

## CARACTERIZACIÓN DE LEVADURAS ASOCIADAS AL MOHO DEL PEDÚNCULO DE PIÑA EN POSCOSECHA

Patricia Oreamuno-Fonseca<sup>1/\*</sup>, Gerardina Umaña-Rojas<sup>2</sup>

**Palabras clave:** *Ananas comosus* L.; fitopatógenos; morfología; descripción molecular; crecimiento; temperatura.

**Keywords:** *Ananas comosus* L.; phytopathogens; morphology; molecular description; growth; temperature.

**Recibido:** 02/02/23

**Aceptado:** 18/04/23

### RESUMEN

**Introducción.** El moho del pedúnculo de la piña es un complejo de microorganismos, que se compone por varios hongos, bacterias y levaduras, que afectan a la fruta en su etapa poscosecha. **Objetivo.** Caracterizar las levaduras asociadas al moho del pedúnculo de la piña en poscosecha, y evaluar el efecto de diferentes temperaturas sobre el crecimiento de las levaduras durante el almacenamiento. **Materiales y métodos.** Se realizó la caracterización morfológica de 24 aislamientos; posteriormente, se seleccionaron 9 aislamientos representativos para la caracterización molecular. Para evaluar el crecimiento de las levaduras a diferentes temperaturas, se colocaron suspensiones de estas en concentraciones de  $10^{-6}$  unidades formadoras de colonias (UFC) sobre placas Petri con el medio PDA (papa-dextrosa-agar). Las placas se almacenaron en una cámara con temperaturas a 4°C, 8°C, 12°C, 16°C y 20°C, y se contó el número de colonias a los 2, 3, 4 y 5 días, de iniciado el

experimento. **Resultados.** Para la descripción microscópica, las células presentaron formas redondas, ovaladas y cilíndricas. En la descripción macroscópica, las formas de las colonias de las levaduras fueron redondas y/o ovaladas. La consistencia de las colonias de las levaduras no pigmentadas fue mantecosa o cremosa, mientras que en las pigmentadas fueron mucoides. En la descripción molecular, las levaduras pigmentadas se clasificaron en las siguientes especies: *Rhodotorula mucilaginosa*, *R. toruloides*, *R. diobovata*, *Sporidiobolus pararoseus* y *S. carnicolor*, y las levaduras no pigmentadas en *Candidata intermedia*, *Meyerozyma guilliermondii* y *M. caribbica*. Para el ensayo de temperaturas, se observó que conforme la temperatura de almacenamiento disminuyó en 4°C, las colonias de las levaduras tardaron un día más en hacerse visibles. **Conclusión.** Se encontró similitud entre la morfología de los aislamientos, por lo que la caracterización molecular permitió identificar la presencia de especies con potencial de biocontroladores para los patógenos asociados al moho.

\* Autora para correspondencia. Correo electrónico: ooreamuno@uned.ac.cr

1 Universidad Estatal a Distancia, Carrera Ingeniería Agronómica, Sabánilla, Costa Rica.

 0000-0002-5560-3947.

2 Universidad de Costa Rica, Facultad de Ciencias Agroalimentarias, Centro de Investigaciones Agronómicas, San José, Costa Rica.

 0000-0002-6368-5225.

## ABSTRACT

### Characterization of yeasts associated with postharvest pineapple peduncle mold.

**Introduction.** Pineapple peduncle mold is a complex of microorganisms composed of several fungi, bacteria and yeasts, which affect the fruit at the postharvest stage. **Objective.** To characterize the yeasts associated with postharvest pineapple peduncle mold, and to evaluate the effect of different temperatures on yeast growth during storage. **Materials and methods.** Morphological characterization of 24 isolates was carried out, subsequently, 9 representative isolates were selected for molecular characterization. To evaluate yeast growth at different temperatures, yeast suspensions in concentrations of  $10^{-6}$  CFU were placed on Petri dishes with PDA (potato-dextrose-agar) medium. The plates were stored in a chamber with temperature at 4°C, 8°C, 12°C, 16°C and 20°C, and the number of colonies was counted at 2, 3, 4 and 5 days after starting

the experiment. **Results.** For the microscopic description, the yeast cells presented round, oval and cylindrical shapes. In the macroscopic description, the shapes of the yeast colonies were round and/or oval. The consistency of non-pigmented yeast colonies was buttery or creamy, while pigmented yeast were mucoid. For molecular description, pigmented yeasts were classified into the following species: *Rhodotorula mucilaginosa*, *R. toruloides*, *R. diobovata*, *Sporidiobolus pararoseus* and *Sporobolomyces carnicolor*, and non-pigmented yeasts: *Candida intermedia*, *Meyerozyma guilliermondii* and *M. caribbica*. For the temperature test, it was observed that as the storage temperature decreased by 4°C, it took one more day for yeast colonies to become visible. **Conclusion.** Similarities were found between the morphology of the isolates, the molecular characterization allowed identifying the presence of species with potential for biocontrol of pathogens associated with molds.

## INTRODUCCIÓN

El cultivo de la piña (*Ananas comosus* L.) con un área de siembra aproximada de 43 000 ha es uno de los principales productos de exportación en Costa Rica, especialmente a mercados en Estados Unidos y la Unión Europea, (CANAPEP 2019). En el 2022, la piña tuvo en el mercado exportador una participación del 17,6% y un valor de \$1 021,3 millones, además el jugo de piña participo con 3,4% (SEPSA 2023).

Las enfermedades poscosecha son uno de los problemas de la industria piñera, debido a que causan en los frutos pudriciones durante el transporte y el almacenamiento, lo cual generan el rechazo de la piña en las plantas empacadoras y el mercado final (Barquero 2010). El moho en el pedúnculo de la piña es un complejo de hongos que generan deterioro en el corte de la fruta, entre las especies identificadas se pueden citar *Penicillium purpureogenum*, *Penicillium*

*diversum*, y *Talaromyces calidicanus* (Castro y Umaña 2015). Igualmente, se ha reportado un grupo de hongos de micelio blanco (Hgb1) relacionados a este moho, como lo son las especies *P. daleae*, *Xylarai adscendens* y *Daldinia eschscholtzii* (Castro y Umaña 2017).

Adicionalmente, se han identificado bacterias y levaduras que crecen tanto en el pedúnculo como en la cáscara de la fruta. Estos microorganismos se han reportado en crecimiento con mayor frecuencia en los pedúnculos de la piña, con valores entre 0,5 y 4,6 UFC.ml<sup>-1</sup> antes del procesamiento comercial y entre 0 y 2,7 UFC.ml<sup>-1</sup> después del procesamiento comercial (Castro y Umaña 2019).

Con respecto a las levaduras, estos microorganismos pueden causar problemas poscosecha al afectar la calidad de las frutas, pero algunas especies se han estudiado por su potencial como controladores biológicos de patógenos (Spadaro y Droby 2016). Las levaduras son

hongos eucariotas, ubicuos, que pueden tener interacción del tipo simbiótico, mutualismo o parasitismo (Starmer y Lachance 2011). El crecimiento de estos organismos depende de factores como la temperatura, los nutrientes, el pH, la humedad, el oxígeno, el estrés oxidativo, entre otros (Sui *et al.* 2015).

Algunas levaduras como *Rhodotorula mucilaginosa* y *Candida fukuyameensis* se han estudiado por el potencial como controladores biológicos poscosecha en piña (Torres *et al.* 2006, Lassois *et al.* 2008, Li *et al.* 2011). Las levaduras *Meyerozyma guilliermondii* y *M. caribbica* se han utilizado para el control del moho gris causado por *Botrytis* sp, que se presenta en los frutos de kiwi (Cheng *et al.* 2023, Pan *et al.* 2022, Qiu *et al.* 2022).

En Costa Rica, se reportó la alta frecuencia de *Wickerhamomyces anomalus* en muestras de piñas (Castro y Umaña 2019). Esta levadura tiene la habilidad de colonizar las frutas y suprimir a otros microorganismos, lo que evidencia su papel como un potencial controlador biológico contra patógenos relacionados con el moho poscosecha de la piña (Aloui *et al.* 2015, Platania *et al.* 2012).

Asimismo, el uso de las levaduras *Hanseniaspora uvarum*, *M. guilliermondii* y *Metzchnikowia aff. pulcherrima* en mezcla para el combate del moho verde poscosecha en mandarinas demostró un alto control del patógeno *P. digitatum* tanto in vivo como in vitro (Öztekin y Karbancioglu 2023).

También, las levaduras del género *Candida* podrían estar relacionadas con la maduración prematura y fermentación de los frutos de la piña, en conjunto con otras levaduras como *Saccharomyces* sp., y *Kloeckera* sp. y la bacteria *Klebsiella* sp. (Korres *et al.* 2010). También, en frutos y jugos procesados de piña se han identificado *Pichia guilliermondii* y *Hanseniaspora uvarum* asociadas al proceso de fermentación (Chanprasartsuk *et al.* 2010).

El objetivo de este trabajo fue caracterizar las levaduras asociadas al moho del pedúnculo de la piña (*Ananas comosus* L.) en poscosecha,

y evaluar el efecto de diferentes temperaturas sobre el crecimiento de las levaduras durante el almacenamiento, esto con el fin de conocer si las especies identificadas presentan un papel potencial como agente beneficioso o perjudicial, en la calidad poscosecha de la fruta.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Los trabajos se realizaron en el Laboratorio de Tecnología de Poscosecha del Centro de Investigaciones Agronómicas (CIA) de la Universidad de Costa Rica, en el 2019. Se trabajó con 24 aislamientos de levaduras obtenidos en investigaciones previas, del pedúnculo de la piña (MD-2 “Gold extra sweet”) con moho poscosecha. Las levaduras presentaron coloraciones pigmentadas (rosadas o anaranjadas) y no pigmentadas (blancas o cremas), y fueron recolectadas de fincas comerciales de piña, en los cantones de Río Cuarto, Sarapiquí, Pital y San Carlos. Los códigos utilizados no hacen referencia a ninguna especie en especial. La levadura *Rhodotorula dairenensis* fue identificada molecularmente en investigaciones previas a este trabajo.

Para la valoración macroscópica de los aislamientos, se consideraron los siguientes criterios: el color, la forma (redonda, ovalada, cilíndrica y apiculada), la consistencia (mantecosa, cremosa, mucoide), la textura (lisa o rugosa), la presencia de brillo y el relieve (plano o convexo) de las colonias de las levaduras (Ramírez *et al.* 2019). La consistencia mucoide se refiere a las levaduras con colonias con mayor viscosidad, la consistencia mantecosa se refiere a las levaduras con colonias grasosas, y la cremosa se refiere a colonias en estado semilíquido denso. Para la caracterización microscópica, se evaluaron mediante observaciones al microscopio la forma de las células de las levaduras (redonda, ovalada, cilíndrica, apiculada).

Para la identificación molecular, se seleccionaron 9 aislamientos representativos del total; para esto se utilizó el criterio de seleccionar las levaduras que morfológicamente presentaron

aspectos más diferenciadoras o contrastantes entre sí, como el color, la consistencia, la textura y el relieve presentado por las colonias.

Las levaduras se caracterizaron molecularmente en el Laboratorio de Técnicas Moleculares de la Escuela de Agronomía y de Biotecnología del Centro de Investigaciones Agronómicas (CIA). Para esta caracterización, a las levaduras seleccionadas se les realizó la extracción de ADN mediante el método CTAB descrito por Rogers y Bendich (1988). Posteriormente, la identificación de las especies aisladas se realizó mediante la amplificación por PCR y secuenciación de la región ITS, con los imprimadores ITS-4 (5-TCCCTCCGCTTATTGATATGC-3) e ITS-5 (5-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3). El producto de PCR se envió a secuenciar, en ambas direcciones, a la compañía Macrogen en Corea del Sur. Una vez obtenidas las secuencias, se analizaron con el programa Bioedit y se realizó una búsqueda en Blastsearch, en la base de datos del Banco de Genes del National Center for Biotechnology Information (NCBI).

Para evaluar el crecimiento de las levaduras a diferentes temperaturas de almacenamiento, se realizaron rayados de los microorganismos, que se encontraban almacenados a 4°C, y se colocaron a crecer por 72 horas, en placas Petri con medio PDA, a una temperatura de 22°C. Luego de transcurrido el tiempo, se preparó una suspensión en la cámara de transferencia, donde se tomaron discos de 3 mm de levadura, se colocaron en 10 ml de agua estéril destilada y se agitaron por 10 minutos. A cada suspensión se le midió la densidad óptica (DO600) con un espectrofotómetro, y se realizó un conteo de células con un hemocitómetro o Cámara de Neubauer, para conocer la concentración de células de las levaduras.

A partir de esta suspensión madre, se realizaron diluciones hasta  $10^{-6}$ . De la suspensión de  $10^{-6}$ , se colocaron 100  $\mu$ l en placas Petri previamente preparadas con PDA, y se esparció con un asa de vidrio Drigalski. Las placas se almacenaron en una cámara de enfriamiento, a las temperaturas: 4°C, 8°C, 12°C, 16°C, 20°C, y

se evaluó el número de colonias durante 5 días. Para cada ensayo de temperatura, se utilizó un diseño completamente aleatorizado, con arreglo factorial de tratamientos, con 2 factores, las levaduras y los días de evaluación. Cada tratamiento contó con 10 repeticiones.

Para determinar el efecto de los tratamientos, en el ensayo de temperaturas sobre las variables de respuesta (número de colonias de levaduras), se realizó un análisis de varianza (ANOVA) con medidas repetidas en el tiempo bajo la teoría de los modelos lineales mixtos. Se comprobaron los supuestos del ANOVA con gráficos diagnósticos (cuantiles de los términos de error, gráficos de residuos y gráficos de residuos vs. predichos) y se seleccionó el mejor modelo en función de los criterios de Akaike (AIC) y de información Bayesiano (BIC). En las variables con diferencias estadísticas entre los tratamientos, se realizaron las comparaciones de medias por medio de la prueba de Prueba de Di Rienzo, Guzmán y Casanoves (DGC) ( $p \leq 0,05$ ) (Di Rienzo *et al.* 2002), lo que permitió la formación de grupos excluyentes y sin transición entre tratamientos. Los análisis de los ensayos se realizaron con el programa Infostat versión 2020 (Di Rienzo *et al.* 2020).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las levaduras presentaron 2 coloraciones predominantes, 17 pigmentadas (rosadas o anaranjadas), y 7 no pigmentadas (blancas o crema), por lo que estas 2 tonalidades son las más frecuentes en las zonas de donde proceden los aislamientos (Tabla 1 y Figura 1). En Colombia, se ha reportado que las colonias levaduriformes aisladas de la pulpa de la manzana de agua presentaron diferentes colores, entre estos blancas, salmón, coral, rosado, beige y marrón (Trujillo y Echeverry 2015). En otro estudio similar, las levaduras aisladas de la filosfera de la mora presentaron colonias de tonalidades blancas, cremas y rosadas (Uribe 2007). El predominio de la coloración de las levaduras está relacionado con las condiciones climáticas de la zona, en los

climas nublados o con lluvias constantes puede existir una prevalencia de las levaduras no pigmentadas, mientras que en los climas calientes

y con alta radiación solar dominan las levaduras pigmentadas (Uribe 2007).

Tabla 1. Características morfológicas de las colonias de las levaduras aisladas del moho del pedúnculo de la piña.

	Aislamiento	Color de colonia	Forma de colonia	Consistencia de colonia
1	DM-1B	Crema	Redonda y ovalada	Mantecosa
2	DM-2B	Crema	Redonda	Mantecosa
3	DM-3B	Crema	Redonda	Mantecosa
4	DM-4B	Crema	Redonda	Mantecosa
5	DM-5B	Crema	Redonda	Mantecosa
6	NOR-1B	Blanca	Redonda	Cremosa
7	TRO-1B	Blanca	Redonda	Cremosa
8	DM-1R	Rosada y anaranjada	Redonda	Mucoide
9	DM-2R	Anaranjada fuerte	Redonda	Mantecosa
10	DM-3R	Rosada	Redonda	Mucoide
11	DM-4R	Rosada y anaranjada	Redonda y ovalada	Mucoide
12	MC-1R	Rosada y anaranjada	Redonda	Mucoide
13	MC-2R	Rosada y anaranjada	Redonda	Mucoide
14	MC-3R	Rosada y anaranjada	Redonda	Mucoide
15	MC-4R	Rosada	Redonda y ovalada	Mucoide
16	MC-5R	Rosada	Redonda y ovalada	Mucoide
17	NOR-1R	Anaranjada fuerte	Redonda	Mucoide
18	NOR-2R	Anaranjada fuerte	Redonda irregular	Cremosa
19	TRO-1R	Rosada	Redonda	Mucoide
20	TRO-2R	Rosada	Redonda	Mucoide
21	TRO-3R	Rosada y anaranjada	Redonda	Mucoide
22	TRO-4R	Rosada y anaranjada	Redonda y ovalada	Mucoide
23	TRO-5R	Rosada	Redonda	Mucoide
24	<i>Rhodotorula dairenensis</i>	Rosada y anaranjada	Ovalada	Mucoide

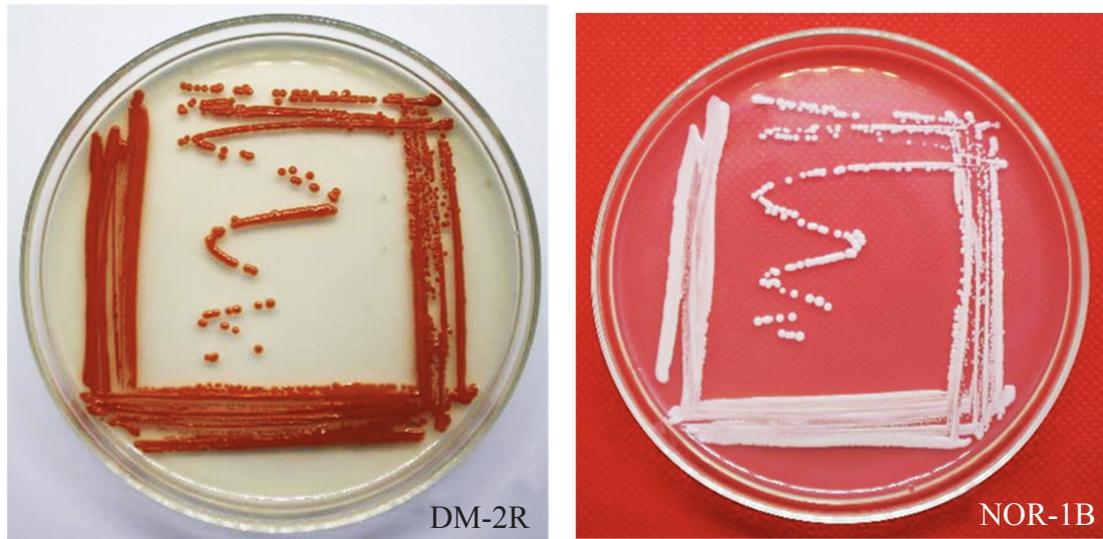


Figura 1. Coloración de las colonias de levaduras aisladas del pedúnculo de la piña. DM-2R: *Rhodotorula mucilaginosa*. NOR-1B: *Meyerozyma guilliermondii*.

Las formas de las colonias de ambos grupos fueron redondas y/o ovaladas. La consistencia de las colonias de las levaduras no pigmentadas fue mantecosa o cremosa, y las pigmentadas fueron mucoides. En la mayoría de los casos, solo la DM-2R fue mantecosa, y la NOR-2R cremosa (Tabla 1). El relieve de las levaduras, en la mayoría fue convexo y fue plano solo para las levaduras no pigmentadas NOR-1B, TRO-1B, y para las pigmentadas NOR-1R y NOR-2R. La textura de las colonias en su mayoría fue lisa, solo la NOR-2R presentó una textura rugosa. Las levaduras no pigmentadas no presentaron brillo, mientras que las pigmentadas si, a excepción de la NOR-2R.

La mayoría de las levaduras pigmentadas, de este trabajo, presentaron una consistencia mucoide, de relieve convexo y con presencia de brillo. La coloración pigmentada se relaciona con las levaduras productoras de carotenoides como *Rhodotorula mucilaginosa*, las cuales se caracterizan por presentar colonias mucoides en tonalidades de salmón y rosa (Guamán y Carvajal 2009). Existen otras especies de levaduras pigmentadas que han sido identificadas con características similares, dentro

de los géneros *Rhodospiridium* y *Sporobolomyces*, lo que evidencia que existe una variabilidad genética entre las especies que presentan estas variables cualitativas (Guamán y Carvajal 2009).

Las levaduras no pigmentadas presentaron colonias de formas redondas, con consistencia mantecosa o cremosa y la mayoría con relieve convexo. Esto coincide con el estudio de levaduras aisladas de plantas de maíz y geranios, en el cual se encontró que las colonias de color blanco presentaron superficie suave, márgenes regulares y consistencia cremosa, además del olor característico (Buck y Burpee 2002).

En las observaciones microscópicas, se encontraron las formas típicas de las células de las levaduras, las redondas, ovaladas y cilíndricas. Uribe (2007) reportó características similares de las levaduras aisladas de la filosfera de la mora. Esto sugiere, la similitud de las células de las levaduras a nivel microscópico, en otra zona geográfica, como este caso de Colombia.

Es evidente que, para este tipo de microorganismos, la caracterización morfológica no

genera la información suficiente para poder identificar las levaduras a nivel de género o especie, por las similitudes fenotípicas que presentan. Por tanto, la identificación molecular es una herramienta valiosa para demostrar la variabilidad genética presente en los aislamientos.

Las levaduras no pigmentadas, se identificaron molecularmente en 3 especies de la división Ascomycota: *Candida intermedia*, *Meyerozyma guilliermondii*, y *M. caribbica* (Tabla 2). En Costa Rica, en un trabajo previo en frutos de piña,

provenientes de las zonas de Puntarenas y Sarapiquí, se reportó la levadura *C. fukuyamaensis* (Castro y Umaña 2019). El género *Candida* ha sido estudiado por su potencial como controlador biológico en diferentes enfermedades poscosecha, por ejemplo, en el cultivo de la manzana de agua (Trujillo y Echeverry 2015). Además, la levadura *C. guilliermondii* aislada de frutos de uchuva, ha sido utilizada como una alternativa para retardar la pudrición en el fruto del banano (Buitrago y Escobar 2009).

Tabla 2. Identificación molecular de las levaduras aisladas del moho del pedúnculo de la piña.

Aislamiento	Especie	Primers	16 S (F63/LR3)
1 DM-3B	<i>Candida intermedia</i>	ITS1-ITS4 EXT	<i>Candida intermedia</i>
2 NOR-1B	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	ITS4-ITS5	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>
3 TRO-1B	<i>Meyerozyma caribbica</i>	ITS4-ITS5	<i>Meyerozyma caribbica</i>
4 DM-2R	<i>Rhodotorula pacifica</i> <i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	ITS1-ITS4 EXT	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>
5 MC-1R	<i>Rhodotorula toruloides</i>	ITS4-ITS5	<i>Rhodotorula toruloides</i>
6 MC-2R	<i>Rhodotorula diobovata</i>	ITS4-ITS5	<i>Rhodotorula diobovata</i>
7 NOR-1R	<i>Sporobolomyces</i> sp. <i>Sporobolomyces carnicolor</i>	ITS4-ITS5	<i>Sporidiobolus pararoseus</i>
8 NOR-2R	<i>Sporobolomyces</i> sp. <i>Sporobolomyces carnicolor</i>	ITS4-ITS5	<i>Sporobolomyces carnicolor</i>
9 TRO-4R	<i>Rhodotorula toruloides</i>	ITS4-ITS5	<i>Rhodotorula toruloides</i>

También, se ha estudiado la actividad antagónica de las levaduras *C. inconspicua* y *Pichia kluyveri*, para el control de *Alternaria alternata* en pitahaya amarilla, y la levadura *C. inconspicua* mostró mejor efectividad que *P. kluyveri*. Además, se utilizaron contra *Colletotrichum musae* en banano orgánico.

*P. kluyveri* demostró una mejor eficacia en reducir la antracnosis que *C. inconspicua* (Vilaplana *et al.* 2020).

Las especies *M. guilliermondii* y *M. caribbica* son ascomicetes muy relacionadas entre sí, que han sido estudiadas por sus atributos

biotecnológicos asociados (Romi *et al.* 2014), así como ser microorganismos con potencial para el control biológico (Bautista *et al.* 2013). La especie *M. caribbica* ha sido exitosa para el control de antracnosis en mango, papaya y aguacate, por medio de la técnica de microencapsulados de microorganismos (Aguirre *et al.* 2022, González *et al.* 2021).

Asimismo, el uso de la aplicación de mezclas de microorganismos ha generado resultados positivos en el control de enfermedades por la sinergia que se deriva, por medio de la combinación de mecanismos presentes como la actividad

antifúngica a través de compuestos orgánicos volátiles, la formación de biopelículas, la inducción de resistencia, competencia por espacio, entre otros (Öztekin y Karbancioglu 2023, Spadaro y Droby 2016).

Las levaduras pigmentadas, se identificaron molecularmente en 5 especies de la división Basidiomycota: *R. mucilaginosa*, *R. toruloides*, *R. diodovata*, *S. carnicolor* y *S. pararoseus* (Tabla 2). Estas levaduras se caracterizan por producir pigmentos carotenoides de colores rosados, que le confieren protección contra los efectos perjudiciales de la radiación UV (Guamán y Carvajal 2009, Moliné *et al.* 2010, Wirth y Goldani 2012). Los pigmentos son producidos, principalmente, durante la fase estacionaria de la curva de crecimiento, momento en que se sintetizan sustancias como metabolitos secundarios volátiles, compuestos aromáticos y quinonas, que pueden tener un efecto antibiótico (Dastager *et al.* 2006).

*Rhodotorula* ha sido reportada como una levadura biocontroladora de *P. digitatum* en frutos de naranjas (Ahima *et al.* 2019), como antagonista de *B. cinerea* (González *et al.* 2019), de igual forma, ha sido utilizada para controlar el moho gris en fresas, causado por *Rhizopus* (Zhang *et al.* 2014).

El género *Sporobolomyces* se caracteriza por ser polifilético, y los miembros presentan la capacidad de crecer en condiciones aeróbicas y microaerofílicas, además de ser tolerantes a la congelación y descongelación, y menos tolerantes a las temperaturas elevadas y a la desecación (Cobban *et al.* 2016). La especie *S. pararoseus*, se ha estudiado por su capacidad en la producción de carotenoides, durante la fermentación, en la cual, se mostró que la concentración máxima de carotenoides totales se alcanzó después de 102 horas (Serrão *et al.* 2011). Esta especie, se evaluó por su eficacia en el control del moho azul poscosecha en manzanas, causada por *P. expansum*, y se encontró que la incidencia de la enfermedad fue menor en las frutas tratadas con la levadura, en comparación con el tratamiento control. Además, en pruebas in vitro, la germinación de

las esporas y la longitud del tubo germinal de *P. expansum* fueron inhibidas por esta levadura (Zhao *et al.* 2018).

En la caracterización de levaduras carotenogénicas de varias zonas de Ecuador, se identificó molecularmente a las especies *R. toruloides*, *R. diobovata* y *S. carnicolor* (Guamán y Carvajal 2009). En frutos de manzana de agua, se identificaron 20 levaduras que correspondieron a 6 géneros: *Rhodotorula* spp.; *Hanseniaspora* spp.; *Brettanomyces* spp.; *Candida* spp.; *Kloeckera* spp.; *Torulopsis* spp (Trujillo y Echeverry 2015). Ante estos reportes, se denota que existe una diversidad de especies que coinciden con las de esta investigación, lo que sugiere que existe una gran variedad de levaduras desarrollándose tanto en la superficie de las plantas, de las frutas, y están presentes en diferentes especies de plantas.

En el ensayo de temperaturas, para la temperatura de 20°C, el análisis de varianza presentó diferencias significativas, para el número de colonias, entre la interacción de las levaduras y el día de evaluación ( $p < 0,0001$ ). Las levaduras a 20°C crecieron a los 2 días del establecimiento del ensayo (Figuras 2 y 3). Resultados similares encontró Uribe (2007), en la cual se midió el crecimiento de las levaduras a varias temperaturas (5°C, 10°C, 25°C, 30°C, 35°C, 37°C, 40°C, 42°C y 45°C), y se determinó que el mejor rango de crecimiento fue entre 25°C a 37°C, para la mayoría de las levaduras (Uribe 2007). Además, se presentó una relación directamente proporcional entre el crecimiento y la temperatura, hasta los 35°C, luego se observó una disminución del crecimiento en la mayoría de las levaduras (Uribe 2007).

Guamán y Carvajal (2009) reportó que para diferentes especies de levaduras, la temperatura que resultó más favorable para su crecimiento fue 20°C, con respecto a 30°C y 37°C. En la pulpa de la manzana de agua, se determinó que los aislamientos presentaron un mejor desarrollo a la temperatura ambiente entre 24°C a 27°C (Trujillo y Echeverry 2015).

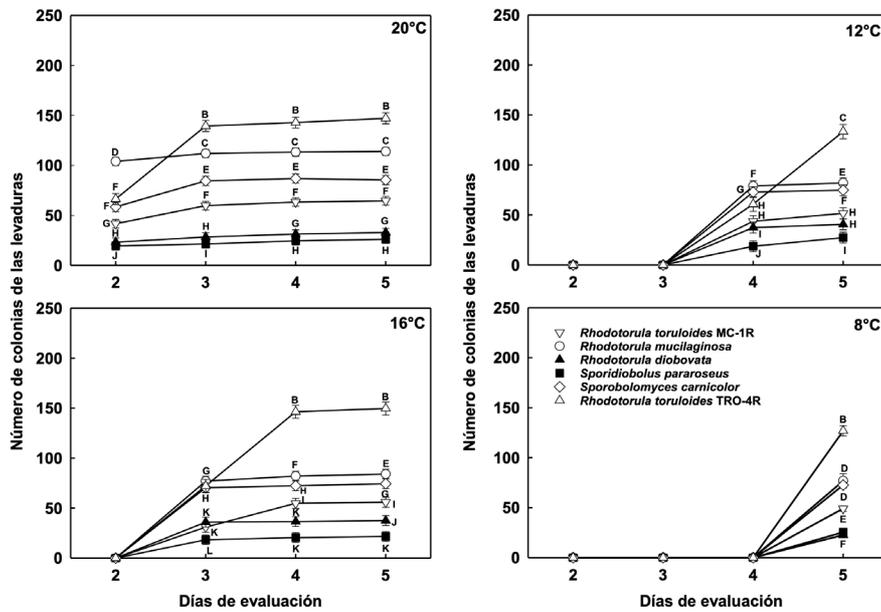


Figura 2. Número de las colonias de las levaduras pigmentadas almacenadas en cámara de refrigeración a 20°C, 16°C, 12°C y 8°C, durante 5 días. Las barras corresponden al error estándar. Medias con una letra común no son significativamente diferentes, de acuerdo con la prueba DGC ( $p > 0,05$ ).

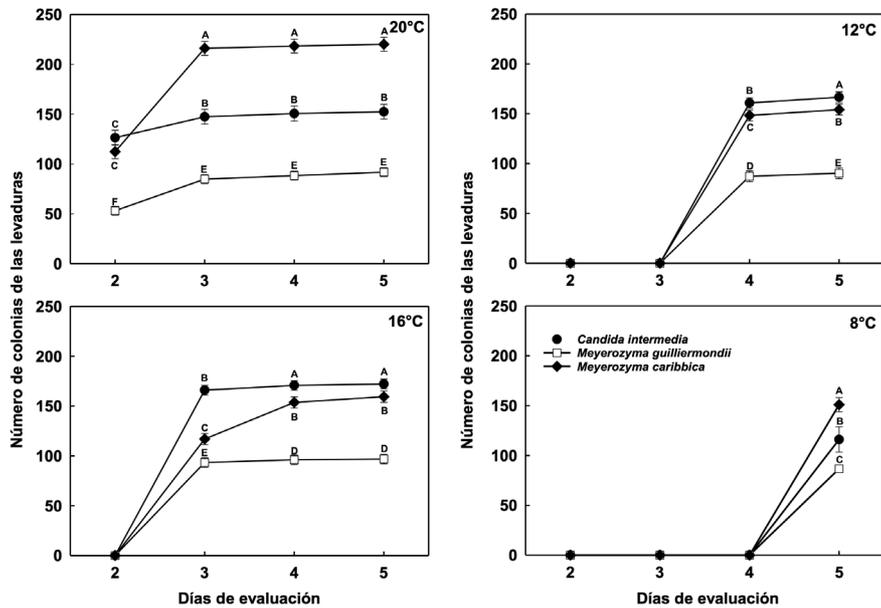


Figura 3. Número de las colonias de las levaduras no pigmentadas almacenadas en cámara de refrigeración a 20°C, 16°C, 12°C y 8°C, durante 5 días. Las barras corresponden al error estándar. Medias con una letra común no son significativamente diferentes, de acuerdo con la prueba DGC ( $p > 0,05$ ).

Para los 20°C, las levaduras que presentaron mayor número de colonias fueron las no pigmentadas *M. caribbica*, *C. intermedia* y la pigmentada *R. toruloides* (TRO-4R), estas 2 últimas sin presentar diferencias significativas entre sí, a los 5 días de evaluación (Figuras 2 y 3). Las levaduras pigmentadas *S. pararoseus*, *R. diobovata* y *R. toruloides* (MC-1R) presentaron el menor número de colonias, respectivamente, estas 2 últimas sin presentar diferencias significativas entre sí, a los 5 días de evaluación (Figura 2).

Para la temperatura de 16°C, el análisis de varianza presentó diferencias significativas para el número de colonias, entre la interacción de las levaduras y el día de evaluación ( $p < 0,0001$ ). Las levaduras almacenadas a 16°C empezaron a crecer a los 3 días del establecimiento del ensayo (Figuras 2 y 3).

Las levaduras que presentaron mayor número de colonias fueron no pigmentadas *C. intermedia*, *M. caribbica* y pigmentada *R. toruloides* (TRO-4R), estas 2 últimas sin presentar diferencias significativas entre sí, a los 5 días de evaluación. Las de menor número de colonias fueron las pigmentadas *S. pararoseus*, *R. diobovata* y *R. toruloides* (MC-1R), respectivamente, todas presentaron diferencias significativas, en la evaluación del día 5 ( $p < 0,0001$ ) (Figura 2).

Para la temperatura de 12°C, el análisis de varianza presentó diferencias significativas, para el número de colonias, entre la interacción de las levaduras y los 4 y 5 días de evaluación ( $p < 0,0001$ ). Las levaduras almacenadas a 12°C empezaron a crecer a los 4 días del establecimiento del ensayo (Figuras 2 y 3).

Las levaduras que presentaron mayor número de colonias fueron *C. intermedia*, *M. caribbica* y *R. toruloides* (TRO-4R), respectivamente, todas presentaron diferencias significativas ( $p < 0,0001$ ) entre sí, a los 5 días de evaluación. Las levaduras que presentaron menor número de colonias fueron *S. pararoseus*, *R. diobovata* y *R. toruloides* (MC-1R), respectivamente, todas presentaron diferencias significativas entre sí, al día 5 de evaluación (Figura 2).

Para la temperatura de 8°C, el análisis de varianza presentó diferencias significativas para el número de colonias, entre las levaduras solamente, ya que, las levaduras empezaron a crecer a los 5 días del establecimiento del ensayo (Figuras 2 y 3). Los resultados mostraron que las levaduras almacenadas a 8°C fueron capaces de desarrollar colonias, a partir del día 4 de iniciado el experimento.

A 8°C, las levaduras con mayor cantidad de colonias fueron la *M. caribbica*, *R. toruloides* (TRO-4R) y *C. intermedia*, estas 2 últimas no presentaron diferencias significativas entre sí, en el día 5 de evaluación. Las levaduras que presentaron el menor número de colonias fueron *R. diobovata*, *S. pararoseus* y *R. toruloides* (MC-1R), respectivamente, respectivamente, estas 2 últimas no presentaron diferencias significativas entre sí, al día 5 de evaluación.

Los microorganismos son capaces de resistir los periodos de almacenamiento en frío a los que se somete a las piñas, en su etapa poscosecha. A temperaturas bajas, los microorganismos reducen su metabolismo, y esto retrasa los procesos de infección (Rivera 2018), no obstante, luego al ser sometidos a temperaturas más cálidas los microorganismos activan su crecimiento, y pueden generar lesiones visibles en los frutos.

Las levaduras almacenadas a 4°C no presentaron crecimiento durante los 5 días de almacenamiento. Durante el almacenamiento, se observó que, por cada 4°C de disminución en la temperatura desde los 20°C hasta los 4°C, las colonias de levaduras se mostraron visibles un día más tarde. Las bajas temperaturas afectan el crecimiento de los microorganismos, y este tiende a disminuir y ser más lento, ya que las células pueden experimentar periodos de latencia, y presentar afectaciones en el metabolismo microbiano, ya que la actividad de las enzimas involucradas en el metabolismo celular se encuentra entre 10°C y 50°C (Redón *et al.* 2011).

En el caso de la piña, durante el transporte y la distribución la fruta fue expuesta a temperaturas entre 7°C y 18°C, incluso en algunos casos puede ser sometida a temperaturas ambientales

mayores. Estas condiciones que soporta la piña afectan también a los microorganismos presentes en la fruta, ya que el crecimiento de las levaduras a partir de temperaturas relativamente bajas, resulta negativo desde la perspectiva de la calidad de la piña, ya que si favorece el desarrollo de especies pigmentadas, aunque estas han sido catalogadas como controladores biológicos, afectan la apariencia del pedúnculo de la fruta, debido a las intensas coloraciones. Por otra parte, este efecto podría resultar positivo, en el caso de considerar para estudios a las especies no pigmentadas como *C. intermedia*, *M. caribbica* y *M. guilliermondii*, identificadas molecularmente en este trabajo, a las cuales se les atribuye un gran potencial como biocontroladores para el control de patógenos en enfermedades poscosecha.

## AGRADECIMIENTOS

Al personal del Laboratorio de Tecnología Poscosecha del CIA, por la colaboración durante la ejecución de esta investigación. Además, al Laboratorio de Técnicas Moleculares de la Escuela de Agronomía y de Biotecnología del (CIA), por sus aportes en la descripción molecular de las levaduras.

## LITERATURA CITADA

- Aguirre, L; Calderón, M; Lagarón, J; Prieto, C; Ragazzo, J. 2022. Formulation of the biological control yeast *Meyerozyma caribbica* by electro spraying process: effect on postharvest control of anthracnose in mango (*Mangifera indica* L.) and papaya (*Carica papaya* L.). *Journal of the science of food and agriculture* 102(2):696-706.
- Ahima, J; Zhang, X; Yang, Q; Zhao, L; Tibiru, A; Zhang, H. 2019. Biocontrol activity of *Rhodotorula mucilaginosa* combined with salicylic acid against *Penicillium digitatum* infection in oranges. *Biological Control* 135:23-32.
- Aloui, H; Licciardello, F; Khwaldia, K; Hamdi, M; Restuccia, C. 2015. Physical properties and antifungal activity of bioactive films containing *Wickerhamomyces anomalus* killer yeast and their application for preservation of oranges and control of postharvest green mold caused by *Penicillium digitatum*. *International Journal of Food Microbiology* 200:22-30.
- Barquero, A. 2010. Estudio comparativo de la eficacia de cinco desinfectantes y optimización del mejor de ellos para la etapa de desinfección de piña fresca en la empresa Banacol. *Práctica Dirigida Escuela de Tecnología de Alimentos para optar por el grado de licenciatura en Tecnología de Alimentos*, Costa Rica, Universidad de Costa Rica. 57 p.
- Bautista, P; Calderón, M; Servín, R; Ochoa, N; Ragazzo, J. 2013. Action mechanisms of the yeast *Meyerozyma caribbica* for the control of the phytopathogen *Colletotrichum gloeosporioides* in mangoes. *Biological Control* 65(3):293-301.
- Buck, J; Burpee, L. 2002. The Effects of Fungicides on the Phylloplane Yeast Populations of Creeping Bentgrass. *Canadian Journal of Microbiology* 48(6):522-529.
- Buitrago, J; Escobar, M. 2009. Aplicación de levadura *Candida* spp. como una alternativa viable para la retardación en la pudrición del banano (*Musa acuminata*). Trabajo de grado Microbiología Industrial. Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias, Bogotá, Colombia. 81 p.
- CANAPEP (Cámara Nacional de Productores y Exportadores de Piña). 2019. Estadísticas (en línea). Consultado 4 mar. 2020. Disponible en <https://canapep.com/estadisticas/>
- Castro, J; Umaña, G. 2015. Poblaciones e identificación de los hongos causantes de mohos poscosecha en el pedúnculo de la piña, en dos zonas de Costa Rica. *Agronomía Costarricense* 39(3):61-77.
- Castro, J; Umaña, G. 2017. Frecuencia de los hongos asociados al desarrollo de mohos poscosecha en el pedúnculo de la piña en dos zonas de Costa Rica. *Agronomía Costarricense* 41(2):17-25.
- Castro, J; Umaña, G. 2019. Yeasts and bacteria associated with pineapple fruit during postharvest handling. *Acta Horticulturae* 1239:77-84.
- Chanprasartsuk, O; Prakitchaiwattana, C; Sanguandeeikul, R; Fleet, G. 2010. Autochthonous yeasts associated with mature pineapple fruits, freshly crushed juice and their ferments; and the chemical changes during natural fermentation. *Bioresource technology* 101:7500-9.
- Cheng, L; Zhou, L; Li, D; Gao, Z; Teng, J; Nie, X; Guo, F; Wang, C; Wang, X; Li, S; Li, X. 2023. Combining the biocontrol agent *Meyerozyma guilliermondii* with UV-C treatment to manage postharvest gray mold on kiwifruit. *Biological Control* 180:105-198.
- Cobban, A; Edgcomb, V; Burgaud, G; Repeta, D; Leadbetter, E. 2016. Revisiting the pink-red pigmented basidiomycete mirror yeast of the phyllosphere. *Microbiologyopen* 5(5):846-855.
- Dastager, S; Li, W; Dayanand, A; Tang, S; Tian, X; Zhi, X; Hua, L; Jiang, C. 2006. Separation, identification and analysis of pigment (melanin) production in

- Streptomyces. African Journal of Biotechnology 5(8):1131-1134.
- Di Rienzo, J; Casanoves, F; Balzarini, M; González, L; Tablada, M; Robledo, C. 2020. InfoStat versión 2020 (en línea). Universidad Nacional de Córdoba. Consultado 30 mar. 2020. Disponible en <http://www.InfoStat.com.ar>
- Di Rienzo, J; Guzmán, A; Casanoves, F. 2002. A multiple-comparisons method based on the distribution of the root node distance of a binary tree. Journal of Agricultural Biological and Environmental Statistics 7:129-142.
- González, A; Gentina, J; Kong, S; Alvarado, R; Stevenson, J; Briceño, E; Montenegro, O. 2019. Survival of Spray-Dried *Rhodotorula mucilaginosa* Isolated from Natural Microbiota of Murta Berries and Antagonistic Effect on *Botrytis cinerea*. Food Technology & Biotechnology 57(2):222-229.
- González, K; Ragazzo, J; Calderón, M. 2021. Application of stressed and microencapsulated *Meyerozyma caribbica* for the control of *Colletotrichum gloeosporioides* in avocado (*Persea americana* Mill. cv. Hass). Journal of Plant Diseases & Protection 128(5):1243-1251.
- Guamán, C; Carvajal, J. 2009. Caracterización e identificación de aislados de levaduras carotenogénicas de varias zonas naturales del Ecuador. Universitas Scientiarum 14(2-3):187-197.
- Korres, A; Ventura, J; Fernandes, P. 2010. First Report of Bacterium and Yeasts Associated with Pineapple Fruit Collapse in Espírito Santo State, Brazil. Plant Disease 94(12):1509.
- Lassois, L; de Lapeyre, L; Jijakli, M. 2008. Biological control of crown rot of banana with *Pichia anomala* strain K and *Candida oleophila* strain O. Biological Control 45(3):410-418.
- Li, R; Zhang, H; Lui, W; Zheng, X. 2011. Biocontrol of postharvest gray and blue mold decay of apples with *Rhodotorula mucilaginosa* and possible mechanisms of action. International Journal of Food Microbiology 146(2):151-156.
- Moliné, M; Flores, M; Libkind, D; Diéguez, M; Fariás, M; van Broock, M. 2010. Photoprotection by carotenoid pigments in the yeast *Rhodotorula mucilaginosa*: the role of torularhodin. Photochemical y Photobiological Sciences 9(8):1145-1151.
- Öztekın, S; Karbancıođlu, F. 2023. Biological control of green mould on mandarin fruit through the combined use of antagonistic yeasts. Biological Control 180:105-186.
- Pan, H; Zhong, C; Wang, Z; Deng, L; Li, W; Zhao, J; Long, C; Li, L. 2022. Biocontrol Ability and Action Mechanism of *Meyerozyma guilliermondii* 37 on Soft Rot Control of Postharvest Kiwifruit. Microorganisms 10(11):2143. DOI: <https://doi.org/10.3390/microorganisms10112143>
- Platania, C; Restuccia, C; Muccilli, S; Cirvilleri, G. 2012. Efficacy of killer yeasts in the biological control of *Penicillium digitatum* on Tarocco orange fruits (*Citrus sinensis*). Food Microbiology 30(1):219-225.
- Qiu, J; Zhao, L; Jiang, S; Abiso, E; Zhang, X; Zhang, H. 2022. Efficacy of *Meyerozyma caribbica* in the biocontrol of blue mold in kiwifruit and mechanisms involved. Biological Control 173:105000. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2022.105000>
- Ramírez, M; Usman, L; Silva, L; Osorio, E. 2019. Dominant yeasts associated to mango (*Mangifera indica*) and rose apple (*Syzygium malaccense*) fruit pulps investigated by culture-based methods. Anais da Academia Brasileira de Ciências 91:e20190052.
- Redón, M; Guillamón, J; Mas, A; Rozes, N. 2011. Effect of growth temperature on yeast lipid composition and alcoholic fermentation at low temperature. Food Research and Technology 232(3):517-527.
- Rivera, G. 2018. Conceptos introductorios a la Fitopatología. 2 ed. Costa Rica, EUNED. 400 p.
- Rogers, S; Bendich, A. 1988. Extraction of DNA from plant tissues (en línea). In Gelvin, S; Schilperoord, R (eds.). Dordrecht, Springer Netherlands. p. 89-99.
- Romi, W; Keisam, S; Ahmed, G; Kumaswamy, J. 2014. Reliable differentiation of *Meyerozyma guilliermondii* from *Meyerozyma caribbica* by internal transcribed spacer restriction fingerprinting. BMC Microbiology 14(1):52.
- SEPSA (Secretaría Ejecutiva de Planificación Sectorial Agropecuaria). 2023. Desempeño del Sector Agropecuario 2022. Costa Rica. 11 p.
- Serrão, M; Cabral Cence, K; Zeni, J; Tsai, S; Durrer, A; Liva, L; Toniazzo, G; Valduga, E; Treichel, H. 2011. Carotenoids production from a newly isolated *Sporidiobolus pararoseus* strain by submerged fermentation. European Food Research and Technology. 233(1):159-166.
- Spadaro, D; Droby, S. 2016. Development of biocontrol products for postharvest diseases of fruit: The importance of elucidating the mechanisms of action of yeast antagonists. Trends in Food Science & Technology 47:39-49.
- Starmer, W; Lachance, M. 2011. Chapter 6 - Yeast Ecology (en línea). In Kurtzman, C; Fell, J; Boekhout, T (eds.). London, Elsevier. p. 65-83.
- Sui, Y; Wisniewski, M; Droby, S; Liu, J. 2015. Responses of Yeast Biocontrol Agents to Environmental Stress. Applied and Environmental Microbiology 81(9):2968-2975.
- Torres, R; Teixidó, N; Viñas, I; Mari, M; Casalini, L; Giraud, M; Usall, J. 2006. Efficacy of *Candida sake* CPA-1 formulation for controlling *Penicillium expansum* decay on pome fruit from different Mediterranean regions. Journal of Food Protection 69(11):2703-2711.

- Trujillo, L; Echeverry, S. 2015. Aislamiento y caracterización de levaduras presentes en el fruto del *Syzygium malaccense* (L) Merr. y L.M Perry (pomoroso) en la comuna 1 de la ciudad de Neiva- Huila. Revista Ingeniería y Región 13(1):37-45.
- Uribe, L. 2007. Caracterización fisiológica de las levaduras aisladas de la filosfera de mora. Microbiología Industrial. Bogotá, Colombia, Pontificia Universidad Javeriana. 154 p.
- Vilaplana, R; Cifuentes, C; Vaca, L; Cevallos, J; Valencia, S. 2020. Curative activity of possible biocontrol agents in the postharvest of yellow pitahaya and organic banana. Postharvest Biology and Technology 159(1):111030.
- Wirth, F; Goldani, L. 2012. Epidemiology of *Rhodotorula*: an emerging pathogen. Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases 465717. 7 p. DOI: 10.1155/2012/465717
- Zhang, H; Ge, L; Chen, K; Zhao, L; Zhang, X. 2014. Enhanced biocontrol activity of *Rhodotorula mucilaginosa* cultured in media containing chitosan against postharvest diseases in strawberries: possible mechanisms underlying the effect. Journal of agricultural and food chemistry 62(18):4214-4224.
- Zhao, L; Yiwen, S; Dongbiao, Y; Jun, L; Xiangyu, G; Xiaoyun, Z; Hongyin, Z. 2018. Effects of *Sporidiobolus pararoseus* Y16 on Postharvest Blue Mold Decay and the Defense Response of Apples. Journal of Food Quality 9 p.

