
		Placa 2	4,9	6,0	5,8	5,57			
		Placa 3	4,1	5,9	5,8	5,27			
	<i>Rhodotorula</i> spp. 3	Placa 1	3,4	4,0	3,5	3,63	4,79	1,24	20,1 9
		Placa 2	4,5	5,2	4,2	4,63			

	<i>Rhodotorula</i> spp. 4	Placa 3	6,7	6,3	5,3	6,10	3,74	1,78	37,5 9
		Placa 1	5,7	4,7	5,5	5,30			
		Placa 2	3,5	5,1	3,8	4,13			
		Placa 3	2,0	1,6	1,8	1,80			
<i>Rhizoctonia</i> spp.	Control	Placa 1	9,0	9,0	9,0	9,00	9,00	0,00	N/A
		Placa 2	9,0	9,0	9,0	9,00			
		Placa 3	9,0	9,0	9,0	9,00			
	<i>Kloeckera</i> spp. 1	Placa 1	9,0	9,0	9,0	9,00	9,00	0,00	0,00
		Placa 2	9,0	9,0	9,0	9,00			
		Placa 3	9,0	9,0	9,0	9,00			
	<i>Kloeckera</i> spp. 2	Placa 1	9,0	9,0	9,0	9,00	9,00	0,00	0,00
		Placa 2	9,0	9,0	9,0	9,00			
		Placa 3	9,0	9,0	9,0	9,00			
	<i>Kloeckera</i> spp. 3	Placa 1	9,0	9,0	9,0	9,00	9,00	0,00	0,00
		Placa 2	9,0	9,0	9,0	9,00			
		Placa 3	9,0	9,0	9,0	9,00			
	<i>Meyerozyma</i> spp.	Placa 1	4,5	8,5	8,5	7,17	7,17	0,00	20,3 7
		Placa 2	4,5	8,5	8,5	7,17			
		Placa 3	4,5	8,5	8,5	7,17			
	<i>Rhodotorula</i> spp. 1	Placa 1	8,0	8,5	8,5	8,33	8,24	0,13	8,40
		Placa 2	7,3	8,5	8,5	8,10			
		Placa 3	7,9	8,5	8,5	8,30			
	<i>Rhodotorula</i> spp. 2	Placa 1	5,5	8,5	8,5	7,50	7,52	0,04	16,4 2
		Placa 2	5,5	8,5	8,5	7,50			
		Placa 3	5,7	8,5	8,5	7,57			
	<i>Rhodotorula</i> spp. 3	Placa 1	4,8	8,5	8,5	7,27	7,22	0,05	19,7 5
		Placa 2	4,7	8,5	8,5	7,23			
		Placa 3	4,5	8,5	8,5	7,17			
	<i>Rhodotorula</i> spp. 4	Placa 1	6,0	8,5	7,6	7,37	7,67	0,44	14,8 1
		Placa 2	5,4	8,5	8,5	7,47			
		Placa 3	7,5	8,5	8,5	8,17			

Anexo 8.

Secuencias de *Botrytis cinerea* y levaduras

>B-c_ATCC (*Botrytis cinerea*)

ACCTGCGGAAGGATCATTACAGAGTTCATGCCCGAAAGGGTAGACCTCCCACCCTTGTGTA
 TTATTACTTTTGTGCTTTGGCGAGCTGCCTTCGGGCCTTGTATGCTCGCCAGAGAATACCA
 AAACCTCTTTTTATTAATGTCGTCTGAGTACTATATAATAGTTAAACCTTCAACAACGGAT
 CTCTTGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGA

ATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTTGGTATTCCGGGGGGCATG
CCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCTTAGCTTGGTATTGAGTCTATGTCAGTAATG
GCAGGC

>B-b_Arándanos (*Botrytis cinerea*)

CTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACAGAGTTCATGCCCCGAAAGGGTAGACCTC
CCACCCTTGTGTATTATTACTTTGTTGCTTTGGCGAGCTGCCTTCGGGCCTTGTATGCTCG
CCAGAGAATACCAAAACTCTTTTTATTAATGTCGTCTGAGTACTATATAATAGTTAAACT
TTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAA
TGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTTGGTAT
TCCGGGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCTTAGCTTGGTATTGAGTC
TATGTCAGTAATGGCAGGC

>Levadura 01 (*Kloeckera* spp. = *Hanseniaspora* spp.)

GATCTTTTACAATAATGTGTATCTTTATTGAAGATGTGCGCTTAATTGCGCTGCTTCTTTA
GAGTGTTCAGTGAAAGTAATCTTGCTTGAATCTCAGTCAACGCTACACACATTGGAGTTT
TTTTACTTTAATAACAATCTTTCTGCTTTGAATCGAAAGGTTCAAGGCAAAAAACAAACAC
AAACAATTTTATTTTATTATAATTTTTTAAACTAAACCAAAATTCCTAACGGAAATTTTAA
AATAATTTAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGA
ATTGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGATACTCGTGAATCATTGAATTTTTGAACGCACATT
GCGCCCTTGAGCATTCTCAGGGGCATGCCTGTTTGAGCGTCATTTCCCTTCTCAAAGATAA
TTTATTATTTTTTGGTTGTGGGCGATACTCAGGGTTAGCTTGAAATTGAAGATTGTTTCAA
TCTTTTTTAATTCAACACTTAGCTTCTTGGAGAC

>Levadura 02 (*Kloeckera* spp. = *Hanseniaspora* spp.)

CGBAAGGATCATTAGATTGAATTATCATTGTTGCTCGAGTTCTTGTTTAGATCTTTTACAA
TAATGTGTATCTTTATTGAAGATGTGCGCTTAATTGCGCTGCTTCTTTAGAGTGTTCAGT
GAAAGTAATCTTGCTTGAATCTCAGTCAACGCTACACACATTGGAGTTTTTTTACTTTAAT
ACAATTCTTTCTGCTTTGAATCGAAAGGTTCAAGGCAAAAAACAAACACAAACAATTTTAT
TTTATTATAATTTTTTAAACTAAACCAAAATTCCTAACGGAAATTTTAAATAATTTAAAA
CTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAATTGCGATAAGT
AATGTGAATTGCAGATACTCGTGAATCATTGAATTTTTGAACGCACATTGCGCCCTTGAGC
ATTCTCAGGGGCATGCCTGTTTGAGCGTCATTTCCCTTCTCAAAGATAATTTATTATTTTT
TGGTTGTGGGCGATACTCAGGGTTAGCTTGAAATTGAAGATTGTTTCAATCTTTTTTAATT
CAACACTTAGCTTC

>Levadura 03 (*Kloeckera* spp. = *Hanseniaspora* spp.)

GATTGAATTATCATTGTTGCTCGAGTTCTTGTTTAGATCTTTTACAATAATGTGTATCTTT
ATTGAAGATGTGCGCTTAATTGCGCTGCTTCTTTAGAGTGTGCGAGTGAAAGTAATCTTGC
TTGAATCTCAGTCAACGCTACACACATTGGAGTTTTTTTACTTTAATAACAATCTTTCTGC
TTTGAATCGAAAGGTTCAAGGCAAAAAACAAACACAAACAATTTTATTTTATTATAATTTT
TTAAACTAAACCAAAATTCCTAACGGAAATTTTAAATAATTTAAACTTTCAACAACGGA
TCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAATTGCGATAAGTAATGTGAATTGCAG

ATACTCGTGAATCATTGAATTTTTGAACGCACATTGCGCCCTTGAGCATTCTCAGGGGCAT
GCCTGTTTGAGCGTCATTTCTTCTCAAAAGATAATTTATTATTTTTTGGTTGTGGGCGAT
ACTCAGGGTTAGCTTGAAATTGAAGATTGTTTCAATCTTTTTTAATTCAACACTTAGCTTC
TTTGGAGACGCTGTTCTCGCTGTGATGTATTTATGGATTTATTCGTTTTACTTTACAAGGG
AAATGGTAACGTACCTTAGGCAAAGGGTTGC

>Levadura 04 - *Rhodotorula* spp.1 (*Rhodotorula* spp.)

ACCTGCGGAAGGATCATTAGTGAACATAGGACGTCCAACCTTAACTTGGAGTCCGAACCTCTC
ACTTTCTAACCCTGTGCACTTGTGGGATAGTAGTCGACCTAGTCGACGAACCTCCTATTC
ACTTATAAACACAAAGTCTATGAATGTATTTAATTTTATAACAAAATAAACTTTCAACAA
CGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATT
GCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCGCTCCATGGTATTCCGTGGA
GCATGCCTGTTTGAGTGTCATGAATACTTCAACCCTCCTCTTTCTTAATGATTGAAGAGGT
GTTTGGATTCTGAGCGCTGCTGGCCTTTATTGGTCTTAGCTCGTTCGTAATGCATTAGCAT
CCGCAATCGAACTTTCCGATTGACTTGGCGTAATAGACTATTCGCTGAGGAATTCTAGTCT
TCGGACTAGAGCCGGGTGGATTAAAGGAAGCTTCTAA

>Levadura 05 - *Rhodotorula* spp.2 (*Rhodotorula* spp.)

GAAGGATCATTAGTGAACATAGGACGTCCAACCTTAACTTGGAGTCCGAACCTCTCACTTTCT
AACCCTGTGCATTTGTTTGGGGTAGTAGCCTTTCGAGGCGAATCCCTATTCATTATAAAC
ACAAAGTCTATGAATGTATTTAATTTTATAACAAAATAAACTTTCAACAACGGATCTCTT
GGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCA
GTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCGCTCCATGGTATTCCGTGGAGCATGCCTGT
TTGAGTGTCATGAATACTTCAACCCTCCTCTTTCTTTATGATCGAAGAGGTGTTTGGATTCT
TGAGCGTTTTTGCTGGCCTCGCGGTTCGAGCTCGCTCGTAATGCATTAGCATCCGCAATCGAA
CTTCGGATTGACTTGGCGTAATAGACTATTCGCTGAGGAATTCTAGTCTTCGGACTAGAGC
CGGGTTGGATTAAAGGAAGC

>Levadura 06 - *Rhodotorula* spp. 3 (*Rhodotorula* spp.)

TGCGGAAGGATCATTAGTGAATCTAGGACGTCCAACCTTAACTTGGAGTCCGAACCTCTCACT
TTCTAACCCTGTGCATCTGTTAATTGGAATAGTAGCTCTTCGGAGTGAACCACCATTCCT
TATAAACACAAAGTCTATGAATGTATACAAATTTATAACAAAACAAAACCTTTCAACAACG
GATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGC
AGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCGCTCCTTGGTATTCCGAGGAGC
ATGCCTGTTTGAGTGTCATGAAATCTTCAACCCACCTCTTTCTTAGTGAATCTGGTGGTGC
TTGGTTTCTGAGCGCTGCTCTGCTTCGGCTTAGCTCGTTCGTAATGCATTAGCATCCGCAA
CCGAACCTTCGGATTGACTTGGCGTAATAGACTATTCGCTGAGGATTCTAGTTTACTAGAGC
CGAGTTGGGTAAAGGAAGC

>Levadura 07 - *Meyerozyma guilliermondii* (*Meyerozyma guilliermondii*)

GAAGGATCATTACAGTATTCTTTTGCCAGCGCTTAACTGCGCGGCGAAAAACCTTACACAC
AGTGTCTTTTTGATACAGAACTCTTGCTTTGGTTTGGCCTAGAGATAGGTTGGGCCAGAGG

TTTAACAAAACACAATTTAATTATTTTTACAGTTAGTCAAATTTTGAATTAATCTTCAAAA
 CTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGT
 AATATGAATTGCAGATTTTCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTCTGGT
 ATTCCAGAGGGCATGCCTGTTTGAGCGTCATTTCTCTCTCAAACCCCCGGGTTTGGTATTG
 AGTGATACTCTTAGTCGGACTAGGCGTTTGCTTGAAAAGTATTGGCATGGGTAGTACTAGA
 TAGTGCTGTCGACCTCTCAATGTATTAGGTTTATCCAACCTCGTTGAATGGTGTGGCGGGAT
 ATTTCTGGTATTGTTGGCCCCGGCCTTACAAC

>Levadura 08 - *Rhodotorula* spp.4 (*Rhodotorula* spp.)

ATGTTCACTAATGATCCTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAGTGAACATAGGAC
 GTCCAACTTAACTTGGAGTCCGAACCTCTCACTTTCTAACCCTGTGCACTTGTTTGGGATAG
 TAGTCGACCTAGTCGACGAACCTCCTATTCACTTATAAACACAAAGTCTATGAATGTATTTA
 ATTTTATAACAAAATAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAAC
 GCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAAC
 GCACCTTGCGCTCCATGGTATTCCGTGGAGCATGCCTGTTTGAGTGTCATGAATACTTCAA
 CCCTCCTCTTTCTTAATGATTGAAGAGGTGTTTGGATTCTGAGCGCTGCTGGCCTTTATTG
 GTCTTAGCTCGTTCGTAATGCATTAGCATCCGCAATCGAACTTTCGGATTGACTTGCGCGTA
 ATAGACTATTCGCTGAGGAATTCTAGTCTTCGGACTAGAGCCGGGTGGATTAAAGGAAGC
 TTCTA

Anexo 9.

Alineaciones de *Hanseniaspora* spp. 1, 2 y 3 en BLAST



