

Universidad Nacional
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Escuela de Ciencias Biológicas
Licenciatura en Biología con Énfasis en Manejo de Recursos Naturales

Informe Escrito Final

Microorganismos cultivables con actividad β -D-glucosidasa obtenidos en cápsulas de *Vanilla planifolia*, *Vanilla pompona* e híbrido de Costa Rica (*V. planifolia* x *V. pompona*)

Tesis de grado presentada como requisito parcial para optar por el grado de Licenciatura en Biología con Énfasis en Manejo de Recursos Naturales

Steven Sánchez Vargas

Campus Omar Dengo
Heredia, Costa Rica


Miembros del tribunal

Este trabajo de graduación fue Aprobado por el Tribunal Examinador de la Escuela de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional, como requisito parcial para optar por el grado de Licenciatura en Biología con Énfasis en Manejo de Recursos Naturales.

MPM. Abad Rodríguez Rodríguez
Representante, Decano, quién preside



M.Sc. Bernal Azofeifa Bolaños
Representante Unidad Académica



Dr. Frank Solano Campos
Tutor

Luis Alonso Porras Reyes

M.Sc. Luis Alonso Porras Reyes
Asesor



M.Sc. Silvia Mau Incháustegui
Invitada especial

Agradecimientos

Agradezco al *Ph.D.* Frank Solano Campos, al *M.Sc.* Luis Alonso Porra Reyes y a la *M.Sc.* Yendry Carvajal Miranda por ser parte de mi comité asesor; quienes me brindaron el apoyo y guía durante el desarrollo del trabajo.

Agradezco a la *M.Sc.* Amelia Paniagua Vásquez por facilitar la recolección de muestras en el campo y al *Ph.D.* Aníbal Mora Villalobos por sus recomendaciones en el desarrollo del proyecto. Y a Pamela Mena Calvo por el apoyo durante este proceso.

Agradezco al programa de becas del Centro Nacional de Alta Tecnología (CENAT) y al Fondo Institucional de Desarrollo Académico (FIDA) por el financiamiento del proyecto. Al al Centro Nacional de Innovaciones Biotecnológicas (CENIBiot) por la prestación de sus instalaciones para desarrollar el presente proyecto.

Dedicatoria

Este trabajo se lo dedico a mí padre (Egérico Sánchez Hernandez) y a mí madre (Donata Vargas Mesén) por el apoyo que me han brindado a lo largo de mi vida y por el incentivo a cumplir mis metas.

Índice

Miembros del tribunal	I
Agradecimientos	II
Dedicatoria	III
Índice.....	IV
Índice de cuadros	VI
Índice de figuras	VII
Abreviaturas	VIII
Resumen	X
1. Introducción.....	1
1.1 Antecedentes.....	3
1.2 Justificación.....	6
1.3 Planteamiento del problema	8
1.4 Objetivos	8
1.4.1. Objetivo general	8
1.4.2. Objetivos específicos	8
2. Marco Teórico	9
2.1 Especies de <i>Vanilla</i> , su conservación e importancia económica.....	9
2.2 Aislamiento de microorganismos con actividad β -D-glucosidasa a partir de diversos ambientes	13
2.3 Enzimas β -D-glucosidasas en microorganismos	15
2.4. Identificación molecular de bacterias y levaduras	17
3. Marco metodológico	19
3.1 Sitios de recolecta de muestras	19
3.2 Recolecta de muestras.....	20
3.3 Aislamiento de microorganismos	20
3.3.1. Aislamiento de bacterias	20
3.3.2. Aislamiento de levaduras	21
3.4 Clasificación inicial de los microorganismos aislados	21
3.5 Secuenciación de ADN para identificación de microorganismos aislados	22
3.5.1. Extracción de ADN genómico	22

3.5.2.	Amplificación del gen ARNr 16S en bacterias y las regiones ITS en levaduras	22
3.6	Asignación taxonómica a los microorganismos aislados.....	23
3.7	Determinación de la abundancia relativa de los microorganismos aislados	23
3.8	Identificación de la actividad β -D-glucosidasa	23
3.8.1.	Identificación de la actividad β -D-glucosidasa bacteriana.....	23
3.8.2.	Identificación de la actividad β -D-glucosidasa en levaduras	25
3.9	Análisis de filogenia molecular del gen ARNr 16S y regiones ITS	26
4.	Resultados	28
4.1	Aislamiento de microorganismos	28
4.2	Asignación taxonómica a los microorganismos aislados.....	28
4.3	Determinación de la abundancia relativa de los microorganismos	29
4.4	Identificación de la actividad β -D-glucosidasa en bacterias	31
4.5	Análisis de filogenia molecular del gen ARNr 16S.....	32
4.6	Identificación de la actividad β -D-glucosidasa en levaduras	40
4.7	Análisis de filogenia molecular de las regiones ITS.....	41
5.	Discusión.....	45
6.	Conclusiones.....	58
7.	Recomendaciones	59
8.	Bibliografía.....	60
9.	Anexos	120

Índice de cuadros

Cuadro 1. Secuencias de primers para las ampliaciones del ARNr 16S y las regiones ITS	22
Cuadro 2. Perfil de amplificación para las regiones ITS en levaduras y ARNr 16S en bacterias.....	22
Cuadro 3. Grupos externos usados en los diferentes filos de microorganismos aislados en las cápsulas de híbrido de Costa Rica, <i>V. planifolia</i> y <i>V. pompona</i>	26
Cuadro 4. Modelos de sustitución nucleotídica por cada filo, de acuerdo con el criterio Bayesiano	27
Cuadro 5. Números de aislamientos de microorganismos en el híbrido de Costa Rica, <i>V. planifolia</i> y <i>V. pompona</i>	28
Cuadro 6. Aislamientos bacterianos con mayor actividad β -D-glucosidasa en cápsulas de híbrido de Costa Rica, <i>V. planifolia</i> y <i>V. pompona</i>	32
Cuadro 7. Actividad β -D-glucosidasa en aislamientos de levaduras en cápsulas de <i>V. planifolia</i> y <i>V. pompona</i>	41

Índice de figuras

Figura 1. Híbrido de Costa Rica y especies comerciales de <i>Vanilla</i>	10
Figura 2. Estructura de algunos β -D-glucósidos.....	11
Figura 3. Generación de vainillina a partir de la hidrólisis de la gluco-vanillina.....	11
Figura 4. Sitios de recolectas de muestras de híbrido de Costa Rica, <i>V. planifolia</i> y <i>V. pompona</i>	20
Figura 5. Pruebas en placas con agar para determinar la actividad β -D-glucosidasa...	24
Figura 6. Categorización de la actividad enzimática en bacterias aisladas de las cápsulas del híbrido de Costa Rica, <i>V. planifolia</i> y <i>V. pompona</i>	25
Figura 7. Categorización de la actividad enzimática en levaduras aisladas de las cápsulas del híbrido de Costa Rica, <i>V. planifolia</i> y <i>V. pompona</i>	26
Figura 8. Asignación taxonómica a los microorganismos aislados en las cápsulas de híbrido de Costa Rica, <i>V. planifolia</i> y <i>V. pompona</i>	29
Figura 9. Abundancia relativa de familias bacterianas aisladas de cápsulas del híbrido de Costa Rica, <i>V. planifolia</i> y <i>V. pompona</i>	30
Figura 10. Abundancia relativa de familias de levaduras aisladas de cápsulas del híbrido de Costa Rica, <i>V. planifolia</i> y <i>V. pompona</i>	31
Figura 11. Árbol filogenético truncado del género <i>Curtobacterium</i> perteneciente al filo Actinobacteria.....	33
Figura 12. Árbol filogenético truncado del género <i>Cohnella</i> perteneciente al filo Firmicutes.....	34
Figura 13. Árbol filogenético truncado del género <i>Paenibacillus</i> perteneciente al filo Firmicutes.....	35
Figura 14. Árbol filogenético truncado del género <i>Bacillus</i> perteneciente al filo Firmicutes	36
Figura 15. Árbol filogenético truncado del género <i>Methylobacterium</i> perteneciente al filo Proteobacteria.....	37
Figura 16. Árbol filogenético truncado de la familia Enterobacteriaceae perteneciente al filo Proteobacteria.....	38
Figura 17. Árbol filogenético truncado de la familia Erwiniaceae perteneciente al filo Proteobacteria.....	39
Figura 18. Árbol filogenético truncado de la familia Enterobacteriaceae y Yersiniaceae perteneciente al filo Proteobacteria.....	40
Figura 19. Árbol filogenético truncado del filo Basidiomycota.	42
Figura 20. Árbol filogenético truncado del filo Basidiomycota.	43
Figura 21. Árbol filogenético truncado del filo Ascomycota.....	44

Abreviaturas

°C	grado Celsius
μL	microlitros
ARNr 16S	ARN Ribosómico 16S
ARNr 5.8S	ARN Ribosómico 5.8S
ADN	ácido desoxirribonucleico
BLASTn	Herramienta básica de alineamiento local para nucleótidos
CAZy	Base de datos en enzimas activas sobre carbohidratos
CENIBiot	Centro Nacional de Innovaciones Biotecnológicas
CSD	Caldo Sabouraud Dextrosa
CTS	Caldo Trypticase de Soya
D1	dominio 1
D2	dominio 2
FIB	Filogenia de inferencia Bayesiana
g	gramos
GFP	proteína verde fluorescente
h	hora
ITS	Espaciador de transcrito interno
IUBMB	Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular
IUCN	Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza
L	litro
LB	Caldo Lisogénico
LSU	Sub-unidad ribosomal larga
MCMC	Métodos de Monte Carlo basados en la cadena de Markov
MEGA	Medio Glicerol Arbutina
MEGE	Medio Glicerol Esculina
min	minuto
ML	Máxima-verosimilitud
mL	mililitro
m.s.n.m.	Metros sobre el nivel del mar
NCBI	Centro Nacional para Información en Biotecnología
OEC	Observatorio de la Complejidad Económica
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
pH	potencial de hidrógeno
pNPG	<i>p</i> -nitrofenil-β-D-glucopiranosido
RDP	Proyecto de base de datos ribosomal
rpm	revoluciones por minuto
s	segundo
SDA	Agar Sabouraud Dextrosa
SH-aLRT	Razón de verosimilitud aproximada con la corrección no paramétrica de Shimodaira–Hasegawa
TSA	Agar Trypticase de Soya
UFBoot	Método de remuestreo (<i>bootstrapping</i>) ultra rápido

WRS

Base de datos en referencia mundial del recurso suelo

Resumen

La acumulación de metabolitos secundarios en las especies comerciales del género *Vanilla*, siendo vainillina el más importante, la convierten en la segunda especie más cara a nivel mundial. Estos metabolitos se forman a partir de la actividad β -D-glucosidasa propia de sus cápsulas y de microorganismos presentes en el proceso de curado. El objetivo del presente trabajo fue determinar la presencia de microorganismos cultivables con actividad β -D-glucosidasa en cápsulas fisiológicamente maduras de *V. planifolia*, *V. pompona* e híbrido de Costa Rica (*V. planifolia* \times *V. pompona*) \times *V. planifolia*, mediante su aislamiento, identificación y crecimiento en placas con sustratos, para un posible uso en el mejoramiento del curado en cápsulas de *Vanilla* comercial. El aislamiento de bacterias y levaduras se realizó previo al proceso de curado en caldos y agares de Trypticase de Soya y Sabouraud Dextrosa, respectivamente. Se usó secuenciación de ADN del ARNr 16S para la identificación de los aislamientos bacterianos y del ITS para la identificación de los aislamientos fúngicos. Además, los sustratos arbutina, esculina y celobiosa se utilizaron para determinar la actividad β -D-glucosidasa. Los aislamientos a partir de las cápsulas de *V. pompona* tuvieron una mayor diversidad de microorganismos. Con respecto a la actividad β -D-glucosidasa en bacterias, el filo Proteobacteria fue el más diverso y con un mayor número de aislamientos con actividad enzimática, principalmente en esculina y celobiosa. En levaduras, el filo con mayor número de aislamientos y más diverso fue Basidiomycota, en el cual, todos los aislamientos tuvieron una alta actividad sobre los sustratos arbutina y esculina. El principal aporte del trabajo se da en ser el primero en estudiar la actividad β -D-glucosidasa de microorganismos obtenidos a partir de cápsulas fisiológicamente maduras y previas a su curado de dos especies comerciales de *Vanilla* y el híbrido de Costa Rica. En conclusión, se obtuvo grupos de microorganismos no reportados previamente provenientes de cápsulas de *V. planifolia*, *V. pompona* e híbrido de Costa Rica con actividad β -D-glucosidasa, donde el grupo de las levaduras son las más ideales para futuras aplicaciones biotecnológicas en el curado de cápsulas de *Vanilla* con valor económico.

1. Introducción

Los bosques tropicales son una fuente importante de recursos naturales para la humanidad (Balvanera, 2012; Fedele et al., 2021; Toledo et al., 2003; Varghese et al., 2015); sin embargo, cerca de un 90% se encuentran fuera de áreas protegidas y su superficie se ha reducido en un 35% a nivel mundial, por el avance de la frontera agrícola (Pinotti et al., 2012; Rodríguez-Echeverry & Leiton, 2021; Varghese et al., 2015).

Las plantas del género *Vanilla*, son unos de los recursos naturales que proveen los bosques tropicales y que son cultivadas por su valor económico (Azofeifa-Bolaños et al., 2014; Gamboa-Gaitán, 2014; Karremans et al., 2020; López-López, 2013), siendo las especies del Neotrópico con mayor valor comercial (Herrera-Cabrera et al., 2012; Lubinsky et al., 2008; Medina et al., 2009). No obstante, en esta región las poblaciones silvestres del género *Vanilla* se encuentran reducidas y con una importante erosión genética (Bautista-Aguilar et al., 2021; Bello-Bello et al., 2015; Bory et al., 2008; Gamboa-Gaitán, 2014; Salazar-Rojas, 2011).

El cultivo de especies comerciales de *Vanilla*, se da principalmente en sistemas agroforestales debido a sus necesidades ecológicas; por ejemplo, árboles que le brinden un 50% de sombra y que le sirvan de soporte para crecer, suelos con buen drenaje y abundante compost (Espinoza-Pérez et al. 2019; López-López, 2013). Por lo tanto, bajo el sistema agroforestal el cultivo de vainilla permite generar zonas de amortiguamiento a las áreas de importancia biológica, aledañas a las comunidades en las regiones tropicales (Hakim et al., 2019; Lubinsky et al., 2008).

Por otra parte, el interés económico en el género *Vanilla* se debe a que algunas de sus especies poseen metabolitos secundarios con características organolépticas (vainillina o 4-hydroxy-3-metoxibenzaldehído, el más importante) muy usados en la industria (principalmente de alimentos); lo cual, la hace la segunda especia más cara a nivel mundial (Andrade-Andrade et al., 2018; Chen et al., 2015a; Gallage et al., 2018; Odoux et al., 2006; Röling et al., 2001; Salazar-Rojas et al., 2012). Sin embargo, estos metabolitos secundarios se encuentran en forma de β -D-glucósidos (vainillina en forma de gluco-vainillina) en las cápsulas de especies comerciales de *Vanilla* y deben ser hidrolizados mediante un proceso denominado curado (Baqueiro-Peña & Guerrero-Beltrán, 2017; Cai et al., 2019; General et al., 2009).

En el curado se exponen los β -D-glucósidos a la actividad de la enzima β -D-glucosidasa en cápsulas en un estado fisiológico entre maduras y verdes (Delgado et al., 2021; Gu et al., 2015; Naidu et al., 2009; Ruiz-Terán et al., 2001; Walton et al., 2000). Este proceso dura aproximadamente de tres a seis meses y consiste de cuatro etapas: 1) muerte/escalado, inhibición del crecimiento vegetativo de las cápsulas por temperatura (60 °C-100 °C) y generando una exposición de los β -D-glucósidos a la actividad endo- β -D-glucosidasa (propia de las cápsulas); 2) asoleo/sudado, para favorecer la actividad β -D-glucosidasa; 3) secado, con el fin de disminuir la humedad para proteger las cápsulas de la descomposición microbiana y otras actividades enzimáticas no deseadas y 4) acondicionamiento, que consiste en el almacenamiento de las cápsulas entre 35 °C y 38 °C para mejorar los resultados (Gu et al., 2017; Kelso-Bucio et al., 2013; Dignum et al., 2002; Ramachandra-Rao & Ravishankar, 2000).

En el proceso de curado, se creía que la hidrólisis de la gluco-vainillina era exclusivo de la actividad endo- β -D-glucosidasa (propia de las cápsulas) (Odoux et al., 2003; Odoux et al., 2006). Sin embargo, la cantidad de vainillina generada al final del curado y la actividad endo- β -D-glucosidasa no concordaban; ya que, la actividad enzimática disminuía considerablemente por la degradación de la enzima en la etapa de muerte debido a las altas temperaturas (Chen et al. 2015a; Dignum et al., 2002; General et al., 2009; Xu et al., 2020).

Por lo tanto, surgió la hipótesis de que la hidrólisis de la gluco-vainillina en el curado también estaba influenciada por factores externos a la actividad enzimática propia de las cápsulas; la cual, ha sido corroborado por el aislamiento de levaduras y bacterias con actividad β -D-glucosidasa sobre la gluco-vainillina, en la etapa del curado (General et al., 2009; Röling et al., 2001; Yeh et al., 2021). Sin embargo, la función que cumplen los microorganismos con capacidad de hidrolizar la gluco-vainillina en el curado, no ha sido ampliamente estudiada (Cai et al., 2019; Chen et al., 2015a).

El amplio uso y el lento proceso de curado (Röling et al., 2001), han hecho que el extracto de vainilla sea el segundo saborizante de mayor valor económico después del azafrán y de mayor popularidad a nivel mundial (Santa-Cardona et al., 2012; Rojas et al., 2020). En los próximos años se prevé un incremento en los ingresos económicos generados por las cápsulas curadas de especies comerciales de *Vanilla*, debido a un aumento en su demanda, la cual

supera en un 87.5% la oferta mundial (Ahmad et al., 2020; Azofeifa-Bolaños et al. 2014; Naidu et al. 2009).

1.1 Antecedentes

La actividad β -D-glucosidasa se ha identificado en microorganismos de diversos ecosistemas naturales: termales (Alarcón et al., 2011; Polymenakou et al., 2021), polares (Buzzini et al., 2012; Cristóbal et al., 2008; Duarte et al., 2018), microbioma vegetal (Bogas et al., 2007) suelos contaminados, en el tracto digestivo de diferentes animales, entre otros (Ahmed et al., 2017; Cristóbal et al., 2008; Duan et al., 2009; Warnecke et al., 2007). También se han aislado microorganismos con actividad β -D-glucosidasa en ambientes artificiales como el procesamiento de bebidas y alimentos (Palmeri & Spagna, 2007; Rompkovski et al., 2021).

Uno de los procesos en el cual se han aislado microorganismos con actividad β -D-glucosidasa ha sido a partir del vino de uva, donde se han obtenido géneros de levaduras como *Brettanomyces*, *Candida*, *Debaromyces*, *Dekkera*, *Hanseniaspora*, *Hansenula*, *Kloeckera*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Saccharomycodes*, *Schizosaccharomyces*, y *Torulasporea*, además de la bacteria *Oenococcus oeni* (Palmeri & Spagna, 2007; Zhang et al., 2021). En otros procesos como la fermentación de soya y mandioca, también se han logrado aislar bacterias con actividad β -D-glucosidasa de los géneros *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Pediococcus* y *Leuconostoc*, así como *Enterococcus*, *Weissella* y *Bacillus*, respectivamente (Abban et al., 2013; Hutajulu et al., 2021; Michlmayr & Kneifel, 2014).

El curado de las cápsulas de *Vanilla planifolia* es otro de los procesos en donde se han aislado microorganismos con actividad β -D-glucosidasa (Khoiratty et al., 2015). En la India se realizó un análisis de la ecología microbiana después de la etapa de escalado de las cápsulas de *V. planifolia* en dos sitios diferentes. En el estudio se encontró, que las bacterias del género *Bacillus* (*B. smithii*, *B. licheniformis*, *B. subtilis*, *B. pumilis* y *B. firmus*) eran las más predominantes y todas ellas a excepción *B. smithii* presentaron actividad β -D-glucosidasa (Röling et al., 2001).

Por otra parte, General et al. (2009), aislaron levaduras a partir de muestras en diferentes estados de curado (frescas, muertas, secadas y curadas), así como de otras estructuras de la planta (hojas verdes, tallo y flores) y suelo de la plantación. En el estudio se logró aislar 17

géneros de levadura con actividad β -D-glucosidasa tales como *Cryptococcus*, *Stephanoascus*, *Kockovaella*, *Brettanomyces*, *Rhodoturula*, *Trichosporon*, *Dekkera*, *Candida*, *Lipomyces*, *Sacchoromycopsis*, *Pichia*, *Debaryomyces*, *Bullera*, *Bensingtonia*, *Nadosonia* y *Saccharomyces*, sin embargo, de estos solo seis estuvieron presentes en la etapa de curado (*Dekkera*, *Candida*, *Pichia*, *Debaryomyces*, *Nadosonia*, y *Saccharomyces*).

En otro estudio realizado por Chen et al., (2015^a), reportaron el aislamiento de 20 cepas de *Bacillus* en cápsulas curadas de *V. planifolia* y determinaron la expresión del gen *bgl* (codificador para una β -D-glucosidasa extracelular en bacterias) en los diferentes estados del curado. Además, realizaron la inoculación de las cepas en medios que contenían gluco-vainillina como única fuente de carbono y expresaron la proteína verde fluorescente (GFP) en una cepa de *B. subtilis* para observar su colonización en las cápsulas. En el estudio se observó que el gen *bgl* se expresó después de la pérdida de la actividad endo- β -D-glucosidasa; además, la hidrólisis de gluco-vainillina en los medios inoculados con bacterias fue mayor al control (sin inóculo bacteriano) después de 24 horas y la cepa de *B. subtilis* marcada con GFP colonizó parcialmente las cápsulas.

En China, el aislamiento de microorganismos en cápsulas comerciales de *Vanilla* ha permitido identificar una nueva especie del género *Bacillus* (*B. vanillea*), la cual presenta actividad β -D-glucosidasa (Chen et al., 2015^b). Esta nueva especie de *Bacillus* fue usada por Gu et al., (2015) junto a *B. subtilis* para realizar tratamientos en cápsulas verdes de *V. planifolia*, empleando como control positivo cápsulas curadas de forma tradicional. En el estudio se determinó que las cápsulas tratadas con *B. vanillea* y *B. subtilis* tuvieron significativamente más contenido de vainillina al final del tratamiento en comparación a la muestra control.

En América Latina, específicamente en México, se reportaron aislamientos de *Pantoea*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Morganella*, *Providencia* y *Escherichia* en *V. planifolia* (Luna-Guevara et al., 2016). De igual forma, en Colombia se han aislado *Bacillus*, *Rhodococcus*, *Curtobacterium*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Acinetobacter*, *Klebsiella*, *Chromobacterium*, *Flavobacterium*, *Acidovorax* y *Actinomycetes* a partir de hojas, tallos, raíces, cápsulas, asociados a la rizosfera y en el proceso de curado de *V.*

planifolia, *V. odorata*, *V. calyculata* y *Vanilla* spp. (López et al., 2013; López-López, 2013; Gamboa-Gaitán, 2014; Gamboa-Gaitán & Otero-Ospina, 2016).

Para Costa Rica, se ha reportado el aislamiento de bacterias endófitas de los géneros *Acetobacter*, *Achromobacter*, *Burkholderia*, *Campylobacter*, *Corynebacterium*, *Cytophaga*, *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Flavobacterium*, *Leuconostoc*, *Klebsiella*, *Micrococcus*, *Enterobacter*, *Azospirillum* y *Erwinia* con actividad bio-controladora contra *Fusarium oxysporum* (Jiménez-Quesada et al., 2015). Sin embargo, en ninguno de los estudios de aislamiento de microorganismos en México, Colombia y Costa Rica fue analizada la actividad β -D-glucosidasa.

Además del aislamiento de microorganismos con actividad β -D-glucosidasa, también se han realizado estudios aplicados a cápsulas verdes usando extractos enzimáticos como Viscozyme de *Aspergillus* y Celluclast de *Trichoderma reesei*, caracterizados por tener β -D-glucosidasas y otras enzimas (arabinasas, hemicelulasas, xylanasas, y pectinasas). Los extractos fueron aplicados en diferentes combinaciones (Celluclast + agua, Celluclast + etanol, Celluclast + Viscozyme + agua, Celluclast + Viscozyme + etanol) donde el tratamiento de Celluclast + Viscozyme + etanol tuvo una mayor actividad en la hidrólisis de gluco-vainillina (Ruiz-Terán et al., 2001).

Investigaciones similares fueron realizadas por Zhang et al., (2014), donde se reporta el uso de enzimas pectinasas provenientes de *Aspergillus niger* y Viscozyme en cápsulas verdes de *V. planifolia*. En el estudio se demostró que en un período de 8 horas se logró una producción de 3.34% de vainillina, la concentración ideal de enzima correspondía a 0.4% (m/m), la temperatura óptima fue de 50 °C y el pH óptimo estaba en un rango de 3.0 a 5.0.

Otro estudio ha aplicado fuentes enzimáticas de la microbiota del rumen (caracterizados por tener celulasas, hemicelulasas y pectinasas) en cápsulas verdes de *V. planifolia*; demostrando un efecto positivo de los fluidos del rumen en la hidrólisis de la gluco-vainillina (Paramita & Yulianto, 2013).

También se han usado extractos enzimáticos crudos de hojas de té en cápsulas verdes y comerciales de *Vanilla* a una concentración de 2% v/v de enzima. Los resultados mostraron que las muestras tratadas con el extracto enzimático de hojas de té tuvieron un 1.82% más de

vainillina en comparación a muestras tratadas con “Viscozyme” (extracto enzimático proveniente de *A. niger*) y su uso en el curado de cápsulas verdes de especies comerciales de *Vanilla* fue patentado en el 2009 por los autores del mismo estudio (Naidu et al., 2009). El uso de β -D-glucosidasas en el tratamiento de cápsulas verdes de *V. planifolia* ha permitido generar un mayor contenido de vainillina (dos o más veces en comparación al método tradicional) en un menor tiempo (Delgado et al., 2021).

1.2 Justificación

Las especies comerciales de *Vanilla*, se pueden cultivar en sistemas agroforestales. Este sistema de cultivo le permite al productor generar ingresos económicos, con un bajo impacto a los ecosistemas tropicales. Sin embargo, al ser plantas aun no domésticas los productores optan por sustraer directamente del bosque este recurso para el cultivo de sus plantaciones afectando negativamente su hábitat, las poblaciones silvestres y la diversidad genética donde se encuentra distribuidas naturalmente (Carranza Alvarez et al., 2021; Goettsch et al., 2021).

A pesar de que los países del Neotrópico son parte del centro de origen de las principales especies comerciales de *Vanilla*, estos no lideran la producción a nivel mundial debido al mal manejo y la falta de experiencia en este cultivo; lo que ha hecho, que sea otros los principales productores y exportadores como lo es Madagascar e Indonesia (con más del 60% de la producción y exportación, en comparación a menos del 1% en el Neotrópico) (Korthou & Verpoorte, 2007; FAOSTAT, 2021, Naidu et al., 2009; OEC, 2021; Salazar Rojas, 2011). Sin embargo, Indonesia y Madagascar carecen de la diversidad genética del cultivo para su mejoramiento (Chambers et al., 2021).

Aunque la vainillina sintética en términos de costo es más atractiva, está no podrá competir con la preferencia del extracto natural obtenido de las cápsulas de algunas especies de *Vanilla*, debido a su calidad organoléptica. Por lo tanto, los agricultores del Neotrópico se podrían incentivar a incursionar en el cultivo de las especies comerciales debido a su rentabilidad económica; además, con la opción de tener un acervo genético para el mejoramiento del cultivo y otras estrategias alternativas que le ayuden a tener un producto final que pueda competir en mejores condiciones en el mercado.

El uso de microorganismos o sus enzimas son algunas estrategias alternativas de manejo que podrían mejorar el proceso de beneficiado de las cápsulas de especies del género *Vanilla*

con interés económico. Este mejoramiento, se puede ver reflejado en una reducción del tiempo de curado (de 24 horas a una semana en comparación a los tres meses de curado artesanal) y la generación de un producto con más contenido de vainillina (dos o más veces al contenido de vainillina obtenido mediante el curado tradicional), que le daría un mayor valor económico en el mercado, haciendo más rentable su producción y a la vez contribuyendo indirectamente a su conservación (Delgado et al., 2021).

El aislamiento e identificación de microorganismos a partir de las cápsulas de vainilla, tanto en condiciones agroforestales y silvestres contribuiría a conocer la diversidad microbiana presente en estos nichos. Asimismo, el almacenamiento de estas cepas garantizará su conservación y pondrá a disposición estos recursos de la biodiversidad costarricense para futuras aplicaciones biotecnológicas y con posibilidad de generar nuevas patentes.

El propósito de este trabajo es realizar una bioprospección de microorganismos con actividad β -D-glucosidasa que puedan servir a futuro como herramientas base en un mejor aprovechamiento del recurso de especies comerciales de *Vanilla* y con posibilidad de ser usados en otros campos de la biotecnología. Así mismo, constituye un trabajo innovador en comparación a estudios previos; ya que, se describe parte de la diversidad microbiana cultivable (que actuó como fuente de actividad β -D-glucosidasa), presente en cápsulas próximas a cosechar de dos especies comerciales de *Vanilla* y el híbrido de Costa Rica cultivados en tres regiones diferentes de Costa Rica. Este híbrido fue obtenido en las décadas de 1960 y 1970 al retrocruzar un híbrido de primera generación (*V. planifolia* \times *V. pompona*) con *V. planifolia* (Grisoni & Nany, 2021).

1.3 Planteamiento del problema

¿Es la diversidad microbiana cultivable asociada a cápsulas de especies comerciales de *Vanilla* y el híbrido de Costa Rica provenientes de sistemas agroforestales costarricenses una potencial fuente de enzimas β -D-glucosidasas?

1.4 Objetivos

1.4.1. Objetivo general

Determinar la presencia de microorganismos cultivables con actividad β -D-glucosidasa en cápsulas fisiológicamente maduras de *V. planifolia*, *V. pompona* e híbrido de Costa Rica (*(V. planifolia* \times *V. pompona)* \times *V. planifolia*), mediante su aislamiento, identificación y crecimiento en placas con sustratos, para un posible uso en el mejoramiento del curado en cápsulas de *Vanilla* comercial.

1.4.2. Objetivos específicos

- 1) Obtener los microorganismos cultivables presentes en cápsulas fisiológicamente maduras de *V. planifolia*, *V. pompona* e híbrido de Costa Rica.
- 2) Identificar a nivel de ADN los microorganismos aislados en cápsulas fisiológicamente maduras de *V. planifolia*, *V. pompona* e híbrido de Costa Rica.
- 3) Determinar cualitativamente la actividad β -D-glucosidasa en los microorganismos provenientes de las cápsulas fisiológicamente maduras de *V. planifolia*, *V. pompona* e híbrido de Costa Rica.

2. Marco Teórico

2.1 Especies de *Vanilla*, su conservación e importancia económica

El género *Vanilla*, se caracteriza por tener alrededor de 132 especies (Andriamihaja et al., 2020), las cuales se distribuyen en las zonas tropicales del mundo a excepción de la zona tropical de Australia (Gamboa-Gaitán, 2014; Hu et al., 2019; Ramos-Castella et al., 2016). Las poblaciones de *Vanilla*, se encuentra en reducción y con una importante erosión genética debido a la expansión de la frontera agrícola, sustracción de plantas para el cultivo de vainilla y su escasa reproducción sexual que aporta poca variabilidad genética a las poblaciones (Azofeifa-Bolaños et al., 2014; Bautista-Aguilar et al., 2021; Bello-Bello et al., 2015; Gamboa-Gaitán, 2014). Los anteriores factores han colocado algunas especies en la lista roja de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN por sus siglas en inglés) (Qiang, 2014; UICN, 2016).

Las especies de interés comercial de *Vanilla* se encuentran distribuidas en la región del trópico americano (Gamboa-Gaitán, 2014; Villanueva-Viramontes et al., 2017), siendo *V. planifolia* la de mayor importancia, seguida por *V. pompona*, *V. x tahitensis* (González-Chávez et al., 2018; Díez-Gómez, 2014; Ramos-Castella et al., 2016; Rao et al., 2014; Takahashi et al., 2013) e híbridos generados producto del mejoramiento genético (Azofeifa et al., 2014; Grisoni & Nany, 2021; White et al., 2014). Sin embargo, se plantea la hipótesis que para los próximos años el número de especies en el género *Vanilla* podría crecer, ya que se presume de la existencia de especies aún no descritas y algunas de ellas podrían tener alguna importancia económica (Azofeifa et al., 2014; Gamboa-Gaitán, 2014; Hurtado et al., 2014).

En Costa Rica se cultivan y se tienen poblaciones silvestres en dos de las especies de interés comercial *V. planifolia* y *V. pompona* (Figura 1) (Azofeifa-Bolaños et al., 2018; Watteyn et al., 2020). Además, también posee el “híbrido de Costa Rica” (Figura 1); el cual se cree, que corresponde al híbrido Tsy taitra ($(V. planifolia \times V. pompona) \times V. planifolia$) creado en un centro de investigación en Madagascar y posteriormente introducido a Costa Rica (Grisoni & Nany, 2021).

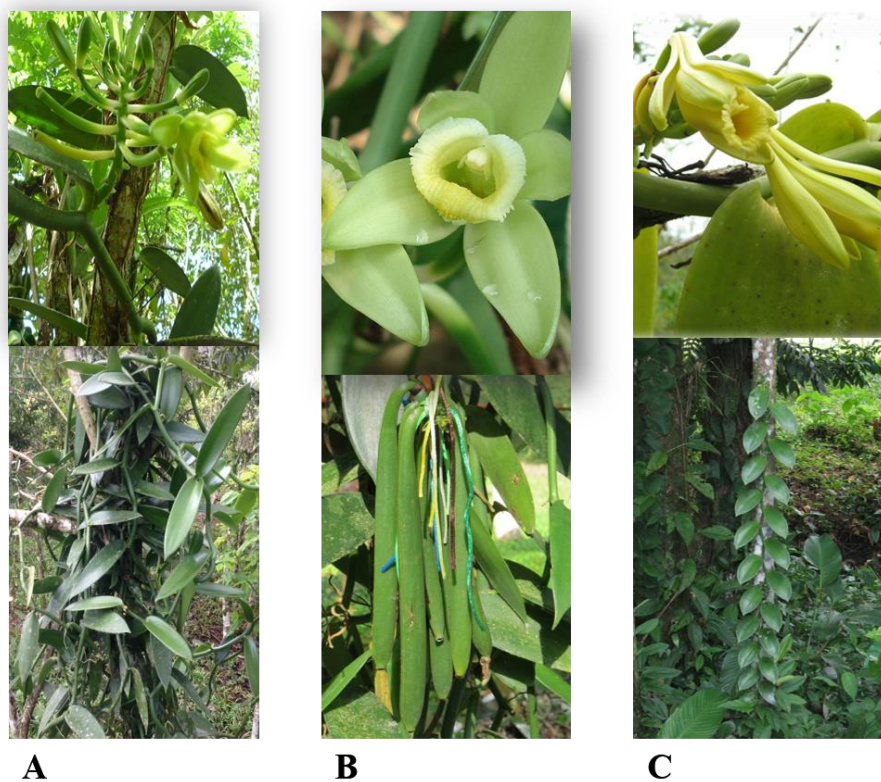


Figura 1. Híbrido de Costa Rica y especies comerciales de *Vanilla*. A) Flor y planta de híbrido de Costa Rica. B) Flor y frutos de *V. planifolia*. C) Flor y planta de *V. pompona*. Fuente: Amelia Paniagua Vásquez.

La importancia económica de algunas especies de *Vanilla*, se debe principalmente a que las cápsulas poseen β -D-glucósidos que son precursores de metabolitos con características organolépticas (Chen et al., 2015a; Khoyratty et al., 2018). Dentro de estos β -D-glucósidos, el de mayor importancia por su concentración y calidad es la gluco-vainillina que da origen a la vainillina (4-hidroxi-3-metoxibenzaldehido) (Gallage et al., 2014; Martău et al., 2021), sin embargo, además de la vainillina, también se generan otros 200 compuestos presentes en menor concentración (Díez Gómez, 2014; Gallage & Møller, 2015; Gu et al., 2015; Santos et al., 2017). En Costa Rica, algunas cápsulas fermentadas de *V. planifolia* encontradas en condiciones naturales (sin ningún tratamiento de curado) han reportado contenidos de vainillina superiores a los estándares del mercado gourmet (Azofeifa et al., 2014; Belanger & Havkin, 2011).

Los β -D-glucósidos están formados por compuestos glúcidos unidos mediante enlaces beta a compuestos no glúcidos (Kundu, 2017); ejemplo de ellos, son la arbutina y esculina usadas para determinar la presencia de β -D-glucosidasas en microorganismos y la glucovanillina presente en cápsulas de algunas especies de *Vanilla* (Figura 2).

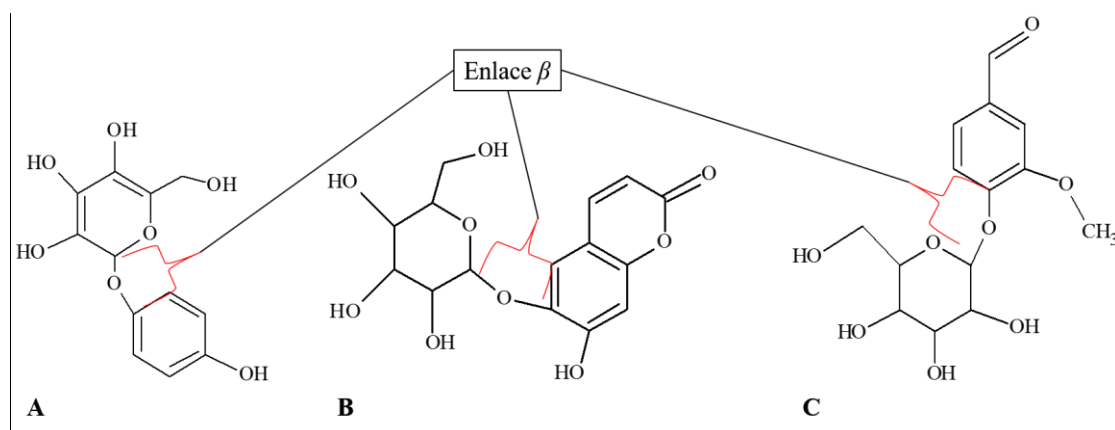


Figura 2. Estructura de algunos β -D-glucósidos. A) Arbutina. B) Esculina. C) Gluco-vainillina.

Fuente: Elaboración propia.

La hidrólisis de metabolitos secundarios como los β -D-glucósidos permite la liberación de compuestos volátiles de interés económico para el mercado mundial. Esto ocurre en las especies comerciales de *Vanilla*, donde la hidrólisis de metabolitos secundarios, como la gluco-vainillina, liberan vainillina (Figura 3). La vainillina es uno de los compuestos responsables del olor y sabor característico de las cápsulas (Falk et al., 2014; Tan & Chin, 2015; Sánchez-Galindo et al., 2018).

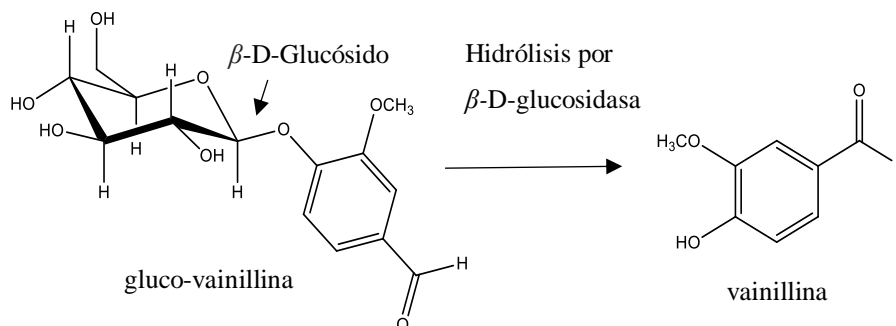


Figura 3. Generación de vainillina a partir de la hidrólisis de la gluco-vainillina.

Fuente: Elaboración propia.

La vainillina, dadas sus características organolépticas es utilizada en la industria de alimentos al incorporarlo como ingrediente de bebidas, confites, helados, galletas entre otros

alimentos. También, este compuesto se usa en la perfumería y la industria tabacalera (Díez Gómez, 2014; Dong et al., 2014; Hurtado et al., 2014; Ramírez-Mosqueda & Iglesias-Andreu, 2017; Singletary, 2020). Otros usos alternativos de la vainillina la involucran como agente conservante de alimentos por su actividad anti-bacteriana (Silveira et al., 2015; Yadav et al., 2020), en la industria farmacéutica por su actividad anti-cancerígena, anti-mutagénica (Dong et al., 2014; Srinual et al., 2017), anti-inflamatoria, antioxidante y anti-apoptótica (Dhanalakshmi et al., 2015; Fouad et al., 2020) y en la industria agrícola para combatir plagas (Corda et al., 2020; Gamboa-Gaitán, 2014; López-López, 2013).

Según datos del Observatorio de la Complejidad Económica (*The Observatory of Economic Complexity* - OEC, por sus siglas en inglés), en el año 2019 las especies comerciales del género *Vanilla* generaron un aproximado de 1170 millones de dólares a nivel mundial; siendo Madagascar el mayor exportador con un 55.6% de la producción y Estados Unidos el mayor importador con un 40.7% de la importación total a nivel mundial (OEC, 2021).

Por otra parte, los países que se encuentran dentro del territorio de distribución natural de las especies comerciales de *Vanilla* y que disponen de un importante acervo a nivel genético de este recurso (Azofeifa & Vásquez, 2015; Díez Gómez, 2014; Ellestad et al., 2021), no tienen una representación significativa en su exportación a nivel mundial. Para el año 2019, Panamá, Colombia, Ecuador, Brasil y Guatemala sumaron menos del 1% en exportación, a excepción de México (que ocupó el tercer lugar a nivel mundial) e incluso algunos no actúan como exportadores y se vieron obligados a la importación del producto o sus derivados (FAOSTAT, 2021; Gamboa-Gaitán, 2014; Isidro, 2003; León Acosta, 2005; OEC, 2021 Tobar-Perdomo & Espinosa-Abondano, 2008). Ejemplo de lo anterior, es una consulta realizada al Banco Central de Costa Rica, para la vainilla en el año 2016 donde Costa Rica importó \$5,745.71 y tan solo exportó \$190,066.00 (Banco Central de Costa Rica, 2016). A esto se suma que en algunas regiones los productores y consumidores desconocen las plantas del género *Vanilla* y su importancia económica (Porrás Rubio, 2013).

Debido a la alta demanda de la vainilla, la producción de vainillina sintética surge como una alternativa para abastecer la demanda de mercado, que en términos económicos es menos costosa que el extracto natural (\$15/kg de vainillina sintética, en comparación a los \$600/kg

de cápsula curada o \$25000/kg de extracto natural de vainilla) (Ciriminna et al., 2019; Rahman et al., 2019). Sin embargo, a pesar de que la vainillina sintética tiene un menor costo económico, el extracto natural sigue siendo el preferido debido a la presencia de otros metabolitos secundarios que aunque se encuentran en menor concentración contribuyen a la calidad del extracto por sus también conocidas propiedades organolépticas y por lo tanto, debido a estas características su demanda sigue en crecimiento (Díez-Gómez, 2014; Gallage & Møller, 2015; Sinha et al., 2008; Wulandari, 2021; Zamzuri & Abd-Aziz 2013).

Las anteriores condiciones podrían hacer del extracto natural de las cápsulas de especies comerciales de *Vanilla* un atractivo para los productores en zonas rurales cercanas a los bosques tropicales; de manera que, se generarían nuevas fuentes de empleo, mayores ingresos económicos a esta zona y disminución de la presión antropogénica a los ecosistemas tropicales naturales (Díez-Gómez, 2014; Martín et al, 2020; Medina et al., 2009; Ticktin, 2004).

Además, debido a la creciente demanda del extracto, se requiere implementar estrategias que ayuden a mejorar su aprovechamiento y que contribuyan a su conservación (Gamboa-Gaitán, 2014). El aislamiento de los microorganismos en cápsulas de especies comerciales de *Vanilla*, podría ser una estrategia alternativa que fomente un aprovechamiento más eficiente del recurso, contribuya indirectamente a su conservación y además podría ayudar a comprender la función de los microorganismos en el curado de las cápsulas (Chen et al., 2015a).

El uso de microorganismos o sus enzimas puede mejorar el curado mediante una disminución del tiempo de este proceso y la obtención de un producto con mayor contenido de vainillina. Lo anterior aumentaría la rentabilidad de la producción, generaría más calidad y por tanto su valor en el mercado se incrementaría, permitiendo competir en mejores condiciones con otros productores a nivel mundial (Pardío et al., 2018; Sreedhar et al., 2007).

2.2 Aislamiento de microorganismos con actividad β -D-glucosidasa a partir de diversos ambientes

El aislamiento de microorganismos contribuye a conocer la diversidad microbiológica del ambiente del cual se recolectan, descripción de nuevas especies, obtención de microorganismos con posibles aplicaciones biotecnológicas y además se pueden

crioconservar garantizando su uso a futuro (Banjara et al., 2015; Beneduzi et al., 2013; Casillo et al., 2018; Elleuche et al., 2014; Kulkarni & Chitte, 2015; Perfumo et al., 2018; Raju et al., 2015; Schultz et al., 2020; Shokryazdan et al., 2017; Singh et al., 2014; Vitorino & Bessa, 2017). Sin embargo, de toda la comunidad microbiológica presente en una muestra ambiental solo una fracción de ella se puede obtener mediante la técnica de cultivo (Anderson et al., 2013; Kim et al., 2013; Van Rossum et al., 2020), por lo tanto, para acceder a los microorganismos no cultivables, se debe hacer uso de otras técnicas como la metagenómica (Meng et al., 2014; Nayfach et al. 2021).

Los microorganismos tienen una distribución cosmopolita, debido a que se pueden encontrar en ambientes con altas a bajas temperaturas, tanto ácidos como alcalinos, de altas a bajas presiones, formando parte de la microbiota animal, vegetal, entre otros (Barberán et al., 2014; Rani & Dev, 2016; Kim et al., 2020; Souza et al., 2016; Østbye et al., 2016). Estas características de distribución en diversos ambientes es lo que hace a los microorganismos de gran interés para la biotecnología, debido a que son fuente importante de enzimas que pueden resistir las diversas condiciones que se desarrollan a nivel industrial (Elleuche et al., 2014; Ozatay, 2020).

Con el fin de conocer la diversidad microbiológica cultivable en diferentes ambientes, se han realizado aislamientos de microorganismos en zonas polares, microbiota animal y vegetal, compostaje de alimentos, ambientes áridos, ríos, mares, volcanes entre otros (Anderson et al., 2013; Azua-Bustos & González-Silva, 2014; Behera et al., 2014; Hahnke et al., 2015; Jensen et al., 2013; Jiménez et al., 2015; Perron et al., 2015; Singh et al., 2014; Souza et al., 2016; Stathopoulou et al., 2013). También se han realizado aislamientos de microorganismos con fines biotecnológicos, por ejemplo, la obtención de microorganismos para aplicaciones en la industria médica, agrícola, biorremediación, biocontrolación, industria de alimentos, entre otros (Balachandran et al., 2015; Das et al., 2014; Kieliszek & Misiewicz, 2014; Parafati et al., 2015; Sharma et al., 2017).

Por otra parte, en el aislamiento de microorganismos con actividad β -D-glucosidasa se han obtenido levaduras asociadas a la producción de vino de los géneros *Cryptococcus*, *Candida*, *Rhodotorula*, *Pichia*, *Debaryomyces*, *Dekkera* y *Kluyveromyces* como los mayores representantes de dicha actividad (Gaensly, 2016) y de menor importancia *Metschnikowia*

(González-Pombo et al., 2008; Vicente et al., 2020). Además se ha encontrado *Brettanomyces* en la producción de cerveza (Wilkowska & Pogorzelski, 2017), *Clavispora* en la producción de etanol (Liu & Cotta, 2015), *Hanseniapora*, *Wickerhamomyces* y *Saccharomyces* en la fermentación de diversos frutos (Restuccia et al., 2011; Zhang et al., 2021), *Scheffersomyces* y *Yamadazyma* provenientes de madera en descomposición (Lopes et al., 2018), *Apiotrichum*, *Cystofilobasidium*, *Naganishia*, *Tausonia* e *Yarrowia* de suelos (Cavello et al., 2019), *Hortaea* y *Trimmatostroma* de aguas hipersalinas (Primožič et al., 2019; Zalar et al., 2005) y hongos filamentosos como *Aspergillus* de sedimentos marinos (Elyas et al., 2010), *Humicola* en heces de la llama (*Lama glama*) y caballos (*Equus caballus*) (Kumar et al., 2017; Souza et al., 2010), *Fusarium*, *Schizophyllum*, *Gibberella*, *Scopulariopsis* y *Trichoderma* en plantas del desierto (Luziatelli et al., 2014), por mencionar algunos ejemplos.

En bacterias, se han aislado géneros con actividad β -D-glucosidasa tales como *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Dyella*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Chryseobacterium*, *Paenibacillus*, *Pandoraea*, *Pseudomonas* provenientes de suelos de montaña (Jae-Won et al., 2018; Liang et al., 2014), *Aeromonas*, *Brevibacillus*, *Enterococcus*, *Hydrothalea*, *Klebsiella*, *Raoultella* obtenidas del contenido intestinal de la carpa herbívora (*Ctenopharyngodon idellus*) (Li et al., 2016), *Agrobacterium*, *Edaphobacter*, *Luteibacter*, *Mucilagibacter*, *Phenylobacterium*, *Sphingomonas*, *Streptomyces* provenientes de cultivos de ginseng (*Panax* sp.) (Fu et al., 2014; Keum et al., 2021), *Bacteroides* y *Bifidobacterium* aisladas del microbioma humano (Tao et al., 2015; Yan et al., 2018) y *Novosphingobium* obtenidas de suelos inundados con aguas residuales de una refinera de azúcar (Du et al., 2014). También se ha obtenido bacterias del género *Limnobacter*, *Geobacillus* obtenidas en suelos volcánicos (Lu et al., 2011, Stathopoulou et al., 2012), *Acinetobacter*, *Asticcacaulis*, *Micrococcus*, *Obesumbacterium*, *Serratia*, *Sphingobacterium* y *Stenotrophomonas* adquiridas en cuevas (Tomova et al., 2013; Zhou et al. 2020), *Microbacter* en rocas de pH bajo (Sanchez-Andrea et al., 2014), *Alteromonas* proveniente del océano profundo (4000 m de profundidad) (Sun et al., 2018), *Natrialba* de un lago hipersalino (Kajale et al., 2020), entre otras.

2.3 Enzimas β -D-glucosidasas en microorganismos

Las β -D-glucosidasas presentan actividad hidrolasa (Buitrón, 2021; Fang et al., 2014) sobre β -D-glucósidos cianógenos, disacáridos, oligosacáridos y grupos arilo, alquilo y

aminos, unidos a carbohidratos mediante enlaces β (Singh et al., 2016; Suhartatik et al., 2014). Sin embargo, bajo ciertas condiciones las β -D-glucosidasas también pueden sintetizar nuevos β -D-glucósidos (Lee et al., 2015; Thenchartanan et al., 2020).

Estas enzimas, se pueden clasificar de acuerdo a la especificidad de sustrato en: 1) aril β -D-glucosidasas que actúan sobre los aril-glucósidos, 2) celobiosas que actúan sobre la celobiosa para liberar glucosa y 3) β -D-glucosidasas con amplio espectro de sustrato (Gaensly, 2016). La Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (IUBMB, por sus siglas en inglés) clasifica las β -D-glucosidasas según la capacidad de hidrolizar el enlace glucosídico y de acuerdo a esta clasificación están en el grupo EC 3.2.1.x. (Gil Muñoz, 2015; Shrivastava et al., 2020).

Otra de las clasificaciones de las β -D-glucosidasas se basa en la homología de sus secuencias de aminoácidos, esta clasificación las ordena en más de 130 familias las cuales están disponibles en la Base de Datos de Enzimas Activas Sobre Carbohidratos (CAZy por sus siglas en inglés, <http://www.cazy.org/>) (Liew et al., 2018; Lombard et al., 2014). También, se clasifican según sus características estructurales (alfa-hélices y barriles-beta), relaciones evolutivas (alta conservación de aminoácidos cerca del sitio activo) y mecanismos catalíticos (Singhania et al., 2013; Srivastava et al. 2019).

La actividad catalítica está dada por un residuo de glutamato conservado en todas las β -D-glucosidasas reportadas; el proceso de hidrólisis ocurre en dos pasos, el primer paso es la glucosilación, en el cual un residuo de glutamato actúa como nucleófilo y ataca el enlace glucosídico formando el complejo intermediario enzima-sustrato; el segundo paso, es la desglucosilación, en este un segundo residuo de glutamato activa una molécula de agua, la molécula de agua activada actúa en el complejo intermediario enzima-sustrato liberando un residuo de glucosa (Singh et al., 2016; Srivastava et al. 2019).

Debido a la importancia de las β -D-glucosidasas en el metabolismo de los carbohidratos, es común su identificación en bacterias, levaduras, hongos, plantas y animales (Rani et al., 2014; Singh et al., 2016; Singhania et al., 2013). Así mismo, los microorganismos que las producen, son los más estudiados en las aplicaciones biotecnológicas debido a su rápido crecimiento, fácil cultivo y manipulación genética (Oliart-Ros et al., 2016). Además, los microorganismos son una fuente importante de enzimas con resistencia a diferentes rangos

de pH, temperatura, concentraciones de etanol, glucosa y otros factores importantes a nivel industrial (Atalah et al., 2019; Omardien, 2013; Rani et al., 2014).

Las β -D-glucosidasas pueden tener varias iso-formas en una misma cepa bacteriana o de levadura, donde generalmente una es la que presenta la mayor actividad (Bonfá et al., 2018; Tiwari et al., 2013); la iso-forma con mayor actividad de acuerdo a sus características químicas puede estar distribuida en el área intracelular, extracelular o estar unidas a la pared celular (Moreno et al., 2013; Mouro, 2012; Omardien, 2013; Zhao et al. 2020). La expresión de las diferentes iso-formas de β -D-glucosidasas dependerá de las condiciones del medio y de la fuente de carbono disponible; sin embargo, se requiere de más investigación para comprender sus mecanismos de regulación (Bonfá et al., 2018; Singhanía et al., 2013).

Estas enzimas han generado gran interés en diferentes campos de la industria biotecnológica (Singh et al., 2016). Por citar algunos ejemplos, en la producción de biocombustibles, industria de alimentos, liberación de componentes antioxidantes, mejoramiento de la calidad organoléptica de vinos, tés, bebidas de frutas, desintoxicación de algunos alimentos, uso para síntesis de nuevos β -D-glucósidos, entre otros (Ahmed et al., 2017; Beitel & Knob, 2013; Hayek et al., 2013; Lu et al., 2013; Rani & Dev, 2016). Por lo tanto, debido a su relevancia en el campo de la biotecnología industrial y a nivel comercial, se ha incentivado su investigación y el mejoramiento de su producción (Coutinho et al., 2018; Liu et al., 2012).

2.4. Identificación molecular de bacterias y levaduras

Para el estudio de la composición de la comunidad bacteriana de diversos ambientes, se ha utilizado ampliamente el gen que codifica para la subunidad menor del ácido ribonucleico ribosómico (ARNr 16S), debido a que este gen es suficientemente informativo y además millones de secuencias están disponibles en bases de datos que son de acceso público (Numberger et al., 2019; Yarza et al., 2014). El gen ARNr 16S consiste en aproximadamente 1540 pb y se divide en nueve regiones hipervariables (V_1 - V_9) flanqueadas por regiones conservadas que permiten usar primers universales para su amplificación (Chaudhary et al., 2015; Earl et al., 2018).

Las regiones V_4 , V_5 y V_6 son las que se han identificado recientemente como las más variables y por lo tanto de mayor importancia en la taxonomía molecular de bacterias (Yang

et al., 2016); sin embargo, en otros estudios realizados en bacterias, se han empleado las regiones V_3 y V_4 o V_1 y V_2 (Guo et al., 2013; Mizrahi-Man, 2013; Połka, 2015; Teng et al., 2018).

En la identificación de levaduras se usan las regiones de los Espaciadores de Transcritos Internos 1 y 2 (ITS, por sus siglas en inglés) ubicadas en los extremos del gen nuclear ARNr 5.8S de las células eucariotas y entre los genes de ARNr 18S y 28S (Purahong et al., 2019; White et al., 2013). La alta variabilidad de las regiones ITS, facil ampliación y secuenciación permiten su uso para realizar análisis de filogenia en los hongos y otros grupos de eucariotas; además, al ser universal en los hongos y con buena resolución a nivel de especie se ha propuesto como un código de barras genético en el estudio de comunidades fúngicas (Bengtsson-Palme et al., 2013; Li et al., 2020; Mowna Sundari et al. 2018; Sundari et al., 2018; Zhu et al. 2018).

Algunos modelos matemáticos usados en el análisis de taxonomía molecular en bacterias y levaduras son Filogenia de Inferencia Bayesiana (FIB), Máxima-verosimilitud (ML, por sus siglas en inglés) (Spang et al., 2015; Wang et al., 2015), prueba de razón de verosimilitud aproximada con la corrección no paramétrica de Shimodaira–Hasegawa (SH-aLRT, por sus siglas en inglés) (Guindon et al., 2010) y otros (Kapli et al., 2020). Los algoritmos FIB y ML han sido utilizados en el análisis filogenético con secuencias del ARNr 16S provenientes de bacterias (Galal et al., 2020; Ybanez et al., 2014) y en secuencias de las regiones ITS obtenidas en hongos (Benedetti, 2014; Ellingham et al., 2019).

3. Marco metodológico

3.1 Sitios de recolecta de muestras

Las cápsulas del híbrido de Costa Rica (*V. pompona* x *V. planifolia*) x *V. planifolia*) se recolectaron en un cultivo agroforestal ubicado en Horquetas de Sarapiquí, Heredia (10°24'06.10" N y 83°59'27.07" W) (Figura 4A), con una altura de 80.0 m.s.n.m. El sitio se caracteriza por tener una temperatura media anual de 25 °C y una precipitación media anual de 4860 mm (Solano & Villalobos, 2000). Las muestras de *V. planifolia* se recolectaron en una plantación ubicada dentro el área marítimo terrestre en Barra Parísmina de Siquirres, Limón (10°16'57.06" N y 83°19'50.54" W) (Figura 4B), con una altura de 6.0 m.s.n.m. El sitio posee una temperatura media anual de 25 °C y una precipitación media anual de 3844 mm (Solano & Villalobos, 2000). La zona de muestreo para *V. pompona*, correspondió a una plantación agroforestal (Finca Osa Verde) ubicada en Fila Nance de Sierpe, Puntarenas (8°40'1.34" N y 83°33'46.31" W) (Figura 4C), la zona se caracteriza por una temperatura media anual de 27 °C y una precipitación media anual de 4282 mm (Solano & Villalobos, 2000), con una altura de 190.0 m.s.n.m.

Los tres sitios de muestreo se caracterizan por tener una zona de vida perteneciente a un bosque muy húmedo tropical, según la clasificación de Holdridge (Bolaños et al., 2005) y en base a la clasificación de Köppen-Geiger, poseen un clima de bosque lluvioso tropical (Esquivel-Hernández, 2018). De acuerdo a la Base de Referencia Mundial del Recurso Suelo (WRS, por sus siglas en inglés), la plantación del híbrido de Costa Rica está ubicado en suelo stagnosol, la *V. planifolia* se encuentra en suelos de tipo letisoles y la *V. pompona* está sobre suelos alisoles (Mata-Chinchilla et al., 2012).

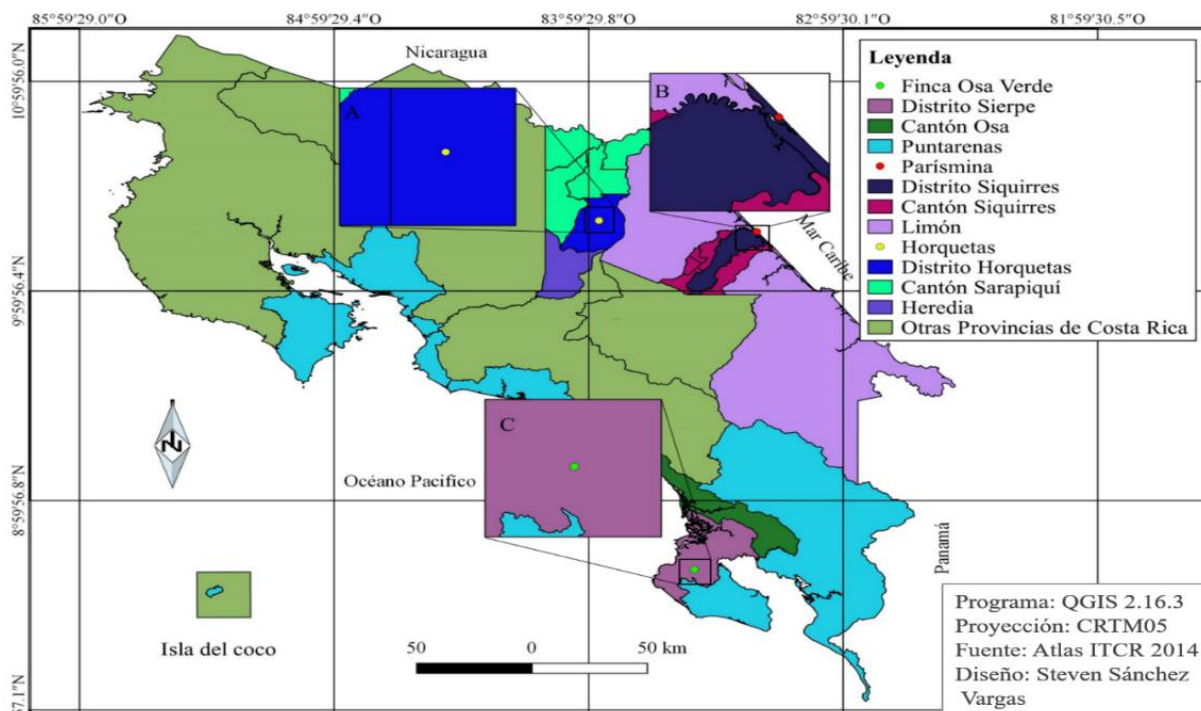


Figura 4. Sitios de recolectas de muestras de híbrido de Costa Rica, *V. planifolia* y *V. pompona*. A) Zona de muestreo de híbrido de Costa Rica, Horquetas de Sarapiquí; B) Zona de muestreo de *V. planifolia*, Parísmina, Siquirres; C) Zona de muestreo de *V. pompona*, Finca Osa Verde, Sierpe.

3.2 Recolecta de muestras

De cada especie (*V. pompona* y *V. planifolia*) e híbrido de Costa Rica se seleccionó cinco plantas al azar y de cada planta se recolectó al azar una cápsula fisiológicamente madura (caracterizadas por la presencia de una tonalidad verde amarilla opaca en el ápice de la cápsula, el cual es un indicativo cualitativo del proceso de maduración y que ocurre aproximadamente entre los seis y nueve meses de edad) (Saldívar-Iglesias, 2015). Las cápsulas, se colocaron por separado en bolsas estériles y se transportaron a temperatura ambiente (Redford et al., 2010) al Centro Nacional de Innovaciones Biotecnológicas (CENIBiot) en Pavas, San José; donde se almacenaron a 4 °C para el posterior aislamiento de microorganismos en el Laboratorio de Microorganismos.

3.3 Aislamiento de microorganismos

3.3.1. Aislamiento de bacterias

Para el aislamiento de microorganismos se usó la metodología empleada por General et al. (2009) con algunas modificaciones. Por cada cápsula, se realizó un hisopado de la parte externa e interna (bajo condiciones estériles) y el hisopo se colocó en 15 mL de Caldo

Tripticasa de Soya (CTS) por 24 h a 30 °C y 150 rpm. Después de la incubación se realizaron diluciones seriadas (10^{-1} - 10^{-9}) en solución salina al 0.7% y a partir de las diluciones de 10^{-4} - 10^{-9} se tomaron alícuotas de 20 μ L y se sembraron en placas de Agar Tripticasa de Soya (TSA); las cuales se incubaron por 48 h a 30 °C. Para obtener cultivos puros bacterianos se realizó tres rayados a partir del aislamiento inicial. Los cultivos puros fueron almacenados en ultra-congelación a -80 °C en el ultracongelador New Brunswick Innova U725 (Eppendorf, Hamburgo, Alemania) empleando una solución con glicerol al 15% en tubos de microcentrífuga (Eppendorf, Hamburgo, Alemania).

3.3.2. Aislamiento de levaduras

Para el aislamiento de levaduras se siguió el mismo procedimiento descrito previamente con bacterias, variando los medios de cultivo y el período de incubación. Se usó Caldo Sabouraud Dextrosa (CSD) para el pre-enriquecimiento y para el sembrado de las alícuotas se usó placas de Agar Sabouraud Dextrosa (SDA). La incubación de los aislamientos en medios líquidos se realizó durante tres días a 150 rpm y 30 °C y las placas se incubaron a 30 °C durante cuatro días. A los medios de SDA y CSD se le agregó estreptomycin a una concentración de 12 μ g/mL para disminuir la carga bacteriana mediante la inhibición del crecimiento de las bacterias Gram negativas (Roushani et al., 2018). Para obtener cultivos puros de levaduras se realizó tres rayados a partir del aislamiento inicial. Los cultivos puros fueron almacenados en ultra-congelación a -80 °C empleando una solución con glicerol al 15% en tubos de microcentrífuga (Eppendorf, Hamburgo, Alemania).

3.4 Clasificación inicial de los microorganismos aislados

Los aislamientos crecidos sobre el agar se observaron al estereoscopio Motic SMZ 168-BL (Motic, Hong Kong, China) para diferenciar entre las morfologías de las colonias obtenidas. Se hizo uso del microscopio óptico Motic BA310 (Motic, Hong Kong, China) para diferenciar por tamaño las bacterias de las levaduras. Además, en el caso de bacterias, se empleó la técnica de tinción de Gram (López-Jácome et al., 2014) para distinguir y clasificar los aislamientos en Gram positivas o Gram negativas.

3.5 Secuenciación de ADN para identificación de microorganismos aislados

3.5.1. Extracción de ADN genómico

Las bacterias se inocularon en Caldo Lisogénico (LB, por sus siglas en inglés) y las levaduras en CSD. Los inóculos se incubaron a 30 °C, 150 rpm, durante 24 horas y 48 horas respectivamente. Después de la incubación se tomó una alícuota de 1 mL y se centrifugó a 15000 rpm por 2 min. Para la extracción de ADN, se realizó una lisis celular basada en altas temperaturas (Queipo-Ortuño et al., 2008), con algunas modificaciones, el precipitado de células se re-suspendió en agua ultra-pura (Sigma-Aldrich, Misuri, USA), se incubó en baño maría a 100 °C por 10 min, se centrifugó a 15000 rpm por 5 min y el sobrenadante se utilizó como ADN molde para realizar la PCR.

3.5.2. Amplificación del gen ARNr 16S en bacterias y las regiones ITS en levaduras

El ADN bacteriano se utilizó para amplificar el gen ARNr 16S con los primers universales 27f y 1492r (Cuadro 1), y las condiciones de termociclado correspondieron a las utilizadas por Frank et al. (2008) (Cuadro 2).

Gen	Primer	Secuencia	Referencia
ARNr 16S	27f	5' AGAGTTTGATCMTGGCTCAG 3'	Frank et al. 2008
	1492r	5' TACCTTGTTACGACTT 3'	
ITS	ITS1	5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3'	White et al. 1990
	ITS4	5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3'	

El ADN genómico de levaduras se utilizó para amplificar las regiones ITS1, ARNr 5.8S e ITS2 mediante los primers ITS-1 e ITS-4 (Cuadro 1) (White et al., 1990) y las condiciones de termociclado para amplificar los ITS correspondieron a las usadas por Omardien, (2013) (Cuadro 2).

Ciclo	ARNr 16S		ITS		Número de ciclos
	Temperatura	Tiempo	Temperatura	Tiempo	
Desnaturalización inicial	94 °C	5 m*	94 °C	5 m	1
Desnaturalización	94 °C	30 s ⁺	94 °C	30 s	
Hibridación	48 °C	30 s	53 °C	30 s	35
Extensión	72 °C	1 m	72 °C	2 m	
Extensión final	72 °C	5 m	72 °C	5 m	1

* m = minutos

⁺ s = segundos

Los productos de PCR se secuenciaron directamente mediante el método de Sanger (Sanger et al., 1978), en el Laboratorio de Genómica y Biología Molecular del CENIBiot, con el analizador genético ABI Prism 3100 (Applied Biosystems, California, USA) y en la casa comercial Macrogen Inc. (Seul, Korea del Sur). La edición de secuencias se realizó con el programa bioinformático Geneious 8.1.6 (Kearse et al., 2012).

3.6 Asignación taxonómica a los microorganismos aislados

La asignación taxonómica se realizó mediante el algoritmo IDTAXA (Murali et al., 2018) y la generación de los gráficos se realizó en la consola de R (R Core Team, 2020) mediante el paquete DECIPHER (Wright, 2016). Para las secuencias ARNr 16S, se usó la Base de Datos Ribosomal (RDP, por sus siglas en inglés) (Wang et al., 2007) y para las regiones ITS se usó la base de datos UNITE (Nilsson et al., 2019). Para ambos análisis se usó un intervalo de confianza del 60%.

También se empleó la metodología usada por Arbefeville y otros (2017) para asignar algún nivel taxonómico a las secuencias ITS. De acuerdo a su similitud con secuencias de la base *Mycobank* (Crous et al., 2004); donde una similitud mayor al 99% se asigna género y especie, una similitud entre 93% y 98.9% se asigna género y una similitud menor al 93% no se puede identificar, además las secuencias deben tener una cobertura del ITS mayor al 75% (datos mostrados junto a los datos de actividad enzimática).

3.7 Determinación de la abundancia relativa de los microorganismos aislados

Se realizó una búsqueda de secuencias similares mediante la Herramienta Básica de Alineamiento Local para nucleótidos (BLASTn, por sus siglas en inglés) (Madden, 2013), en las bases de datos no redundantes del Centro Nacional de Información en Biotecnología (NCBI, por sus siglas en inglés) para las secuencias ARNr 16S e ITS (O'Leary, et al., 2016). La abundancia relativa para las cápsulas de las especies comerciales de *Vanilla* e híbrido de Costa Rica se determinaron a nivel de familia y se graficaron en Microsoft Excel 2013 (Microsoft Corporation, 2013).

3.8 Identificación de la actividad β -D-glucosidasa

3.8.1. Identificación de la actividad β -D-glucosidasa bacteriana

Se utilizó agar LB más arbutina 1.0 g/L (Chen et al., 2015^a; Mattéotti et al., 2011) y agar LB más esculina a 1.0 g/L, ambos suplementados con citrato de amonio férrico al 0.05%

(Perry et al., 2007). Además, se utilizó agar celobiosa cuya composición se detalla a continuación: celobiosa 4.0 g/L (Bohra, 2011), medio M9: Na₂HPO₄ 7H₂O 12.8 g/L, KH₂PO₄ 3.0 g/L, NaCl 0.5 g/L, NH₄Cl 1.0 g/L, 2.0 mM MgSO₄ y 0.1 mM CaCl₂ (Sekar et al., 2012) y agar 15.0 g/L (Liu et al., 2009).

Las cepas bacterianas se crecieron en caldo LB a 30 °C, 150 rpm, durante 24 horas para la obtención de un inóculo. Del inóculo, se tomaron y se inocularon tres alícuotas de 20 µL de acuerdo a la Figura 5, en placas de LB con arbutina, LB con esculina y M9 con celobiosa, las placas inoculadas se incubaron por 48 horas a 30 °C. La actividad glucosidasa en arbutina y esculina se determinó mediante la formación de halos oscuros alrededor de la colonia (Chen et al., 2015^a); mientras que la actividad glucosidasa en celobiosa se determinó por el crecimiento o no crecimiento de colonias bacterianas (Bohra, 2011).

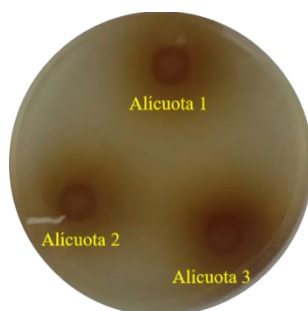


Figura 5. Pruebas en placas con agar para determinar la actividad β -D-glucosidasa

El control positivo correspondió a una cepa de *B. liqueniformis* ATCC 14580 (Chen et al., 2017; Rey et al., 2004) y el control negativo a una cepa de *E. coli* BL21. Además, la actividad enzimática se categorizó cualitativamente desde ninguna (-) a alta (+++) (Arroyo et al., 2010; Daenen et al., 2008; Fia et al., 2005) como se observa en la Figura 6.

		Categorización de actividad enzimática					
		Ninguna (-)	Baja (+)	Media (++)	Alta (+++)		
Sustratos	Arbutina		 34*		 40*	Cambio de coloración	Indicador de actividad enzimática
	Esculina		 40*		 97*		
	Celobiosa		 26*		 211*	Crecimiento	

Figura 6. Categorización de la actividad enzimática en bacterias aisladas de las cápsulas del híbrido de Costa Rica, *V. planifolia* y *V. pompona*. *Número que corresponde al aislamiento.

3.8.2. Identificación de la actividad β -D-glucosidasa en levaduras

En la identificación de la actividad β -D-glucosidasa en levaduras, se utilizó un medio glicerol compuesto por: caseína hidrolizada 1.0 g/L, extracto de levadura 25.0 g/L, glicerol 8.0 mL/L, cloruro férrico 0.3 g/L, arbutina (MEGA) o esculina (MEGE) 3.0 g/L, agar 20.0 g/L y pH 6.0. Como control positivo se usó la cepa de *Kluyveromyces marxianus* DSM 5418 (Pérez et al. 2011; Yoshida et al., 2010).

Los aislamientos de levaduras se inocularon en caldo glicerol (sin arbutina o esculina) por tres días a 30 °C y 150 rpm para generar un inóculo. Del inóculo, se tomaron tres alícuotas de 20 μ l y se sembraron de acuerdo a la Figura 5, en placas de MEGE y MEGA. Las placas inoculadas, se incubaron por tres días a 30 °C y la actividad β -D-glucosidasa se determinó por la presencia de halos oscuros alrededor de la colonia (Hernández et al., 2003). Para la clasificación de actividad β -D-glucosidasa en levadura se usó la misma metodología empleada en bacterias (Arroyo et al., 2010; Daenen et al., 2008; Fia et al. 2005) (Figura 7).







		Categorización de actividad enzimática				
		Baja (+)	Media (++)	Alta (+++)		
Sustratos	Arbutina				Cambio de coloración	Indicador de actividad enzimática
	Esculina					

Figura 7. Categorización de la actividad enzimática en levaduras aisladas de las cápsulas del híbrido de Costa Rica, *V. planifolia* y *V. pompona*. *Número que corresponde al aislamiento.

3.9 Análisis de filogenia molecular del gen ARNr 16S y regiones ITS

Las secuencias del ARNr 16S y las regiones ITS se agruparon por filos, las secuencias con similitud mayor al 98.9% en los diferentes filos se eliminaron con el programa *USEARCH 10.0.240* (Edgar, 2010) y las secuencias espurias se eliminaron del alineamiento (sin los grupos externos) con valor del 75% mediante el programa *Trimal V1.2* (Capella-Gutiérrez et al., 2009). Además, por cada filo se creó un grupo externo (Cuadro 3) y se realizó un alineamiento con el complemento del alineador *MUSCLE* (Edgar, 2004) dentro del programa *Geneious 8.1.6* (Kearse et al., 2012). Las columnas con poca consistencia dentro el alineamiento generado por *MUSCLE* fueron eliminadas de forma automatizada con el programa *Trimal V1.2* (Capella-Gutiérrez et al., 2009).

Cuadro 3. Grupos externos usados en los diferentes filos de microorganismos aislados en las cápsulas de híbrido de Costa Rica, *V. planifolia* y *V. pompona*

Súper reino	Filo	Grupo Externo
Bacterias	Actinobacteria	<i>Clavibacter</i> y <i>Rathayibacter</i>
	Firmicutes	<i>Erwinia</i> y <i>Sphingomonas</i>
	Proteobacteria	<i>Bacillus</i> y <i>Paenibacillus</i>
Eucariota	Ascomycota	<i>Hannaella</i> y <i>Tremella</i>
	Basidiomycota	<i>Candida</i> , <i>Schwanniomyces</i> y <i>Meyerozyma</i>

El modelo de sustitución nucleotídica de mejor ajuste por cada alineamiento de acuerdo con el criterio Bayesiano (Cuadro 4), se determinó en el programa *IQ-TREE V2.1.2* (Nguyen

et al., 2015). En el servidor *CIPRES Science Gateway* V.3.3 (Miller et al., 2010), por cada filo se corrió un análisis de SH-aLRT con 10000 réplicas (Guindon et al., 2010) y un análisis de aproximación *Ultrafast Bootstrap* (UFBoot, por sus siglas en inglés) con 2100 millones de interacciones y un criterio de convergencia del 0.99 (Minh et al., 2013) en el programa *IQ-TREE V2.1.2* (Nguyen et al., 2015). Igualmente, en *CIPRES Science Gateway* V.3.3, se corrieron por cada alineamiento dos análisis en paralelo de FIB, empleando el método de Monte Carlo basado en la Cadena de Markov (MCMC) (Yang & Rannala, 1997), con 49 millones de generaciones y una convergencia menor a 0.05 en el programa *Exabayes* V.1.5 (Aberer et al., 2014).

Cuadro 4. Modelos de sustitución nucleotídica por cada filo, de acuerdo con el criterio Bayesiano		
Súper reino	Filo	Modelo
Bacterias	Actinobacteria	TN+F+I
	Firmicutes	TIM3e+R10
	Proteobacteria	GTR+F+R10
Eucariota	Ascomycota	TVM+F+I+G4
	Basidiomycota	TIM2+F+I+G4

Los árboles filogenéticos obtenidos de los diferentes análisis se combinaron y truncaron en el editor de árboles *TreeGraph2* (Stöver & Müller, 2010) para mostrar los clados donde se identificaron aislamientos con actividad β -D-glucosidasa. En los árboles finales, los valores de soportes en los diferentes análisis de filogenia se ordenaron de la siguiente manera SH-aLRT/UFBoot y FIB; además, se consideraron nodos con buen soporte aquellos con valores de SH-aLRT/ UFBoot iguales o superiores a 80/95 o que el soporte de FIB fuera igual o mayor a 0.95 (Huelsenbeck & Ronquist, 2001; Nguyen et al., 2015).

Los árboles originales se adjuntan en el presente documento como un archivo por aparte en formato TIFF. Los archivos de los árboles filogenéticos se adjuntan de la siguiente manera: filo Actinobacteria (*Actinobacteri_Árbol_Filogenético_Original*), filo Firmicutes (*Firmicutes_Árbol_Filogenético_Original*), filo Proteobacteria (*Proteobacteria_Árbol_Filogenético_Original*), filo Ascomycota (*Ascomycota_Árbol_Filogenético_Original*) y filo Basidiomycota (*Basidiomycota_Árbol_Filogenético_Original*).

4. Resultados

4.1 Aislamiento de microorganismos

Se lograron aislar un total de 111 microorganismos a partir de las cápsulas del híbrido de Costa Rica y las dos especies comerciales de *Vanilla* estudiadas. El análisis morfológico permitió clasificar cerca de un 69% de esos aislamientos como bacterias. El mayor y menor número de microorganismos aislados se dio en las cápsulas de *V. pompona* y el híbrido de Costa Rica, respectivamente (Cuadro 5).

Cuadro 5. Número de aislamientos de microorganismos en el híbrido de Costa Rica, *V. planifolia* y *V. pompona*

Especie	Bacterias	Levaduras	Total
híbrido de Costa Rica	17	8	25
<i>V. planifolia</i>	24	12	36
<i>V. pompona</i>	33	17	50
Total	74	37	111
Porcentaje (%)	69.3	30.6	100

4.2 Asignación taxonómica a los microorganismos aislados

Luego de la secuenciación de ADN y la asignación taxonómica de los aislamientos con el algoritmo IDTAXA, se logró determinar que las bacterias se distribuyeron en tres filos, donde el 59 % de las secuencias fueron clasificadas dentro del filo Proteobacteria (Figura 8). Dentro de este filo, el grupo “Enterobacteriaceae no clasificadas” fue el de mayor presencia, representado por un 23% de las secuencias (Figura 8). Por otra parte, las secuencias obtenidas de los aislamientos de las levaduras se distribuyeron en dos filos, siendo Basidiomycota el de mayor representación con un 77% de las secuencias, donde el género *Papiliotrema* sp. obtuvo el 54% de las secuencias (Figura 8).

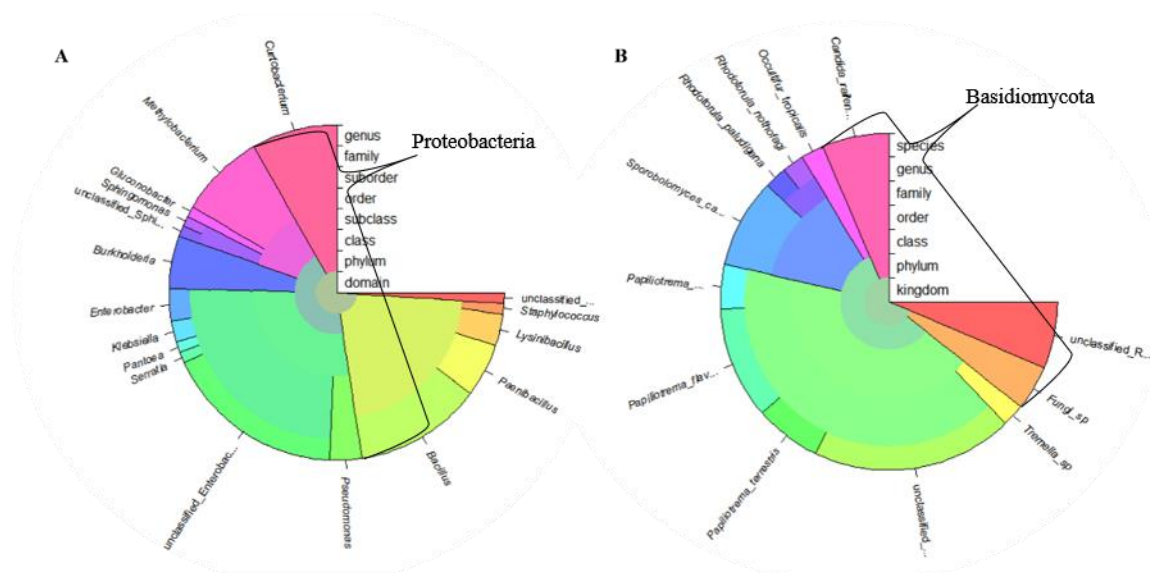


Figura 8. Asignación taxonómica a los microorganismos aislados en las cápsulas de híbrido de Costa Rica, *V. planifolia* y *V. pompona*. A) Asignación taxonómica a los aislamientos de bacterias. B) Asignación taxonómica a los aislamientos de levaduras.

4.3 Determinación de la abundancia relativa de los microorganismos

Respecto a la abundancia relativa de las bacterias aisladas se observó que, a nivel de familia, el híbrido de Costa Rica mostró una baja diversidad bacteriana, siendo Bacillaceae la más abundante, mientras que en *V. planifolia* las familias Methylobacteriaceae y Bacillaceae presentaron la mayor abundancia (Figura 9). Además, las cápsulas de *V. pompona* presentaron la mayor diversidad a nivel de familia, donde los grupos Enterobacteriaceae y Erwiniaceae fueron los más abundantes (Figura 9).

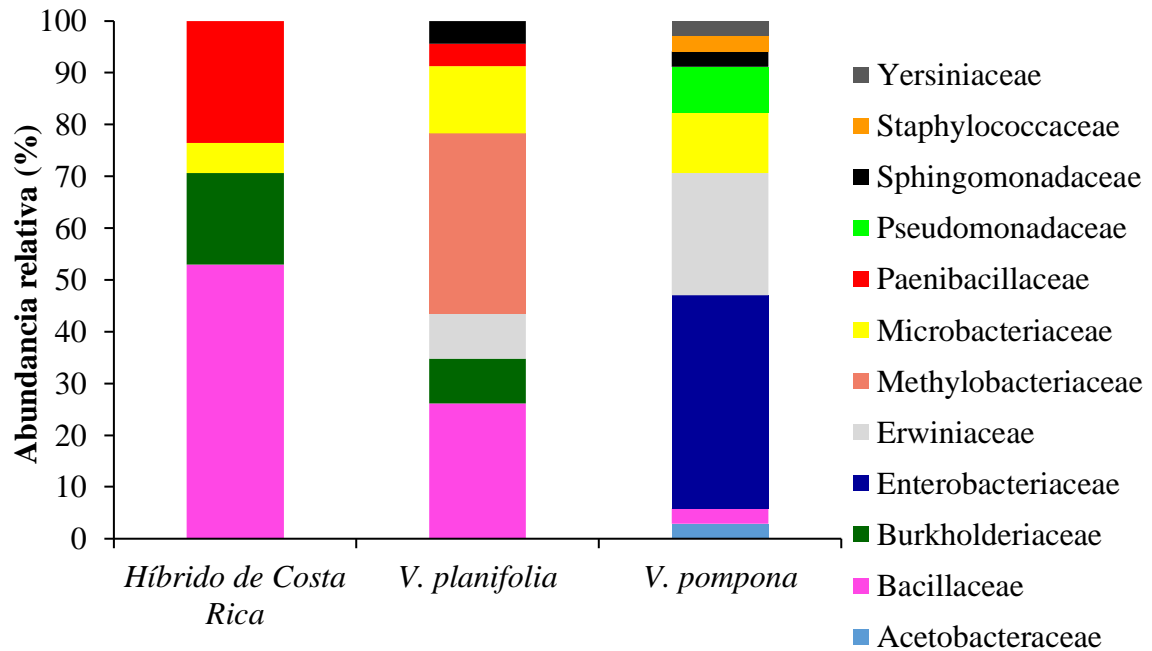


Figura 9. Abundancia relativa de familias bacterianas aisladas de cápsulas del híbrido de Costa Rica, *V. planifolia* y *V. pompona*.

La diversidad de levaduras se comportó similar a la diversidad bacteriana; ya que las cápsulas del híbrido de Costa Rica presentaron la menor diversidad y *V. pompona* fue la que presentó la mayor diversidad (Figura 10). Las familias con mayor abundancia fueron Sporidiobolaceae y Cryptococcaceae en híbrido de Costa Rica, Cryptococcaceae y Rhynchogastrematacea en *V. planifolia* y Saccharomycetidae en *V. pompona* (Figura 10).

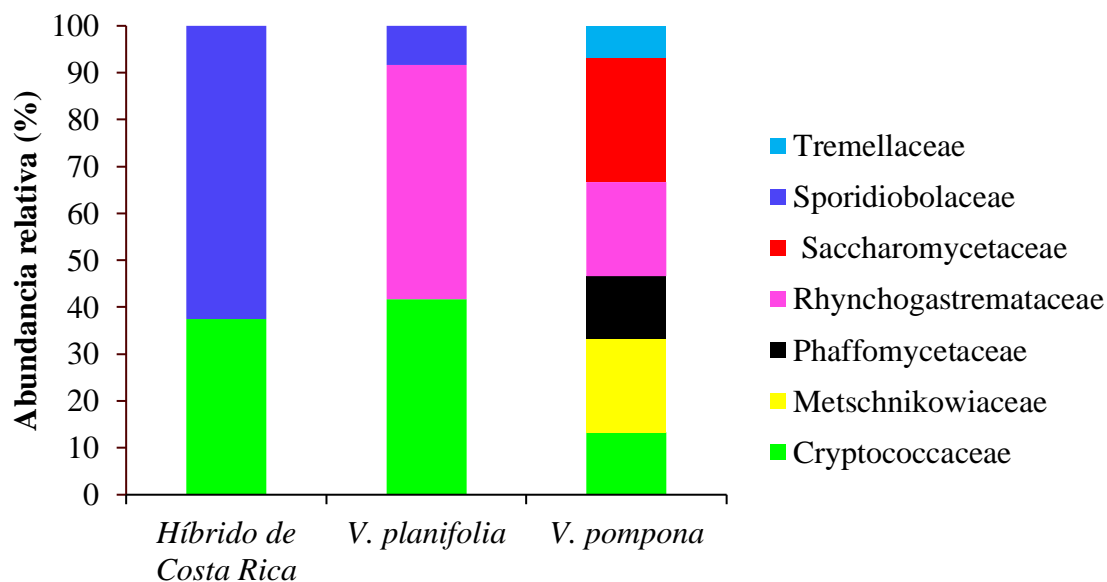


Figura 10. Abundancia relativa de familias de levaduras aisladas de cápsulas del híbrido de Costa Rica, *V. planifolia* y *V. pompona*.

4.4 Identificación de la actividad β -D-glucosidasa en bacterias

En cuanto a la identificación de la actividad enzimática sobre los sustratos arbutina, esculina y celobiosa, se obtuvieron 18 aislamientos bacterianos que presentaron actividad β -D-glucosidasa de media a alta en al menos dos de los tres sustratos. Además, se obtuvieron dos aislamientos (*Híbrido_41* y *V_planifolia_97*) que solo presentaron una alta actividad en el sustrato arbutina y esculina, respectivamente (Cuadro 6).

Por otra parte, el filo Proteobacteria fue el que presentó el mayor número de aislamientos con actividad β -D-glucosidasa (Cuadro 6). El grupo *Enterobacter*, fue el que presentó el mayor número de aislamientos con actividad β -D-glucosidasa dentro de las Proteobacterias (Cuadro 6). Además, la especie *V. pompona* fue la que presentó el mayor número de géneros bacterianos con actividad β -D-glucosidasa (Cuadro 6).

Cuadro 6. Aislamientos bacterianos con mayor actividad β -D-glucosidasa en cápsulas de híbrido de Costa Rica, *V. planifolia* y *V. pompona*

Especie	Aislamiento	A ⁺	E ⁺⁺	C ⁺⁺⁺	Clasificación por filogenia	Filo
híbrido	41	+++	+	+	<i>Bacillus</i>	Firmicutes
	42	+	++	+++	<i>Paenibacillus</i>	
	61	+	++	++	<i>Bacillus</i>	
<i>V. planifolia</i>	72	+	+++	++	<i>Curtobacterium</i>	Actinobacteria
	73	+	+++	++	<i>Methylobacterium</i>	Proteobacteria
	90	+	++	++		
	97	-	+++	+	<i>Cohnella</i>	Firmicutes
<i>V. pompona</i>	162B	+	+++	+++	<i>Pantoea</i>	Proteobacteria
	165B_F	+	++	+++	Erwiniaceae	
	165C	+	++	++	<i>Klebsiella</i>	
	172	+	++	++	<i>Enterobacter</i>	
	199	+	++	++	<i>Pantoea</i>	
	200	+	++	++	<i>Enterobacter</i>	
	202A	++	++	++		
	205	+++	+	+++	Enterobacteriaceae*	
	207	+	++	++		
	208	+	+++	+++		
	211	++	++	++		
216	+	++	+	<i>Serratia</i>		
218	+	++	++	Enterobacteriaceae*		

⁺A = Arbutina

⁺⁺E = Esculina

⁺⁺⁺C = Celobiosa

*Asignación de taxón a un nivel superior al género, debido a la poca resolución del aislamiento y bajos soportes de SH-aLRT/UFBstrap y FIB a nivel de género.

4.5 Análisis de filogenia molecular del gen ARNr 16S

Para los análisis de filogenia molecular en bacterias (Figura 11-Figura 18), se realizó un SH-aLRT con 1×10^4 replicas y UFBoot con un número de generaciones menor o igual a 2.1×10^9 interacciones y con una convergencia del 0.99. Además, se realizó una FIB con dos corridas en paralelo de menor o igual a 4.9×10^7 generaciones con una desviación estándar menor a 0.05. En el caso de la Figura 11, se empleó 2×10^7 generaciones para cada análisis de UFBoot y FIB.

Los aislamientos pertenecientes al género *Curtobacterium* con una mayor actividad β -D-glucosidasa se agruparon en dos clados diferentes, donde *V. planifolia_72* formó un grupo con *V. planifolia_89* y *C. luteum* teniendo soportes de SH-aLRT/UFBoot y FIB iguales a 95/80 y 1, respectivamente (Figura 11). Por otro lado, *V. planifolia_73*, se posicionó cerca

de las especies *C. albidum* y *C. citreum*, pero con valores de SH-aLRT/UFBboot y FIB inferiores a 80/95 y 0.95 (Figura 11).

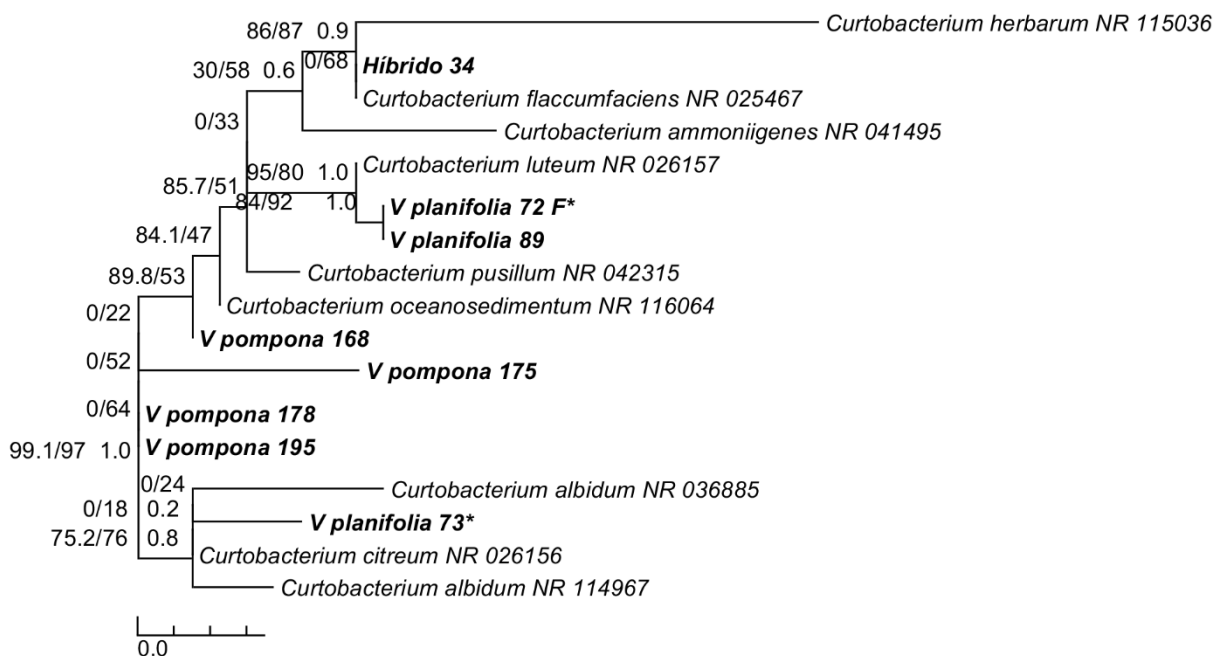


Figura 11. Árbol filogenético truncado del género *Curtobacterium* perteneciente al filo Actinobacteria. El árbol filogenético se realizó con una prueba de SH-aLRT con 1×10^4 replicas y un UFBboot con 2×10^7 replicas con una convergencia de 0.99. Además, se realizó una FIB con dos corridas en paralelo de 2×10^7 generaciones cada uno, con una desviación estándar menor a 0.01. Se muestran los valores de soporte de SH-aLRT/UFBboot y FIB, respectivamente. *Aislamientos con mayor actividad β -D-glucosidasa.

El aislamiento *V. planifolia_97_F* quedó cercano a la especie *C. thailandensis* dentro el género *Cohnella* (Figura 12). En este clado, los soportes de SH-aLRT/UFBboot y FIB fueron de 95.7/100 y 1, respectivamente (Figura 12).

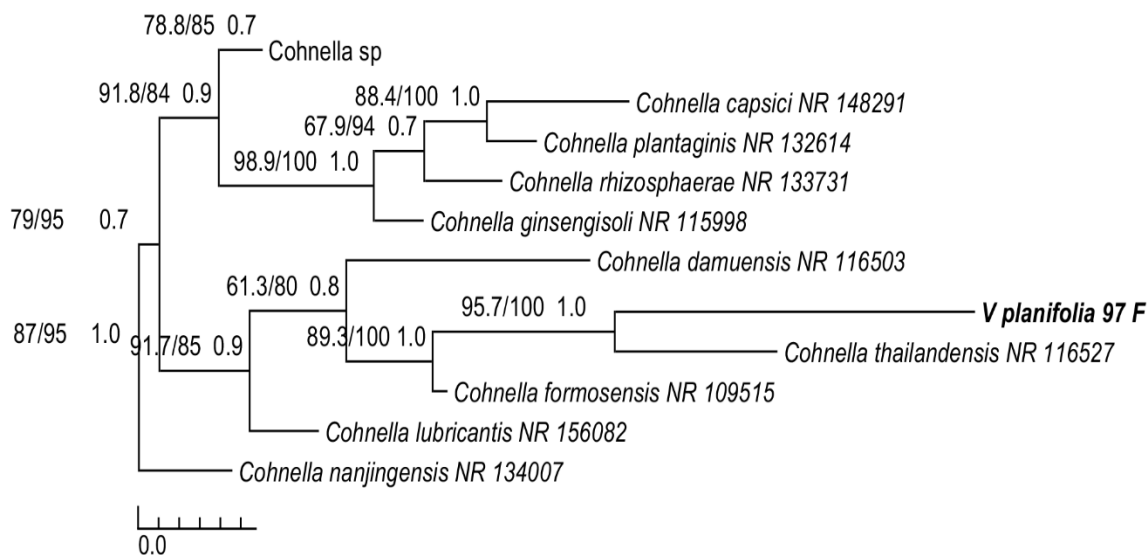


Figura 12. Árbol filogenético truncado del género *Cohnella* perteneciente al filo Firmicutes. El árbol filogenético se realizó con una prueba de SH-aLRT con 1×10^4 replicas y un UFBoot con 2.1×10^9 replicas y una convergencia de 0.99. Además, se realizó una FIB con dos corridas en paralelo de 4.9×10^7 generaciones cada uno, con una desviación estándar menor a 0.022. Se muestran los valores de soporte de SH-aLRT/UFBoot y FIB, respectivamente. Un único aislamiento con actividad β -D-glucosidasa.

En el género *Paenibacillus*, el aislamiento *Híbrido_42*, que presentó mayor actividad β -D-glucosidasa, formó un clado con las especies *P. taichungensis* y *P. pabuli* (Figura 13). En este clado, los valores de soporte para SH-aLRT/UFB y FIB fueron de 84.5/100 y 1, respectivamente (Figura 13).

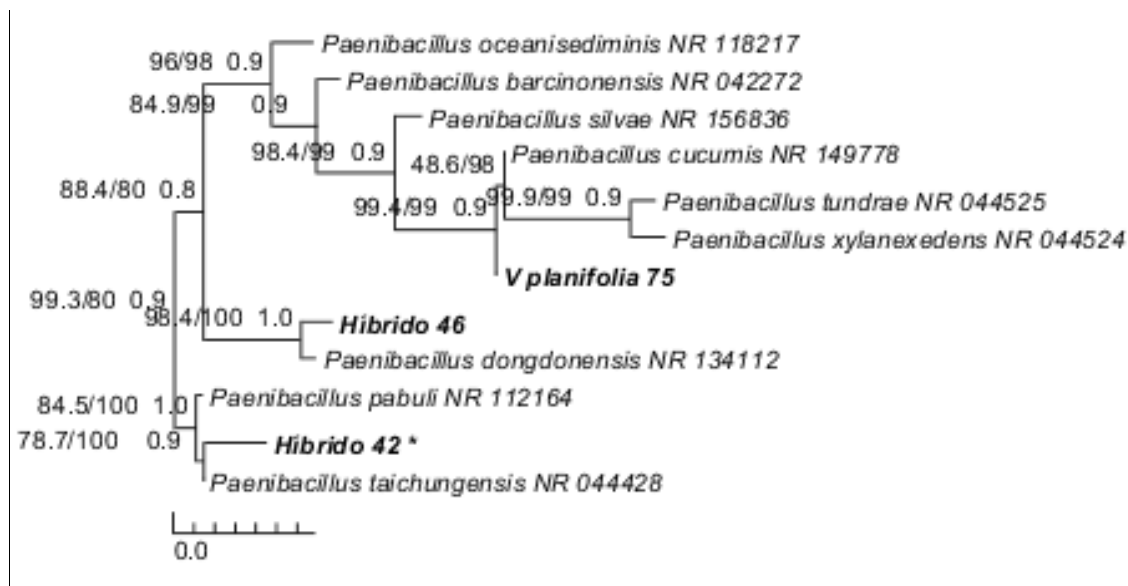


Figura 13. Árbol filogenético truncado del género *Paenibacillus* perteneciente al filo Firmicutes. El árbol filogenético se realizó con una prueba de SH-aLRT con 1×10^4 replicas y un UFBoot con 2.1×10^9 replicas y una convergencia de 0.99. Además, se realizó una FIB con dos corridas en paralelo de 4.9×10^7 generaciones cada uno, con una desviación estándar menor a 0.022. Se muestran los valores de soporte de SH-aLRT/UFBoot y FIB, respectivamente. *Aislamiento con mayor actividad β -D-glucosidasa.

En el género *Bacillus* el aislamiento *Híbrido_41* con mayor actividad β -D-glucosidasa se agrupó con las especies *B. stratosphericus* y *B. pumilus* con soportes de SH-aLRT/UFBoot iguales a 84.1/97; sin embargo, para FIB no se obtuvo ningún valor en la combinación de los árboles (Figura 14). Por otra parte, el aislamiento *Híbrido_61*, formó un clado con las especies *B. marcorestrictum*, *B. toyonensis* y con los aislamientos *V_planifolia_123*, *Híbrido_60*, *Híbrido_58*, *V_planifolia_128_F*; *Híbrido_45* y *V_planifolia_204* con un soporte de SH-aLRT/UFBoot y FIB de 78.4/98 y 0.9 respectivamente (Figura 14).

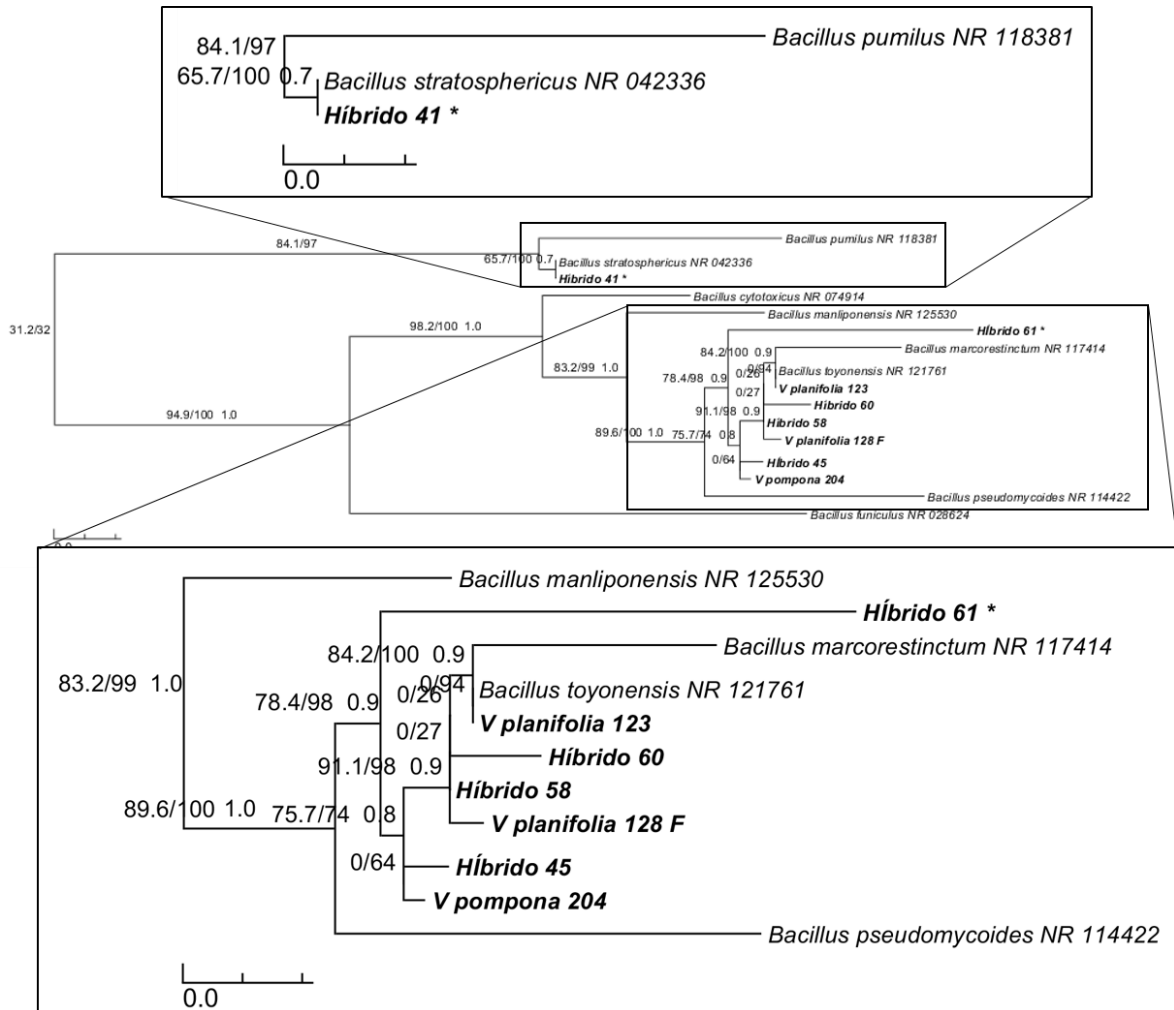


Figura 14. Árbol filogenético truncado del género *Bacillus* perteneciente al filo Firmicutes. El árbol filogenético se realizó con una prueba de SH-aLRT con 1×10^4 replicas y un UFBoot con 2.1×10^9 replicas y una convergencia de 0.99. Además, se realizó una FIB con dos corridas en paralelo de 4.9×10^7 generaciones cada uno, con una desviación estándar menor a 0.022. Se muestran los valores de soporte de SH-aLRT/UFBoot y FIB, respectivamente. *Aislamientos con mayor actividad β -D-glucosidasa.

En el género *Methylobacterium* el aislamiento *V_planifolia_90* con actividad β -D-glucosidasa media en celobiosa y esculina (Cuadro 6); formó un clado con las especies *M. aerolatum*, *M. persicinum*, *M. komagatae* y con los aislamientos *V_planifolia_114*, *V_planifolia_102*, *V_planifolia_110*, *V_plamifolia_86* y *V_planifolia_109* con un soporte de SH-aLRT/UFBoot y FIB 99.6/99 y 1, respectivamente (Figura 15).

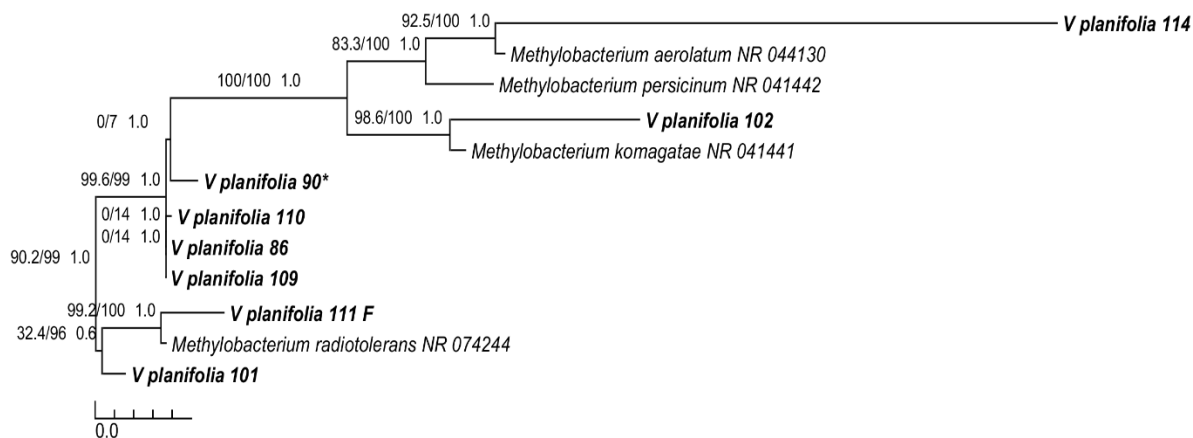


Figura 15. Árbol filogenético truncado del género *Methylobacterium* perteneciente al filo Proteobacteria. El árbol filogenético se realizó con una prueba de SH-aLRT con 1×10^4 replicas y un UFBoot con 2.1×10^9 replicas y una convergencia de 0.99. Además, se realizó una FIB con dos corridas en paralelo de 4.9×10^7 generaciones cada uno, con una desviación estándar menor a 0.05. Se muestran los valores de soporte de SH-aLRT/UFBoot y FIB, respectivamente. *Aislamientos con mayor actividad β -D-glucosidasa.

En las familias Enterobacteriaceae, Erwiniaceae y Yersiniaceae del filo Proteobacteria, no tuvieron buena resolución; ya que, en el árbol sin trincar hubieron géneros de familias diferentes (Enterobacteriaceae, Erwiniaceae o Yersiniaceae) que se agrupaban en un solo clado o géneros de una familia (Enterobacteriaceae, Erwiniaceae o Yersiniaceae) podían formar dos clados diferentes, separados entre sí por géneros de otra familia (Enterobacteriaceae, Erwiniaceae o Yersiniaceae).

El aislamiento *V_pompona_165C* con mayor actividad β -D-glucosidasa se posicionó junto al aislamiento *V_pompona_221* y a la especie *Klebsiella pneumoniae*. Este clado presentó soportes SH-aLRT/UFBoot y FIB de 84.7/100 y 1, respectivamente (Figura 16). Los aislamientos, *V_pompona_200*, *V_pompona_202A*, *V_pompona_172* que obtuvieron una actividad β -D-glucosidasa media a alta (Cuadro 6), formaron un solo grupo con los aislamientos *V_pompona_193*, *V_pompona_210*, *V_pompona_212*, el cual quedó cercano a la especie *Enterobacter bugandensis* con un valor de SH-aLRT/UFBoot y FIB de 74.9/90 y 0.5, respectivamente (Figura 16).

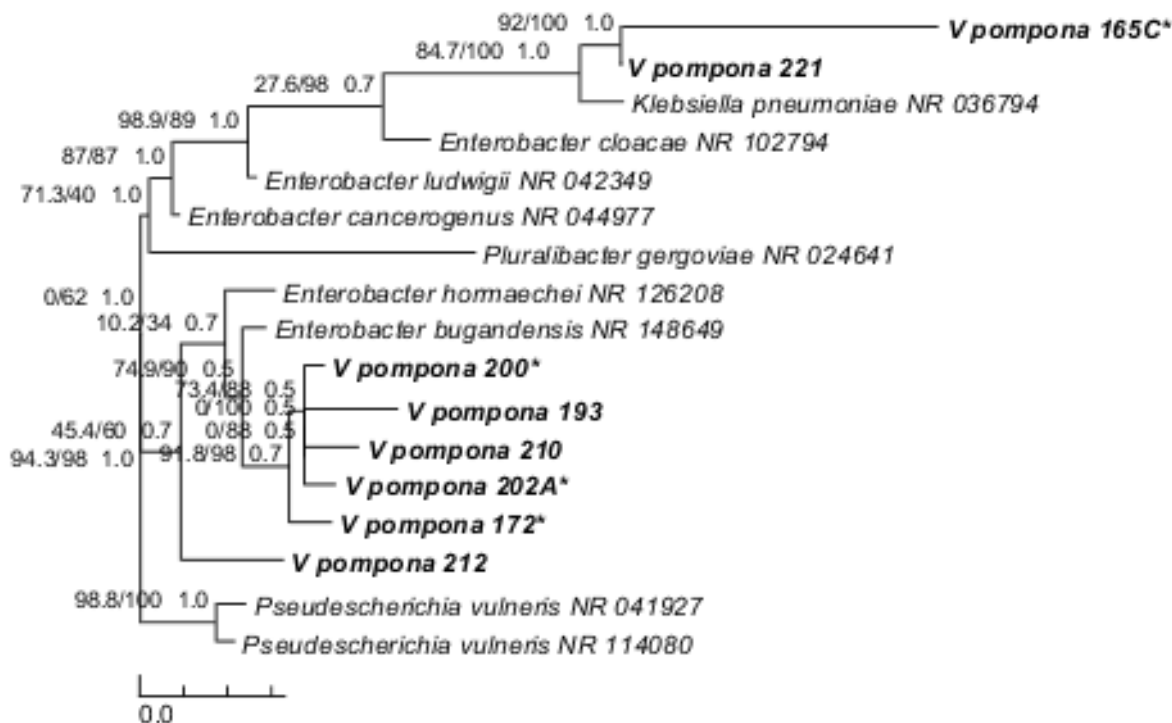


Figura 16. Árbol filogenético truncado de la familia Enterobacteriaceae perteneciente al filo Proteobacteria.

El árbol filogenético se realizó con una prueba de SH-aLRT con 1×10^4 replicas y un UFBoot con 2.1×10^9 replicas y una convergencia de 0.99. Además, se realizó una FIB con dos corridas en paralelo de 4.9×10^7 generaciones cada uno con una desviación estándar menor a 0.05. Se muestran los valores de soporte de SH-aLRT/UFBoot y FIB, respectivamente. *Aislamientos con mayor actividad β -D-glucosidasa.

Además, los aislamientos *V_pompona_162B* y *V_pompona_199* con actividad β -D-glucosidasa (Cuadro 6), formaron un grupo independiente con los aislamientos *V_pompona_203F* y *V_pompona_206*; el cual quedó cercano a un clado donde se encuentran tres especies del género *Pantoea* (Figura 17). En el caso del aislamiento *V_pompona_165B* con actividad β -D-glucosidasa media en esculina y alta en celobiosa (Cuadro 6), se posicionó junto con *V_pompona_163F* en un grupo independiente que quedó cercano a un clado con varias especies de *Erwinia*, con soportes de SH-aLRT/UFBoot y FIB de 92.3/83 y 1, respectivamente (Figura 17).

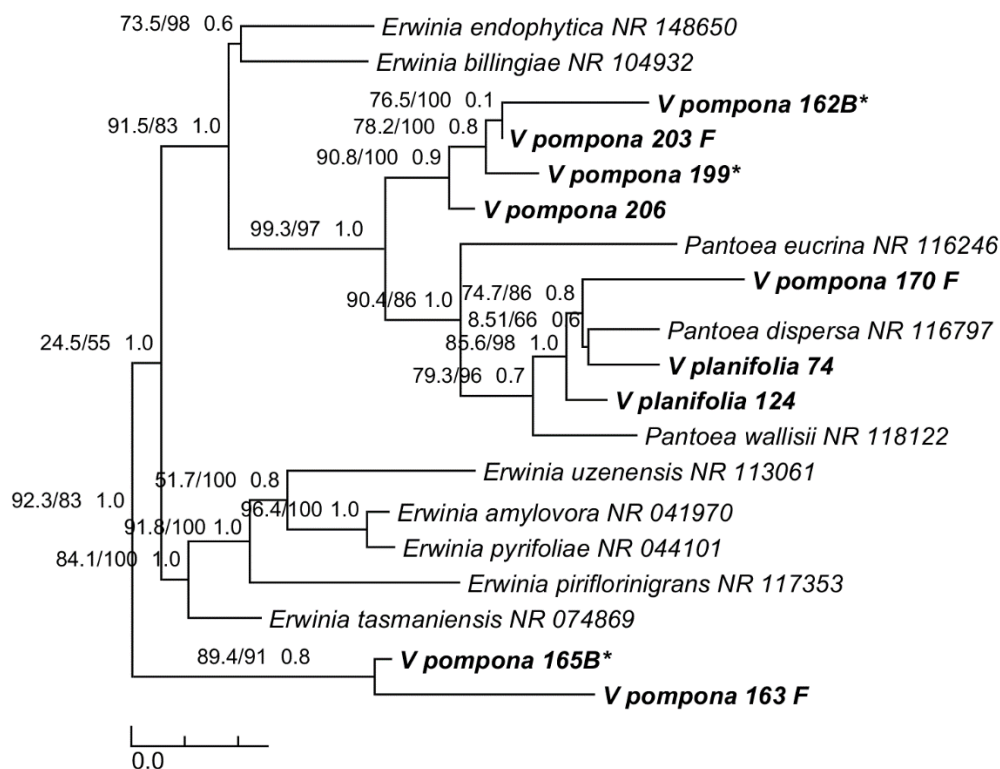


Figura 17. Árbol filogenético truncado de la familia Erwiniaceae perteneciente al filo Proteobacteria. El árbol filogenético se realizó con una prueba de SH-aLRT con 1×10^4 replicas y un UFBoot con 2.1×10^9 replicas y una convergencia de 0.99. Además, se realizó una FIB con dos corridas en paralelo de 4.9×10^7 generaciones cada uno, con una desviación estándar menor a 0.05. Se muestran los valores de soporte de SH-aLRT/UFBoot y FIB, respectivamente. *Aislamientos con mayor actividad β -D-glucosidasa.

Para los aislamientos *V_pompona_208*, *V_pompona_218*, *V_pompona_207*, *V_pompona_205* y *V_pompona_211* con mayor actividad β -D-glucosidasa (Cuadro 6), se agruparon junto con el aislamiento *V_pompona_201* y la especie *Klebsiella aerogenes* con un bajo soporte de SH-aLRT/UFBoot y un soporte de FIB mayor al 0.95, respectivamente (Figura 18); además, el aislamiento *V_pompona_216* formó un clado con tres especies del género *Serratia* y con soportes de SH-aLRT/UFBoot igual a 76.9/92 y un soporte de FIB igual a 1.0 (Figura 18).

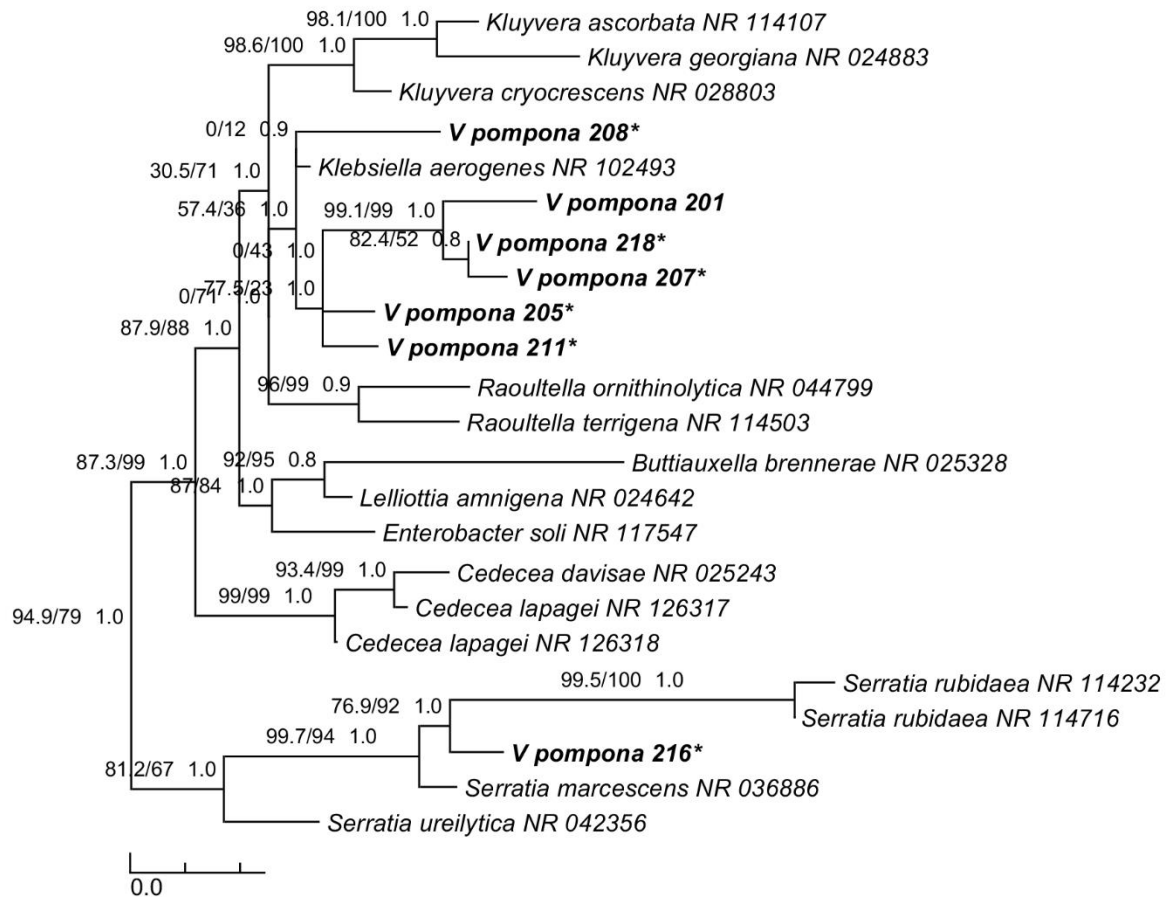


Figura 18. Árbol filogenético truncado de la familia Enterobacteriaceae y Yersiniaceae perteneciente al filo Proteobacteria. El árbol filogenético se realizó con una prueba de SH-aLRT con 1×10^4 replicas y un UFBoot con 2.1×10^9 replicas y una convergencia de 0.99. Además, se realizó una FIB con dos corridas en paralelo de 4.9×10^7 generaciones cada uno con una desviación estándar menor a 0.05. Se muestran los valores de soporte de SH-aLRT/UFBoot y FIB, respectivamente. *Aislamientos con mayor actividad β -D-glucosidasa.

4.6 Identificación de la actividad β -D-glucosidasa en levaduras

En el grupo de las levaduras, se obtuvieron siete aislamientos con actividad β -D-glucosidasa, donde seis de ellos pertenecieron al filo Basidiomycota y siendo *Papiliotrema* el género mayor representado (Cuadro 7). Por otra parte, *V. pompona* fue la especie que presentó mayor diversidad de levaduras con actividad β -D-glucosidasa. Además, el aislamiento *V_pompona_161* presentó una actividad β -D-glucosidasa sobre esculina superior a la categoría alta (Cuadro 7). La actividad β -D-glucosidasa en los aislamientos de levaduras pertenecientes al híbrido de Costa Rica, no se determinó debido a las pérdidas de células viables durante su almacenamiento en glicerol a ultrabaja temperatura.

Cuadro 7. Actividad β -D-glucosidasa en aislamientos de levaduras en cápsulas de *V. planifolia* y *V. pompona*

Especie	Aisl ^a	A ^b	E ^c	Identificación			
				Identificación*			
				Taxón	Similitud (%)	Filogenia	Filo
<i>V. planifolia</i>	103	+++	+++		100,0	Tremellales	
	138	+++	+++	<i>Papiliotrema</i>	100,0	Tremellales	Bas ^d
	146	+++	+++	<i>flavescens</i>	100,0	Tremellales	
	150	+++	+++		100,0	Tremellales	
<i>V. pompona</i>	161	+	++++	<i>Candida pseudofloscolorum</i>	99,4	Saccharomycetales	Asc ^e
	184	+++	+++	<i>Papiliotrema;</i> <i>Cryptococcus sp.</i>	98,9	Tremellales	Bas ^d
	187	+++	+++	<i>Papiliotrema flavescens</i>	100,0	Tremellales	Bas ^d

^aAisl = Aislamiento^bA = Arbutina^cE = Esculina^dBas = Basidiomycota^eAsc = Ascomycota

*Identificación de levaduras por el método empleado por Arbefeville y otros (2017)

4.7 Análisis de filogenia molecular de las regiones ITS

Para levaduras, los análisis de filogenia molecular (Figura 19-Figura 21), se realizaron empleando un SH-aLRT con 1×10^4 replicas y UFBoot con un número de generaciones igual a 2.1×10^9 interacciones y una convergencia del 0.99. En el caso de FIB, se realizó empleando dos corridas en paralelo de 4.9×10^7 generaciones con una desviación estándar menor a 0.05

En los árboles filogenéticos se obtuvo poca definición en el posicionamiento de los aislamientos *V_planifolia_150*, *V_planifolia_146*, *V_planifolia_138*, *V_pompona_187* y *V_planifolia_103*, todos con actividad β -D-glucosidasa (Cuadro 7). Estos se unieron a los aislamientos *V_planifolia_140*, *V_planifolia_144*, *V_planifolia_122*, *V_planifolia_76*, *V_planifolia_147*, *V_planifolia_136*, *V_planifolia_137*, *V_pompona_177*, *V_pompona_182*, *Híbrido_33*, *Híbrido_53* e *Híbrido_57* con valores de SH-aLRT/UFBoot y un FIB de 73.3/98 y 0.9, respectivamente (Figura 19). Además, este grupo quedó cercano al orden Tremellales (Figura 19).

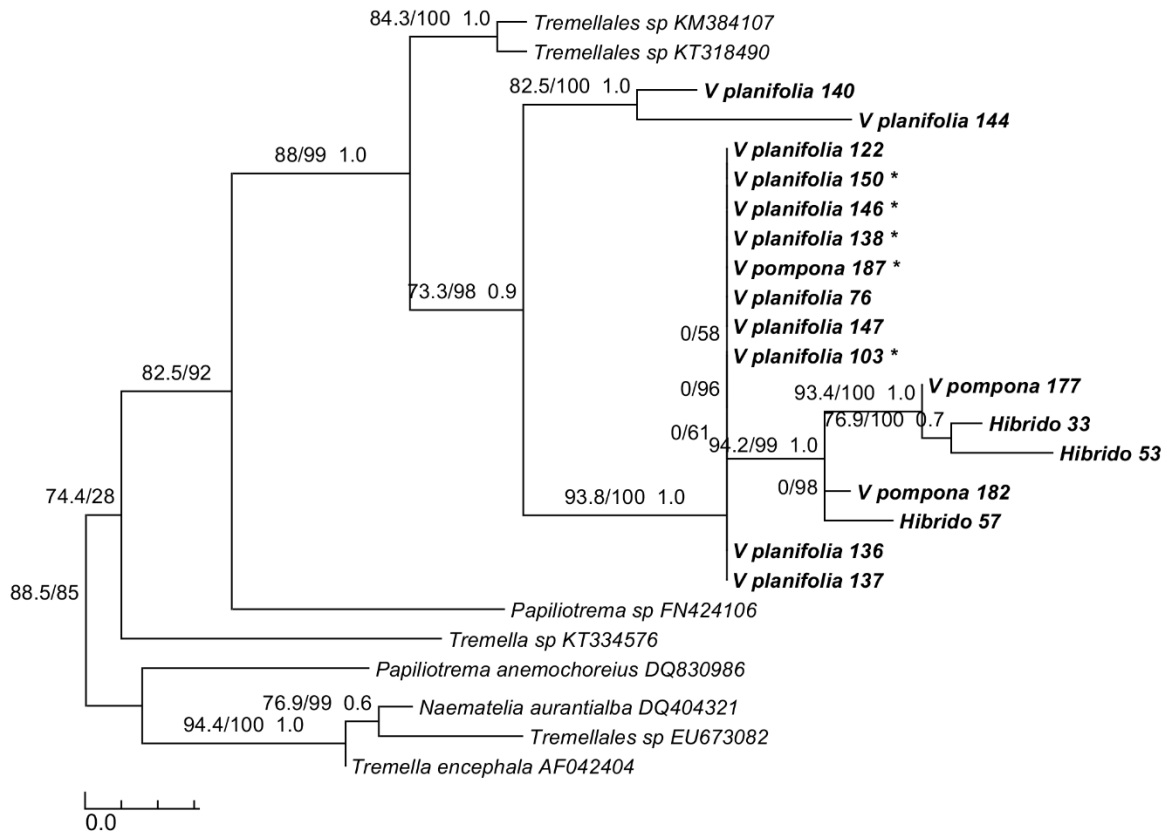


Figura 19. Árbol filogenético truncado del filo Basidiomycota. El árbol filogenético se realizó con una prueba de SH-aLRT con 1×10^4 replicas y un UFBoot con 2.1×10^9 replicas y una convergencia de 0.99. Además, se realizó una FIB con dos corridas en paralelo de 4.9×10^7 generaciones cada uno con una desviación estándar menor a 0.007. Se muestran los valores de soporte de SH-aLRT/UFBoot y FIB, respectivamente. *Aislamientos con mayor actividad β -D-glucosidasa.

El aislamiento *V_pompona_184* con una alta actividad en arbutina y esculina (Cuadro 7); formó un clado con el aislamiento *V_pompona_176*, *Cryptococcus sp.* y *Papiliotrema bandonii* con valores de SH-aLRT/UFBoot y FIB de 84/93 y 0.5, respectivamente (Figura 20).

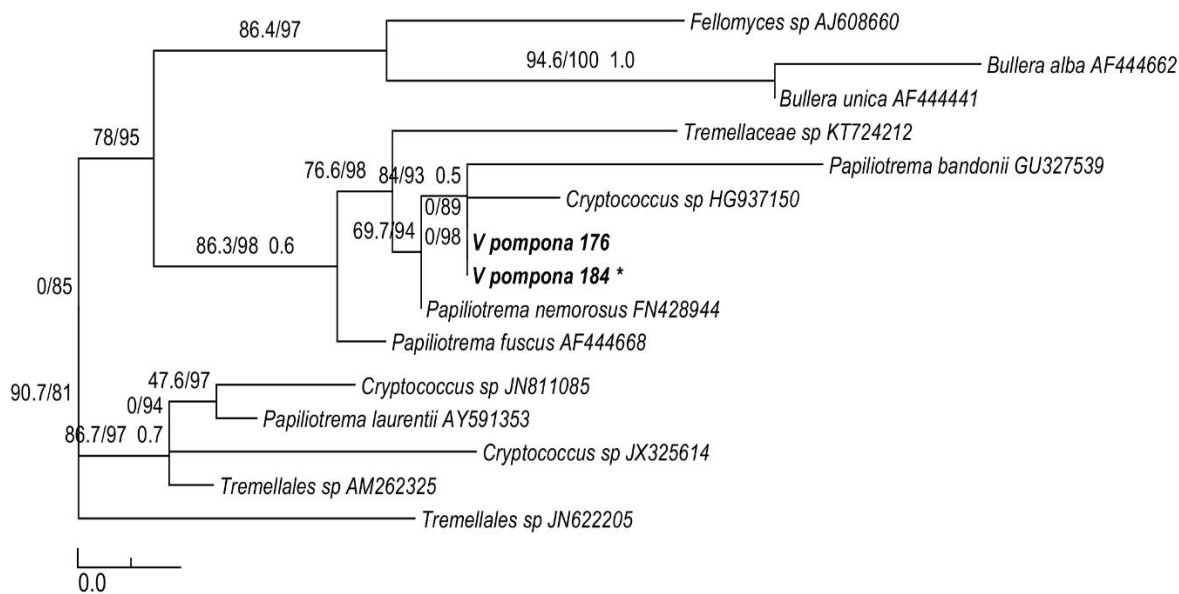


Figura 20. Árbol filogenético truncado del filo Basidiomycota. El árbol filogenético se realizó con una prueba de SH-aLRT con 1×10^4 replicas y un UFBoot con 2.1×10^9 replicas y una convergencia de 0.99. Además, se realizó una FIB con dos corridas en paralelo de 4.9×10^7 generaciones cada uno, con una desviación estándar menor a 0.007. Se muestran los valores de soporte de SH-aLRT/UFBoot y FIB, respectivamente. *Aislamientos con mayor actividad β -D-glucosidasa.

El aislamiento *V_pompona_161* con actividad β -D-glucosidasa, se agrupó a los aislamientos *V_pompona_181* y *V_pompona_197* con un soporte de SH-aLRT/UFBoot y FIB igual a 99.9/100 y 1, respectivamente (Figura 21). Además, este grupo se posicionó cercano a especies del género *Candida* y del orden Saccharomycetales (Figura 21).

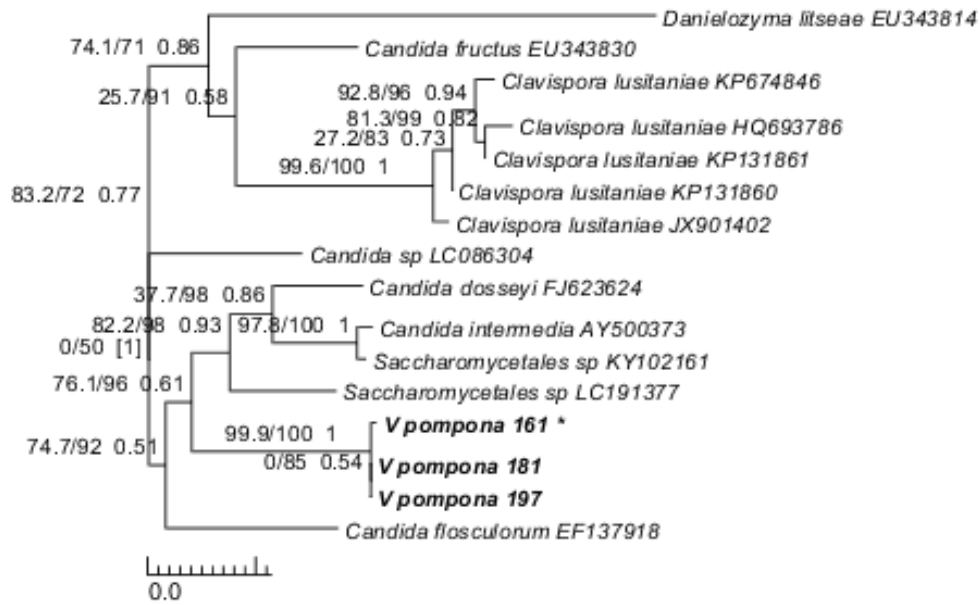


Figura 21. Árbol filogenético truncado del filo Ascomycota. El árbol filogenético se realizó con una prueba de SH-aLRT con 1×10^4 replicas y un UFBoot con 2.1×10^9 replicas y una convergencia de 0.99. Además, se realizó una FIB con dos corridas en paralelo de 4.9×10^7 generaciones cada uno, con una desviación estándar menor a 0.007. Se muestran los valores de soporte de SH-aLRT/UFBoot y FIB, respectivamente. *Aislamiento con mayor actividad β -D-glucosidasa.

5. Discusión

Las secuencias completas del ARNr 16S son ampliamente usadas en el estudio de perfiles bacterianos en diferentes ecosistemas (Bukin et al., 2019; Edgar, 2018; Marino et al., 2017). Sin embargo, su uso para la identificación de bacterias a nivel de especie resulta controversial; ya que hay estudios que demuestran que las variaciones en secuencias completas del ARNr 16S ofrecen información suficiente para dar resolución a nivel de especie y cepa (Earl et al., 2018; Johnson et al., 2019; Srinivasan et al., 2015). Sin embargo, otras investigaciones han demostrado que en algunos casos, el uso de secuencias completas del ARNr 16S para la identificación de bacterias a nivel de especie no es recomendable, debido a recombinaciones inter-genómicas e intra-genómicas que puede provocar la existencia de secuencias del ARNr 16S iguales pero de diferente especie o por el contrario, especies iguales con diferentes secuencias de ARNr 16S (Antony-Babu et al., 2017; Beye et al., 2018; Maroniche et al., 2017; Muhamad Rizal et al., 2020; Numberger et al., 2019; Sato & Miyazaki, 2017).

En las levaduras, se ha reportado el uso de secuencias ITS en el estudio de ADN ambiental con el objetivo de conocer la composición del microbioma en diferentes ecosistemas (Boix-Amorós et al., 2019; Kinge et al., 2019; McTaggart et al., 2019; Nilsson et al., 2019; Usyk et al., 2017), y también se han usado estas secuencias para realizar análisis de filogenia molecular a nivel de filo (Buehler et al., 2017). Sin embargo, en algunos casos las secuencias ITS pueden tener limitaciones al no ofrecer información necesaria para dar una buena resolución en la identificación de hongos a nivel de especie, ya que podría ser idéntica entre algunas especies, tener variaciones intra-genómicas o divergencia dentro un genoma (Hilário et al. 2022). Por lo tanto, se requiere de secuencias adicionales como las de los dominios 1 y 2 (D1/D2) pertenecientes a la subunidad ribosomal larga (LSU, por sus siglas en inglés) (Arbefeville et al., 2017; Fajarningsih, 2016; Müştak et al., 2019; Vu et al., 2016).

Lo anterior explicaría la baja resolución en algunos grupos; por ejemplo, la obtención de grupos no clasificados en la asignación de taxones (Figura 8), la formación de clados con bajo soporte en los aislamientos de bacterias (Figura 16) o el agrupamiento de varios aislamientos de levaduras en un solo clado (Figura 19). Además, se deben de analizar con prudencia los datos obtenidos con el gen ARNr 16S y las regiones ITS; ya que, podría mostrar

una realidad que no existe (por ejemplo, la identificación de aislamientos a nivel de especie o la sugerencia de especies no descritas).

Los grupos bacterianos más abundantes asociados a plantas se encuentran mayormente representados por el filo Proteobacteria (Gong & Xin, 2021). Este filo se caracteriza por ser metabólicamente muy diverso, en donde los géneros con mayor abundancia suelen ser *Acetobacter* y *Enterobacter* (Barrera et al., 2019; Dong et al., 2019; Stone et al., 2018). Así mismo, los Firmicutes tienden a ser otro grupo abundante, pero en menor proporción en comparación a las bacterias del filo Proteobacteria (Sivakumar et al. 2020). Además, las Actinobacterias también han sido reportadas en plantas, pero en términos de abundancia no suelen ser relevantes (Luo et al., 2019). Por otra parte, los filos de mayor presencia reportados en las comunidades de hongos presentes en plantas son Ascomycota (siendo *Papiliotrema* uno de sus géneros más abundantes), seguido por Basidiomycota (Into et al., 2020; Luo et al., 2019; Qian et al., 2018; Qian et al., 2020; Yao et al., 2019). Lo anterior corresponde con los resultados obtenidos en este estudio; ya que, Proteobacteria fue el filo bacteriano más abundante con una mayor representación del género *Enterobacter* (Figura 8A) y en levaduras Basidiomycota fue el filo más sobresaliente con una mayor agrupación de los aislamientos en *Papiliotrema* (Figura 8C).

A nivel de géneros bacterianos los *Bacillus*, *Burkholderia*, *Curtobacterium*, *Gluconobacter*, *Klebsiella*, *Methylobacterium*, *Paenibacillus*, *Paraburkholderia*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Sphingomonas* y *Staphylococcus* (encontrado solo en estructuras asociadas a frutos) se han reportado en diferentes estructuras de las plantas y se catalogan como microorganismos benéficos, ya que promueven el crecimiento de la planta, producen compuestos volátiles que contribuyen a la disminución del estrés, favorecen la biodisponibilidad de algunos micronutrientes, fijan nitrógeno, contribuyen al reciclaje de materia orgánica, actúan como biocontroladores de fitopatógenos entre otros (Alibrandi et al., 2018; Asaf et al., 2020; Bourles et al., 2019; Dey et al., 2019; Esmael et al., 2020; Herrera et al., 2020; Johnson et al., 2021; Kshetri et al., 2019; Olivera et al., 2021; Zúñiga et al., 2017). En el caso de *Curtobacterium*, *Gluconobacter* y *Pseudomonas* también tienen especies fitopatógenas (Armanious, 2020; Chase et al., 2016); mientras *Erwinia* solo es asociada a enfermedades en plantas (Cellini et al., 2019).

Para los géneros pertenecientes al grupo de las levaduras, como *Cryptococcus*, *Candida*, *Cyberlindnera*, *Papiliotrema*, *Rhodotorula*, *Sporidiobolus* y *Tremella* poseen especies que se han reportado en la parte interna o externa de plantas y están asociadas a la promoción de su crecimiento mediante fitohormonas, inhibición de bacterias y al combate de fitopatógenos (Calixto, 2020; Canto et al., 2017; Into et al., 2020; Khunnamwong et al., 2019; Kumla et al., 2020; Limtong et al., 2014; Peng et al., 2018; Surussawadee et al., 2014; Zhu & Sun, 2008). Con respecto a la familia Saccharomycetaceae se han aislado de bromelias y en más de 50 especies de plantas pertenecientes a diferentes grupos (Glushakova et al., 2007; Sousa et al., 2014).

Por lo tanto, se evidencia que los géneros de levaduras y bacterias logrados en este estudio se han reportado como parte de las comunidades microbianas de las plantas; además, de tener la capacidad de beneficiar a su hospedero (planta). De manera que, se sugiere que los aislamientos obtenidos cumplen roles ecológicos que podrían beneficiar a las plantaciones de las especies comerciales de *Vanilla*. Estas interacciones que se dan entre microbioma y plantas de *Vanilla* sería un posible campo de estudio que podría contribuir a una mejor rentabilidad económica del cultivo.

En el caso del bajo número de aislamientos y diversidad de microorganismos detectada en las cápsulas del híbrido de Costa Rica en comparación a las cápsulas de *V. planifolia* y *V. pompona*, podría estar explicado por las aplicaciones de Kilol en la plantación. Este producto se caracteriza por ser un insumo agrícola realizado a base de semillas cítricas con efecto bactericida y fungicida (Azofeifa-Bolaños et al., 2019; Badilla López, 2001; Coto-Calvo & Wang-Wong, 1995).

A nivel de familia, los grupos Bacillaceae y Paenibacillaceae tienen capacidad de formar endósporas que les permiten resistir factores ambientales estresantes (Mandic-Mulec et al., 2015; Sáez-Nieto et al., 2017). Por otra parte, especies de la familia Burkholderiaceae tienen la capacidad de tolerar diferentes compuestos con actividad antibiótica e incluso algunas especies pueden tener la capacidad de degradarlos (Ahn et al., 2016; Rhodes & Schweizer, 2016). De igual forma, en especies de levaduras pertenecientes a las familias Cryptococcaceae y Sporidiobolaceae se ha reportado la resistencia a varios agentes antifúngicos (Freimoser et al., 2019; Magoye et al., 2020). De manera que, lo anterior hace

suponer que las familias de microorganismos presentes en las cápsulas del híbrido de Costa Rica podrían tener alguna capacidad para resistir a las aplicaciones del Kilol.

El efecto antagónico demostrado del Kilol sobre poblaciones de las familias Erwiniaceae, Pseudomonadaceae, Microbacteriaceae, Enterobacteriaceae y en la familia de las levaduras Saccharomycetidae (Coto-Calvo & Wang-Wong, 1995; Loayza Chávez, 2019; Quimtia, 2018); podría explicar, la presencia de las anteriores familias en las cápsulas de *V. planifolia* y *V. pompona*, pero su ausencia en las cápsulas del híbrido de Costa Rica.

Por otra parte, la baja diversidad de microorganismos en las cápsulas del híbrido de Costa Rica, también podría estar influenciada por una alta abundancia de las familias bacterianas Bacillaceae, Burkholderiaceae, Paenibacillaceae y de las familias de levaduras Cryptococcaceae y Sporidiobolaceae; ya que, especies pertenecientes a estas familias han reportado la capacidad inhibir otros grupos de microorganismos mediante competencia por los mismos recursos, secreción de enzimas que degradan la pared de hongos, producción de compuestos inhibitorios, entre otros (Bergstrom & Da Luz, 2005; Compant et al., 2019; Freimoser et al., 2019; Tilocca et al., 2020).

La mayor diversidad de microorganismos en las cápsulas de *V. pompona* podría estar asociada a una reducción o nula aplicación de insumos agrícolas con efecto bactericida y fungicida; ya que las familias bacterianas Enterobacteriaceae y Erwiniaceae fueron las más abundantes y muchas de sus especies se catalogan como fitopatogénicas (Bell et al., 2004; Cesarano et al., 2017; Nagrale et al., 2020; Whitehead et al., 2002). Lo mismo podría suceder con el grupo de las levaduras, donde algunas especies de la familia Saccharomycetaceae se les consideran como fitoparásitos (Sampaio et al., 2003; Suh et al., 2006).

La variación en la diversidad microbiana observada en las cápsulas no solo se explica por la diferencia de especies del hospedero; también, se puede explicar por factores que influyen a nivel intraespecífico como radiación ultravioleta, viento, humedad, temperatura, estado fisiológico de la planta, período de muestreo entre otros (Gilbert et al., 2021; Moitinho et al., 2019).

De las familias bacterianas identificadas en este trabajo, las que se han reportado en cápsulas de diferentes especies de *Vanilla* (comerciales y no comerciales), son

Acetobacteraceae, Burkholderiaceae, Erwiniaceae, Methylobacteriaceae, Sphingomonadaceae y Staphylococcaceae; mientras asociadas a cápsulas y rizosfera se han identificado Bacillaceae, Enterobacteriaceae, Pseudomonadaceae y en rizosfera solamente se han reportado Microbacteriaceae y Yersiniaceae (Álvarez-López et al., 2014; Chen et al., 2015a; Chen et al., 2015b; Gamboa-Gaitán, 2014; Gamboa-Gaitán & Otero-Ospina, 2016; Jiménez-Quesada et al., 2015; López et al., 2013; López-López, 2013; Luna-Guevara et al., 2016; Röling et al., 2001; Xu et al., 2020). En el caso de la familia Paenibacillaceae obtenida en esta investigación, no se ha reportado en la comunidad bacteriana asociada al género *Vanilla*, sin embargo, se ha reportado en otras plantas pertenecientes a la familia Orchidaceae (Pei et al., 2019).

Familias bacterianas como Bradyrhizobiaceae, Caulobacteraceae, Devosiaceae, Lachnospiraceae, Halomonadaceae, Jatrophihabitanceae, Micrococcaceae, Moraxellaceae, Pseudonocardiaceae y Streptococcaceae se han reportado en cápsulas de *V. planifolia* mediante análisis del ADN total (Xu et al., 2020); sin embargo, en el presente estudio no fueron identificadas. También, no se obtuvieron aislamientos de las familias Brevibacteriaceae, Cellulomonadaceae, Corynebacteriaceae, Enterococcaceae, Lactobacillaceae, Morganellaceae, Neisseriaceae, Nocardiaceae, Nostocaceae, Rhodospirillaceae, Tsukamurellaceae, Vibrionaceae y Xanthomonadaceae, las cuales se han obtenido mediante aislamiento en cápsulas de *V. planifolia* (López-López, 2013, Luna-Guevara et al., 2016; Röling et al., 2001). Lo anterior sugiere, que en las cápsulas de especies comerciales de *Vanilla* podría haber grupos bacterianos que solo se podrían identificar mediante análisis de ADN total y que la diversidad bacteriana podría variar en cápsulas de una misma especie de *Vanilla*. Otra posible explicación, es que los anteriores géneros requieran de condiciones de cultivo diferentes a las usadas en este estudio (como tiempo de incubación, temperatura, concentración de nutrientes entre otros) que permitan su aislamiento (Sarhan et al. 2019).

Adicionalmente, varias especies de levaduras pertenecientes a las familias Cryptococcaceae, Saccharomycetidae y Sporidiobolaceae se han encontrado en diferentes estructuras de las plantas de vainilla (General et al., 2009; Xu et al., 2020). Sin embargo, las familias Tremellaceae y Metschnikowiaceae no se han reportado previamente en ninguna

estructura del género *Vanilla*, no obstante, si han sido reportadas en otras especies pertenecientes al grupo de las orquídeas (Jacquemyn et al., 2013; McAlpine, 2013). Además, las familias Rhynchogastremataceae, Myrobotryomycetidae y Phaffomycetaceae no han sido reportadas en el grupo de las orquídeas, pero sí en otros grupos de plantas pertenecientes a las familias de las Bromeliaceae, Melastomataceae y en la filósfera de otras plantas (Chang et al., 2012; Li et al., 2020; Pagani et al., 2016; Sousa-Silva et al., 2021).

En relación con el estudio de la actividad β -D-glucosidasa en microorganismos aislados a partir de cápsulas de *Vanilla*, solamente se ha enfocado en cápsulas de la especie *V. planifolia* durante la etapa de curado (Chen et al., 2015a; General et al., 2009; Röling et al., 2001). Este estudio es el primero que investiga la actividad β -D-glucosidasa en microorganismos cultivables presentes en cápsulas fisiológicamente maduras, sin curar y pertenecientes a *V. planifolia*, *V. pompona* y el híbrido de Costa Rica.

Los grupos de bacterias presentes en el microbioma total de un ambiente que tienen capacidad de actuar como los mayores reservorios de actividad β -D-glucosidasa pueden variar de acuerdo con las características del ecosistema y tiempo de muestreo. No necesariamente, están asociados a la abundancia del filo ya que filos con menor abundancia pueden ser una mayor fuente de actividad β -D-glucosidasa (Pathan et al., 2017; Tiwari et al., 2016; Zang et al., 2017). En estudios previos se ha reportado a los Firmicutes como principal fuente de β -D-glucosidasas en las cápsulas de *V. planifolia* durante su curado, representado por bacterias del género *Bacillus* (Chen et al., 2015a). Sin embargo, en este estudio los filos que presentaron mayor número de aislamientos y diversidad de fuentes para la enzima fueron Proteobacteria en bacterias y Basidiomycota en levaduras.

Por otro lado, dentro de los grupos bacterianos aislados e identificados en las cápsulas de *V. pompona*, *V. planifolia* e híbrido de Costa Rica, se ha reportado la actividad enzimática β -D-glucosidasa en especies pertenecientes a las familias Acetobacteraceae, Bacillaceae, Burkholderiaceae, Enterobacteriaceae, Erwiniaceae, Methylobacteriaceae, Microbacteriaceae, Paenibacillaceae, Pseudomonadaceae, Sphingomonadaceae y Yersiniaceae (Akintola et al., 2020; Chen et al., 2015a; Huang et al., 2003; Karhukorpi & Päivänurmi, 2014; Kim et al., 2006; Knief et al., 2012; Marques et al., 2003; Röling et al., 2001, Tajima et al., 2001; Tiwari et al., 2014; Vroemen et al., 1995; Yao et al., 2020).

Igualmente, en el grupo de las levaduras la actividad de esta enzima se ha identificado en especies dentro de las familias Cryptococcaceae, Metschnikowiaceae, Rhynchogastremataceae, Saccharomycetidae, Sporidiobolaceae y Tremellaceae (Fukuta et al., 2013; General et al., 2009; González-Pombo et al., 2008; Resende, 2014, Vyas & Chhabra, 2017).

Con respecto a los géneros bacterianos identificados con la actividad β -D-glucosidasa, en el presente estudio, *Curtobacterium* solo se ha reportado durante la descripción de nuevas especies mediante pruebas bioquímicas de sus enzimas sobre los sustratos arbutina, esculina y celobiosa (Funke et al., 2005; Kim et al., 2008; Kim et al., 2009; Ventorino et al., 2015). Lo anterior, concuerda con los resultados obtenidos en este estudio, ya que la mayoría de los aislamientos pertenecientes al género *Curtobacterium* presentaron actividad en los sustratos arbutina, esculina y celobiosa, siendo este último en el cual se dio más actividad en la mayoría de los aislamientos (Cuadro 6 y Anexo 1).

Igualmente, en el género *Cohnella* la actividad β -D-glucosidasa ha sido reportada solamente en la descripción de nuevas especies (Kudryashova et al., 2018; Lee & Jeon, 2017; Lin et al., 2020). En este caso, la especie más cercana *C. thailandensis* al aislamiento *V_planifolia_97* en el análisis filogenético (Figura 12), ha presentado actividad sobre arbutina, esculina y celobiosa (Khiangam et al., 2010). Además, la actividad β -D-glucosidasa en *C. formosensis* (Figura 12), solo ha sido reportada sobre esculina y celobiosa (Hameed et al., 2013). Lo anterior es consistente con el resultado obtenido para el aislamiento *V_planifolia_97*, que presentó actividad β -D-glucosidasa en arbutina y celobiosa (Cuadro 6).

En los géneros *Bacillus* y *Paenibacillus*, la actividad β -D-glucosidasa ha sido estudiada con más detalle en algunas de sus especies; ya que se conocen enzimas de este tipo con características termoestables, tolerantes a la glucosa y sales, con una mayor actividad a pH neutros y ligeramente ácidos y se cuenta con algunas estructuras cristalizadas (Lee et al., 2016; Raza et al., 2020; Saha et al., 2005). Además, se han identificado enzimas pertenecientes a muchas familias de hidrolasas glucosídicas como GH1-4, GH6, GH8-12, GH16, GH26, GH30-31, GH36, GH39, GH42-43, GH48, GH51-52, GH75 y GH95 (Ghio et al. 2020; Raza et al. 2020; Srivastava et al. 2020). Cabe mencionar que los estudios se han enfocado principalmente en la hidrólisis de la celobiosa con el fin de usarse en biorefinerías

(Choi et al., 2009; Dong et al., 2017; Ghio et al., 2018; Isorna et al., 2007; Kämpfer et al., 2016; Lee et al., 2007; Lee et al., 2013; Lee et al., 2015; Nelson et al., 2009; Son et al., 2014; Tiwari et al., 2017; Zhang et al., 2016).

Sin embargo, los *Bacillus* y *Paeneibacillus* también han reportado β -D-glucosidasas con capacidad de hidrolizar diferentes β -D-glucósidos entre ellos arbutina, esculina, *p*-nitrofenil- β -D-glucopiranosido (pNPG), salicina, entre otros (Agamennone et al., 2019; Asha et al., 2015; Dutta et al., 2017; Heyrman et al., 2005; Li et al., 2016; Papalazaridou et al., 2003; Rahman et al., 2018; Weiss et al., 2015) por mencionar algunos ejemplos. Lo anterior sugiere que los aislamientos obtenidos de *Bacillus* y *Paenibacillus*, podrían hidrolizar un mayor número de β -D-glucósidos al utilizado en el presente estudio. Además, su actividad sobre sustratos comúnmente usados en la cuantificación de la actividad β -D-glucosidasa permitiría establecer y comparar métodos para determinar dicha actividad.

Para las especies *P. pabuli* y *P. taichungensis* que formaron un grupo con el aislamiento *Híbrido_42* con alta actividad en los sustratos esculina y celobiosa (Figura 13 y Cuadro 6), solamente se ha reportado su actividad β -D-glucosidasa durante la descripción de nuevas especies; y en algunos casos se ha mencionado su capacidad de hidrolizar β -D-glucósidos de interés comercial (Kim et al., 2005; Lee et al., 2008; Nelson et al., 2009; Pandey et al., 2013; Park et al., 2013; Roux et al., 2008).

Por otra parte, *Bacillus* es el único género con actividad β -D-glucosidasa reportado en el aislamiento de bacterias durante el curado de cápsulas de *V. planifolia* y además se ha demostrado su capacidad de hidrolizar la gluco-vainillina (Chen et al., 2015a; Chen et al., 2015b; Gu et al., 2015; Röling et al., 2001). Sin embargo, en el presente estudio, el cual se realizó con cápsulas fisiológicamente maduras y previas al curado en dos especies comerciales de *Vanilla* y el híbrido de Costa Rica, se logró aislar un mayor número de géneros bacterianos con capacidad de producir β -D-glucosidasas (Cuadro 5 y Anexo 1).

En el caso de *B. stratosphericus* y *B. pumilus*, especies más cercanas al aislamiento *Híbrido_41* con mayor actividad en arbutina (Figura 14 y Cuadro 6); se han reportado genes codificadores de β -D-glucosidasas con capacidad de hidrolizar β -glucósidos como esculina y pNPG; sin embargo, carecen de actividad hidrolítica sobre celobiosa (Bogas et al., 2007; Yuan & Gao, 2015). Además, en la especie *B. stratosphericus* se ha reportado una mejor

eficiencia en la inducción de β -D-glucosidasas en medios con esculina y en presencia de KH_2PO_4 y MgSO_4 (Dutta et al., 2017; Singh et al., 2019).

Para la especie *B. toyonensis*, cercana al aislamiento *Híbrido_61* (Figura 14), se ha demostrado su actividad β -D-glucosidasa sobre los sustratos arbutina, celobiosa y otros como salicina (Agamenzone et al., 2019; Miller et al., 2016). Sin embargo, aunque para *B. marcorestinum* (Figura 14), no fue posible encontrar reportes de la capacidad de producir β -D-glucosidasas, si se logró reportar la actividad enzimática para la mayoría de los demás aislamientos (*V_planifolia_123*, *Híbrido_60*, *Híbrido_58*, *V_planifolia_128*, *Híbrido_45* y *V_pompona_204*) que formaron un clado con *Híbrido_61* (Figura 14) sobre alguno de los sustratos arbutina o esculina, pero con mayor intensidad en celobiosa (Cuadro 6).

En el grupo *Methylobacterium*, el estudio de la actividad β -D-glucosidasa solo se ha reportado sobre el sustrato esculina, durante la identificación de nuevas especies (Knief et al., 2012). Sin embargo, los resultados presentados en este estudio sugieren que el género *Methylobacterium* podría tener algunas especies que sean fuente importante de actividad β -D-glucosidasa, ya que el aislamiento *V_planifolia_90* hidrolizó los sustratos esculina y celobiosa de forma similar a los aislamientos pertenecientes al género *Bacillus* y *Paenibacillus*, en los cuales la actividad de esta enzima ha sido estudiada con mayor detalle (Cuadro 6 y Anexo 1).

Para los géneros *Citrobacter*, *Enterobacter* y *Klebsiella* pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae, el género *Serratia* de la familia Yersiniaceae; y varios géneros de la familia Erwiniaceae, se ha reportado la capacidad de hidrolizar celobiosa y varios β -glucósidos entre ellos arbutina, esculina y pNPG (Akintola et al., 2020; García-Fraile et al., 2015; Geiger et al., 2010; Huang et al., 2003; Kerppola et al., 1987; Lokapirnasari et al., 2015; Marri et al., 1995; Perry et al., 2007; Raghunand & Mahadevan, 2003; Ribeiro et al., 2017; Waghmare et al., 2018). Además, en los genomas de algunas especies de *Pantoea*, perteneciente a la familia Erwiniaceae, y especies del género *Enterobacter* de la familia Enterobacteriaceae, se han reportado genes codificadores de β -D-glucosidasas (Ma et al., 2016; Szczerba et al., 2020).

A pesar de que en la literatura el reporte de la enzima β -D-glucosidasa en las familias Enterobacteriaceae y Erwiniaceae se ha realizado principalmente de forma cualitativa; en

este trabajo fueron los grupos con mayor número de aislamientos y diversidad en términos de actividad β -D-glucosidasa (Cuadro 6 y Anexo 1). Lo que indica que podrían ser una importante fuente de β -D-glucosidasa para usarse en el curado de cápsulas de vainilla; sin embargo, se debe tener presente que muchos de ellos son fitopatógenos de plantas y por lo tanto, su(s) enzima(s) se debería usar puras o en extracto.

En general, para el grupo de las bacterias, la actividad β -D-glucosidasa tuvo mayor intensidad para los sustratos esculina y celobiosa (Cuadro 6). Sin embargo, para una posible aplicación de las bacterias en el curado de las cápsulas se sugiere los aislamientos *Híbrido_41* perteneciente al género *Bacillus* y *V_pompona_205* perteneciente a la familia Enterobacteriaceae; ya que tuvieron una alta actividad sobre el sustrato arbutina (Cuadro 6), el cual tiene una estructura molecular similar a la gluco-vainillina (Figura 2).

En el grupo de las levaduras, el género *Candida* ha reportado la capacidad de hidrolizar la arbutina y esculina; mientras que en aislamientos de *Papiliotrema* solo se ha reportado la actividad sobre arbutina (Pagani et al., 2016; Sánchez-Torres et al., 1998; Yalçın et al., 2020). Lo anterior concuerda con los resultados obtenidos en este estudio para los aislamientos de *Candida*; sin embargo, para los aislamientos pertenecientes al género *Papiliotrema* además de hidrolizar la arbutina, también se demostró que tienen una capacidad alta de hidrolizar esculina (Cuadro 7 y Anexo 2).

El género *Cryptococcus*, presenta actividad β -D-glucosidasa alta sobre arbutina en especies como *C. albicans*, *C. humicola*, *C. laurentii*, *C. terreus*, *C. yarrowi* y *Cryptococcus* sp. las cuales han sido aisladas de diversos frutos (Trindade et al., 2002). Sin embargo, respecto a la actividad sobre esculina solo se ha reportado de forma cualitativa en *C. neoformans* y *C. flavescens* (Chae et al., 2012; Pérez et al., 2011). Además, este género puede tener especies con capacidad de producir β -D-glucosidasa a bajas temperaturas, pero también se han reportado especies incapaces de expresarla (Edberg et al., 1980; Mendoza, 2005; Pavlova et al., 2002; Trindade et al., 2002). La mayoría de los aislamientos del género *Cryptococcus* obtenidos en esta investigación concuerdan con los reportes previos, respecto a la actividad sobre arbutina y esculina (Cuadro 7 y Anexo 2).

Adicionalmente, se ha mencionado que los géneros *Candida* y *Cryptococcus* tienen capacidad de hidrolizar una gran variedad de β -glucósidos; así como muchos precursores de

compuestos aromáticos presentes en frutos usados en la industria de jugos y vinos (Barrilli et al., 2020; Escribano et al., 2017; García et al., 2018; Gueguen et al., 2001; Maicas & Mateo, 2017; Thongekkaew et al., 2019). Con base en la información anterior y en los resultados obtenidos en este estudio, donde se demuestra que las levaduras presentaron una alta actividad en los sustratos arbutina y esculina (Cuadro 7), en comparación a las bacterias (Cuadro 6), se podría sugerir que las β -D-glucosidasas de las levaduras serían las más adecuadas para hidrolizar la gluco-vainillina en las cápsulas de especies comerciales de *Vanilla*.

Para futuras aplicaciones de la β -D-glucosidasa en el mejoramiento del curado de cápsulas del híbrido de Costa Rica y especies comerciales de *Vanilla*, se podría usar tanto el microorganismo vivo como el extracto enzimático; pero se debe tener en cuenta que estos métodos podrían generar compuestos secundarios que le podrían restar calidad al producto (Gu et al., 2012; Zhang et al., 2014). Con respecto a lo anterior, las especies del género *Bacillus* han demostrado contribuir al mejoramiento del curado de cápsulas, sin generar la formación de compuestos no deseados (Gu et al., 2015). Por otra parte, el uso de enzimas recombinantes podría estar limitado por el tipo de producto; ya que, el uso de microorganismos genéticamente modificados o sus derivados no está permitido en productos con certificación orgánica (Decreto ejecutivo de la República de Costa Rica, 18 de setiembre del 2001; Departamento de Agricultura de Estados Unidos, Servicio de Comercialización Agrícola, Programa Nacional Orgánico, 2011; Parlamento Europeo y de Consejo, 2018).

Es importante resaltar que la mayoría de las investigaciones sobre la actividad β -D-glucosidasas en microorganismos presentes en cápsulas de especies comerciales en *Vanilla* se ha enfocado principalmente en el proceso del curado, donde una parte del microbioma se ha perdido por la etapa de muerte vegetativa (Chen et al., 2015a; Chen et al., 2015b; General et al., 2009; Gu et al., 2015; Röling et al., 2001). Sin embargo, en este trabajo, donde se realizaron aislamientos previos al curado de las cápsulas en especies comerciales de *Vanilla*, se logró encontrar una fuente de microorganismos más diversa con actividad β -D-glucosidasas en comparación a la reportada durante el curado, donde sobresalió el grupo de las bacterias.

Además, este trabajo e investigaciones previas sobre la actividad β -D-glucosidasa en microorganismos de cápsulas de vainilla se han enfocado en los microorganismos cultivables. Sin embargo, las β -D-glucosidasas también se pueden obtener a partir de muestras ambientales a través de la metagenómica, metaproteómica y metatranscriptómica de los microorganismos no cultivables (Jiang et al., 2009; Porras, 2019; Speda et al., 2017; Zhang et al., 2020). De manera que, surge la hipótesis que previo al curado y en el proceso de maduración de las cápsulas en condiciones naturales hay una mayor fuente de β -D-glucosidasa asociada al microbioma no cultivable que podría ayudar a mejorar el curado.

Así mismo, estudios reportan que el microbioma presente en el curado de las cápsulas de especies comerciales de *Vanilla*, pueden contribuir a un mayor contenido de vainillina a través de su biosíntesis (Gu et al. 2017; Khoyratty, 2020; Xu et al. 2020); lo cual hace pensar, que en condiciones de maduración natural de las cápsulas de vainilla, además de haber un mayor número de microorganismos productores de β -D-glucosidasas; también el grupo de microorganismos asociados a la biosíntesis de vainillina puede ser mayor y por tanto contribuir a obtener un mejor producto al final del curado.

De manera que, debido a la capacidad del microbioma presente en las cápsulas de especies comerciales de *Vanilla* en contribuir a una mayor concentración de vainillina mediante la hidrólisis de la gluco-vainillina a través de β -D-glucosidasas o su biosíntesis mediante rutas metabólicas, se sugiere que la muerte vegetativa mediante temperatura durante el proceso de curado, podría tener un efecto negativo en la concentración final de vainillina; ya que, en esta etapa se podría favorecer a una posible pérdida del microbioma asociado a la generación de vainillina.

El principal aporte de este trabajo se da en ser el primero a nivel nacional e incluso en países de Mesoamérica, que estudia la actividad β -D-glucosidasa microbiana en cápsulas fisiológicamente maduras y recolectadas directamente de la plantación de dos especies comerciales de *Vanilla* y el híbrido de Costa Rica. Además, este trabajo ha permitido acceder a recursos biológicos como los microorganismos, los cuales se han podido almacenar a largo plazo mediante el método de crioconservación que garantiza su uso a futuro para aplicaciones en el mejoramiento del curado de cápsulas del híbrido de Costa Rica o de las especies de *Vanilla* con valor comercial; también, se podrían usar en otros procesamientos de alimentos

y bebidas e inclusive en la biorrefinería debido a los diferentes usos de las β -D-glucosidasas. Otras posibles aplicaciones de los microorganismos obtenidos podrían ser como biocontroladores, fijadores de nitrógeno, bioestimulantes de crecimiento en plantas, favorecimiento en la biodisponibilidad de micronutrientes entre otras. Lo anterior destaca la importancia de la conservación de recursos biológicos que garanticen su uso en futuras aplicaciones biotecnológicas.

6. Conclusiones

En conclusión, el filo Proteobacteria fue el más abundante, con una mayor representación por el género *Enterobacter*; en el caso de las levaduras, el filo Basidiomycota con el género *Papiliotrema* fueron los más sobresalientes. Por otra parte, se obtuvieron grupos no reportados de microorganismos provenientes de las cápsulas de especies comerciales de *Vanilla* con actividad β -D-glucosidasa que podrían contribuir al mejoramiento del curado. Dentro de estos nuevos microorganismos, hay algunos que su actividad β -D-glucosidasa solo se ha reportado durante la descripción e identificación de nuevas especies. En el caso de las bacterias, la actividad β -D-glucosidasa tuvo mayor intensidad en los sustratos esculina y celobiosa. Las levaduras, principalmente del filo Ascomycota, fueron las que presentaron mayor actividad β -D-glucosidasa sobre los sustratos arbutina y esculina. Además, las levaduras serían los microorganismos más promisorios para estudios posteriores con fines de mejoramiento del curado en cápsulas de especies comerciales de *Vanilla* con importancia económica.

7. Recomendaciones

Se recomienda estudiar la actividad β -D-glucosidasa presente durante el proceso de maduración natural de las cápsulas de especies comerciales de *Vanilla* e híbrido de Costa Rica. Además, se recomienda investigar las posibles β -D-glucosidasas presentes en cápsulas fisiológicamente maduras de *V. planifolia*, *V. pompona* e híbrido de Costa Rica asociadas a la fracción de microorganismos no cultivables mediante enfoques independientes de cultivo (por ejemplo, metatranscriptómica). Por último, se recomienda usar diferentes condiciones de cultivo para obtener un mayor número en el aislamiento de microorganismos y usar la molécula gluco-vainillina en la identificación de la actividad β -D-glucosidasa en un medio M9 para corroborar de forma certera su hidrólisis por los microorganismos o β -D-glucosidasas obtenidas.

8. Bibliografía

- Abban, S., Brimer, L., Abdelgadir, W. S., Jakobsen, M. & Thorsen, L. (2013). Screening for *Bacillus subtilis* group isolates that degrade cyanogens at pH 4, 5–5.0. *International Journal of Food Microbiology*, 161(1), 31-35. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.11.019>
- Aberer, A. J., Kobert, K., & Stamatakis, A. (2014). ExaBayes: massively parallel Bayesian tree inference for the whole-genome era. *Molecular Biology and Evolution*, 31(10), 2553-2556. <https://doi.org/10.1093/molbev/msu236>
- Agamennone, V., van Straalen, J., Brouwer, A., de Boer, T. E., Hensbergen, P. J., Zaagman, N., Braster, M., Straalen, N. M., Roelofs, D., & Janssens, T. K. (2019). Genome annotation and antimicrobial properties of *Bacillus toyonensis* VU-DES 13, isolated from the *Folsomia candida* gut. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 167(3), 269-285. <https://doi.org/10.1111/eea.12763>
- Ahmad, H., Khera, R. A., Hanif, M. A., Ayub, M. A., & Jilani, M. I. (2020). Vanilla. In *Medicinal Plants of South Asia* (pp. 657-669). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102659-5.00048-3>
- Ahmed, A., Batool, K., & Bibi, A. (2017). Microbial β -glucosidase: sources, production and applications. *Journal of Applied & Environmental Microbiology*, 5(1), 31-46. <https://doi.org/10.12691/jaem-5-1-4>
- Ahn, Y., Kim, J. M., Kweon, O., Kim, S. J., Jones, R. C., Woodling, K., da Costa, G. G., LiPuma, J. J., Hussong, D., Marasa B. S., & Cerniglia, C. E. (2016). Intrinsic resistance of *Burkholderia cepacia* complex to benzalkonium chloride. *MBio*, 7(6), e01716-16. <https://doi.org/10.1128/MBIO.01716-16>
- Akintola, A. I., Oyedeji, O., Adewale, I. O., & Bakare, M. K. (2020). Production and physicochemical properties of thermostable, crude cellulase from *Enterobacter cloacae* IP8 isolated from plant leaf litters of *Lagerstroemia indica* Linn. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 2020, 989-994. <https://doi.org/10.15414/jmbfs.2019.8.4.989-994>

- Alarcón, E. C., Manríquez, N. R., Siles, E. T. & Aliaga, M. T. Á. (2011). Producción de β -D-glucosidasas por cultivos de bacterias termófilas indígenas del altiplano boliviano. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 13(1), 66-72.
- Alibrandi, P., Cardinale, M., Rahman, M. M., Strati, F., Ciná, P., de Viana, M. L., Giamminola, E. M., Gallo, G., Schnell, S., De Filippo, C., Ciaccio, M., & Puglia, A. M. (2018). The seed endosphere of *Anadenanthera colubrina* is inhabited by a complex microbiota, including *Methylobacterium* spp. and *Staphylococcus* spp. with potential plant-growth promoting activities. *Plant and Soil*, 422(1), 81-99. <https://doi.org/10.1007/s11104-017-3182-4>
- Álvarez-López, C., Osorio-Vega, W., Díez-Gómez, M. C., & Marín-Montoya, M. (2014). Caracterización bioquímica de microorganismos rizosféricos de plantas de vainilla con potencial como biofertilizantes. *Agronomía Mesoamericana*, 25(2), 226-241.
- Anderson, K. E., Sheehan, T. H., Mott, B. M., Maes, P., Snyder, L., Schwan, M. R., Walton, A., Jones, B. M., & Corby-Harris, V. (2013). Microbial ecology of the hive and pollination landscape: bacterial associates from floral nectar, the alimentary tract and stored food of honey bees (*Apis mellifera*). *PloS One*, 8(12), 1-16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0083125>
- Andrade-Andrade, G., Delgado-Alvarado, A., Herrera-Cabrera, B. E., Arévalo-Galarza, L., & Caso-Barrera, L. (2018). Variación de compuestos fenólicos totales, flavonoides y taninos en *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews de la Huasteca Hidalguense, México. *Agrociencia*, 52(1), 55-66.
- Andriamihaja, C. F., Ramarosandratana, A. V., Grisoni, M., Jeannoda, V., & Besse, P. (2020). The leafless *Vanilla* species-complex from the South-West Indian Ocean Region: A taxonomic puzzle and a model for orchid evolution and conservation research. *Diversity*, 12(12), 443. <https://doi.org/10.3390/d12120443>
- Antony-Babu, S., Stien, D., Eparvier, V., Parrot, D., Tomasi, S., & Suzuki, M. T. (2017). Multiple *Streptomyces* species with distinct secondary metabolomes have identical 16S rRNA gene sequences. *Scientific Reports*, 7(1), 1-8. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11363-1>

- Arbefeville, S., Harris, A., & Ferrieri, P. (2017). Comparison of sequencing the D2 region of the large subunit ribosomal RNA gene (MicroSEQ®) versus the internal transcribed spacer (ITS) regions using two public databases for identification of common and uncommon clinically relevant fungal species. *Journal of microbiological methods*, *140*, 40-46. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2017.06.015>
- Armanious, H. A. (2020). Pomegranate (*Punica granata* L.) inner decay caused by *Gluconobacter oxydans* bacterium. *Asian Journal of Agricultural and Horticultural Research*, *7*(4), 14-29. <https://doi.org/10.9734/ajahr/2020/v7i430101>
- Arroyo, T., Cordero-Bueso, G., Serrano, A., & Valero, E. (2010). β -glucosidase production by non-*Saccharomyces* yeast isolated from vineyards. *Expression of Multidisciplinary Flavour Science. Winterthur, Switzerland*, 359-362.
- Asaf, S., Numan, M., Khan, A. L., & Al-Harrasi, A. (2020). *Sphingomonas*: from diversity and genomics to functional role in environmental remediation and plant growth. *Critical Reviews in Biotechnology*, *40*(2), 138-152. <https://doi.org/10.1080/07388551.2019.1709793>
- Asha, B. M., Pathma, J., & Sakthivel, N. (2015). Isolation and characterization of a novel thermostable β -glucosidase from *Bacillus subtilis* SU40. *Applied Biochemistry and Microbiology*, *51*(1), 21-26. <https://doi.org/10.1134/S0003683815010032>
- Atalah, J., Cáceres-Moreno, P., Espina, G., & Blamey, J. M. (2019). Thermophiles and the applications of their enzymes as new biocatalysts. *Bioresource Technology*, *280*, 478-488. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.02.008>
- Azofeifa Bolaños, J. B., Paniagua-Vásquez, A. & García García, J. A. (2014). Importancia y desafíos de la conservación de *Vanilla* spp. (Orquidaceae) en Costa Rica. *Agronomía Mesoamericana*, *25*(1), 189-202.
- Azofeifa, J. B., & Vásquez, A. P. (2015). Investigación y Extensión, ¿Son complementarias? El caso de la vainilla. *Universidad en Diálogo: Revista de Extensión*, *5*(1), 73-86.
- Azofeifa-Bolaños, J. B., Rivera-Coto, G., Paniagua-Vásquez, A., & Cordero-Solórzano, R. (2018). Respuestas morfogénicas de plantas in vitro y esquejes de *Vanilla planifolia*

- (Orchidaceae) durante el desarrollo inicial del cultivo en invernadero y en sistemas agroforestales. *Cuadernos de Investigación UNED*, 10(2), 368-378. <http://dx.doi.org/10.22458/urj.v10i2.1995>
- Azofeifa-Bolaños, J. B., Rivera-Coto, G., Paniagua-Vásquez, A., Cordero-Solórzano, R., & Salas-Alvarado, E. (2019). Efecto de la desinfección de segmentos nodales sobre el rendimiento morfogénico de vitroplantas de *Vanilla planifolia* Andrews. *Agronomía Mesoamericana*, 30(1), 33-49. <http://dx.doi.org/10.15517/am.v30i1.32360>
- Azua Bustos, A., & González-Silva, C. (2014). Biotechnological applications derived from microorganisms of the Atacama Desert. *BioMed Research International*, 1, 1-8. <https://doi.org/10.1155/2014/909312>
- Badilla Lòpez, J. R. (2001). Propagación vegetativa de turrá *Ulmus Mexicana* (liebm) planch con fines de reforestación clonal. Informe de Práctica de Especialidad. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Tomado de https://repositoriotec.tec.ac.cr/bitstream/handle/2238/700/Informe_Final.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Balachandran, C., Duraipandiyar, V., Emi, N., & Ignacimuthu, S. (2015). Antimicrobial and cytotoxic properties of *Streptomyces* sp. (ERINLG-51) isolated from Southern Western Ghats. *South Indian Journal of Biological Sciences*, 1(1), 7-14. <https://doi.org/10.22205/sijbs/2015/v1/i1/100436>
- Balvanera, P. (2012). Los servicios eco-sistémicos que ofrecen los bosques tropicales. *Ecosistemas*, 21(1-2), 136-147.
- Banco Central de Costa Rica. (2016). Investigación de análisis económico para cambio de año base. (Contacto: Rosalia Rojas, Teléfono: 5062243-3290).
- Banjara, N., Suhr, M. J. & Hallen-Adams, H. E. (2015). Diversity of yeast and mold species from a variety of cheese types. *Current Microbiology*, 70(6), 792-800. <https://doi.org/10.1007/s00284-015-0790-1>
- Baqueiro-Peña, I. & Guerrero-Beltrán, J. Á. (2017). *Vanilla* (*Vanilla planifolia* Andr.), its residues and other industrial by-products for recovering high value flavor molecules: A

- review. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 6, 1-9.
<https://doi.org/10.1016/j.jarmap.2016.10.003>
- Barberán, A., Casamayor, E. O., & Fierer, N. (2014). The microbial contribution to macroecology. *Frontiers in Microbiology*, 5, 203-211.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00203>
- Barrera, S. E., Sarango-Flóres, S. W., & Montenegro-Gómez, S. P. (2019). The phyllosphere microbiome and its potential application in horticultural crops. A review. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 13(3), 384-396.
<https://doi.org/10.17584/rcch.2019v13i3.8405>
- Barrilli, É. T., Tadioto, V., Milani, L. M., Deoti, J. R., Fogolari, O., Müller, C., Barros, K. O., Rosa, C. A., dos Santos, A. A., Stambuk, B. U., Treichel, H., & Alves, S. L. (2020). Biochemical analysis of cellobiose catabolism in *Candida pseudointermedia* strains isolated from rotten wood. *Archives of Microbiology*, 202, 1-11.
<https://doi.org/10.1007/s00203-020-01884-1>
- Bautista-Aguilar, J. R., Iglesias-Andreu, L. G., Martínez-Castillo, J., Ramírez-Mosqueda, M. A., & Ortiz-García, M. M. (2021). In Vitro Conservation and Genetic Stability in *Vanilla planifolia* Jacks. *HortScience*, 1(aop), 1, 1-5. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI16118-21>
- Behera, B. C., Parida, S., Dutta, S. K. & Thatoi, H. N. (2014). Isolation and identification of cellulose degrading bacteria from mangrove soil of Mahanadi River Delta and their cellulase production ability. *American Journal of Microbiological Research*, 2(1), 41-46.
<https://doi.org/10.12691/ajmr-2-1-6>
- Beitel, S. M. & Knob, A. (2013). *Penicillium miczynskii* β -glucosidase: a glucose-tolerant enzyme produced using pineapple peel as substrate. *Industrial Biotechnology*, 9(5), 293-300. <https://doi.org/10.1089/ind.2013.0016>
- Belanger, F. C., & Havkin F, D. Molecular analysis of a *Vanilla* hybrid cultivated in Costa Rica. In Havkin F, D., & Belanger, F. C. (2011). In *Handbook of Vanilla Science and technology*, (pp. 256-265). Recuperado de <http://www.agrifs.ir/sites/default/files/Handbook%20of%20Vanilla%20Science%20and>

%20Technology%20%7BDaphna%20Havkin-
Frenkel%7D%20%5B9781405193252%5D%20%282011%29_0.pdf#page=278

- Bell, K. S., Sebahia, M., Pritchard, L., Holden, M. T. G., Hyman, L. J., Holeva, M. C., Thomson, N. R., Bentley, S. D., Churcher, L. J. C., Mungall, K., Atkin, R., Bason, N., Brooks, K., Chillingworth, T., Clark, K., Doggett, J., Fraser, A., Hance, Z., Hauser, H.,... & Atkin, R. (2004). Genome sequence of the enterobacterial phytopathogen *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* and characterization of virulence factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *101*(30), 11105-11110. <https://doi.org/10.1073/pnas.0402424101>
- Bello-Bello, J. J., García-García, G. G. & Iglesias-Andreu, L. (2015). Conservación de vainilla (*Vanilla planifolia* Jacks.) bajo condiciones de lento crecimiento in vitro. *Revista Fitotecnia Mexicana*, *38*(2), 165-171.
- Benedetti, V. P. (2014). *Isolados de Candida provenientes de pacientes diabéticos e transplantados renais: análise filogenética, avaliação da resistência ao fluconazol e polimorfismo do gene ERG11*. (Tesis de doctorado, Universidade Federal do Paraná). Recuperado de <http://acervodigital.ufpr.br/bitstream/handle/1884/43551/R%20-%20T%20-%20VOLMIR%20PITT%20BENEDETTI.pdf?sequence=3&isAllowed=y>
- Beneduzi, A., Moreira, F., Costa, P. B., Vargas, L. K., Lisboa, B. B., Favreto, R., IvoBaldani, J. I., & Passaglia, L. M. P. (2013). Diversity and plant growth promoting evaluation abilities of bacteria isolated from sugarcane cultivated in the South of Brazil. *Applied Soil Ecology*, *63*, 94-104. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2012.08.010>
- Bengtsson-Palme, J., Ryberg, M., Hartmann, M., Branco, S., Wang, Z., Godhe, A., De Wit, P., Sánchez-García, M., Ebersberger, I., de Sousa, F., Amend, A., Jumpponen, A., Unterseher, M., Kristiansson, E., Abarenkov, K., Bertrand, Y. J. K., Sanli, K., Eriksson, K. M., Vik, U.,... & Nilsson, H. (2013). Improved software detection and extraction of ITS1 and ITS2 from ribosomal ITS sequences of fungi and other eukaryotes for analysis of environmental sequencing data. *Methods in Ecology and Evolution*, *4*(10), 914-919. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12073>
- Bergstrom, G. C., & Da Luz, W. C. (2005). *U.S. Patent No. 6,896,883*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.

- Beye, M., Fahsi, N., Raoult, D., & Fournier, P. E. (2018). Careful use of 16S rRNA gene sequence similarity values for the identification of *Mycobacterium* species. *New Microbes and New Infections*, 22, 24-29. <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2017.12.009>
- Bogas, A. C., Watanabe, M. A. E., Barbosa, A., Vilas-Boas, L. A., Bonatto, A. C., Dekker, R., Souza, E. M., & Fungaro, M. H. P. (2007). Structural characterization of the bglH gene encoding a beta-glucosidase-like enzyme in an endophytic *Bacillus pumilus* strain. *Genetics and Molecular Biology*, 30(1), 100-104. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572007000100018>
- Bohra, P. (2011). *Directed evolution of Escherichia coli LacZ gene to create diversity in glycosidic bonds hydrolysis*. (Tesis de Maestría, Universitetet i Tromsø). Recuperado de <http://munin.uit.no/bitstream/handle/10037/3567/thesis.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Boix-Amorós, A., Puente-Sánchez, F., Du Toit, E., Linderborg, K. M., Zhang, Y., Yang, B., Salminen, S., Isolauri, E., Tamames, J., Alex Mira, A., & Collado, M. C. (2019). Mycobiome profiles in breast milk from healthy women depend on mode of delivery, geographic location, and interaction with bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 85(9), 1-19. <https://doi.org/10.1128/AEM.02994-18>
- Bolaños, R.; Watson, V., y Tosi, J. 2005. Mapa ecológico de Costa Rica (Zonas de Vida), según el sistema de clasificación de zonas de vida del mundo de L.R. Holdridge), Escala 1:750 000. Centro Científico Tropical, San José, Costa Rica. Recuperado de <https://repositorios.cihac.fcs.ucr.ac.cr/cmelendez/handle/123456789/149?mode=full>
- Bonfá, E. C., de Souza Moretti, M. M., Gomes, E., & Bonilla-Rodríguez, G. O. (2018). Biochemical characterization of an isolated 50 kDa beta-glucosidase from the thermophilic fungus *Myceliophthora thermophila* M. 7.7. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 13, 311-318. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.01.008>
- Bory, S., Da Silva, D., Risterucci, A. M., Grisoni, M., Besse, P. & Duval, M. F. (2008). Development of microsatellite markers in cultivated vanilla: Polymorphism and transferability to other *Vanilla* species. *Scientia Horticulturae*, 115(4), 420-425. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2007.10.020>

- Bourles, A., Guentas, L., Chalkiadakis, E., Majorel, C., Juillot, F., Cavaloc, Y., Burtet-Sarramegna, V., Medevielle, V., Jourand, P., & Amir, H. (2019). New caledonian ultramafic conditions structure the features of *Curtobacterium citreum* strains that play a role in plant adaptation. *Canadian Journal of Microbiology*, *65*(12), 880-894. <https://doi.org/10.1139/cjm-2019-0283>
- Buehler, A. J., Evanowski, R. L., Martin, N. H., Boor, K. J., & Wiedmann, M. (2017). Internal transcribed spacer (ITS) sequencing reveals considerable fungal diversity in dairy products. *Journal of Dairy Science*, *100*(11), 8814-8825. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-12635>
- Buitrón Buitrón, K. P. (2021). *Actividad de hidrolasas en la descomposición de materia orgánica y su relación con carbono y nitrógeno orgánico en zonas conservadas e intervenidas de la Reserva Ecológica “Los Ilinizas”* ((Tesis de Bachiller, Universidad Central de Ecuador). Recuperado de <http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/24519>
- Bukin, Y. S., Galachyants, Y. P., Morozov, I. V., Bukin, S. V., Zakharenko, A. S., & Zemskaya, T. I. (2019). The effect of 16S rRNA region choice on bacterial community metabarcoding results. *Scientific Data*, *6*(1), 1-14. <https://doi.org/10.1038/sdata.2019.7>
- Buzzini, P., Branda, E., Goretti, M. & Turchetti, B. (2012). Psychrophilic yeasts from worldwide glacial habitats: diversity, adaptation strategies and biotechnological potential. *FEMS Microbiology ecology*, *82*(2), 217-241. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2012.01348.x>
- Cai, Y., Gu, F., Hong, Y., Chen, Y., Xu, F., & An, K. (2019). Metabolite transformation and enzyme activities of hainan vanilla beans during curing to improve flavor formation. *Molecules*, *24*(15), 2781. <https://doi.org/10.3390/molecules24152781>
- Calixto, G. B. (2020). *Leveduras no controle de Colletotrichum truncatum e seu efeito na produtividade da soja. (Tesis de Maestría, Universidade Estadual do Oeste do Paraná)*. Recuperado de <http://tede.unioeste.br/handle/tede/4821>
- Canto, A., Herrera, C. M., & Rodriguez, R. (2017). Nectar-living yeasts of a tropical host plant community: diversity and effects on community-wide floral nectar traits. *PeerJ*, *5*, e3517- e3539. <https://doi.org/10.7717/peerj.3517>

- Capella-Gutiérrez, S., Silla-Martínez, J. M., & Gabaldón, T. (2009). TrimAl: a tool for automated alignment trimming in large-scale phylogenetic analyses. *Bioinformatics*, 25(15), 1972-1973. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp348>
- Carranza Alvarez, C., Trinidad García, K. L., Reyes Hernández, H., Castillo Pérez, L. J., & Fortanelli Martínez, J. (2021). Efecto de extractos orgánicos naturales sobre la micropropagación in vitro de *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews (Orchidaceae). *Biotecnia*, 23(1), 5-12. <https://doi.org/10.18633/biotecnia.v23i1.805>
- Casillo, A., Lanzetta, R., Parrilli, M., & Corsaro, M. M. (2018). Exopolysaccharides from marine and marine extremophilic bacteria: structures, properties, ecological roles and applications. *Marine Drugs*, 16(2), 69-103. <https://doi.org/10.3390/md16020069>
- Cavello, I. A., Bezus, B., Martinez, A., Garmendia, G., Vero, S., & Cavalitto, S. (2019). Yeasts from Tierra Del Fuego Province (Argentina): biodiversity, characterization and bioprospection of hydrolytic enzymes. *Geomicrobiology Journal*, 36(9), 847-857. <https://doi.org/10.1080/01490451.2019.1641769>
- Cellini, A., Giacomuzzi, V., Donati, I., Farneti, B., Rodriguez-Estrada, M. T., Savioli, S., Angeli, S., & Spinelli, F. (2019). Pathogen-induced changes in floral scent may increase honeybee-mediated dispersal of *Erwinia amylovora*. *The ISME Journal*, 13(4), 847-859. <https://doi.org/10.1038/s41396-018-0319-2>
- Cesarano, G., De Filippis, F., La Stora, A., Scala, F., & Bonanomi, G. (2017). Organic amendment type and application frequency affect crop yields, soil fertility and microbiome composition. *Applied Soil Ecology*, 120, 254-264. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2017.08.017>
- Chae, H. S., Jang, G. E., Kim, N. H., Son, H. R., Lee, J. H., Kim, S. H., Son, H. R., Lee, J. H., Kim, S. H., Park, G. N., Jo, H. J., Kim, J. T., & Chang, K. S. (2012). Classification of *Cryptococcus neoformans* and yeast-like fungus isolates from pigeon droppings by colony phenotyping and ITS genotyping and their seasonal variations in Korea. *Avian Diseases*, 56(1), 58-64. <https://doi.org/10.1637/9703-030711-Reg.1>
- Chambers, A., Cibrián-Jaramillo, A., Karremans, A. P., Martinez, D. M., Hernandez-Hernandez, J., Brym, M., Resende Jr. M. F. R., Moloney, R., Sierra, S. N., Hasing, T., Alomia, Y.

- A., Hu, Y., & Vanilla Genotyping Consortium. (2021). Genotyping-By-Sequencing diversity analysis of international *Vanilla* collections uncovers hidden diversity and enables plant improvement. *Plant Science*, *311*, 111019. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2021.111019>
- Chang, C. F., Liu, Y. R., Chen, S. F., Naumov, G. I., Naumova, E. S., & Lee, C. F. (2012). Five novel species of the anamorphic genus *Candida* in the *Cyberlindnera* clade isolated from natural substrates in Taiwan. *Antonie Van Leeuwenhoek*, *102*(1), 9-21. <https://doi.org/10.1007/s10482-012-9708-0>
- Chase, A. B., Arevalo, P., Polz, M. F., Berlemont, R., & Martiny, J. B. (2016). Evidence for ecological flexibility in the cosmopolitan genus *Curtobacterium*. *Frontiers in Microbiology*, *7*, 1874. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01874>
- Chaudhary, N., Sharma, A. K., Agarwal, P., Gupta, A. & Sharma, V. K. (2015). 16S classifier: a tool for fast and accurate taxonomic classification of 16S rRNA hypervariable regions in metagenomic datasets. *PloS One*, *10*(2), e0116106. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116106>
- Chen, Y. G., Gu, F. L., Li, J. H., Xu, F., He, S. Z. & Fang, Y. M. (2015b). *Bacillus vanillea* sp. nov., isolated from the cured *Vanilla* bean. *Current Microbiology*, *70*(2), 235-239. <https://doi.org/10.1007/s00284-014-0707-4>
- Chen, Y., Gu, F., Li, J., He, S., Xu, F. & Fang, Y. (2015a). Involvement of colonising *Bacillus* isolates in glucovanillin hydrolysis during the curing of *Vanilla planifolia* Andrews. *Applied and Environmental Microbiology*, *81*, 4947-4954. <https://doi.org/10.1128/AEM.00458-15>
- Chen, Z., Meng, T., Li, Z., Liu, P., Wang, Y., He, N., & Liang, D. (2017). Characterization of a beta-glucosidase from *Bacillus licheniformis* and its effect on bioflocculant degradation. *AMB Express*, *7*(1), 1-7. <https://doi.org/10.1186/s13568-017-0501-3>
- Choi, I. S., Wi, S. G., Jung, S. R., Patel, D. H., & Bae, H. J. (2009). Characterization and application of recombinant β -glucosidase (BglH) from *Bacillus licheniformis* KCTC 1918. *Journal of Wood Science*, *55*(5), 329-334. <https://doi.org/10.1007/s10086-009-1044-2>

- Ciriminna, R., Fidalgo, A., Meneguzzo, F., Parrino, F., Ilharco, L. M., & Pagliaro, M. (2019). Vanillin: The case for greener production driven by sustainability megatrend. *ChemistryOpen*, 8(6), 660-667. <https://doi.org/10.1002/open.201900083>
- Compant, S., Samad, A., Faist, H., & Sessitsch, A. (2019). A review on the plant microbiome: Ecology, functions, and emerging trends in microbial application. *Journal of Advanced Research*, 19, 29-37. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2019.03.004>
- Corda, G., Solari, P., Dettori, M. A., Fabbri, D., Delogu, G., Crnjar, R., & Sollai, G. (2020). Association between olfactory sensitivity and behavioral responses of *Drosophila suzukii* to naturally occurring volatile compounds. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 104(3), e21669-e21683. <https://doi.org/10.1002/arch.21669>
- Coto-Calvo, B., & Wang-Wong, A. (1995). Evaluación de cinco tratamientos químicos para el combate de la bacteriosis (*Erwinia sp.*) en frutos de mango variedad Tommy Atkins, en Turubares, Costa Rica. *Agronomía Costarricense.*, 19(1), 15-20.
- Coutinho, T. C., Rojas, M. J., Tardioli, P. W., Paris, E. C., & Farinas, C. S. (2018). Nanoimmobilization of β -glucosidase onto hydroxyapatite. *International Journal of Biological Macromolecules*, 119, 1042-1051. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.08.042>
- Cristóbal, H. A., Breccia, J. D. & Abate, C. M. (2008). Isolation and molecular characterization of *Shewanella sp.* G5, a producer of cold-active β -D-glucosidases. *Journal of Basic Microbiology*, 48(1), 16-24. <https://doi.org/10.1002/jobm.200700146>
- Crous, P. W., Gams, W., Stalpers, J. A., Robert, V., & Stegehuis, G. (2004). MycoBank: an online initiative to launch mycology into the 21st century. *Studies in Mycology*, 50(1), 19-22.
- Daenen, L., Saison, D., Sterckx, F., Delvaux, F. R., Verachtert, H. & Derdelinckx, G. (2008). Screening and evaluation of the glucoside hydrolase activity in *Saccharomyces* and *Brettanomyces* brewing yeasts. *Journal of Applied Microbiology*, 104(2), 478-488. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03566.x>

- Das, S., Jean, J. S., Kar, S., Chou, M. L. & Chen, C. Y. (2014). Screening of plant growth-promoting traits in arsenic-resistant bacteria isolated from agricultural soil and their potential implication for arsenic bioremediation. *Journal of Hazardous Materials*, 272, 112-120. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.03.012>
- Decreto ejecutivo de la Republica de Costa Rica. (18 de setiembre del 2001). Reglamento de Agricultura Orgánica N° 29782-MAG. La Gaceta N°179 del 18 de setiembre del 2001.
- Delgado, L., Heckmann, C. M., De Benedetti, S., Nardini, M., Gourlay, L. J., & Paradisi, F. (2021). Producing natural vanilla extract from green vanilla beans using a β -glucosidase from *Alicyclobacillus Acidiphilus*. *Journal of Biotechnology*, 329, 21-28. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2021.01.017>
- Departamento de agricultura de Estados Unidos, Servicio de Comercialización Agrícola, Programa Nacional Organico. (2011). National organic program handbook: Guidance and instructions for accredited certifying agents and certified operations. Tomado de <https://www.ams.usda.gov/rules-regulations/organic/handbook>.
- Dey, S., Dutta, P., & Majumdar, S. (2019). Biological Control of *Macrophomina phaseolina* in *Vigna mungo* L. by endophytic *Klebsiella pneumoniae* HR1. *Jordan Journal of Biological Sciences*, 12(2), 219-227.
- Dhanalakshmi, C., Manivasagam, T., Nataraj, J., Justin Thenmozhi, A. & Essa, M. M. (2015). Neurosupportive role of vanillin, a natural phenolic compound, on rotenone induced neurotoxicity in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015, 626028. <https://doi.org/10.1155/2015/626028>
- Díez Gómez, M. C. (2014). *Ecofisiología de la vainilla Vanilla planifolia Andrews*. (Tesis de Doctora, Universidad Nacional de Colombia). Recuperado de <http://www.bdigital.unal.edu.co/49347/1/43054505.2015.pdf>
- Dignum, M. J., Kerler, J. & Verpoorte, R. (2002). *Vanilla* curing under laboratory conditions. *Food Chemistry*, 79(2), 165-171. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00125-5](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00125-5)

- Dong, C. J., Wang, L. L., Li, Q., & Shang, Q. M. (2019). Bacterial communities in the rhizosphere, phyllosphere and endosphere of tomato plants. *PLoS One*, *14*(11), e0223847. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0223847>
- Dong, W., Xue, M., Zhang, Y., Xin, F., Wei, C., Zhang, W., Hao Wu, H., Ma, J., & Jiang, M. (2017). Characterization of a β -glucosidase from *Paenibacillus* species and its application for succinic acid production from sugarcane bagasse hydrolysate. *Bioresour. Technol.*, *241*, 309-316. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.05.141>
- Dong, Z., Gu, F., Xu, F. & Wang, Q. (2014). Comparison of four kinds of extraction techniques and kinetics of microwave-assisted extraction of vanillin from *Vanilla planifolia* Andrews. *Food Chemistry*, *149*, 54-61. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.10.052>
- Du, L., Wang, Z., Zhao, Y., Huang, J., Pang, H., Wei, Y., Lin, L., & Huang, R. (2014). A [beta]-glucosidase from *Novosphingobium* sp. GX9 with high catalytic efficiency toward isoflavonoid glycoside hydrolysis and (+)-catechin transglycosylation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *98*(16), 7069-7080. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5661-3>
- Duan, C. J., Xian, L., Zhao, G. C., Feng, Y., Pang, H., Bai, X. L., Tang, J. L, Ma., Q. S., & Feng, J. X. (2009). Isolation and partial characterization of novel genes encoding acidic cellulases from metagenomes of buffalo rumens. *Journal of Applied Microbiology*, *107*(1), 245-256. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04202.x>
- Duarte, A. W. F., Dos Santos, J. A., Vianna, M. V., Vieira, J. M. F., Mallagutti, V. H., Inforsato, F. J., Pinto Wentzel, L. C., Lario, L. D., Rodrigues, A., Pagnocca, F. C., Junior, A. P., & Durães Sette, L. (2018). Cold-adapted enzymes produced by fungi from terrestrial and marine Antarctic environments. *Critical Reviews in Biotechnology*, *38*(4), 600-619. <https://doi.org/10.1080/07388551.2017.1379468>
- Dutta, S. G., Shaik, A. B., Kumar, C. G., & Kamal, A. (2017). Statistical optimization of production conditions of β -glucosidase from *Bacillus stratosphericus* strain SG9. *3 Biotech*, *7*(3), 221-236. <https://doi.org/10.1007/s13205-017-0866-7>

- Earl, J. P., Adappa, N. D., Krol, J., Bhat, A. S., Balashov, S., Ehrlich, R. L., Palmer, J. N., Workman, A. D., Blasetti, M., Sen, B., Hammond, J., Cohen, N. A., Ehrlich, G. D., & Mell, J. C. (2018). Species-level bacterial community profiling of the healthy sinonasal microbiome using Pacific Biosciences sequencing of full-length 16S rRNA genes. *Microbiome*, *6*(1), 1-26. <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0569-2>
- Edberg, S. C., Chaskes, S. J., Altire-Werber, E., & Singer, J. M. (1980). Esculin-based medium for isolation and identification of *Cryptococcus neoformans*. *Journal of Clinical Microbiology*, *12*(3), 332-335. <https://doi.org/10.1128/jcm.12.3.332-335.1980>
- Edgar, R. (2010). *Usearch*. Lawrence Berkeley National Lab. (LBNL), Berkeley, CA (United States).
- Edgar, R. C. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic acids Research*, *32*(5), 1792-1797. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh340>
- Edgar, R. C. (2018). Updating the 97% identity threshold for 16S ribosomal RNA OTUs. *Bioinformatics*, *34*(14), 2371-2375. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty113>
- Ellestad, P., Forest, F., Serpe, M., Novak, S. J., & Buerki, S. (2021). Harnessing large-scale biodiversity data to infer the current distribution of *Vanilla planifolia* (Orchidaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, *196*(3), 407-422. <https://doi.org/10.1093/botlinnean/boab005>
- Elleuche, S., Schröder, C., Sahn, K. & Antranikian, G. (2014). Extremozymes—biocatalysts with unique properties from extremophilic microorganisms. *Current Opinion in Biotechnology*, *29*, 116-123. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2014.04.003>
- Ellingham, O., David, J., & Culham, A. (2019). Enhancing identification accuracy for powdery mildews using previously underexploited DNA loci. *Mycologia*, *111*(5), 798-812. <https://doi.org/10.1080/00275514.2019.1643644>
- Elyas, K. K., Mathew, A., Sukumaran, R. K., Ali, P. M., Sapna, K., Kumar, S. R., & Mol, K. R. (2010). Production optimization and properties of beta glucosidases from a marine fungus

- Aspergillus*-SA 58. *New Biotechnology*, 27(4), 347-351.
<https://doi.org/10.1016/j.nbt.2010.02.007>
- Escribano, R., González-Arenzana, L., Garijo, P., Berlanas, C., López-Alfaro, I., López, R., Gutiérrez, A. R., & Santamaría, P. (2017). Screening of enzymatic activities within different enological non-*Saccharomyces* yeasts. *Journal of Food Science and Technology*, 54(6), 1555–1564. <https://doi.org/10.1007/s13197-017-2587-7>
- Esmael, Q., Jacquard, C., Sanchez, L., Clément, C., & Barka, E. A. (2020). The mode of action of plant associated *Burkholderia* against grey mould disease in grapevine revealed through traits and genomic analyses. *Scientific Reports*, 10(1), 1-14. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-76483-7>
- Espinoza-Pérez, J., Díaz-Bautista, M., Barrales-Cureño, H. J., Edgar, B., Herrera-Cabrera, M. A. S. Q., Juárez-Bernabe, Y., & Reyes, C. (2019). Floristic biodiversity in *Vanilla planifolia* agroecosystems in the Totonacapan region of Mexico. *Biocell*, 43(7-1), 440-452.
- Esquivel-Hernández, G. (2018). *Análisis integrado de variabilidad climática, dinámica de precipitación y conflictos por el agua para la gestión del recurso hídrico en Costa Rica*. (Tesis de doctorado, Universidad Estatal a Distancia, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Universidad Nacional de Costa Rica). Recuperado de https://repositoriotec.tec.ac.cr/bitstream/handle/2238/10694/An%C3%A1lisis_integrado_de_variabilidad_clim%C3%A1tica_din%C3%A1mica_de_precipitaci%C3%B3n_y_conflictos_por_el_agua_para_la_gesti%C3%B3n_del_recurso_h%C3%ADrico_en_Costa_Rica.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Fajarningsih, N. D. (2016). Internal Transcribed Spacer (ITS) as DNA barcoding to identify fungal species: a review. *Squalen Bulletin of Marine and Fisheries Postharvest and Biotechnology*, 11(2), 37-44. <https://doi.org/10.15578/squalen.v11i2.213>
- Falk, K. L., Kästner, J., Bodenhausen, N., Schramm, K., Paetz, C., Vassão, D. G., REICHELTL, M., Knorre, D. V., Bergelson, J., Erb, M., Gershenzon, J., & Meldau, S. (2014). The role of glucosinolates and the jasmonic acid pathway in resistance of *Arabidopsis thaliana* against molluscan herbivores. *Molecular Ecology*, 23(5), 1188-1203. <https://doi.org/10.1111/mec.12610>

- Fang, S., Chang, J., Seok-Lee, Y., Guo, W., Lark Choi, Y. & Zhou, Y. (2014). Cloning and characterization of a new broad specific β -glucosidase from *Lactococcus* sp. FSJ4. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30(1), 213-223. <https://doi.org/10.1007/s11274-013-1444-8>
- FAOSTAT. (2021). Production quantities of *Vanilla* by country 2019. <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL/visualize>
- Fedele, G., Donatti, C. I., Bornacelly, I., & Hole, D. G. (2021). Nature-dependent people: Mapping human direct use of nature for basic needs across the tropics. *Global Environmental Change*, 102368. <https://doi.org/10.1016/j.gloenvcha.2021.102368>
- Fia, G., Giovani, G. & Rosi, I. (2005). Study of β -glucosidase production by wine-related yeasts during alcoholic fermentation. A new rapid fluorimetric method to determine enzymatic activity. *Journal of Applied Microbiology*, 99(3), 509–517. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02657.x>
- Fouad, A. A., Amin, E. F., & Ahmed, A. F. (2020). Naringenin and vanillin mitigate cadmium-induced pancreatic injury in rats via inhibition of JNK and p38 MAPK pathways. *Pharmacognosy Journal*, 12(4), 742-748. <https://doi.org/10.5530/pj.2020.12.107>
- Frank, J. A., Reich, C. I., Sharma, S., Weisbaum, J. S., Wilson, B. A. & Olsen, G. J. (2008). Critical evaluation of two Primers commonly used for amplification of bacterial 16S rRNA genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(8), 2461–2470. <https://doi.org/10.1128/AEM.02272-07>
- Freimoser, F. M., Rueda-Mejia, M. P., Tilocca, B., & Migheli, Q. (2019). Biocontrol yeasts: mechanisms and applications. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 35(10), 154-173. <https://doi.org/10.1007/s11274-019-2728-4>
- Fu, Y., Yin, Z., Wu, L. & Yin, C. (2014). Diversity of cultivable β -glycosidase-producing microorganisms isolated from the soil of a ginseng field and their ginsenosides-hydrolysing activity. *Letters in Applied Microbiology*, 58(2), 138-144. <https://doi.org/10.1111/lam.12166>

- Fukuta, Y., Shirasaka, N., Ikenaga, C., Kusuda, M., Yamauchi, M., & Terashita, T. (2013). Purification and characterization of endo-type cellulase of *Hypoxylon truncatum*, a companion fungus of *Tremella fuciformis*. *Mushroom Science and Biotechnology*, 21(3), 123-128. https://doi.org/10.24465/msb.21.3_123
- Funke, G., Aravena-Roman, M., & Frodl, R. (2005). First description of *Curtobacterium* spp. isolated from human clinical specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(3), 1032-1036. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.3.1032-1036.2005>
- Gaensly, F. (2016). *Seleção de leveduras vînicas autóctones produtoras da enzima b-glicosidade em mosto de uvas Vitis labrusca visando o aumento do teor de resveratrol livre*. (Tesis de doctorado, Universidade Federal do Paraná). Recuperado de <http://acervodigital.ufpr.br/bitstream/handle/1884/44051/R%20-%20T%20-%20FERNANDA%20GAENSLY.pdf?sequence=3&isAllowed=y>
- Galal, F. H., & Seufi, A. M. (2020). Molecular characterization of cultivable bacteria associated with adult *Schistocerca gregaria*, using 16S rRNA. *Journal of Taibah University for Science*, 14(1), 605-614. <https://doi.org/10.1080/16583655.2020.1760537>
- Gallage, N. J. & Møller, B. L. (2015). Vanillin–bioconversion and bioengineering of the most popular plant flavor and its de novo biosynthesis in the *Vanilla* orchid. *Molecular Plant*, 8(1), 40-57. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2014.11.008>
- Gallage, N. J., Hansen, E. H., Kannangara, R., Olsen, C. E., Motawia, M. S., Jørgensen, K., Inger Holme, I., Hebelstrup, K., Grisoni, M., & Møller, B. L. (2014). Vanillin formation from ferulic acid in *Vanilla planifolia* is catalysed by a single enzyme. *Nature Communications*, 5(1), 1-13. <https://doi.org/10.1038/ncomms5037>
- Gallage, N. J., Jørgensen, K., Janfelt, C., Nielsen, A. J., Naake, T., Duński, E., Dalsten, L., Grisoni, M., & Møller, B. L. (2018). The intracellular localization of the vanillin biosynthetic machinery in pods of *Vanilla planifolia*. *Plant and Cell Physiology*, 59(2), 304-318. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcx185>
- Gamboa-Gaitán, M. A. & Otero-Ospina, J. T. (2016). Colombian vanilla and its microbiota. III. Diversity and structure of the endophytic community. *Acta Botanica Hungarica*, 58(3-4), 241-256. <https://doi.org/10.1556/abot.58.2016.3-4.2>

- Gamboa-Gaitán, M. Á. (2014). Vainillas colombianas y su microbiota. II. Diversidad, cultivo y microorganismos endófitos. *Universitas Scientiarum*, 19(3), 287-300.
- García, M., Esteve-Zarzoso, B., Cabellos, J. M., & Arroyo, T. (2018). Advances in the Study of *Candida stellata*. *Fermentation*, 4(3), 74-96.
<https://doi.org/10.3390/fermentation4030074>
- García-Fraile, P., Chudíčková, M., Benada, O., Pikula, J., & Kolařík, M. (2015). *Serratia myotis* sp. nov. and *Serratia vespertilionis* sp. nov., isolated from bats hibernating in caves. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 65(1), 90-94.
<https://doi.org/10.1099/ijs.0.066407-0>
- Geiger, A., Fardeau, M. L., Falsen, E., Ollivier, B., & Cuny, G. (2010). *Serratia glossinae* sp. nov., isolated from the midgut of the tsetse fly *Glossina palpalis gambiensis*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60(6), 1261-1265. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.013441-0>
- General, T., Mamatha, V., Divya, V. & Appaiah, K. A. A. (2009). Diversity of yeast with β -glycosidase activity in vanilla (*Vanilla planifolia*) plant. *Current Science*, 96(11), 1501-1505.
- Ghio, S., Bradanini, M. B., Garrido, M. M., Ontañón, O. M., Piccinni, F. E., de Villegas, R. M. D., Talia, P. M., & Campos, E. (2020). Synergic activity of Cel8Pa β -1, 4 endoglucanase and Bg1Pa β -glucosidase from *Paenibacillus xylanivorans* A59 in beta-glucan conversion. *Biotechnology Reports*, 28, e00526.
<https://doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00526>
- Ghio, S., Ontañón, O., Piccinni, F. E., de Villegas, R. M. D., Talia, P., Grasso, D. H., & Campos, E. (2018). *Paenibacillus* sp. A59 GH10 and GH11 extracellular endoxylanases: application in biomass bioconversion. *BioEnergy Research*, 11(1), 174-190.
<https://doi.org/10.1007/s12155-017-9887-7>
- Gil Muñoz, J. (2015). Estudio de las β -D-glucosidasas del complejo celulítico de *Talaromyces amestolkiae*: caracterización y aplicaciones biotecnológicas. (Tesis de Doctorado, Universidad Complutense de Madrid). Recuperado de: <http://eprints.ucm.es/32999/1/T36342.pdf>

- Gilbert, K. J., & Renner, T. (2021). Acid or base? How do plants regulate the ecology of their phylloplane?. *AoB Plants*, *13*(4), 1-14. <https://doi.org/10.1093/aobpla/plab032>
- Glushakova, A. M., Ivannikova, Y. V., Naumova, E. S., Chernov, I. Y., & Naumov, G. I. (2007). Massive isolation and identification of *Saccharomyces paradoxus* yeasts from plant phyllosphere. *Microbiology*, *76*(2), 205-210. <https://doi.org/10.1134/S0026261707020129>
- Goettsch, B., Urquiza-Haas, T., Koleff, P., Acevedo Gasman, F., Aguilar-Meléndez, A., Alavez, V., Gabriel Alejandro-Iturbide, G., Cuevas, F. A., Pérez, C. A., Carr, J. A., Castellanos-Morales, G., Cerén, G., Contreras-Toledo, A. R., Correa-Cano, M. E., De la Cruz Larios, L., Debouck, D. G., Delgado-Salinas, A., Gómez-Ruiz, E. P., González-Ledesma, M.,... & Jenkins, R. K. (2021). Extinction risk of Mesoamerican crop wild relatives. *Plants, People, Planet*, *3*(6), 775-795. <https://doi.org/10.1002/ppp3.10225>
- Gong, T., & Xin, X. F. (2021). Phyllosphere microbiota: Community dynamics and its interaction with plant hosts. *Journal of Integrative Plant Biology*, *63*(2), 297-304. <https://doi.org/10.1111/jipb.13060>
- González-Chávez, M. D. C. A., Torres-Cruz, T. J., Sánchez, S. A., Carrillo-González, R., Carrillo-López, L. M., & Porrás-Alfaro, A. (2018). Microscopic characterization of orchid mycorrhizal fungi: *Scleroderma* as a putative novel orchid mycorrhizal fungus of *Vanilla* in different crop systems. *Mycorrhiza*, *28*(2), 147-157. <https://doi.org/10.1007/s00572-017-0808-6>
- González-Pombo, P., Pérez, G., Carrau, F., Guisán, J. M., Batista-Viera, F., & Brena, B. M. (2008). One-step purification and characterization of an intracellular β -glucosidase from *Metschnikowia pulcherrima*. *Biotechnology Letters*, *30*(8), 1469-1475. <https://doi.org/10.1007/s10529-008-9708-3>
- Grisoni, M., & Nany, F. (2021). The beautiful hills: half a century of vanilla (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews) breeding in Madagascar. *Genetic Resources and Crop Evolution*, *68*, 1-18. <https://doi.org/10.1007/s10722-021-01119-2>
- Gu, F., Chen, Y., Fang, Y., Wu, G. & Tan, L. (2015). Contribution of *Bacillus* isolates to the flavor profiles of vanilla beans assessed through aroma analysis and

- chemometrics. *Molecules*, 20(10), 18422-18436.
<https://doi.org/10.3390/molecules201018422>
- Gu, F., Chen, Y., Hong, Y., Fang, Y., & Tan, L. (2017). Comparative metabolomics in *Vanilla* pod and *Vanilla* bean revealing the biosynthesis of vanillin during the curing process of *Vanilla*. *Amb Express*, 7(1), 1-9. <https://doi.org/10.1186/s13568-017-0413-2>
- Gu, F., Xu, F., Tan, L., Wu, H., Chu, Z., & Wang, Q. (2012). Optimization of enzymatic process for vanillin extraction using response surface methodology. *Molecules*, 17(8), 8753-8761. <https://doi.org/10.3390/molecules17088753>
- Gueguen, Y., Chemardin, P., & Arnaud, A. (2001). Purification and characterization of an intracellular β -glucosidase from a *Candida sake* strain isolated from fruit juices. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 95(3), 151-162. <https://doi.org/10.1385/ABAB:95:3:151>
- Guindon, S., Dufayard, J. F., Lefort, V., Anisimova, M., Hordijk, W., & Gascuel, O. (2010). New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Systematic Biology*, 59(3), 307-321. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syq010>
- Guo, F., Ju, F., Cai, L. & Zhang, T. (2013). Taxonomic precision of different hypervariable regions of 16S rRNA gene and annotation methods for functional bacterial groups in biological wastewater treatment. *PloS One*, 8(10), e76185. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076185>
- Hahnke, R. L., Bennke, C. M., Fuchs, B. M., Mann, A. J., Rhiel, E., Teeling, H., Amann, R., & Harder, J. (2015). Dilution cultivation of marine heterotrophic bacteria abundant after a spring phytoplankton bloom in the North Sea. *Environmental Microbiology*, 17(10), 3515-3526. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12479>
- Hakim, L., Siswanto, D., Rahardi, B., & Zayadi, H. (2019). Fostering coffee agroforestry for agrotourism development in degraded land in a buffer zone of a national park: A case study from Poncokusumo, Malang, Indonesia. *EurAsian Journal of BioSciences*, 13(2), 1613-1620.

- Hakulinen, N., Paavilainen, S., Korpela, T., & Rouvinen, J. (2000). The crystal structure of β -glucosidase from *Bacillus circulans* sp. alkalophilus: ability to form long polymeric assemblies. *Journal of Structural Biology*, 129(1), 69-79. <https://doi.org/10.1006/jsbi.1999.4206>
- Hameed, A., Hung, M. H., Lin, S. Y., Hsu, Y. H., Liu, Y. C., Shahina, M., , Wei-An Lai¹, W. A., Huang, H. C., Young, L. S., & Young, C. C. (2013). *Cohnellaformosensis* sp. nov., a xylanolytic bacterium isolated from the rhizosphere of *Medicago sativa* L. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63(8), 2806-2812. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.045831-0>
- Hayek, S. A., Shahbazi, A., Worku, M. & Ibrahim, S. A. (2013). Enzymatic activity of *Lactobacillus reuteri* grown in a sweet potato based medium with the addition of metal ions. *SpringerPlus*, 2(1), 1-10. <https://doi.org/10.1186/2193-1801-2-465>
- Hernández, L. F., Espinosa, J. C., Fernández-González, M. & Briones, A. (2003). *B-D-glucosidase* activity in a *Saccharomyces cerevisiae* wine strain. *International Journal of Food Microbiology*, 80(2), 171–176. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00149-6](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00149-6)
- Herrera, H., Sanhueza, T., Novotná, A., Charles, T. C., & Arriagada, C. (2020). Isolation and identification of endophytic bacteria from mycorrhizal tissues of terrestrial orchids from southern Chile. *Diversity*, 12(2), 55-67. <https://doi.org/10.3390/d12020055>
- Herrera-Cabrera, B. E., Salazar-Rojas, V. M., Delgado-Alvarado, A., Contreras, J., Contreras, C. & Cervantes-Vargas, J. (2012). Use and conservation of *Vanilla planifolia* J. in the Totonacapan Region, México. *European Journal of Environmental Sciences*, 2(1), 43-50. <https://doi.org/10.14712/23361964.2015.37>
- Heyrman, J., Logan, N. A., Rodríguez-Díaz, M., Scheldeman, P., Lebbe, L., Swings, J., Heyndrickx, M., & De Vos, P. (2005). Study of mural painting isolates, leading to the transfer of ‘*Bacillus maroccanus*’ and ‘*Bacillus carotarum*’ to *Bacillus simplex*, emended description of *Bacillus simplex*, re-examination of the strains previously attributed to ‘*Bacillus macroides*’ and description of *Bacillus muralis* sp. nov. *International Journal*

- of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(1), 119-131.
<https://doi.org/10.1099/ijs.0.63221-0>
- Hilário, S., Santos, L., Phillips, A. J., & Alves, A. (2022). Caveats of the internal transcribed spacer region as a barcode to resolve species boundaries in Diaporthe. *Fungal Biology*, 126(1), 54-74. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2021.10.005>
- Hu, Y., Resende, M. F., Bombarely, A., Brym, M., Bassil, E., & Chambers, A. H. (2019). Genomics-based diversity analysis of Vanilla species using a *Vanilla planifolia* draft genome and Genotyping-By-Sequencing. *Scientific Reports*, 9(1), 1-16. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40144-1>
- Huang, H. C., Hsieh, T. F., & Erickson, R. S. (2003). Biology and epidemiology of *Erwinia rhapontici*, causal agent of pink seed and crown rot of plants. *Plant Pathology*, 12, 69-76.
- Huelsenbeck, J. P., & Ronquist, F. (2001). MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics*, 17(8), 754-755.
- Hurtado, F. M., Mina, R. T. G., Flanagan, N. S. & Otero, J. T. (2014). *Vanilla rivassii* (orchidaceae), a new species from the Colombian pacific region. *Lankesteriana*, 13(3), 353-357. <https://doi.org/10.15517/LANK.V13I3.14423>
- Hutajulu, I. B. E., Kulla, P. D. K., & Retnaningrum, E. (2021). Diversity of lactic acid bacteria isolated during fermentation of indigenous cassava obtained from Sumba, East Nusa Tenggara, Indonesia. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, 22(7), 2561-2570. <https://doi.org/10.13057/biodiv/d220703>
- International Union for Conservation of Nature. *Red list of threatened species, 2016*. Recuperado de <http://www.iucnredlist.org/search>
- Into, P., Pontes, A., Sampaio, J. P., & Limtong, S. (2020). Yeast diversity associated with the phylloplane of corn plants cultivated in Thailand. *Microorganisms*, 8(1), 80-104. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8010080>
- Isidro, S. A. (2003). Producción del cultivo de vainilla *Vanilla planifolia* Andrews y su importancia en el mercado nacional y mundial. (Tesis de Bachiller, Universidad

- Autónoma Agraria Antonio Narro). Recuperado de [http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/1282/PRODUCCION%20DEL%20CULTIVO%20DE%20VAINILLA%20\(vanilla%20planipolia%20and%20icelus\)%20Y%20SU%20IMPORTANCIA%20EN%20EL%20MERCADO%20NACIONAL%20Y%20MUNDIAL.pdf?sequence=1](http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/1282/PRODUCCION%20DEL%20CULTIVO%20DE%20VAINILLA%20(vanilla%20planipolia%20and%20icelus)%20Y%20SU%20IMPORTANCIA%20EN%20EL%20MERCADO%20NACIONAL%20Y%20MUNDIAL.pdf?sequence=1)
- Isorna, P., Polaina, J., Latorre-García, L., Cañada, F. J., González, B., & Sanz-Aparicio, J. (2007). Crystal structures of *Paenibacillus polymyxa* β -glucosidase B complexes reveal the molecular basis of substrate specificity and give new insights into the catalytic machinery of family I glycosidases. *Journal of Molecular Biology*, *371*(5), 1204-1218. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2007.05.082>
- Jacquemyn, H., Lenaerts, M., Tyteca, D., & Lievens, B. (2013). Microbial diversity in the floral nectar of seven *Epipactis* (*Orchidaceae*) species. *MicrobiologyOpen*, *2*(4), 644-658. <https://doi.org/10.1002/mbo3.103>
- Jae-Won, L., Ye-Eun, K., & Park, S. J. (2018). *Burkholderia alba* sp. nov., isolated from a soil sample on Halla mountain in Jeju island. *The Journal of Microbiology*, *56*(5), 312-316. <https://doi.org/10.1007/s12275-018-8034-2>
- Jensen, B., Knudsen, I. M., Andersen, B., Nielsen, K. F., Thrane, U., Jensen, D. F. & Larsen, J. (2013). Characterization of microbial communities and fungal metabolites on field grown strawberries from organic and conventional production. *International Journal of Food Microbiology*, *160*(3), 313-322. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.11.005>
- Jiang, C., Ma, G., Li, S., Hu, T., Che, Z., Shen, P., Yan, B., & Wu, B. (2009). Characterization of a novel β -glucosidase-like activity from a soil metagenome. *The Journal of Microbiology*, *47*(5), 542-548. <https://doi.org/10.1007/s12275-009-0024-y>
- Jiménez, J., Kulko, E., Veloz, E., Barron, E., Ibrahim, B., Flannery, T., Margolis, B., Das, P., Mateo, J., & Aponte, T. (2015). 16S rRNA identification of microorganisms and direct detection of functional genes in waste material generated by an in-vessel rotating compost system. *EC Microbiology*, *1*(3), 129-142.
- Jiménez-Quesada, K., Schmidt-Durán, A., Quesada-Montero, K. & Moreira-González, I. (2015). Aislamiento de una bacteria endófitas de vainilla (*Vanilla planifolia*) con actividad

- biocontroladora in vitro contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *Vanillae*. *Revista Tecnología en Marcha*, 28(2), 116-125.
- Johnson, E. T., Dowd, P. F., Skory, C. D., & Dunlap, C. A. (2021). Description of *Cohnella zeiphila* sp. nov., a bacterium isolated from maize callus cultures. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 114(1), 37-44. <https://doi.org/10.1007/s10482-020-01495-2>
- Johnson, J. S., Spakowicz, D. J., Hong, B. Y., Petersen, L. M., Demkowicz, P., Chen, L., Leopold, S. R., Blake M. Hanson, B. M., Agresta, H. O., Gerstein, M., Sodergren, E., & Weinstock, G. M. (2019). Evaluation of 16S rRNA gene sequencing for species and strain-level microbiome analysis. *Nature Communications*, 10(1), 1-11. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13036-1>
- Kajale, S., Deshpande, N., Pali, S., Shouche, Y., & Sharma, A. (2020). *Natrialba swarupiae* sp. nov., a halophilic archaeon isolated from a hypersaline lake in India. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70(3), 1876-1881. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003986>
- Kämpfer, P., Busse, H. J., Kloepper, J. W., Hu, C. H., McInroy, J. A., & Glaeser, S. P. (2016). *Paenibacillus cucumis* sp. nov., isolated from a cucumber plant. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66(7), 2599-2603. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001087>
- Kapli, P., Yang, Z., & Telford, M. J. (2020). Phylogenetic tree building in the genomic age. *Nature Reviews Genetics*, 21(7), 428-444. <https://doi.org/10.1038/s41576-020-0233-0>
- Karhukorpi, J., & Päivänurmi, M. (2014). Differentiation of *Yersinia enterocolitica* biotype 1A from pathogenic *Yersinia enterocolitica* biotypes by detection of β -glucosidase activity: comparison of two chromogenic culture media and Vitek2. *Journal of Medical Microbiology*, 63(1), 34-37. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.062521-0>
- Karremans, A. P., Chinchilla, I. F., Rojas-Alvarado, G., Cedeño-Fonseca, M., Alexander, D., & Léotard, G. (2020). A reappraisal of neotropical *Vanilla*. With a note on taxonomic inflation and the importance of alpha taxonomy in biological studies. *Lankesteriana*, 20(3), 395-497. <https://doi.org/10.15517/LANK.V20I3.45203>

- Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Buxton, S., Cooper, A., Markowitz, S., Duran, C., Thierer, T., Ashton, B., Meintjes, P., & Drummond, A. (2012). Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, 28(12), 1647-1649. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts199>
- Kelso Bucio, H. A., Reyes López, D., Cruz Palacios, M. I., Villegas Rodríguez, I., Rodríguez Morales, B., Pascual Ramírez, F., Mamadou, K., Magaña Hernández, F., & Huerta Gómez, I. (2013). Beneficiado semi-mecanizado de vainilla. *Revista Ciencias Técnicas Agropecuarias*, 22, 38-40.
- Kerppola, T. K., Serwold-Davis, T., Gross, D. C., & Kahn, M. L. (1987). Effect of increased β -glucosidase activity on virulence of *Erwinia amylovora*. *Applied and Environmental Microbiology*, 53(4), 677-682. <https://doi.org/10.1128/AEM.53.4.677-682.1987>
- Keum, D. H., Yeon, J. M., Yun, C. S., Lee, S. Y., & Im, W. T. (2021). *Chryseobacterium panacisoli* sp. nov., isolated from ginseng-cultivation soil with ginsenoside-converting activity. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 71(11), 005086. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.005086>
- Khianggam, S., Tanasupawat, S., Akaracharanya, A., Kim, K. K., Lee, K. C., & Lee, J. S. (2010). *Cohnella thailandensis* sp. nov., a xylanolytic bacterium from Thai soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60(10), 2284-2287. <https://doi.org/10.1099/ijms.0.015859-0>
- Khoyratty, S. (2020). *Potential interference of fungal endophytes in Vanilla planifolia on vanilla flavor compounds biosynthesis*. (Tesis de Doctorado, Universidad de Leiden). Recuperado de <https://scholarlypublications.universiteitleiden.nl/handle/1887/137981>
- Khoyratty, S., Dupont, J., Lacoste, S., Palama, T. L., Choi, Y. H., Kim, H. K., Payet, B., Grisoni, M., Fouillaud, M., Verpoorte, R., & Kodja, H. (2015). Fungal endophytes of *Vanilla planifolia* across Réunion Island: isolation, distribution and biotransformation. *BMC Biología Vegetal*, 15(142), 1-19. <https://doi.org/10.1186/s12870-015-0522-5>

- Khoyratty, S., Kodja, H., & Verpoorte, R. (2018). *Vanilla* flavor production methods: a review. *Industrial Crops and Products*, *125*, 433-442. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.09.028>
- Khunnamwong, P., Surussawadee, J., Ribeiro, J. R., Hagler, A. N., & Limtong, S. (2019). *Tremella saccharicola* fa, sp. nov., a novel tremellaceous yeast species isolated from tropical regions. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *69*(7), 2010-2016. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003420>
- Kieliszek, M. & Misiewicz, A. (2014). Microbial transglutaminase and its application in the food industry. A review. *Folia Microbiologica*, *59*(3), 241-250. <https://doi.org/10.1007/s12223-013-0287-x>
- Kim, H. B., Park, M. J., Yang, H. C., An, D. S., Jin, H. Z., & Yang, D. C. (2006). *Burkholderia ginsengisoli* sp. nov., a β -glucosidase-producing bacterium isolated from soil of a ginseng field. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *56*(11), 2529-2533. <https://doi.org/10.1099/ijms.0.64387-0>
- Kim, M. K., & Jung, H. Y. (2009). *Pseudoclavibacter soli* sp. nov., a β -glucosidase-producing bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *59*(4), 835-838. <https://doi.org/10.1099/ijms.0.65627-0>
- Kim, M. K., Kim, Y. J., Kim, H. B., Kim, S. Y., Yi, T. H., & Yang, D. C. (2008). *Curtobacterium ginsengisoli* sp. nov., isolated from soil of a ginseng field. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *58*(10), 2393-2397. <https://doi.org/10.1099/ijms.0.65591-0>
- Kim, M. K., Lee, J. W., Lee, K. Y., & Yang, D. C. (2005). Microbial conversion of major ginsenoside Rb 1 to pharmaceutically active minor ginsenoside Rd. *The Journal of Microbiology*, *43*(5), 456-462.
- Kim, M., You, Y. H., Woo, J. R., Lee, G. M. & Kong, W. S. (2013). Metagenomic analysis of fungal communities inhabiting the fairy ring zone of *Tricholoma matsutake*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, *23*(10), 1347-1356. <https://doi.org/10.4014/jmb1306.06068>

- Kim, S., Kim, J. H., Lim, J. H., Jeong, J. H., Heo, J. M., & Kim, I. N. (2020). Distribution and control of bacterial community composition in marian cove surface waters, king george island, antarctica during the summer of 2018. *Microorganisms*, 8(8), 1115. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8081115>
- Kinge, T. R., Cason, E. D., Valverde Portal, Á., Nyaga, M., & Gryzenhout, M. (2019). Endophytic seed mycobiome of six sorghum (*Sorghum bicolor*) cultivars from commercial seedlots using an Illumina sequencing approach. *Mycosphere*, 10(1): 739–756. <http://dx.doi.org/10.5943/MYCOSPHERE/10/1/16>
- Knief, C., Dengler, V., Bodelier, P. L., & Vorholt, J. A. (2012). Characterization of *Methylobacterium* strains isolated from the phyllosphere and description of *Methylobacterium longum* sp. nov. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 101(1), 169-183. <https://doi.org/10.1007/s10482-011-9650-6>
- Korthou, H. & Verpoorte, R. (Ed.). (2007). *Flavours and fragrances: Chemistry, bioprocessing and sustainability*. [Versión de Springer]. Recuperado de <https://link.springer.com/book/10.1007/978-3-540-49339-6>
- Kshetri, L., Naseem, F., & Pandey, P. (2019). Role of Serratia sp. as Biocontrol Agent and Plant Growth Stimulator, with Prospects of Biotic Stress Management in Plant. In *Plant Growth Promoting Rhizobacteria for Sustainable Stress Management* (pp. 169-200). Springer, Singapore. <https://link.springer.com/book/10.1007/978-981-13-6536-2>
- Kudryashova, E. B., Karlyshev, A. V., Ariskina, E. V., Streshinskaya, G. M., Vinokurova, N. G., Kopitsyn, D. S., & Evtushenko, L. I. (2018). *Cohnella kolymensis* sp. nov., a novel *Bacillus* isolated from Siberian permafrost. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 68(9), 2912-2917. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002919>
- Kulkarni, G. A. & Chitte, R. R. (2015). A preservation of thermophilic bacterial spores using filter paper disc techniques. *Journal Bioprocessing and Biotechniques*, 5(223), 2-7. <https://doi.org/10.4172/2155-9821.1000223>
- Kumar, S. S., Sujatha, E., & Swetha, K. G. (2015). Optimization and characterization of thermostable β -glucosidase by *Scytalidium thermophilum* SKESMBKU01 and *Humicola* sp. SKESMBKU03. *Octa Journal of Biosciences*, 5(1), 13-19.

- Kumla, J., Nundaeng, S., Suwannarach, N., & Lumyong, S. (2020). Evaluation of multifarious plant growth promoting trials of yeast isolated from the soil of Assam tea (*Camellia sinensis* var. *assamica*) plantations in Northern Thailand. *Microorganisms*, 8(8), 1168-1186. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8081168>
- Kundu, A. (2017). Vanillin biosynthetic pathways in plants. *Planta*, 245, 1069–1078. <https://doi.org/10.1007/s00425-017-2684-x>
- Lee, D. E., Lee, S., Jang, E. S., Shin, H. W., Moon, B. S., & Lee, C. H. (2016). Metabolomic profiles of *Aspergillus oryzae* and *Bacillus amyloliquefaciens* during rice koji fermentation. *Molecules*, 21(6), 773-788. <https://doi.org/10.3390/molecules21060773>
- Lee, F. L., Kuo, H. P., Tai, C. J., Yokota, A., & Lo, C. C. (2007). *Paenibacillus taiwanensis* sp. nov., isolated from soil in Taiwan. *International journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57(6), 1351-1354. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.64764-0>
- Lee, F. L., Tien, C. J., Tai, C. J., Wang, L. T., Liu, Y. C., & Chern, L. L. (2008). *Paenibacillus taichungensis* sp. nov., from soil in Taiwan. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58(11), 2640-2645. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.65776-0>
- Lee, H. W., Roh, S. W., Yim, K. J., Shin, N. R., Lee, J., Whon, T. W., Kim, J. Y., Hyun, D. W., Kim, D., & Bae, J. W. (2013). *Paenibacillus marinisediminis* sp. nov., a bacterium isolated from marine sediment. *Journal of Microbiology*, 51(3), 312-317. <https://doi.org/10.1007/s12275-013-3198-2>
- Lee, J. M., Kim, Y. R., Kim, J. K., Jeong, G. T., Ha, J. C. & Kong, I. S. (2015). Characterization of salt-tolerant [beta]-glucosidase with increased thermostability under high salinity conditions from *Bacillus* sp. SJ-10 isolated from jeotgal, a traditional Korean fermented seafood. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 38(7), 1335-1346. <https://doi.org/10.1007/s00449-015-1375-x>
- Lee, Y., & Jeon, C. O. (2017). *Cohnella algarum* sp. nov., isolated from a freshwater green alga *Paulinella chromatophora*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 67(11), 4767-4772. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002377>

- León Acosta, D. M. (2005). *Estudio de pre-factibilidad para la producción e industrialización de vainilla (Vanilla planifolia Andrews) en la zona de Plan Piloto (Santo Domingo de los Colorados-Pichincha) con fines de exportación* (Tesis de Bachiller, Universidad San Francisco de Quito). Recuperado de <http://repositorio.usfq.edu.ec/bitstream/23000/875/1/91222.pdf>
- Li, A. H., Yuan, F. X., Groenewald, M., Bensch, K., Yurkov, A. M., Li, K., Han, P. J., Guo, L. D., Aime, M. C., Sampaio, J. P., Jindamorakot, S., Turchetti, B., Inacio, J., Fungsin, B., Wang, Q. M., & Ba, F. Y. (2020). Diversity and phylogeny of basidiomycetous yeasts from plant leaves and soil: proposal of two new orders, three new families, eight new genera and one hundred and seven new species. *Studies in Mycology*, *96*, 17-140. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2020.01.002>
- Li, H., Wu, S., Wirth, S., Hao, Y., Wang, W., Zou, H., Li, W., & Wang, G. (2016). Diversity and activity of cellulolytic bacteria, isolated from the gut contents of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) (Valenciennes) fed on Sudan grass (*Sorghum sudanense*) or artificial feedstuffs. *Aquaculture Research*, *47*(1), 153-164. <https://doi.org/10.1111/are.12478>
- Li, L., Shin, S. Y., Lee, S. J., Moon, J. S., Im, W. T., & Han, N. S. (2016). Production of ginsenoside F2 by using *Lactococcus lactis* with enhanced expression of β -glucosidase gene from *Paenibacillus mucilaginosus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *64*(12), 2506-2512. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b04098>
- Li, S., Deng, Y. E., Wang, Z., Zhang, Z., Kong, X., Zhou, W., Yi, Y., & Qu, Y. (2020). Exploring the accuracy of amplicon-based internal transcribed spacer markers for a fungal community. *Molecular Ecology Resources*, *20*(1), 170-184. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13097>
- Liang, Y. L., Zhang, Z., Wu, M., Wu, Y. & Feng, J. X. (2014). Isolation, screening, and identification of cellulolytic bacteria from natural reserves in the subtropical region of China and optimization of cellulase production by *Paenibacillus terraе* ME27-1. *BioMed Research International*, *2014*, 512497. <https://doi.org/10.1155/2014/512497>

- Liew, K. J., Lim, L., Woo, H. Y., Chan, K. G., Shamsir, M. S., & Goh, K. M. (2018). Purification and characterization of a novel GH1 beta-glucosidase from *Jeotgalibacillus malaysiensis*. *International Journal of Biological Macromolecules*, *115*, 1094-1102. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.04.156>
- Limtong, S., Kaewwichian, R., Yongmanitchai, W., & Kawasaki, H. (2014). Diversity of culturable yeasts in phylloplane of sugarcane in Thailand and their capability to produce indole-3-acetic acid. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *30*(6), 1785-1796. <https://doi.org/10.1007/s11274-014-1602-7>
- Lin, S. Y., Chen, W. M., Hameed, A., Huang, G. H., Hung, M. H., & Young, C. C. (2020). *Cohnella fermenti* sp. nov., isolated from a fermentation process. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *70*(4), 2602-2610. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004080>
- Liu, D., Zhang, R., Yang, X., Zhang, Z., Song, S., Miao, Y. & Shen, Q. (2012). Characterization of a thermostable β -glucosidase from *Aspergillus fumigatus* Z5, and its functional expression in *Pichia pastoris* X33. *Microbial Cell Factories*, *11*(1), 1-15. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-11-25>
- Liu, W., Hong, J., Bevan, D. R. & Zhang, Y. H. P. (2009). Fast identification of thermostable beta-glucosidase mutants on cellobiose by a novel combinatorial selection/screening approach. *Biotechnology and Bioengineering*, *103*(6), 1087-1094. <https://doi.org/10.1002/bit.22340>
- Liu, Z. L. & Cotta, M. A. (2015). Technical assessment of cellulosic ethanol production using [beta]-glucosidase producing yeast *Clavispora* NRRL Y-50464. *BioEnergy Research*, *8*(3), 1203-1212. <https://doi.org/10.1007/s12155-014-9575-9>
- Loayza Chávez, J. G. (2019). Elaboración de un plan HACCP y propuesta de validación en la etapa de lavado de la línea de ceviche de pescado del restaurante El Paisa. (Trabajo Académico para optar el Título de: INGENIERO PESQUERO, Universidad Nacional Agraria La Molina). Recuperado de <http://repositorio.lamolina.edu.pe/bitstream/handle/UNALM/4124/loayza-chavez-jessica-graciela.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

- Lokapirnasari, W. P., Nazar, D. S., Nurhajati, T., Supranianondo, K., & Yulianto, A. B. (2015). Production and assay of cellulolytic enzyme activity of *Enterobacter cloacae* WPL 214 isolated from bovine rumen fluid waste of *Surabaya abbatoir*, Indonesia. *Veterinary World*, 8(3), 367-371. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2015.367-371>
- Lombard, V., Ramulu, H.G., Drula, E., Coutinho, P.M. & Henrissat, B. (2014). The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucleic Acids Research*, 42, 490-496. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1178>
- Lopes, M. R., Lara, C. A., Moura, M. E., Uetanabaro, A. P. T., Morais, P. B., Vital, M. J., & Rosa, C. A. (2018). Characterisation of the diversity and physiology of cellobiose-fermenting yeasts isolated from rotting wood in Brazilian ecosystems. *Fungal Biology*, 122(7), 668-676. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2018.03.008>
- López, C. L. Á., Vega, N. W. O., & Montoya, M. M. (2013). Identificación molecular de microorganismos asociados a la rizosfera de plantas de vainilla en Colombia. *Acta Biológica Colombiana*, 18(2), 293-305.
- López-Jácome, L. E., Hernández-Durán, M., Colín-Castro, C. A., Ortega-Peña, S., Cerón-González, G., & Franco-Cendejas, R. (2014). Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología. *Investigación en Discapacidades*, 3(1), 10-18.
- López-López, D. (2013). *Calidad microbiológica y organoléptica de vainilla (Vainilla planifolia Jacks) beneficiada artesanalmente*. (Tesis de Maestría, Instituto de Enseñanza e Investigación en Ciencias Agrícolas). Recuperado de <http://studylib.es/doc/8103222/colégio-de-postgraduados>.
- Lu, H., Sato, Y., Fujimura, R., Nishizawa, T., Kamijo, T., & Ohta, H. (2011). *Limnobacter litoralis* sp. nov., a thiosulfate-oxidizing, heterotrophic bacterium isolated from a volcanic deposit, and emended description of the genus *Limnobacter*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61(2), 404-407. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.020206-0>
- Lu, J., Du, L., Wei, Y., Hu, Y. & Huang, R. (2013). Expression and characterization of a novel highly glucose-tolerant β -glucosidase from a soil metagenome. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 45(8), 664–673. <https://doi.org/10.1093/abbs/gmt061>

- Lubinsky, P., Bory, S., Hernández, J. H., Kim, S. C. & Gómez-Pompa, A. (2008). Origins and dispersal of cultivated *Vanilla* (*Vanilla planifolia* Jacks. [Orchidaceae]). *Economic Botany*, 62(2), 127-138. <https://doi.org/10.1007/s12231-008-9014-y>
- Luna-Guevara, J. J., Ruiz-Espinosa, H., Herrera-Cabrera, E. B., Navarro-Ocaña, A., Delgado-Alvarado, A. & Luna-Guevara, M. L. (2016). Variedad de microflora presente en vainilla (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews) relacionados con procesos de beneficiado. *Agroproductividad*, 9(1), 3-8.
- Luo, L., Zhang, Z., Wang, P., Han, Y., Jin, D., Su, P., Tan, X., Zhang, D., Muhammad-Rizwan, H., Lu, X., & Liu, Y. (2019). Variations in phyllosphere microbial community along with the development of angular leaf spot of cucumber. *AMB Express*, 9(1), 1-13. <https://doi.org/10.1186/s13568-019-0800-y>
- Luziatelli, F., Crognale, S., D'Annibale, A., Moresi, M., Petruccioli, M., & Ruzzi, M. (2014). Screening, isolation, and characterization of glycosyl-hydrolase-producing fungi from desert halophyte plants. *International Microbiology*, 17(1), 41-48. <https://doi.org/10.2436/20.1501.01.206>
- Ma, J., Zhang, K., Liao, H., Hector, S. B., Shi, X., Li, J., Liu, B., Xu, T., Tong, C., Liu, X., & Zhu, Y. (2016). Genomic and secretomic insight into lignocellulolytic system of an endophytic bacterium *Pantoea ananatis* Sd-1. *Biotechnology for Biofuels*, 9(1), 1-15. <https://doi.org/10.1186/s13068-016-0439-8>
- Madden, T. (2013). The BLAST sequence analysis tool. In *The NCBI Handbook. 2nd edition*. National Center for Biotechnology Information (US). Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK143764/>
- Magoye, E., Hilber-Bodmer, M., Pfister, M., & Freimoser, F. M. (2020). Unconventional yeasts are tolerant to common antifungals and *Aureobasidium pullulans* has low baseline sensitivity to captan, cyprodinil, and difenoconazole. *Antibiotics*, 9(9), 602-621. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9090602>
- Maicas, S., Lilao, J., & Mateo, J. J. (2017). Characterization of a β -glucosidase isolated from an alpeorajo strain of *Candida adriatica*. *Food Biotechnology*, 31(2), 114-127. <https://doi.org/10.1080/08905436.2017.1303388>

- Mandic-Mulec, I., Stefanic, P., & van Elsas, J. D. (2015). Ecology of Bacillaceae. *Microbiology spectrum*, 3(2), . <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.TBS-0017-2013>
- Marino, M., Innocente, N., Maifreni, M., Mounier, J., Cobo-Díaz, J. F., Coton, E., Carraro, L., & Cardazzo, B. (2017). Diversity within Italian cheesemaking brine-associated bacterial communities evidenced by massive parallel 16S rRNA gene tag sequencing. *Frontiers in Microbiology*, 8, 2119. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02119>
- Maroniche, G. A., García, J. E., Salcedo, F., & Creus, C. M. (2017). Molecular identification of *Azospirillum* spp.: Limitations of 16S rRNA and qualities of rpoD as genetic markers. *Microbiological Research*, 195, 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2016.11.009>
- Marques, A. R., Coutinho, P. M., Videira, P., Fialho, A. M., & Sá-Correia, I. (2003). *Sphingomonas paucimobilis* beta-glucosidase Bgl1: a member of a new bacterial subfamily in glycoside hydrolase family 1. *Biochemical Journal*, 370(3), 793-804. <https://doi.org/10.1042/BJ20021249>
- Marri, L., Valentini, S., & Venditti, D. (1995). Cloning and nucleotide sequence of the bglA gene from *Erwinia herbicola* and expression of β -glucosidase activity in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letters*, 128(2), 135-138. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1995.tb07512.x>
- Martău, G. A., Călinoiu, L. F., & Vodnar, D. C. (2021). Bio-vanillin: Towards a sustainable industrial production. *Trends in Food Science & Technology*, 109(2021), 579-592. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.01.059>
- Martín, D. A., Andriafanomezantsoa, R., Dröge, S., Osen, K., Rakotomalala, E., Wurz, A., Andrianarimisa, A., & Kreft, H. (2020). Bird diversity and endemism along a land-use gradient in Madagascar: The conservation value of *Vanilla* agroforests. *Biotropica*, 53(1), 179-190. <https://doi.org/10.1111/btp.12859>
- Mata-Chinchilla, R., Vásque-Mora, A. & Rosales-Ibarra, A. (2012). El mapa de suelos de Costa Rica con la leyenda WRB. Recuperado de <http://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/av-1630.pdf>

- Mattéotti, C., Thonart, P., Francis, F., Haubruge, E., Destain, J., Brasseur, C., Bauwens, J., De Pauw, E., Portetelle, D., & Vandenberghe, M. (2011). New glucosidase activities identified by functional screening of a genomic DNA library from the gut microbiota of the termite *Reticulitermes santonensis*. *Microbiological Research*, 166(8), 629-642. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2011.01.001>
- McAlpine, J. (2013). The role of yeasts in the pollination success of a Neotropical orchid. (Master degree, University of Oregon). Recuperado de https://scholarsbank.uoregon.edu/xmlui/bitstream/handle/1794/13280/McAlpine_oregon_0171N_10711.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- McTaggart, L. R., Copeland, J. K., Surendra, A., Wang, P. W., Husain, S., Coburn, B., Guttman, D. S., & Kus, J. V. (2019). Mycobiome sequencing and analysis applied to fungal community profiling of the lower respiratory tract during fungal pathogenesis. *Frontiers in Microbiology*, 10, 512-524. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00512>
- Medina, J., Rodríguez, G., García, H., Rosado, T., García, M. & Robles, V. (2009). *Vanilla: post-harvest operations*. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Recuperado de http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/inpho/docs/Post_Harvest_Compndium_-_Vanilla.pdf
- Mendoza, M. (2005). Importancia de la identificación de levaduras. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 25(1), 15-23.
- Meng, J., Xu, J., Qin, D., He, Y., Xiao, X. & Wang, F. (2014). Genetic and functional properties of uncultivated MCG archaea assessed by metagenome and gene expression analyses. *The ISME Journal*, 8(3), 650-659. <https://doi.org/10.1038/ismej.2013.174>
- Michlmayr, H. & Kneifel, W. (2014). β -Glucosidase activities of lactic acid bacteria: mechanisms, impact on fermented food and human health. *FEMS Microbiology Letters*, 352(1), 1-10. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12348>
- Microsoft Corporation. (2013). *Microsoft Excel*. <https://www.microsoft.com/es-es/microsoft-365/previous-versions/microsoft-excel-2013>.

- Miller, M. A., Pfeiffer, W., & Schwartz, T. (2010, November). Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. In *2010 gateway computing environments workshop (GCE)* (pp. 1-8). Ieee. Recuperado de <https://ieeexplore.ieee.org/document/5676129>
- Miller, R. A., Beno, S. M., Kent, D. J., Carroll, L. M., Martin, N. H., Boor, K. J., & Kovac, J. (2016). *Bacillus wiedmannii* sp. nov., a psychrotolerant and cytotoxic *Bacillus cereus* group species isolated from dairy foods and dairy environments. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66(11), 4744-4753. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001421>
- Minh, B. Q., Nguyen, M. A. T., & von Haeseler, A. (2013). Ultrafast approximation for phylogenetic bootstrap. *Molecular Biology and Evolution*, 30(5), 1188-1195. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst024>
- Mizrahi-Man, O., Davenport, E. R. & Gilad, Y. (2013). Taxonomic classification of bacterial 16S rRNA genes using short sequencing reads: evaluation of effective study designs. *PloS One*, 8(1), 1-14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053608>
- Moitinho, M. A., Chiaramonte, J. B., Souza, D. T., Solano, J. H., Bononi, L., Melo, I. S., & Taketani, R. G. (2019). Intraspecific variation on epiphytic bacterial community from *Laguncularia racemosa* phylloplane. *Brazilian Journal of Microbiology*, 50(4), 1041-1050. <https://doi.org/10.1007/s42770-019-00138-7>
- Moreno, B., Cañizares, R., Nuñez, R. & Benitez, E. (2013). Genetic diversity of bacterial β -glucosidase-encoding genes as a function of soil management. *Biology and Fertility of Soils*, 49(6), 735-745. <https://doi.org/10.1007/s00374-012-0765-3>
- Mouro, A. (2012). *Fermentação de xilose e celobiose por leveduras isoladas da biodiversidade brasileira*. (Tesis de Doctorado, Universidad Federal de Santa Catarina). Recuperado de <https://repositorio.ufsc.br/bitstream/handle/123456789/100622/313694.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Mowna Sundari, T., Alwin Prem Anand, A., Jenifer, P., & Shenbagarathai, R. (2018). Bioprospection of Basidiomycetes and molecular phylogenetic analysis using internal

- transcribed spacer (ITS) and 5.8 S rRNA gene sequence. *Scientific Reports*, 8(1), 1-18. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-29046-w>
- Muhamad Rizal, N. S., Neoh, H. M., Ramli, R., Hanafiah, A., Abdul Samat, M. N., Tan, T. L., Kon Ken Wong, K. K., Sheila Nathan, S., Chieng, S., Saw, S. H., & Khor, B. Y. (2020). Advantages and limitations of 16S rRNA Next-Generation Sequencing for pathogen identification in the diagnostic microbiology laboratory: Perspectives from a middle-income country. *Diagnostics*, 10(10), 816. <https://doi.org/10.3390/diagnostics10100816>
- Murali, A., Bhargava, A., & Wright, E. S. (2018). IDTAXA: a novel approach for accurate taxonomic classification of microbiome sequences. *Microbiome*, 6(1), 1-14. <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0521-5>
- Müştak, İ. B., Sarıcam, S., & Müştak, H. K. (2019). Comparison of Internal Transcribed Spacer Region sequencing and conventional methods used in the identification of fungi isolated from domestic animals. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 25(5), 1-6. <https://doi.org/10.9775/kvfd.2018.21506>
- Nagrale, D. T., Gawande, S. P., Hiremani, N. S., & Gokte-Narkhedkar, N. (2020). Occurrence and pathogenicity of *Enterobacter sp.* causing sprout decay and seedling stunting of upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Journal of Phytopathology*, 168(7-8), 391-398. <https://doi.org/10.1111/jph.12903>
- Naidu, M. M., Kumar, P. S., Shyamala, B. N., Sulochanamma, G., Prakash, M. & Thakur, M. S. (2009). Enzyme-assisted process for production of superior quality vanilla extracts from green vanilla pods using tealeaf enzymes. *Food and Bioprocess Technology*, 5(2), 527-532. <https://doi.org/10.1007/s11947-009-0291-y>
- Nayfach, S., Roux, S., Seshadri, R., Udworthy, D., Varghese, N., Schulz, F., Dongying Wu, D., Paez-Espino, D., Chen, I. M., Huntemann, M., Palaniappan, K., Ladau, J., Mukherjee, S., Reddy, T. B. K., Nielsen, T., Kirton, E., Faria, J. P., Edirisinghe, J. N., Henry, C. S., & Elloe-Fadrosh, E. A. (2021). A genomic catalog of Earth's microbiomes. *Nature Biotechnology*, 39(4), 499-509. <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0718-6>
- Nelson, D. M., Glawe, A. J., Labeda, D. P., Cann, I. K., & Mackie, R. I. (2009). *Paenibacillus tundrae* sp. nov. and *Paenibacillus xylanexedens* sp. nov., psychrotolerant, xylan-

- degrading bacteria from Alaskan tundra. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59(7), 1708-1714. <https://doi.org/10.1099/ijls.0.004572-0>
- Nguyen, L. T., Schmidt, H. A., Von Haeseler, A., & Minh, B. Q. (2015). IQ-TREE: a fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 32(1), 268-274. <https://doi.org/10.1093/molbev/msu300>
- Nilsson, R. H., Anslan, S., Bahram, M., Wurzbacher, C., Baldrian, P., & Tedersoo, L. (2019). Mycobiome diversity: high-throughput sequencing and identification of fungi. *Nature Reviews Microbiology*, 17(2), 95-109. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0116-y>
- Nilsson, R. H., Larsson, K. H., Taylor, A. F. S., Bengtsson-Palme, J., Jeppesen, T. S., Schigel, D., Kennedy, P., Picard, K., Glöckner, F. O., Tedersoo, L., Saar, I., Kõljalg, U., & Abarenkov, K. (2019). The UNITE database for molecular identification of fungi: handling dark taxa and parallel taxonomic classifications. *Nucleic Acids Research*, 47(D1), D259-D264. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1022>
- Numberger, D., Ganzert, L., Zoccarato, L., Mühldorfer, K., Sauer, S., Grossart, H. P., & Greenwood, A. D. (2019). Characterization of bacterial communities in wastewater with enhanced taxonomic resolution by full-length 16S rRNA sequencing. *Scientific Reports*, 9(1), 1-14. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-46015-z>
- Odoux, E., Chauwin, A. & Brillouet, J. M. (2003). Purification and characterization of vanilla bean (*Vanilla planifolia* Andrews) β -D-glucosidase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(10), 3168-3173. <https://doi.org/10.1021/jf0260388>
- Odoux, E., Escoute, J. & Verdeil, J. L. (2006). The relation between glucovanillin, β -d-glucosidase activity and cellular compartmentation during the senescence, freezing and traditional curing of vanilla beans. *Annals of Applied Biology*, 149, 43-52. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.2006.00071.x>
- O'Leary, N. A., Wright, M. W., Brister, J. R., Ciufu, S., Haddad, D., McVeigh, R., Rajput, B., Robbertse, B., Smith-White, B., Ako-Adjei, D., Astashyn, A. Badretdin, A., Bao, Y., Blinkova, O., Brover, V., Chetvernin, V., Choi, J., Cox, E., Ermolaeva, O., Farrell, C. M., & Pruitt, K. D. (2016). Reference sequence (RefSeq) database at NCBI: current status,

- taxonomic expansion, and functional annotation. *Nucleic Acids Research*, 44(D1), D733-D745. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1189>
- Oliart-Ros, R. M., Sánchez-Otero, M. G. & Manresa-Presas, Á. (2016). Utilización de microorganismos de ambientes extremos y sus productos en el desarrollo biotecnológico. *CienciaUAT*, 11(1), 79-90.
- Olivera, M., Delgado, N., Cádiz, F., Riquelme, N., Montenegro, I., Seeger, M., Guillermo Bravo, G., Barros-Parada, W., Pedreschi, R., & Besoain, X. (2021). Diffusible compounds produced by *Hanseniaspora osmophila* and *Gluconobacter cerinus* help to control the causal agents of gray rot and summer bunch rot of table grapes. *Antibiotics*, 10(6), 664-674. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10060664>
- Omaidien, S. (2013). *Bioprospecting for beta-glucosidases and beta-xylosidases from non-Saccharomyces yeast*. (Tesis de doctorado, Stellenbosch University). Recuperado de <https://scholar.sun.ac.za/handle/10019.1/80152>
- Østbye, K., Wilson, R. & Rudi, K. (2016). Rumen microbiota for wild boreal cervids living in the same habitat. *FEMS Microbiology Letters*, 363(20), 1-13. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnw233>
- Ozatay, S. (2020). Recent applications of enzymes in food industry. *Journal of Current Research on Engineering, Science and Technology*, 6 (1), 17-30. <https://doi.org/10.26579/jocrest.52>
- Pagani, D. M., Brandao, L. R., Santos, A. R. O., Felix, C. R., Ramos, J. P., Broetto, L., Gloria Scorzetti, G., Fell, J. W., Rosa, C., A., Valente, P., & Landell, M. F. (2016). *Papiliotrema leoncinii* sp. nov. and *Papiliotrema miconiae* sp. nov., two tremellaceous yeast species from Brazil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66(4), 1799-1806. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000945>
- Palmeri, R. & Spagna, G. (2007). β -Glucosidase in cellular and acellular form for winemaking application. *Enzyme and Microbial Technology*, 40(3), 382-389. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2006.07.007>

- Pandey, S., Singh, S., Yadav, A. N., Nain, L., & Saxena, A. K. (2013). Phylogenetic diversity and characterization of novel and efficient cellulase producing bacterial isolates from various extreme environments. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 77(7), 1474-1480. <https://doi.org/10.1271/bbb.130121>
- Papalazaridou, A., Charitidou, L., & Sivropoulou, A. (2003). β -Glucosidase enzymatic activity of crystal polypeptide of the *Bacillus thuringiensis* strain 1.1. *Journal of Endotoxin Research*, 9(4), 215-224. <https://doi.org/10.1179/096805103225001413>
- Parafati, L., Vitale, A., Restuccia, C. & Cirvilleri, G. (2015). Biocontrol ability and action mechanism of food-isolated yeast strains against *Botrytis cinerea* causing post-harvest bunch rot of table grape. *Food Microbiology*, 47, 85-92. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.11.013>
- Paramita, V. & Yulianto, M. E. (2013). Effect of [beta]-glucosidase activity on the vanillin enzymatic formation by using rumen liquid for cell walls degradation. *Journal of Food Research*, 2(2), 65-69. <https://doi.org/10.5539/jfr.v2n2p65>
- Pardío, V. T., Flores, A., López, K. M., Martínez, D. I., Márquez, O., & Waliszewski, K. N. (2018). Effect of endogenous and exogenous enzymatic treatment of green *Vanilla* beans on extraction of vanillin and main aromatic compounds. *Journal of Food Science and Technology*, 55(6), 2059-2067. <https://doi.org/10.1007/s13197-018-3120-3>
- Park, D. J., Lee, Y. S., & Choi, Y. L. (2013). Characterization of a cold-active β -glucosidase from *Paenibacillus xylanilyticus* KJ-03 capable of hydrolyzing isoflavones daidzin and genistin. *The Protein Journal*, 32(7), 579-584. <https://doi.org/10.1007/s10930-013-9520-3>
- Parlamento Europeo y de Consejo. (2018). Reglamento (UE) 2018/848 del Parlamento Europeo y del Consejo de 30 de mayo de 2018 sobre producción ecológica y etiquetado de los productos ecológicos y por el que se deroga el Reglamento (CE) n.o 834/2007 del Consejo. Tomado de <https://eurlex.europa.eu/eli/reg/2018/848/oj>.
- Pathan, S. I., Žifčáková, L., Ceccherini, M. T., Pantani, O. L., Větrovský, T., & Baldrian, P. (2017). Seasonal variation and distribution of total and active microbial community of

- β -glucosidase encoding genes in coniferous forest soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 105, 71-80. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2016.11.003>
- Pavlova, K., Angelova, G., Savova, I., Grigorova, D., & Kuppenov, L. (2002). Studies of Antarctic yeast for β -glucosidase production. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 18(6), 569-573. <https://doi.org/10.1023/A:1016337529488>
- Pei, D. F., Wu, Q. Q., Luo, H., Paul, N. C., Deng, J. X., & Zhou, Y. (2019). Diversity and antifungal activity of endophytes associated with *Spiranthes sinensis* (Orchidaceae, Magnoliophyta) in China. *International Journal of Applied Microbiology and Biotechnology Research*, 7, 7-17. <https://doi.org/doi.org/10.33500/ijambr.2019.07.003>
- Peng, X., Wang, Y., Tang, L. J., Li, X. X., Xiao, Y. W., Zhang, Z. B., Ri Ming Yan, R. M., Hui Lin Yang, H. L., Chang, J., Zhu, B., & & Zhu, D. (2018). Yeasts from Nanfeng mandarin plants: occurrence, diversity and capability to produce indole-3-acetic acid. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 32(6), 1496-1506. <https://doi.org/10.1080/13102818.2018.1487337>
- Pérez, G., Farina, L., Barquet, M., Boido, E., Gaggero, C., Dellacassa, E., & Carrau, F. (2011). A quick screening method to identify β -glucosidase activity in native wine yeast strains: application of Esculin Glycerol Agar (EGA) medium. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(1), 47-55. <https://doi.org/10.1007/s11274-010-0425-4>
- Perfumo, A., Banat, I. M., & Marchant, R. (2018). Going green and cold: biosurfactants from low-temperature environments to biotechnology applications. *Trends in Biotechnology*, 36(3), 277-289. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2017.10.016>
- Perron, G. G., Whyte, L., Turnbaugh, P. J., Goordial, J., Hanage, W. P., Dantas, G. & Desai, M. M. (2015). Functional characterization of bacteria isolated from ancient arctic soil exposes diverse resistance mechanisms to modern antibiotics. *PLoS One*, 10(3), 1-19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069533>
- Perry, J.D., Morris, K.A., James, A.L., Oliver, M. & Gould, F.K. (2007). Evaluation of novel chromogenic substrates for the detection of bacterial β -glucosidase. *Journal of Applied Microbiology*, 102, 410–415. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.03096.x>

- Pinotti, B. T., Pagotto, C. P. & Pardini, R. (2012). Habitat structure and food resources for wildlife across successional stages in a tropical forest. *Forest Ecology and Management*, 283, 119-127. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2012.07.020>
- Pořka, J., Rebecchi, A., Pisacane, V., Morelli, L. & Puglisi, E. (2015). Bacterial diversity in typical Italian salami at different ripening stages as revealed by high-throughput sequencing of 16S rRNA amplicons. *Food Microbiology*, 46, 342-356. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.08.023>
- Polymenakou, P. N., Nomikou, P., Zafeiropoulos, H., Mandalakis, M., Anastasiou, T. I., Kiliyas, S., Kyrpides, N. C., Kotoulas, G., & Magoulas, A. (2021). The Santorini Volcanic Complex as a Valuable Source of Enzymes for Bioenergy. *Energies*, 14(5), 1414-1426. <https://doi.org/10.3390/en14051414>
- Porras Rubio, E. A. (2013). *Estudio de mercado para la comercialización nacional e internacional de vainilla natural (Vanilla tahitiensis)*. (Tesis de Bachiller, Universidad de San Francisco de Quito). Recuperado de <http://repositorio.usfq.edu.ec/bitstream/23000/2652/1/108890.pdf>
- Porras, R. L. A. (2019). Bioprospección de beta-glucosidasas novedosas a partir de metagenomas obtenidos de intestinos de escarabajos pasálidos de Costa Rica y respiraderos hidrotermales de la Isla Vulcano en Italia. (Tesis de Maestría, Universidad de Costa Rica). Recuperado de <http://www.kerwa.ucr.ac.cr/bitstream/handle/10669/79792/Tesis%20MSc.%20Luis%20Alonso%20Porras.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Primožič, M., Čolnik, M., Knez, Ž., & Leitgeb, M. (2019). Advantages and disadvantages of using SC CO₂ for enzyme release from halophilic fungi. *The Journal of Supercritical Fluids*, 143, 286-293. <https://doi.org/doi.org/10.1016/j.supflu.2018.09.001>
- Purahong, W., Mapook, A., Wu, Y. T., & Chen, C. T. (2019). Characterization of the *Castanopsis carlesii* deadwood mycobiome by Pacbio sequencing of the full-length fungal nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS). *Frontiers in Microbiology*, 10, 983. <https://doi.org/doi.org/10.3389/fmicb.2019.00983>

- Qian, X., Duan, T., Sun, X., Zheng, Y., Wang, Y., Hu, M., Yao, H., Ji, N., Lv, P., Chen, L., Shi, M., Guo, L., & Zhang, D. (2018). Host genotype strongly influences phyllosphere fungal communities associated with *Mussaenda pubescens* var. *alba* (Rubiaceae). *Fungal Ecology*, *36*, 141-151. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2018.10.001>
- Qian, X., Li, S., Wu, B., Wang, Y., Ji, N., Yao, H., Cai, H., Shi, M., & Zhang, D. (2020). Mainland and island populations of *Mussaenda kwangtungensis* differ in their phyllosphere fungal community composition and network structure. *Scientific Reports*, *10*(1), 1-14. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-57622-6>
- Qiang, G. Y. (2014). *Survivability and plant regeneration studies of a vanda orchid's non-encapsulated and encapsulated protocorm-like bodies (PLBS)* (Tesis de Licenciatura, Universiti Tunku Abdul Rahman). Recuperado de <http://eprints.utar.edu.my/1248/1/BT-2014-1006617.pdf>
- Queipo-Ortuño, M. I., Colmenero, J. D. D., Macias, M., Bravo, M. J. & Morata, P. (2008). Preparation of bacterial DNA template by boiling and effect of immunoglobulin G as an inhibitor in real-time PCR for serum samples from patients with brucellosis. *Clinical and Vaccine Immunology*, *15*(2), 293-296. <https://doi.org/10.1128/CVI.00270-07>
- QUIMTIA, 2018. Información técnica del producto Kilol L-20. Versión 01.
- R Core Team (2020). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- Raghunand, T. R., & Mahadevan, S. (2003). The β -glucoside genes of *Klebsiella aerogenes*: conservation and divergence in relation to the cryptic bgl genes of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letters*, *223*(2), 267-274. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(03\)00393-8](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(03)00393-8)
- Rahman, K. U., Thaleth, M. K. B., Kutty, G. M., & Subramanian, R. (2019). Pilot scale cultivation and production of *Vanilla planifolia* in the United Arab Emirates. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, *25*(6), 1143-1150.
- Rahman, M. S., Banu, R., Moni, R., Islam, N., Ruma, M. K., & Zohora, U. S. (2018). Investigation on a Bangladeshi isolate *Bacillus aryabhattai* for promising

- biotechnological applications. *Jahangirnagar University Journal of Biological Sciences*, 7(2), 33-45. <https://doi.org/10.3329/jujbs.v7i2.40745>
- Raju, N. J., Gossel, W. & Sudhakar, M. (Eds.). (2015). *Management of Natural Resources in a Changing Environment*. Springer. Recuperado de <https://link.springer.com/book/10.1007/978-3-319-12559-6>
- Ramachandra-Rao, S. & Ravishankar, G. A. (2000). Vanilla flavour: production by conventional and biotechnological routes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 289 – 304. [https://doi.org/10.1002/1097-0010\(200002\)80:3<289::AID-JSFA543>3.0.CO;2-2](https://doi.org/10.1002/1097-0010(200002)80:3<289::AID-JSFA543>3.0.CO;2-2)
- Ramírez-Mosqueda, M. A., & Iglesias-Andreu, L. G. (2017). Vanilla (*Vanilla planifolia* Jacks.) cell suspension cultures: establishment, characterization, and applications. *3 Biotech*, 7(4), 1-6. <https://doi.org/10.1007/s13205-017-0871-x>
- Ramos-Castellá, A. L., Iglesias-Andreu, L. G., Martínez-Castillo, J., Ortíz-García, M., Andueza-Noh, R. H., Octavio-Aguilar, P. & Luna-Rodríguez, M. (2016). Evaluation of molecular variability in germplasm of vanilla (*Vanilla planifolia* G. Jackson in Andrews) in Southeast Mexico: implications for genetic improvement and conservation. *Plant Genetic Resources*, 15(4), 310-320. <https://doi.org/10.1017/S1479262115000660>
- Rani, V. & Dev, K. (2016). Molecular evolution of β -Galactosidase in thermophiles, psychrophiles, mesophiles, plants and mammals by in silico approach. *Research Journal of Recent Sciences*, 5(2), 1-11.
- Rani, V., Mohanram, S., Tiwari, R., Nain, L. & Arora, A. (2014). Beta-glucosidase: Key enzyme in determining efficiency of cellulase and biomass hydrolysis. *Journal of Bioprocessing & Biotechniques*, 5(1), 1-8. <https://doi.org/10.4172/2155-9821.1000197>
- Rao, X., Krom, N., Tang, Y., Widiez, T., Havkin-Frenkel, D., Belanger, F. C., Dixon, R. A., & Chen, F. (2014). A deep transcriptomic analysis of pod development in the vanilla orchid (*Vanilla planifolia*). *BMC Genomics*, 15(1), 964-976. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-964>
- Raza, A., Pothula, R., Abdelgaffar, H., Bashir, S., & Jurat-Fuentes, J. L. (2020). Identification and functional characterization of a β -glucosidase from *Bacillus tequelensis* BD69

- expressed in bacterial and yeast heterologous systems. *PeerJ*, 8, e8792. <https://doi.org/10.7717/peerj.8792>
- Redford, A. J., Bowers, R. M., Knight, R., Linhart, Y., & Fierer, N. (2010). The ecology of the phyllosphere: geographic and phylogenetic variability in the distribution of bacteria on tree leaves. *Environmental Microbiology*, 12(11), 2885-2893. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2010.02258.x>
- Resende, A. A. (2014). Leveduras associadas a frutos da macaúba (*Acrocomia aculeata* (Jaq.) Lodd. ex Mart): diversidade e caracterização quanto à produção de exoenzimas e fatores de crescimento. (Tesis de Maestría, Universidade Federal De Minas Gerais). Recuperado de https://repositorio.ufmg.br/bitstream/1843/BUOS-9UNHG4/1/disserta__o_de_mestrado_arquivo_final_modifica__es_banca.pdf
- Restuccia, C., Muccilli, S., Palmeri, R., Randazzo, C. L., Caggia, C., & Spagna, G. (2011). An alkaline β -glucosidase isolated from an olive brine strain of *Wickerhamomyces anomalus*. *FEMS Yeast Research*, 11(6), 487-493. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2011.00738.x>
- Rey, M. W., Ramaiya, P., Nelson, B. A., Brody-Karpin, S. D., Zaretsky, E. J., Tang, M., de Leon, A. L., Xiang, H., Gusti, V., Clausen, I. G., Olsen, P. B., Rasmussen, M. D., Andersen, J. T., Jørgensen, P. L., Larsen, T. S., Sorokin, A., Bolotin, A., Lapidus, A., Galleron, N., & Berka, R. M. (2004). Complete genome sequence of the industrial bacterium *Bacillus licheniformis* and comparisons with closely related *Bacillus* species. *Genome Biology*, 5(10), 1-12. <https://doi.org/10.1186/gb-2004-5-10-r77>
- Rhodes, K. A., & Schweizer, H. P. (2016). Antibiotic resistance in *Burkholderia* species. *Drug Resistance Updates*, 28, 82-90. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2016.07.003>
- Ribeiro, T. G., Goncalves, B. R., da Silva, M. S., Novais, Â., Machado, E., Carrico, J. A., & Peixe, L. (2017). *Citrobacter portucalensis* sp. nov., isolated from an aquatic sample. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 67(9), 3513-3517. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002154>
- Rodríguez-Echeverry, J., & Leiton, M. (2021). Pérdida y fragmentación de ecosistemas boscosos nativos y su influencia en la diversidad de hábitats en el hotspot Andes tropicales. *Revista*

- Mexicana de Biodiversidad*, 92, 923449.
<https://doi.org/doi.org/10.22201/ib.20078706e.2021.92.3449>
- Rojas, L., S., Ramírez-Valverde, B., Díaz-Bautista, M., Pizano-Calderón, J., & Rodríguez-López, C. (2020). La producción de vainilla (*Vanilla planifolia*) en México: análisis y pronóstico. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 11(1), 175-187.
<https://doi.org/10.29312/remexca.v11i1.2065>
- Röling, W. F., Kerler, J., Braster, M., Apriyantono, A., Stam, H. & Van Verseveld, H. W. (2001). Microorganisms with a taste for vanilla: microbial ecology of traditional Indonesian vanilla curing. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(5), 1995-2003.
<https://doi.org/10.1128/AEM.67.5.1995-2003.2001>
- Rompkovksi, C., Agustini, B. C., Deffert, F., Stadtlober, M. G. A., Brand, D., da Silva, G. A., & Bonfim, T. M. B. (2021). Microbial dynamics in industrial-scale wine fermentation employing *Hanseniaspora uvarum* b-glucosidase-producer strain. *Journal of Food Science and Technology*. <https://doi.org/10.1007/s13197-021-05168-4>
- Roushani, M., Ghanbari, K., & Hoseini, S. J. (2018). Designing an electrochemical aptasensor based on immobilization of the aptamer onto nanocomposite for detection of the streptomycin antibiotic. *Microchemical Journal*, 141, 96-103.
<https://doi.org/10.1016/j.microc.2018.05.016>
- Roux, V., Fenner, L., & Raoult, D. (2008). *Paenibacillus provencensis* sp. nov., isolated from human cerebrospinal fluid, and *Paenibacillus urinalis* sp. nov., isolated from human urine. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58(3), 682-687. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.65228-0>
- Ruiz-Terán, F., Perez-Amador, I. & López-Munguía, A. (2001). Enzymatic extraction and transformation of glucovanillin to vanillin from vanilla green pods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(11), 5207-5209. <https://doi.org/10.1021/jf010723h>
- Sáez-Nieto, J. A., Medina-Pascual, M. J., Carrasco, G., Garrido, N., Fernandez-Torres, M. A., Villalón, P., & Valdezate, S. (2017). *Paenibacillus* spp. isolated from human and environmental samples in Spain: detection of 11 new species. *New Microbes and New Infections*, 19, 19-27. <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2017.05.006>

- Saha, P., Mondal, A. K., Mayilraj, S., Krishnamurthi, S., Bhattacharya, A., & Chakrabarti, T. (2005). *Paenibacillus assamensis* sp. nov., a novel bacterium isolated from a warm spring in Assam, India. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(6), 2577-2581. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63846-0>
- Salazar-Rojas, V. M. (2011). *Estrategia de uso y conservación del germoplasma de Vanilla planifolia Jack. En la región Totonacapan Puebla-Veracruz*. (Tesis de doctorado, Instituto de Enseñanza e Investigación en Ciencias Agrícolas). Recuperado de http://colposdigital.colpos.mx:8080/jspui/bitstream/handle/10521/609/Salazar_Rojas_V_M_DC_EDAR_2011.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Salazar-Rojas, V. M., Herrera-Cabrera, B. E., Delgado-Alvarado, A., Soto-Hernández, M., Castillo-González, F. & Cobos-Peralta, M. (2012). Chemotypical variation in *Vanilla planifolia* Jack.(Orchidaceae) from the Puebla-Veracruz Totonacapan region. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 59(5), 875-887. <https://doi.org/10.1007/s10722-011-9729-y>
- Saldívar-Iglesias, P. (2015). Cultivo de vainilla (*Vanilla planifolia* Jackson). Recuperado de <http://ri.uaemex.mx/bitstream/handle/20.500.11799/66693/Revisi%F3n+Literatura+del+Cultivo+de+Vainilla.pdf;jsessionid=230B84845AB73E7A8C51851B542C9D08?sequence=3>
- Sampaio, J. P., Gadanho, M., Bauer, R., & Weiß, M. (2003). Taxonomic studies in the *Microbotryomycetidae*: *Leucosporidium golubevii* sp. nov., *Leucosporidiella* gen. nov. and the new orders *Leucosporidiales* and *Sporidiobolales*. *Mycological Progress*, 2(1), 53-68. <https://doi.org/10.1007/s11557-006-0044-5>
- Sanchez-Andrea, I., Sanz, J. L., & Stams, A. J. (2014). *Microbacter margulisiae* gen. nov., sp. nov., a propionigenic bacterium isolated from sediments of an acid rock drainage pond. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64(12), 3936-3942. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.066241-0>
- Sánchez-Galindo, M., Arévalo-Galarza, M., Delgado-Alvarado, A., Herrera-Cabrera, B. E., & Osorio-García, C. (2018). Quality of green and cured vanilla (*Vanilla planifolia* Jacks.

- ex Andrews) fruit in relation to its age at harvest. *Revista Chapingo. Serie Horticultura*, 24(3), 203-213. <https://doi.org/doi.org/10.5154/r.rchsh.2018.02.004>
- Sánchez-Torres, P., González-Candelas, L., & Ramón, D. (1998). Heterologous expression of a *Candida molischiana* anthocyanin- β -glucosidase in a wine yeast strain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(1), 354-360. <https://doi.org/10.1021/jf970570r>
- Sanger, F., Coulson, A. R., Friedmann, T., Air, G. M., Barrell, B. G., Brown, N. L., Fiddes, J. C., Hutchison, C.A., Slocombe, P. M., & Smith, M. (1978). The nucleotide sequence of bacteriophage ϕ X174. *Journal of Molecular Biology*, 125(2), 225-246. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(78\)90346-7](https://doi.org/10.1016/0022-2836(78)90346-7)
- Santa Cardona, C., Marín Montoya, M. & Claudia Díez, M. (2012). Identificación del agente causal de la pudrición basal del tallo de vainilla en cultivos bajo cobertizos en Colombia. *Revista Mexicana de Micología*, 35, 23-34.
- Santos, I. C., Smuts, J., & Schug, K. A. (2017). Rapid profiling and authentication of vanilla extracts using gas chromatography-vacuum ultraviolet spectroscopy. *Food Analytical Methods*, 10(12), 4068-4078. <https://doi.org/10.1007/s12161-017-0976-1>
- Sarhan, M. S., Hamza, M. A., Youssef, H. H., Patz, S., Becker, M., ElSawey, H., RahmaNemr, R., Daanaa, H. S. A., Mourad, A. F., Morsi, A. T., Abdelfadeel, M. R., Abbas, M. T., Fayez, M., Ruppel, S., & Hegazi, N. A. (2019). Culturomics of the plant prokaryotic microbiome and the dawn of plant-based culture media—A review. *Journal of Advanced Research*, 19, 15-27. <https://doi.org/doi.org/10.1016/j.jare.2019.04.002>
- Sato, M., & Miyazaki, K. (2017). Phylogenetic network analysis revealed the occurrence of horizontal gene transfer of 16S rRNA in the genus *Enterobacter*. *Frontiers in Microbiology*, 8, 2225. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02225>
- Schultz, J., & Rosado, A. S. (2020). Extreme environments: a source of biosurfactants for biotechnological applications. *Extremophiles*, 24(2), 189-206. <https://doi.org/doi.org/10.1007/s00792-019-01151-2>

- Sekar, R., Shin, H. D. & Chen, R. (2012). Engineering *Escherichia coli* cells for cellobiose assimilation through a phosphorolytic mechanism. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(5), 1611-1614. <https://doi.org/10.1128/AEM.06693-11>
- Sharma, S., Kumar, V. & Tripathi, R. B. (2017). Isolation of phosphate solubilizing microorganism (PSMs) from soil. *Journal of Microbiology and Biotechnology Research*, 1(2), 90-95. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01270>
- Shokryazdan, P., Faseleh Jahromi, M., Liang, J. B., & Ho, Y. W. (2017). Probiotics: from isolation to application. *Journal of the American College of Nutrition*, 36(8), 666-676. <https://doi.org/10.1080/07315724.2017.1337529>
- Shrivastava, S. (2020). Introduction to glycoside hydrolases: Classification, Identification and occurrence. In *Industrial Applications of Glycoside Hydrolases* (pp. 3-84). Springer, Singapore. https://doi.org/doi.org/10.1007/978-981-15-4767-6_1
- Silveira, A. C., Moreira, G. C., Artés, F. & Aguayo, E. (2015). Vanillin and cinnamic acid in aqueous solutions or in active modified packaging preserve the quality of fresh-cut Cantaloupe melon. *Scientia Horticulturae*, 192, 271-278. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.06.029>
- Singh, G., Verma, A. K. & Kumar, V. (2016). Catalytic properties, functional attributes and industrial applications of β -glucosidases. *3 Biotech*, 6(1), 1-14. <https://doi.org/10.1007/s13205-015-0328-z>
- Singh, P., Singh, S. M., Tsuji, M., Prasad, G. S. & Hoshino, T. (2014). *Rhodotorula svalbardensis* sp. nov., a novel yeast species isolated from cryoconite holes of Ny-Ålesund, Arctic. *Cryobiology*, 68(1), 122-128. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2014.01.006>
- Singh, S., Jaiswal, D. K., Sivakumar, N., & Verma, J. P. (2019). Developing efficient thermophilic cellulose degrading consortium for glucose production from different agro-residues. *Frontiers in Energy Research*, 7(JUL), 61. <https://doi.org/10.3389/fenrg.2019.00061>

- Singhania, R. R., Patel, A. K., Sukumaran, R. K., Larroche, C. & Pandey, A. (2013). Role and significance of beta-glucosidases in the hydrolysis of cellulose for bioethanol production. *Bioresource Technology*, 127, 500-507. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.09.012>
- Singletary, K. W. (2020). Vanilla: potential health benefits. *Nutrition Today*, 55(4), 186-196. <https://doi.org/10.1097/NT.0000000000000412>
- Sinha, A. K., Sharma, U. K., & Sharma, N. (2008). A comprehensive review on vanilla flavor: extraction, isolation and quantification of vanillin and others constituents. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 59(4), 299-326. <https://doi.org/10.1080/09687630701539350>
- Sivakumar, N., Sathishkumar, R., Selvakumar, G., Shyamkumar, R., & Arjunekumar, K. (2020). Phyllospheric microbiomes: Diversity, ecological significance, and biotechnological applications. In *Plant Microbiomes for Sustainable Agriculture* (pp. 113-172). Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-38453-1_5
- Solano, J. & Villalobos, R. (2000). *Regiones y subregiones climáticas de Costa Rica*. San José, Costa Rica. Instituto Meteorológico Nacional. Recuperado de http://www.conarroz.com/UserFiles/File/Reg_climaCR.pdf
- Son, J. S., Kang, H. U., & Ghim, S. Y. (2014). *Paenibacillus dongdonensis* sp. nov., isolated from rhizospheric soil of *Elymus tsukushiensis*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64(8), 2865-2870. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.061077-0>
- Sousa, F. M., Morais, P. B., Lachance, M. A., & Rosa, C. A. (2014). *Hagleromyces* gen. nov., a yeast genus in the Saccharomycetaceae, and description of *Hagleromyces aurorensis* sp. nov., isolated from water tanks of bromeliads. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64(Pt_8), 2915-2918. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.063883-0>
- Sousa-Silva, M., Vieira, D., Soares, P., Casal, M., & Soares-Silva, I. (2021). Expanding the knowledge on the skillful yeast *Cyberlindnera jadinii*. *Journal of Fungi*, 7(1), 36-55. <https://doi.org/doi.org/10.3390/jof7010036>

- Souza, F. H. M., Nascimento, C. V., Rosa, J. C., Masui, D. C., Leone, F. A., Jorge, J. A., & Furriel, R. P. M. (2010). Purification and biochemical characterization of a mycelial glucose-and xylose-stimulated β -glucosidase from the thermophilic fungus *Humicola insolens*. *Process Biochemistry*, 45(2), 272-278. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2009.09.018>
- Souza, I. F., Napoleão, T. H., de Sena, K. X., Paiva, P. M., de Araújo, J. M. & Coelho, L. C. (2016). Endophytic microorganisms in leaves of *Moringa oleifera* collected in three localities at Pernambuco State, Northeastern Brazil. *British Microbiology Research Journal*, 13(5), 1-7. <https://doi.org/10.9734/BMRJ/2016/24722>
- Spang, A., Saw, J. H., Jørgensen, S. L., Zaremba-Niedzwiedzka, K., Martijn, J., Lind, A. E., Eijk, R. V., Schleper, C., Guy, L., & Ettema, T. J. (2015). Complex archaea that bridge the gap between prokaryotes and eukaryotes. *Nature*, 521(7551), 173-179. <https://doi.org/10.1038/nature14447>
- Speda, J., Jonsson, B. H., Carlsson, U., & Karlsson, M. (2017). Metaproteomics-guided selection of targeted enzymes for bioprospecting of mixed microbial communities. *Biotechnology for Biofuels*, 10(1), 1-17. <https://doi.org/10.1186/s13068-017-0815-z>
- Sreedhar, R. V., Roohie, K., Venkatachalam, L., Narayan, M. S. & Bhagyalakshmi, N. (2007). Specific pretreatments reduce curing period of vanilla (*Vanilla planifolia*) beans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(8), 2947-2955. <https://doi.org/10.1021/jf063523k>
- Srinivasan, R., Karaoz, U., Volegova, M., MacKichan, J., Kato-Maeda, M., Miller, S., Nadarajan, R., Brodie, E. L., & Lynch, S. V. (2015). Use of 16S rRNA gene for identification of a broad range of clinically relevant bacterial pathogens. *PloS One*, 10(2), e0117617. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117617>
- Srinual, S., Chanvorachote, P. & Pongrakhananon, V. (2017). Suppression of cancer stem-like phenotypes in NCI-H460 lung cancer cells by vanillin through an Akt-dependent pathway. *International Journal of Oncology*, 50, 1341-1351. <https://doi.org/10.3892/ijo.2017.3879>

- Srivastava, N., Rathour, R., Jha, S., Pandey, K., Srivastava, M., Thakur, V. K., Sengar, R. S., Gupta, V. K., Mazumder, P. B., Khan, A. F., & Mishra, P. K. (2019). Microbial beta glucosidase enzymes: recent advances in biomass conversion for biofuels application. *Biomolecules*, *9*(6), 220-243. <https://doi.org/10.3390/biom9060220>
- Srivastava, S., Dafale, N. A., & Purohit, H. J. (2020). Functional genomics assessment of lytic polysaccharide mono-oxygenase with glycoside hydrolases in *Paenibacillus dendritiformis* CRN18. *International Journal of Biological Macromolecules*, *164*, 3729-3738. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.08.147>
- Stathopoulou, P. M., Savvides, A. L., Karagouni, A. D. & Hatzinikolaou, D. G. (2013). Unraveling the lipolytic activity of thermophilic bacteria isolated from a volcanic environment. *BioMed Research International*, *2013*, 1-13. <https://doi.org/10.1155/2013/703130>
- Stone, B. W., Weingarten, E. A., & Jackson, C. R. (2018). The role of the phyllosphere microbiome in plant health and function. *Annual Plant Reviews online*, 533-556. <https://doi.org/10.1002/9781119312994.apr0614>
- Stöver, B. C., & Müller, K. F. (2010). TreeGraph 2: combining and visualizing evidence from different phylogenetic analyses. *BMC Bioinformatics*, *11*(1), 7-16. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-11-7>
- Suh, S. O., Blackwell, M., Kurtzman, C. P., & Lachance, M. A. (2006). Phylogenetics of *Saccharomycetales*, the Ascomycete yeasts. *Mycologia*, *98*(6), 1006-1017. <https://doi.org/10.3852/mycologia.98.6.1006>
- Suhartatik, N., Cahyanto, M. N., Rahardjo, S., Miyashita, M. & Rahayu, E. S. (2014). Isolation and identification of lactic acid bacteria producing β -glucosidase from Indonesian fermented foods. *International Food Research Journal*, *21*(3) 973-978.
- Sun, J., Wang, W., Yao, C., Dai, F., Zhu, X., Liu, J., & Hao, J. (2018). Overexpression and characterization of a novel cold-adapted and salt-tolerant GH1 β -glucosidase from the marine bacterium *Alteromonas* sp. L82. *Journal of Microbiology*, *56*(9), 656-664. <https://doi.org/10.1007/s12275-018-8018-2>

- Sundari, T. M., Anand, A. A. P., Jenifer, P., & Shenbagarathai, R. (2018). Bioprospection of Basidiomycetes and molecular phylogenetic analysis using internal transcribed spacer (ITS) and 5.8 S rRNA gene sequence. *Scientific Reports*, 8(1), 1-18. <https://doi.org/doi.org/10.1038/s41598-018-29046-w>
- Surussawadee, J., Khunnamwong, P., Srisuk, N., & Limtong, S. (2014). *Papiliotrema siamense* fa, sp. nov., a yeast species isolated from plant leaves. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64(9), 3058-3062. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.065607-0>
- Szczerba, H., Komoń-Janczara, E., Krawczyk, M., Dudziak, K., Nowak, A., Kuzdraliński, A., Waśko, A., & Targoński, Z. (2020). Genome analysis of a wild rumen bacterium *Enterobacter aerogenes* LU2-a novel bio-based succinic acid producer. *Scientific Reports*, 10(1), 1-13. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-58929-0>
- Tajima, K., Nakajima, K., Yamashita, H., Shiba, T., Munekata, M., & Takai, M. (2001). Cloning and sequencing of the beta-glucosidase gene from *Acetobacter xylinum* ATCC 23769. *DNA Research*, 8(6), 263-269. <https://doi.org/10.1093/dnares/8.6.263>
- Takahashi, M., Sakamaki, S. & Fujita, A. (2013). Simultaneous analysis of guaiacol and vanillin in a vanilla extract by using high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 77(3), 595-600. <https://doi.org/10.1271/bbb.120835>
- Tan, B. C. & Chin, C. F. (2015). *Vanilla planifolia*: an economically important orchid and its propagation. *Minerva Biotechnologica*. 27, 107-116.
- Tao, Y. L., Yang, D. H., Zhang, Y. T., Zhang, Y., Wang, Z. Q., Wang, Y. S., Cai, S. Q., & Liu, S. L. (2014). Cloning, expression, and characterization of the [beta]-glucosidase hydrolyzing secoisolariciresinol diglucoside to secoisolariciresinol from *Bacteroides uniformis* ZL1. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(6), 2519-2525. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5111-7>
- Teng, F., Nair, S. S. D., Zhu, P., Li, S., Huang, S., Li, X., Xu, J., & Yang, F. (2018). Impact of DNA extraction method and targeted 16S-rRNA hypervariable region on oral microbiota profiling. *Scientific Reports*, 8(1), 16321. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-34294-x>

- The Observatory of Economic Complexity. ¿Wich countries export Vanilla? (2019).
<https://oec.world/en/profile/hs92/vanilla>
- Thenchartanan, P., Pitchayatanakorn, P., Wattana-Amorn, P., Ardá, A., Svasti, J., Jiménez-Barbero, J., & Kongsaree, P. T. (2020). Synthesis of long-chain alkyl glucosides via reverse hydrolysis reactions catalyzed by an engineered β -glucosidase. *Enzyme and Microbial Technology*, 140, 109591.
<https://doi.org/doi.org/10.1016/j.enzmictec.2020.109591>
- Thongekkaew, J., Fujii, T., Masaki, K., & Koyama, K. (2019). Evaluation of *Candida easanensis* JK8 β -glucosidase with potentially hydrolyse non-volatile glycosides of wine aroma precursors. *Natural product Research*, 33(24), 3563-3567.
<https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1481845>
- Ticktin, T. (2004). The ecological implications of harvesting non-timber forest products. *Journal of Applied Ecology*, 41(1), 11-21. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2664.2004.00859.x>
- Tilocca, B., Cao, A., & Migheli, Q. (2020). Scent of a Killer: microbial volatilome and its role in the biological control of plant pathogens. *Frontiers in Microbiology*, 11, 41.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00041>
- Tiwari, P., Misra, B. N. & Sangwan, N. S. (2013). β -Glucosidases from the fungus *Trichoderma*: An Efficient cellulase machinery in biotechnological applications. *Hindawi Publishing Corporation, BioMed Research International*, 2013, 1-10.
<https://doi.org/10.1155/2013/203735>
- Tiwari, R., Kumar, K., Singh, S., Nain, L., & Shukla, P. (2016). Molecular detection and environment-specific diversity of glycosyl hydrolase family 1 β -glucosidase in different habitats. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1597-1609.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01597>
- Tiwari, R., Singh, P. K., Singh, S., Nain, P. K., Nain, L., & Shukla, P. (2017). Bioprospecting of novel thermostable β -glucosidase from *Bacillus subtilis* RA10 and its application in biomass hydrolysis. *Biotechnology for Biofuels*, 10(1), 1-18.
<https://doi.org/10.1186/s13068-017-0932-8>

- Tiwari, R., Singh, S., Shukla, P., & Nain, L. (2014). Novel cold temperature active β -glucosidase from *Pseudomonas lutea* BG8 suitable for simultaneous saccharification and fermentation. *RSC Advances*, 4(101), 58108-58115. <https://doi.org/10.1039/C4RA09784J>
- Tobar Perdomo, D., & Espinosa Abondano, L. F. (2008). *Estructura de abordaje del mercado Mexicano con fines de exportación de la vainilla (vainilla planifolia Andrews) para la empresa Inversiones Perdomo y Cia s. en c.* (Tesis de Bachiller, Universidad de la Salle). Recuperado de <http://repository.lasalle.edu.co/bitstream/handle/10185/5377/T12.08%20T551e.pdf;jsessionid=2ECC1F705616B6A5553C50C8C75E2874?sequence=1>
- Toledo, V. M., Ortiz-Espejel, B., Cortés, L., Moguel, P. & Ordoñez, M. J. (2003). The multiple use of tropical forests by indigenous peoples in Mexico: a case of adaptive management. *Conservation Ecology*, 7(3), 9-25. <https://doi.org/10.5751/ES-00524-070309>
- Tomova, I., Lazarkevich, I., Tomova, A., Kambourova, M., & Vasileva-Tonkova, E. (2013). Diversity and biosynthetic potential of culturable aerobic heterotrophic bacteria isolated from Magura Cave, Bulgaria. *International Journal of Speleology*, 42(1), 65-76. <https://doi.org/10.5038/1827-806X.42.1.8>
- Trindade, R. C., Resende, M. A., Silva, C. M., & Rosa, C. A. (2002). Yeasts associated with fresh and frozen pulps of Brazilian tropical fruits. *Systematic and Applied Microbiology*, 25(2), 294-300. <https://doi.org/10.1078/0723-2020-00089>
- Usyk, M., Zolnik, C. P., Patel, H., Levi, M. H., & Burk, R. D. (2017). Novel ITS1 fungal primers for characterization of the mycobiome. *MSphere*, 2(6), e00488-17. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00488-17>
- Van Rossum, T., Ferretti, P., Maistrenko, O. M., & Bork, P. (2020). Diversity within species: interpreting strains in microbiomes. *Nature Reviews Microbiology*, 18(9), 491-506. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0368-1>
- Varghese, A., Ticktin, T., Mandle, L. & Nath, S. (2015). Assessing the Effects of multiple stressors on the recruitment of fruit harvested trees in a tropical dry forest, Western Ghats, India. *PLoS ONE*, 10 (3), 1-17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119634>

- Ventorino, V., Aliberti, A., Faraco, V., Robertiello, A., Giacobbe, S., Ercolini, D., Amore, A., Fagnano, M., & Pepe, O. (2015). Exploring the microbiota dynamics related to vegetable biomasses degradation and study of lignocellulose-degrading bacteria for industrial biotechnological application. *Scientific Reports*, 5, 8161. <https://doi.org/10.1038/srep08161>
- Vicente, J., Ruiz, J., Belda, I., Benito-Vázquez, I., Marquina, D., Calderón, F., Santos, A., & Benito, S. (2020). The genus *Metschnikowia* in enology. *Microorganisms*, 8(7), 1038-1057. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8071038>
- Villanueva-Viramontes, S., Hernández-Apolinar, M., Carnevali Fernández-Concha, G., Dorantes-Euán, A., Dzib, G. R., & Martínez-Castillo, J. (2017). Wild *Vanilla planifolia* and its relatives in the Mexican Yucatan Peninsula: Systematic analyses with ISSR and ITS. *Botanical Sciences*, 95(2), 169-187. <https://doi.org/10.17129/botsci.668>
- Vitorino, L. C., & Bessa, L. A. (2017). Technological microbiology: development and applications. *Frontiers in Microbiology*, 8, 827. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00827>
- Vroemen, S., Heldens, J., Boyd, C., Henrissat, B., & Keen, N. T. (1995). Cloning and characterization of the *bgxA* gene from *Erwinia chrysanthemi* D1 which encodes a β -glucosidase/xylosidase enzyme. *Molecular and General Genetics MGG*, 246(4), 465-477. <https://doi.org/10.1007/BF00290450>
- Vu, D., Groenewald, M., Szöke, S., Cardinali, G., Eberhardt, U., Stielow, B., de Vries, M., Verkleij, G. J. M., Crous, P. W., Boekhout, T., & Robert, V. (2016). DNA barcoding analysis of more than 9 000 yeast isolates contributes to quantitative thresholds for yeast species and genera delimitation. *Studies in Mycology*, 85, 91-105. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2016.11.007>
- Vyas, S., & Chhabra, M. (2017). Isolation, identification and characterization of *Cystobasidium oligophagum* JRC1: A cellulase and lipase producing oleaginous yeast. *Bioresource Technology*, 223, 250-258. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.10.039>
- Waghmare, P. R., Patil, S. M., Jadhav, S. L., Jeon, B. H., & Govindwar, S. P. (2018). Utilization of agricultural waste biomass by cellulolytic isolate *Enterobacter* sp. SUK-

- Bio. Agriculture and Natural Resources*, 52(5), 399-406.
<https://doi.org/10.1016/j.anres.2018.10.019>
- Walton, N. J., Narbad, A., Faulds, C. B. & Williamson, G. (2000). Novel approaches to the biosynthesis of vanillin. *Current Opinion in Biotechnology*, 11, 490–496.
[https://doi.org/10.1016/s0958-1669\(00\)00125-7](https://doi.org/10.1016/s0958-1669(00)00125-7)
- Wang, Q. M., Groenewald, M., Takashima, M., Theelen, B., Han, P. J., Liu, X. Z., Boekhout, T., & Bai, F. Y. (2015). Phylogeny of yeasts and related filamentous fungi within Pucciniomycotina determined from multigene sequence analyses. *Studies in Mycology*, 81, 27-53. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2015.08.002>
- Wang, Q., Garrity, G. M., Tiedje, J. M., & Cole, J. R. (2007). Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(16), 5261-5267. <https://doi.org/10.1128/AEM.00062-07>
- Warnecke, F., Luginbühl, P., Ivanova, N., Ghassemian, M., Richardson, T. H., Stege, J. T., Cayouette, M., McHardy, A. C., Djordjevic, G., Aboushadi, N., Sorek, R., Tringe, S. G., Podar, M., Martin, H. G., Kunin, V., Dalevi, D., Madejska, J., Kirton, E., Platt, D., ... & Leadbetter, J. R. (2007). Metagenomic and functional analysis of hindgut microbiota of a wood-feeding higher termite. *Nature*, 450(7169), 560-565.
<https://doi.org/10.1038/nature06269>
- Watteyn, C., Fremout, T., Karremans, A. P., Huarcaya, R. P., Azofeifa Bolaños, J. B., Reubens, B., & Muys, B. (2020). Vanilla distribution modeling for conservation and sustainable cultivation in a joint land sparing/sharing concept. *Ecosphere*, 11(3), e03056- e03073.
<https://doi.org/10.1002/ecs2.3056>
- Weiss, P. H., Álvares, A. C., Gomes, A. A., Miletto, L. C., Skoronski, E., da Silva, G. F., de Freitas, S. M., & Magalhaes, M. L. (2015). Beta glucosidase from *Bacillus polymyxa* is activated by glucose-6-phosphate. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 580, 50-56.
<https://doi.org/10.1016/j.abb.2015.06.012>
- White, J. F., Torres, M. S., Sullivan, R. F., Jabbour, R. E., Chen, Q., Tadych, M., Irizarry, I., Bergen, M. S., Havkin-Frenkel, D., & Belanger, F. C. (2014). Occurrence of *Bacillus*

- amyloliquefaciens* as a systemic endophyte of vanilla orchids. *Microscopy research and technique*, 77(11), 874-885. <https://doi.org/10.1002/jemt.22410>
- White, J. R., Maddox, C., White, O., Angiuoli, S. V. & Fricke, W. F. (2013). CloVR-ITS: automated internal transcribed spacer amplicon sequence analysis pipeline for the characterization of fungal microbiota. *Microbiome*, 1(1), 6. <https://doi.org/10.1186/2049-2618-1-6>
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S. J. W. T., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications*, 18(1), 315-322.
- Whitehead, N. A., Byers, J. T., Commander, P., Corbett, M. J., Coulthurst, S. J., Everson, L., Harris, A. K. P., Pemberton, C. L., Simpson, N. J. L., Slater, H., Smith, D. S., Welch, M., Williamson, N., & Smith, D. S. (2002). The regulation of virulence in phytopathogenic *Erwinia* species: quorum sensing, antibiotics and ecological considerations. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 81(1-4), 223-231. <https://doi.org/10.1023/a:1020570802717>
- Wilkowska, A., & Pogorzelski, E. (2017). Aroma enhancement of cherry juice and wine using exogenous glycosidases from mould, yeast and lactic acid bacteria. *Food Chemistry*, 237, 282-289. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.05.120>
- Wright, E. S. (2016). Using DECIPHER v2. 0 to analyze big biological sequence data in R. *R Journal*, 8(1).
- Wulandari, S. (2021). Investment risk management for vanilla agribusiness development in Indonesia. *E3S Web of Conferences*, 232, 02022). EDP Sciences. <https://doi.org/10.1051/e3sconf/202123202022>
- Xu, F., Chen, Y., Cai, Y., Gu, F., & An, K. (2020). Distinct roles for bacterial and fungal communities during the curing of vanilla. *Frontiers in Microbiology*, 11, 2342-2353. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.552388>
- Yadav, M., Pandey, R., & Chauhan, N. S. (2020). Catabolic machinery of the human gut microbes bestow resilience against vanillin antimicrobial nature. *Frontiers in Microbiology*, 11, 2511. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.588545>

- Yalçın, H. T., Fındık, B., Terzi, Y., Uyar, E., & Shatila, F. (2020). Isolation and molecular identification of industrially important enzyme producer yeasts from tree barks and fruits. *Archives of Microbiology*, 203(3), 1079–1088. <https://doi.org/10.1007/s00203-020-02104-6>
- Yan, S., Wei, P. C., Chen, Q., Chen, X., Wang, S. C., Li, J. R., & Gao, C. (2018). Functional and structural characterization of a β -glucosidase involved in saponin metabolism from intestinal bacteria. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 496(4), 1349-1356. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.02.018>
- Yang, B., Wang, Y. & Qian, P. Y. (2016). Sensitivity and correlation of hypervariable regions in 16S rRNA genes in phylogenetic analysis. *BMC Bioinformatics*, 17(1), 135-142. <https://doi.org/10.1186/s12859-016-0992-y>
- Yang, Z., & Rannala, B. (1997). Bayesian phylogenetic inference using DNA sequences: a Markov Chain Monte Carlo method. *Molecular Biology and Evolution*, 14(7), 717-724. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a025811>
- Yao, H., Sun, X., He, C., Maitra, P., Li, X. C., & Guo, L. D. (2019). Phyllosphere epiphytic and endophytic fungal community and network structures differ in a tropical mangrove ecosystem. *Microbiome*, 7(1), 57-72. <https://doi.org/10.1186/s40168-019-0671-0>
- Yao, X., Xiao, L., Liu, H., Zhou, M., Zhou, Z., Ju, X., & Li, L. (2020). Rhamnolipid enhanced beta-glucosidase from *Paenibacillus* sp. LLZ1 for in situ lignocellulose saccharification in ionic liquids. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 1-8. <https://doi.org/10.1007/s13399-020-01002-7>
- Yarza, P., Yilmaz, P., Pruesse, E., Glöckner, F. O., Ludwig, W., Schleifer, K. H., Whitman, W. B., Euzéby, J., Amann, R., & Rosselló-Móra, R. (2014). Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences. *Nature Reviews Microbiology*, 12(9), 635-645. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3330>
- Ybanez, A. P., Sashika, M. & Inokuma, H. (2014). The phylogenetic position of *Anaplasma bovis* and inferences on the phylogeny of the genus *Anaplasma*. *Journal of Veterinary Medical Science*, 76(2), 307-312. <https://doi.org/10.1292/jvms.13-0411>

- Yeh, C. H., Chen, K. Y., Chou, C. Y., Liao, H. Y., & Chen, H. C. (2021). New insights on volatile components of *Vanilla planifolia* cultivated in Taiwan. *Molecules*, 26(12), 3608. <https://doi.org/10.3390/molecules26123608>
- Yoshida, E., Hidaka, M., Fushinobu, S., Koyanagi, T., Minami, H., Tamaki, H., Kitaoka, M., Katayama, T., & Kumagai, H. (2010). Role of a PA14 domain in determining substrate specificity of a glycoside hydrolase family 3 β -glucosidase from *Kluyveromyces marxianus*. *Biochemical Journal*, 431(1), 39-49. <https://doi.org/10.1042/BJ20100351>
- Yuan, Y., & Gao, M. (2015). Genomic analysis of a ginger pathogen *Bacillus pumilus* providing the understanding to the pathogenesis and the novel control strategy. *Scientific Reports*, 5(1), 10259. <https://doi.org/10.1038/srep10259>
- Zalar, P., Kocuvan, M. A., Plemenitaš, A., & Gunde-Cimerman, N. (2005). Halophilic black yeasts colonize wood immersed in hypersaline water. *Botanica Marina*, 48(4), 323–326. <https://doi.org/10.1515/BOT.2005.042>
- Zamzuri, N. A. & Abd-Aziz, S. (2013). Biovanillin from agro wastes as an alternative food flavour. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(3), 429-438. <https://doi.org/10.1002/jsfa.5962>
- Zang, X., Liu, M., Wang, H., Fan, Y., Zhang, H., Liu, J., Xing, A., Xu, X., & Li, H. (2017). The distribution of active β -glucosidase-producing microbial communities in composting. *Canadian Journal of Microbiology*, 63(12), 998-1008. <https://doi.org/10.1139/cjm-2017-0368>
- Zhang, J., Ma, X. T., Gao, J. S., Zhao, J. J., Yin, H. Q., Zhang, C. W., Zhang, R. J., & Zhang, X. X. (2016). *Paenibacillusoryzae* sp. nov., isolated from rice roots. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66(12), 5000-5004. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001459>
- Zhang, P., Zhang, R., Sirisena, S., Gan, R., & Fang, Z. (2021). Beta-glucosidase activity of wine yeasts and its impacts on wine volatiles and phenolics: A mini-review. *Food Microbiology*, 103859. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2021.103859>

- Zhang, P., Zhang, R., Sirisena, S., Gan, R., & Fang, Z. (2021). Beta-glucosidase activity of wine yeasts and its impacts on wine volatiles and phenolics: A mini-review. *Food Microbiology*, *100*(2021), 103859. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2021.103859>
- Zhang, X., Ma, B., Liu, J., Chen, X., Li, S., Su, E., Gao, L., & Li, H. (2020). β -Glucosidase genes differentially expressed during composting. *Biotechnology for Biofuels*, *13*(1), 174. <https://doi.org/10.1186/s13068-020-01813-w>
- Zhang, Y., Mo, L., Chen, F., Lu, M., Dong, W., Wang, Q., Xu, F., & Gu, F. (2014). Optimized production of vanillin from green vanilla pods by enzyme-assisted extraction combined with pre-freezing and thawing. *Molecules*, *19*(2), 2181-2198. <https://doi.org/10.3390/molecules19022181>
- Zhao, J., Shi, D., Yang, S., Lin, H., & Chen, H. (2020). Identification of an intracellular β -glucosidase in *Aspergillus niger* with transglycosylation activity. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *104*(19), 8367-8380. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10840-4>
- Zhou, X. K., Huang, Y., Li, M., Zhang, X. F., Wei, Y. Q., Qin, S. C., Zhang, T. K., Wang, X. J., Liu, J. J., Mr, L. W., Liu, Z. Y., & Mo, M. H. (2020). *Asticcacaulis tiandongensis* sp. nov., a new member of the genus *Asticcacaulis*, isolated from a cave soil sample. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *70*(1), 687-692. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003818>
- Zhu, H., & Sun, S. J. (2008). Inhibition of bacterial quorum sensing-regulated behaviors by *Tremella fuciformis* extract. *Current Microbiology*, *57*(5), 418-422. <https://doi.org/10.1007/s00284-008-9215-8>
- Zhu, S., Li, Q., Chen, S., Wang, Y., Zhou, L., Zeng, C., & Dong, J. (2018). Phylogenetic analysis of *Uncaria* species based on internal transcribed spacer (ITS) region and ITS2 secondary structure. *Pharmaceutical biology*, *56*(1), 548-558. <https://doi.org/10.1080/13880209.2018.1499780>
- Zuniga, A., Donoso, R. A., Ruiz, D., Ruz, G. A., & González, B. (2017). Quorum-sensing systems in the plant growth-promoting bacterium *Paraburkholderia phytofirmans* PsJN exhibit cross-regulation and are involved in biofilm formation. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *30*(7), 557-565. <https://doi.org/10.1094/MPMI-01-17-0008-R>

9. Anexos

Anexo 1. Identificación de la actividad β -D-glucosidasa de bacterias en los sustratos arbutina, esculina y celobiosa.

Especie de <i>Vanilla</i>	Aisl	Sustratos			Clasificación por filogenia	Filo
		A	E	C		
Híbrido de Costa Rica	31	-	-	++	<i>Paenibacillus</i>	Firmicutes
	32	+	+	+	<i>Bacillus</i>	Firmicutes
	34	-	+	++	<i>Curtobacterium</i>	Actinobacteria
	39	-	+	+	<i>Paenibacillus</i>	Firmicutes
	40	+	+	++	<i>Bacillus</i>	Firmicutes
	41	+++	+	+	<i>Bacillus</i>	Firmicutes
	42	+	++	+++	<i>Paenibacillus</i>	Firmicutes
	43	+	+	++	<i>Bacillus</i>	Firmicutes
	44	-	-	+	<i>Bacillus</i>	Firmicutes
	45	+	+	++	<i>Bacillus</i>	Firmicutes
	46	**	**	**	<i>Paenibacillus</i>	Firmicutes
	56	-	++	+	<i>Burkholderia</i>	Proteobacteria
	58	+	-	+	<i>Bacillus</i>	Firmicutes
	59	-	++	+	<i>Burkholderia</i>	Proteobacteria
	60	+	+	++	<i>Bacillus</i>	Firmicutes
	61	+	++	++	<i>Bacillus</i>	Firmicutes
	62	**	**	**	<i>Burkholderia</i>	Proteobacteria
V. <i>planifolia</i>	72	+	+++	++	<i>Curtobacterium</i>	Actinobacteria
	73	+	+++	++	<i>Curtobacterium</i>	Actinobacteria
	74	+	+	+++	<i>Erwiniaceae</i>	Proteobacteria
	75	-	+	+	<i>Paenibacillus</i>	Firmicutes
	77	+	++	+	<i>Sphingomonas</i>	Proteobacteria
	86	-	-	+	<i>Methylobacterium</i>	Proteobacteria
	89	+	+	++	<i>Curtobacterium</i>	Actinobacteria
	90	+	++	++	<i>Methylobacterium</i>	Proteobacteria
	97_F	-	+++	+	<i>Cohnella</i>	Firmicutes
	98	-	-	+++	<i>Paraburkholderia</i>	Proteobacteria
	9	-	-	++	<i>Paraburkholderia</i>	Proteobacteria
	101	-	-	+	<i>Methylobacterium</i>	Proteobacteria
	102	**	**	**	<i>Methylobacterium</i>	Proteobacteria
	109	-	-	+	<i>Methylobacterium</i>	Proteobacteria
	110	-	-	+	<i>Methylobacterium</i>	Proteobacteria
	111	-	-	-	<i>Methylobacterium</i>	Proteobacteria
	112*	-	-	+		
	114	**	**	**	<i>Methylobacterium</i>	Proteobacteria
	121	-	-	++	<i>Bacillus</i>	Firmicutes
	123	+	-	++	<i>Bacillus</i>	Firmicutes
124	+	+	+++	<i>Erwiniaceae</i>	Proteobacteria	
128_F	+	-	++	<i>Bacillus</i>	Firmicutes	
129_F	-	-	+	<i>Bacillus</i>	Firmicutes	
130	-	-	+	<i>Bacillus</i>	Firmicutes	

	160	-	-	-	<i>Gluconobacter</i>	Proteobacteria
	162B	+	+++	+++	<i>Erwiniaceae</i>	Proteobacteria
	163F	+	+	++	<i>Erwiniaceae</i>	Proteobacteria
	165B_F	+	++	+++	<i>Erwiniaceae</i>	Proteobacteria
	165C	+	++	++	<i>Klebsiella</i>	Proteobacteria
	168	**	**	**	<i>Curtobacterium</i>	Actinobacteria
	170F	+	-	++	<i>Erwiniaceae</i>	Proteobacteria
	172	+	++	++	<i>Enterobacteriaceae</i>	Proteobacteria
	173	-	-	-	<i>Sthapylococcus</i>	Proteobacteria
	175	+	+	+	<i>Curtobacterium</i>	Actinobacteria
	178	+	+	++	<i>Curtobacterium</i>	Actinobacteria
	179	-	-	-	<i>Pseudomonas</i>	Proteobacteria
	193	+	+	++	<i>Enterobacteriaceae</i>	Proteobacteria
	195	-	+	++	<i>Curtobacterium</i>	Actinobacteria
	199	-	++	++	<i>Erwiniaceae</i>	Proteobacteria
	200	+	++	++	<i>Enterobacteriaceae</i>	Proteobacteria
<i>V. pompona</i>	201	+	+	++	<i>Enterobacteriaceae</i>	Proteobacteria
	202A	++	++	++	<i>Enterobacteriaceae</i>	Proteobacteria
	203F	+	-	++	<i>Erwiniaceae</i>	Proteobacteria
	204	+	+	++	<i>Bacillus</i>	Firmicutes
	205	+++	+	+++	<i>Enterobacteriaceae</i>	Proteobacteria
	206	**	**	**	<i>Erwiniaceae</i>	Proteobacteria
	207	+	++	++	<i>Enterobacteriaceae</i>	Proteobacteria
	208F	+	+++	+++	<i>Enterobacteriaceae</i>	Proteobacteria
	210	-	++	++	<i>Enterobacteriaceae</i>	Proteobacteria
	211	++	++	++	<i>Enterobacteriaceae</i>	Proteobacteria
	212	-	+	++	<i>Enterobacteriaceae</i>	Proteobacteria
	213	-	-	-	<i>Pseudomonas</i>	Proteobacteria
	215	-	-	+	<i>Pseudomonas</i>	Proteobacteria
	216	+	++	+	<i>Serratia</i>	Proteobacteria
	218	+	++	++	<i>Enterobacteriaceae</i>	Proteobacteria
	221				<i>Klebsiella</i>	Proteobacteria
	223	+	+	+	<i>Sphingomonas</i>	Proteobacteria

Aisl = Aislamiento

A = Arbutina

E = Esculina

C = Celobiosa

*Secuencias del ARNr 16S de baja calidad

** Pérdida de células viables

Anexo 2. Identificación de la actividad β -D-glucosidasa en levaduras sobre los sustratos arbutina y esculina

Especie	Aisl	A	E	Identificación*		Clasificación de aislamientos por filogenia	Filo	
				Clasificación de aislamientos*	Similitud (%)			Cobertura (%)
Híbrido de Costa Rica	33			<i>Papiliotrema flavescens</i> , <i>Cryptococcus Sporidiobolus metaroseus</i>	100,0	100,0	<i>Tremellales</i>	Bas
	38			<i>Sporidiobolus metaroseus</i>	99,8	99,8	<i>Sporobolomyces</i>	Bas
	47			<i>Sporidiobolus metaroseus</i>	99,6	99,8	<i>Sporobolomyces</i>	Bas
	49	**	**	<i>Sporidiobolus metaroseus</i>	99,8	99,8	<i>Sporobolomyces</i>	Bas
	52			<i>Sporidiobolus metaroseus</i>	99,4	99,8	<i>Sporobolomyces</i>	Bas
	53			<i>Papiliotrema flavescens</i>	100,0	100,0	<i>Tremellales</i>	Bas
	54			<i>Rhodotorula nothofagi</i>	99,2	100,0	<i>Sporidiobolaceae</i>	Bas
	57			<i>Papiliotrema flavescens</i>	99,8	100,0	<i>Tremellales</i>	Bas
<i>V. planifolia</i>	76	++	+++	<i>Papiliotrema flavescens</i>	100,0	100,0	<i>Tremellales</i>	Bas
	103	+++	+++	<i>Papiliotrema flavescens</i>	100,0	100,0	<i>Tremellales</i>	Bas
	122	-	++	<i>Papiliotrema flavescens</i>	100,0	100,0	<i>Tremellales</i>	Bas
	136	++	+++	<i>Papiliotrema flavescens</i>	100,0	100,0	<i>Tremellales</i>	Bas
	137	++	+++	<i>Papiliotrema sp</i>	100,0	100,0	<i>Tremellales</i>	Bas
	138	+++	+++	<i>Papiliotrema flavescens</i>	100,0	100,0	<i>Tremellales</i>	Bas
	140	++	+++	<i>Cryptococcus aureus</i>	100,0	100,0	<i>Tremellales</i>	Bas
	144	++	+++	<i>Cryptococcus aureus</i> , <i>Papiliotrema aurea</i>	100,0	100,0	<i>Tremellales</i>	Bas
146	+++	+++	<i>Papiliotrema flavescens</i>	100,000	100,0	<i>Tremellales</i>	Bas	
147	++	+++	<i>Papiliotrema flavescens</i>	100,0	100,0	<i>Tremellales</i>	Bas	

	149	++	+++	<i>Rhodotorula paludigena</i>	99,8	100,0	<i>Rhodotorula paludigena</i>	Bas
	150	+++	+++	<i>Papiliotrema flavescens</i>	100,0	100,0	<i>Tremellales</i>	Bas
	161	+	+++ +	<i>Candida pseudoflosculorum</i>	99,4	100,0	<i>Saccharomycetales</i>	Asc
	168 ⁺	-	++					
	169	-	+++	<i>Tremella sp</i>	99,1	100,0	<i>Tremella sp</i>	Bas
	176	++	+++	<i>Papiliotrema sp</i>	99,9	100,0	<i>Tremellales</i>	Bas
	177	-	+++	<i>Cryptococcus flavescens, Papiliotrema flavescens</i>	100,0	100,0	<i>Tremellales</i>	Bas
	181	-	-	<i>Candida Cryptococcus flavescens,</i>	94,9	100,0	<i>Saccharomycetales</i>	Bas
	182	**	**	<i>Papiliotrema flavescens</i>	100,0	100,0	<i>Tremellales</i>	Bas
V.	183	+	+++	<i>Cyberlindnera pompona</i>	95,2	99,1	<i>Cyberlindnera</i>	Asc
	184	+++	+++	<i>Papiliotrema</i>	98,9	99,8	<i>Tremellales</i>	Bas
	186	-	+++	<i>Candida</i>	97,4	100,0	<i>Cyberlindnera</i>	Asc
	187	+++	+++	<i>Papiliotrema flavescens</i>	100,0	100,0	<i>Tremellales</i>	Bas
	188	**	**	<i>Candida oleophila</i>	100,0	100,0	<i>Debaryomycetaceae</i>	Asc
	190	**	**	<i>Candida railenensis</i>	100,0	100,0	<i>Debaryomycetaceae</i>	Asc
	197	-	+	<i>Candida railenensis</i>	100,0	100,0	<i>Saccharomycetales</i>	Asc
	206 ⁺	+	+++					
	222	-	++	<i>Occultifur tropicalis</i>	99,1	99,8	<i>Cystobasidiales</i>	Bas
	226	-	+++	<i>Candida railenensis</i>	100,0	100,0	<i>Debaryomycetaceae</i>	Asc

Aisl = Asilamiento

A = Arbutina

E = Esculina

+ = secuencias de ITS de baja calidad

*Identificación de levaduras por el método empleado por Arbefeville y otros (2017)

**Perdida de células viables

Anexo 3. Valores de los parámetros estadísticos obtenidos en el análisis de *Exabayes* para el árbol filogenético de Actinobacteria

Parámetros	media	Ds	perc5	perc25	mediana	perc75	per95	ESS>100	psrf<1.1
pi{0}(T)	1.990943169	1.014571165	1.989583103	1.921263456	1.989583103	2.058303136	2.160701833	2.407895194	9.999783927
pi{0}(G)	849911e-01	938265e-02	565382e-01	533270e-01	565382e-01	339165e-01	506667e-01	631374e+04	790390e-01
r{0}(A<->C)	3.212682711	1.205443437	3.211791036	3.130863258	3.211791036	3.293394335	3.413074429	2.668700766	9.999792241
LnPr	719569e-01	839277e-02	745184e-01	253620e-01	745184e-01	500547e-01	373212e-01	246735e+04	636761e-01
r{0}(G<->T)	8.320974382	2.386241343	8.111386218	6.625376255	8.111386218	9.813980581	1.255131968	2.518668098	9.999943801
TL{0}	204327e-02	252550e-02	326357e-02	215869e-02	326357e-02	035127e-02	015736e-01	482791e+04	774487e-01
LnL	8.873112405	2.230659052	8.874400861	8.858831049	8.874400861	8.888701902	8.907592843	2.854099681	9.999674084
r{0}(A<->T)	7.853367738	2.013043000	7.699931312	6.407634747	7.699931312	9.146147475	1.141145843	1.259497955	9.999683396
alpha{0}	049355e-02	716548e-02	371851e-02	662048e-02	371851e-02	426310e-02	086890e-01	773734e+04	094080e-01
pi{0}(A)	2.350628418	2.230659052	2.337747786	2.194751071	2.337747786	2.493478266	2.735459321	2.854099681	9.999674084
r{0}(A<->G)	632422e-01	493722e-02	766431e-01	845090e-01	766431e-01	608266e-01	855072e-01	411682e+04	362318e-01
pi{0}(C)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
alpha{0}	3.074355064	6.551518215	3.073995960	3.078540859	3.073995960	3.069743400	3.064257841	2.658222632	9.999672291
r{0}(A<->T)	920961e+03	111037e+00	277180e+03	521379e+03	277180e+03	940361e+03	090073e+03	026631e+04	093500e-01
r{0}(A<->G)	2.388542116	1.108530903	2.387539496	2.313155900	2.387539496	2.462322915	2.573617811	2.590190274	9.999666684
r{0}(C<->G)	704516e-01	689734e-02	214675e-01	502430e-01	214675e-01	101258e-01	762974e-01	080800e+04	382433e-01
pi{0}(C)	4.586681712	2.574809352	4.007186616	2.000000000	4.007186616	6.248687800	9.515594522	2.875005897	9.999690260
r{0}(A<->T)	420394e-02	645029e-02	852968e-02	000000e-02	852968e-02	052268e-02	523289e-02	609916e+04	132422e-01
r{0}(A<->G)	1.054538724	2.779366338	1.034467758	8.562133997	1.034467758	1.232045620	1.543228432	2.222043822	9.999768502
r{0}(C<->G)	117982e-01	852266e-02	025220e-01	622891e-02	025220e-01	526570e-01	813588e-01	199648e+04	148713e-01
pi{0}(C)	1.634054515	2.874029444	1.616006916	1.431924480	1.616006916	1.817930922	2.137305215	2.381536277	1.000001116
r{0}(C<->T)	167379e-01	620819e-02	159116e-01	758088e-01	159116e-01	482955e-01	414269e-01	799453e+04	201157e+00
pi{0}(C)	1.216526635	2.358523141	1.201183878	1.051433176	1.201183878	1.369174142	1.626544906	2.516041770	9.999709259
r{0}(C<->T)	776803e-01	910057e-02	178639e-01	298880e-01	178639e-01	400340e-01	350616e-01	249317e+04	052222e-01
pi{0}(C)	2.407832001	1.100159031	2.407133144	2.333701305	2.407133144	2.480854597	2.591537876	2.558216260	9.999671788
r{0}(C<->T)	725973e-01	138011e-02	086288e-01	936716e-01	086288e-01	477700e-01	885745e-01	743720e+04	128396e-01
pi{0}(C)	4.477445912	4.701743286	4.475847776	4.157683033	4.475847776	4.795949627	5.259103017	2.019091975	1.000041098
r{0}(C<->T)	912471e-01	682353e-02	711832e-01	101713e-01	711832e-01	191837e-01	232831e-01	968699e+04	552894e+00

ASDF<0.01

Anexo 4. Valores de los parámetros estadísticos obtenidos en el análisis de *Exabayes* para el árbol filogenético del filo Firmicutes

Parámetros	media	Ds	perc5	perc25	mediana	perc75	per95	ESS>100	psrf<1.1
pi{0}(T)	2.292004107	5.687010866	2.291210383	2.253515661	2.291210383	2.330044734	2.386854836	7.279327286	9.999897319
	175362e-01	742675e-03	233081e-01	210671e-01	233081e-01	806435e-01	231685e-01	445481e+03	776697e-01
pi{0}(G)	2.943415883	6.708178764	2.943180290	2.897750324	2.943180290	2.988521540	3.054168500	9.270203519	1.000394536
r{0}(A<->C)	339133e-01	532672e-03	314446e-01	384901e-01	314446e-01	533448e-01	312296e-01	648267e+03	079424e+00
	8.059459410	3.855966011	8.053724249	7.795480422	8.053724249	8.316500673	8.702651846	6.220495227	1.001477849
	933018e-02	837833e-03	067458e-02	908094e-02	067458e-02	853228e-02	379031e-02	036891e+03	349765e+00
LnPr	1.579755232	8.819721265	1.579825685	1.573728246	1.579825685	1.585756856	1.594207143	2.613423641	1.001195685
	759190e+03	292518e+00	561917e+03	084172e+03	561917e+03	321386e+03	767463e+03	356108e+03	206593e+00
	7.386676947	3.287244826	7.382532578	7.162502186	7.382532578	7.605750217	7.933332290	8.778857586	1.000063648
r{0}(G<->T)	402290e-02	484065e-03	402090e-02	077546e-02	402090e-02	885540e-02	225620e-02	440443e+03	890767e+00
	4.086566363	8.819721265	4.085862389	4.026558251	4.085862389	4.146846231	4.231952835	2.613423641	1.001195685
TL{0}	451558e+01	292412e-01	579242e+01	625433e+01	579242e+01	162606e+01	104065e+01	356033e+03	206627e+00
	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LnL	4.652921907	2.433410690	4.652898409	4.654558774	4.652898409	4.651247815	4.648982961	4.298388355	1.000365881
	834528e+04	232978e+01	409847e+04	547828e+04	409847e+04	632977e+04	253775e+04	588263e+03	243538e+00
pi{0}(A)	2.454847098	6.502283147	2.455190574	2.411075421	2.455190574	2.499221326	2.560809415	4.356455294	1.001409415
	798344e-01	793200e-03	535775e-01	423089e-01	535775e-01	183603e-01	474560e-01	156535e+03	251473e+00
alpha{0}	3.115183558	7.786129862	3.114610239	3.062840252	3.114610239	3.166843435	3.244641794	1.260864016	1.000197455
	541579e-01	285814e-03	503550e-01	131668e-01	503550e-01	063978e-01	270448e-01	026782e+04	176109e+00
	1.024179370	4.322786824	1.023686844	9.945657287	1.023686844	1.052979464	1.096363289	1.372416153	1.002207878
r{0}(A<->T)	814761e-01	889861e-03	771037e-01	329039e-02	771037e-01	759575e-01	293246e-01	199870e+04	255065e+00
r{0}(A<->G)	2.683963502	9.970777233	2.681848094	2.614541198	2.681848094	2.751110957	2.851968614	2.657024862	1.000504729
	287837e-01	772900e-03	851844e-01	592868e-01	851844e-01	270203e-01	324235e-01	522234e+03	172746e+00
r{0}(C<->G)	6.038500266	2.990430792	6.033036619	5.833516464	6.033036619	6.237239423	6.539433268	1.808405433	1.001004977
	245445e-02	989296e-03	108174e-02	495358e-02	108174e-02	345954e-02	290006e-02	723451e+04	587562e+00
	2.309732910	5.952409550	2.309530803	2.269353891	2.309530803	2.349685136	2.407582133	3.199421230	1.000332740
pi{0}(C)	687151e-01	381633e-03	029988e-01	231342e-01	029988e-01	217149e-01	358099e-01	158165e+03	973606e+00
	4.143393464	1.164639762	4.144220973	4.064585583	4.144220973	4.224389125	4.332276137	2.667463177	1.001919860
r{0}(C<->T)	439254e-01	107687e-02	912873e-01	785557e-01	912873e-01	946579e-01	544274e-01	320435e+03	925530e+00

ASDF<0.022

Anexo 5. Valores de los parámetros estadísticos obtenidos en el análisis de *Exabayes* para el árbol filogenético del filo Proteobacteria

Parámetros	media	Ds	perc5	perc25	mediana	perc75	per95	ESS>100	psrf<1.1
	2.228618788	5.078108017	2.229477734	2.194953191	2.229477734	2.263177508	2.310574747	3.253043262	1.068189247
pi{0}(T)	212641e-01	903717e-03	542775e-01	394612e-01	542775e-01	575758e-01	281777e-01	245464e+02	764577e+00
	3.385444529	6.275408501	3.385259062	3.342805917	3.385259062	3.427450998	3.489221301	7.139630079	1.025941048
pi{0}(G)	309237e-01	505216e-03	786569e-01	564607e-01	786569e-01	857712e-01	867007e-01	906503e+02	964043e+00
r{0}(A<->C)	8.370177299	3.635522974	8.365227729	8.121128057	8.365227729	8.612850517	8.976625344	2.747899817	1.002047521
	797318e-02	107725e-03	648142e-02	436229e-02	648142e-02	602146e-02	974740e-02	296241e+03	306561e+00
	1.735886623	1.431791185	1.736607997	1.726740776	1.736607997	1.745797194	1.758158561	2.521274955	1.098693166
LnPr	610866e+03	746128e+01	275766e+03	504358e+03	275766e+03	116780e+03	290673e+03	243350e+02	168839e+00
	9.114083478	3.276354527	9.109886637	8.890664883	9.109886637	9.332471984	9.657956688	7.270717775	1.001966591
r{0}(G<->T)	143353e-02	818988e-03	052379e-02	386000e-02	052379e-02	290948e-02	026102e-02	286819e+03	967278e+00
	6.900164131	1.431791185	6.892952560	6.801065779	6.892952560	6.991637480	7.148145702	2.521274955	1.098693166
TL{0}	623703e+01	746113e+00	499037e+01	541963e+01	499037e+01	416668e+01	963923e+01	243502e+02	168356e+00
	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	6.018119968	2.596008424	6.018074248	6.019843839	6.018074248	6.016352152	6.013905512	1.069842088	1.004816564
LnL	063416e+04	034505e+01	327286e+04	072615e+04	327286e+04	349428e+04	051014e+04	025585e+03	210995e+00
	1.896009900	4.575289041	1.895239358	1.864731627	1.895239358	1.926669602	1.972533464	1.704376467	1.007557101
pi{0}(A)	100194e-01	796897e-03	594148e-01	655669e-01	594148e-01	019403e-01	900061e-01	380961e+03	076918e+00
	3.286037571	4.325543262	3.285981437	3.256621182	3.285981437	3.315055547	3.357214273	2.810365986	1.000030484
alpha{0}	976548e-01	177975e-03	983054e-01	526107e-01	983054e-01	980740e-01	510640e-01	058913e+03	817130e+00
	1.527717273	4.992705652	1.527198001	1.493823723	1.527198001	1.561017160	1.610588247	9.435911456	1.008328760
r{0}(A<->T)	176289e-01	241021e-03	722870e-01	270052e-01	722870e-01	407712e-01	422997e-01	877499e+02	462109e+00
r{0}(A<->G)	2.562883136	7.282639623	2.564189157	2.514259146	2.564189157	2.612565554	2.680456372	4.061756271	1.063338344
	690029e-01	804620e-03	853929e-01	788766e-01	853929e-01	438714e-01	914914e-01	893975e+02	650953e+00
r{0}(C<->G)	8.347144232	2.913128793	8.344325842	8.148821795	8.344325842	8.542619311	8.832545303	1.065400771	1.013851618
	978426e-02	877607e-03	399165e-02	631503e-02	399165e-02	891357e-02	059947e-02	936787e+03	476433e+00
	2.489926782	5.264702330	2.489630229	2.454146967	2.489630229	2.525444986	2.576888917	1.399822233	1.000339211
pi{0}(C)	377898e-01	599332e-03	847822e-01	601496e-01	847822e-01	710505e-01	670973e-01	270547e+03	269794e+00
	3.326259089	8.173462821	3.324010147	3.270101891	3.324010147	3.380486092	3.463690035	5.353706696	1.044753433
r{0}(C<->T)	041718e-01	945572e-03	874444e-01	804337e-01	874444e-01	622727e-01	564920e-01	023123e+02	870479e+00

ASDF<0.05

Anexo 6. Valores de los parámetros estadísticos obtenidos en el análisis de *Exabayes* para el árbol filogenético del filo Basidiomycota

Parámetros	media	Ds	perc5	perc25	mediana	perc75	per95	ESS	psrf
pi{0}(T)	3,878899147	1,162630723	3,880947833	3,802092987	3,880947833	3,958064361	4,066063793	3,853306517	1,000034554
	018899e-01	439896e-02	960019e-01	878347e-01	960019e-01	311845e-01	282235e-01	614815e+03	067056e+00
	1,121141492	6,788795362	1,119252751	1,074625216	1,119252751	1,165743290	1,235500474	1,178339461	9,999948158
pi{0}(G)	379248e-01	052042e-03	501209e-01	260830e-01	501209e-01	768930e-01	445341e-01	060315e+04	785440e-01
r{0}(A<->C)	1,000338716	7,436940038	9,985713359	9,493658163	9,985713359	1,049619391	1,125643325	6,727827912	1,000010531
	945711e-01	322509e-03	183017e-02	272241e-02	183017e-02	118863e-01	050831e-01	849202e+03	566009e+00
	1,283237382	1,096126719	1,283549027	1,276566013	1,283549027	1,290426043	1,300253024	2,672032269	1,000093480
LnPr	630097e+03	912102e+01	407523e+03	493724e+03	407523e+03	978931e+03	195753e+03	802602e+03	858341e+00
	8,582025829	8,364122741	8,542903098	7,998066363	8,542903098	9,129018611	1,001826420	4,768038400	1,000013050
r{0}(G<->T)	046916e-02	489512e-03	138256e-02	860440e-02	138256e-02	205654e-02	280485e-01	751546e+03	133948e+00
	3,689970628	1,096126719	3,686854580	3,618089058	3,686854580	3,756688410	3,865851637	2,672032269	1,000093480
TL{0}	970714e+01	912109e+00	039507e+01	816875e+01	039507e+01	578732e+01	250535e+01	802576e+03	858357e+00
	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1,320333072	2,500252099	1,320294861	1,321989257	1,320294861	1,318631862	1,316299019	2,708868778	1,000141895
LnL	578235e+04	557783e+01	945348e+04	973922e+04	945348e+04	346224e+04	613937e+04	393999e+03	679323e+00
	1,889086187	1,090932989	1,877246410	1,811902292	1,877246410	1,956949264	2,087579506	2,016029883	9,999962750
pi{0}(A)	211754e-01	370460e-02	703949e-01	778929e-01	703949e-01	107757e-01	493237e-01	042519e+03	186663e-01
	3,683021475	1,420673542	3,678546259	3,585385072	3,678546259	3,775601035	3,924044999	5,903311089	1,000133100
alpha{0}	507448e-01	240934e-02	778697e-01	235705e-01	778697e-01	066622e-01	689469e-01	091759e+03	382744e+00
	1,273315795	8,292547805	1,271461450	1,216575557	1,271461450	1,328028278	1,412767157	8,671198629	1,000003606
r{0}(A<->T)	515775e-01	765674e-03	201248e-01	702111e-01	201248e-01	755882e-01	128245e-01	711775e+03	167935e+00
r{0}(A<->G)	4,682293284	2,056519918	4,687006173	4,546480687	4,687006173	4,823237461	5,012852068	4,544016579	9,999977860
	711840e-01	783127e-02	021776e-01	690005e-01	021776e-01	402091e-01	091834e-01	722484e+03	590203e-01
r{0}(C<->G)	5,098025855	6,651457753	5,068457329	4,634443254	5,068457329	5,526590965	6,239366645	1,118742026	1,000000124
	901721e-02	883110e-03	218377e-02	050424e-02	218377e-02	335963e-02	113188e-02	079498e+04	606502e+00
	3,110873173	1,097077904	3,109917141	3,036960585	3,109917141	3,183876462	3,291588088	3,954534875	1,000014111
pi{0}(C)	390157e-01	197287e-02	941390e-01	986505e-01	941390e-01	131331e-01	771783e-01	762530e+03	363390e+00
	1,676047034	1,293712338	1,665442257	1,584767343	1,665442257	1,756780007	1,906231677	2,374633459	1,000053085
r{0}(C<->T)	331746e-01	696250e-02	562843e-01	481972e-01	562843e-01	171045e-01	847985e-01	249343e+03	404902e+00

ASDF<0.00716098

Anexo 7. Valores de los parámetros estadísticos obtenidos en el análisis de *Exabayes* para el árbol filogenético del filo Ascomycota

Parámetros	media	Ds	perc5	perc25	mediana	perc75	perc95	ESS	psrf
pi{0}(T)	3.825791734	2.019244162	3.840297859	3.684906741	3.840297859	3.967650448	4.145095304	5.216105576	1.001671759
pi{0}(G)	063079e-01	688792e-02	450787e-01	376290e-01	450787e-01	918457e-01	180857e-01	619979e+02	202647e+00
r{0}(A<->C)	1.356014455	1.329446130	1.317661546	1.261067057	1.317661546	1.427845635	1.621571473	5.654670769	1.002391784
LnPr	761897e-01	680658e-02	052124e-01	340658e-01	052124e-01	484219e-01	271190e-01	024722e+02	190896e+00
r{0}(G<->T)	1.146502685	9.728110876	1.143802825	1.078719712	1.143802825	1.211691460	1.311455889	3.652656368	1.000384722
TL{0}	736353e-01	504650e-03	435793e-01	660212e-01	435793e-01	850848e-01	728198e-01	576355e+03	054385e+00
LnL	6.187926798	2.097215232	6.157460133	6.037066305	6.157460133	6.328222137	6.568133445	5.192510626	1.002268449
r{0}(A<->T)	924599e+02	047548e+01	880506e+02	368171e+02	880506e+02	612743e+02	063646e+02	866796e+02	449661e+00
alpha{0}	9.101962414	8.828135144	9.095011315	8.496831230	9.095011315	9.694861388	1.056776290	4.106809628	1.000124863
pi{0}(A)	928658e-02	692009e-03	547694e-02	419033e-02	547694e-02	072226e-02	546491e-01	836170e+03	922127e+00
r{0}(A<->G)	3.656920886	2.097215232	3.687392020	3.516633120	3.687392020	3.807792427	3.963512136	5.192510626	1.002268449
pi{0}(C)	664444e+01	047532e+00	289779e+01	476112e+01	289779e+01	995113e+01	780011e+01	866733e+02	449681e+00
alpha{0}	-	-	-	-	-	-	-	-	-
r{0}(A<->T)	1.876451840	1.864271823	1.876415936	1.877691734	1.876415936	1.875171435	1.873448016	3.734630288	1.000360005
r{0}(A<->G)	863773e+04	818981e+01	792208e+04	443464e+04	792208e+04	323425e+04	897220e+04	762151e+03	610261e+00
r{0}(C<->G)	2.456387679	1.545863219	2.472239744	2.358598058	2.472239744	2.564663294	2.689001725	9.646095550	1.000597556
pi{0}(A)	019973e-01	495128e-02	563534e-01	867948e-01	563534e-01	217007e-01	346631e-01	315673e+02	595049e+00
alpha{0}	4.129556809	1.627312582	4.120050936	4.015816629	4.120050936	4.234542234	4.412483380	1.384171372	1.000732147
r{0}(A<->T)	770823e-01	148406e-02	130354e-01	316426e-01	130354e-01	627544e-01	839618e-01	430716e+03	167282e+00
r{0}(A<->G)	1.822783935	1.475525407	1.794799469	1.716686869	1.794799469	1.911066336	2.105581870	7.040553081	1.001490139
r{0}(C<->G)	360153e-01	962650e-02	434538e-01	903039e-01	434538e-01	215423e-01	040406e-01	822075e+02	578000e+00
pi{0}(C)	3.401567009	3.002829624	3.449311096	3.197654610	3.449311096	3.618727704	3.835758460	5.222115278	1.001953394
alpha{0}	082798e-01	567581e-02	663664e-01	904067e-01	663664e-01	703433e-01	189970e-01	815934e+02	263851e+00
r{0}(C<->T)	1.030457104	1.172047678	1.030845420	9.486664682	1.030845420	1.110959274	1.222936779	1.476274601	1.000646827
pi{0}(C)	325740e-01	604776e-02	908762e-01	879159e-02	908762e-01	069496e-01	744598e-01	773368e+03	497427e+00
alpha{0}	2.361806131	9.633427287	2.360027231	2.295577909	2.360027231	2.425663073	2.523446153	6.341750120	1.000440824
r{0}(C<->T)	155053e-01	599281e-03	970204e-01	668013e-01	970204e-01	763474e-01	781816e-01	387155e+03	573563e+00
alpha{0}	1.688493024	2.118133194	1.654910381	1.533884948	1.654910381	1.827219596	2.078495076	5.104803460	1.002075105
ASDF	002149e-01	289099e-02	689435e-01	834791e-01	689435e-01	671932e-01	239897e-01	731802e+02	808709e+00

ASDF<0.00474008