

DIVERSIDAD DE LEVADURAS ASOCIADAS A INFLORESCENCIAS DE MANGO Y FLORES DE “LULO ARBÓREO”

YEAST DIVERSITY ASSOCIATED TO INFLORESCENCES OF MANGO AND FLOWERS OF “LULO ARBOREO”

DIVERSIDADE DE LEVEDURAS ASSOCIADAS A INFLORESCÊNCIAS DE MANGA E FLORES DE “LULO ARBÓREO”

JACKELINE GAVIRIA V.¹, ESTEBAN OSORIO C.²

RESUMEN

*En Colombia, el conocimiento de levaduras ha sido limitado a especies de interés clínico. El micro-hábitat aéreo de las flores, presenta un área de gran interés para el aislamiento de levaduras con importancia en el campo industrial, por su potencial uso como controlador biológico. El objetivo de este trabajo es analizar la diversidad de levaduras asociadas a inflorescencia de Mango (*Mangífera indica*) y flores de Lulo arbóreo (*Solanum wrightii*). Para dicha finalidad se trabajó con 96 aislados, a los cuales se les realizó caracterización fenotípica y posteriores pruebas de MSP-PCR Fingerprinting. Estas pruebas fueron complementadas con amplificación parcial y secuenciación del segmento 26S del ADNr para identificación a nivel de especie. El patrón de diversidad encontrado refleja una dominancia de la especie *Candida leandrae* en flores de lulo arbóreo, también se presentaron especies como *Cryptococcus laurentii*, *Candida parazyama*, *Aeurobasidium pullulans* y *Pseudozyma tsukubaensis*. Las inflorescencias de mango presentaron especies como *Sydowia eucalypti*, *Cryptococcus flavescens*, *C. laurentii*, *C. nemorosus*, *C. heveanensis*, *Pichia kluyveri*, *Pseudozyma tsukubaensis* y *Candida asparagi*. Se logró identificar*

Recibido para evaluación: 12/05/2012. Aprobado para publicación: 22/07/2012

1 Grupo de investigación en biología molecular de microorganismos Universidad del Valle.
2 Profesor titular sección de Genética, Departamento de Biología, Universidad del Valle,

Correspondencia: jackegaviria@gmail.com

hasta el nivel taxonómico de especie el total de los aislados encontrados, además se hallaron especies con potencial uso biotecnológico.

ABSTRACT

*The knowledge of the communities of yeast in Colombia has been limited to species of yeasts from clinical interest. The aereo microhabitat of flowers, has an area of great interest for the isolation of yeasts in industrial importance for potential use as biocontrol agents. The objective of this study was to analyze the diversity of yeasts from the inflorescences of Mango (*Mangifera indica*) and flowers of Lulo 'Arboreo' (*Solanum wrightii*). For this, worked with 96 isolated, to which characterization is realized to them phenotypic and later tests of MSP-PCR Fingerprinting complemented with amplification and sequencing of the partial region for the 26S rDNA species level identification. The pattern of diversity found reflects a predominance of specie *Candida leandrae* in the flowers of lulo "arboreo" also species are as *Cryptococcus laurentii*, *Candida parazyima*, *Aeurobasidium pullulans* and *Pseudozyma tsukubaensis*. The inflorescences of mango presented species as *Sydowia eucalyptus*, *Cryptococcus laurentii*, *C. flavescens*, *C. nemorosus*, *C. heveanensis*, *Pichia kluyveri*, *Pseudozyma tsukubaensis* and *Candida asparagi*. We identified to the taxonomic level of species total isolates found, in addition to finding species with potential biotechnological use.*

RESUMO

*Na Colômbia, o conhecimento das leveduras é limitado a espécies de interesse clínico. O micro-habitat aéreo das flores apresenta um interessante campo para o isolamento de leveduras com importância na indústria pelo seu potencial uso em controle biológico. O objetivo deste trabalho foi analisar a diversidade de leveduras associadas a inflorescências de Manga (*Mangifera indica*) e flores de "lulo" (*Solanum wrightii*). Para isso, foram analisados 96 isolados, que foram caracterizados com testes fenotípicos e MSP-PCR Fingerprinting complementadas com sequenciamento parcial da região 26S do rDNA para identificação no nível de espécie. O padrão de diversidade reflete a dominância da espécie *Candida leandrae* nas flores de "lulo", além disso, foram encontradas espécies como *Cryptococcus laurentii*, *Candida parazyima*, *Aeurobasidium pullulans* e *Pseudozyma tsukubaensis*. As inflorescências de manga apresentaram espécies como *Sydowia eucalypti*, *Cryptococcus flavescens*, *C. laurentii*, *C. nemorosus*, *C. heveanensis*, *Pichia kluyveri*, *Pseudozyma tsukubaensis* e *Candida asparagi*. Foi possível identificar até o nível taxonômico de espécie a totalidade dos isolados, além de encontrar espécies com potencial uso biotecnológico.*

PALABRAS CLAVES:

Leveduras, MSP-PCR Fingerprinting, Secuenciación, Región D1/D2

KEYWORDS:

Yeast, MSP-PCR fingerprinting, Sequencing, Region D1/D2

PALAVRAS-CHAVE:

Leveduras, MSP-PCR Fingerprinting, Sequenciamento, Região D1/D2

INTRODUCCIÓN

Los microorganismos epifitos, como las levaduras encontrados en flores, se desarrollan en un ambiente hostil, con rápidas fluctuaciones físicas y nutricionales, resultado de hábitats dinámicos con variables ambientales cíclicas y no cíclicas [1], ello ocasiona que permanezcan básicamente, a expensas de los pocos nutrientes que exuda la planta. En consecuencia, estas levaduras presentan adaptaciones concretas [2], que les permiten desarrollarse en hábitats donde hay altas concentraciones de azúcares, vivir en simbiosis con insectos (de los cuales dependen para su dispersión); tener temperaturas de crecimiento comprendidas entre 5 y 37°C; desarrollarse según las condiciones de oxígeno del medio en el que se encuentren y soportar amplias variaciones de pH comprendidas entre 2,8 y 8,5 [3].

Dado el importante papel que cumplen las levaduras aéreas en el desarrollo y producción de la misma planta, identificar las poblaciones de microorganismos asociados a ambientes aéreos de una planta particular sería equivalente a describir el nicho específico que estos microorganismos pueden potencialmente ocupar [2]; y comprender con ello la ecología particular del microorganismo; siendo de gran relevancia, especialmente si se pretende que estos puedan ser empleados como agentes de control biológico. Estos ambientes hostiles generan un importante factor de selección al momento de identificar levaduras con alto potencial biotecnológico.

A pesar de que las levaduras presentes en las flores se conocen desde hace aproximadamente un siglo, se han realizado muy pocos estudios referentes a conocer las poblaciones de microorganismos asociados a ellas y la ecología particular de los mismos. La mayoría de investigaciones acerca de comunidades de levaduras presentes en flores se basan en el néctar de la flor y en la interacción levadura-flor-polinizador [4, 5, 7]. En Colombia, los estudios sobre levaduras se centran principalmente en especies de interés clínico.

El estudio de la diversidad de especies en microhábitats aéreos de las flores podría ampliar el conocimiento de estos ambientes, y a largo plazo, brindar posibles avances y descubrimientos en industria y biotecnología. El propósito de esta investigación es evaluar la diversidad de levaduras encontradas en dos tipos

diferentes de flores, asimismo conformar una colección de cepas para del banco de levaduras de la Universidad del Valle. La identificación de dichas levaduras, no se llevó a nivel meramente morfológico, debido a que éste causa a menudo imprecisiones al estar fuertemente influenciado por condiciones del cultivo. Por ello, en el presente estudio la caracterización morfológica se complementa con datos obtenidos por técnicas de biología molecular, tomando como base la reacción en cadena de la polimerasa (PCR *fingerprinting*), la cual permite caracterizar genéticamente cepas de levaduras en forma rápida y económica.

MÉTODO

Sitio y diseño experimental

El experimento se llevó a cabo en las instalaciones del campus principal de la universidad del Valle (sede Meléndez) ubicado en el municipio de Cali, Valle (3°22' N y 76°32' W). El experimento se realizó completamente al azar seleccionando 5 árboles de cada una de las dos especies a estudiar, se trabajó con un total de 15 flores o inflorescencia por especie y un total de 96 cepas obtenidas de las muestras de flores de mango y lulo arbóreo con diluciones seriadas (10^{-1} - 10^{-4}) y una repetición por dilución.

Recolección de materia vegetal

Las muestras fueron tomadas en los meses de Febrero- Marzo (reportado como época de floración tardía para el mango [6]), de cada uno de los 5 árboles seleccionados se tomaron 3 muestras representativas en el estrato bajo (1,20 m) y/o medio (2-3 m) para flores de mango y en el estrato alto para flores de lulo (5 m). Las muestras fueron tomadas con tijeras estériles y guardadas en bolsas estériles para ser trasladadas al laboratorio de Biología Molecular de Microorganismos de la Universidad del Valle, donde fueron procesadas en las 2 a 3 horas siguientes después de ser recolectadas.

Aislamiento de levaduras

Las muestras de flores fueron homogenizadas por maceración, previo lavado con solución de agua destilada e hipoclorito de sodio comercial al 10%, por 10- 15 minutos.

El macerado se realizó en un matraz estéril con 2 ml de agua mili-Q estéril, de la solución madre resultante se tomaron 500 μ l. Se realizó recuentos mediante diluciones seriadas (10^{-1} – 10^{-4}), de cada dilución se tomó 100 μ l para siembra por dispersión en medio de cultivo YPDA (1% extracto de levadura, 2% peptona micológica, 2% de glucosa, 2% agar) suplementado con 25mg/mL de Ampicilina y cloranfenicol. Las cajas Petri se incubaron a 30°C, monitoreando el crecimiento de los cultivos por 72 horas y realizando conteo a simple vista de las colonias conseguidas en placa, de esta manera se aislaron las colonias más representativas por cada muestreo. Las colonias aisladas fueron crio-conservadas a -20 °C en medio YPD-glicerol al 30%.

Caracterización fenotípica

La caracterización macroscópica se lleva a cabo de acuerdo a las descripciones realizadas por Boekhout [7]. Durante los primeros tres días post sembrado se realizó la caracterización morfológica de los aislados, teniendo en cuenta: forma, brillo, tamaño, elevación, bordes, superficie, consistencia y color de cada una de las colonias.

Se determinaron las características microscópicas relacionadas con la forma de las células, presencia de filamentos, germinación y tipo de gemación.

A partir de la caracterización tanto macroscópica como microscópica, se agruparon los aislados para posteriores análisis moleculares.

Extracción de DNA

La extracción del ADN genómico de levaduras se realizó utilizando la metodología descrita por Osorio-Cadavid [8]. La extracción se verificó en geles de agarosa al 1%, usando TAE 1X a 9v/cm durante 1h revelados con Bromuro de Etidio. La cuantificación del ADN se realizó mediante espectrofotometría a 260nm y se determinó la pureza mediante la relación espectrofotométrica A260/A280nm con el uso de NanodropTM 2000c (Termo Scientific) en el laboratorio de Genética Molecular Humana de la Universidad del Valle.

MSP-PCR Fingerprinting

Para el análisis MSP-PCR (Minisatellite-primed) se siguió la metodología propuesta por Silva-Filho en el

2005 [9], usando el primer (GTG)₅. Las reacciones de PCR fueron realizadas en un volumen de reacción de 25 μ l, que contenía 5 μ l (aproximadamente 1ng/ μ L) de ADN genómico total, 10X PCR buffer, 1 mM dNTPs Mix; 3,5mM de cloruro de magnesio; 0,8 mM de iniciador, y 1 U Taq ADN polimerasa (Fermentas).

El ADN fue amplificado en un termociclador (M.J. Research, USA) bajo las siguientes condiciones: paso inicial de desnaturalización de 5 min a 94 °C, 34 ciclos de: 15 s (segundos) a 93 °C, 45 s a 3.55 °C y 90 s a 72 °C, y paso final de extensión de 6 min a 72 °C. Los fragmentos de ADN amplificados fueron separados por electroforesis en geles de agarosa al 1,5% (Gibco-BRL) en 0,5 X TBE buffer (Buffer tris-Borato-EDTA) a 60 V por 4,5 h y revelados en solución de Bromuro de Etidio (2 mg/ml).

En cada gel fue incluido un marcador de peso molecular como referencia (marcador de 250 pb). Todas las reacciones se realizaron mínimo por duplicado, a fin de evaluar la reproducibilidad de los perfiles de bandas obtenidos.

El tamaño de los fragmentos obtenidos en cada una de las reacciones realizadas fueron estimados con el software Total Lab Quant overview[®], posteriormente fueron formados los agrupamientos moleculares con similitudes de 100%.

Secuenciación de la región D1/D2

Se amplificó el dominio D1/D2 de la Subunidad grande del gen ribosomal rDNA 26S. Se analizó una muestra de cada grupo principal conformado. Los primers fueron: NL1 (5´-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3´) y NL4 (5´-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3´).

Las reacciones de amplificación (PCR) fueron realizadas en un termociclador (Multigene- Labnet, USA) bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 94°C por 5 minutos, 30 ciclos de desnaturalización a 94°C por 1 min, apareamiento a 55°C por 30seg, y extensión a 72°C por 1 min, con una extensión final de 10 min a 72°C. Para la amplificación, se tomaron 7 μ l (aproximadamente 1ng/ μ L) de ADN Genómico extraído y se resuspendió en 28 μ L de mezcla de PCR: 0.5 μ M NL1, 0.5 μ M NL4, 10 μ M dNTPs, 1X NH₄⁺, 1.5mM MgCl₂, y 1U de Taq Polimerasa. La calidad de la amplificación fue evaluada en geles de agarosa al 1.5% y visualizadas con Bromuro de Etidio a 240nm.

Los productos de PCR fueron purificados y secuenciados por MACROGEN (USA) bajo condiciones estandarizadas por la misma empresa. Las secuencias fueron ensambladas, editadas mediante el programa Chromas Pro v. 1.42 ® y comparadas con las secuencias reportadas en el GenBank usando el algoritmo "Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)". Posteriormente, se realizaron los árboles filogenéticos correspondientes, empleando el Software MEGA 5.

Análisis estadístico

Con el fin de verificar los grupos moleculares conformados con los pesos de las bandas obtenidas se realizó un análisis Cluster con algoritmo UPGMA y el índice de correlación de PEARSON, usando el Software estadístico PAST versión 2.14 [10].

RESULTADOS

Aislamiento

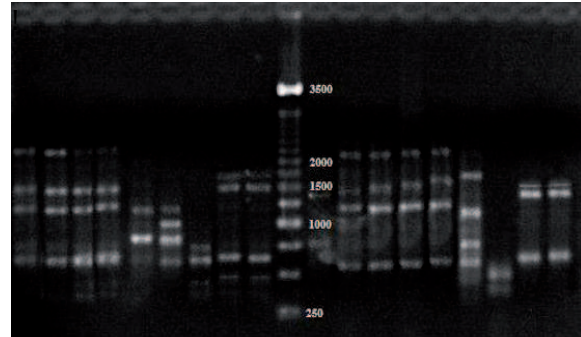
Se obtuvo un total de 96 aislados de levaduras a partir de flores de mango y lulo arbóreo. De estos, el 56 % pertenecen a los aislados obtenidos para mango y el 44 % restante para lulo. El conteo aproximado de unidades formadoras de colonia para las levaduras encontradas fue $7,12 \times 10^2$ UFC/ml.

Del total de levaduras obtenidas se conformaron 10 agrupamientos con características morfológicas similares para flores de lulo arbóreo y 10 para inflorescencias de mango, donde el morfotipo dominante fue la textura mantecillosa, apariencia lisa, color blanco, forma circular, margen entero y elevación convexa, también se encontraron 5 aislados con características morfológicas únicas.

MSP-PCR Fingerprinting

El promedio de concentración obtenido para la extracción de DNA fue $58,87 \pm 5,8$ ng/ μ l y pureza de $1,99 \pm 0,02$. Posterior a la extracción del DNA se realizó la técnica MSP-PCR fingerprinting, los patrones de bandas obtenidos con esta técnica dieron lugar a bandas de pesos comprendidos entre 250 y 2500 pb (Figura 1). Con los datos del peso de las bandas de cada perfil se realizó una matriz de datos binarios basados

Figura 1. Verificación producto de PCR fingerprinting (7 μ l/pozo. En el carril número 6 se evidencia el marcador de peso molecular (250 pb).



en la presencia/ausencia de bandas, sobre la cual se hicieron los análisis de Cluster (UPGMA).

La reproducibilidad de las bandas obtenidas con la técnica MSP-PCR depende de las condiciones utilizadas para su empleo (Concentraciones de DNA exactas y previamente cuantificadas). Las diferencias en intensidades de bandas entre miembros de una misma especie encontradas en esta investigación, pueden ser atribuidas a variaciones entre condiciones de reacción o diferencia en concentración de DNA.

Agrupamientos

Para inflorescencias de mango se obtuvo un total de 9 agrupamientos con patrones similares en un 100% y un total de 4 cepas que no presentan similitud de 100% con ningún agrupamiento como indica la Figura 2.

Para cepas obtenidas de flores de lulo arbóreo se obtuvo un total de siete agrupamientos con patrones similares en un 100%, y un total de cuatro cepas que no presentan similitudes de 100% con ningún agrupamiento. Se registraron relaciones entre algunos grupos mayores al 80%, y relaciones entre grupos de 75 % como muestra la Figura 3.

Secuenciación dominio D1/D2 rDNA 26S

Se secuenció la región del dominio D1/D2 del gen ribosomal 26S para un aislado representativo de cada agrupamiento. Los datos obtenidos para cada una de las secuencias aisladas a partir de inflorescencias de mango y flores de lulo arbóreo se muestran en los cuadros 1 y 2, respectivamente.

Figura 2. Análisis Cluster con algoritmo UPGMA realizado a partir de pesos moleculares obtenidos de cepas de mango (*Mangifera indica*)

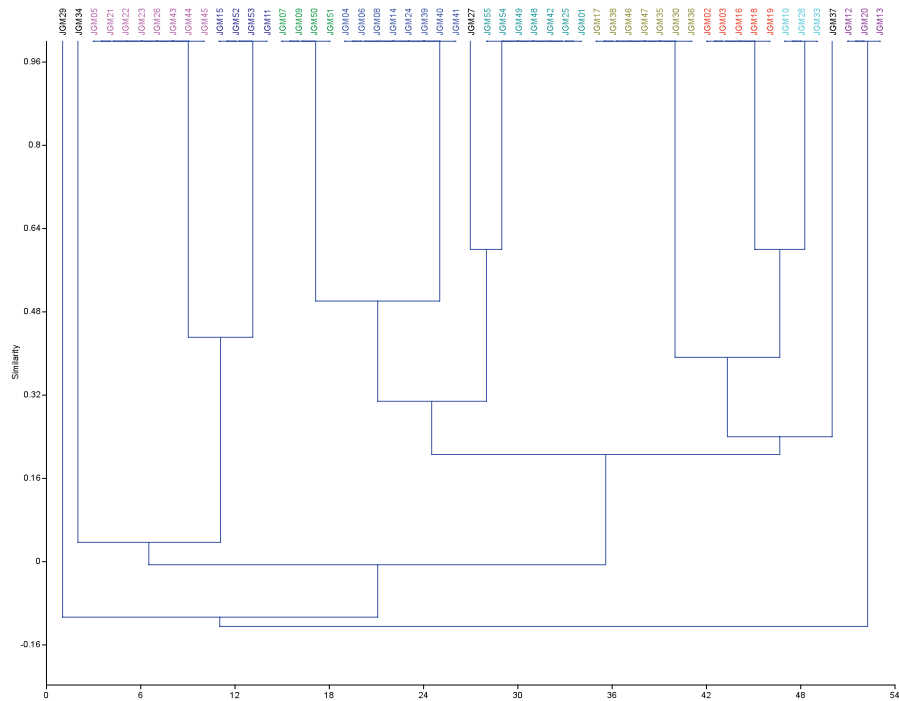
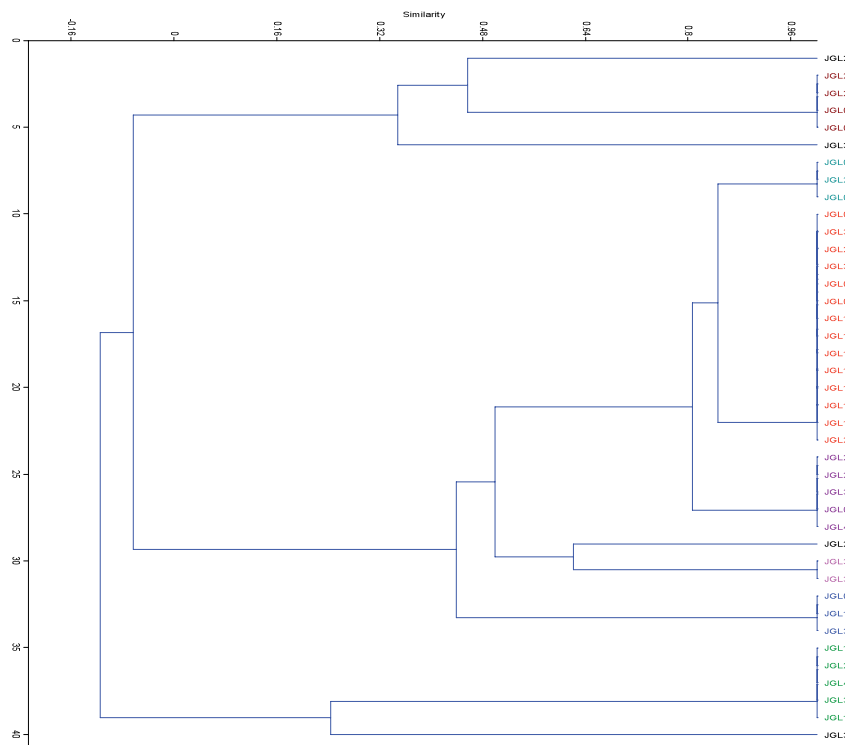


Figura 3. Análisis Cluster con algoritmo UPGMA, realizado a partir de pesos moleculares obtenidos de cepas de lulo arbóreo (*Solanum wrightii*)



Cuadro 1. Alineamiento de secuencias obtenidas con el algoritmo BLAST para aislados obtenidos a partir de inflorescencias de mango (*Mangifera indica*)

Aislado	Max. Identidad	N. Accesoión	Especie
JGM01	99%	GQ303328.1	Sydowiaa eucalypti
JGM02	98%	JN167988	Kodamaea ohmeri
JGM08	100%	EU386718	Cryptococcus laurentii
JGM09	100%	GU646863	Rhodotorula taiwanensis.
JGM10	99%	FN428883	Cryptococcus nemorosus
JGM15	99%	HQ199208	Cryptococcus heveanensis
JGM20	99%	AM397862	<i>Pichia kluyveri</i>
JGM23	99%	GQ303328.1	Sydowia eucalypti
JGM29	99%	AY520407.1	<i>Candida asparagi.</i>
JGM27	99%	GQ303328.1	Sydowia eucalypti
JGM34	99%	FN428902.1	Cryptococcus flavescens
JGM37	100%	AB550288.1	Pseudozyma tsukubaensis
JGM30	99%	FN428902.1	Cryptococcus flavescens

Cuadro 2. Alineamiento de secuencias obtenidas con el algoritmo BLAST para aislados obtenidos a partir de flores de lulo arbóreo (*Solanum wrightii*)

w Aislado	Max. Identidad	N. Accesoión	Especie
JGL01	99%	FJ527048.1	Candida leandreae
JGL22	100%	FJ527048.1	Candida leandreae
JGL23	100%	FJ527048.1	Candida leandreae
JGL26	100%	EU386718.1	Cryptococcus laurentii
JGL29	100%	AB550287.1	Pseudozyma tsukubaensis
JGL31	98%	FJ157914	Kabatiella microsticta
JGL32	98%	GU585248.1	Aureobasidium pullulans
JGL35	100%	FJ527048.1	Candida leandreae
JGL25	99%	EU273475.1	Candida parazyza
JGL27	99%	AY449659.1	Candida leandreae
JGL04	99%	FN665414	Aureobasidium pullulans.

Las especies evaluadas a partir de inflorescencias de mango, muestran valores de 100% de identidad Máxima, para *Cryptococcus laurentii*, *Rhodotorula taiwanensis* y *Pseudozyma tsukubaensis*. Los aislados restantes muestran valores de Max. Identidad iguales a 99%, este valor de acuerdo a Kurtzman y Robnett, [11], es considerado correcto para asignar un aislado hasta el nivel de especie.

Los aislados JGL22, JGL23, JGL26, JGL29 y JGL35, presentaron una similitud del 100% con respecto a las secuencias depositadas en el Genbank, los aislados restantes presentaron identidad del 98-99%. Estos resultados corroboran con el máximo nivel de confianza la asignación del grupo a la especie. Los aislados JGL01, JGL22 y JGL23 pertenecientes a la especie *Candida leandreae*, muestran una similitud del 75% y 80% en análisis Cluster (Figura 3).

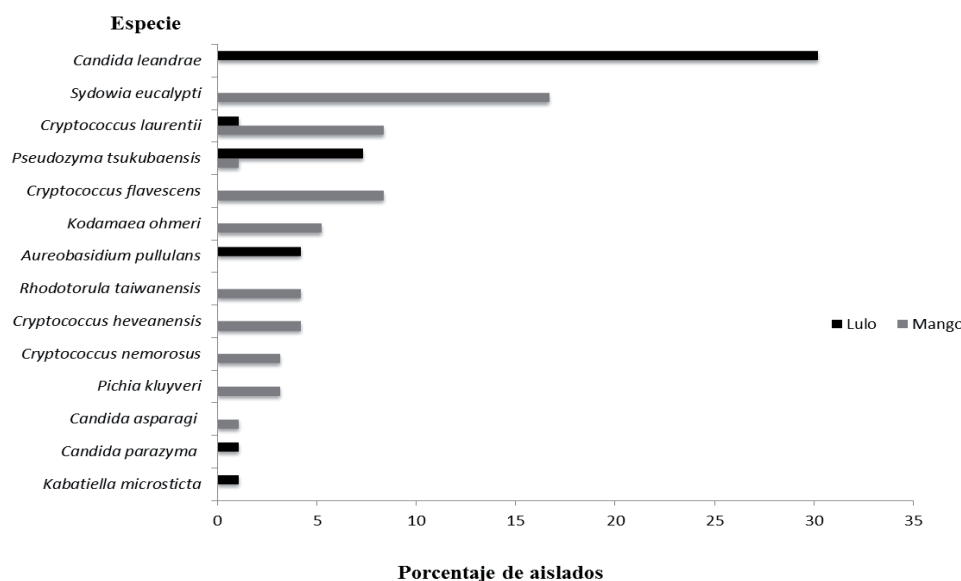
Del total de especies identificadas se reportaron en el Genbank las secuencias de los aislados que presentaron mayor abundancia y son recientemente descritos (JGM01, JGM09 Y JGL01) con los números de accesoión JQ514555, JQ514556 y JQ514557 respectivamente.

Abundancia de especies obtenidas

El patrón de diversidad obtenido para especies aisladas a partir de flores de lulo arbóreo muestra una dominancia de la especie *Candida leandreae* con el 32% del total de aislados (figura 3). Este patrón de diversidad concuerda con trabajos realizados por Herrera, 2008, quien encontró una marcada dominancia de una única especie en néctar floral (*Helleborous foetidius*) y en aislados de abejorro *Bombus*, mismo género reportado como polinizador en flores de lulo. Además esta dominancia puede verse reflejada por características particulares presentes en esta especie para soportar el crecimiento en micro hábitats cambiantes o por la eficiente dispersión de esta levadura por medio de insectos (generalmente abejorros) o viento [5].

La especie *Sydowia eucalypti* presentó la mayor abundancia en inflorescencias de mango representando el 17% del total de especies obtenidas, esta es una especie de microhongo encontrada en hojas y hojarasca de especies de Eucalipto en el sur de Africa, Portugal y Australia [15], en condiciones de cultivo se presenta como "yeast-like" y sus características morfológicas son similares a los géneros *Aureobasidium* y *Hormonema*.

Figura 3. Relación riqueza y abundancia de especies de en flores de lulo arbóreo e inflorescencias de mango



Esta especie es capaz de crecer en una amplia gama de especies de plantas no relacionadas con eucalipto [16].

Del total de especies identificadas los generos *Cryptococcus* y *Candida*, estuvieron mayormente presentes, lo que concuerda con lo publicado por Atlas, 2002, quien reportó que estos generos se encuentran frecuentemente asociados a plantas, ya sea flores u hojas [13].

Algunos géneros de levaduras encontradas tales como *Cryptococcus*, *Pichia* y *Rhodotorula* tienen la capacidad de formar capsulas [12] que actúan como escudo y les confiere ventajas adaptativas a los ambientes adversos, la presencia de pigmentos carotenoides en el caso de *Rhodotorula* les confiere protección contra radiación UV [14]. Dichas ventajas adaptativas generan un importante factor de selección al momento de identificar levaduras con potencial biotecnológico como controladores de fitopatogenos en estos ambientes.

La especie *Aureobasidium pullulans* representa solo el 4% del total de aislados lo que concuerda a lo reportado por Lachance *et al.*, 2001, quienes encontraron que las poblaciones de *Aureobasidium* estaban presentes en número muy bajo para flores de diferentes plantas [5]. Esta especie presenta un alto grado de diversidad intra-específica, reportándose diferentes variedades de la misma especie y presenta un alto potencial

biotecnológico por su importancia como productor de Polisacrido extracelular biodegradable (EPS) pullulan (poly- α -1,6-maltotriose). Este componente es un prometedor biomaterial y es utilizado actualmente para el envasado de alimentos y medicamentos [17].

La especie *Pseudozyma tsukubaensis* encontrada tanto para aislados obtenidos a partir de flores de lulo arbóreo como para los obtenidos de inflorescencias de mango, presenta un amplio rango de distribución en plantas, se ha reportado para hojas de *Perilla frutescens* (Lamiaceae) en Japón, como productoras de biosurfactantes glicolípidos, *P. tsuckubaensis* es además capaz de producir gran cantidad de diastereoisómeros MEL-B a partir de aceites vegetales, por lo que son consideradas especies de gran interés biotecnológico [18].

Otros géneros como *Rhodotorula*, *Cryptococcus* y *Pichia* son ampliamente empleados en biotecnología por la capacidad de producir mananos lineales con enlaces alternados, heteropolisacáridos ácidos con alto contenido de xilosa y fosfomanos a partir de glucosa [19].

Las especies del genero *Cryptococcus* reportadas para esta investigación corresponden a *haveanensis*, *laurentii* y *flavescens*, este género mostro una alta frecuencia de levaduras. Caso paradójico a lo publicado por Lachance en el 2001, quien reportó que

varias especies de levaduras *Basidiomycetas* como *Cryptococcus* y *Pseudozyma* son poco frecuentes en las flores, concluyendo que estos son miembros generalistas del filopano y son simplemente alóctonos de los ecosistemas levadura-flor-polinizador [5]. Las especies pertenecientes al género *Cryptococcus* son de gran interés en el campo industrial, siendo productores de exopolisacáridos (*C. flavescens*) o controladores biológicos como *C. laurentii*, reduciendo la adhesión y germinación de conidias de *Botrytis cinérea*, un hongo causante de la declinación de post-cosechas en muchas especies vegetales [20].

Por último las especies *Candida parazyama* y *Rhodotorula taiwanensis* han sido descritas como especies recientes. *C. parazyama* es una especie descrita en el 2002, encontrada en flores de *Ipomoea indica* en Hawái y relaciona con el insecto *Drosophila floricola*, el hábitat de esta especie son flores e insectos asociados a flores, de climas cálidos principalmente [5]. *R. taiwanensis* descrita en el 2010, fue obtenida a partir de tallos de *Artemisia argyi*, estando más cercanamente relacionada a *Rhodospidium sphaerocarpum* [21]

CONCLUSIONES

La identificación del 100% de las especies halladas en este estudio, se logró gracias al empleo de las técnicas moleculares implementadas.

El patrón de diversidad encontrado tanto para flores de lulo arbóreo como para inflorescencias de mango varía ampliamente, presentando en este último un mayor número de especies, siendo la especie de mayor frecuencia *Sydowia eucalyti* con el 17% del total de aislados

La mayor parte de las especies encontradas en esta investigación no habían sido reportadas para Colombia, contribuyendo de esta manera con el conocimiento de levaduras en microhabitats naturales de las flores.

Especies como *A. pullulans*, *C. laurentii*, *P. tsukubaensis* y *C. flavescens*, se han reportado como especies de interés biotecnológico, lo que permite un panorama interesante para futuras investigaciones en industria biotecnológica.

REFERENCIAS

- [1] LINDOW, S.E. and LEVEAU, H.J. Phyllosphere microbiology. *Curr Opin Biotech.*, 13, 2002, p. 259-265.
- [2] MEDINA, C.M, CRISTANCHO D. and URIBE, D. Physiological Responses and Antagonistic Capacity of Yeast Phyllospheric: Isolates Obtained in Blackberry Crops (*Rubus glaucus*). *Acta biológica Colombiana.*, 14(3), 2009, p. 181-198.
- [3] URIBE, G. L. Caracterización fisiológica de levaduras aisladas de la filosfera de mora [tesis de pregrado]. Bogotá-Colombia: Pontificia Universidad Javeriana, facultad de ciencias, 2007, 153 p.
- [4] CANTO, A., HERRERA, C.M., MEDRANO, M., PÉREZ, R. and GARCÍA, I.M. Pollinator foraging modifies nectar sugar composition in *Helleborus foetidus* (Ranunculaceae): an experimental test. *American Journal of Botany*, 2008, p. 315–320.
- [5] LACHANCE, M. A., STARMER, W.T., ROSA, C.A., BOWLES, J.M., BARKER, J.S. and JANZEN, D.H. Biogeography of the yeasts of ephemeral flowers and their insects. *FEMS Yeast Research*, 2001, p.1–8.
- [6] HUETE, M and ARIAS, S. Manual para la producción de mango. Usaid-red proyecto de diversificación económica rural, 2007, p 1-42.
- [7] BOEKHOUT, T., ROBERT, V., SMITH, M., STALPERS, J., YARROW, D., BOER, P., BUIS, R., GIJSWIJT, G., KURTZMAN, C.P., FELL, J.W., GUÉHO, E., GUILLOT, J. and ROBERTS, I. *Yeasts of the World: Morphology, Physiology, Sequences and Identification*. 2 ed. Amsterdam, Netherlands, 2004.
- [8] OSORIO-CADAVID, E., RAMÍREZ, M., LÓPEZ, A., W. and MAMBUSCAY, L.A. Estandarización de un protocolo sencillo para la extracción de ADN genómico de levaduras. *Revista Colombiana de Biotecnología.*, 11(1), 2009, p. 125-131.
- [9] SILVA-FILHO, E. A., DOS SANTOS, S. K., RESENDE, A. M., DE MORAIS, J. O., DE MORAIS, M. A. and SIMOES, D. A. Yeast population dynamics of industrial fuel-ethanol fermentation process assessed by PCR-fingerprinting. *Springer Antonie Van Leeuwenhoek.*, 88, 2005, p.13-23.
- [10] HAMMER, D.A., HARPER, T. and RYAN, P.D. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontologia Electronica.*, 4(1), 2001, 9 p.

- [11] KURTZMAN, C.P. and ROBNETT, C.J. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie van Leeuwenhoek.*, 73(4), 1998, p. 331-371.
- [12] MARTIN-MAZUELOS, E. and VALVERDE-CONDE, A. Criptococosis: diagnostico microbiologico y estudio de la sensibilidad in vitro. Hospital universitario de valme, 2006, 5 p.
- [13] ATLAS, R. Ecología microbiana y microbiología ambiental. 4 ed. Madrid, (España): Addison Wesley, 2002, 677p.
- [14] LIBKIND, D., MOLINÉ M. and VANBROOCK, M. Posibles mecanismos de fotoprotección en levaduras. *Revista electrónica de Radiobiología.*, 4, 2004, p. 84-88.
- [15] CHEEWANGK, R., SUMMERELL, B.A., HYDE, K.D., TO-ANUN, C. and CROUS, P.W. Myrtaceae: a cache of fungal biodiversity. *Antonie van Leeuwenhoek*, 23, 2009, p. 55-85
- [16] CROUS, P.W., PHILLIPS, A. J. and BAXTER, A. P. Phytopathogenic fungi from South Africa. *South Africa*, 2000, 358p.
- [17] SINGH, R.S, SAINI, G., KENNEDY, J. Pullulan: microbial sources, production and applications. *Carbohydrate Polymers*, 2008, p. 515-531
- [18] TUKUOMA, F., M. TOMOTAKE, K. MASAOKI I. TOMOHIRO and K. DAI. A basidiomycetous yeast, *Pseudozyma tsukubaensis*, efficiently produces a novel glycolipid biosurfactant. The identification of a new diastereomer of mannosylerythritol lipid-B. *Journal of Bioscience and Bioengineering.*, 112(2), 2008, p.137-144.
- [19] KURTZMAN, C.P. and FELL, J. The yeast a taxonomic study. 4 ed. Elsevier, 1999, p. 16-105.
- [20] FILONOW, A. Butyl acetato y yeasts interact in adhesion and germination of *Botrytis cinerea* conidia in vitro and in fungal decay of golden delicious apple. *Chem Ecol*, 27, 2001. p. 831- 844.
- [21] HUANG, C.H., LEE, F.L., TIEN, C.J. and HSIEH, P.W. *Rhodotorula taiwanensis* sp. nov., a novel yeast species from a plant in Taiwan. *Antonie Van Leeuwenhoek.*, 99(2), 2010, p. 297-302.