

Efecto de la temperatura en el crecimiento de *Rhizopus* spp. Y *Colletotrichum* spp aislados de yaca (*Artocarpus heterophyllus* Lam.)

Sandoval-Contreras, T. ¹, Iñiguez-Moreno, M.¹, Garrido-Sánchez, L.², Ragazzo-Sánchez, A.¹, Calderón-Santoyo, M.¹.

¹Instituto Tecnológico de Tepic. Posgrado en Ciencias en Alimentos. Av. Tecnológico # 2595, Col. Lagos del Country. C.P. 63175 Tepic, Nayarit. México.

² Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Occidente. Periférico Sur Manuel Gómez Morín # 8585 C.P. 45604 Tlaquepaque, Jalisco, México.

Correo de correspondencia: mcalderon@ittepic.edu.mx

e) Palabras Clave: Micología predictiva, modelo de crecimiento, deterioro, control postcosecha
Introducción

La yaca, (*Artocarpus heterophyllus*, Lam) es un fruto de características organolépticas únicas con muchas propiedades nutritiva, siendo el estado de Nayarit el mayor productor y exportador de esta fruta [1], [2]. Siendo un fruto climatérico de alto rango de respiración su maduración es rápida y los frutos se vuelven más susceptibles al deterioro [3]. Entre los principales hongos patógenos se encuentran el *Rhizopus artocarpus*, *Lasiodiplodia theobroae*, *Aspergillus niger* y *Colletotrichum gloeosporioides* [1], [2], [4].

El crecimiento fúngico depende de diversos factores ambientales, como la temperatura [5]. En postcosecha se han realizado grandes esfuerzos para el control de pudriciones, que incluyen el uso de fungicidas, buenas prácticas de manejo, atmósferas modificadas, tratamientos térmicos o desinfectantes, etcétera [6]. Sin embargo, no han sido lo suficiente para controlar las enfermedades postcosecha. La micología predictiva ha sido desarrollada para mejorar la calidad e inocuidad de los alimentos. El desarrollo de modelos puede ser un paso importante y decisivo en el manejo de riesgos [7]. Los modelos que involucran el crecimiento de hongos en postcosecha que han sido desarrollados analizan hongos patógenos en peras, limón persa o papaya [8]–[10]. Sin embargo, aún son escasos. Otro punto importante es que los frutos normalmente poseen una microbiota epifita la cual normalmente no resulta ser patógena y juegan un papel importante en la resistencia a enfermedades [11]. Entre estos hongos pueden existir interacciones en postcosecha en las que estos pueden entremezclarse, inhibirse o dominar frente a otras especies y pueden tener ventaja en la colonización del fruto [12]. Conocer el comportamiento de estos hongos puede ser útil en la predicción de su crecimiento con el fin de evitar daños durante la postcosecha o pérdida de su calidad. Los modelos de crecimiento de hongos patógenos de yaca, para nuestro conocimiento, no han sido abordados y su implementación pudiera ayudar en la toma de decisiones durante su almacenamiento o transporte. El objetivo de este estudio fue determinar *in vitro* el modelo del efecto de la temperatura en el crecimiento de dos especies fúngicas fitopatógenas aisladas de la superficie de la yaca.

Metodología

Se recolectaron muestra de yaca (*Artocarpus heterophyllus* Lam.) de un mercado en la ciudad de Tepic, Nayarit México. Los hongos fueron aislados directamente de las principales pudriciones del fruto. Se tomaron dos aislados diferentes morfológicamente a simple vista. La caracterización tanto macroscópica como microscópica se llevó a cabo en el Laboratorio Integral de Investigación en Alimentos (LIIA) del Instituto Tecnológico de Tepic. Para los cultivos del ensayo se utilizó un agar diseñado para este estudio que contuviera 0.6 % de pectina [13] aproximadamente, al cual le llamamos agar yaca (AY). Contiene 28 g de cáscaras de yaca finamente molidas y 15 g de agar por litro.

Los aislados se cultivaron en ADP a 25 °C durante 5 días. Para conocer el efecto de la temperatura en el crecimiento de los hongos se realizó un diseño unifactorial de tres niveles de temperatura en atmósfera saturada. Para los cultivos se tomó un disco de 5 mm de diámetro del margen de crecimiento de cada aislado cultivado en ADP. Cada disco fue transferido en una placa de AY y se realizaron cultivos por triplicado. Los aislados fueron cultivados a diferentes temperaturas (13, 25 y 30 °C). Una vez que las colonias empezaron a desarrollarse, se midieron los radios de crecimiento diariamente durante 7 días y se registraron. La actividad de agua del medio de cultivo AY se midió antes y después de los experimentos.

Para el análisis de datos, se graficaron los radios contra el tiempo de incubación de cada aislado solo. La velocidad y la fase lag se obtuvieron por regresión no lineal ajustando los datos al modelo de Baranyi y Roberts (1994) (Ecuaciones 1 y 2) [14].

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

$$A = t + \left(\frac{1}{\mu_{max}} \right) \ln \left[\exp(-\mu_{max} t) + \exp(-\mu_{max} \lambda) - \exp(-\mu_{max} t - \mu_{max} \lambda) \right] \quad (2)$$

Donde R es el radio de la colonia (mm), R_0 es el radio de la colonia al tiempo $t = 0$; R_{max} es el radio máximo alcanzado en la placa de Petri, y A es una variable integral con valores de 0 a t , en función de la curvatura de la gráfica. El proceso del ajuste de la curva se realizó por medio del algoritmo de Marquard con el programa StatGraphics Centurion XV.II (Maryland, USA) con un 95 % de confianza.

El efecto de la temperatura en la velocidad de crecimiento μ_{max} para cada aislado se estimó por medio el modelo cardinal con inflexión (CMI) de Rosso y Robinson (1993) (ecuación 3) [15] y se estimaron los valores cardinales de temperatura T_{min} , T_{max} y T_{opt} , así como la velocidad máxima μ_{max} .

$$\mu_{max} = \frac{\mu_{opt}(T - T_{max})(T - T_{min})^2}{(T_{opt} - T_{min})\{(T_{opt} - T_{min})(T - T_{opt}) - (T_{opt} - T_{max})(T_{opt} + T_{min} - 2T)\}} \quad (3)$$

Para el ajuste de la curva se utilizó el algoritmo de Marquard utilizando el programa StatGraphics Centurion XV.II (Maryland, USA) con un 95 % de confianza.

La evaluación del desempeño de los modelos se realizó infectando frutos frescos de yaca con madurez comercial, desinfectados con hipoclorito de sodio al 1 % (v/v) durante 2 minutos y enjuagados con agua estéril [16]. Después fueron inoculados por triplicado con cada uno de los aislados en una lesión realizada con un punzón de 3 mm de diámetro y 3 mm de profundidad. El inóculo fue de 10 μ l de una suspensión de 10⁶ esporas/ml de concentración. Los frutos fueron incubados a 25 °C en atmósfera saturada (RH > 85 %). Se observó el crecimiento y se midieron los diámetros de la infección diariamente durante 7 días. El radio de cada infección fue graficado y se utilizó el modelo de Baranyi y Roberts para estimar la velocidad de crecimiento. Para comparar los modelos predictivos y los modelos observados en yaca fresca se utilizó el factor de sesgo B_f y el factor de precisión A_f propuestos por Ross (1996) (ecuaciones 4 y 5) [17].

$$B_f = 10^{\left[\frac{\sum \log \left(\frac{tv_{predicted}}{tv_{observed}} \right) / n}{n} \right]} \quad (4)$$

$$A_f = 10^{\left[\frac{\sum \left| \log \left(\frac{tv_{predicted}}{tv_{observed}} \right) \right| / n}{n} \right]} \quad (5)$$

Resultados y discusión

Los hongos caracterizados con base a la metodología de Barnett y Barry (1998) [18] fueron identificados como *Rhizopus* spp. Y *Colletotrichum* spp. Estos géneros han sido reportados como los principales causantes de pudriciones en zonas con altas temperaturas y humedades ambientales, como lo es el estado de Nayarit, México [4]. La actividad de agua de los medios de cultivo se mantuvo estable durante los experimentos ($aw = 0.97 \pm 0.03$) al igual que en la fruta fresca se debe mantener estable su aw para mantener su calidad [8]. Las velocidades obtenidas en cada una de las temperaturas se muestran en la tabla 1. *Rhizopus* spp. mostró una velocidad aproximadamente cuatro veces mayor que *Colletotrichum* spp., excepto a altas temperaturas.

Tabla 1. Velocidad radial (μ_{max}) estimada para las cepas fitopatógenas aisladas de yaca.

	* μ_{max} (mm/d) at 13 °C	* μ_{max} (mm/d) at 25 °C	* μ_{max} (mm/d) at 35 °C
<i>Rhizopus</i> spp. ^a	8 ± 0.1	18.9 ± 2.3	0.6 ± 0.1
<i>Colletotrichum</i> spp. ^b	1.9 ± 0.05	5.9 ± 0.1	4.4 ± 0.1

*Los valores son las medias \pm el error estándar. Letras diferentes: diferencias significativas (P < 0.05).

Rhizopus es un hongo de rápido crecimiento y su velocidad máxima ha sido reportada hasta 94.32 mm/d, valores aún mayores que los encontrados en este estudio [19]. En el caso de *Colletotrichum*, la velocidad resultó similar a la reportada por [9] para *C. gloeosporioides* aislado de papaya.

Los gráficos de crecimiento de los aislados se muestran en la figura 1. Se observa que la velocidad es más alta para *Rhizopus* spp., con pendientes más elevadas, excepto a 35 °C donde su crecimiento fue pobre.

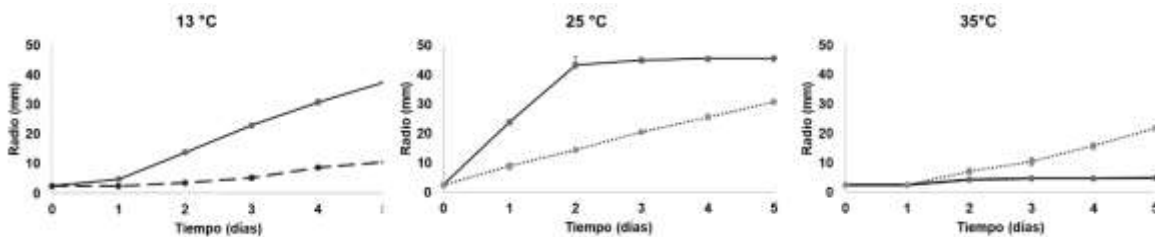


Figura 1. Gráficos de crecimiento para las cepas aisladas de yaca. Línea continua: *Rhizopus* spp. Línea punteada: *Colletotrichum* spp.

Con el modelo cardinal CMI se determinó el efecto de la temperatura sobre la velocidad de crecimiento de los dos aislados. El gráfico de las curvas ajustadas se muestra en la figura 2. Se pueden observar velocidades bajas a temperaturas extremas, siendo la μ_{opt} en su temperatura óptima de crecimiento. Para *Rhizopus*, su crecimiento ha sido reportado desde 5 °C hasta 35 °C, con temperaturas óptimas a 25 °C. Usualmente no crece a 37 °C [20], temperaturas muy cercanas a las observadas en nuestro estudio.

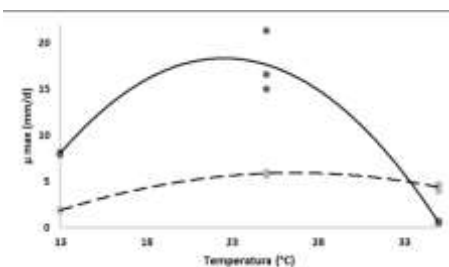


Figura 2. Velocidad radial versus temperatura para las dos cepas aisladas de yaca. Línea continua: *Rhizopus* spp. Línea punteada: *Colletotrichum* spp. Los puntos indican los datos observados y las líneas indican el ajuste de los datos al modelo cardinal.

La tabla 2 muestra los coeficientes calculados. Se puede observar que las temperaturas máximas de crecimiento están sobreestimadas para ambos hongos, ya que han sido reportados valores menores.

Tabla 2. Coeficientes estimados por el modelo CMI para los aislados de yaca en medio AY.

Aislado	μ_{opt}	T_{opt}	T_{max}	T_{min}	R^2	CME
<i>Rhizopus</i> spp.	18.2 ± 1.2	22.7 ± 1E-7	35.2 ± 0.4	8.0 ± 2.4	0.95	4.3
<i>Colletotrichum</i> spp.	5.9 ± 0.1	27.0 ± 1E-8	43.0 ± 1.1	10.5 ± 3.7	0.98	0.1

*Los valores muestran las medias ± la desviación estándar

Para el género *Colletotrichum* se han reportado temperaturas óptimas de crecimiento entre 25 -30 °C en aguacate [21] y de 27 a 31 °C en papaya [9]. Pitt y Hocking (2009) reportan no crecimiento a 5 °C y no germinación a 37 °C para *C. gloeosporioides*, mientras que para *R. stolonifer* reporta bajo crecimiento entre 35 y 35 °C [22], valores similares a los estimados por los modelos.

Para medir la veracidad de los modelos se calcularon los valores velocidad de crecimiento de los aislados en yaca fresca a 25 °C se compararon con los obtenidos in vitro bajo esas mismas condiciones, obteniendo los valores de B_f y A_f (tabla 3).

Table 3. Velocidad radial (μ) de los hongos patógenos en yaca fresca y sus factores de veracidad

Mold	μ (mm/d)	R ²	*B _f	*A _f
<i>Rhizopus</i> spp.	19.18 ± 0.3	> 0.95	2.2	2.2
<i>Colletotrichum</i> spp.	0.67 ± 0.2	> 0.88	2.5	2.5

* Los factores B_f y A_f fueron calculados comparando la velocidad *in vitro* e *in vivo* a 25 °C

Cabe mencionar que los hongos fueron visibles desde el primer día después de la infección de la fruta y su severidad fue alta, con un halo de lesión hasta dos veces mayor que la infección con micelio visible. Los valores de B_f y A_f muestran discrepancias con los modelos. En una predicción perfecta los valores son de B_f y A_f=1. Esto indica que la infección se desarrolla más lentamente en la yaca fresca que en medio de cultivo, probablemente debido a sustancias inhibitorias presentes en la cáscara de la yaca. Agentes bioactivos como polifenoles y flavonoides han sido reportados presentes en la cáscara de yaca en forma abundante y con propiedades antiinflamatorias [23]. Sin embargo, los modelos son una muy buena aproximación al comportamiento de los hongos en la realidad y pueden ayudar en la predicción de su crecimiento dependiendo de las condiciones y de la etapa en que se encuentren los frutos de yaca durante su manejo postcosecha.

Conclusiones

Se desarrollaron modelos de crecimiento de dos hongos patógenos para la yaca que pueden ser utilizados en la toma de decisiones durante la gestión de la cadena de suministro de la yaca, aspectos que se deben tomar muy en cuenta dado su alto grado de maduración y su corta vida de anaquel. Las interacciones entre estos hongos que pueden cohabitar sobre la fruta es un aspecto importante para determinar en la siguiente etapa de esta investigación, logrando así tener una herramienta más completa en el manejo postcosecha de la yaca.

Reconocimientos

Agradecemos al consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca (2018-000005-01NACV-00374) otorgada a T. Sandoval-Contreras durante su estancia posdoctoral.

Referencias

- Ragazzo-Sánchez J. A., Gutierrez-Escatel A., Luna-solano G., Gómez-Leyva J. F. and Calderón-Santoyo M. (2011). Molecular identification of the fungus causing postharvest rot in jackfruit, *Rev. Mex. Micol.*, **34**:9–15.
- Medina-Tiznado M. A., Luna-Esquivel G., Cambero-Campos O. J., Ramírez-Guerrero L. G., and Ríos-Velazco C. (2018). *Lasiodiplodia theobromae* agente causal de la pudrición blanda de frutos de *Artocarpus heterophyllus* Lam. en Nayarit, México. *Rev. Bras. Fruticultura*. **40**(5):1–5.
- Luna-Esquivel G., Alejo-Santiago G., Ramírez-Guerrero L. G., and Arévalo-Galarza M. L. C. (2013). La yaca (*Artocarpus heterophyllus* Lam.) un fruto de exportación. *Agro Product*. 65–70.
- Bhunjun C. S. et al. (2019). Multigene phylogenetic characterisation of *Colletotrichum artocarpicola* sp. Nov. From *Artocarpus heterophyllus* in northern Thailand. *Phytotaxa*. **418**(3):273–286.
- Belbahi A., Leguerinel I., Méot J. M., Loiseau G., Madani K., and Bohuon P. (2016). Modelling the effect of temperature, water activity and carbon dioxide on the growth of *Aspergillus niger* and *Alternaria alternata* isolated from fresh date fruit. *J. Appl. Microbiol.* **121**(6):1685–1698.
- Photita W., Taylor P. W. J., Ford R., Hyde K. D., and Lumyong S. (2005). Morphological and molecular characterization of *Colletotrichum* species from herbaceous plants in Thailand. *Fungal Divers.* **18**:117–133.
- Marín S., Colom C., Sanchis V., and Ramos A. J. (2009). Modelling of growth of aflatoxigenic *A. flavus* isolates from red chilli powder as a function of water availability. *Int. J. Food Microbiol.* **128**(3):491–496.
- Sandoval-Contreras T., Marín S., Villarruel-López A., Gschaedler A., Garrido-Sánchez L., and Ascencio F. (2017). Growth Modeling of *Aspergillus niger* Strains Isolated from Citrus Fruit as a Function of Temperature on a Synthetic Medium from Lime (*Citrus latifolia* T.) Pericarp. *J. Food Prot.* **80**(7):1090–1098.