

**UNIVERSIDAD DE COSTA RICA  
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**HONGOS CAUSANTES DE MOHOS EN FRUTOS DE PIÑA POSCOSECHA, SU  
INCIDENCIA Y RELACIÓN CON LAS CONDICIONES CLIMÁTICAS EN DOS  
ZONAS DE COSTA RICA**

**Tesis sometida a la consideración de la Comisión del Programa de Estudios  
de Posgrado en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales para optar al grado  
y título de Maestría Académica en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales  
con énfasis en Protección de Cultivos**

**JOHANNY CASTRO CHINCHILLA**

**Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, Costa Rica**

**2015**

## DEDICATORIA

**“A DIOS, A MI MADRE Y A TODA MI FAMILIA”**

## **AGRADECIMIENTO**

A Dios y la Virgen de Los Angeles por permitirme concluir con éxito una etapa muy importante de mi vida.

A mi madre por su apoyo y esfuerzo durante toda mi carrera.

Un agradecimiento especial a la Dra. Gerardina Umaña y el Msc. Marco Vinicio Sáenz, por su excelente dirección y múltiples consejos durante todo el desarrollo de mi maestría.

Al Dr. Luis Gómez y la Msc. Lilliana Cháves, por toda su colaboración y consejos para la ejecución de este proyecto.

A todo el personal del Laboratorio de Tecnología Poscosecha que colaboró con la ejecución del proyecto y en especial a Joheny Solano, Anthony Molina, Mario Quesada y Cristofer Ruiz.

A la compañía Banacol y en especial a los Sres. Francisco López y Eduardo Naranjo, por la colaboración brindada durante el planteamiento y la ejecución del trabajo.

A mi novia Dayana, por su paciencia y apoyo durante esta etapa de mi vida.

**A TODOS, MUCHAS GRACIAS**

"Esta tesis fue aceptada por la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales de la Universidad de Costa Rica, como requisito parcial para optar al grado y título de Maestría Académica en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales con énfasis en Protección de Cultivos"



Msc. Marco Vinicio Sáenz Murillo  
**Representante de la Decana  
Sistema de Estudios de Posgrado**



Dra. Gerardina Umaña Rojas  
**Directora de Tesis**




Dr. Luis Gómez Alpizar  
**Asesor**



Msc. Lilliana Chaves Fallas  
**Asesora**



**Dr. Eric Guevara Berger**  
Director Programa de Posgrado en Ciencias Agrícolas  
y Recursos Naturales



Johanny Castro Chinchilla  
**Candidato**

## TABLA DE CONTENIDO

PORTADA .....	i
DEDICATORIA .....	ii
AGRADECIMIENTO .....	iii
HOJA DE APROBACIÓN .....	iv
TABLA DE CONTENIDO .....	v
RESUMEN .....	vii
SUMMARY .....	vii
LISTA DE CUADROS .....	viii
LISTA DE FIGURAS .....	x
INTRODUCCIÓN .....	1
OBJETIVO GENERAL .....	4
OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	4
REVISIÓN DE LITERATURA .....	5
1. Generalidades sobre la piña .....	5
2. Cosecha y procesamiento de la fruta .....	7
3. Desarrollo de enfermedades poscosecha .....	9
4. Organismos patógenos poscosecha .....	10
5. Tratamientos poscosecha para evitar el deterioro de la fruta .....	13
6. Fuentes de inóculo e influencia del clima en el desarrollo de microorganismos .....	17
MATERIALES Y MÉTODOS .....	21
1. Lavado y encerado .....	21
2. Recibo de fruta y empaque .....	23
3. Enfriamiento y almacenamiento .....	25
4. Identificación morfológica y molecular de los microorganismos .....	25
5. Pruebas de crecimiento <i>in vitro</i> .....	28
6. Relación de las poblaciones de hongos y el porcentaje de moho con diferentes variables climáticas .....	29
7. Análisis estadístico .....	30
RESULTADOS .....	32
1. Poblaciones de hongos, bacterias y levaduras en diferentes etapas del proceso poscosecha de la piña .....	32
1.1 Hongos .....	32

1.1.1 Aguas de lavado-desinfección y cera.....	32
1.1.2 Aire de las cámaras de enfriamiento .....	33
1.1.3 Pedúnculo y cáscara de fruta procesada y sin procesar .....	34
1.1.3.1 Pedúnculo.....	34
1.1.3.2 Cáscara .....	37
1.2 Levaduras y bacterias .....	39
1.2.1 Aguas de lavado-desinfección y cera.....	39
1.2.2 Aire de las cámaras de enfriamiento .....	40
1.2.3 Pedúnculo y cáscara de fruta procesada y sin procesar .....	41
1.2.3.1 Pedúnculo.....	41
1.2.3.2 Cáscara .....	44
2. Incidencia y severidad de moho en pedúnculo de fruta procesada y sin procesar .	46
2.1 Incidencia .....	46
2.2 Severidad .....	47
3. Comparación estadística de las poblaciones de microorganismos y el porcentaje de moho en el pedúnculo .....	50
4. Identificación morfológica y molecular de los microorganismos .....	53
5. Análisis de frecuencia de recuperación.....	59
5.1 Frecuencia por grupos de organismos.....	59
5.2 Frecuencia por fase de procesamiento.....	60
6. Pruebas de crecimiento <i>in vitro</i> .....	64
7. Variables climáticas y su relación con las poblaciones de hongos y el porcentaje de moho en el pedúnculo .....	67
DISCUSIÓN.....	72
1. Poblaciones de hongos, levaduras y bacterias .....	72
2. Análisis de frecuencia y pruebas de crecimiento .....	80
3. Influencia de las variables climáticas .....	84
4. Consideraciones finales .....	87
CONCLUSIONES.....	89
RECOMENDACIONES.....	92
LITERATURA CITADA .....	94
ANEXOS .....	108

## RESUMEN

La presencia de moho en el pedúnculo de la piña es un problema poscosecha importante en Costa Rica, que causa el rechazo de la fruta en el mercado destino. El objetivo del presente estudio fue cuantificar e identificar los principales hongos causantes de moho en el pedúnculo de la piña y evaluar su relación con las condiciones climáticas y con las diferentes fuentes de inóculo en la planta empacadora. Se realizó un muestreo mensual desde abril de 2012 a marzo de 2013 en dos fincas ubicadas en Sarapiquí y Puntarenas, Costa Rica, para lo cual se tomó fruta en el área de recibo (SP) y en empaque (P), agua de las pilas de desinfección, cera y aire de las cámaras de enfriamiento. Las muestras fueron trasladadas al Laboratorio de Tecnología Poscosecha de la Universidad de Costa Rica, donde se cultivó y cuantificó *in vitro*, el número de unidades formadoras de colonias (UFC) en cada una de las fases de procesamiento y en la fruta. Las frutas se almacenaron en cámaras de enfriamiento, durante 19 días a 7 °C y tres días a 18 °C y posteriormente se evaluó la incidencia y severidad de moho en el pedúnculo. Se identificó los principales géneros de hongos en cada una de las fases poscosecha y en la fruta y las especies más frecuentes fueron caracterizadas molecularmente y se estudió su velocidad de crecimiento *in vitro*. Además, se analizó mediante regresiones lineales, la relación entre las condiciones climáticas antes de la cosecha de la fruta y las poblaciones de hongos y el moho en el pedúnculo.

Se obtuvo variaciones en las poblaciones de microorganismos durante el año de estudio en ambas zonas, con valores más altos en la cera que en el agua de desinfección. En el pedúnculo y la cáscara de fruta SP se obtuvo UFC de hongos más altas que en fruta P, lo cual coincidió con mayores porcentajes de moho en el pedúnculo. En el aire de enfriamiento, también se recuperó esporas de hongos, que podrían ser una fuente de inóculo para el desarrollo de moho. Se concluyó que las especies *Penicillium purpureogenum*, *P. diversum* y un grupo de hongos de micelio blanco, fueron los principales microorganismos presentes en las diferentes fases de procesamiento y en la fruta de ambas zonas. No se encontró una relación directa entre el clima y las poblaciones de hongos y el crecimiento de moho en el pedúnculo y de todas las variables, solamente se obtuvo una relación entre la velocidad del viento, temperatura y la precipitación de dos y tres semanas antes de la cosecha con las poblaciones de hongos en la cáscara y el desarrollo de moho en el pedúnculo de fruta SP. El procesamiento poscosecha disminuyó el moho en el pedúnculo, sin embargo, no evitó del todo su expresión al finalizar el almacenamiento. Además, diferentes puntos del proceso como el encerado y el enfriamiento, donde en el aire se pueden encontrar y ser distribuidas esporas de diferentes especies de hongos, podrían favorecer el posterior desarrollo de moho, por lo que se considera importante la adecuada limpieza de la planta empacadora, las cámaras de enfriamiento y cada una de las superficies con las que entra en contacto la fruta, además de la búsqueda de mecanismos para que la cera no acumule esporas de hongos.

## SUMMARY

Pineapple peduncle mold is an important postharvest problem in Costa Rica and it causes fruit rejection. The present study was developed in order to identify and quantify the most important fungi contributing to pineapple peduncle molds and its relation to climate and to different inoculum sources during packaging process. Monthly samplings were performed from April 2012 to march 2013 in two farms located in Sarapiquí and Puntarenas, Costa Rica. Samples of recently harvested fruit were taken before (NP) and after processing (P), as well as samples from processing water, wax, and air samples from cooling rooms.

Samples and fruits were transported to Universidad de Costa Rica's Postharvest Technology Laboratory, where colony forming units present in each sample or fruit were determined. Fruits were stored in cooling rooms, during 19 days at 7 °C and three days at 18 °C and then evaluated for incidence and severity of peduncle molds. The main genus of fungi isolated were identified and the most frequent species were characterized at molecular level and an *in vitro* growth velocity test was carried out for each isolate. The relation among climate variables and fungi populations in the fruit and the peduncle was analyzed using linear regressions.

Changes in microorganisms populations during the year were observed in both farms, with higher populations in wax than in disinfection water. Fungi population was higher in the peel and peduncle of NP fruit as compared with P fruit at the end of storage. In air samples from the cooling rooms fungi population may be a source of inoculum for peduncle molds development. Based on the frequency analysis and *in vitro* growth tests, the species *Penicillium purpureogenum*, *P. diversum* and a group of white mycelia fungi were the main microorganisms recovered. No close relationship was found among the climate variables and fungi populations and peduncle mold development. Of these, only the wind speed, temperature and precipitation from two and three weeks before harvest gave a good relation in NP fruits. In general, commercial postharvest treatments had an impact on fungi populations developed in peel and peduncle, but were not enough to totally avoid peduncle molds development. Moreover, different commercial practices as waxing and cooling can enhance the peduncle molds development and it's considered important the cleaning of facilities for fruits handling, cooling rooms and different surfaces in contact with fruits, as well as to develop mechanisms to avoid spores accumulation in wax.



## LISTA DE CUADROS

- CUADRO 1.** Comparación estadística entre los promedios de UFC de hongos en la fruta, agua y cera, y el porcentaje de moho en el pedúnculo de fruta procesada (P) y sin procesar (SP), de las fincas de Puntarenas y Sarapiquí.....52
- CUADRO 2.** Comparación estadística entre los promedios de UFC de levaduras y bacterias en la fruta, agua y cera, de las fincas de Puntarenas y Sarapiquí.....53
- CUADRO 3.** Descripción de los hongos más frecuentes recuperados en las distintas fases de procesamiento muestreadas en empacadoras de piña de las fincas de Puntarenas y Sarapiquí.....54
- CUADRO 4.** Descripción de las levaduras y bacterias más frecuentes recuperadas en las distintas fases de procesamiento muestreadas en empacadoras de piña de las fincas de Puntarenas y Sarapiquí.....57
- CUADRO 5.** Frecuencia de los principales hongos recuperados en las distintas fases de procesamiento y en la cáscara y pedúnculo de fruta procesada (P) y sin procesar (SP) de las fincas de Puntarenas y Sarapiquí.....63

**CUADRO 6.** Frecuencia de las principales levaduras y bacterias recuperadas en las distintas fases de procesamiento y en la cáscara y pedúnculo de fruta procesada (P) y sin procesar (SP) de las fincas de Puntarenas y Sarapiquí.....64

**CUADRO 7.** Resumen de las variables climáticas con mayor ajuste en el análisis de regresión entre las condiciones climáticas previo a la cosecha de la fruta y las poblaciones de hongos y desarrollo de moho en el pedúnculo.....68

### **LISTA DE FIGURAS**

**FIGURA 1.** Promedio mensual de UFC de hongos/mL en aguas de lavado-desinfección y cera de las fincas de Puntarenas (A) y Sarapiquí (B).....33

**FIGURA 2.** Promedio mensual de UFC de hongos por placa con PDA + AI, recuperados en muestreos del aire de las cámaras de enfriamiento de las fincas de Puntarenas y Sarapiquí.....34

**FIGURA 3.** Promedio mensual de UFC de hongos/mL de la suspensión de pedúnculo de fruta recién cosechada, procesada (P) y sin procesar (SP) de las fincas de Puntarenas (A) y Sarapiquí (B).....35

**FIGURA 4.** Promedio mensual de UFC de hongos/mL de la suspensión de pedúnculo de fruta procesada (P) y sin procesar (SP) de las fincas de Puntarenas (A) y Sarapiquí (B), después de 22 días de almacenamiento.....36

**FIGURA 5.** Promedio mensual de UFC de hongos/mL de la suspensión de cáscara de fruta recién cosechada, procesada (P) y sin procesar (SP) de las fincas de Puntarenas (A) y Sarapiquí (B).....37

**FIGURA 6.** Promedio mensual de UFC de hongos/mL de la suspensión de cáscara de fruta procesada (P) y sin procesar (SP) de las fincas de Puntarenas (A) y Sarapiquí (B), después de 22 días de almacenamiento.....38

**FIGURA 7.** Promedio mensual de UFC de levaduras y bacterias/mL en aguas de lavado-desinfección y cera de las fincas de Puntarenas (A) y Sarapiquí (B).....40

**FIGURA 8.** Promedio mensual de UFC de levaduras y bacterias recuperadas por placa Petri con PDA + AI, en muestreos del aire de las cámaras de enfriamiento de las fincas de Puntarenas y Sarapiquí.....41

**FIGURA 9.** Promedio mensual de UFC de levaduras y bacterias/mL de suspensión de pedúnculo de fruta recién cosechada, procesada (P) y sin procesar (SP) de las fincas de Puntarenas (A) y Sarapiquí (B).....42

**FIGURA 10.** Promedio mensual de UFC de levaduras y bacterias/mL, de suspensión de pedúnculo de fruta procesada (P) y sin procesar (SP) de las fincas de Puntarenas (A) y Sarapiquí (B), después de 22 días de almacenamiento.....43

**FIGURA 11.** Promedio mensual de UFC de levaduras y bacterias/mL de suspensión de cáscara de fruta recién cosechada, procesada (P) y sin procesar (SP) de las fincas de Puntarenas (A) y Sarapiquí (B).....45

**FIGURA 12.** Promedio mensual de UFC de levaduras y bacterias/mL de suspensión de cáscara de fruta procesada (P) y sin procesar (SP) de las fincas de Puntarenas (A) y Sarapiquí (B), después de 22 días de almacenamiento.....46

**FIGURA 13.** Incidencia de moho en el pedúnculo de frutos de piña procesada (P) y sin procesar (SP) de las fincas de Puntarenas (A) y Sarapiquí (B), después de 22 días de almacenamiento.....47

**FIGURA 14.** Porcentaje de moho en el pedúnculo de frutos de piña procesada (P) y sin procesar (SP) de las fincas de Puntarenas (A) y Sarapiquí (B), después de 22 días de almacenamiento.....48

**FIGURA 15.** Crecimiento de diferentes tipos de moho en el pedúnculo de frutos de piña provenientes de las fincas de Puntarenas y Sarapiquí.....49

**FIGURA 16.** Hongos más frecuentes recuperados en las fincas de Puntarenas y Sarapiquí. Superficie y reverso de las colonias de: A (*Penicillium diversum*); B (*Penicillium purpureogenum*); C (*Penicillium citrinum*, *P. griseofulvum*); D (*Talaromyces calidicanus*); E (*Fusarium proliferatum*); F (*Fusarium* sp.); G (*Aspergillus aculeatus*); H (*Cladosporium* sp.).....55

**FIGURA 17.** Colonias de los hongos de micelio blanco y oscuro más frecuentes recuperados en las fincas de Puntarenas y Sarapiquí. Superficie y reverso de las colonias de: A (*Penicillium daleae*); B (*Xylaria adscendens*); C (Hongo del orden Xylariales.); D (*Daldinia eschscholtzii*); E (*Microsphaeropsis arundinis*); F (*Phoma herbarum*); G (*Lasiodiplodia* sp.).....56

**FIGURA 18.** Colonias de las levaduras y bacterias más frecuentes recuperadas en las fincas de Puntarenas y Sarapiquí. Superficie de las colonias de: A (Levcr01); B (*Wickerhamomyces anomalus*); C (*Pichia caribbica*, *Candida fukuyamaensis*); D (Levam02); E (*Rhodotorula mucilaginosa*); F (Bam); G (Bcr).....58

**FIGURA 19.** Frecuencia de los principales hongos (A), levaduras y bacterias (B), con base en el total de muestreos realizados en las diferentes fases de procesamiento, de las fincas de Puntarenas y Sarapiquí.....60

**FIGURA 20.** Porcentaje promedio de cobertura del medio de cultivo PDA + AI, con el micelio de los hongos más frecuentes, luego de seis días en incubación a 18 °C.....65

**FIGURA 21.** Diámetro promedio de crecimiento de diferentes hongos de micelio blanco y oscuro en medio de cultivo PDA, luego de seis días en incubación a 18 °C..... 66

**FIGURA 22.** Regresión lineal para la variable climática que presentó la mejor relación con respecto a las UFC de hongos/mL en la cáscara de fruta sin procesar (SP), de la finca de Puntarenas.....69

**FIGURA 23.** Regresiones lineales para las variables climáticas que presentaron la mejor relación con respecto al desarrollo de moho en el pedúnculo de fruta sin procesar (SP), de la finca de Sarapiquí.....69

**FIGURA 24.** Regresiones lineales para las variables climáticas que presentaron la mejor relación con respecto a las poblaciones de hongos en la cáscara de fruta sin procesar de Sarapiquí, recién cosechada y después de 22 días de almacenamiento.....70

**FIGURA 25.** Regresiones lineales para las variables climáticas que presentaron la mejor relación con respecto a las poblaciones de hongos en la cáscara de fruta procesada de Sarapiquí, recién cosechada y después de 22 días de almacenamiento.....71

## INTRODUCCIÓN

La producción de piña (*Ananas comosus* L.), como monocultivo a gran escala en Costa Rica, se inició a finales de la década de 1970, por la compañía Pineapple Development Company (PINDECO), una subsidiaria de la transnacional Del Monte que inició sus operaciones en el sur del país. Una de las variedades más utilizadas en la última década ha sido la “Dorada extradulce”, aunque anteriormente también se sembró la variedad Cayena Lisa y el clon Champaka (Saborío y Camacho 1996, Jiménez 1999, Mata 2009). El rápido crecimiento de este cultivo favoreció una alta tecnificación del mismo y un rápido incremento en el área cultivada para producir fruta de exportación (Castro 1994).

Esta actividad se ha expandido rápidamente durante los últimos diez años y se ha alcanzado un área sembrada de aproximadamente 42.000 has distribuidas entre la Zona Atlántica, Norte y Pacífica (SEPSA 2013, CANAPEP 2014) y para el 2013 se exportó un total de 1.939.680 TM, lo cual generó un ingreso para el país de \$816,3 millones (Arguedas 2014).

La mayoría de las exportaciones de piña son de fruta fresca, a la cual se le aplican en la planta empacadora los tratamientos de encerado y fungicida con el objetivo de alargar su vida poscosecha (Hu *et al.* 2011). A pesar de esto, una vez cosechada, la fruta presenta diversos problemas patológicos, entre los que se citan: la pudrición negra, el oscurecimiento interno de la pulpa en la variedad Cayena Lisa, la pudrición de los frutículos y la presencia de mohos sobre la superficie de la misma (Montero y Cerdas 2005).

La presencia de hongos causantes de mohos o pudriciones es común en frutas tropicales, por ejemplo el banano es afectado por diferentes especies del género *Fusarium*, *Acremonium* sp. y *Colletotrichum musae*, que causan importantes pérdidas poscosecha (Robinson 1996, Chillet *et al.* 2010, Umaña-Rojas y García 2011). En piña, los mohos representan pérdidas significativas en fincas de la zona norte de Costa Rica y es uno de los principales problemas poscosecha en la actualidad (López 2012)<sup>1</sup>.

Entre los principales géneros de hongos citados como patógenos de frutos de piña se encuentran: *Penicillium* spp., *Fusarium moniliforme*, *Thielaviopsis paradoxa* y *Mortierella* sp. (Mourichon 1998, Jiménez 1999, Reyes 1999, Montero-Calderón *et al.* 2008). Un aspecto importante en el estudio de estos y otros microorganismos que afectan el fruto de piña, como base para su control, es el conocimiento de las condiciones climáticas presentes en el campo durante el desarrollo de la fruta, por ejemplo, en trabajos realizados en este cultivo por Rohrbach y Pfeiffer (1975) y Rohrbach y Taniguchi (1984), se encontró una relación directa de la temperatura y precipitación con el inóculo de los hongos *Penicillium funiculosum*, *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans* y una bacteria del género *Acetomonas* durante la floración.

El género *Penicillium* presenta gran cantidad de especies que tienen la capacidad de afectar los tejidos de diversas frutas y hortalizas, entre estos se puede mencionar las especies *P. digitatum* y *P. italicum* en cítricos y *P. expansum* en manzana, pera, cereza y otras frutas, lo que convierte a este género en uno de

---

<sup>1</sup> López, F. 2012. Comunicación personal. Departamento de Investigación Banacol, Costa Rica.



los principales patógenos poscosecha en estos cultivos, con la consecuente pérdida de calidad de los mismos, situación que hace necesario un mejor conocimiento de este hongo en las situaciones particulares de cada cultivo donde tiene la capacidad de desarrollarse (Martínez 2003).

El manejo del inóculo de estos microorganismos mediante la implementación de prácticas poscosecha que incluyen la desinfección, aplicación de fungicidas, uso de ceras y enfriamiento de la fruta a temperaturas de 8 a 10 °C, han sido las principales estrategias empleadas para disminuir las pérdidas poscosecha en frutos de piña (Mohammed 1994, Montero y Cerdas 2005).

Además de las prácticas mencionadas, se han realizado trabajos para aislar microorganismos autóctonos a partir de la cáscara de frutos de piña, con el objetivo de seleccionar agentes de control biológico de enfermedades poscosecha (Reyes 1999). Igualmente, en otros cultivos como manzana y cítricos, se ha desarrollado investigaciones similares en la búsqueda de microorganismos para el control biológico de enfermedades poscosecha (Barkai-Golan 2001, Manso y Nunes 2011).

Bajo este contexto y tomando en cuenta que la piña es uno de los principales cultivos de exportación de fruta fresca en Costa Rica, se planteó la presente investigación con la finalidad de mejorar el conocimiento de los principales hongos causantes de mohos en poscosecha, de manera que sirva como base para establecer estrategias para el manejo integrado de estos microorganismos.

## OBJETIVO GENERAL

Identificar los principales hongos causantes de mohos poscosecha en frutos de piña en las zonas de Puntarenas y Sarapiquí y establecer su relación con las condiciones climáticas y con las diferentes fuentes de inóculo en la planta empacadora.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1- Aislar e identificar los géneros de los hongos causantes de moho en el pedúnculo de frutos de piña, variedad “Dorada extradulce” provenientes de las dos zonas de estudio.
- 2- Determinar en cada zona de estudio, si alguna de las etapas de procesamiento poscosecha en la planta empacadora representa una mayor fuente de inóculo de los hongos causantes de moho en el pedúnculo.
- 3- Identificar mediante análisis molecular, las especies de los hongos causantes de moho en el pedúnculo más frecuentes y con mayor potencial de crecimiento *in vitro*, seleccionadas al finalizar los muestreos en las dos zonas de estudio.
- 4- Determinar si existe relación entre las poblaciones de hongos e incidencia de moho en el pedúnculo y las condiciones climáticas prevalentes durante el desarrollo de la fruta en el campo.

## REVISIÓN DE LITERATURA

### 1. Generalidades sobre la piña

La piña es una planta de la familia Bromeliaceae, especie *Ananas comosus* L., originaria de América tropical y subtropical. Es una planta herbácea con un tallo redondeado y presenta 30 a 40 hojas. La fruta está compuesta por un racimo de frutículos individuales y el corazón o centro del fruto es una extensión del pedúnculo (Jiménez 1999).

En los trópicos, la piña se cultiva comercialmente entre los 100 y 800 msnm. El clima influye sobre el tamaño y calidad de la fruta, y la temperatura óptima para su desarrollo se encuentra entre los 22 °C y 30 °C. Requiere una precipitación entre 1000 y 1500 mm anuales y se puede cultivar en gran diversidad de suelos, siempre y cuando se tenga condiciones óptimas de drenaje (Baraona y Sancho 1998).

Se propaga exclusivamente de forma vegetativa, mediante la selección de hijos con un peso mayor a 250 g y un tamaño mayor a 25 cm de longitud y la densidad de siembra oscila entre 50.000 y 70.000 plantas/ha, de acuerdo con la variedad (Baraona y Sancho 1998, MAG 2010). De acuerdo con Baraona y Sancho (1998), se ha establecido diferentes grupos que incluyen las variedades comúnmente utilizadas y entre estos se encuentran:

- a) **Grupo Cayenne:** incluye la variedad Cayena Lisa, cuyas hojas son lisas, con excepción de algunas espinas en la punta y en la base. La

pulpa es amarilla, con un peso de la fruta que oscila entre 2 y 4 kg, de forma cilíndrica y con un corazón pequeño. Es resistente al hongo *Thielaviopsis paradoxa*. Es el grupo estándar para procesamiento y fruta fresca, debido a que posee características como forma cilíndrica, frutículos poco profundos, color amarillo de la pulpa y alta productividad (Paull y Duarte 2011).

- b) **Grupo Queen:** Hojas cortas, frecuentemente espinosas y con extremidades rojizas. Frutos pequeños, con un peso menor a 1,3 kg. La pulpa es más firme, menos jugosa y con aroma más pronunciado que Cayena Lisa.
- c) **Grupo Spanish (Española roja):** Hojas largas, estrechas y espinosas, de color verde oscuro y con una banda central rojo cobriza. El fruto pesa de 1 a 2,5 kg, es globoso, de pulpa amarillo pálido y más fibrosa que Cayena Lisa. No es apropiada para industrializar.
- d) **Grupo Abacaxi:** Planta de porte recto con hojas largas que presentan pequeñas espinas y en la base tienen coloración rosa-púrpura. El fruto es piramidal, de pulpa blanquecina, poco apropiado para conservas y exportación como fruta fresca, por la forma y coloración de la pulpa.
- e) **Grupo Maipure:** Agrupa a todos los cultivares que están totalmente libres de espinas. La principal variedad es Montelirio y se caracteriza por tener frutos relativamente grandes, con pulpa blanca, más ácida y jugosa que Cayena Lisa y menos fibrosa que ésta. Su forma es tronco-cónica. No es apta para exportación debido a que presenta frutículos muy profundos, el eje central o "corazón" presenta un diámetro muy

grande, el color blanco de la pulpa no es atractivo para conservas y su forma tampoco es adecuada para el procesamiento industrial.

En general, el fruto de piña se encuentra constituido por 80 a 85% de agua y 12 a 15% de azúcares, de los cuales dos terceras partes se encuentran en forma de sacarosa y el resto como glucosa y fructosa. Prácticamente no contiene almidón y su contenido de proteínas y grasas es bajo (Arias y Toledo 2000).

Cuando la fruta se encuentra desarrollada, la maduración ocurre a partir de la sección basal, y aspectos como temperatura, humedad y contenido de nutrimentos afectan el contenido de azúcares y la acidez, los cuales son parámetros evaluados comúnmente para determinar su calidad poscosecha (Jiménez 1999; Abdullah 2011).

Entre los principales países productores de piña en el mundo se encuentran Tailandia, Brazil, Filipinas, China y la India, y los mayores exportadores de fruta fresca son Costa Rica, Filipinas y Costa de Marfil (Chen *et al.* 2009).

## 2. Cosecha y procesamiento de la fruta

La fruta de piña se cosecha de acuerdo con diferentes parámetros de calidad, entre los que se citan (Montero y Cerdas 2005, García y Rodríguez 2011):

- a) **Color de la cáscara:** se define de acuerdo con una escala que toma en cuenta el porcentaje de color amarillo y varía de acuerdo con el mercado destino.

- b) **Forma y tamaño:** la fruta debe tener una forma cilíndrica, con un tamaño de fruta 7 u 8 que de acuerdo con la escala comercial corresponde con un peso de aproximadamente 1,5 a 2 kg.
- c) **Contenido de sólidos solubles:** debe tener un valor entre 12 y 13%.
- d) **Acidez:** debe estar entre 0,5 y 1%.
- e) **Translucidez:** la pulpa no debe presentar una alta translucidez, ya que si esto ocurre la fruta es muy susceptible a daños mecánicos por su alto contenido de agua en las células.
- f) **Apariencia de los frutículos:** las hojas de los frutículos deben estar secas y estos deben presentar una forma plana.

La cosecha de la fruta se realiza manualmente y la recolección, mediante maquinaria que contiene una banda transportadora donde se coloca la fruta recién cosechada y la lleva directamente hacia una carreta, la cual se mantiene en un predio o patio de espera dentro de la finca por un período de no más de 60 min, luego es transportada mediante un tractor hacia la planta empacadora, el cual debe desplazarse lentamente para evitar el daño físico de la misma (Bartholomew *et al.* 2003, Montero y Cerdas 2005).

Una vez en la empacadora, cada carreta es colocada generalmente en un área bajo sombra, donde se registra e identifica el lote de procedencia y se realiza una inspección visual de la calidad general de la fruta. Posteriormente, esta se coloca en pilas con agua para lavado y desinfección, se desplaza hacia el área de selección manual, donde se elimina aquella que no cumple con los estándares de calidad del mercado destino y se aplican los tratamientos de encerado y aspersión

de fungicida, se empaca en cajas de cartón y se almacena en frío hasta la llegada y venta en el mercado destino (Bartholomew *et al.* 2003, Montero y Cerdas 2005).

### **3. Desarrollo de enfermedades poscosecha**

Debido a que la cosecha de la piña se realiza manualmente, es posible que durante este proceso se cause heridas que facilitan la entrada de patógenos, como bacterias y hongos que afectan la calidad de la fruta para exportación, situación que ocurre no solamente en piña, sino también en diversos tipos de frutos (Arauz 1994, Reyes 1999, Montero y Cerdas 2005). Estos microorganismos son parte de la microflora que generalmente se encuentra presente durante el desarrollo de la fruta en el campo y que puede servir de inóculo para el desarrollo de enfermedades poscosecha (Mata 2009; Barth *et al.* 2009, Prusky y Gullino 2010).

Un aspecto a destacar es que este tipo de infecciones poscosecha generadas por microorganismos en la fruta, comúnmente no son visibles o predecibles de forma inmediata durante la cosecha y los síntomas se desarrollan posteriormente cuando el producto se encuentra en el mercado destino, lo que causa importantes pérdidas económicas (Dennis 1983, Wills *et al.* 1998).

Barquero (2010) indica que, en las compañías dedicadas a la exportación de piña fresca en Costa Rica, constantemente se presentan problemas de hongos en la fruta que causan el rechazo de la misma en el mercado, y esto ocurre principalmente cuando esta es enviada a Europa, debido a que se encuentra

sometida a tiempos prolongados de almacenamiento y transporte de hasta un mes o más, en función de la capacidad de comercialización de cada compañía.

Este deterioro de la fruta genera importantes pérdidas económicas para los productores de piña, debido al costo de los reclamos y las devoluciones de los contenedores (Barquero 2010). Este tipo de reclamos surgen debido a que comúnmente se evalúa la apariencia externa de la fruta y si esta se encuentra afectada por la presencia de hongos u otros factores, se rechaza aunque la calidad interna se mantenga inalterada (Wills *et al.* 1998).

#### **4. Organismos patógenos poscosecha**

El deterioro poscosecha en la piña y otros frutos, es causado frecuentemente por levaduras y mohos, entre los que se citan géneros de hongos como *Rhizopus*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Botrytis* y *Penicillium*, y levaduras como *Candida* spp., *Saccharomyces* spp. y *Zygosaccharomyces* spp. (Malins 1991, Kays 1999, Phaff 2001, Agrios 2005, Hui *et al.* 2006, Barth *et al.* 2009, Garita 2014). Recientemente, también se informó que el hongo *Curvularia eragrostidis*, causa pudriciones poscosecha en frutos de piña cultivar Pérola, comercializados en Brasil (Ferreira *et al.* 2014).

En Hawai, Reyes (1999) recuperó en la fruta los géneros de hongos *Acremonium*, *Cephalosporium*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Gliocladium*, *Mortierella* y *Penicillium*, aunque no necesariamente asociados con el desarrollo



de pudriciones o mohos poscosecha, ya que el objetivo de este trabajo fue la búsqueda de microorganismos útiles para el control biológico de *Thielaviopsis paradoxa*, provenientes del mismo fruto de piña.

En trabajos en invernadero realizados por Hernández (2010) en Cuba, se aisló en tallos de piña los hongos *Phytophthora nicotianae*, *Fusarium guttiforme* y *Thielaviopsis paradoxa*, y de estos, los géneros *Fusarium* y *Thielaviopsis*, también han sido informados como microorganismos que se desarrollan en plantas y frutos de piña de diversas regiones del mundo (Ploetz 2001, Ploetz 2007, Bartholomew *et al.* 2003).

Otra enfermedad conocida como pudrición de los frutículos, causa un oscurecimiento en el centro de cada frutículo (Mitra 1997, Rohrbach y Schmitt 2003). Las manchas necróticas en algunas ocasiones no son visibles en la parte externa, lo que hace difícil la selección de la fruta en las etapas previas al empaque (Mourichon 1998). Según indican Mourichon (1998) y Reyes (1999), el hongo aislado y causante de esta enfermedad en el 70% de los casos en Costa de Marfil y otras regiones productoras de piña es *Penicillium funiculosum*, que a su vez se encuentra asociado con hongos del género *Fusarium* (Petty *et al.* 2006). Mohammed (1993), Paull (1993), Kader (2002) y Bartholomew *et al.* (2003), indican que no solamente *P. funiculosum* es causante de la pudrición de los frutículos, sino que también incluyen como agentes causales de esta enfermedad al hongo *Fusarium moniliforme* Sheldon var. *subglutinans* y la levadura *Candida guilliermondii*.

En trabajos realizados en Costa Rica por Barquero (2010), se recuperó en frutos de piña los géneros *Penicillium* y *Fusarium* y se determinó que la mayor concentración de estos microorganismos se da en el pedúnculo, debido a que es una superficie porosa que permite la entrada de las esporas del patógeno. A su vez, *P. funiculosum* fue el principal hongo aislado en frutos de piña producidos en Costa Rica y procesados en España, donde se estudió la influencia de las condiciones de empaque sobre la vida de anaquel de fruta precortada, bajo condiciones de almacenamiento de 5 °C y rangos de oxígeno de 11 a 40% durante 20 días (Montero-Calderón *et al.* 2008). En estudios más recientes con frutos en poscosecha realizados en Costa Rica por Reyes (2012) y López (2012), fue frecuente la recuperación en el pedúnculo, de los géneros *Penicillium*, *Fusarium*, *Aspergillus* y *Trichoderma*.

Otros microorganismos encontrados en frutos de piña, son las bacterias *Pseudomonas* spp., *Lactobacillus* sp., *Acetobacter* spp., *Erwinia herbicola* y *Erwinia carotovora* (Kader 2002; Hui *et al.* 2006, Korres *et al.* 2010, Paull y Lobo 2012). La sintomatología observada por el ataque de *E. carotovora* consiste en un moteado café y el endurecimiento anormal de los tejidos. Esta bacteria puede ingresar a la fruta durante la floración y se desarrolla solamente durante la maduración (Kader 2002). Marín-Cevada *et al.* (2010) indican que en la planta de piña generalmente están presentes bacterias de los géneros *Azospirillum*, *Burkholderia*, *Erwinia*, *Gluconacetobacter*, *Herbaspirillum* y *Pantoea*, sin embargo, no siempre afectan la fruta y desencadenan el desarrollo de patologías que causan su deterioro.

Chanprasartsuk *et al.* (2010) aislaron e identificaron levaduras autóctonas en frutas frescas y jugos procesados de piña, variedad Cayena Lisa, donde las principales especies aisladas fueron *Pichia guilliermondii* y *Hanseniaspora uvarum*.

En un caso documentado en Brasil por Korres *et al.* (2010) en piña, se cita que la presencia en conjunto de la bacteria *Klebsiella* sp. y las levaduras *Candida* sp., *Saccharomyces* sp. y *Kloeckera* sp. se asoció con síntomas de fermentación y maduración prematura de la fruta en el campo y en poscosecha.

## **5. Tratamientos poscosecha para evitar el deterioro de la fruta**

De acuerdo con MAG (2010) y García y Rodríguez (2011), toda planta empacadora de piña debe contar con una pila de lavado para eliminar la suciedad externa de la fruta y en estas pilas se utiliza como desinfectante el cloro, que puede ser adicionado como hipoclorito de sodio para alcanzar concentraciones entre 50 y 150 ppm de cloro libre residual. Además, se debe garantizar que el pH del agua se mantenga entre 6,5 y 7,5 para optimizar el proceso de desinfección externa de la fruta.

En Costa Rica, Barquero (2010) evaluó los desinfectantes ácido peracético, hipoclorito de calcio, cloruro de calcio y peroximonosulfato de potasio diluidos en el agua de lavado de la fruta. En este estudio se determinó una carga inicial de mohos y levaduras de la piña recién cosechada de aproximadamente  $8,5 \times 10^5$  unidades formadoras de colonias/piña. Como resultado de estas pruebas se

obtuvo que, ninguno de los desinfectantes evaluados disminuyó significativamente la carga microbiológica presente en la fruta.

Rohrbach (1994), Ayernor *et al.* (2010) y Paull y Duarte (2011) indican que el uso de ceras y otros materiales de cubrimiento aplicados sobre la fruta, reducen la pérdida de humedad, disminuyen la captura de oxígeno y el escape del dióxido de carbono y funcionan como una barrera a la infección y desarrollo de patógenos poscosecha que pueden estar presentes durante el procesamiento y transporte. En trabajos realizados por Hu *et al.* (2011) se encontró que la cera Sta-Fresh 2952 a 60 g/L fue la más efectiva con respecto a otras ceras evaluadas para evitar el daño por frío, retrasar la pérdida de firmeza, pérdida de peso y obtención de un mayor contenido de azúcares totales y ácido ascórbico e igualmente Lin *et al.* (2013), obtuvieron resultados similares con el uso de esta cera. En otro estudio realizado por Nimitkeatkai *et al.* (2006), se encontró que el uso de las ceras Sempresh<sup>TM</sup> al 1% y Sta-Fresh 7055 al 10% aplicadas sobre la fruta redujo el oscurecimiento interno, mantuvo un mayor contenido de ácido ascórbico y se logró extender la vida útil en cinco días con respecto al testigo sin uso de cera, el cual fue almacenado durante 28 días. Debido a los beneficios que brinda este insumo, el encerado de la fruta es una de las prácticas utilizadas comúnmente en plantas empacadoras de piña de Costa Rica (MAG 2010).

Además del cloro y el encerado, sobre la fruta se aplica fungicidas para evitar el deterioro debido al desarrollo de hongos poscosecha y es común que estos sean mezclados y aplicados junto con la cera, la cual cubre toda la superficie de la fruta, sin embargo, en algunas fincas también se aplican

directamente en el pedúnculo mediante aspersión (Paull y Duarte 2011). Entre los más utilizados y mencionados por diversos autores se encuentran el benomil, tiabendazol y triadimefon (Eckert y Ogawa 1985, Paull 1993, Reyes 1999, Arias y Toledo 2000, Reyes *et al.* 2004, Pinto y Haroldo 2004, Saborío y Fonseca 2011) y otros en proceso de registro en Estados Unidos como el fludioxonil (Adaskaveg y Förster 2010), sin embargo, debido a los riesgos para la salud humana, el uso de este tipo de insumos cada vez se restringe más en los mercados destino y se evalúa constantemente el cumplimiento de los LMRS (límites máximos de residuos), lo que obliga a buscar estrategias de manejo integrado que permitan reducir al mínimo o eliminar su uso (Sharma *et al.* 2009, Hjorth *et al.* 2011). Otro de los problemas relacionados con el uso continuo de fungicidas poscosecha consiste en el desarrollo de resistencia por parte del patógeno y un ejemplo de ello se menciona en cítricos donde Sánchez-Torres y Tuset (2011) encontraron un 77% y 84% de las razas de *Penicillium digitatum* resistentes al imazalil y thiabendazol respectivamente, situación que también fue informada previamente por Hamamoto *et al.* (2001) y Kinay *et al.* (2007) en aislamientos de este hongo recuperados en plantas empacadoras de cítricos.

Una vez procesada y empacada la fruta, la piña se almacena a temperaturas entre 8 y 10 °C, y una humedad relativa del 85 a 90%, con el objetivo de mantener los atributos de calidad y reducir el desarrollo de patógenos poscosecha, durante su transporte hacia el mercado destino (Malins 1991, Mohammed 1994, Montero y Cerdas 2005, Alvarado *et al.* 2006, Kader *et al.* 2011).

El control biológico es otra estrategia para el manejo de patógenos en poscosecha y Reyes (1999) realizó trabajos en Hawai en búsqueda de microorganismos para el control biológico de *Thielaviopsis paradoxa* en piña y entre los principales géneros y especies de levaduras con potencial para lograr este objetivo se encontró *Candida* sp., *Cryptococcus albidus*, *Pichia guilliermondii*, *Rhodotorula aurantiaca* y *Rhodotorula glutinis*.

En Costa Rica, Reyes (2012), evaluó el efecto de compuestos GRAS (Generally recognized as safe, por sus siglas en inglés), sobre el crecimiento *in vitro* e *in vivo* de los géneros *Fusarium* y *Penicillium*, de los cuales el Butilhidroxianisol (BHA), fue el que mostró los resultados más promisorios para el control de moho en el pedúnculo de la piña en poscosecha.

Adicional a las estrategias mencionadas, Jiménez (1999) enfatiza que la limpieza del área de procesamiento y empaque de la fruta es fundamental para evitar la infección de la misma con patógenos como *Penicillium* sp., *Fusarium moniliforme* y la levadura *Candida guilliermondii*, los cuales se han encontrado como agentes causales de importantes pérdidas poscosecha en Costa Rica, debido al desarrollo de mohos y pudriciones en piña. En otros cultivos como manzana, se ha informado que la contaminación de la fruta con diferentes especies del género *Penicillium* ocurre principalmente durante el manejo poscosecha y se obtuvo densidades de 4.000 a 5.000 esporas m<sup>-3</sup> en el aire de las cámaras de enfriamiento y almacenamiento, que correlacionaron con una alta densidad de esporas en la superficie de la fruta y el desarrollo posterior de pudriciones (Amiri y Bompeix 2005).

Como indica Salazar (2010), el correcto diagnóstico de los organismos patógenos en las frutas es muy importante cuando se desea implementar estrategias de manejo. Adicional a la identificación morfológica y morfométrica que se han utilizado tradicionalmente, en la actualidad se dispone de herramientas moleculares que permiten establecer con mayor certeza los agentes causales de enfermedades poscosecha y en Costa Rica, esta técnica se ha implementado en el estudio de hongos que afectan cultivos como papa y banano (Páez *et al.* 2005, Hernández 2009, Salazar 2010) y es una opción disponible para lograr un mejor conocimiento de los agentes causales de mohos en frutos de piña de Costa Rica.

## **6. Fuentes de inóculo e influencia del clima en el desarrollo de microorganismos**

El suelo, el aire, el agua de lavado y cada una de las superficies con las que entra en contacto la fruta durante y después de la cosecha, pueden ser fuente adicional de inóculo de los diversos patógenos que causan el desarrollo de mohos y pudriciones en piña y otros cultivos (Arauz 1994, Araya y Cascante 2000, Barkai-Golan 2001, Hui *et al.* 2006, Morales *et al.* 2010).

El inóculo del patógeno que entra en contacto con la fruta determina en gran medida la severidad de la infección poscosecha (Barkai-Golan 2001) y entre los factores que determinan la cantidad presente, se pueden citar la temperatura y la humedad relativa, que varían dependiendo de la zona y la época del año. El conocimiento del comportamiento de cada especie de patógeno con respecto a

estas variables climáticas es importante si se desea establecer medidas de combate efectivas (Arauz 2011, Rivera 1999, Araya y Cascante 2000, Ansari y Feridoon 2006). Wills *et al.* (1998) indican que, además de la relación con las variables climáticas, la interacción entre el hospedero y el patógeno es muy específica y como ejemplo de ello se cita la especie *Penicillium expansum* que afecta solamente frutos de pera y manzana, por lo que es conveniente realizar estudios para cada cultivo en particular.

Las condiciones meteorológicas tienen una influencia significativa en la producción, dispersión y deposición de las esporas de diferentes especies de hongos. La lluvia, velocidad y dirección del viento, temperatura y humedad relativa son las principales variables que influyen sobre las poblaciones de la mayoría de hongos (Li y Kendrick 1995, Mueller y Buck 2003, Arauz 2011) y en muchas ocasiones la interacción entre diferentes variables climáticas es la que determina el desarrollo de enfermedades en las plantas, causadas por diferentes patógenos, por ejemplo, Poole *et al.* (2013) en trabajos realizados en Estados Unidos, determinaron una interacción significativa entre la temperatura, precipitación y presencia de nieve sobre el desarrollo y distribución en el campo de diferentes especies del género *Fusarium*.

Debido a que el crecimiento y desarrollo de diferentes patógenos está determinado por sus requerimientos climáticos, es importante conocer dicha información para cada especie en particular (Garrett *et al.* 2006), y es un tema cada vez más importante en la agricultura, debido a que con el cambio climático se podría incrementar el efecto negativo de diferentes patógenos sobre los



cultivos, por ejemplo, la germinación de esporas del hongo *Puccinia substriata* incrementa conforme aumenta la temperatura, en un rango entre 19 °C y 22 °C (Tapsoba y Wilson 1997) y el patógeno de raíz *Monosporascus cannonballus* se reproduce con mayor rapidez a temperaturas entre 25 °C y 30 °C (Waugh *et al.* 2003).

El viento ha mostrado ser un factor importante para la diseminación de los hongos *Penicillium* spp. y *Aspergillus* spp., incluso con estos patógenos puede tener más influencia que la temperatura (Pasanen *et al.* 1991, Li y Kendrick 1995). En trabajos realizados por O' Gorman y Fuller (2008), se encontró una relación positiva entre la humedad relativa y el conteo de esporas en el aire de los géneros *Penicillium* y *Aspergillus*, situación que también fue informada previamente por Wu *et al.* (2007), lo cual muestra la importancia que puede tener un cambio en alguna de estas variables climáticas sobre el nivel de inóculo de estos hongos.

En trabajos *in vitro* realizados por Pardo *et al.* (2006) se encontró que, entre 20 °C y 30 °C, los niveles mínimos de agua libre ( $a_w$ ) para la germinación y crecimiento de micelio de *Penicillium verrucosum* fueron de 0,8 y 0,85 respectivamente, con un máximo de germinación y crecimiento entre 0,9 y 0,95. Con base en esta información, se generaron modelos matemáticos que de acuerdo con estos autores podrían servir para controlar las condiciones de almacenamiento de granos, con el fin de disminuir el crecimiento de este hongo.

No solamente el crecimiento, sino también la producción de metabolitos como las micotoxinas están influenciados por factores como la temperatura y el  $a_w$

(Garcia *et al.* 2009). En trabajos *in vitro* realizados por Garcia *et al.* (2011), se registró la mayor producción de patulina en 79 aislados de *Penicillium expansum* a una temperatura de 20 °C, que coincide con la condición óptima para la esporulación y crecimiento de este hongo.

En algunas variedades de piña, uno de los principales problemas patológicos poscosecha es la pudrición negra, causada por el hongo *Thielaviopsis paradoxa* y se ha determinado mediante diferentes trabajos que este microorganismo se desarrolla con temperaturas entre 21 y 32 °C, con una temperatura óptima para su crecimiento de 27 °C y un pH de 6 en la fruta (Mitra 1997, Wijeratnam *et al.* 2005) y se ha encontrado una alta correlación entre la duración de la lluvia antes de la cosecha y la infección de este hongo en frutos de piña (Rohrbach 1994).

El objetivo de mejorar el conocimiento de la respuesta de diferentes patógenos con respecto al clima, es buscar herramientas que permitan un manejo más eficiente de las enfermedades, por ejemplo, en trabajos realizados en California, Estados Unidos para el control de mildiú polvoso en lechuga causado por *Bremia lactucae*, se ha logrado utilizar la información de la temperatura, humedad relativa y período de mojadura de la hoja como criterio para programar las aplicaciones de fungicida, mejorándose de esta forma el establecimiento del programa de control químico de esta enfermedad (Wu *et al.* 2005).

## MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo de investigación se llevó a cabo en dos zonas productoras de piña en Costa Rica: cantón de Puntarenas en la provincia de Puntarenas y cantón de Sarapiquí en la provincia de Heredia. En cada zona se seleccionó una finca y se realizó un muestreo mensual de abril de 2012 a marzo de 2013. Ambas fincas se encontraban administradas por la misma compañía y el manejo poscosecha de la fruta fue semejante durante el desarrollo del trabajo. Para hacer los estudios, en cada finca se seleccionó las siguientes fases del procesamiento de la fruta: recibo, lavado, encerado, empaque y enfriamiento.

A continuación se detalla el procedimiento utilizado para el muestreo y procesamiento de las muestras en cada una de las fases seleccionadas:

### **1. Lavado y encerado**

A partir del momento de inicio del procesamiento de la fruta en la empacadora, se recolectó seis submuestras de 250 mL de agua de la pila de lavado y desinfección de la fruta. Estas se recogieron de forma equidistante a lo largo de la pila, a una profundidad de aproximadamente 10 cm, para formar una muestra compuesta de 1,5 L, la cual se homogenizó mediante agitación manual y se tomó un volumen final de 40 mL, el cual se colocó en un tubo plástico estéril, con una pastilla de 100 mg de tiosulfato de sodio, como agente para neutralizar el efecto del cloro residual sobre los posibles microorganismos presentes en el agua al momento del muestreo. Se completó un total de 15 muestras compuestas, con

un intervalo de 15 min entre cada una y se aseguró que en el momento de la toma de cada muestra, el agua de la pila se encontrase en recirculación.

En el punto de caída de la cascada de cera que se aplica sobre la fruta, se recolectó 6 submuestras de 250 mL de la cera para formar al igual que en el agua, una muestra compuesta de 1,5 L, la cual se homogenizó mediante agitación manual y se tomó un volumen final de 40 mL y se colocó en un tubo plástico estéril. Estas muestras se recogieron simultáneamente con las de agua de las pilas de lavado y desinfección de la fruta.

Cada muestra de cera y agua se colocó en una hielera a una temperatura entre 7 y 10 °C y se trasladó al Laboratorio de Tecnología Poscosecha del Centro de Investigaciones Agronómicas de la Universidad de Costa Rica, donde se mantuvieron en una cámara de enfriamiento a 7 °C previo a su procesamiento.

Para el aislamiento de los hongos a partir de la cera se utilizó el método de dilución seriada estándar con tres diluciones (French y Hebert 1980, Tortora *et al.* 2007), el cual consistió en colocar volúmenes de 100 µL de cera en tubos eppendorf estériles y adicionar 900 µL de agua destilada autoclavada, agitar durante 30 segundos y a partir de esta dilución tomar nuevamente un volumen de 100 µL y repetir el procedimiento anterior hasta completar la tercera dilución. Para las muestras de agua no se hizo ninguna dilución.

A partir de la dilución final de cada muestra de cera y de las muestras de agua, se tomó 100 µL y mediante una asa Digralsky se distribuyeron uniformemente en una placa Petri con el medio de cultivo papa dextrosa agar con

ácido láctico (PDA + Al) y cada placa se incubó a una temperatura de 22 °C y un fotoperíodo de 12 h luz durante 5 días. Posteriormente, se contó el número de unidades formadoras de colonias (UFC) de hongos, bacterias y levaduras por placa y se multiplicó por el factor de dilución correspondiente (10.000 en cera y 10 en agua) para obtener el número de UFC/mL de la muestra original.

## **2. Recibo de fruta y empaque**

En el área de recibo de fruta se seleccionó e identificó una carreta con fruta recién cosechada y con calidad de exportación (color grado 0,5 a 1, calibre 7, sin heridas visibles, pudriciones y sin defectos en la corona como coronas dobles o deformadas, de la cual se tomó un total de 28 frutas sin procesar, en adelante designadas como SP y otro lote con la misma cantidad de frutas procesadas con los tratamientos comerciales de la finca y listas para empaque, designadas como fruta P. Estos tratamientos consistieron en el lavado de la fruta en tanques de agua con concentraciones de cloro libre de 150 a 180 ppm durante aproximadamente 30 minutos, selección manual, aplicación de un recubrimiento de cera compuesta por aceite de origen vegetal y ácidos grasos del glicerol y el sorbitán y aspersion de fungicida en el corte. Ambos grupos de frutas provenientes de la misma carreta se colocaron en cajas plásticas o de cartón, se cubrieron con papel kraft y fueron trasladadas al Laboratorio de Tecnología Poscosecha de la Universidad de Costa Rica.

Una vez en el laboratorio, las frutas se almacenaron en cámaras de enfriamiento bajo condiciones que simulaban el manejo comercial para exportación como fruta fresca: 5 días a 7 °C, 1 hora a 18 °C, 14 días a 7 °C y 3 días a 18 °C, para un total de 22 días de almacenamiento a una humedad relativa de 90 a 95%. Al finalizar este período, se evaluó la incidencia de moho y se estimó la severidad del mismo como porcentaje de cobertura del pedúnculo en cada fruta.

De la fruta sin procesar y de la procesada, se seleccionó al azar cinco frutas en el momento de ingreso al laboratorio y cinco frutas al finalizar el período de almacenamiento y a cada una se le extrajo un segmento superficial de aproximadamente 3 cm<sup>2</sup> de pedúnculo y de cáscara de la zona ecuatorial de la fruta. Cada uno de estos segmentos se cortó con ayuda de un bisturí en cuatro a seis subunidades de igual tamaño y estas se colocaron en un beaker con 30 mL de agua destilada estéril con una gota de Tween 20 y se agitó durante 5 minutos mediante un agitador magnético. Para cada muestra de pedúnculo o cáscara, se utilizó el método de dilución seriada estándar previamente citado para cereza, considerando dos diluciones para los tejidos de la fruta recién cosechada y tres diluciones para los de la fruta almacenada durante 22 días. A partir de la última dilución se tomó 100 µL y se colocaron en una placa Petri con el medio de cultivo PDA + AI, se distribuyeron uniformemente sobre la misma con ayuda de una asa Digralsky y a los 5 días se contó el número de UFC por placa de hongos, bacterias y levaduras, que se multiplicó por el factor de dilución correspondiente (1.000 en fruta recién cosechada y 10.000 en fruta almacenada), para obtener la cantidad de UFC/mL de la suspensión inicial.

### **3. Enfriamiento y almacenamiento**

En las cámaras de enfriamiento y almacenamiento de cada finca, se seleccionó 15 sitios equidistantes y en cada uno se colocó una placa Petri con PDA + Al, la cual se expuso en ese ambiente durante 15 minutos, de acuerdo con la metodología utilizada por Buttner y Stetzenbach (1993) y recomendada por Pitt y Hocking (2009) para el muestreo por deposición de esporas de hongos presentes en el aire. Las placas se sellaron con parafilm, se colocaron en una hielera a una temperatura entre 7 y 10 °C y se trasladaron al Laboratorio de Tecnología Poscosecha de la Universidad de Costa Rica, donde se dejaron a la temperatura ambiente del Laboratorio durante 5 días y una vez transcurrido ese tiempo, se contó el número de UFC por placa de hongos, bacterias y levaduras.

### **4. Identificación morfológica y molecular de los microorganismos**

Una vez finalizado el conteo de UFC en cada una de las muestras de las distintas fases de procesamiento, se aisló en medio PDA + Al los hongos presentes y luego de que esporularon, se identificó los más frecuentes mediante la observación de sus características morfológicas en un microscopio de luz, la ayuda de claves de identificación de la literatura (Barnett y Hunter 1972; von Arx 1974; Ellis 1976; Watanabe 1994; Seifert *et al.* 2011) y la guía de profesionales del Laboratorio de Tecnología Poscosecha.

Los hongos que no esporularon y tres de las levaduras más frecuentes, se conservaron en placas Petri con medio de cultivo PDA + Al en refrigeración a 7 °C hasta finalizar todos los muestreos, y en una última etapa, estos microorganismos fueron caracterizados a nivel molecular.

Previo a la identificación molecular de los hongos, se hizo cultivos monospóricos de cada especie y para los hongos que no presentaron esporulación y las levaduras, se trabajó con colonias puras de cada microorganismo seleccionado.

Para este análisis, se trabajó con siete especies de hongos y tres levaduras que presentaron alta frecuencia al finalizar los muestreos en ambas fincas, los que fueron procesados para su identificación molecular en el Laboratorio de Técnicas Moleculares del Centro de Investigaciones en Protección de Cultivos (CIPROC) de la Universidad de Costa Rica. Otro grupo de tres hongos de micelio blanco y tres hongos de micelio oscuro fueron procesados en el Laboratorio de Biotecnología de Plantas del Centro de Investigaciones Agronómicas de la Universidad de Costa Rica.

El procedimiento utilizado por el Laboratorio de Biotecnología de Plantas, consistió en la extracción de ADN mediante el método de Rogers y Bendich (1988), citado y utilizado por Hernández (2009) y Salazar (2010) en la identificación molecular de especies de hongos del género *Colletotrichum* en banano.



El ADN obtenido se utilizó para amplificar mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) las regiones de los espaciadores internos transcritos ITS1 e ITS2 (ITS-Internal Transcribed Spacers, por sus siglas en inglés) con los imprimadores ITS5/ITS4 (White *et al.* 1990; Malacinski 2003).

Cada reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen total de 25  $\mu\text{L}$ , la mezcla consistió de: 2,5  $\mu\text{L}$  de 10x Tampón DreamTaq™; 2  $\mu\text{L}$  de cada imprimador (10 mM); 2  $\mu\text{L}$  de dNTP's (10 mM); 1,7  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  (25 mM); 1  $\mu\text{L}$  de BSA (20 mg/mL); 0,25  $\mu\text{L}$  de polimerasa (5u/  $\mu\text{L}$ ) DreamTaq™ (Fermentas); 2  $\mu\text{L}$  de ADN molde (30 ng) y 11,6  $\mu\text{L}$  de agua nanopura estéril.

La amplificación se realizó en un Termociclador Applied Biosystems Veriti™ con el siguiente programa térmico: desnaturalización inicial a 94 °C por 3 minutos; 25 ciclos bajo las siguientes condiciones: 45 segundos a 94 °C, 30 segundos a 61 °C, 120 segundos a 72 °C y una extensión final durante 5 minutos a 72 °C. Los productos de amplificación fueron separados por electroforesis en geles de agarosa (TopVision™ Fermentas) al 1,6% (p/v) con buffer 0,5 x tris-buffer (TBE) y 2  $\mu\text{L}$  de GelRed™ (Biotum). La visualización de los fragmentos se realizó con luz ultravioleta (UV).

Los productos de PCR se purificaron con el kit QiAquick PCR Purification Kit (Qiagen, CA, EU), de acuerdo con las indicaciones del fabricante y se enviaron para la secuenciación a la compañía Macrogen (Corea del Sur). Los resultados de secuenciación se analizaron con el programa BioEdit Sequences Alignment Editor

2007® y se compararon mediante el programa BLASTn (NCBI 2011) con las secuencias depositadas en el banco de genes (GenBank).

La extracción del ADN en el Laboratorio de Técnicas Moleculares del CIPROC, se llevó a cabo mediante el método CTAB (Murray y Thompson 1985) y este se cuantificó mediante un espectrofotómetro BioPhotometer Plus 6132 (Eppendorf), y se llevó a una concentración final de 80 ng/μL. La reacción de PCR, la secuenciación del ADN y el análisis de resultados se realizó con los mismos imprimadores, reactivos y programa informático utilizados por el Laboratorio de Biotecnología de Plantas, de acuerdo con los protocolos específicos de cada laboratorio.

## **5. Pruebas de crecimiento *in vitro***

Una vez finalizados todos los muestreos en las empacadoras, se seleccionó nueve hongos que presentaron alta frecuencia en ambas zonas, los cuales fueron identificados previamente a nivel de género. Además, se seleccionó los dos hongos de micelio claro y tres hongos de micelio oscuro más frecuentes, que correspondieron a microorganismos agrupados en dos categorías definidas como hongos de micelio blanco (Hgblbp y Hgblbc) y una categoría de hongos de micelio oscuro (Hgosc) y que no presentaron esporulación en medio PDA + AI.

Con cada uno de estos hongos seleccionados se realizó una prueba de crecimiento *in vitro* en medio de cultivo PDA + AI, para lo que se tomó un disco de aproximadamente 0,5 cm<sup>2</sup> de PDA con el micelio de cada hongo, se colocó en el

centro de una placa Petri con el medio de cultivo, se almacenó en una incubadora a 18 °C, con un fotoperíodo de 12 h durante 6 días. Una vez transcurrido este tiempo, se evaluó el crecimiento de cada microorganismo de dos formas distintas detalladas a continuación:

Para un primer grupo constituido por siete de los hongos más frecuentes, se evaluó el porcentaje de cobertura del crecimiento del hongo por placa, debido a que por el tipo de esporulación, se produjo un patrón de crecimiento de colonias al azar sobre la superficie del medio, razón por la cual, la medición del diámetro de crecimiento no se consideró un buen indicador.

Para el segundo grupo que correspondió a los hongos de micelio blanco, de micelio oscuro y los géneros *Lasiodiplodia* y *Cladosporium*, se evaluó el diámetro mayor y diámetro menor de crecimiento de la colonia, y a partir de éstos se obtuvo un promedio de diámetro, metodología previamente utilizada en pruebas *in vitro* por Astúa *et al.* (1994), Hernández (2009) y Salazar (2010).

## **6. Relación de las poblaciones de hongos y el porcentaje de moho con diferentes variables climáticas**

Para realizar posteriormente un análisis de regresión en fruta procesada y sin procesar de ambas fincas, se seleccionó como variables dependientes para cada muestreo, los promedios de porcentaje de incidencia y porcentaje de moho en el pedúnculo, UFC/mL de hongos en la suspensión del pedúnculo y UFC/mL de hongos en la suspensión de cáscara, y como variables regresoras, la precipitación

acumulada (mm), el porcentaje de humedad relativa (%HR), la velocidad del viento (km/h), la temperatura promedio, máxima, mínima y la diferencia entre temperatura máxima y mínima ( $\Delta T$  °C). Para cada una de estas variables climáticas se utilizó el promedio o acumulado en el caso de la precipitación, de las primeras dos semanas de desarrollo de la fruta en el campo, una, dos y tres semanas antes de la cosecha y el promedio o acumulado en las 20 semanas de desarrollo de la fruta en el campo, el cual corresponde al tiempo promedio de desarrollo de la fruta en ambas fincas.

## **7. Análisis estadístico**

Los datos de las poblaciones de hongos fueron transformados a  $\log_{10}(x+1)$  para facilitar la visualización de las tendencias de las mismas durante el año de estudio.

En el análisis estadístico se incluyó el total de datos de los doce muestreos para cada fase de la empacadora muestreada. Se utilizó una prueba de F para comparar las varianzas de las poblaciones de hongos en los diferentes sustratos o procesos, de acuerdo con la siguiente agrupación por finca: agua vs cera, pedúnculo de fruta procesada vs pedúnculo de fruta sin procesar al momento de la cosecha y a los 22 días de almacenamiento, cáscara de fruta procesada y sin procesar al momento de la cosecha y a los 22 días de almacenamiento y porcentaje de moho en fruta procesada vs sin procesar. Una vez comparadas las varianzas, se aplicó una prueba de t de Student para muestras independientes,

suponiendo varianzas iguales o desiguales y se comparó las medias de acuerdo con la misma agrupación utilizada para la prueba de F.

Se realizó un análisis de frecuencia de recuperación de los hongos, bacterias y levaduras. Para esto, se contabilizó el número de placas Petri con medio de cultivo en las que se registró cada género o especie de microorganismo y se dividió entre el total de placas Petri de todas las fases de procesamiento muestreadas en ambas fincas. Con base en este análisis, se escogió y se graficó los cinco hongos más frecuentes y dentro del grupo de levaduras y bacterias, las cuatro más frecuentes. Se realizó este mismo análisis con el total de muestras para cada fase de procesamiento.

Para los resultados de las pruebas de crecimiento *in vitro* se realizó un análisis de varianza y la separación de medias a través de la prueba de diferencia mínima significativa (DMS) al 5% con el programa estadístico Infostat, versión 2012.

Con los datos de clima como variables regresoras y las poblaciones de hongos en la fruta y el porcentaje de moho como variables dependientes, se realizó un total de 630 regresiones lineales para cada finca, mediante el programa estadístico Infostat, versión 2012 y se seleccionó aquellas que presentaron un  $R^2$  ajustado igual o mayor a 0,6.

## RESULTADOS

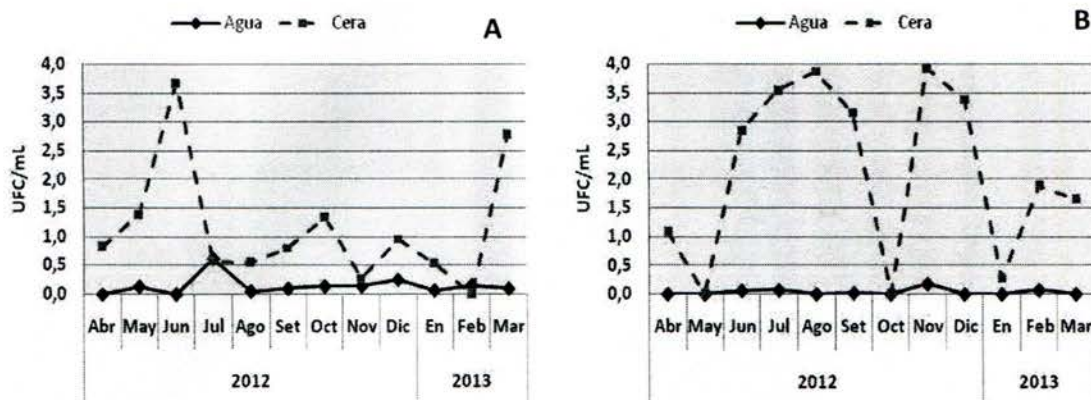
### 1. Poblaciones de hongos, bacterias y levaduras en diferentes etapas del proceso poscosecha de la piña

#### 1.1 Hongos

##### *1.1.1 Aguas de lavado-desinfección y cera*

En la figura 1 se observa que las poblaciones de hongos en la cera utilizada durante el proceso poscosecha de ambas zonas fueron mayores que las del agua de lavado-desinfección en la mayoría de los muestreos, y los valores más altos en cera se alcanzaron en Puntarenas en los meses de junio de 2012 y marzo de 2013, y en Sarapiquí en agosto y noviembre de 2012.

Al comparar entre ambas zonas se observa que en Sarapiquí, las poblaciones de hongos en la cera en los meses de julio a diciembre de 2012 tendieron a ser mayores que en Puntarenas, con excepción de octubre que presentó un valor de cero UFC/mL en Sarapiquí.

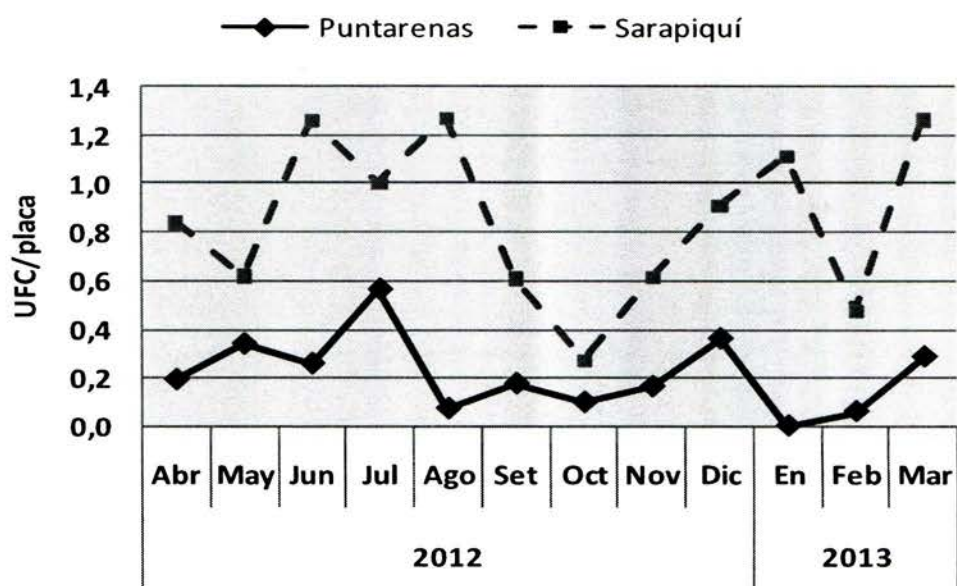


\*Datos transformados a  $\log_{10}(x+1)$

**Figura 1.** Promedio mensual de UFC de hongos/mL en aguas de lavado-desinfección y cera de las fincas de Puntarenas (A) y Sarapiquí (B).

### 1.1.2 Aire de las cámaras de enfriamiento y almacenamiento

Las poblaciones de hongos por placa, capturadas en el aire de las cámaras de enfriamiento fueron mayores durante todo el intervalo de evaluación en la zona de Sarapiquí que en Puntarenas, alcanzándose las cantidades más altas en los meses de junio y agosto de 2012 y enero y marzo de 2013 con valores cercanos a 1,3 UFC/placa (17,3 UFC, dato sin transformar), mientras que en esos mismos meses en Puntarenas se obtuvo valores menores a 0,3 UFC/placa (0,9 UFC, dato sin transformar) (Figura 2).



\*Datos transformados a  $\log_{10}(x+1)$ .

**Figura 2.** Promedio mensual de UFC de hongos recuperados por placa Petri con PDA + Al, en muestreos del aire de las cámaras de enfriamiento de las fincas de Puntarenas y Sarapiquí.

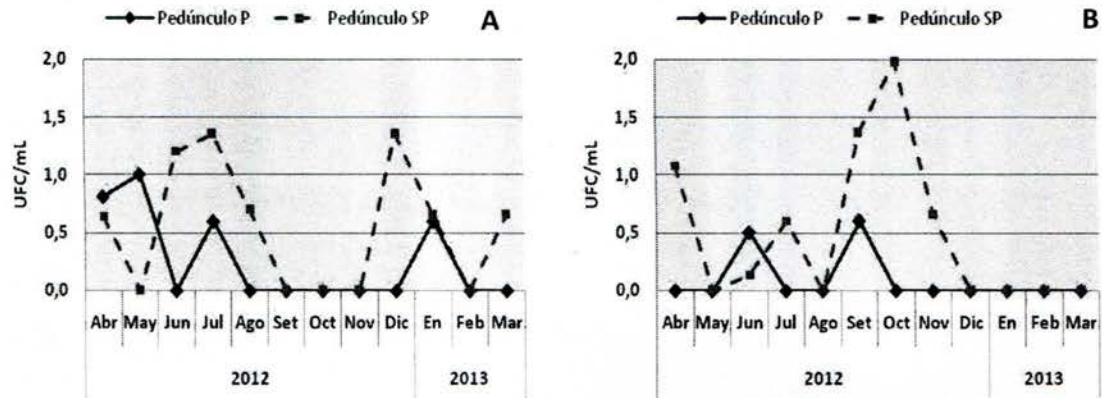
### 1.1.3 Pedúnculo y cáscara de fruta procesada y sin procesar

#### 1.1.3.1 Pedúnculo

Las poblaciones de hongos en el pedúnculo de fruta recién cosechada, procesada y sin procesar presentaron variaciones durante el año, con valores registrados entre 0 y 1,5 UFC/mL de suspensión en Puntarenas y entre 0 y 2 UFC/mL en Sarapiquí, como se muestra en la Figura 3. A pesar de no observarse una tendencia definida en el comportamiento de estas poblaciones a lo largo del año evaluado, de los meses en que se registró crecimiento de hongos, se obtuvo solamente 2 de 8 muestreos en Puntarenas y 1 de 6 muestreos en Sarapiquí, en



que la población en fruta procesada fue mayor que en fruta sin procesar. En el resto de los muestreos se registró 0 UFC/mL en ambos tipos de fruta muestreada (Figura 3).



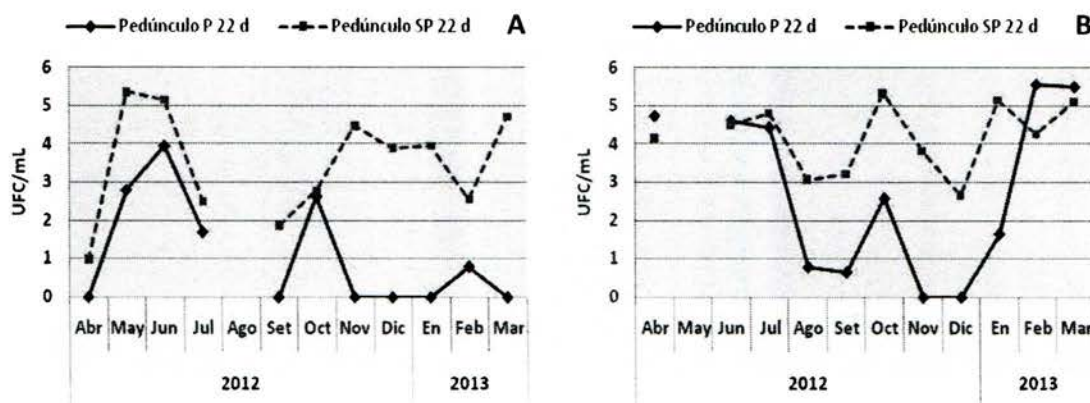
\*Datos transformados a  $\log_{10}(x+1)$

**Figura 3.** Promedio mensual de UFC de hongos/mL de la suspensión de pedúnculo de fruta recién cosechada, procesada (P) y sin procesar (SP) de las fincas de Puntarenas (A) y Sarapiquí (B).

Las poblaciones de hongos en el pedúnculo, en ambas fincas después de 22 días de almacenamiento de la fruta procesada y sin procesar (Figura 4), fueron mayores que las presentes al momento de la cosecha (Figura 3), con valores que van desde 0,7 hasta 5,5 UFC/mL.

Al comparar ambas zonas, a los 22 días de almacenamiento se observa que en la mayoría de los muestreos, las poblaciones de hongos en el pedúnculo sin procesar tendieron a ser mayores que en el pedúnculo procesado, con excepción de los meses de octubre de 2012 en Puntarenas y abril y junio de 2012 y febrero y marzo de 2013 en Sarapiquí.

Al igual que al momento de la cosecha, después de 22 días de almacenamiento, las poblaciones de hongos en el pedúnculo presentaron variaciones durante el año de estudio, donde los valores más altos de UFC/mL se registraron en fruta SP de Puntarenas en los meses de mayo, junio y noviembre de 2012 y marzo de 2013, con valores entre 4,73 y 5,38 UFC/mL, mientras que en Sarapiquí, los valores más altos alcanzados en fruta procesada y sin procesar, estuvieron entre 4 y 5,58 UFC/mL en los meses de abril, junio y julio de 2012 y febrero y marzo de 2013.



\*Datos transformados a  $\log_{10}(x+1)$

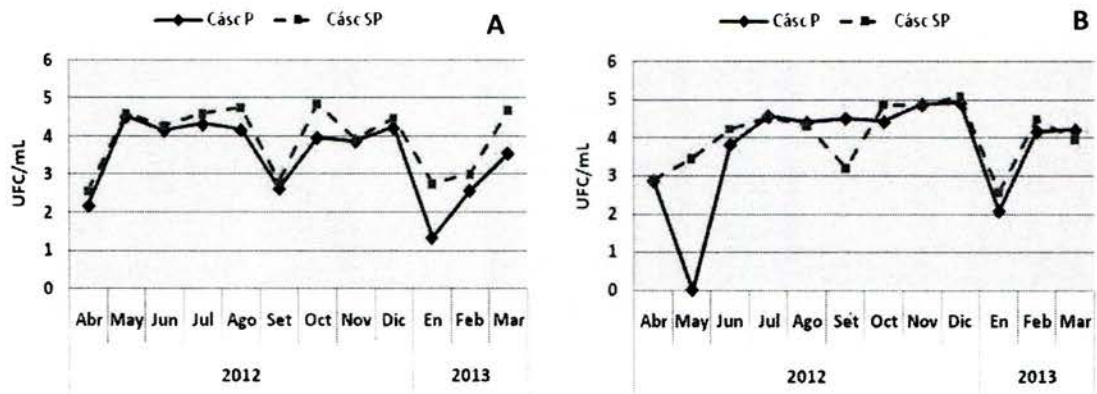
Datos de agosto en Puntarenas y mayo en Sarapiquí no disponibles.

**Figura 4.** Promedio mensual de UFC de hongos/mL de la suspensión de pedúnculo de fruta procesada (P) y sin procesar (SP) de las fincas de Puntarenas (A) y Sarapiquí (B), después de 22 días de almacenamiento.

### 1.1.3.2 Cáscara

En la figura 5 se muestra una población de hongos similar en la cáscara de fruta recién cosechada, procesada y sin procesar de ambas zonas, con excepción del mes de enero de 2013 en Puntarenas, donde la población en fruta procesada fue menor que en fruta sin procesar y en mayo de 2012 en Sarapiquí, donde no se recuperó hongos en la cáscara de fruta procesada y en la fruta sin procesar se obtuvo 3,5 UFC/mL. En general, en ambas fincas la mayoría de los valores obtenidos se mantuvo entre 2 y 5 UFC/mL.

La población de hongos en la cáscara de fruta recién cosechada fue mayor que en el pedúnculo (Figuras 3 y 5) en ambas zonas, y se observó esta misma tendencia a lo largo de todos los muestreos, tanto en fruta procesada como sin procesar.

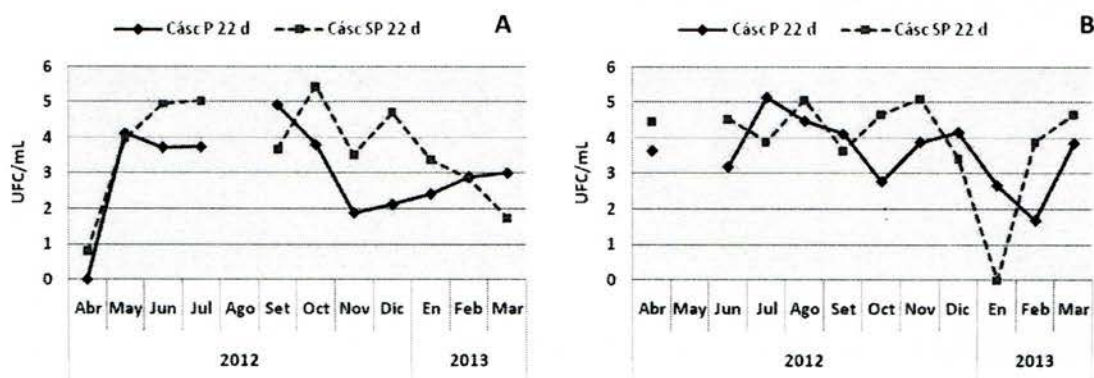


\*Datos transformados a  $\log_{10}(x+1)$ .

**Figura 5.** Promedio mensual de UFC de hongos/mL de la suspensión de cáscara de fruta recién cosechada, procesada (P) y sin procesar (SP) de las fincas de Puntarenas (A) y Sarapiquí (B).

La figura 6A, correspondiente a las poblaciones en cáscara después del almacenamiento, muestra en Puntarenas épocas del año, junio y julio de 2012 y de octubre de 2012 a enero de 2013, en que la población de hongos en la cáscara de fruta procesada fue menor que en fruta sin procesar. En Sarapiquí (Figura 6B), no se presentó este mismo comportamiento, sino que solamente en algunos meses del año, abril, junio, octubre y noviembre de 2012 y febrero y marzo de 2013, la población en fruta procesada fue menor que en fruta sin procesar.

En general, la población de hongos en la cáscara de fruta almacenada durante 22 días de Puntarenas (Figura 6A), tendió a ser menor en los meses de final e inicio de año, tal como se observa en los resultados obtenidos entre los meses de noviembre de 2012 y marzo de 2013 y en el primer muestreo realizado en abril de 2012, donde se obtuvo los valores más bajos de 0 UFC/mL en fruta procesada y 0,8 UFC/mL en fruta sin procesar. En Sarapiquí (Figura 6B), la población de hongos se mantuvo entre 2,79 y 5 UFC/mL durante todos los muestreos, desde abril hasta diciembre de 2012 y en marzo de 2013.



\*Datos transformados a  $\log_{10}(x+1)$

Datos de agosto en Puntarenas y mayo en Sarapiquí no disponibles

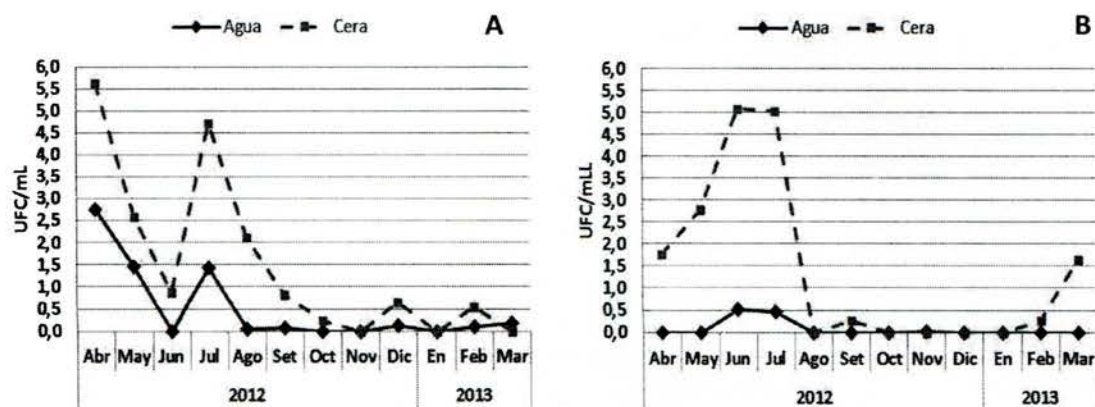
**Figura 6.** Promedio mensual de UFC de hongos/mL de la suspensión de cáscara de fruta procesada (P) y sin procesar (SP) de las fincas de Puntarenas (A) y Sarapiquí (B), después de 22 días de almacenamiento.

## 1.2 Levaduras y bacterias

### 1.2.1 Aguas de lavado-desinfección y cera

La figura 7 muestra poblaciones de bacterias y levaduras menores en agua que en cera en los muestreos en que hubo crecimiento. En el agua de las pilas de lavado de Puntarenas (Figura 7A), solamente se registró crecimiento de estos microorganismos en abril, mayo y julio de 2012, con valores entre 1,5 y 2,8 UFC/mL, mientras que en Sarapiquí (Figura 7B), solamente se registró crecimiento en junio y julio de 2012, con 0,5 UFC/mL en cada mes.

En la cera de Puntarenas (Figura 7A) se obtuvo una mayor población de bacterias y levaduras en el período comprendido entre abril y setiembre de 2012, con los valores más altos en los meses de mayo y julio de 2012, de 5,7 y 4,7 UFC/mL respectivamente. En Sarapiquí (Figura 7B), se recuperó bacterias y levaduras en cera entre abril y julio de 2012, con los valores máximos en junio y julio de 5 UFC/mL y en el resto del año no hubo crecimiento o este fue menor a 0,5 UFC/mL, con excepción de marzo de 2013, donde se registró 1,6 UFC/mL en promedio.

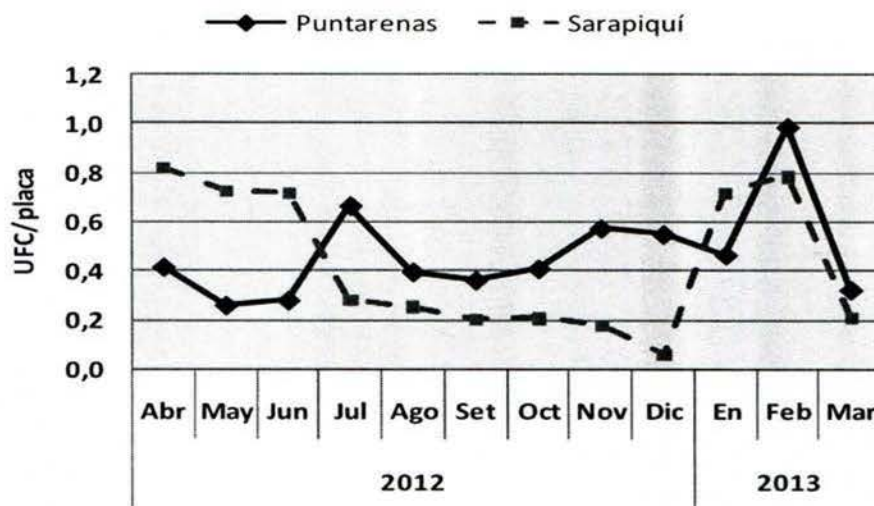


\*Datos transformados a  $\log_{10}(x+1)$

**Figura 7.** Promedio mensual de UFC de levaduras y bacterias/mL en aguas de lavado-desinfección y cera de las fincas de Puntarenas (A) y Sarapiquí (B).

### 1.2.2 Aire de las cámaras de enfriamiento

En la figura 8 se observa que las poblaciones de levaduras y bacterias registradas fueron iguales o menores a 1 UFC/placa en ambas zonas, con una época del año, de abril a junio de 2012, en que las poblaciones en Sarapiquí fueron mayores que en Puntarenas y una segunda época, de julio a diciembre de 2012, en que ocurrió lo contrario. En el 2013, las poblaciones fueron semejantes en ambas zonas, con valores entre 0,46 y 1 UFC/mL.



\*Datos transformados a  $\log_{10}(x+1)$

**Figura 8.** Promedio mensual de UFC de levaduras y bacterias recuperadas por placa Petri con PDA + AI, en muestreos del aire de las cámaras de enfriamiento de las fincas de Puntarenas y Sarapiquí.

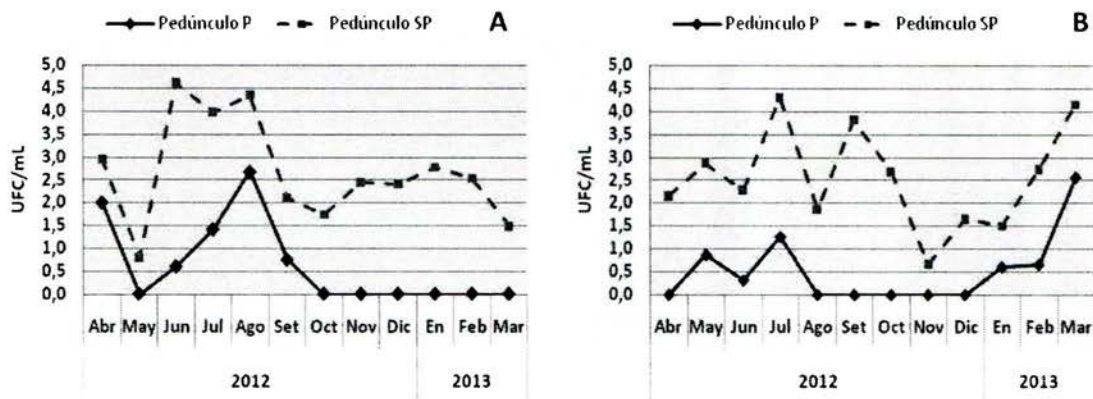
### 1.2.3 Pedúnculo y cáscara de fruta procesada y sin procesar

#### 1.2.3.1 Pedúnculo

La población de levaduras y bacterias en fruta recién cosechada fue mayor en el pedúnculo sin procesar que procesado, en todos los muestreos de ambas zonas (Figura 9). En la fruta procesada de Puntarenas (Figura 9A), la población se incrementó desde junio con 0,6 UFC/mL hasta agosto de 2012 con un máximo de 2,7 UFC/mL y luego disminuyó y se mantuvo en 0 UFC/mL entre octubre de 2012 y marzo de 2013. La fruta sin procesar presentó los valores más altos de hasta 4,5 UFC/mL entre junio y agosto de 2012 y luego tendió a disminuir y mantenerse entre setiembre de 2012 y marzo de 2013 en poblaciones entre 1,5 y 2,8 UFC/mL.

A partir del pedúnculo de fruta procesada de Sarapiquí (Figura 9B), se registró crecimiento de bacterias y levaduras en dos épocas del año, de mayo a julio de 2012 y de enero a marzo de 2013, mientras que en el pedúnculo de fruta sin procesar se registró crecimiento durante todos los muestreos, alcanzándose los valores más altos en julio y setiembre de 2012 y marzo de 2013, con valores entre 3,9 y 4,4 UFC/mL.

Las poblaciones de levaduras y bacterias en el pedúnculo al momento de la cosecha (Figura 9) en ambas zonas, tendieron a ser mayores que las poblaciones de hongos (Figura 3), ya que las primeras alcanzaron valores de hasta 4,6 UFC/mL, mientras que el valor máximo obtenido en hongos fue de 2 UFC/mL.

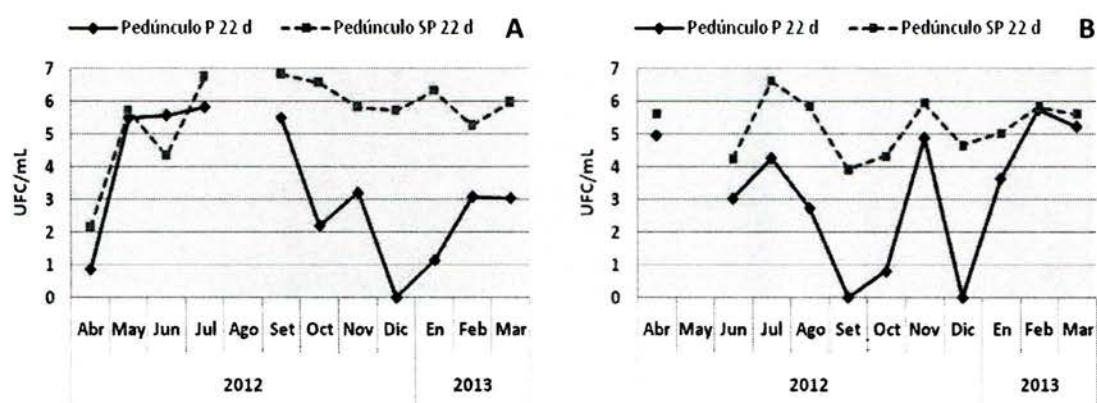


\*Datos transformados a  $\log_{10}(x+1)$

**Figura 9.** Promedio mensual de UFC de levaduras y bacterias/mL de suspensión de pedúnculo de fruta recién cosechada, procesada (P) y sin procesar (SP) de las fincas de Puntarenas (A) y Sarapiquí (B).



En la figura 10 que muestra las poblaciones de levaduras y bacterias en el pedúnculo después de 22 días de almacenamiento, se observa una mayor cantidad de estos microorganismos en fruta sin procesar que en la procesada, con excepción de junio de 2012 en Puntarenas y febrero de 2013 en Sarapiquí. Se obtuvo una mayor variación durante el año en los valores promedio de la fruta procesada, con una tendencia a disminuir en Puntarenas desde 5,5 UFC/mL en setiembre de 2012, hasta 0 UFC/mL en diciembre de ese mismo año, mientras que en Sarapiquí la reducción se observó desde abril de 2012 con 5 UFC/mL hasta setiembre del mismo año con 0 UFC/mL. A su vez, la variación en las poblaciones de la fruta sin procesar fue menor durante el año de estudio, manteniéndose en Puntarenas desde julio de 2012, hasta marzo de 2013 entre 5,3 y 6,8 UFC/mL y en Sarapiquí entre 3,9 y 6,6 UFC/mL durante todo el periodo de evaluación.



\*Datos transformados a  $\log_{10} (x+1)$

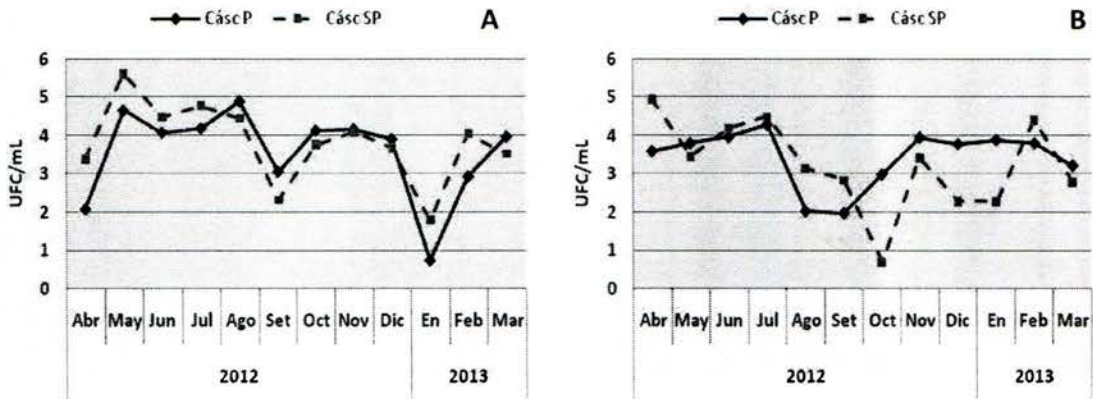
Datos de agosto de 2012 en Puntarenas y mayo de 2012 en Sarapiquí no disponibles.

**Figura 10.** Promedio mensual de UFC de levaduras y bacterias/mL de la suspensión de pedúnculo de fruta procesada (P) y sin procesar (SP) de las fincas de Puntarenas (A) y Sarapiquí (B), después de 22 días de almacenamiento.

### **1.2.3.2 Cáscara**

El promedio de población de levaduras y bacterias en la cáscara de fruta recién cosechada (Figura 11), procesada y sin procesar de la finca de Puntarenas fue similar, con los valores más bajos entre 0,7 y 3,4 UFC/mL en abril y setiembre de 2012 y enero de 2013. En Sarapiquí, la población de estos microorganismos fue menor en fruta sin procesar que en fruta procesada en el período comprendido entre octubre de 2012 y enero de 2013, mientras que de mayo a julio de 2012 se obtuvo entre 3,4 y 4,5 UFC/mL en ambos tipos de fruta. Estos resultados muestran que en ambas zonas, el proceso poscosecha no generó diferencias importantes en la disminución de las poblaciones de levaduras y bacterias en fruta recién cosechada.

Al comparar estas poblaciones en cáscara con las presentes en el pedúnculo al momento de la cosecha (Figura 9), se observa que tendió a ser mayor la población en cáscara que en el pedúnculo de fruta procesada en ambas zonas, ya que las poblaciones en cáscara presentaron promedios de hasta 4,9 UFC/mL, mientras que en el pedúnculo se obtuvo como máximo 2,7 UFC/mL en Agosto de 2012 en Puntarenas.

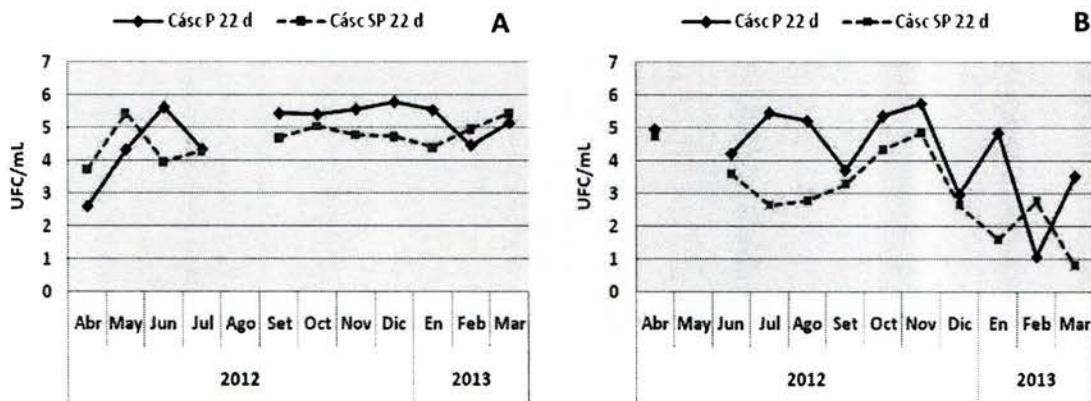


\*Datos transformados a  $\log_{10}(x+1)$

**Figura 11.** Promedio mensual de UFC de levaduras y bacterias/mL de suspensión de cáscara de fruta recién cosechada, procesada (P) y sin procesar (SP), de las fincas de Puntarenas (A) y Sarapiquí (B).

Como se muestra en la figura 12, las poblaciones de levaduras y bacterias en la cáscara después de 22 días de almacenamiento presentaron menos variaciones durante el año en Puntarenas que en Sarapiquí, donde estas tendieron a disminuir entre noviembre de 2012 y marzo de 2013, tanto en fruta procesada como sin procesar, hasta alcanzar un mínimo de 1 UFC/mL, mientras que en Puntarenas, durante la mayor parte del período de evaluación se mantuvieron entre 4 y 6 UFC/mL.

Se destaca además, que durante la mayoría de los muestreos (7 de 12 en Puntarenas y 10 de 12 en Sarapiquí), la población de levaduras y bacterias en fruta procesada fue igual o mayor que en fruta sin procesar.



\*Datos transformados a  $\log_{10}(x + 1)$

Datos de agosto en Puntarenas y mayo en Sarapiquí no disponibles

**Figura 12.** Promedio mensual de UFC de levaduras y bacterias/mL de suspensión de cáscara de fruta procesada (P) y sin procesar (SP), de las fincas de Puntarenas (A) y Sarapiquí (B), después de 22 días de almacenamiento.

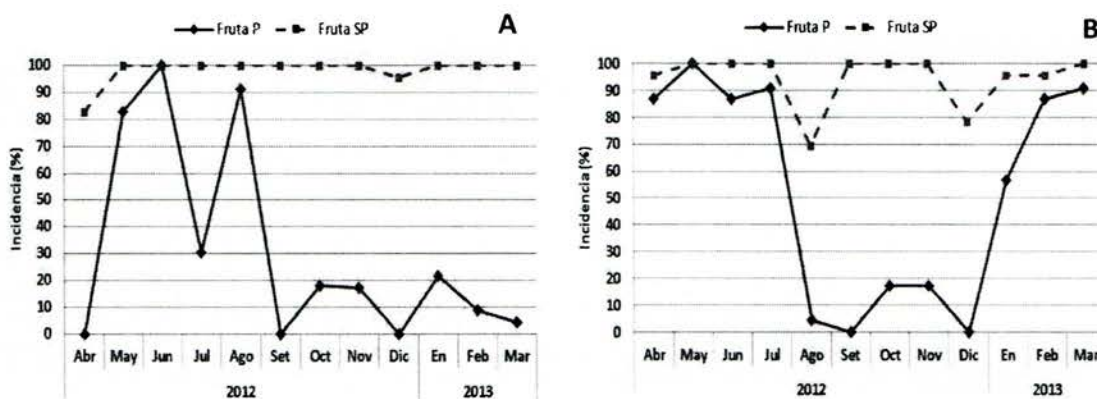
## 2. Incidencia y severidad de moho en pedúnculo de fruta procesada y sin procesar

### 2.1 Incidencia

La figura 13 muestra la incidencia de moho por mes en el pedúnculo de la fruta de las fincas de Puntarenas y Sarapiquí. Se obtuvo una incidencia cercana o igual al 100% en fruta sin procesar durante la mayoría de los muestreos en ambas zonas, con excepción de abril de 2012 en Puntarenas y agosto y diciembre de ese mismo año en Sarapiquí.

La mayor incidencia de moho en fruta procesada de Puntarenas se presentó en los meses de mayo a agosto de 2012, con valores entre 30% y 100%,

mientras que en Sarapiquí, la mayor incidencia se registró en los meses de abril a julio de 2012 y febrero a marzo de 2013, con valores entre 87% y 100%. En las dos zonas de estudio, en los meses de setiembre a diciembre de 2012 se obtuvo valores bajos de menos del 20% de incidencia en la fruta procesada, comportamiento que se mantuvo en Puntarenas hasta marzo de 2013, mientras que en Sarapiquí tendió a aumentar a partir de enero y hasta marzo de 2013, donde se alcanzó una incidencia del 90%.

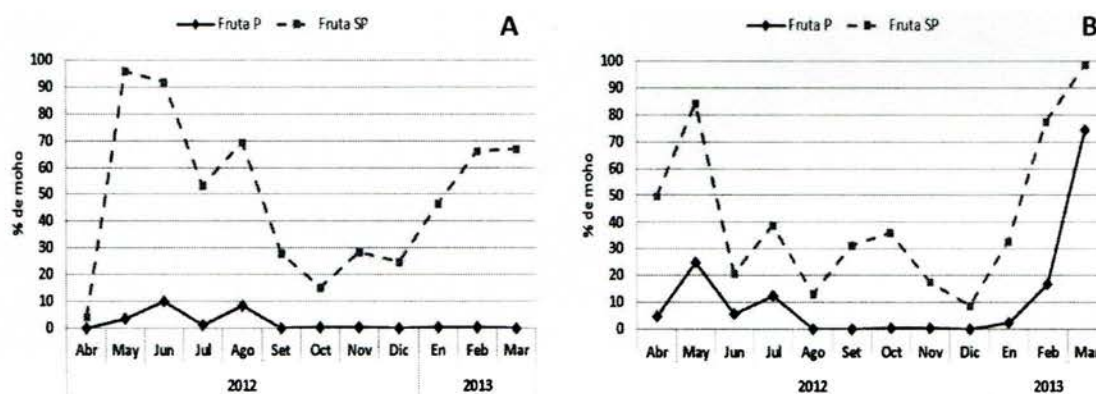


**Figura 13.** Incidencia de moho en el pedúnculo de frutos de piña procesada (P) y sin procesar (SP) de las fincas de Puntarenas (A) y Sarapiquí (B), después de 22 días de almacenamiento.

## 2.2 Severidad

La cantidad de moho en el pedúnculo de la fruta sin procesar fue mayor que en la fruta procesada en todos los meses para ambas zonas (Figura 14). En Puntarenas, el máximo porcentaje obtenido en fruta procesada fue del 10% en los meses de junio y agosto de 2012 y en el resto del año, el promedio se mantuvo

entre 0,04 y 0,96 %, con excepción de abril, setiembre y diciembre de 2012, donde no hubo desarrollo de moho. A su vez, en Sarapiquí se obtuvo los mayores porcentajes de moho en fruta procesada, entre 5% y 25% en los meses de abril a julio de 2012, y en el 2013 se registró un aumento a partir de enero, hasta alcanzar un máximo de 75% en el mes de marzo. En el resto de los muestreos, se obtuvo entre 0,04 y 0,48%, con excepción de setiembre y diciembre de 2012, donde no hubo desarrollo de moho.



**Figura 14.** Porcentaje de moho en el pedúnculo de frutos de piña procesada (P) y sin procesar (SP) de las fincas de Puntarenas (A) y Sarapiquí (B), después de 22 días de almacenamiento.

En la figura 15 se complementa la información de incidencia y severidad, con imágenes de los diferentes tipos de moho que crecieron sobre la superficie del pedúnculo en ambas zonas de estudio.



**Figura 15.** Crecimiento de diferentes tipos de moho en el pedúnculo de frutos de piña, provenientes de las fincas de Puntarenas y Sarapiquí.

### **3. Comparación estadística de las poblaciones de microorganismos y el porcentaje de moho en el pedúnculo**

Los cuadros 1 y 2 muestran el análisis estadístico mediante pruebas de F y t para las poblaciones de hongos, levaduras y bacterias en el pedúnculo y la cáscara, y el porcentaje de moho en las fincas de Puntarenas y Sarapiquí, tanto para la fruta procesada (P) como sin procesar (SP), a la cosecha y luego de 22 días de almacenamiento.

En Puntarenas, ni la población de hongos, ni la de levaduras y bacterias en el pedúnculo de fruta recién cosechada, presentó diferencias significativas entre fruta procesada (P) y sin procesar (SP), mientras que en Sarapiquí, solamente la población de levaduras y bacterias fue mayor en fruta SP que en fruta P. Después de 22 días de almacenamiento, la población de hongos, levaduras y bacterias en el pedúnculo de Puntarenas fue menor en fruta P que en SP, mientras que en Sarapiquí se encontró diferencias significativas únicamente en la población de levaduras y bacterias en este tejido, con un promedio aproximadamente seis veces mayor en fruta SP.

Aunque el análisis estadístico no compara específicamente entre zonas, el promedio de la población de hongos en el pedúnculo fue mayor en Sarapiquí que en Puntarenas luego de 22 días de almacenamiento de la fruta, y esto se reflejó en un mayor porcentaje de moho en fruta procesada, donde se obtuvo un 11,6% en Sarapiquí y fue de un 2,1% en Puntarenas (Cuadro 1).



En la cáscara, solamente se obtuvo diferencias significativas en fruta recién cosechada, donde la población de hongos de Puntarenas y la de levaduras y bacterias en Sarapiquí, fue mayor en fruta SP que en fruta P.

En la cáscara, la población de hongos presentó diferencias significativas únicamente en fruta recién cosechada de Puntarenas y fue mayor en fruta sin procesar, y en la población de levaduras y bacterias, solamente se obtuvo diferencias significativas en fruta recién cosechada de Sarapiquí, donde la población fue mayor en fruta que no recibió procesamiento poscosecha.

Aunque no se obtuvo diferencias estadísticas significativas entre las UFC de hongos en el pedúnculo de fruta procesada y sin procesar de Sarapiquí, tanto a la cosecha como luego de 22 días de almacenamiento, en las figuras 3 y 4 se observó durante varios meses del año poblaciones promedio más altas en la fruta sin procesar, lo cual coincidió con un promedio mayor en la población de hongos de la fruta que no recibió tratamiento poscosecha (Cuadro 1). Una situación similar a nivel estadístico ocurrió con las poblaciones de levaduras y bacterias en el pedúnculo de fruta recién cosechada de Puntarenas, donde se obtuvo un promedio de UFC mayor durante el año de estudio en fruta sin procesar (Figura 9), mientras que en la cáscara de la fruta de Sarapiquí luego de 22 días de almacenamiento, se obtuvo poblaciones más altas durante la mayoría de los muestreos en la fruta procesada (Figura 12), lo cual se reflejó en un promedio mayor para este tejido (Cuadro 1), en comparación con la fruta que no recibió procesamiento poscosecha.

En ambas fincas, la población de todos los microorganismos muestreados fue mayor en cera, que en aguas de lavado-desinfección, con diferencias importantes, ya que en hongos se obtuvo como máximo 6,4 UFC/mL en agua de Puntarenas, mientras que los promedios en cera fueron de 4.747,2 UFC/mL en Puntarenas y 12.737,4 UFC/mL en Sarapiquí.

**Cuadro 1.** Comparación estadística entre los promedios de UFC de hongos en la fruta, agua y cera, y el porcentaje de moho en el pedúnculo de fruta procesada (P) y sin procesar (SP), de las fincas de Puntarenas y Sarapiquí.

Variables	Puntarenas			Sarapiquí		
	Promedio	P (F)	P (t)	Promedio	P (F)	P (t)
UFC/mL pedúnculo P cosecha	2.213,8 a	$1,5 \times 10^{-19}$	0,52	19,2 a	0,002	0,08
UFC/mL pedúnculo SP cosecha	950,3 a			707,3 a		
UFC/mL pedúnculo P 22 d	16.181,8 b	$6,8 \times 10^{-9}$	0,0003	100.318,2 a	0,35	0,33
UFC/mL pedúnculo SP 22 d	76.727,3 a			134.139,4 a		
UFC/mL cásc P cosecha	28.638,3 b	$2,1 \times 10^{-8}$	0,02	61.610,1 a	$1,11 \times 10^{-5}$	0,12
UFC/mL cásc SP cosecha	72.514,3 a			97.504,3 a		
UFC/mL cásc P 22 d	211.454,6 a	0,008	0,84	92.833,3 a	$2,39 \times 10^{-9}$	0,15
UFC/mL cásc SP 22 d	184.727,3 a			166.000,0 a		
UFC/mL agua	6,4 b	0	$2,2 \times 10^{-9}$	0,2 b	0	$2,3 \times 10^{-17}$
UFC/mL cera	4.747,2 a			12.737,4 a		
% moho fruta P 22 d	2,1 b	0	$3,2 \times 10^{-62}$	11,6 b	$1,7 \times 10^{-13}$	$1,5 \times 10^{-27}$
% moho fruta SP 22 d	48,9 a			42,5 a		

**Cuadro 2.** Comparación estadística entre los promedios de UFC de levaduras y bacterias en la fruta, agua y cera, de las fincas de Puntarenas y Sarapiquí.

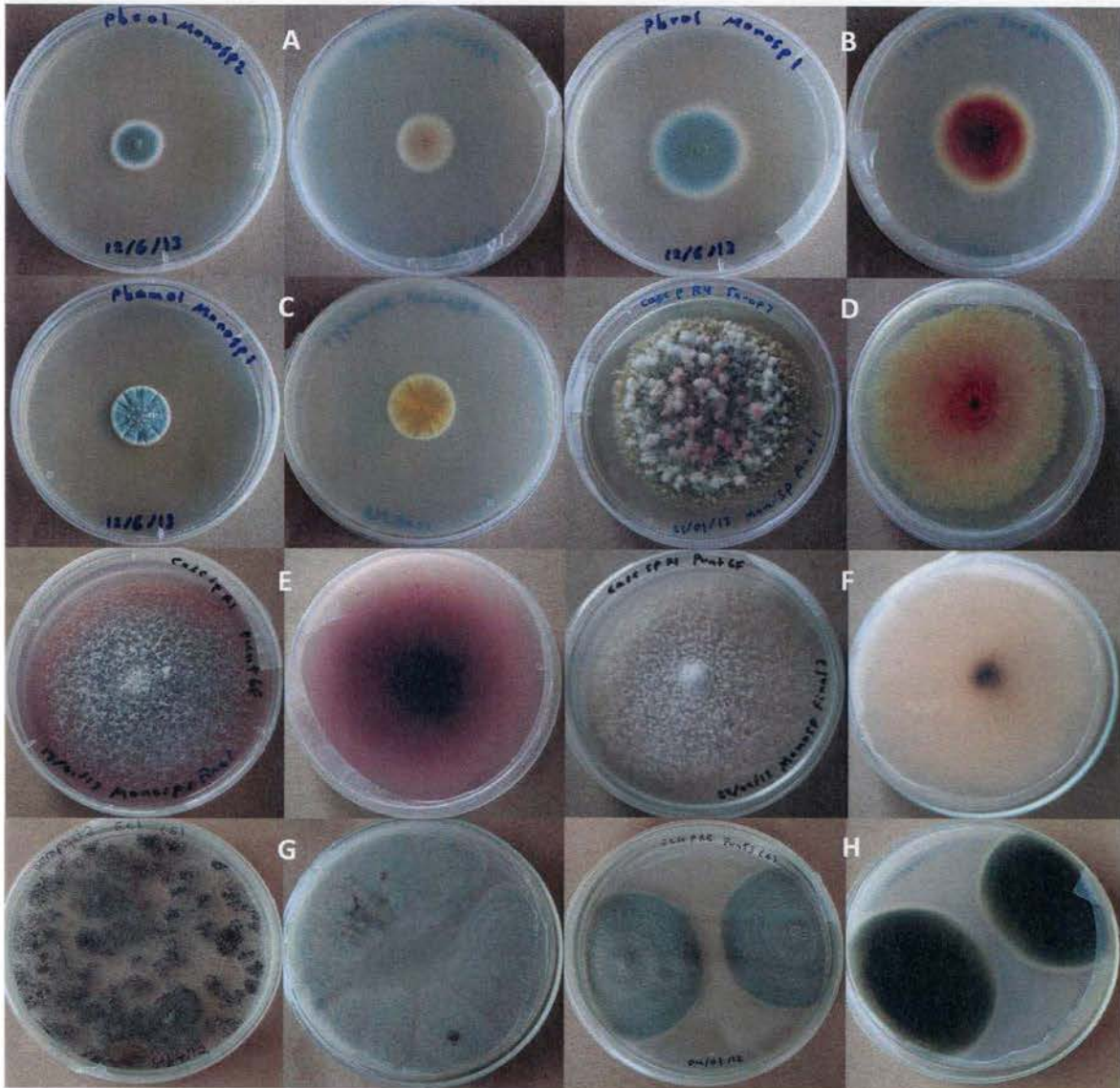
Variables	Puntarenas			Sarapiquí		
	Promedio	P (F)	P (t)	Promedio	P (F)	P (t)
UFC/mL pedúnculo P cosecha	11.888,2 a	$3,07 \times 10^{-6}$	0,48	522,5 b	0	0,005
UFC/mL pedúnculo SP cosecha	17.565,3 a			15.033,8 a		
UFC/mL pedúnculo P 22 d	415.636,4 b	0	$3,9 \times 10^{-5}$	179.616,7 b	0	$2,77 \times 10^{-5}$
UFC/mL pedúnculo SP 22 d	2.533.636,4 a			1.073.311,5 a		
UFC/mL cásc P cosecha	45.655,7 a	0	0,15	13.226,1 b	$1,08 \times 10^{-12}$	0,018
UFC/mL cásc SP cosecha	158.382,7 a			27.147,1 a		
UFC/mL cásc P 22 d	369.272,7 a	$6,66 \times 10^{-16}$	0,61	298.200 a	0	0,12
UFC/mL cásc SP 22 d	288.545,5 a			51.133,3 a		
UFC/mL agua	1.996,1 b	0	$8,33 \times 10^{-5}$	0,74 b	0	$4,77 \times 10^{-9}$
UFC/mL cera	156.854,3 a			24.500 a		

#### 4. Identificación morfológica y molecular de los microorganismos

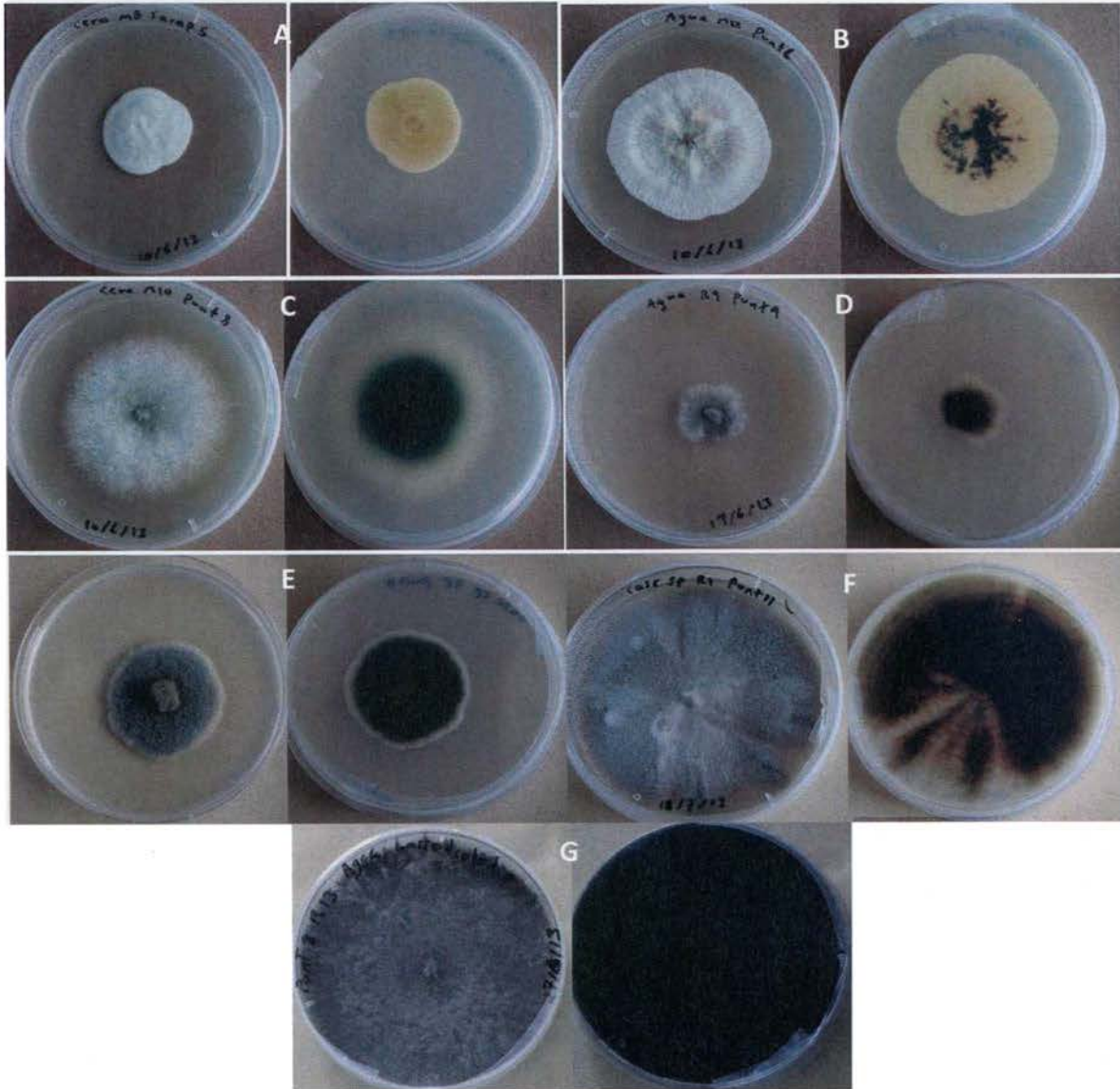
En el cuadro 3 se presenta la descripción de la coloración y forma de las colonias de los hongos más frecuentes recuperados e identificados morfológica y molecularmente en las diferentes fases de procesamiento en las empacadoras de las dos zonas de estudio. Para las especies identificadas molecularmente, se indica entre paréntesis el porcentaje de similitud con las secuencias genéticas y el número de accesoión del GenBank. La información se complementa con fotografías que muestran la superficie y reverso de las colonias de estos microorganismos creciendo en medio de cultivo PDA + AI (Figuras 16 y 17).

**Cuadro 3.** Descripción de los hongos más frecuentes recuperados en las distintas fases de procesamiento muestreadas en las fincas de Puntarenas y Sarapiquí.

<b>Código/Identificación (número de accesión)</b>	<b>Descripción del hongo</b>
<i>Penicillium diversum</i> (99%-HM 469392.1)	Micelio verde, de colonia lisa con el borde blanco y redondeado; el reverso de esta con poca pigmentación. Abundante esporulación
<i>Penicillium purpureogenum</i> (100%-GU 566198.1)	Micelio verde, de colonia lisa con el borde blanco y redondeado, cuyo reverso presenta fuerte pigmentación de color rojizo. Abundante esporulación
Pba01 ( <i>Penicillium citrinum</i> , <i>P. griseofulvum</i> ) (100% JQ 316514.1/ 100% EU 497956.1)	Micelio verde, colonia con formación de surcos radiales, el borde blanco y redondeado y cuyo reverso presenta pigmentación amarilla. Abundante esporulación
<i>Talaromyces calidicanus</i> (99% NR_103665.1)	Micelio verde y rojizo, con proyecciones superficiales de hifas y conidióforos que pueden alcanzar el borde superior de la placa Petri; colonia de borde irregular, cuyo reverso presenta una pigmentación rojiza. Abundante esporulación
<i>Fusarium proliferatum</i> (100% EU 821492.1)	Micelio blanco, con el borde de la colonia redondeado, esta adquiere una coloración púrpura al madurar, principalmente en el reverso de la misma. Abundante esporulación
<i>Fusarium</i> sp.	Micelio blanco, con el borde de la colonia redondeado; esta adquiere una coloración anaranjada al madurar, principalmente en el reverso de la misma. Abundante esporulación
<i>Cladosporium</i> sp.	Micelio verde oscuro, con el borde de la colonia redondeado, cuyo reverso presenta una tonalidad de verde oscuro a negro. Abundante esporulación
<i>Aspergillus aculeatus</i> (100% EU 833205.1)	Micelio negro, con abundantes conidióforos, colonia de borde irregular cuyo reverso presenta poca pigmentación
Hgblbc	Micelio blanco algodonoso, con el borde de la colonia redondeado o irregular y reverso de la misma con poca pigmentación. Poca esporulación o del todo ausente
Hgblbp	Hongos de micelio blanco algodonoso, con el borde de las colonias redondeado o irregular y reverso de las mismas con fuerte pigmentación verde oscuro o negro. Poca esporulación o del todo ausente
Hgosc	Hongos de micelio oscuro, con el borde de las colonias redondeado o irregular y reverso de las mismas con fuerte pigmentación color negro. Poca esporulación o del todo ausente



**Figura 16.** Hongos más frecuentes recuperados en las fincas de Puntarenas y Sarapiquí. Superficie y reverso de las colonias de: A (*Penicillium diversum*); B (*Penicillium purpureogenum*); C (*Penicillium citrinum*, *P. griseofulvum*); D (*Talaromyces calidicanus*); E (*Fusarium proliferatum*); F (*Fusarium* sp.); G (*Aspergillus aculeatus*); H (*Cladosporium* sp.).

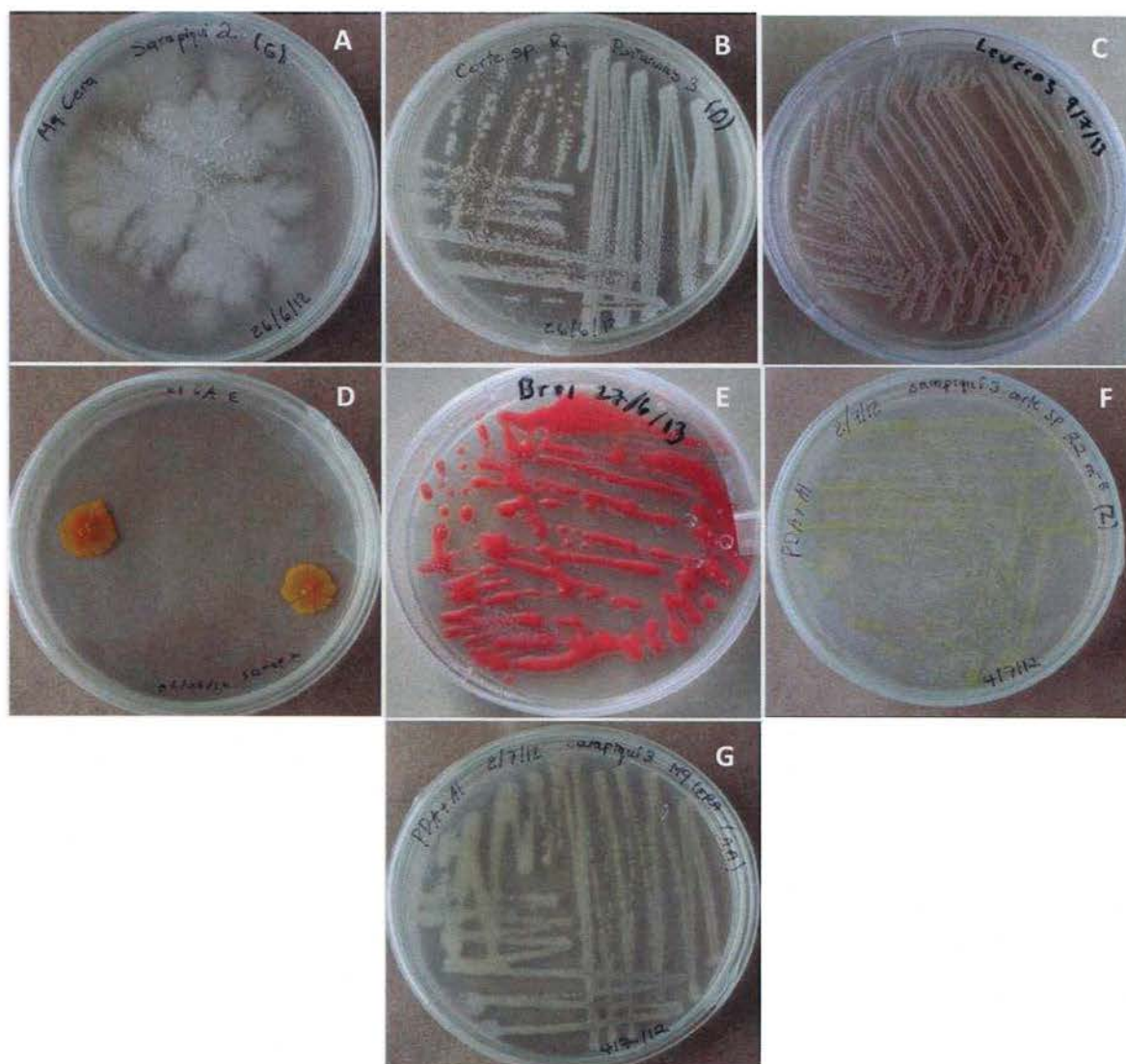


**Figura 17.** Colonias de los hongos de micelio blanco y oscuro más frecuentes recuperados en las fincas de Puntarenas y Sarapiquí. Superficie y reverso de las colonias de: A (*Penicillium daleae*); B (*Xylaria adscendens*); C (Hongo del orden Xylariales.); D (*Daldinia eschscholtzii*); E (*Microsphaeropsis arundinis*); F (*Phoma herbarum*); G (*Lasiodiplodia* sp.).

En el cuadro 4 se presenta la descripción de la coloración y forma de las levaduras y bacterias más frecuentes recuperadas en el presente estudio. Para las especies identificadas molecularmente, se indica entre paréntesis el porcentaje de similitud con las secuencias genéticas y el número de accesoión del GenBank. La información se complementa con fotografías que muestran la superficie de las colonias, creciendo en medio de cultivo PDA + AI (Figura 18).

**Cuadro 4.** Descripción de las levaduras y bacterias más frecuentes recuperadas en las distintas fases de procesamiento muestreadas en empacadoras de piña de las fincas de Puntarenas y Sarapiquí.

<b>Código/Identificación (número de accesoión)</b>	<b>Descripción de las colonias</b>
Levcr01	Levadura color crema, con el borde de la colonia de forma irregular y reverso de la misma sin pigmentación. Produce abundante esporulación
<i>Wickerhamomyces anomalus</i> (100% GQ 376076.1)	Levadura que forma colonias redondeadas, con la superficie y reverso de color blanco. Abundante esporulación
Levcr03 ( <i>Pichia caribbica</i> , <i>Candida fukuyamaensis</i> )- (99% GU 248264.1/99% AM 158923.1)	Levadura que forma colonias redondeadas, con la superficie y reverso de color crema. Abundante esporulación
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (100% HQ 702343.1)	Levadura que forma colonias redondeadas, con la superficie y reverso de color rojizo. Abundante esporulación
Levam02	Levadura que forma colonias de borde irregular, con la superficie y reverso de color amarillo
Bcr	Bacteria que forma colonias de borde redondeado, con la superficie y reverso de color crema
Bam	Bacteria que forma colonias de borde redondeado, con la superficie y reverso de color amarillo



**Figura 18.** Colonias de las levaduras y bacterias más frecuentes recuperadas en las fincas de Puntarenas y Sarapiquí. Superficie de las colonias de: A (Levcr01); B (*Wickerhamomyces anomalus*); C (*Pichia caribbica*, *Candida fukuyamaensis*); D (Levam02); E (*Rhodotorula mucilaginosa*); F (Bam); G (Bcr).



## 5. Análisis de frecuencia de recuperación

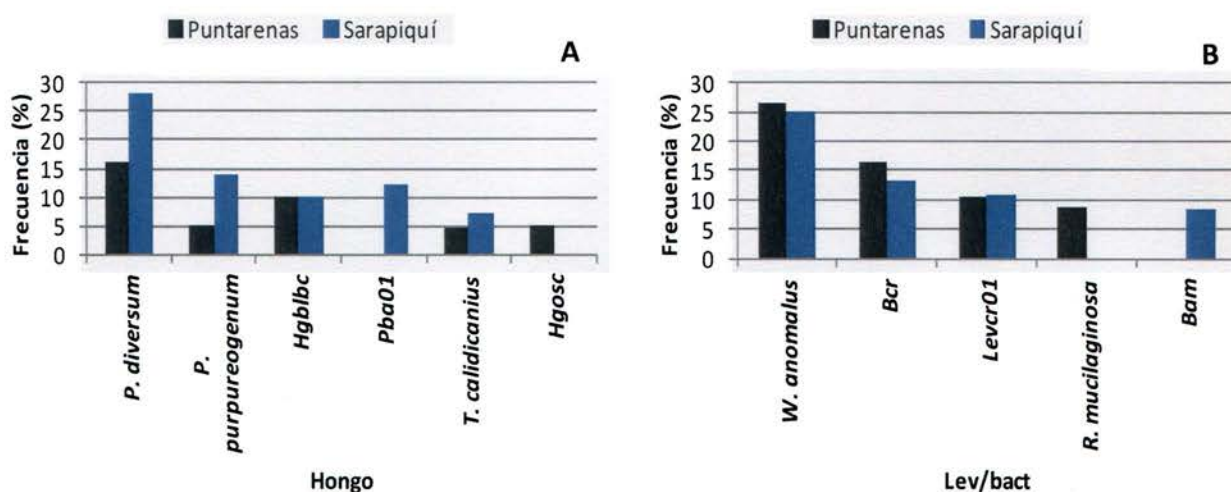
### 5.1 Frecuencia por grupos de organismos

En la figura 19 se muestra la frecuencia de recuperación de los principales microorganismos, con base en el total de muestras de todas las fases de procesamiento analizadas. Se recuperó tres especies de hongos del género *Penicillium* (Figura 19A), con una frecuencia entre 5% y 28,3%, las cuales correspondieron a *P. diversum*, *P. purpureogenum* y una especie designada como Pba01, que de acuerdo con la caracterización molecular, correspondió con la secuencia genética de *P. citrinum* o *P. griseofulvum*. Además, se identificó *Talaromyces calidicanus*, con una frecuencia de 4,5% en Puntarenas y 7,3% en Sarapiquí, y un grupo de hongos de micelio claro (Hgblbc) con un 10%, dentro del cual se identificó los géneros y especies *Pestalotia* sp., *Acremonium* sp., *Penicillium daleae* y *Xylaria adscendens*.

En Puntarenas, fue frecuente la recuperación de un grupo de hongos de micelio oscuro con un 5%, dentro del cual se incluyó a *Cladosporium* sp., *Lasiodiplodia* sp., *Phoma herbarum*, *Microsphaeropsis arundinis* y *Daldinia eschscholtzii*.

Entre las levaduras y bacterias (Figura 19B), la más frecuente correspondió a *Wickerhamomyces anomalus*, con aproximadamente 25% en ambas zonas, una levadura de color crema (Levcr01) no identificada a nivel de género con un 10%, y *Rhodotorula mucilaginosa*, que solamente se recuperó en Puntarenas con una

frecuencia del 8,7%. En bacterias, las más frecuentes desarrollaron colonias de color crema (Bcr) con frecuencias de 16,5% y 13,4% en Puntarenas y Sarapiquí respectivamente y de color amarillo (Bam), aisladas únicamente en la zona de Sarapiquí, en un 8,5% del total de muestras.



**Figura 19.** Frecuencia de los principales hongos (A), levaduras y bacterias (B), con base en el total de muestreos realizados en las diferentes fases de procesamiento, de las fincas de Puntarenas y Sarapiquí.

## 5.2 Frecuencia por fase de procesamiento

En los cuadros 5 y 6 se muestra la frecuencia de los principales hongos, levaduras y bacterias recuperados en cada fase de procesamiento muestreada (agua, cera y cámaras de enfriamiento) y en el pedúnculo y cáscara de fruta procesada (P) y sin procesar (SP) al finalizar los doce muestreos en cada zona.

El género *Penicillium* se recuperó en todas las fases de procesamiento y en la cáscara y pedúnculo de la fruta de ambas zonas. *P. diversum* y *P.*

*purpureogenum* fueron las especies más frecuentes con valores entre 0,6% y 74,1%, dependiendo de la fase muestreada. El grupo de hongos de micelio blanco también se recuperó en todas las fases de procesamiento y en la fruta de ambas zonas, con una frecuencia menor que *Penicillium* y que osciló entre 1,1% y 18,5%.

Algunos hongos fueron frecuentes únicamente en determinadas fases de procesamiento, entre ellos, el grupo de hongos de micelio oscuro, con 2,4% en agua y 3,4% en cera de Puntarenas y 0,6% en agua y 6,1% en cera de Sarapiquí, no se recuperaron el aire de las cámaras de enfriamiento de ambas zonas y se aislaron únicamente en el pedúnculo de fruta sin procesar de Puntarenas. *Aspergillus aculeatus* fue frecuente únicamente en agua y cera de Puntarenas con 2,4% y 3,9% respectivamente. *Cladosporium* sp. se recuperó en cera de Puntarenas con 2,2% y en Sarapiquí con un 10% y en cámaras de enfriamiento con un 11% a 12% en ambas zonas (Cuadros 5 y 6). *Fusarium proliferatum* se encontró solamente en fruta, tanto procesada como sin procesar de las dos fincas, con excepción de la cáscara en Puntarenas, donde no se registró crecimiento de este microorganismo (Cuadro 5).

En el cuadro 5 se observa que en Puntarenas, el procesamiento de la fruta generó diferencias en la frecuencia de recuperación de hongos en el pedúnculo, ya que solamente *P. diversum* y *F. proliferatum* fueron frecuentes tanto en fruta P como SP, mientras que en Sarapiquí, la mayoría de los hongos recuperados (4 de 6) presentaron valores similares de frecuencia, independientemente de si la fruta fue procesada o no. En la cáscara de ambas zonas, los principales géneros o especies recuperados fueron los mismos en fruta P y SP, con una frecuencia

ligeramente mayor en cáscara SP y dentro de estos, predominó el género *Penicillium* con valores entre 11,4% y 37,2%.

Con respecto a las levaduras, la más frecuente en fruta P y SP correspondió a *W. anomalus* (Cuadro 6), con valores entre 27,2% y 68,6%. Además, esta levadura se recuperó en agua de Puntarenas, cera de Sarapiquí, y en la cámara de enfriamiento de Puntarenas. *R. mucilaginoso* fue frecuente en el pedúnculo de fruta P y SP de Puntarenas y en el pedúnculo SP de Sarapiquí, con valores entre 13,3% y 29,8% y también presentó un 13,3% de frecuencia en la cáscara de fruta P de Puntarenas y 3,3% en la cera de Sarapiquí. El crecimiento de bacterias con colonias de color crema y amarillo fue frecuente en todas las fases de procesamiento, con excepción de la cera de Sarapiquí, donde solamente se observó el crecimiento de levaduras (Cuadro 6).

Las demás levaduras presentaron una frecuencia entre el 4,9% y 40,2% y al igual que *W. anomalus*, fueron frecuentes en el pedúnculo, principalmente de fruta SP, donde además, se observó crecimiento de patrones de manchas amarillas o rojizas que podrían estar asociadas con la presencia de estos microorganismos.

**Cuadro 5.** Frecuencia de los principales hongos recuperados en las distintas fases de procesamiento y en la cáscara y pedúnculo de fruta procesada (P) y sin procesar (SP) de las fincas de Puntarenas y Sarapiquí.

Finca	Fase/tejido	Frecuencia (%) por organismo									
		<i>P. diversum</i>	<i>P. purpureogenum</i>	<i>T. calidicanus</i>	<i>F. proliferatum</i>	<i>A. aculeatus</i>	<i>Cladosporium</i> sp.	Pba01	Hgblbc	Hgblbp	Hgosc
Puntarenas	Agua	3	0	0	0	2,4	0	0	11,5	4,8	2,4
	Cera	9	0	0	0	3,9	2,2	0	9,6	0	3,4
	Aire de cámaras	24,3	0	0	0	0	11,2	8,3	5,9	8,9	0
	Pedúnculo P	6,8	5,8	1	1	0	0	1	0	0	0
	Pedúnculo SP	11,5	0	0	8,7	0	9,6	0	7,7	0	12,5
	Cásc P	28,6	11,4	19	0	9,5	0	0	18,1	0	0
	Cásc SP	36,5	19,2	14,4	0	20,2	0	0	17,3	0	0
Sarapiquí	Agua	0,6	0,6	0	0	0	0	0	1,1	0	0,6
	Cera	18,9	0	6,7	0	0	10	10	0	0	6,1
	Aire de cámaras	74,1	18,5	0	0	0	12,2	45,5	18,5	0	0
	Pedúnculo P	13	13,7	6,1	0	0	0	3,8	3,1	0	0
	Pedúnculo SP	15,5	15,5	6,2	13,2	0	0	0	7,8	0	0
	Cásc P	37,2	31	20,2	14	0	0	0	12,4	0	0
	Cásc SP	33,1	21,5	18,5	16,9	0	0	0	20	0	0

**Cuadro 6.** Frecuencia de las principales levaduras y bacterias recuperadas en las distintas fases de procesamiento y en la cáscara y pedúnculo de fruta procesada (P) y sin procesar (SP), de las fincas de Puntarenas y Sarapiquí.

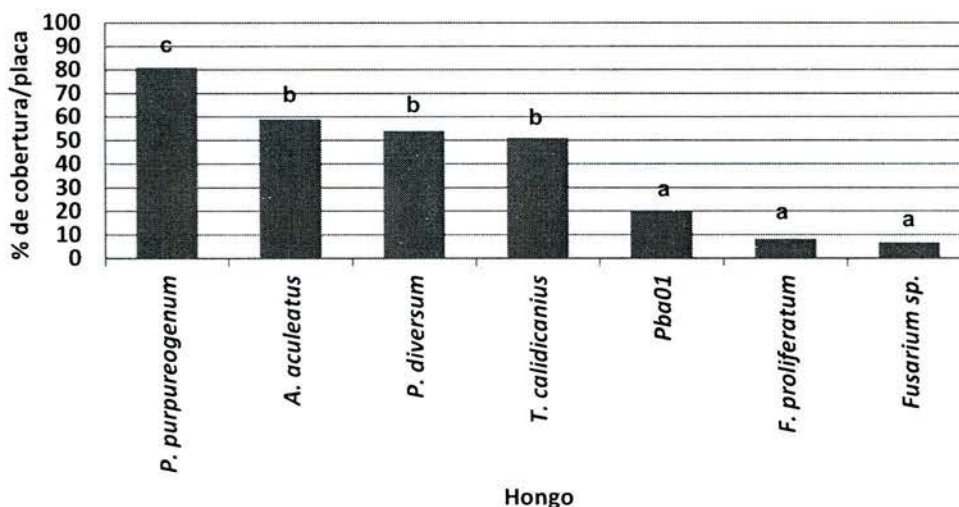
Finca	Fase/tejido	Frecuencia (%) por organismo							
		<i>W. anomalus</i>	<i>R. mucilaginosa</i>	<i>Levcr01</i>	<i>Levcr03</i>	<i>Levcr04</i>	<i>Levam02</i>	Bcr	Bam
Puntarenas	Agua	5,5	0	11,5	0	0	0	3,6	5,5
	Cera	0	0	14	0	0	9,6	8,4	5,6
	Aire de cámaras	7,1	0	16	0	40,2	0	9,5	0
	Pedúnculo P	27,2	13,6	0	4,9	0	0	17,5	0
	Pedúnculo SP	61,5	29,8	0	0	0	25	29,8	0
	Cásc P	68,6	13,3	0	0	0	0	33,3	16,2
	Cásc SP	53,8	0	0	0	0	22,1	30,8	20,2
Sarapiquí	Agua	0	0	7,3	0	0	5,6	1,7	1,7
	Cera	4,4	3,3	23,3	0	0	12,2	0	0
	Aire de cámaras	0	0	14,8	0	19	0	17,5	8,5
	Pedúnculo P	28,2	0	6,9	6,9	0	0	0	3,8
	Pedúnculo SP	52,7	18,6	0	18,6	0	0	27,1	0
	Cásc P	59,7	0	0	20,2	0	0	24,8	10,1
	Cásc SP	47,7	0	0	9,2	0	0	25,4	25,4

## 6. Pruebas de crecimiento *in vitro*

La figura 20 muestra el promedio del porcentaje de cobertura de la superficie del medio de cultivo con el micelio de los hongos más frecuentes, recuperados al finalizar los muestreos en ambas zonas de estudio.

Se obtuvo diferencias significativas entre especies, donde el hongo con mayor crecimiento correspondió a *P. purpureogenum*, con un 81% de cobertura, seguido por *A. aculeatus*, *P. diversum* y *T. calidicanus*, todos con valores entre 51% y 59%. El menor crecimiento *in vitro* se registró en Pba01, *Fusarium proliferatum* y *Fusarium* sp., cuyos valores estuvieron entre 6,7% y 20,1%. Además, es importante destacar que las especies *P. purpureogenum* y *P. diversum*, las cuales se recuperaron con alta frecuencia en las distintas fases de

procesamiento, también estuvieron entre las especies con mayor crecimiento *in vitro*.



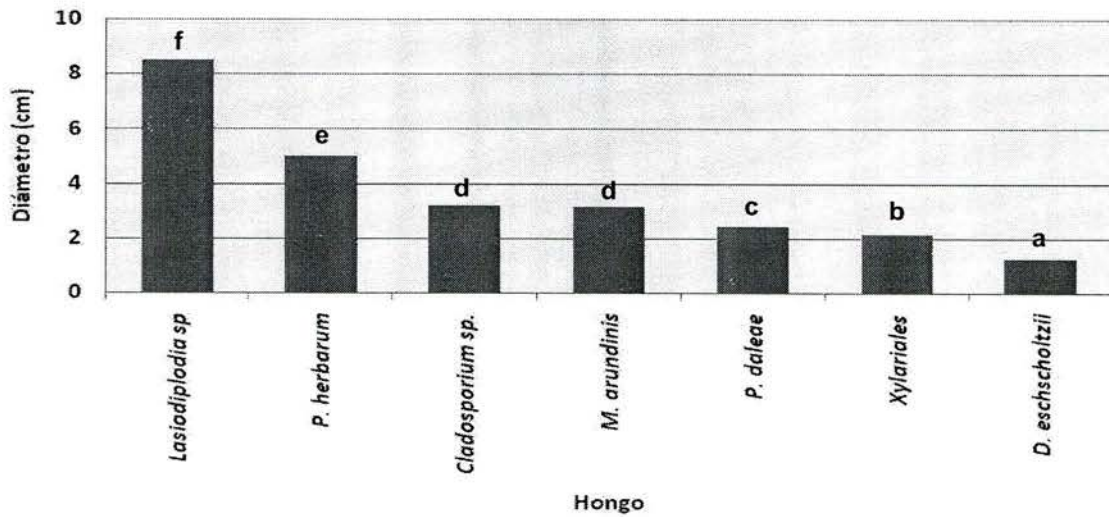
\*Letras diferentes entre las barras indican diferencias significativas de acuerdo con el análisis de varianza y la prueba de diferencia mínima significativa (DMS) al 5%.

**Figura 20.** Porcentaje promedio de cobertura del medio de cultivo PDA + AI, con el micelio de los hongos más frecuentes, luego de seis días en incubación a 18 °C.

En la figura 21 se muestra el diámetro promedio de crecimiento sobre la superficie del medio de cultivo de los hongos de micelio blanco y oscuro más frecuentes, recuperados en los muestreos de ambas zonas.

Se obtuvo diferencias significativas entre los géneros evaluados y *Lasiodiplodia* sp. fue el hongo con mayor crecimiento luego de seis días de incubación, con un diámetro de 8,5 cm que correspondió a un 100% de cobertura de la superficie del medio de cultivo, seguido por *P. herbarum*., con 5 cm de diámetro. El hongo con menor crecimiento fue *D. eschscholtzii* con 1,26 cm,

mientras que el resto de hongos evaluados presentaron un diámetro promedio entre 2,15 cm y 3,21 cm.



\*Letras diferentes entre barras indican diferencias significativas, de acuerdo con el análisis de varianza y la prueba de diferencia mínima significativa (DMS) al 5%.

**Figura 21.** Diámetro promedio de crecimiento de diferentes hongos de micelio blanco y oscuro en medio de cultivo PDA, luego de seis días en incubación a 18 °C.



## **7. Variables climáticas y su relación con las poblaciones de hongos y el porcentaje de moho en el pedúnculo**

En el cuadro 7 se presenta el resumen de la relación de las variables climáticas con respecto a las poblaciones de hongos y el porcentaje de moho en el pedúnculo. En este resumen se muestra únicamente aquellas en las cuales se obtuvo un  $R^2$  ajustado igual o mayor a 0,6, de acuerdo con el análisis de regresión.

De un total de 630 regresiones para cada finca, solamente diez en Sarapiquí (1,6%) y una en Puntarenas (0,2%) presentaron el mejor ajuste con un  $R^2$  mayor a 0,6. De estas, en Sarapiquí la precipitación acumulada dos y tres semanas antes de la cosecha fue la variable climática que presentó la mejor relación con respecto a las poblaciones de hongos en la cáscara de la fruta recién cosechada y después de 22 días de almacenamiento. En Puntarenas, también la precipitación acumulada dos semanas antes de la cosecha, fue la variable que presentó la mejor relación con respecto a las UFC/mL de hongos en la suspensión de cáscara después de 22 días de almacenamiento.

Las otras variables que presentaron un buen ajuste en Sarapiquí fueron, la diferencia entre temperatura máxima y mínima ( $\Delta T$ ) y la velocidad del viento dos semanas antes de la cosecha, al relacionarlas con el porcentaje de moho en el pedúnculo al finalizar el almacenamiento. Asimismo, la temperatura máxima ( $T_{max}$ ) dos y tres semanas antes de la cosecha presentó un buen ajuste, al relacionarla con las UFC/mL de hongos en la cáscara después de 22 días de almacenamiento.

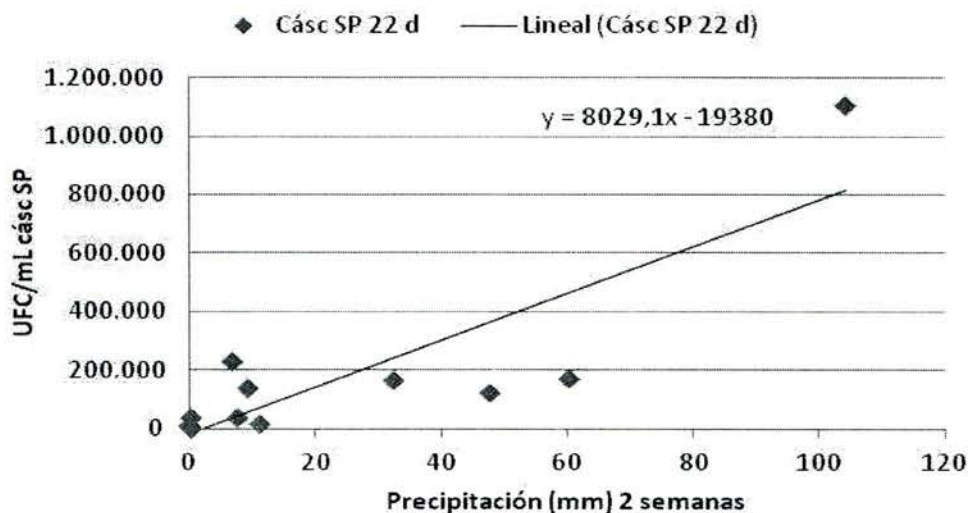
**Cuadro 7.** Resumen de las variables climáticas con mayor ajuste en el análisis de regresión entre las condiciones climáticas previo a la cosecha de la fruta y las poblaciones de hongos y desarrollo de moho en el pedúnculo.

Finca	Variable en fruta	Variable climática	Semanas antes de cosecha	Valor de p	R <sup>2</sup> ajustado
Sarapiquí	% moho en el pedúnculo SP 22 d	$\Delta T$ (°C)	2	0,0011	0,64
		Viento (km/h)	2	0,0019	0,6
	UFC/mL cásc SP cosecha	Precipitación acumulada (mm)	2	0,0002	0,73
			3	0,0014	0,62
	UFC/mL cásc SP 22 d	Precipitación acumulada (mm)	2	0,0019	0,64
			3	0,0007	0,71
	UFC/mL cásc P cosecha	Precipitación acumulada (mm)	2	0,0019	0,6
			3	0,0013	0,63
UFC/mL cásc P 22 d	T max (°C)	2	0,0022	0,63	
		3	0,0002	0,79	
Puntarenas	UFC/mL cásc SP 22 d	Precipitación acumulada (mm)	2	0,0011	0,68

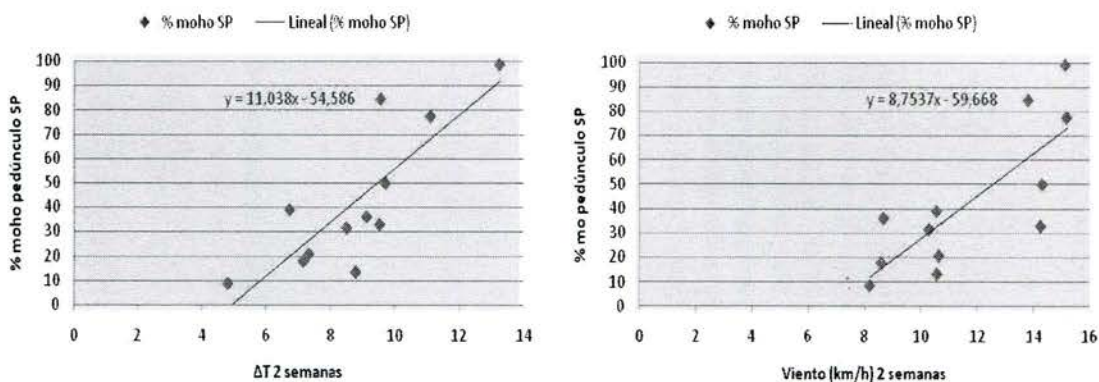
En las figuras 22 a 25 se observa la tendencia en la dispersión de los datos de las poblaciones de hongos y el porcentaje de moho en la fruta en función de las variables climáticas con el mejor ajuste indicadas en el cuadro 7. Además, se presenta la ecuación respectiva obtenida de acuerdo con el análisis de regresión lineal.

En la mayoría de las variables, la relación fue positiva, es decir, a medida que aumentó la precipitación, el  $\Delta T$  y la velocidad del viento, aumentó el porcentaje de moho y las poblaciones de hongos en la cáscara, mientras que en la zona de Sarapiquí (Figura 25), se presentó una relación negativa entre la temperatura máxima durante dos y tres semanas previo a la cosecha y las

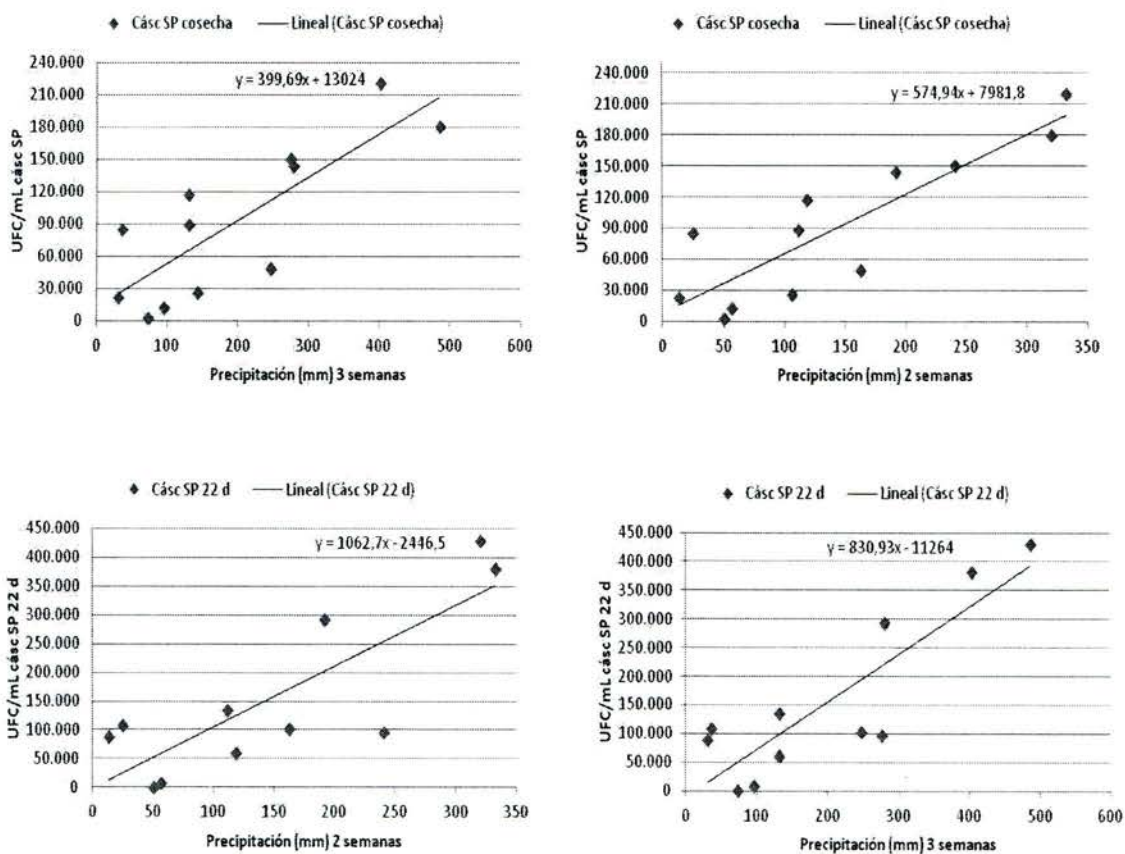
poblaciones de hongos en la cáscara de fruta procesada a los 22 días de almacenamiento.



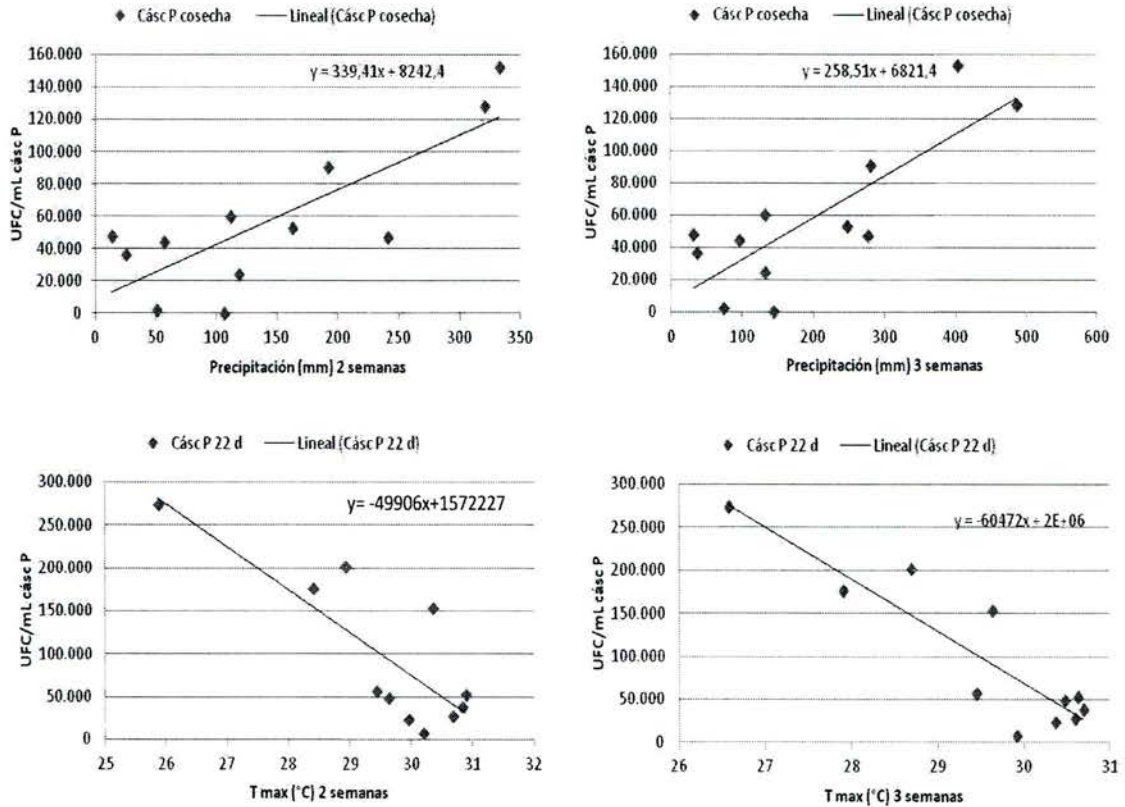
**Figura 22.** Regresión lineal para la variable climática que presentó la mejor relación con respecto a las UFC de hongos/mL en la cáscara de fruta sin procesar (SP), de la finca de Puntarenas.



**Figura 23.** Regresiones lineales para las variables climáticas que presentaron la mejor relación con respecto al desarrollo de moho en el pedúnculo de fruta sin procesar (SP), de la finca de Sarapiquí.



**Figura 24.** Regresiones lineales para las variables climáticas que presentaron la mejor relación con respecto a las poblaciones de hongos en la cáscara de fruta sin procesar (SP) de Sarapiquí, recién cosechada y después de 22 días de almacenamiento.



**Figura 25.** Regresiones lineales para las variables climáticas que presentaron la mejor relación con respecto a las poblaciones de hongos en la cáscara de fruta procesada (P) de Sarapiquí, recién cosechada y después de 22 días de almacenamiento.

## DISCUSIÓN

### 1. Poblaciones de hongos, levaduras y bacterias

En el presente trabajo, las altas poblaciones de hongos recuperadas en el pedúnculo de la fruta, entre mayo y agosto de 2012 en Puntarenas y de abril a julio de 2012 en Sarapiquí luego de 22 días de almacenada, son un buen parámetro para explicar la mayor incidencia y severidad de moho obtenida en esos meses. Este mismo patrón se observó entre enero y marzo de 2013 en Sarapiquí, donde se obtuvo un incremento en las poblaciones de hongos en el pedúnculo de fruta procesada y sin procesar y como consecuencia de ello, también tendió a incrementar la incidencia y severidad de moho.

Las poblaciones de hongos que se obtuvieron en el pedúnculo de fruta recién cosechada no reflejaron la tendencia en los valores de incidencia y severidad al finalizar el almacenamiento de la fruta y un aspecto que pudo influir en este comportamiento fueron las especies asociadas y las diferencias en la velocidad de crecimiento de cada una, lo que pudo permitir que aunque inicialmente se encontraban en poblaciones relativamente bajas y no fueron detectadas con la metodología utilizada, tuvieron la capacidad de crecer y esporular rápidamente en el pedúnculo y desarrollar cantidades importantes de moho, como respuesta a las prácticas poscosecha empleadas y a las condiciones de almacenamiento, como cambios en la humedad relativa y temperatura.

Esta diferencia en la velocidad de crecimiento entre distintas especies de hongos fue evidente en las pruebas de crecimiento *in vitro* realizadas en el

presente trabajo (Figuras 20 y 21), donde *Penicillium purpureogenum*, *P. diversum*, *Talaromyces calidicanus* y *Aspergillus aculeatus*, presentaron una mayor velocidad de crecimiento que los hongos *Fusarium proliferatum* y *Fusarium* sp., e igualmente se observó diferencias en la velocidad de crecimiento entre los hongos de micelio blanco y los hongos de micelio oscuro. Resultados semejantes obtuvieron Baert *et al.* (2008) en manzana, quienes encontraron variaciones en la tasa de crecimiento en  $\text{mm h}^{-1}$  con diferentes cepas y niveles de inóculo del hongo *Penicillium expansum* y por su parte, Morales *et al.* (2008), concluyeron que la influencia de la cantidad de inóculo en el aumento de la velocidad de crecimiento de *P. expansum* en frutos de manzana fue dependiente del aislado del hongo utilizado.

Los anteriores resultados y los obtenidos en el presente estudio indican que en piña, donde existe una diversidad de microorganismos presentes en el pedúnculo, es importante la identificación de los géneros o especies prevaletentes en este tejido, o bien, identificar los organismos presentes en la cáscara, el cual fue un tejido con pocas variaciones entre las poblaciones y especies medidas al momento de la cosecha y luego de 22 días de almacenamiento. La oportuna identificación de estos microorganismos permite desarrollar medidas específicas de manejo, de acuerdo con el tipo de organismos presente, la cual es una estrategia comúnmente sugerida en los programas de manejo integrado de enfermedades (Tewari 2002, Narayanasamy 2006).

La estimación de las poblaciones de hongos presentes en la fruta sin procesar cuando ingresó a la empacadora, fue mejor en la cáscara que en el

pedúnculo, debido a que en ese tejido de ambas regiones estudiadas, se registró poblaciones mayores a 1 UFC/mL, lo cual permitió observar los incrementos o disminuciones durante el año de estudio, y aunque no necesariamente los aumentos en las poblaciones de hongos en la cáscara coincidieron con una alta incidencia y severidad de moho al finalizar el almacenamiento de la fruta, este podría ser un parámetro importante a medir para estimar la cantidad de inóculo que llega a la empacadora y entra en contacto con el agua de lavado-desinfección, la cera y las diferentes superficies con las que tiene contacto la fruta durante su procesamiento poscosecha.

Barth *et al.* (2009), Prusky y Gullino (2010), resaltan la importancia de conocer la carga de microorganismos con que ingresa la fruta a la empacadora, ya que este inóculo en muchas ocasiones es una fuente importante de esporas de diferentes tipos de hongos que causan pudriciones poscosecha y que, aunque los tratamientos comúnmente utilizados en la empacadora sean efectivos en la reducción del mismo, no lo eliminan completamente, como sucedió en el presente estudio, donde el procesamiento poscosecha, no fue suficiente para evitar por completo el desarrollo de moho en el pedúnculo durante el año de estudio (Figuras 13 y 14).

La diferencia observada entre las poblaciones de hongos, levaduras y bacterias en el pedúnculo de fruta procesada y sin procesar, muestra el efecto positivo de las prácticas de manejo poscosecha en la reducción de microorganismos en esa zona del corte. En las fincas muestreadas, al igual que en otras empacadoras de piña de Costa Rica y otros países, la desinfección de la



fruta en agua con concentraciones de cloro entre 50 y 150 ppm y el uso de fungicidas poscosecha aplicados directamente al pedúnculo, son prácticas comunes (MAG 2010, García y Rodríguez 2011, Hu *et al.* 2011, Paull y Duarte 2011) y que pudieron influir en las diferencias encontradas durante la mayoría de los muestreos, donde se obtuvo las poblaciones más altas de microorganismos en la fruta que no recibió estos tratamientos poscosecha.

En comparación con el pedúnculo, en la cáscara la diferencia en las poblaciones de hongos, levaduras y bacterias entre fruta procesada y sin procesar fue menor, lo cual pudo deberse a que durante el proceso poscosecha, la aplicación de fungicida se realizó únicamente al pedúnculo; además, estos resultados mostraron que la desinfección con cloro no redujo las poblaciones de microorganismos en la cáscara lo suficiente, las cuales pudieron continuar multiplicándose y se mantuvieron en este tejido, hasta finalizar el período de almacenamiento.

Aunque hubo poca disminución de las poblaciones de hongos en la cáscara, como consecuencia de las prácticas poscosecha empleadas en ambas fincas, no fue evidente el desarrollo de moho en este tejido, mientras que en el pedúnculo, con poblaciones iguales o menores que las de cáscara, cuyos valores máximos estuvieron entre 4 y 5 UFC/mL, se obtuvo un desarrollo importante de moho, lo cual indica que este tejido provee mejores condiciones para el desarrollo de micelio que la cáscara, posiblemente debido a que el corte del pedúnculo es una herida en la fruta a partir de la cual pueden fluir sustancias nutritivas, entre estas los azúcares (Paull y Reyes 1996), los cuales son abundantes en este tejido,

en comparación con la cáscara, en la cual se ha encontrado como máximo 3% de sólidos solubles, mientras que en los tejidos internos de la fruta se ha obtenido promedios entre 13% y 17% de sólidos solubles (Kao y Chen 2013, Prakongpan *et al.* 2002, Saradhulhat y Paull 2007, Hajar *et al.* 2012, Syazwani *et al.* 2013), y que sirven como sustrato para diversos microorganismos. Por su parte, la cáscara de la piña y otros frutos presenta un mayor contenido de sustancias como polifenoles, cutina y ceras, que reducen el crecimiento de microorganismos y protegen la fruta de infecciones por diversos patógenos (Bocco *et al.* 1998, Guo *et al.* 2003, Mokbel y Hashinaga 2005, Lata *et al.* 2009, Chanda *et al.* 2010, Lara *et al.* 2014), lo cual pudo influir significativamente para que aún con las poblaciones recuperadas, no se obtuviese desarrollo de moho en este tejido.

Si bien, no se observó efecto del crecimiento de bacterias y levaduras en el pedúnculo, las poblaciones de estos microorganismos presentaron variaciones a lo largo del año y en general, como se observó en los cuadros 1 y 2, en promedio se obtuvo mayores poblaciones de levaduras y bacterias que de hongos en ambas zonas, lo que indica que estos microorganismos contribuyen de manera importante a la carga microbiológica presente tanto en el pedúnculo como en la cáscara. De las levaduras identificadas mediante análisis molecular, de la única que podría observarse fácilmente el crecimiento en el pedúnculo, sería *Rhodotorula mucilaginosa*, debido a que las colonias presentan una coloración rojiza que las hace evidentes y que pudo estar relacionada con el desarrollo de colonias redondeadas de color rojizo observadas en el pedúnculo luego de 22 días de almacenamiento de la fruta, en los muestreos de julio de 2012 en Sarapiquí y

setiembre, octubre y noviembre de ese mismo año en Puntarenas, y que no cubrieron más del 5% de la superficie de ese tejido.

*R. mucilaginosa* y diferentes especies del género *Candida*, han sido señaladas como levaduras con potencial para el control biológico de los hongos *Penicillium expansum* y *Botrytis cinerea* en cultivos como manzana, pera y banano (Leibinger *et al.* 1997, Benbow y Sugar 1999, Lassois *et al.* 2008, Torres *et al.* 2006, Gholamnejad *et al.* 2010, Guerrero *et al.* 2011, Li *et al.* 2011, Alavi-Fard *et al.* 2012). En el presente trabajo, se recuperó *R. mucilaginosa* y una levadura que correspondió con la secuencia molecular de *C. fukuyamaensis*, los cuales son microorganismos con potencial para su evaluación como controladores biológicos poscosecha en piña, sin embargo, se debe tomar en cuenta que otros trabajos realizados por Korres *et al.* (2010), también informan que el género *Candida* podría estar relacionado con la maduración prematura y fermentación de frutos de piña, en asociación con otros microorganismos como *Klebsiella* sp., *Saccharomyces* sp. y *Kloeckera* sp., razón por la cual sería conveniente desarrollar investigación que permita determinar si estas levaduras podrían tener potencial como controladores biológicos en piña o por el contrario, son patógenos que afectan el fruto.

Debido a la diversidad de microorganismos que pueden colonizar los tejidos del fruto de piña, se debe considerar que, aunque en algunos casos particulares como en el pedúnculo de fruta procesada y sin procesar de Sarapiquí, no se obtuvo diferencias estadísticas en las UFC recuperadas (Cuadro 1), las diferencias en el promedio de hasta miles de UFC, podrían ser importantes a nivel biológico,

debido a una disminución de la cantidad de inóculo con potencial para desarrollar moho en la fruta procesada durante el almacenamiento, mostrándose de esta forma la efectividad del procesamiento poscosecha aplicado en esta empacadora.

Una situación similar a nivel estadístico, ocurrió con las poblaciones de levaduras y bacterias en el pedúnculo de fruta recién cosechada de Puntarenas, donde se obtuvo poblaciones más altas durante el año de estudio en fruta sin procesar, lo cual muestra que el procesamiento poscosecha afectó de manera importante a estos microorganismos, mientras que en la cáscara de la fruta de Sarapiquí ocurrió lo contrario, y se obtuvo un promedio mayor de UFC en la fruta que recibió los tratamientos poscosecha, lo cual podría sugerir que prácticas como el encerado y la aplicación de fungicida, fomentan el crecimiento de estos microorganismos, ya sea porque según el tipo de cera utilizada, esta se podría convertir en un sustrato para su crecimiento, o bien, porque el fungicida elimina algunos microorganismos competidores.

Como indican Arauz (1994), Araya y Cascante (2000) y Hui *et al.* (2006), el aire, el agua de lavado y desinfección y cada una de las superficies con que entra en contacto la fruta pueden ser una fuente de inóculo de los patógenos que causan el desarrollo de mohos y pudriciones poscosecha. Al comparar las poblaciones de hongos en el agua de lavado y desinfección y en cera (Figura 1), se observó que la cera constituye una fuente mayor de inóculo para el pedúnculo de la fruta en comparación con el agua, esto posiblemente debido a que el sistema de aplicación de las ceras en piña requiere de una recirculación de la misma, debido al costo económico de este insumo, lo que podría favorecer que con el

transcurso del proceso se acumulen propágulos de diseminación que podrían quedar depositados en el pedúnculo de la fruta durante su aplicación. Las poblaciones en la cera obtenidas en el presente estudio (Cuadro 1), fueron mayores que el nivel crítico para el desarrollo de moho, definido por López (2012) para los géneros *Trichoderma*, *Penicillium*, *Aspergillus* y *Fusarium*, donde hubo crecimiento de moho e incremento en la cantidad que se desarrolló en el pedúnculo, luego de inocular este tejido con suspensiones de al menos 1.000 esporas/mL de cualquiera de los hongos.

A su vez, las bajas poblaciones de hongos en el agua, podrían deberse a las concentraciones de cloro en el agua de lavado-desinfección de las pilas, que como se indicó anteriormente, es un tratamiento comúnmente utilizado en piña (MAG 2010, García y Rodríguez 2011) y que en el presente estudio se registró en concentraciones entre 150 a 180 ppm de cloro libre durante todos los muestreos.

En los muestreos realizados en las cámaras de enfriamiento y almacenamiento, se observó que el aire de las mismas contiene esporas de hongos que por el mecanismo de recirculación del aire de enfriamiento podrían alcanzar la superficie del pedúnculo y dependiendo de la especie presente, contribuir al desarrollo de mohos. Además, las poblaciones de hongos más altas durante todos los muestreos en la zona de Sarapiquí, en comparación con las de Puntarenas, podría deberse a diferencias en los protocolos de limpieza de las cámaras en ambas fincas y a que la finca de Sarapiquí procesa mayores volúmenes de fruta durante el año, lo cual podría aumentar la presión de esporas de hongos en el aire de las cámaras.

Morales *et al.* (2008 y 2010) informan que con la adecuada limpieza y desinfección de las plantas empacadoras y de las cámaras de enfriamiento y almacenamiento de manzana, se logró disminuir significativamente el nivel de inóculo y la incidencia de fruta con moho causado por *Penicillium expansum*. Además, trabajos realizados en este mismo cultivo por Amiri y Bompeix (2005), mostraron una relación directa entre la cantidad de esporas por m<sup>3</sup> en el aire de las cámaras de almacenamiento y la densidad de esporas del género *Penicillium* en la superficie de frutos de manzana, por lo tanto, aunque no fue una de las variables medidas en el presente estudio, la adecuada limpieza y desinfección de la planta empacadora y las cámaras de enfriamiento en piña son aspectos que deberían tomarse en cuenta para disminuir la posibilidad de que posterior a la aplicación de cloro y fungicida, lleguen esporas de hongos al pedúnculo, que podrían causar el desarrollo de mohos en poscosecha.

## **2. Análisis de frecuencia y pruebas de crecimiento**

En el análisis que tomó en cuenta todas las muestras procesadas (Figura 19), se destacó con mayor frecuencia los géneros *Penicillium*, *Talaromyces* y el grupo de hongos de micelio blanco y oscuro, a la vez, los resultados muestran una diversidad de microorganismos que podrían contribuir al desarrollo de moho en el pedúnculo.

Sin embargo, al analizar únicamente las poblaciones de fruta procesada, destacan los géneros *Penicillium*, *Talaromyces* y el grupo de hongos de micelio

blanco como los principales microorganismos recuperados posterior a la desinfección con cloro y la aplicación de fungicida, lo que los define como un grupo crítico y el manejo del inóculo de estos microorganismos en particular, es importante si se desea lograr un mejor control de los mohos poscosecha en el pedúnculo.

La alta frecuencia en las diferentes fases de procesamiento, el rápido crecimiento *in vitro* y la recuperación en fruta procesada, tanto recién cosechada, como después de 22 días de almacenamiento, permite considerar que especies como *Penicillium purpureogenum*, *P. diversum* y el grupo de hongos de micelio blanco, son microorganismos que pueden permanecer en el pedúnculo de la fruta e incrementar su crecimiento cuando la piña es colocada en anaqueles en el mercado destino, a temperaturas de 18 °C o mayores, o cuando por alguna situación en particular se eleva la temperatura durante el almacenamiento y transporte, ya que la mayoría de especies del género *Penicillium* tienen su rango óptimo de crecimiento entre 18 °C y 30 °C (Martínez 2003, Plaza *et al.* 2003, Baert *et al.* 2007, Gougouli y Koutsounamis 2010).

El género *Penicillium* se encuentra entre los hongos más importantes informados como patógenos en piña (Malins 1991, Mitra 1997, Hui *et al.* 2006) y que reviste importancia para el ser humano, debido a la producción de altas cantidades de micotoxinas en algunas especies (Martínez 2003, Barkai-Golan 2008). Mourichon (1998) y Bartholomew *et al.* (2003) informan que la especie *Penicillium funiculosum* se encuentra directamente asociada con la enfermedad conocida como pudrición de los frutículos en algunas variedades de piña, lo cual

muestra que es un organismo importante en este cultivo. Así mismo, el género *Talaromyces* que corresponde al teleomorfo del género *Penicillium*, es un hongo poco común en frutas frescas y algunas especies son causantes de mohos en jugos y otros productos alimenticios procesados (Beuchat 1988, King 1997, Voldřich *et al.* 2004), sin embargo, en el presente trabajo se recuperó frecuentemente en la cera y fruta de ambas zonas, lo que indica que es un hongo con capacidad de colonizar los tejidos del fruto de piña y acumularse en la cera, por lo que eventualmente podría contribuir con el desarrollo de moho en el pedúnculo.

El género *Fusarium*, recuperado con frecuencia en el pedúnculo y cáscara de ambas zonas, es un patógeno importante del cultivo de piña, que también puede colonizar los diferentes tejidos de la planta (Snowdon 2000, Jacobs *et al.* 2010, Stępień *et al.* 2011a, Stępień *et al.* 2011b, Stępień *et al.* 2013), y que tiene la capacidad para desarrollar moho en la fruta, sin embargo, en las pruebas de crecimiento se encontró una diferencia importante en la velocidad de crecimiento con respecto a hongos como *Penicillium* y *Aspergillus*, los cuales en seis días lograron cubrir entre un 60% y 80% de la superficie de la placa Petri, mientras que ninguna de las especies de *Fusarium* cubrió más del 10% de la misma, lo que muestra un mayor potencial de géneros como *Penicillium* y *Aspergillus* como posibles causantes de mohos en el mercado destino, por lo que sería importante realizar pruebas de inoculación con estos microorganismos en fruta y almacenarlas a las temperaturas que se utilizan comercialmente en piña, para corroborar si este comportamiento observado *in vitro* se mantiene.



No se encontró información de otras investigaciones que citen como patógenos en piña, los demás microorganismos recuperados con alta frecuencia en este trabajo, entre los que estuvieron el género *Cladosporium* y el grupo de hongos de micelio blanco y oscuro, sin embargo, los hongos pertenecientes a los géneros *Phoma*, *Lasiodiplodia* y *Cladosporium*, han sido señalados como patógenos en diversos cultivos tropicales como papaya, mango y banano (Alvarez y Nishijima 1987, González *et al.* 1999, Snowdon 2000, CAB 2002, Anthony *et al.* 2004, Moalemiyan *et al.* 2007, Alves *et al.* 2008, Shrestha *et al.* 2011), y debido a sus características de alta producción de esporas y abundante crecimiento de micelio de color oscuro o blanco y algodonoso, son microorganismos que pueden contribuir al desarrollo de moho poscosecha en el pedúnculo de la piña.

Aunque la caracterización de las levaduras en los tejidos de la fruta y las diferentes fases de procesamiento poscosecha no fue uno de los objetivos principales del presente trabajo, se debe destacar que tanto en la fruta como en las diferentes fases de procesamiento, estos fueron microorganismos frecuentes y podrían tener un impacto en el desarrollo de moho en el pedúnculo, sin embargo, se requiere desarrollar investigación que permita determinar si el impacto es positivo o negativo y de ser beneficioso, estas podrían ser utilizadas para el control biológico de mohos en piña.

*Wickerhamomyces anomalus*, anteriormente conocida como *Pichia anomala* (Kurtzman 2011, Passoth *et al.* 2011), fue la levadura más frecuente en el pedúnculo y cáscara de ambas fincas, en cantidades incluso superiores al género *Penicillium*, y a pesar de la alta frecuencia, no se asoció con ninguna

sintomatología evidente de deterioro en la fruta, que pudiese indicar la patogenicidad de este microorganismo. Aunado a ello, en diversas investigaciones se informa sobre la diversidad de ambientes que puede colonizar y su efecto como controlador biológico precosecha y poscosecha de hongos como *Penicillium* spp., *Botrytis cinerea* y *Colletotrichum gloeosporioides* en los cultivos de manzana, cítricos y papaya (Fredlund *et al.* 2002, Friel *et al.* 2007, Haïssam 2011, Izgu *et al.* 2011, Walker 2011, Platania *et al.* 2012, Lima *et al.* 2013), por lo tanto, este podría ser un microorganismo sobre el cual enfocar estudios posteriores para el control biológico de los hongos causantes de moho en el pedúnculo.

### **3. Influencia de las variables climáticas**

La influencia del clima sobre el desarrollo de patógenos en diferentes cultivos ha sido mencionada por diversos autores, los cuales destacan la importancia de la temperatura, humedad relativa y el viento, que influyen significativamente en la duración del ciclo de vida de diversos microorganismos y determinan su supervivencia (Plaza *et al.* 2004, Arauz 2011, Abdel *et al.* 2012, Paterson *et al.* 2013), sin embargo, el análisis de regresión realizado en el presente trabajo no permitió establecer una influencia significativa del clima sobre las poblaciones de hongos en la fruta y el desarrollo de moho en el pedúnculo, ya que un bajo porcentaje de las regresiones presentó el mejor ajuste con un  $R^2$  mayor a 0,6.

El corte del pedúnculo, en donde crece el moho poscosecha, es una superficie no expuesta al ambiente durante el desarrollo de la fruta en el campo, lo que podría explicar en parte, el bajo grado de relación entre las variables climáticas analizadas y el desarrollo de moho en este tejido, donde solamente la velocidad del viento y el  $\Delta T$  ( $^{\circ}\text{C}$ ), dos semanas antes de la cosecha, presentaron una influencia significativa sobre el crecimiento de moho en el pedúnculo. Además, se debe tener en cuenta que las diferentes prácticas poscosecha modifican significativamente las poblaciones de microorganismos provenientes del campo, lo que hace aún más difícil encontrar una relación matemática significativa entre el clima y el desarrollo de moho poscosecha en la piña.

Así mismo, el clima tiene influencia sobre el inóculo de diferentes hongos presentes en el campo y que tienen la capacidad de colonizar los tejidos de la planta y de la fruta, lo que explicaría el mejor ajuste obtenido en las poblaciones de hongos en la cáscara, en función de la precipitación acumulada dos y tres semanas antes de la cosecha, ya que al aumentar la precipitación en ese período, se generan condiciones de alta humedad y mojadura en la superficie de la fruta que podrían favorecer el incremento de las poblaciones de hongos registradas en la cáscara.

La finca de Sarapiquí fue la que presentó una mayor cantidad de regresiones significativas, donde al incrementarse la precipitación dos y tres semanas antes de la cosecha, aumentaron las poblaciones de hongos en la cáscara, posiblemente debido a que es una zona donde se registra una precipitación mensual acumulada igual o mayor a 100 mm durante todos los

meses del año (Anexo 1), mientras que en Puntarenas, prácticamente la mitad de los meses del año registran precipitaciones menores a 100 mm o del todo no llueve, lo cual puede crear diferencias importantes con respecto a la influencia que ejerce esta variable climática sobre las poblaciones de microorganismos en la superficie de la fruta.

Un ejemplo de la influencia del clima sobre la diseminación del hongo *Penicillium* es citado por Pasanen *et al.* (1991) quienes indican que se requiere una velocidad del viento de al menos  $18 \text{ km h}^{-1}$  para lograr un efectivo transporte de los conidios de este hongo, y en piña, se citan los trabajos realizados por Rohrbach y Pfeiffer (1975) y Rohrbach y Taniguchi (1984), quienes en evaluaciones de campo encontraron una influencia directa de la temperatura y precipitación sobre la cantidad de inóculo de *Penicillium funiculosum* y *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans*, lo cual evidencia el efecto significativo del clima sobre géneros como *Penicillium* y *Fusarium*, de los cuales se identificaron varias especies en la presente investigación, sin embargo, futuros trabajos más detallados, podrían concluir con mayor certeza si el clima tiene un efecto directo sobre el desarrollo de mohos poscosecha en frutos de piña.

No se obtuvo un alto porcentaje de variables climáticas que se relacionen directamente con las poblaciones de hongos en la fruta y el desarrollo de moho en el pedúnculo, sin embargo, no se debe desestimar el efecto que ejerce el clima sobre las poblaciones de microorganismos causantes de mohos u otros problemas patológicos en la fruta luego de cosechada, ya que el aumento del inóculo de los mismos durante su desarrollo en el campo, podría incidir directamente en la

cantidad de esporas acarreadas en la superficie de la fruta y que tienen contacto con el agua, la cera y las demás superficies con las que tiene contacto la fruta durante su procesamiento poscosecha, lo cual favorece que dichas esporas alcancen la superficie del pedúnculo y ocurra posteriormente el desarrollo de moho.

#### **4. Consideraciones finales**

Aunque las prácticas de manejo poscosecha como la desinfección de la fruta en agua con cloro y la aplicación de fungicida disminuyen significativamente las poblaciones de los hongos causantes de moho, no son suficientes para eliminar totalmente el riesgo de crecimiento de estos microorganismos al finalizar el almacenamiento en frío y, prácticas como el encerado de la fruta y la inadecuada limpieza de las cámaras de enfriamiento, podrían contribuir al desarrollo de mohos en el pedúnculo, causado principalmente por las especies *P. purpureogenum*, *P. diversum* y el grupo de hongos de micelio blanco, recuperados con alta frecuencia en fruta procesada y que, además mostraron una alta velocidad de crecimiento a 18 °C, temperatura a la que la fruta debería estar expuesta el menor tiempo posible durante su transporte o en el mercado destino para disminuir el crecimiento de estos microorganismos.

Debido a que el desarrollo de moho en el pedúnculo causa pérdidas de fruta importantes, a partir de la información generada en el presente trabajo, se debe continuar con investigaciones en las cuales se genere el conocimiento necesario para lograr un manejo integrado de los hongos que causan este

problema poscosecha. Para ello, se debe explorar alternativas como el control biológico a través de levaduras provenientes de la misma fruta o bien, mediante productos formulados y ya existentes en el mercado, uso de sustancias GRAS (Generally recognized as safe, por sus siglas en inglés), u otras moléculas orgánicas que podrían ser utilizadas en poscosecha, disminuyéndose de esta manera el uso de fungicidas sintéticos, los cuales cada vez tienen más restricciones de uso, principalmente en poscosecha, debido a la posibilidad de residuos de estas moléculas en la fruta. Igualmente, se debe tomar en cuenta que la disminución del inóculo de estos microorganismos puede lograrse mediante un adecuado manejo de la limpieza de las instalaciones y equipos antes y durante el procesamiento de la fruta en la planta empacadora, búsqueda de alternativas para evitar que la cera acumule cargas importantes de microorganismos o bien, tratamientos que permitan eliminarlos y además, lograr un mantenimiento adecuado de la cadena de frío durante el almacenamiento y transporte, para evitar que la fruta sea expuesta a temperaturas que permitan el rápido crecimiento de los hongos causantes de mohos.

## CONCLUSIONES

- 1- Los principales hongos asociados con el desarrollo de moho poscosecha fueron *Penicillium purpureogenum*, *Penicillium diversum* y el grupo de hongos de micelio blanco, los cuales se recuperaron en fruta procesada y sin procesar, presentaron alta frecuencia, rápido crecimiento *in vitro* y se observó su crecimiento en el pedúnculo.
- 2- La cáscara y el pedúnculo de la piña son sustratos para diversas especies de hongos como *P. purpureogenum*, *P. diversum*, *P. citrinum*/*P. griseofulvum*, *Talaromyces calidicanus*, *Fusarium proliferatum*, *Aspergillus aculeatus*, y algunas otras especies que también fueron recuperadas en las distintas fases de procesamiento poscosecha.
- 3- Las poblaciones de hongos en la fruta y en las distintas fases de procesamiento presentaron variaciones durante el año de estudio y en las mediciones realizadas en el pedúnculo de la fruta después de 22 días de almacenamiento, coincidió el aumento en las poblaciones de hongos con el incremento en la incidencia y severidad de moho en ese tejido.
- 4- La carga microbiológica del agua de las pilas de lavado y desinfección de la fruta fue baja y esta no es una fuente de inóculo significativa de los hongos causantes de moho.

- 5- En ambas zonas, la recirculación de la cera, favoreció la acumulación de cargas significativas de hongos, que durante el procesamiento comercial de la fruta, podrían contribuir al desarrollo de moho en el pedúnculo.
  
- 6- Las esporas de los hongos recuperadas en el aire de las cámaras de enfriamiento pueden ser una fuente de inóculo para el desarrollo de moho en el pedúnculo.
  
- 7- El procesamiento poscosecha empleado por ambas fincas disminuyó significativamente las poblaciones de microorganismos en el pedúnculo, sin embargo, no siempre fue suficiente para evitar la aparición de moho al finalizar el período de almacenamiento.
  
- 8- Las levaduras y bacterias fueron microorganismos frecuentes en el pedúnculo y la cáscara y contribuyeron significativamente a la carga microbiológica de la fruta.
  
- 9- Solamente un bajo porcentaje de las variables climáticas analizadas presentó una relación significativa con respecto a las poblaciones de hongos en la fruta y el porcentaje de moho en el pedúnculo y entre estas, la precipitación acumulada dos y tres semanas antes de la cosecha fue la



que mostró una mejor relación con respecto a las poblaciones de hongos en la cáscara.

- 10- Las poblaciones de hongos en la cáscara y el porcentaje de moho en el pedúnculo de fruta sin procesar, presentaron una mayor relación con las variables climáticas en la fruta de Sarapiquí, que en la de Puntarenas.

## RECOMENDACIONES

- 1- Se debe explorar alternativas de manejo integrado de los hongos *P. purpureogenum*, *P. diversum* y el grupo de hongos de micelio blanco y para ello, es importante tomar en cuenta el uso de sustancias GRAS, moléculas orgánicas como extractos vegetales, agentes de control biológico o bien, nuevas formulaciones de fungicidas existentes en el mercado y aprobadas para su uso en el mercado destino.
  
- 2- Es importante desarrollar investigación que permita determinar la presencia y cuantificar el inóculo de los principales hongos causantes de mohos en las diferentes fases de procesamiento, para lo cual se podría explorar la posibilidad de utilizar técnicas como el PCR en tiempo real o muestreos del aire de las cámaras de enfriamiento, a través de muestreadores de aire electrónicos, lo cual podría facilitar un diagnóstico rápido y preciso.
  
- 3- Continuar con investigaciones que permitan determinar si las levaduras y bacterias más frecuentes recuperadas en el presente estudio podrían ser agentes de control biológico de los hongos causantes de mohos en piña, o por el contrario, bajo determinadas condiciones son organismos que pueden modificar el sustrato y favorecer el desarrollo de los mohos.

- 4- Para los hongos recuperados con mayor frecuencia en el presente estudio, sería pertinente evaluar la sensibilidad *in vitro* a los principales fungicidas utilizados actualmente para el control de mohos en piña o para las nuevas moléculas.
  
- 5- Debido a que la cera acumula cargas significativas de hongos durante el procesamiento de la fruta, es importante buscar mecanismos para evitar que la cera recircule o bien, que acumule cargas importantes de estos microorganismos, para lo cual se puede explorar la posibilidad de adicionar a la cera sustancias de tipo GRAS con propiedades fungistáticas o fungicidas o bien, la pasteurización de este insumo.
  
- 6- Se considera importante que las empacadoras de piña mantengan un adecuado programa de limpieza de las instalaciones, entre estas, el área de recibo, empaque y cámaras de enfriamiento, y de las diferentes superficies con las que tiene contacto la fruta durante su procesamiento, para disminuir la cantidad de inóculo de hongos que podría tener contacto con la fruta.

## LITERATURA CITADA

- Abdel, A.A; Khoder, M.I; Ibrahim, Y.H; Saeed, Y; Osman, M.E; Ghanem, S. 2012. Study on some factors affecting survivability of airborne fungi. *Science of the Total Environment* 414: 696-700.
- Abdullah, H. 2011. Quality maintenance of pineapple in postharvest handling. *Acta Horticulturae. Proceedings of Seventh International Pineapple Symposium. Malaysia.* 606 p.
- Adaskaveg, J.E; Förster, H. 2010. New developments in postharvest fungicide registrations for edible horticultural crops and use strategies in the United States. *In: Prusky, D; Gullino, M. Postharvest pathology. New York, USA. Springer.* 211 p.
- Agrios, G. 2005. *Plant pathology. California, USA. Elsevier, Academic Press.* 5<sup>th</sup> Edition. 922 p.
- Alavi Fard, F; Etebarian, H.R; Sahebani, N. 2012. Biological control of gray mold of apple by *Candida membranifaciens*, *Rhodotorula mucilaginosa* and *Pichia guilliermondii*. *Iran Journal of Plant Pathology* 48(1): 17-26.
- Alvarado, E; Demerutis, C; Martínez, A; Gonzáles, M. 2006. Evaluación de fungicidas biológicos para el control postcosecha de la pudrición de corona y pedúnculo en piña (*Ananas comosus* (L) Merr.). *Revista Iberoamericana de Tecnología Poscosecha* 8(1): 17-25.
- Alvarez, A.M; Nishijima, W.T. 1987. Postharvest diseases of papaya. *Plant Disease* 71(8): 681-686.
- Alves, A; Crous, P.W; Correia, A; Phillips, A.J.L. 2008. Morphological and molecular data reveal cryptic speciation in *Lasiodiplodia theobromae*. *Fungal Diversity* 28: 1-13.
- Amiri, A; Bompeix, G. 2005. Diversity and population dynamics of *Penicillium* spp. on apples in pre-and postharvest environments: consequences for decay development. *Plant Pathology* 54: 74-81.
- Ansari, N. A; Feridoon, H. 2006. Postharvest application of hot water, fungicide and waxing on the shelf life of Valencia and the local orange cv. Siavarz. *Proceedings of the International Symposium on the Role of Postharvest Technology in the Globalisation of Horticulture.* 277 p.
- Anthony, S; Abeywickrama, K; Dayananda, R; Wilson, S; Arambewela, L. 2004. Fungal pathogens associated with banana fruit in Sri Lanka and their treatment with essential oils. *Mycopathologia* 157: 91-97.

- Arauz, F. 1994. Elementos básicos de patología poscosecha de frutas y hortalizas. I Taller regional de manejo poscosecha de productos de interés para el Trópico. San José, Costa Rica.
- Arauz, F. 2011. Fitopatología, un enfoque agroecológico. Segunda Edición. San José, Costa Rica. Editorial de la Universidad de Costa Rica. 519 p.
- Araya, B; Cascante, M. 2000. Manejo post-cosecha de productos agrícolas. San José, Costa Rica. Editorial UNED. 219 p.
- Arguedas, I. 2014. Estadísticas de comercio exterior Costa Rica. San José, Costa Rica. Procomer. 255 p. En línea. Consultado el: 3 de setiembre 2014. Disponible en: [www.procomer.com](http://www.procomer.com)
- Arias, C; Toledo, J. 2000. Manual de manejo poscosecha de frutas tropicales (papaya, piña, plátano, cítricos). Organización de las Naciones Unidas Para la Agricultura y la Alimentación (FAO). Roma, Italia. 136 p. En línea. Consultado el 12 de agosto de 2013. Disponible en [http://www.fao.org/inpho\\_archive/content/documents/vlibrary/ac304s/ac304s00.htm](http://www.fao.org/inpho_archive/content/documents/vlibrary/ac304s/ac304s00.htm)
- Astúa, G; Arauz, L.F. Umaña, G. 1994. Sensibilidad reducida al tiabendazole en *Colletotrichum gloeosporioides* aislado de papaya. Agronomía Costarricense 18(1): 35-39.
- Ayernor, G; Afoakwa, E; Bartels, P; Budu, A. 2010. Effects of polymeric coating and anti-fungal treatment on the shrinkage characteristics of pineapple fruits during storage. International Journal of Fruit Science 10: 309-322.
- Baert, K; Valero, A; De Meulenaer, B; Samapundo, S; Morshed, M; Bo, L; Debevere, J; Devlieghere, F. 2007. Modeling the effect of temperature on the growth rate and lag phase of *Penicillium expansum* in apples. International Journal of Food Microbiology 118: 139-150.
- Baert, K; Devlieghere, F; Bo, Li; Debevere, J; De Meulenaer, B. 2008. The effect of inoculum size on the growth of *Penicillium expansum* in apples. Food Microbiology 25: 212-217.
- Baraona, M; Sancho, E. 1998. Piña y papaya. Fruticultura especial. San José, Costa Rica. EUNED.44 p.
- Barkai-Golan, R. 2001. Postharvest diseases of fruits and vegetables. Amsterdam, England. Elsevier.418 p.
- Barkai-Golan, R. 2008. *Penicillium* mycotoxins. In: Barkai-Golan; Paster, N. Mycotoxins in fruits and vegetables. California, USA. Elsevier.395 p.
- Barnett, H.L; Hunter, B.B. 1972. Illustrated genera of imperfect fungi. Third edition. Minnesota, USA. Burgess Publishing Company. 241 p.

- 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.
- Barth, M; Hankinson, T; Zhuang, H; Breidt, F. 2009. Microbiological spoilage of fruits and vegetables. *In*: Sperber, W; Doyle, M. Compendium of the microbiological spoilage of foods and beverages. New York, USA. Springer. 367 p.
- Bartholomew, D.P; Paull, R.E; Rohrbach, K.G. 2003. The pineapple, botany, production and uses. New York, USA. CABI Publishing. 301 p.
- Benbow, J.M; Sugar, D. 1999. Fruit surface colonization and biological control of postharvest diseases of pear by preharvest yeast applications. *Plant Disease* 83: 839-844.
- Beuchat, L.R. 1988. Influence of organic acids on heat resistance characteristics of *Talaromyces flavus* ascospores. *International Journal of Food Microbiology* 6: 97-105.
- Bocco, A; Cuvelier, M; Richard, H; Berset, C. 1998. Antioxidant activity and phenolic composition of citrus peel and seed extracts. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 46: 2123-2129.
- Buttner, M.P; Stetzenbach, L.D. 1993. Monitoring airborne fungal spores in an experimental indoor environment to evaluate sampling methods and the effects of human activity on air sampling. *Applied and Environmental Microbiology* 59(1): 219-226.
- CAB. 2002. *Phoma herbarum*. *In*: Descriptions of fungi and bacteria. CABI. En línea. Disponible en: [www.cabi.org/dfb](http://www.cabi.org/dfb). Consultado el 25 de noviembre de 2013.
- CANAPEP. 2014. Estadísticas de exportaciones. En línea. Consultado el 3 de setiembre de 2014. Disponible en: [www.canapep.com](http://www.canapep.com)
- Castro, Z. 1994. Atlas Agropecuario de Costa Rica: El cultivo de la piña. San José, Costa Rica. EUNED. 513 p.
- Chanda, S; Baravalia, Y; Kaneria, M; Rakholiya, K. 2010. Fruit and vegetable peels-strong natural source of antimicrobics. *In*: Vilas, M. Current Research Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology. Badajoz, España. 788 p.
- 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: 7500-7509.

- Chen, N. J; Paull, R. E; Chen, C; Saradhuldhat; P. 2009. Pineapple production for quality and postharvest handling. *Acta Horticulturae*. Proceedings of the Sixth International Pineapple Symposium. João Pessoa, Brazil. 328 p.
- Chillet, M; Hubert, O; De Lapeyre, L. 2010. Postharvest disease: Effects of the physiological age of bananas (*Musa* spp.) on their susceptibility to wound anthracnose due to *Colletotrichum musae*. *Acta Horticulturae* 879: 419-424.
- Dennis, C. 1983. Post-harvest pathology of fruits and vegetables. London, England. Academic Press. 264 p.
- Eckert, J; Ogawa, J. 1985. The chemical control of postharvest diseases: subtropical and tropical fruits. *Annual Review of Phytopathology* 23: 421-454.
- Ellis, M.B. 1976. More dematiaceous hyphomycetes. Surrey, England. CAB. 507 p.
- Ferreira, A.P.S; Pinho, D.B; Machado, A.R; Pereira, O.L. 2014. First report of *Curvularia eragrostidis* causing postharvest rot of pineapple in Brazil. *Plant Disease* 98(9): 1277.
- Fredlund, E; Druvefors, U; Boysen, M; Lingsten, K; Schnürer, J. 2002. Physiological characteristics of the biocontrol yeast *Pichia anomala* J121. *FEMS Yeast Research* 2: 395-402.
- French, E; Hebert, T. 1980. Métodos de investigación fitopatológica. San José, Costa Rica. IICA. 289 p.
- Friel, D; Gomez, N; Vandenbol, M; Jijakli, M. 2007. Separate and combined disruptions of two exo- $\beta$ -1,3-glucanase genes decrease the efficiency of *Pichia anomala* (strain K) biocontrol against *Botrytis cinerea* on apple 20(4): 371-379.
- Garcia, D; Ramos, A.J; Sanchis, V; Marín, S. 2009. Predicting mycotoxins in foods: A review. *Food Microbiology* 26: 757-769.
- Garcia, D; Ramos, A.J; Sanchis, V; Marín, S. 2011. Intraspecific variability of growth and patulin production of 79 *Penicillium expansum* isolates at two temperatures. *International Journal of Food Microbiology* 151: 195-200.
- García, A; Rodríguez, M. 2011. Manual de buenas prácticas agrícolas para la producción de piña en Costa Rica. San José, Costa Rica. Banacol-RepCar. 66 p.

- Garita, R.A. 2014. La piña. Cartago, Costa Rica. Editorial Tecnológica de Costa Rica. 566 p.
- Garrett, K.A; Dendy, S.P; Frank, E.E; Rouse, M.N; Travers, S.E. 2006. Climate change effects on plant disease: genomes to ecosystems. Annual Review of Phytopathology 44: 489-509.
- Gholamnejad, J; Reza, H; Sahebani, N. 2010. Biological control of apple blue mold with *Candida membranifaciens* and *Rhodotorula mucilaginosa*. African Journal of Food Science 4(1): 1-7.
- González, E; Umaña, G; Arauz, L. 1999. Fluctuación poblacional de *Botryodiplodia theobromae* Pat. en mango. Agronomía Costarricense 23(1): 21-29.
- Gougouli, M; Koutsoumanis, K.P. 2010. Modelling growth of *Penicillium expansum* and *Aspergillus niger* at constant and fluctuating temperature conditions. International Journal of Food Microbiology 140: 254-262.
- Guerrero, V.M; Blanco, A.C; Guigón, C; Tamayo, C.J; Molina, F.J; Berlanga, D.I; Carvajal, E; Dolores, G. 2011. Competencia por nutrientes; modo de acción de *Candida oleophila* contra *Penicillium expansum* y *Botrytis cinerea*. Revista Mexicana de Fitopatología 29(2): 90-97.
- Guo, C; Yang, J; Wei, J; Li, Y; Xu, J; Jiang, Y. 2003. Antioxidant activities of peel, pulp and seed fractions of common fruits as determined by FRAP assay. Nutrition Research 23: 1719-1726.
- Haïssam, J.M. 2011. *Pichia anomala* in biocontrol for apples: 20 years of fundamental research and practical applications. Antonie van Leeuwenhoek 99: 93-105.
- Hajar, N; Zainal, S; Nadzirah, K.Z; Siti Roha, A.M; Atikah, O; Tengku, T.Z.M. 2012. Physicochemical properties analysis of three indexes pineapple (*Ananas comosus*) peel extract variety N36. APCBEE Procedia 4: 115-121.
- Hamamoto, H; Hasegawa, K; Nakaune, R; Jin Lee, Y; Akutsu, K; Hibi, T. 2001. PCR-based detection of sterol demethylation inhibitor-resistant strains of *Penicillium digitatum*. Pest Management Science 57: 839-843.
- Hernández, R. 2009. Sensibilidad a fungicidas poscosecha e identificación molecular del hongo *Colletotrichum* spp., agente causal de la antracnosis en frutos de banano en Costa Rica. Tesis Magister Scientiae Universidad de Costa Rica, Costa Rica. 82 p.
- Hernández, A. 2010. Chemical control of fungi pathogens in pineapple. Fitosanidad 14 (4): 235-239.



- Hjorth, K; Johansen, K; Holen, B; Andersson, A; Christensen, H.B; Siivinen, K; Toome, M. 2011. Pesticide residues in fruits and vegetables from South America- a Nordic Project. *Food Control* 22: 1701-1706.
- Hu, H; Li, X; Dong, C; Chen, W. 2011. Effects of wax treatment on quality and postharvest physiology of pineapple fruit in cold storage. *African Journal of Biotechnology* 10(39): 7592-7603.
- Hui, Y; Barta, J; Cano, M; Gusek, T. 2006. Handbook of fruits and fruit processing: science and technology. Iowa, USA. Blackwell Publishing. 697 p. Consultado el 12 de agosto de 2013. Disponible en <http://books.google.com>
- Izgu, D; Kepekci, R; Izgu, F. 2011. Inhibition of *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum* *in vitro* and *in planta* with panomycocin, a novel exo- $\beta$ -1,3- glucanase isolated from *Pichia anomala* NCYC 434. *Antonie van Leeuwenhoek* 99: 85-91.
- Jacobs, A; Van Wyk, P.S; Marasas, W.F; Wingfield, B.D; Wingfield, M.J; Coutinho, T.A. 2010. *Fusarium ananatum* sp. Nov in the *Giberella fujikuroi* species complex from pineapples with fruit rot in South Africa. *Fungal Biology* 114: 515-527.
- Jiménez, J. 1999. El cultivo de la piña. Cartago, Costa Rica. Editorial Tecnológica de Costa Rica. 224 p.
- Kader, A. 2002. Postharvest technology of horticultural crops. California, USA. University of California. Agricultural and Natural Resources. 537 p. Consultado el 13 de agosto de 2013. Disponible en <http://books.google.com>
- Kader, A; Sommer, N; Arpaia, M. 2011. Sistemas de manejo post-cosecha: Frutas tropicales. En: Kader, A. Tecnología poscosecha de cultivos hortofrutícolas. California, USA. UC DAVIS. 584 p.
- Kao, T.H; Chen, B.H. 2013. Fruits and vegetables. *In*: Chandrasakaran, M. Valorization of Food Processing by-products. New York, USA. CRC Press. 772 p.
- Kays, S. 1999. Preharvest factors affecting appearance. *Postharvest Biology and Technology* 15: 233-247.
- Kinay, P; Mansour, M; Gabler, F; Margosan, D; Smilanick, J. 2007. Characterization of fungicide-resistant isolates of *Penicillium digitatum* collected in California. *Crop Protection* 26: 647-656.
- King, A. 1997. Heat resistance of *Talaromyces flavus* ascospores as determined by a two phase slug flow heat exchanger. *International Journal of Food Microbiology* 35: 147-151.

- Korres, A.M; Ventura, J.A; Fernandes, P.M. 2010. First report of bacterium and yeasts associated with pineapple fruit collapse in Espírito Santo State, Brazil. *Plant disease* 94(12): 1509.
- Kurtzman, C. 2011. Phylogeny of the ascomycetous yeasts and the renaming of *Pichia anomala* to *Wickerhamomyces anomalus*. *Antonie van Leeuwenhoek* 99: 13-23.
- Lara, I; Belge, B; Goulao, L.F. 2014. The fruit cuticle as a modulator of postharvest quality. *Postharvest Biology and Technology* 87: 103-112.
- Lassois, L; de Lapeyre, L; Jijakli, M.H. 2008. Biological control of crown rot bananas with *Pichia anomala* strain K and *Candida oleophila* strain O. *Biological Control* 45: 410-418.
- Lata, B; Trampczynska, A; Paczesna, J. 2009. Cultivar variation in apple peel and whole fruit phenolic composition. *Scientia Horticulturae* 121: 176-181.
- Leibinger, W; Breuker, B; Hahn, M; Mendgen, K. 1997. Control of postharvest pathogens and colonization of the apple surface by antagonistic microorganisms in the field. *Phytopathology* 87: 1103-1110.
- Li, D; Kendrick, B. 1995. A year-round study on functional relationships of airborne fungi with meteorological factors. *International Journal of Biometeorology* 39: 74-80.
- Li, R; Zhang, H; Liu, W; Zheng, X. 2011. Biocontrol of postharvest gray and blue mold decay of apples with *Rhodotorula mucilaginosa* and possible mechanism of action. *International Journal of Food Microbiology* 146: 151-156.
- Lima, J.R; Gondim, D.M.F; Oliveira, J.T.A; Oliveira, F.S.A; Gonçalves, L.R.B; Viana, F.M.P. 2013. Use of killer yeast in the management of postharvest papaya anthracnose. *Postharvest Biology and Technology* 83: 58-64.
- Lin, X; Li, X; Chen, W. 2013. Effect of wax treatment on the quality and postharvest physiology of pineapple fruits. *Acta Horticulturae* 975: 519-526.
- López, C. 2012. Frecuencia de los principales organismos asociados con el moho en el corte de piña (*Ananas comosus*) var. Dorada Extradulce, patogenicidad y sensibilidad al fungicida triadimefon. Tesis de Licenciatura en Agronomía. Costa Rica, Universidad de Costa Rica. 71 p.
- MAG. 2010. Manual de buenas prácticas agrícolas para la producción de piña. MAG. San José, Costa Rica. 133 p.
- Malacinski, G. 2003. Essentials of molecular biology. Jones and Bartlett Publishers. Massachusetts, USA. 4 th Edition. 491 p.

- Malins, A. 1991. Second regional workshop in tropical fruit crops, papaya, pineapple and mango. Antigua & Barbuda. IICA.97 p.
- Manso, T; Nunes, C. 2011. *Metschnikowia andauensis* as a new biocontrol agent of fruit postharvest diseases. *Postharvest Biology and Technology* 61: 64-71.
- Marin-Cevada, V; Caballero-Mellado, J; Bustilos-Cristales, R; Muñoz-Rojas, J; Mascarua-Esparza, M; Castañeda-Lucio, M; Lopez-Reyes, L; Martínez-Aguilar, L; Fuentes-Ramírez, L. 2010. *Tatumella ptyseos*, an unrevealed causative agent of pink disease in pineapple. *Journal of Phytopathology* 158:93-99.
- Martínez, E. 2003. Estudio de especies micotoxígenas del género *Penicillium*: *Penicillium verrucosum* Dierckx. Tesis Doctorado en veterinaria. Barcelona, España. Universitat Autònoma de Barcelona. 288 p.
- Mata, M. 2009. Estudio de la eficacia de cuatro desinfectantes comerciales para la desinfección de piña (*Ananas comosus* cv. MD-2) en la empresa TROPIFROST S.A. Tesis de Licenciatura en Tecnología de Alimentos. Costa Rica, Universidad de Costa Rica. 53 p.
- Mitra, S. 1997. Postharvest physiology and storage of tropical and subtropical fruits. London, England. Cab International. 423 p.
- Moalemiyan, M; Vikram, A; Kushalappa, A.C. 2007. Detection and discrimination of two fungal diseases of mango (cv. Keitt) fruit based on volatile metabolite profiles using GC/MS. *Postharvest Biology and Technology* 45: 117-125.
- Mohammed, M. 1993. Optimizing postharvest handling and maintaining quality of fresh pineapples (*Ananas comosus* (L)).Trinidad & Tobago. IICA.10 p.
- Mohammed, M. 1994. Regional Workshop on pineapple in Martinique. Postharvest physiology of pineapples. Martinique. IICA. 49 p. Consultado el 30 de setiembre de 2011. Disponible en <http://books.google.co.cr/books?id=R8s>
- Mokbel, M.S; Hashinaga, F. 2005. Antibacterial and antioxidant activities of banana peel (*Musa*, AAA cv. Cavendish) fruits peel. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology* 1(3): 125-131.
- Montero, M; Cerdas, M. 2005. Guías técnicas para el manejo poscosecha para el mercado fresco, piña (*Ananas comosus*). San José, Costa Rica. Ministerio de Agricultura y Ganadería. 46 p.
- Montero-Calderón, M; Rojas-Graü, M.A; Martín-Belloso, O. 2008. Effect of packaging conditions on quality and shelf-life of fresh-cut pineapple (*Ananas comosus*). *Postharvest Biology and Technology* 50: 182-189.

- Morales, H; Sanchis, V; Coromines, J; Ramos, A.J; Marín, S. 2008. Inoculum size and intraspecific interactions affects *Penicillium expansum* growth and patulin accumulation in apples. *Food Microbiology* 25: 378-385.
- Morales, H; Marín, S; Ramos, A; Sanchis, V. 2010. Influence of post-harvest technologies applied during cold storage of apples in *Penicillium expansum* growth and patulin accumulation: A review. *Food Control* 21: 953-962.
- Mourichon, X. 1998. Pineapple fruit core rot (black spot) and leathery pocket: review and prospects. *Acta Horticulturae, Proceedings of 2<sup>nd</sup> International Pineapple Symposium*. Montpellier, Francia. 508 p.
- Mueller, D.S; Buck, J.W. 2003. Effects of light, temperature and leaf wetness duration on daylily rust. *Plant Disease* 87: 442-445.
- Murray, M.G; Thompson, W.F. 1985. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acid Research* 8(19): 4321-4325.
- Narayanasamy, P. 2006. *Postharvest pathogens and disease management*. New Jersey, USA. Wiley. 563 p. Consultado el 20 de enero de 2014. Disponible en: <http://books.google.com>
- Nimitkeatkai, H; Srilaong, V; Kanlayanarat, S. 2006. Effect of edible coating on pineapple fruit quality during cold storage. *Acta Horticulturae* 712: 643-648.
- O' Gorman, C; Fuller, H. 2008. Prevalence of culturable airborne spores of selected allergenic and pathogenic fungi in outdoor air. *Atmospheric Environment* 42: 4355-4368.
- Páez, O; Valverde, R; Gómez, L; Brenes, A. 2005. Diversidad genética de aislamientos de *Phytophthora infestans* en plantaciones de papa en Costa Rica con el uso de RAPDs. *Agronomía Costarricense* 29(1): 41-55.
- Pardo, E; Malet, M; Marín, S; Sanchis, V; Ramos, A.J. 2006. Effects of water activity and temperature on germination and growth profiles of ochratoxigenic *Penicillium verrucosum* isolates on barley meal extract agar. *International Journal of Food Microbiology* 106: 25-31.
- Pasanen, A.L; Pasanen, P; Jantunen, M.J; Kalliokoski, P. 1991. Significance of air humidity and air velocity for fungal spore release into the air. *Atmospheric Environment* 25(2): 459-462.
- Passoth, V; Olstorpe, M; Schnürer, J. 2011. Past, present and future research directions with *Pichia anomala*. *Antonie van Leeuwenhoek* 99: 121-125.
- Paterson, R.R.M; Sariah, M; Lima, N. 2013. How will climate change affect oil palm fungal diseases?. *Crop Protection* 46: 113-120.

- Paull, R. 1993. Postharvest handling of Smooth Cayenne pineapple in Hawaii for the fresh fruit market. *Acta Horticulturae*. First International Pineapple Symposium. Honolulu Hawaii. 285 p.
- Paull, E; Duarte, O. 2011. Tropical fruits. London, England. Cab International. 2<sup>nd</sup> Edition. 400 p.
- Paull, R.E; Lobo, M.G. 2012. Pineapple. *In*: Siddiq, M. Tropical and subtropical fruits. Postharvest physiology, processing and packaging. Iowa, USA. Wiley-blackwell. 631 p.
- Paull, R.E; Reyes, M.E. 1996. Preharvest weather conditions and pineapple fruit translucency. *Scientia Horticulturae* 66: 59-67.
- Petty, G.J; Tustin, H.A; Dicks, H.M. 2006. Control of black spot disease/fruitlet core rot in Queen pineapple with integrated mealybug, pineapple fruit mite and fungus control programmes. *Acta Horticulturae* 702: 143-149.
- Phaff, H. 2001. Yeasts. *Encyclopedia of life sciences*. New York, USA. Nature Publishing Group. pp: 1-11.
- Pinto, A; Haroldo, D. 2004. *Cultura do abacaxi: sistema de produção para Itaberaba/BA*. Bahia, Brazil. Embrapa. 35 p.
- Pitt, J; Hocking, A.D. 2009. *Fungi and food spoilage*. New York, USA. Springer. 519 p. Consultado el 19 de mayo de 2012. Disponible en: [books.google.co.cr/books](http://books.google.co.cr/books).
- 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: 219-225.
- Plaza, P; Usall, J; Teixidó, N; Viñas, I. 2003. Effect of water activity and temperature on germination and growth of *Penicillium digitatum*, *P. italicum* and *Geotrichum candidum*. *Journal of Applied Microbiology* 94: 549-554.
- Plaza, P; Usall, J; Teixidó, N; Viñas, I. 2004. Effect of water activity and temperature on competing abilities of common postharvest citrus fungi. *International Journal of Food Microbiology* 90: 75-82.
- Ploetz, R. 2001. Significant diseases in the tropics that are caused by species of *Fusarium*. *In*: Summerell, B; Leslie, J; Backhouse, D; Bryden, W; Burgess, L. *Fusarium*. Minnesota, USA. APS Press. 392 p.
- Ploetz, R. 2007. Diseases of tropical perennial crops: challenging problems in diverse environments. *Plant Disease* 91(6): 644-663.
- Poole, G; Smiley, R; Walker, C; Huggins, D; Rupp, R; Abatzoglou, J; Garland-Campbell, K; Paulitz, T. 2013. Effect of climate on the distribution of

- Fusarium* spp. causing crown rot of wheat in the Pacific Northwest of the United States. *Phytopathology* 103(11): 1130-1140.
- Prakongpan, T; Nitithamyong, A; Luangpituksa, P. 2002. Extraction and application of dietary fiber and cellulose from pineapple cores. *Journal of Food Science* 67(4): 1308-1313.
- Prusky, D; Gullino, M. 2010. *Postharvest Pathology*. New York, USA. Springer. 1150 p.
- Reyes, D. 2012. Compuestos GRAS para el control de patógenos poscosecha *in vitro* en mango (*Mangifera indica* L.), piña (*Ananas comosus* L.) y papaya (*Carica papaya* L.), y pruebas de eficacia *in vivo* en piña. Tesis de Licenciatura en Agronomía. Costa Rica, Universidad de Costa Rica. 92 p.
- Reyes, M. 1999. Use of microbial antagonists to control postharvest black rot on pineapple fruit. Tesis de Doctorado en Horticultura. Hawaii, Universidad de Hawaii. 128 p.
- Reyes, M; Rohrbach, K; Paull, R. 2004. Microbial antagonists control postharvest black rot of pineapple fruit. *Postharvest Biology and Technology* 33: 193-203.
- Rivera, G. 1999. Conceptos introductorios a la fitopatología. San José, Costa Rica. Editorial UNED. 308 p.
- Robinson, J. 1996. Bananas and plantains. Nelsprut, South Africa. CAB International. 238 p.
- Rohrbach, K.G; Pfeiffer, J.B. 1975. The field induction of bacterial pink disease in pineapple fruit. *Phytopathology* 65: 803-805.
- Rohrbach, K.G; Schmitt, D. 2003. Diseases of pineapple. *In*: Ploetz, R. Diseases of tropical fruit crops. Florida, USA. CABI Publishing. 527 p.
- Rohrbach, K.G; Taniguchi, G. 1984. Effects of temperature and stage of inflorescence development on infection of pineapple by *Penicillium funiculosum* and *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans*. *Phytopathology* 74(8): 995-1000.
- Rohrbach, K. 1994. Perspectives on pineapple fresh fruit production, handling and marketing. I Taller regional de manejo poscosecha de productos de interés para el Trópico. San José, Costa Rica. s.p.
- Saborío, D; Camacho, O. 1996. Descripción del manejo poscosecha y factores de rechazo de piña (var. Cayenna Lisa y clon Champaña) para exportación de la zona norte de Costa Rica. *Agronomía Costarricense* 20(1): 67-73.

- Saborío, D.A; Fonseca, J.M. 2011. Effect of alternative coatings and waxes on postharvest quality and shelf life of pineapples (*Ananas comosus* 'MD-2') grown in Costa Rica for export. *Acta Horticulturae* 906: 245-252.
- Salazar, E. 2010. Identificación molecular del hongo *Colletotrichum* spp. aislado de banano (*Musa* sp.) de altura en la zona de Turrialba y determinación de su sensibilidad a fungicidas poscosecha. Tesis Licenciatura en Agronomía. Costa Rica, Universidad de Costa Rica. 84 p.
- Sánchez-Torres, P; Tuset, J. 2011. Molecular insights into fungicide resistance in sensitive and resistant *Penicillium digitatum* strains infecting citrus. *Postharvest Biology and Technology* 59: 159-165.
- Saradhuldhat, P; Paull, R. 2007. Pineapple organic acid metabolism and accumulation during fruit development. *Scientia Horticulturae* 112: 297-303.
- Seifert, K; Morgan-Jones, G; Gams, W; Kendrick, B. 2011. The genera of hyphomycetes. Utrecht, Netherlands. CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre. 997 p.
- SEPSA. 2013. Boletín estadístico agropecuario. San José, Costa Rica. 186 p. En línea. Consultado el 3 de setiembre de 2014. Disponible en: [www.infoagro.go.cr](http://www.infoagro.go.cr)
- Sharma, R.R; Singh, D; Singh, R. 2009. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: A review. *Biological Control* 50: 205-221.
- Shrestha, P; Szaro, T.M; Bruns, T.D; Taylor, J.W. 2011. Systematic search of cultivable fungi that best deconstruct cell walls of *Miscanthus* and sugarcane in the field. *Applied and environmental microbiology* 77(15): 5490-5504.
- Snowdon, A. 2000. A color Atlas of post-harvest diseases & disorders of fruits and vegetables. Vol 1. Florida, USA. CRC Press. 302 p.
- Stępień, L; Koczyk, G; Waśkiewicz, A. 2011a. FUM cluster divergence in fumonisins-producing *Fusarium* species. *Fungal Biology* 115: 112-123.
- Stępień, L; Koczyk, G; Waśkiewicz, A. 2011b. Genetic and phenotypic variation of *Fusarium proliferatum* isolates from different host species. *Journal of Applied Genetics* 52: 487-496.
- Stępień, L; koczyk, G; Waśkiewicz, A. 2013. Diversity of *Fusarium* species and mycotoxins contaminating pineapple. *Journal of Applied Genetics* 54(3): 367-380.

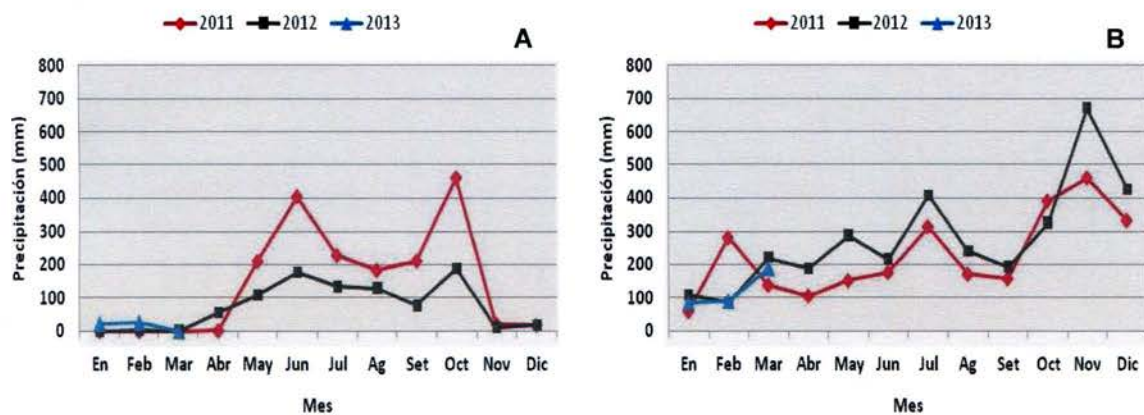
- Syazwani, S; Nurliya, I; Ding, P. 2013. Storage quality of 'MD2' pineapple (*Ananas comosus* L.) fruits. *Acta Horticulturae* 1012: 897-902.
- Tapsoba, H; Wilson, J.P. 1997. Effects of temperature and light on germination of uredinospores of the pearl millet rust pathogen, *Puccinia substriata* var. *indica*. *Plant Disease* 81: 1049-1052.
- Tewari, J. 2002. Plant pathogen pest management. *In*: Pimentel, D. Encyclopedia of pest management. New York, USA. Marcel Dekker. 931 p.
- 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.
- Tortora, G; Funke, B; Case, C. 2007. Introducción a la microbiología. Buenos Aires, Argentina. Editorial Médica Panamericana. 9° Edición. 963 p.
- Umaña-Rojas, G; García, J. 2011. Patogenicidad de organismos asociados con la pudrición de corona en dos cultivares de banano. *Acta Horticulturae* 906: 219-224.
- Voldřich, M; Dobiáš, J; Tichá, L; Čeřovský, M; Krátká, J. 2004. Resistance of vegetative cells and ascospores of heat resistant mould *Talaromyces avellaneus* to the high pressure treatment in apple juice. *Journal of Food Engineering* 61: 541-543.
- Von Arx, J.A. 1974. The genera of fungi. Sporulating in pure culture. Leutershausen, Germany. J. Cramer. 315 p.
- Walker, G. 2011. *Pichia anomala*: cell physiology and biotechnology relative to other yeasts. *Antonie van Leeuwenhoek* 99: 25-34.
- Waugh, M.M; Kim, D.H; Ferrin, D.M; Stanghellini, M.E. 2003. Reproductive potential of *Monosporascus cannonballus*. *Plant Disease* 87: 45-50.
- Watanabe, T. 1994. Soil and seed fungi. Morphologies of cultured fungi and key to species. Tokyo, Japan. Lewis Publishers. 411 p.
- White, T.J; Bruns, T.D; Lee, S; Taylor, J.W. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes phylogenetics. *In* 'PCR protocols: a guide to methods and applications'. Eds MA Innis. DH Gelfand. pp: 315-322.
- Wijeratnam, R.S; Hewajulige, I.G.N; Abeyratne, N. 2005. Postharvest hot water treatment for the control of *Thielaviopsis* black rot of pineapple. *Postharvest Biology and Technology* 36: 323-327.



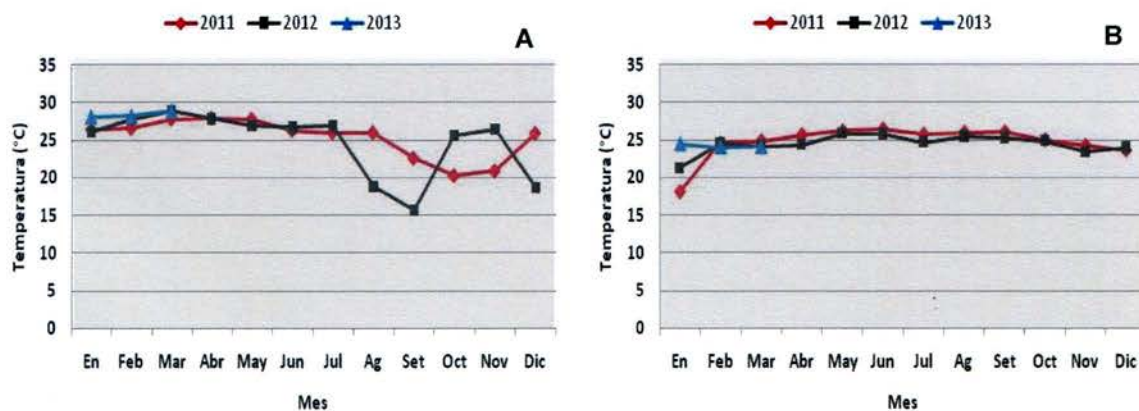
- Wills, R; Mc Glasson, B; Graham, D; Joyce, D. 1998. Postharvest. An introduction to the physiology & handling of fruit, vegetables & ornamentals. Sydney, Australia. Cab International. 262 p.
- Wu, B.M; Subbarao, K.V; van Bruggen, A.H. 2005. Analyses of the relationship between lettuce downy mildew and weather variables using geographic information system techniques. *Plant Disease* 89: 90-96.
- Wu, Y; Chan, C; Rao, C; Lee, C; Hsu, H; Chiu, Y; Chao, H. 2007. Characteristics, determinants and spatial variations of ambient fungal levels in the subtropical Taipei metropolis. *Atmospheric Environment* 41: 2500-2509.

## ANEXOS

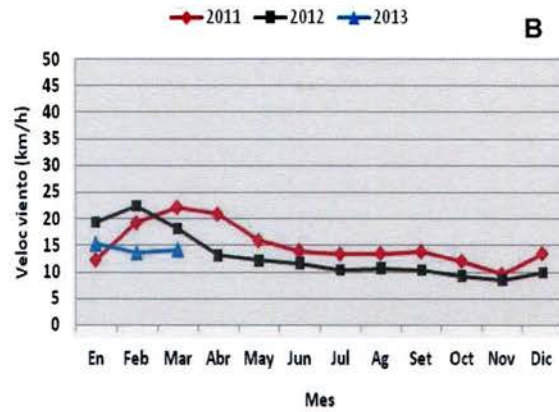
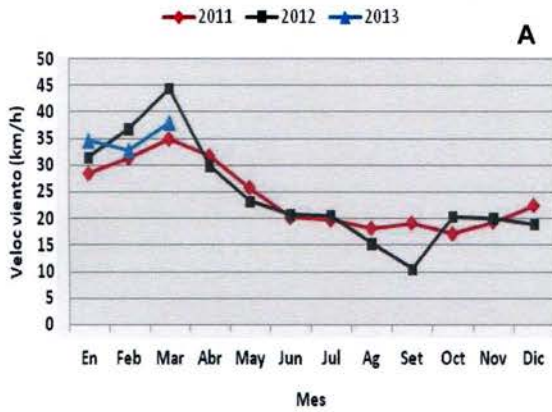
**ANEXO 1.** Precipitación mensual acumulada (mm) desde 2011 hasta marzo de 2013 en las fincas de Puntarenas (A) y Sarapiquí (B).



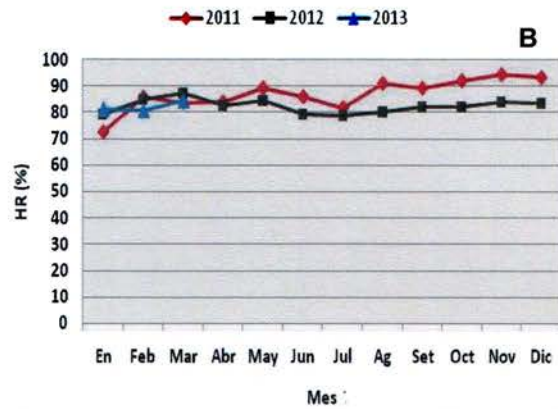
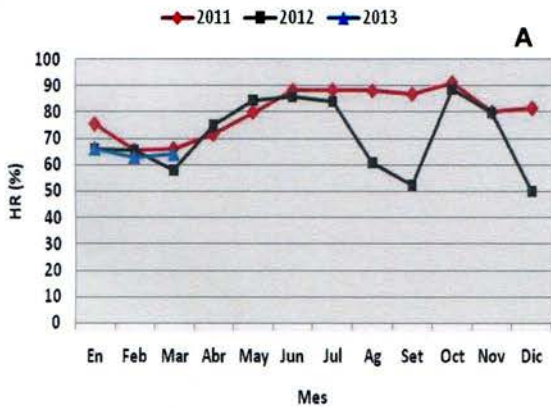
**ANEXO 2.** Promedio mensual de temperatura (°C) desde 2011 hasta marzo de 2013 en las fincas de Puntarenas (A) y Sarapiquí (B).



**ANEXO 3.** Promedio mensual de velocidad del viento (km/h) desde 2011 hasta marzo de 2013 en las fincas de Puntarenas (A) y Sarapiquí (B).



**ANEXO 4.** Promedio mensual de humedad relativa (%HR) desde 2011 hasta marzo de 2013 en las fincas de Puntarenas (A) y Sarapiquí (B).



**ANEXO 5.** Promedio mensual de UFC de hongos en las diferentes fases de procesamiento y en los tejidos de la fruta de la finca de Sarapiquí (datos sin transformar).

Muestra	Unidad	2012										2013		
		Abril	Mayo	Junio	Julio	Agosto	Setiembre	Octubre	Noviembre	Diciembre	Enero	Febrero	Marzo	
Agua		0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	
Cera		3.333	0	14.000	25.333	32.000	17.333	0	33.333	16.000	667	5.333	6.000	
Cásc P		48.000	0	90.864	53.000	59.800	44.400	47.200	152.400	128.400	1.800	36.400	24.400	
Cásc SP		21.667	25.200	143.487	48.400	88.250	11.600	150.000	220.000	179.800	1.600	84.400	117.000	
Cásc P 22 d	UFC/mL	58.000		49.100	202.000	38.000	27.800	54.000	176.000	274.000	24.000	8.000	154.000	
Cásc SP 22 d		88.000		291.800	102.000	134.000	8.400	96.000	382.000	430.000	0	108.000	60.000	
Corte P		0	0	25	0	0	200	0	0	0	0	0	0	
Corte SP		5.000	0	7	200	0	1.600	2.000	400	0	0	0	0	
Corte P 22 d		96.000	*	127.100	42.000	2.000	400	22.000	0	0	6.000	430.000	378.000	
Corte SP 22 d		190.000	*	52.727	78.000	128.000	12.000	300.000	86.000	20.000	158.000	292.000	160.000	
Cámara	UFC/placa	6	4	18	10	19	4	1	4	8	13	2	21	

**ANEXO 6.** Promedio mensual de UFC de hongos en las diferentes fases de procesamiento y en los tejidos de la fruta de la finca de Puntarenas (datos sin transformar).

Muestra	Unidad	2012										2013		
		Abril	Mayo	Junio	Julio	Agosto	Setiembre	Octubre	Noviembre	Diciembre	Enero	Febrero	Marzo	
Agua		0	7	0	49	0	0	1	1	1	1	16	2	
Cera		3.000	5.333	16.667	2.667	4.375	2.000	7.500	667	704	1.333	0	11.333	
Cásc P		16.845	54.000	43.000	28.800	18.400	14.667	21.400	10.000	32.600	1.200	1.600	123.800	
Cásc SP		6.069	440.000	37.200	51.200	83.000	72.600	132.800	15.000	35.600	4.400	6.000	94.400	
Cásc P 22 d	UFC/mL	0	166.000	44.000	136.000	*	162.000	248.000	30.000	80.000	1.182.000	112.000	166.000	
Cásc SP 22 d		2.000	120.000	172.000	168.000	*	36.000	1.106.000	36.000	136.000	16.000	228.000	12.000	
Corte P		3.280	22.000	0	200	0	0	0	0	0	200	0	0	
Corte SP		6.429	0	400	1.000	600	0	0	0	1.000	400	0	400	
Corte P 22 d		0	70.000	68.000	8.000	*	0	30.000	0	0	0	2.000	0	
Corte SP 22 d		14.000	250.000	226.000	10.000	*	44.000	30.000	34.000	92.000	70.000	12.000	62.000	
Cámara	UFC/placa	1	2	1	3	0	1	0	1	2	0	0	1	

**ANEXO 7.** Promedio mensual de levaduras y bacterias en las diferentes fases de procesamiento y en los tejidos de la fruta de la finca de Sarapiquí (datos sin transformar).

Muestra	Unidad	2012										2013		
		Abril	Mayo	Junio	Julio	Agosto	Setiembre	Octubre	Noviembre	Diciembre	Enero	Febrero	Marzo	
Agua		0	0	3	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cera		12.000	14.000	134.667	126.667	0	667	0	0	0	0	0	667	5.333
Cásc P		28.000	7.200	15.400	31.600	2.000	1.200	9.600	11.200	10.000	14.800	7.800	16.000	
Cásc SP		121.667	27.200	27.087	36.600	12.500	4.400	600	22.000	9.800	4.200	34.200	3.800	
Cásc P 22 d	UFC/mL	140.000		200.800	458.000	396.000	10.800	314.000	1.524.000	88.000	154.000	60.000	32.000	
Cásc SP 22 d		68.000		38.700	16.000	88.000	2.200	28.000	222.000	26.000	4.000	80.000	2.000	
Corte P		0	4.200	69	600	0	0	0	0	0	200	400	1.800	
Corte SP		10.000	10.200	5.953	63.800	2.750	22.600	2.000	400	5.600	3.600	25.000	43.200	
Corte P 22 d		192.000	*	113.700	550.000	42.000	0	2.000	154.000	0	36.000	752.000	200.000	
Corte SP 22 d		1.738.000	*	346.818	4.252.000	874.000	15.400	1.092.000	1.368.000	960.000	240.000	794.000	998.000	
Cámara	UFC/placa	7	8	7	3	1	1	1	1	0	6	7	1	

**ANEXO 8.** Promedio mensual de levaduras y bacterias en las diferentes fases de procesamiento y en los tejidos de la fruta de la finca de Puntarenas (datos sin transformar).

Muestra	Unidad	2012										2013		
		Abril	Mayo	Junio	Julio	Agosto	Setiembre	Octubre	Noviembre	Diciembre	Enero	Febrero	Marzo	
Agua		17.895	1.713	0	77	0	0	0	0	1	0	2	24	
Cera		1.342.000	46.000	6.667	215.333	13.125	3.333	625	0	2.000	0	2.000	0	
Casc P		117.260	72.000	23.600	21.400	87.600	8.833	17.200	21.000	12.200	1.000	7.000	18.000	
Casc SP		242.644	1.198.000	36.200	83.200	60.800	6.800	8.000	14.000	6.400	600	14.400	49.000	
Casc P Final		18.000	360.000	492.000	236.000	*	352.000	424.000	398.000	676.000	436.000	448.000	222.000	
Casc SP Final		52.000	340.000	112.000	228.000	*	74.000	1.702.000	84.000	64.000	62.000	102.000	354.000	
Corte P		52.227	0	200	1.400	3.200	250	0	0	0	0	0	0	
Corte SP		16.674	2.000	84.000	25.200	34.800	2.600	13.800	1.500	6.400	4.000	15.800	2.400	
Corte P Final		4.000	690.000	516.000	998.000	*	1.012.000	242.000	792.000	0	98.000	110.000	110.000	
Corte SP Final		108.000	648.000	234.000	6.504.000	*	6.784.000	4.986.000	1.488.000	736.000	5.092.000	340.000	950.000	
Cámara		2	1	1	5	2	2	2	4	4	2	9	1	