

Modelado del crecimiento de hongos fitopatógenos aislados de frutos de aguacate Hass

Iñiguez-Moreno, M.^{1,2} • Sandoval-Contreras, T.¹
Ragazzo-Sánchez, J. A.² • Calderón-Santoyo, M.^{2*}

Palabras clave: micología predictiva, *Colletotrichum gloeosporioides*, antracnosis, pérdidas postcosecha
Key words: predictive mycology, *Colletotrichum gloeosporioides*, anthracnose, postharvest losses

Introducción

El fruto del aguacate tiene un alto valor económico en el mundo. Sin embargo, esta fruta es altamente susceptible a daños mecánicos (especialmente magulladuras), deterioro fisiológico y descomposición microbiológica durante la etapa de postcosecha. Las principales pérdidas durante esta etapa se atribuyen a la antracnosis causada por *Colletotrichum gloeosporioides*, cuyas infecciones a menudo comienzan en la etapa de precosecha. La antracnosis es una enfermedad común en frutos tropicales, caracterizada por la aparición de lesiones necróticas hundidas de color marrón oscuro o negro, con la formación de masas conidiales color naranja, que finalmente resulta en la pudrición del tejido. Esta enfermedad afecta tanto

a frutos como a hojas, flores, tallos y raíces [1]. En aguacate, la antracnosis es causada principalmente por hongos de los géneros *Colletotrichum*, *Neofusicoccum* y *Diaporthe*; siendo *Colletotrichum* el principal agente causal de esta enfermedad. Diversas especies de *Colletotrichum* se han asociado a la antracnosis en aguacate en diferentes países, *Colletotrichum gigasporum* y *C. gloeosporioides* en Sri Lanka, *Colletotrichum fructicola* y *C. gloeosporioides* en Italia. Mientras que en México, las especies de este género principalmente aisladas de aguacates con antracnosis son *C. gloeosporioides*, *Colletotrichum acutatum*, *Colletotrichum boninense*, *Colletotrichum hymenocallidis*, *Colletotrichum siamense* y *Colletotrichum tropicale* [1,2].

1 Instituto de Ciencias Aplicadas y Tecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, 04510, Ciudad de México, México. Teléfono: +52(55) 5622-8602.

2 Laboratorio Integral de Investigación en Alimentos, Instituto Tecnológico de Tepic/Tecnológico Nacional de México, Av. Tecnológico 2595, Lagos del Country, 63175, Tepic, Nayarit, México. Teléfono: +52(311) 211-9400.

* mcalderon@ittpic.edu.mx



Diversos factores entre los que se incluyen tanto las características intrínsecas del fitopatógeno, como las extrínsecas (fruta huésped, el clima y las condiciones de almacenamiento) determinan la incidencia y la gravedad de la antracnosis. El desarrollo visible de hongos fitopatógenos es uno de los problemas de calidad más importantes en muchos productos, incluido el aguacate. Esto tiene importantes implicaciones económicas para la industria alimentaria, ya que un producto es rechazado para la venta cuando el desarrollo del hongo se vuelve visible [3]. Debido a que en los frutos de aguacate los hongos llegan a la fruta y se mantienen en estado quiescente hasta que comienza el proceso de maduración, es necesario utilizar herramientas para predecir su crecimiento. Aunado a ello, hasta donde sabemos no se ha modelado el crecimiento de los hongos causantes de la antracnosis en frutos de aguacates. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue obtener el modelo primario del crecimiento de hongos fitopatógenos previamente aislados de aguacate Hass.

Metodología

Hongos fitopatógenos

Ocho hongos fitopatógenos [*C. gloeosporioides* (Pa1, Pa2, Pa3, Pa5, Pa8 y Pa14), *C. boninense* (Pa6) y *Fusarium incarnatum* (Pa12)] previamente aislados de frutos aguacate, fueron reactivados en agar papa dextrosa (APD, Bioxon®, Becton Dickinson and Company, Querétaro, México) y se obtuvieron suspensiones de esporas, ambos protocolos de acuerdo a lo descrito por Iñiguez-Moreno y cols. [2].

Modelado del crecimiento de los hongos

Para evaluar el crecimiento de los hongos se utilizó un modelo primario. Brevemente, 10 µL de la suspensión de esporas de cada hongo a una concentración de 1 x10⁵ esporas/mL fueron colocados en el centro de cajas de Petri con APD (actividad de agua, a_a = 0.99)

y fueron incubados a 25 °C durante 7 días. Una vez que el crecimiento comenzó, el diámetro de las colonias (mm) fue medido por duplicado. El crecimiento radial fue evaluado graficando el radio de la colonia (mm) versus el tiempo (días). Para cada hongo, se utilizó una regresión no lineal para estimar la velocidad máxima de crecimiento (µ_{máx.}, mm/día), fase lag (λ) y radio máximo de la colonia (R, mm) para el ajuste de los datos experimentales se utilizó el modelo de Baranyi y Roberts [4] (Figura 1 y 2), el cual representa las tres fases de crecimiento (fase lag, linear y asintótica) donde R₀ es el radio de la colonia al tiempo 0, R_{máx} es el máximo radio de la colonia alcanzado en la caja de Petri, A es una integral de la variable que va de 0 a t en función de la curva de la gráfica, λ es el tiempo de la fase lag (días) y t es el tiempo (días). El tiempo que el micelio sea visible en las cajas de Petri (t_v) fue calculado usando la función Solver de Excel® (Microsoft, Redmond, EE. UU.) utilizando el modelo de Baranyi y Roberts [4] Cada experimento fue realizado por triplicado

La bondad del ajuste del modelo a los datos experimentales se evaluó mediante el coeficiente de determinación (R², Figura 3) y el error cuadrático medio (RMSE, del inglés *root mean square error*, Figura. 4) donde CME es el cuadrado medio del error y MTC es la media de la suma total de cuadrados. y y* son los datos experimentales y los datos estimados, respectivamente y z es el número de datos experimentales.

Análisis estadístico

Para modelar las curvas de crecimiento se utilizó el algoritmo de Marquardt. El análisis estadístico de los datos se realizó con el software Statgraphics Centurion XV.I ® (Statpoint Technologies, Inc., Warrenton, EE. UU.). Además, se utilizó la prueba de la mínima diferencia significativa de Fisher (p ≤ 0.05) de LSD para la comparación de medias.

$$R = R_0 \mu_{max} A - \ln \left[1 + \frac{\exp(\mu_{max} A) - 1}{\exp(R_{max} - R_0)} \right]$$

Figura 1. Ecuación 1

$$A = t + \left(\frac{1}{\mu_{max}} \right) \ln [\exp(-\mu_{max} t) + \exp(-\mu_{max} \lambda) - \exp(-\mu_{max} t - \mu_{max} \lambda)]$$

Figura 2. Ecuación 2

$$R^2 = 1 - \frac{CME}{MTC}$$

Figura 3. Ecuación 3

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum_{k=1}^z (y_k - y_k^*)^2}{z}}$$

Figura 4. Ecuación 4

Resultados y discusión

De acuerdo con el modelo de Baranyi y Roberts [4] los datos experimentales de los ocho hongos evaluados presentaron una cinética sigmoideal (Figura 5). Los gráficos obtenidos fueron similares para todos los hongos identificados como *C. gloeosporioides*, sin embargo, fueron diferentes para *C. boninense* Pa6 y *F. incarnatum* Pa12 (Figura 5). La bondad de ajuste fue satisfactoria para todos ellos ($R^2 > 99\%$ y $RMSE < 0.8$; Tabla 1). La fase lag es un periodo de adaptación, en el cual se supone que las esporas no se replican; por lo tanto, la tasa de crecimiento es cero. Una vez adaptadas las esporas comienzan a crecer en la medida en que las condiciones ambientales lo permitan [4]. El valor estimado para la fase de latencia más corto fue de 0.12 días dado por *F. incarnatum* Pa12 ($p \leq 0.05$).

Mientras que, los valores estimados para los hongos del género *Colletotrichum* no mostraron diferencia significativa ($p > 0.05$, Tabla 1). Lo cual a su vez reduce e incrementa; respectivamente, el tiempo requerido para que el micelio sea visible en las cajas de Petri ($p \leq 0.05$, Tabla 1). Para *Fusarium spp.*, previamente se ha estimado una fase de latencia de hasta 23 h [5]. La variabilidad en esta fase está fuertemente ligada a la temperatura y a_d [6]. Además, esta fase se incrementa cuando las esporas se obtienen de cultivos de 8 a 12 días y disminuye con el uso de altas concentraciones de esporas. Debido a que una alta concentración de esporas puede desarrollar micelio visible antes que cuando se utiliza una concentración baja de esporas (Tabla 1) [7].

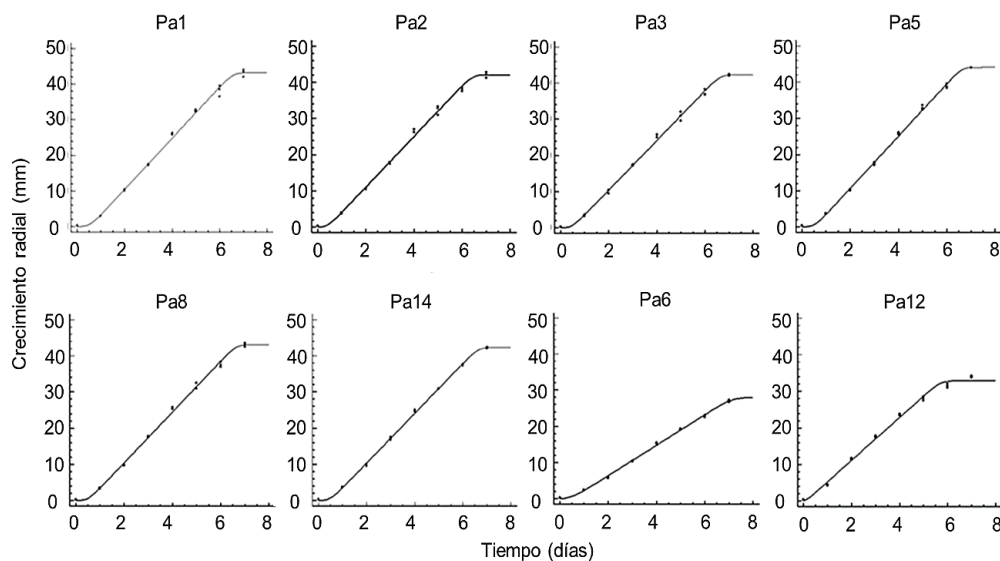


Figura 5. Crecimiento radial (mm) versus tiempo (días) para ocho hongos fitopatógenos aislados de fruto de aguacate. Los puntos son los datos observados y las líneas indican el ajuste de los datos al modelo de Baranyi y Roberts [4]. *Colletotrichum gloeosporioides* (Pa1, Pa2, Pa3, Pa5, Pa8 y Pa14), *Colletotrichum boninense* (Pa6) y *Fusarium incarnatum* (Pa12).

Tabla 1. Coeficientes estimados para el modelo de Baranyi y Roberts [4] para los hongos aislados del fruto del aguacate.

Hongo	Velocidad de crecimiento (mm/día)	Fase lag (días)	t_v (días)	Radio máximo de la colonia (mm)	R ² (%)	RMSE
Pa1	7.18 ± 0.12 ^{ab}	0.54 ± 0.05 ^a	0.61 ± 0.06 ^{ab}	43.19 ± 0.53 ^a	99.71	0.76
Pa2	7.00 ± 0.12 ^{bc}	0.42 ± 0.06 ^b	0.51 ± 0.04 ^c	42.06 ± 0.51 ^b	99.70	0.75
Pa3	6.85 ± 0.10 ^c	0.47 ± 0.05 ^{ab}	0.56 ± 0.03 ^{bc}	42.33 ± 0.45 ^a	99.79	0.51
Pa5	7.23 ± 0.08 ^a	0.54 ± 0.04 ^a	0.61 ± 0.01 ^{ab}	44.06 ± 0.36 ^a	99.87	0.34
Pa6	4.21 ± 0.06 ^e	0.48 ± 0.05 ^{ab}	0.63 ± 0.02 ^a	27.98 ± 0.77 ^d	99.84	0.15
Pa8	7.02 ± 0.10 ^b	0.51 ± 0.05 ^{ab}	0.59 ± 0.03 ^{ab}	43.07 ± 0.44 ^a	99.81	0.49
Pa12	5.87 ± 0.16 ^d	0.12 ± 0.09 ^c	0.25 ± 0.04 ^d	32.94 ± 0.39 ^c	99.52	0.76
Pa14	6.87 ± 0.06 ^c	0.50 ± 0.03 ^{ab}	0.58 ± 0.03 ^{ab}	42.34 ± 0.27 ^{ab}	99.93	0.17

Colletotrichum gloeosporioides (Pa1, Pa2, Pa3, Pa5, Pa8 y Pa14), *Colletotrichum boninense* (Pa6) y *Fusarium incarnatum* (Pa12). R²: coeficiente de determinación, RMSE: error cuadrático medio. Los valores representan la media de tres pruebas ± error estándar, los valores en la misma columna con superíndices diferentes son significativamente diferentes de acuerdo con la prueba LSD de Fisher en $p \leq 0.05$.

Así como se observaron diferencias en los valores estimados en la fase Lag, también se obtuvieron variaciones en la tasa de crecimiento ($p \leq 0.05$). La mayor tasa de crecimiento estimada fue para *C. gloeosporioides* Pa5, mientras que la menor para Pa6 ($p \leq 0.05$). El rango de valores obtenido para este parámetro, concuerda con la tasa de crecimiento de 5.90 y 6.14 mm/día ($26 \pm 1^\circ\text{C}$, $a_g = 0.99$) previamente reportada para *Colletotrichum sp.* AhCx-02 y AhCx-03, respectivamente, aislados de jaca [3] Por otro lado, *F. incarnatum* Pa12 presentó una tasa de crecimiento de 5.87 mm/día, representando un valor medio a los previamente reportados (3.34 y 6.42 mm/día) para cepas de *F. incarnatum* en medios con un 0.99 aa a 25°C [8].

La variabilidad obtenida en este estudio en comparación con otros reportes probablemente está relacionada con la fuente de aislamiento de la cepa y las variaciones en el medio de cultivo. Debidos a que los hongos se comportan de manera diferente según la matriz o las condiciones ambientales bajo las cuales se estén desarrollando (Figura 5) [3].

Conclusión

Los hallazgos del modelo de crecimiento de hongos proporcionan un primer patrón para desarrollar pautas para el trabajo futuro en el campo de la micología predictiva. Esto con la finalidad de mejorar los modelos para el control postcosecha de hongos en los frutos de aguacate. Sin embargo, el presente trabajo sólo proporciona el modelo primario del desarrollo *in vitro*, por lo que se deben realizar sobre el comportamiento de los hongos involucrados en la antracnosis utilizando modelos secundarios y validarlos en matrices alimentarias.

Agradecimientos

Esta investigación fue financiada por “Convocatoria de Atención a Problemas Nacionales” CONACYT, México [2015-01-1053]. Los autores agradecen al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca postdoctoral otorgada a M. Iñiguez Moreno [2018-000005-01NACV-00746, 2018].

Referencias

1. Bill M, Sivakumar D, Thompson AK, Korsten L. Avocado fruit quality management during the postharvest supply chain. *Food Rev Int.* 2014;30:169-202. doi:10.1080/87559129.2014.907304
2. Iñiguez-Moreno M, González-Gutiérrez KN, Ragazzo-Sánchez JA, Narváez-Zapata JA, Sandoval-Contreras T, Calderón-Santoyo M. Morphological and molecular identification of the causal agents of post-harvest diseases in avocado fruit, and potential biocontrol with *Meyerozyma caribbica*. *Arch Phytopathol Plant Prot.* 2020;54:411-430. doi:10.1080/03235408.2020.1834806
3. Sandoval-Contreras T, Iñiguez-Moreno M, Garrido Sánchez L, Ragazzo Sánchez JA, Narváez Zapata JA, Calderón Santoyo M. Effect of temperature on the interaction between *Rhizopus stolonifer* and *Colletotrichum sp.*, postharvest pathogens of jackfruit (*Artocarpus heterophyllus Lam.*). *Nov Sci.* 2022;14:1-15. doi:10.21640/ns.v14i28.2966
4. Baranyi J, Roberts TA. A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *Int J Food Microbiol.* 1994;23:277-294. doi:https://doi.org/10.1016/0168-1605(94)90157-0
5. Williams PJ, Geladi P, Britz TJ, Manley M. Growth characteristics of three *Fusarium* species evaluated by near-infrared hyperspectral imaging and multivariate image analysis. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2012;96:803-813. doi:10.1007/s00253-012-4380-x
6. Panagou EZ, Chelonas S, Chatzipavlidis I, Nychas GJE. Modelling the effect of temperature and water activity on the growth rate and growth/no growth interface of *Byssoschlamys fulva* and *Byssoschlamys nivea*. *Food Microbiol.* 2010;27:618-627. doi:10.1016/j.fm.2010.02.005
7. Sautour M, Dantigny P, Guilhem MC, Bensoussan M. Influence of inoculum preparation on the growth of *Penicillium chrysogenum*. *J Appl Microbiol.* 2003;95:1034-1038. doi:10.1046/j.1365-2672.2003.02073.x
8. Lahouar A, Marin S, Crespo-Sempere A, Saïd S, Sanchis V. Influence of temperature, water activity and incubation time on fungal growth and production of ochratoxin A and zearalenone by toxigenic *Aspergillus tubingensis* and *Fusarium incarnatum* isolates in sorghum seeds. *Int J Food Microbiol.* 2017;242:53-60. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2016.11.015