

Competencia interespecífica entre los principales hongos deterioradores de la papaya (*Carica papaya*, L.)

Sandoval-Contreras, T.¹, Garrido-Sánchez, L.², Iñiguez-Moreno, M.¹, Ragazzo-Sánchez, A.¹, Alberto Narváez-Zapata³, 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. ³Instituto Politécnico Nacional, Centro de Biotecnología Genómica, Col. Narciso Mendoza, Reynosa, Tamaulipas, México

Correo de correspondencia: mcalderon@ittepic.edu.mx

Palabras Clave: Antracnosis, control postcosecha, dominancia, interacciones fúngicas, velocidad de crecimiento

Introducción

La papaya (*Carica papaya* L.) es importante cultivo comercial al ser fuente de antioxidantes, minerales, vitaminas y fibra, además de ser rica en la enzima digestiva papaína que tiene un uso industrial variado [1, 2]. México es uno de los mayores productores y exportadores según la FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, 2020). Es también un fruto climatérico con una vida de anaquel corta debido a su alta sensibilidad a las lesiones mecánicas y enfermedades, siendo la antracnosis causada por *Colletotrichum gloeosporioides* la causante del mayor deterioro. Sin embargo, existen otros hongos como *Rhizoctonia solani*, *Rhizopus stolonifer*, *Fusarium flocciferum*, *F. nivale*, *Lasiodiplodia theobromae*, *Aspergillus flavus*, *A. fumigatus*, *A. niger* y *Alternaria alternata* que pueden causar deterioro en la fruta dependiendo de su estado fisiológico, de la temperatura y de los tiempos en almacenamiento, lesiones mecánicas, etcétera [1, 3, 4]. Algunos de estos hongos son huésped específico y son la causa de grandes pérdidas económicas antes y después de la cosecha [5]. El desarrollo de los hongos poscosecha está determinado principalmente por las condiciones ambientales y estos factores pueden afectar la interacción entre ellos donde una especie se vuelve dominante sobre las otras [6]. El principal tipo de interacción entre los hongos filamentosos es la competencia por el espacio, es decir, por los recursos. El impacto de las interacciones entre especies de hongos es importante para comprender su competencia y dominio, lo cual resultaría en una predicción de su crecimiento, previniendo la pudrición, pérdida de calidad o pérdidas económicas durante la cadena de suministro de papaya [7]. Los objetivos de este estudio fueron examinar, in vitro, el efecto de la temperatura sobre el crecimiento de los principales patógenos fúngicos aislados de papaya y su interacción en un medio complejo.

Metodología

Se recolectaron muestras de papaya (*Carica papaya* L.) de un mercado en la ciudad de Tepic, Nayarit México y se aislaron los patógenos directamente de las principales pudriciones del fruto. Además, se utilizaron las cepas de *Rhizopus stolonifer* CpRs-01 y *Alternaria alternata* CpAa-04, también aisladas de papaya y pertenecientes al Laboratorio de Microbiología de Alimentos del Instituto Tecnológico de Tepic, México. Para los cultivos del ensayo se utilizó un agar diseñado para este estudio que contuviera 3.5 % en carbohidratos y fibra aproximadamente, al cual se le llamó agar papaya (AP). Contiene 115 g de cáscaras de finamente molidas y 15 g de agar por litro.

Inoculación. Se tomó un disco de agar de 5 mm de diámetro del margen de un cultivo de 5 días de crecimiento en ADP (para la cepa de *R. stolonifer* de crecimiento rápido se tomó una colonia de un día de crecimiento) y se transfirió a la placa de medio AP colocada a 2,0 cm de distancia del otro aislamiento en competencia en la placa. Se realizaron controles de cada uno de los aislados inoculando centralmente y en solitario con un disco de agar.

Incubación y crecimiento. Después de la inoculación, las placas se sellaron y se incubaron por triplicado a 13, 25 y 35 ° C durante hasta 5 días o más. Periódicamente se observaron y se realizaron dos mediciones radiales de cada colonia, una en una línea que une los dos puntos de inoculación y otra en el lado opuesto de la colonia. Para cada tratamiento, se aplicó una regresión lineal de Excel para estimar la tasa máxima de crecimiento ($\mu_{m\acute{a}x}$, mm / día).

Efecto de la temperatura. Con el fin de simular las condiciones óptimas y extremas que pueden rodear la cadena de suministro de papaya no certificada, se estimó el efecto de la temperatura sobre $\mu_{m\acute{a}x}$ para cada hongo no pareado utilizando el modelo cardinal con inflexión (CMI) desarrollado por Rosso [8] (ecuación 1) utilizando el programa StatGraphics Centurion XV.II (Maryland, USA) con un 95 % de confianza. Se estimaron los valores cardinales de temperatura T_{min} , T_{max} y T_{opt} , así como la velocidad máxima μ_{max} .

$$\mu_{max} = \frac{\mu_{opt}(T-T_{max})(T-T_{min})^2}{(T_{opt}-T_{min})\{(T_{opt}-T_{min})(T-T_{opt})-(T_{opt}-T_{max})(T_{opt}+T_{min}-2T)\}} \quad (1)$$

Tipos de interacción y cálculo del Índice de dominancia (I_D). Debido a la simetría radial involucrada, un modelo matemático unidimensional es suficiente para investigar dicha interacción correspondiente al crecimiento a lo largo de la línea que conecta los centros de los sitios de inoculación, comparándolo con el lado opuesto. Esta interacción se observó en función de la velocidad de crecimiento de cada hongo solo o pareado con otro. La dominancia numérica para todas las cepas se determinó analizando estadísticamente las velocidades de crecimiento radial mediante la prueba de Tukey HSD. Si existen diferencias estadísticas significativas en sus velocidades, entonces existe interacción. Se asignó una puntuación numérica en función del tipo de interacción asignando arbitrariamente un valor: entremezclado mutuo: (1); antagonismo mutuo al contacto o con espacio libre entre colonias de hongos <2 mm: (2); antagonismo mutuo a distancia: (3); dominancia al contacto: (4) para la especie dominante, 0 para la especie inhibida; dominancia a distancia: (5) para la especie dominante, 0 para la especie inhibida [9, 10]. El I_D se calcula sumando el puntaje dado a una cierta temperatura para cada cepa, basado en el puntaje de interacción para cada especie.

Resultados y discusión

Identificación de hongos. Los dos aislados de hongos tomados directamente de las lesiones en papaya mostraron diferente morfología a simple vista. Los caracteres estructurales microscópicos fueron observados y registrados. Ambos aislamientos se identificaron siguiendo la metodología de Barnett y Hunter (1998) y Carrillo (2003) [11, 12] como *Colletotrichum* sp. CpCx-02 y *Fusarium* sp CpFx-03. Estos hongos han sido reportados como los patógenos más comunes en las pudriciones de la papaya [4]. El que se desarrolle uno de estos hongos en la etapa de poscosecha y llegue a ser dominante depende no solo de la temperatura, sino de la disponibilidad de agua y del estado fisiológico de la fruta como la madurez, daño de la piel, etcétera. Estos factores son determinantes para la entrada de un determinado patógeno [9, 13]. Por lo tanto, el estado fisiológico de la fruta y el manejo poscosecha son determinantes a lo largo de la cadena de suministro para evitar el desarrollo de hongos y pudriciones.

Evaluación de crecimiento. Se obtuvieron los gráficos de crecimiento de todas las cepas cultivadas individualmente en medio AP a diferentes temperaturas (Figura 1). La mayoría de las cepas mostraron una pequeña variabilidad en su crecimiento en los primeros cinco días de incubación en todas las condiciones.

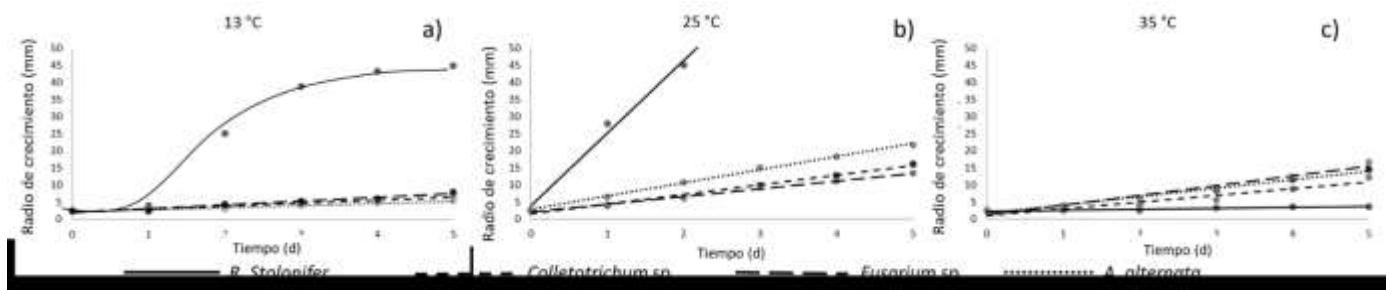


Figura 1: Radios de crecimiento contra el tiempo, a diferentes temperaturas, que describen el crecimiento de las cepas *R. stolonifer* (línea continua); *A. alternata* (línea punteada); *Colletotrichum* sp. (línea rayas pequeñas) y *Fusarium* sp (línea rayas grandes) aisladas de pudriciones de papaya.

El patrón de crecimiento para *R. stolonifer* fue el típico sigmoide a 13 °C. En todas las otras condiciones los otros aislados mostraron un marcado crecimiento lineal con una breve fase lag y sin fase estacionaria. Las velocidades estimadas por regresión lineal se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Velocidad radial (μ_{max}) estimada a diferentes temperaturas para los cuatro aislados patógenos de papaya en PA

Isolate	Radial growth rate (μ_{max} , mm/d)*		
	13 °C	25 °C	35 °C
<i>R. stolonifer</i>	11.6 ± 0.5 ^a	17.2 ± 0.3 ^b	0.3 ± 0.0 ^c
<i>Colletotrichum</i> sp.	0.8 ± 0.05 ^a	3.0 ± 0.2 ^b	2.5 ± 0.1 ^c
<i>Fusarium</i> sp.	0.8 ± 0.1 ^a	1.9 ± 0.3 ^b	2.0 ± 0.05 ^b
<i>A. alternata</i>	1.2 ± 0.05 ^a	3.7 ± 0.05 ^b	2.9 ± 0.05 ^c

* Los valores son las medias + el error estándar con una $R^2 > 0.95$, excepto para *R. stolonifer* a 13 y 35 °C ($0.80 > R^2 > 0.90$). Letras diferentes indican diferencias significativas para cada uno de los tratamientos.

El crecimiento más rápido observado fue para *R. stolonifer*, cubriendo la placa de cultivo el segundo día de incubación tanto a 13 °C como a 25 °C, aunque a 35 °C su crecimiento fue pobre o nulo. Su velocidad ha sido reportada hasta en 94.32 mm/d [14], valores aún mayores que los observados en este estudio. Por otra parte, las cepas *Colletotrichum* sp. y *Fusarium* sp. tuvieron una velocidad μ de crecimiento similar sin diferencias significativas, pero diferente a *R. stolonifer* y *A. alternata*. El valor μ para *Colletotrichum* fue mayor a 25 °C y disminuyó en condiciones extremas, siendo los valores más bajos a 13 °C ($P < 0.05$), mientras que *Fusarium* no mostró diferencias en los valores μ a 25 y 30 °C. *Alternaria alternata* creció un poco más rápido que las cepas *Colletotrichum* y *Fusarium* ($P < 0.05$).

Efecto de la temperatura. Se realizó un modelo secundario para cada cepa individualmente con el fin de estudiar el efecto de la temperatura en su crecimiento. Las curvas obtenidas mostraron valores máximos de μ en la temperatura óptima para su crecimiento (Figura 2), mientras que a temperaturas superiores o inferiores la velocidad fue menor.

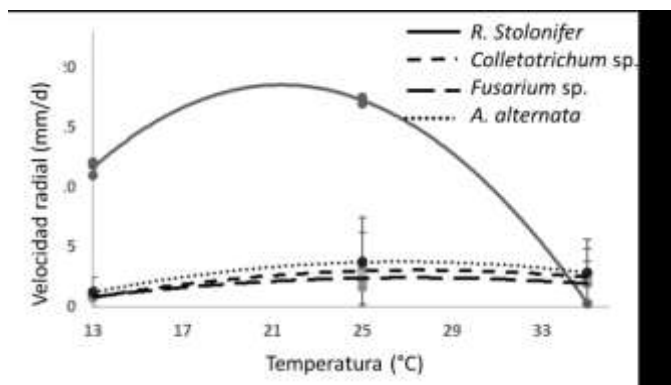


Figura 2. Temperatura (T, °C) versus velocidad radial (μ_{max} , mm/day) para *R. stolonifer* (línea negra continua), *Colletotrichum* sp. (línea gris continua), *Fusarium* sp. (línea punteada negra) and *A. alternata* (línea gris punteada) aislados de papaya. Los puntos indican los datos y las líneas indican el ajuste de los datos al modelo CMI

El modelo CMI desarrollado por Rosso se utilizó para estimar los valores cardinales de temperatura con un buen desempeño. Los parámetros calculados por este modelo se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Coeficientes estimados con modelo CMI ajustado a la velocidad de crecimiento para cuatro aislados fúngicos de pudriciones de papaya, no pareados, en medio AP

Isolate	μ_{max}^*	T_{max}^*	T_{min}^*	T_{opt}^*	R^2	RMSE
<i>R. stolonifer</i>	22.0 ± 0.1	35.0 ± 0.02	8.66 ± 0.1	22.5 ± 0.1	0.99	0.1
<i>Colletotrichum</i> sp.	3.35 ± 0.1	39.2 ± 1.0	4.0 ± 1.3	29.4 ± Ind [#]	0.98	0.03
<i>Fusarium</i> sp.	2.82 ± 0.13	41.6 ± 3.1	8.9 ± 3.7	26.5 ± 4.5E-9	0.99	0.05

<i>A. alternata</i>	3.8 ± 03	43.5 ± 0.5	9.6 ± 2.5	26.8 ± Ind [#]	0.99	0.004
---------------------	----------	------------	-----------	-------------------------	------	-------

*Los valores son las medias ± la desviación estándar. # Indica un número indefinido por el programa estadístico.

Rhizopus stolonifer mostró el valor máximo de $\mu_{m\acute{a}x}$ hasta siete veces más alto que las otras cepas incluso a baja temperatura, pero la temperatura alta no fue favorecida. Las temperaturas mínimas de crecimiento estimadas estuvieron entre 4 a 9.6 ° C para todos los aislamientos y las temperaturas óptimas fueron las esperadas para cada uno.

Interacciones. La competencia observada en cultivos pareados tuvo una variación significativa entre las diferentes cepas con respecto a su crecimiento en solitario. La velocidad de *R. stolonifer* en condiciones óptimas fue levemente potenciada por la presencia de *Colletotrichum* y *Fusarium* (P> 0.05) (Figura 3). Sin embargo, la presencia de *A. alternata* afecta significativamente en su velocidad según la prueba Tukey HSD, ralentizando su crecimiento (P<0.05).

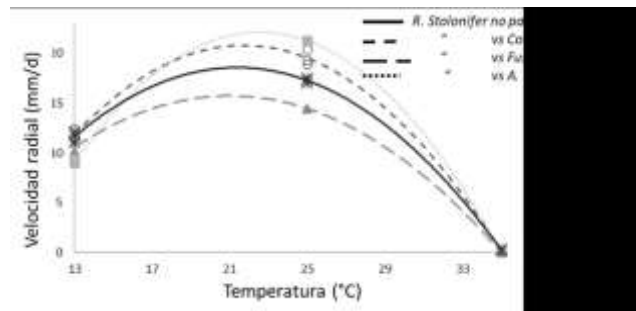


Figura 3. Efecto de la temperatura en la velocidad de crecimiento de *R. stolonifer* cuando crece individualmente (línea continua) y pareado a (líneas discontinuas).

El patrón de crecimiento pareado de *Colletotrichum*, *Fusarium* y *A. alternata* se muestra en la figura 4 con una escala muy diferente debido al rápido crecimiento de *R. stolonifer*. *Colletotrichum* sp. creció más rápido junto a *A. alternata* (P<0.05), mientras que *Colletotrichum* frente a *R. stolonifer* y *Fusarium*, su crecimiento fue más lento (P<0.05).

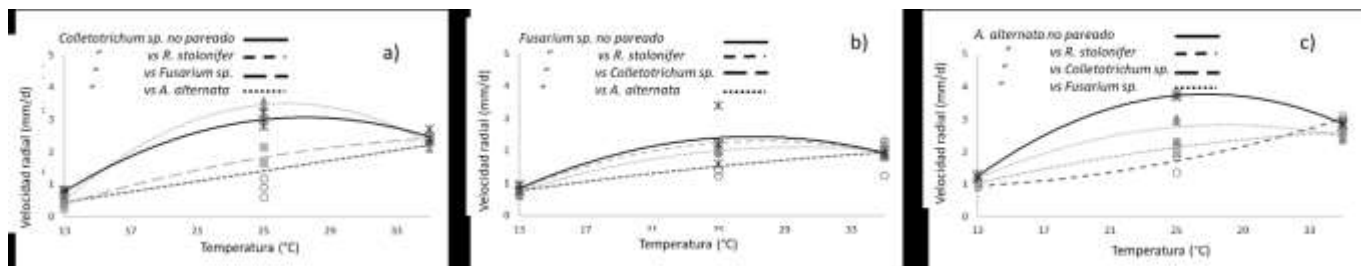


Figura 4. Efecto de la temperatura en la velocidad de crecimiento de a): *Colletotrichum* sp.; b) *Fusarium* sp. y c): *A. alternata* cuando crecen de forma individual (líneas continuas) y pareados a otro aislado (líneas discontinuas).

La competencia observada entre *Fusarium* frente a las otras cepas a temperatura óptima, el valor de μ fue ligeramente más lento sin diferencias significativas. Por el contrario, *A. alternata* disminuyó su crecimiento frente a *R. stolonifer* y *Colletotrichum* (P<0.05) mientras que, frente a *Fusarium*, el cambio en la velocidad de crecimiento no fue significativo. Dependiendo de las diferencias estadísticas entre $\mu_{m\acute{a}x}$ a una determinada temperatura, se determinó el índice de dominancia (ID) con una puntuación según el tipo de interacción. Los resultados se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Índice de dominancia *ID dado a diferentes especies fúngicas cuando crece pareado a otra especie

Temperature	Isolate vs/ <i>R. stolonifer</i>	<i>R. stolonifer</i>	<i>Colletotrichum</i> sp.	<i>Fusarium</i> sp.	<i>A. alternata</i>	ID*
		-	1	0	1	2

13 °C	<i>Colletotrichum</i> sp.	1	-	0	2	3
	<i>Fusarium</i> sp.	4	4	-	1	9
	<i>A. alternata</i>	1	2	1	-	4
	<i>R. stolonifer</i>	-	4	1	2	7
25 °C	<i>Colletotrichum</i> sp.	0	-	1	4	5
	<i>Fusarium</i> sp.	1	1	-	1	3
	<i>A. alternata</i>	2	0	1	-	3
	<i>R. stolonifer</i>	-	0	0	0	0
35 °C	<i>Colletotrichum</i> sp.	5	-	1	1	7
	<i>Fusarium</i> sp.	5	1	-	4	10
	<i>A. alternata</i>	5	1	0	-	6

*I_D se refiere a la suma del puntaje dado a una cierta temperatura para cada cepa basado en el puntaje de interacción para cada especie. 1): entremezclado mutuo cuando coexisten ambas colonias; 2): antagonismo mutuo al contacto con una reducción significativa de su velocidad de crecimiento; 3): antagonismo mutuo a distancia; 4): dominancia al contacto, 4 para la especie dominante, 0 para la especie inhibida; 5): dominancia a distancia, 5 para la especie dominante, 0 para la especie inhibida].

Estos resultados muestran que la temperatura influye significativamente en el crecimiento *in vitro* de los diferentes hongos. A temperaturas extremas, *Fusarium* resulta ser dominante, aunque su crecimiento sea pobre. Por el contrario, a 25 ° C la velocidad de crecimiento de *R. stolonifer* fue tan rápida que domina a las demás. *R. stolonifer* mostró además un crecimiento potenciado cuando se combinó con *Colletotrichum* o *Fusarium*. *Rhizopus* es un hongo de campo que causa pudriciones en papaya cuando se produce una ruptura de la cutícula por daño mecánico. Si se detecta oportunamente, se puede controlar [9]. La incidencia de *Rhizopus* puede minimizarse con buenas prácticas para evitar heridas, y tratamiento térmico a 49 ° C durante 20 min [15 – 17], por lo que se considera un patógeno menor. Por otro lado, *Colletotrichum* es una enfermedad poscosecha importante de la papaya en donde la infección comienza en el campo cuando los conidios germinan y forman apresorios, seguida de una etapa de inactividad hasta que la fruta climatérica madura y el patógeno cambia de la fase biotrófica a la necrotrofica [18]. Nuestros resultados mostraron que *Colletotrichum* coexiste con *R. stolonifer* y es el segundo hongo dominante a temperatura ambiente, condiciones en las que, a lo largo de la cadena de suministro, las papayas comienzan a madurar.

A temperaturas extremas, el hongo dominante es *Fusarium*, uno de los hongos patógenos que se asocian comúnmente con las frutas tropicales. Este patógeno puede entrar a través de la herida del corte durante la cosecha, o por las grietas entre el pedúnculo y la pulpa, causando pudriciones [18]. En esta investigación se puede inferir que, a temperaturas extremas, la pudrición del pedúnculo causada por *Fusarium* sería favorecida. Se sabe que muchas especies de *Fusarium* producen micotoxinas en condiciones muy particulares [19]. Podría presentar un riesgo potencial para la salud si se procesan papayas contaminadas por *Fusarium* [20].

El índice de dominancia a una cierta temperatura refleja el potencial de combate y dominio de una especie. Sin embargo, en el cultivo contaminado naturalmente, la proporción relativa de diferentes especies es variable y las interacciones en una población mixta son más complejas [21]. Diversos estudios han demostrado que la composición de la microbiota que habita un organismo, tanto endo como epifíticamente, puede tener un efecto profundo en la fisiología de sus huéspedes, incluidas las respuestas de resistencia a enfermedades [22].

Conclusiones

El manejo agronómico del huerto y los tratamientos previos a la cosecha pueden reducir los patógenos e influir en la abundancia de alguna especie en particular [23]. Las interacciones entre el tratamiento protector poscosecha y las especies fúngicas que persisten en su epicarpio inciden en su éxito. El conocimiento del tipo de interacción de los patógenos en la superficie de la fruta puede servir como herramienta para predecir qué patógeno puede ser el dominante y de esta manera mejorar los sistemas de control poscosecha. Este estudio se complementará con la validación de los resultados en papaya fresca de manera que se pueda obtener una herramienta más completa para la toma de decisiones en el control de patógenos a lo largo de la cadena de suministro de papaya.

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

- Mendy, T. K. et al. (2019). Antifungal properties of Aloe vera through in vitro and in vivo screening against postharvest pathogens of papaya fruit. *Scientia Horticulturae*, **257**:108767.
- Chen, F. et al. (2020) 'Reduced sensitivity of azoxystrobin and thiophanate-methyl resistance in *Lasiodiplodia theobromae* from papaya', *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 162(April 2019), pp. 60–68.
- Zhou, L., Paull, R. E. and Chen, N. J. (2014) Papaya: Postharvest Quality-Maintenance Guidelines. *Fruit, Nut, and Beverage Crops*. **34**:1–6.
- Helal, R. B., Hosen, S. and Shamsi, S. (2018). Mycoflora associated with post-harvest disease of papaya (*Carica papaya* L.) and their pathogenic potentiality. *Bangladesh Journal of Botany*. **47**(3):389–395.
- Abdelfattah, A. et al. (2016). Spatial and compositional variation in the fungal communities of organic and conventionally grown apple fruit at the consumer point-of-purchase. *Horticulture Research*, 3:16047.
- Troth, E. E. G., Johnston, J. A. and Dyer, A. T. (2018). Competition between *Fusarium pseudograminearum* and *cochliobolus sativus* observed in field and greenhouse studies. *Phytopathology*. **108**(2):215–222.
- Kolesidis, D. A. Boddy, L., Eastwood, D.C., Yuan, C. and Fowler, M.S. (2019). Predicting fungal community dynamics driven by competition for space. *Fungal Ecology*. **41**:13–22.
- Rosso, L., Lobry, J. R. and Flandrois, J. P. (1993). An unexpected correlation between cardinal temperatures of microbial growth highlighted by a new model. *Journal of Theoretical Biology*. **162**(4):447–463.
- Magan, N. and Lacey, J. (1985). Interactions between field, and storage fungi on wheat grain. *Transactions of the British Mycological Society*. **85**(1):29–37.
- Sempere, F. and Santamarina, M. P. (2010). Study of the interactions between *Penicillium oxalicum* currie & thom and *Alternaria alternata* (Fr.) keissler. *Brazilian Journal of Microbiology*. **41**(3):1-7
- Barnett H.L. and Hunter B.B. (1998) *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*. 4th Edition. 217p. APS Press. St. Paul, Minnesota.
- Carrillo, L. (2003) *Los hongos de los alimentos y forrajes*. Universidad Nacional de Salta, Ed. Jujuy, Ar
- Magan, N. and Lacey J. (1988). Ecological determinants of mould growth in stored grain. *International Journal of Food Microbiology*. **7**:245-256.
- Nelson, S. (2005). *Rhizopus roto* of jackfruit. *Plant Disease*. **PD**-29
- De la Cruz Medina, J., Vela Gutiérrez, G. and García, H. (2003.) *PAPAYA Post-harvest Operations, INPho, Post-harvest Compendium*. Edited by F. and A. O. of the U. N. (FAO). On line. [http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/inpho/docs/Post_Harvest_Compendium - Pawpaw Papaya .pdf](http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/inpho/docs/Post_Harvest_Compendium_-_Pawpaw_Papaya.pdf)
- Bautista-Baños, S. et al. (2013). A review of management alternatives for controlling fungi on papaya fruit during postharvest supply chain. *Crop Protection*. **49**:8–20.
- Zhou, L., Paull, R. E. and Chen, N. J. (2014). Papaya: Postharvest Quality-Maintenance Guidelines. *Fruit, Nut, and Beverage Crops*. **34**:1–6.
- Sriram, S. and Rao Sudhakar, V. D. (2020). *Papaya*. In *Postharvest Pathology of Fresh Horticultural Produce*. Palou, L. and Smilanick, J. L. (eds). pp. 257–276. CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL
- Zakaria, L. et al. (2012). *Fusarium* species associated with fruit rot of banana (*Musa* spp.), papaya (*Carica papaya*) and guava (*Psidium guajava*). *Malaysian Journal of Microbiology*. **8**(2):127–130.
- Sandoval-Contreras, T. et al. (2018). Mycotoxigenic potential of phytopathogenic moulds isolated from citrus fruits from different states of Mexico. *Quality Assurance and Safety of Crops and Foods*. **10**(2):125–136.
- Lee, H. B. and Magan, N. (2000). Impact of environment and interspecific interactions between spoilage fungi and *Aspergillus ochraceus* on growth and ochratoxin production in maize grain. *International Journal of Food Microbiology*, **61**(1):11–16.
- Droby, S. and Wisniewski, M. (2018). The fruit microbiome: A new frontier for postharvest biocontrol and postharvest biology. *Postharvest Biology and Technology*, **140**:107–112.
- Romanazzi, G., Smilanick, J.L., Feliziani, E., Droby, S. (2016). Integrated management of postharvest gray mold on fruit crops. *Postharvest Biology and Thechnology*. **113**:69-76

