



TECNOLÓGICO
NACIONAL DE MÉXICO

TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO
INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TEPIC



**MODELO PREDICTIVO DEL CRECIMIENTO DEL HONGO *Alternaria* spp.
AISLADO DE PAPAYA (*Carica Papaya* L.) EN FUNCIÓN DE LA
TEMPERATURA Y HUMEDAD RELATIVA COMO HERRAMIENTA PARA EL
CONTROL EN LA GESTIÓN DEL MANEJO DE PAPAYA**

Por:

ING. AGROINSUSTRIAL.
JERUSALEN BETANCOURT RODRÍGUEZ

TESIS PROPUESTA A LA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
E INVESTIGACIÓN

COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OBTENER EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS
EN ALIMENTOS

Director: Dra. Montserrat Calderón Santoyo

Codirector: Dra. Teresa Sandoval Contreras

Tepic, Nayarit

fecha.

AGRADECIMIENTOS

A **Dios**, por darme la capacidad de enfrentar los retos que se me presentaron en el camino y por haber permitido esta oportunidad como parte de mi crecimiento personal y profesional.

Al **Instituto Tecnológico de Tepic**, por abrir sus puertas y permitir que en sus instalaciones aprendiera los conocimientos pertinentes en diferentes contextos.

A la **Dra. Montserrat**, por haber confiado en mí y brindar su apoyo como directora de este proyecto, a la **Dra. Teresa** por compartir sus enseñanzas, observaciones y entusiasmo al mismo, al **Dr. Juan Arturo** y al **Dr. Luis** por contribuir sensatamente a las correcciones que aportaron al presente proyecto.

A **CONACyT**, por la beca otorgada, con número 886659 para la realización del presente proyecto.

DEDICATORIAS

A mis padres, **Jairo Enrique Betancourt Jiménez** y **Zaida Leonor Rodríguez Hernández**, por brindarme su amor, comprensión, apoyo y sabiduría que fueron de especial luz en esta travesía, en particular a mi mamá, por esa entereza que me transmitió siempre y me dio fuerzas para continuar, a mi papá por su carisma y entusiasmo incondicional, ambos me han inculcado valores, principios y cualidades que hoy me hacen ser quien soy, capaz de afrontar nuevos retos y ver las verdaderas cosas que importan en la vida.

A mis hermanas, **Libnazaret** y **Jeimmy**, por su apoyo, consejos y alegrías otorgadas, en especial a lib, por estar para mí cuando más la necesité y motivarme, acompañándome con su especial apoyo en cada uno de los eventos de mi vida, las amo con todo mi corazón y ustedes han sido mi ejemplo de amistad y amor.

A **Copito**, nunca pensé que una mascota sería parte crucial en este acontecimiento, en especial él fue un alivio para continuar a delante cuando todo pareció oscurecer.

A mis amigos de Colombia, en particular a **kate** y **Juli** por sus divertidas y alentadoras conversaciones que me regalaron durante todo este proceso.

A mi segunda familia en México, **Alejandra, Edson, David, Carlos, Armando, Cecilia, Ariana**, a todos ellos agradezco enormemente todos los momentos que me han regalado, su cariño y apoyo incondicional en esta etapa importante de mi vida.

A mis amigos de laboratorio, **Katia, Yuliana, Maricarmen, Tere, Rafa, Irving**, por brindarme ratos agradables e inolvidables que ayudaron a mi crecimiento.

RESUMEN

La papaya (*Carica papaya* L.) es un fruto de gran importancia económica a nivel mundial y México es de los principales países consumidores, productores y exportadores. Este fruto es susceptible de ser atacado por varios patógenos fúngicos cuyo crecimiento se ve favorecido por el ambiente, lo que incrementa las pérdidas postcosecha. Recientemente el interés en la micología predictiva a través de modelos matemáticos predictivos, ha surgido como una herramienta alternativa capaz de describir el comportamiento del hongo, de manera que se puedan manipular los parámetros ambientales en el almacenamiento y transporte de la papaya, para facilitar el control y la predicción de enfermedades en fruto.

El objetivo de esta investigación fue aplicar un modelo matemático para predecir el crecimiento del hongo *Alternaria* spp., aislado de papaya (*Carica papaya* L.) en función de la temperatura y humedad relativa (HR) del ambiente para determinar el comportamiento del hongo en postcosecha.

Se tomaron papaya infectadas y fueron aisladas cinco cepas del hongo fitopatógeno. El crecimiento de las cepas se estudió en un medio complejo agar papaya y se incubaron en dos tratamientos, el primero fue a diferentes temperaturas (13-35°C) y HR constante y el segundo a diferentes humedades relativas (40-80%) y temperatura constante, la velocidad de crecimiento fue estimada mediante regresión lineal. Para describir el efecto de la temperatura sobre la velocidad de crecimiento del hongo, fue utilizado el modelo cardinal con inflexión. Asimismo, para ver el efecto de la HR en la velocidad de crecimiento, se usó la ecuación modificada de Arrhenius-Davey. Por último, se calculó el tiempo de visibilidad del micelio utilizando un modelo polinomial. Se realizó una validación externa en frutos de papaya, el rendimiento de los modelos fue evaluado por medio del factor de sesgo y de precisión.

De las cinco cepas, la velocidad óptima más alta que el modelo estimó fue para la cepa CpA-01 (4.78 mm/día) en su óptimo de crecimiento. También, se observó en general que *Alternaria alternata* puede demorar un día y medio aproximadamente para presentar visibilidad de micelio, en ambos casos fue en función de la temperatura. Por otra parte, la velocidad de crecimiento más alta calculada a partir del modelo de Arrhenius-Davey fue de 5.4 mm/día para la CpA-03 en la mayor humedad relativa del ambiente probada. Obtuvimos una bondad de ajuste satisfactoria (R^2 mayores al 75%) en los tres modelos usados (Rosso, polinomial y Arrhenius-Davey) y se observaron factores de sesgo de 0.88 a 1.4 y factores de precisión mayores a 1.

El modelo de Rosso fue el mejor modelo presentado ya que sus parámetros representan un significado biológico, además a partir de los modelos matemáticos que se estudiaron mostraron el comportamiento que tiene el hongo *Alternaria alternata* bajo la influencia de factores ambientales, lo cual estos datos facilitarían la toma de decisiones en la gestión del manejo de la papaya.

Palabras claves: *Carica papaya* L., *Alternaria alternata*, modelos de crecimiento, micología predictiva, enfermedades postcosecha, factores ambientales.

ABSTRAC

Papaya (*Carica papaya* L.) is a tropical fruit of economic interest worldwide and México is the main consuming, producing and exporter countries. This fruit is very susceptible at spoilage fungi pathogens whose growth is influence by the environment, which increases postharvest losses. Recently the interest in predictive mycology through predictive mathematical models has emerged as an alternative tool capable of describing the behavior of fungal, that environmental parameters can be used in the storage and transport of papaya, to facilitate control and prediction of diseases in fruit.

The aim of the investigation was to apply a mathematical model to predict the growth of the fungus *Alternaria* spp., isolated from papaya (*Carica papaya* L.) as a function of the temperature and relative humidity (RH) of the environment to control the quality of papaya in postharvest.

Infect papaya was used and five strains of the phytopathogen fungus were isolated. The growth of the strains was studied in the complex papaya agar medium and they were incubated in two treatments. The first was at different temperatures (13-35°C, HR cst) and the second was at different relative humidity (40-80%, T cst), the growth rate was estimated using linear regression. The inflection cardinal model was used to describe the effect of temperature on the growth rate and the modified Arrhenius-Davey equation to describe the effect of RH on the growth rate of strains. In addition, a polynomial model was used to calculate the time in the fungus mycelium becomes visible. External validation was carried out on papaya fruits, the performance of the models was evaluated using the bias and accuracy factor.

The highest optimal growth rate was obtained of estimate model for the CpA-01 strain (4.78 mm/day) in its optimal growth and in general *Alternaria alternata* can slowly approximately one days to present mycelium visibility, in both cases it was influencing of temperature. On the other hand, the highest growth rate calculated from the Arrhenius-Davey model was 5.5 mm/day to CpA-01 in 80% of relative humidity tested. We obtained a satisfactory goodness fit ($R^2 > 75\%$) in the three models used (Rosso, polynomial and Arrhenius-Davey) and Bias factor values of 0.88 to 1.4 and accuracy factor > 1 were observed.

The Rosso model including parameters with biological significance, furthermore from the mathematical models that were studied they showed the behavior of *Alternaria alternata* fungus in function of environmental factors, which these data would facilitate the decision in the management of papaya.

Keywords: Carica Papaya L., *Alternaria alternata*, models growth, predictive mycology, postharvest diseases, environmental conditions.

CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	II
DEDICATORIAS	III
RESUMEN	IV
ABSTRACT	V
LISTA DE CUADROS	IX
LISTA DE FIGURAS	X

CAPITULO 1. INTRODUCCIÓN.....	- 1 -
CAPITULO 2. ANTECEDENTES.....	- 4 -
2.1. Generalidades del fruto de papaya	- 4 -
2.1.1. Producción mundial y nacional de la papaya	- 4 -
2.2. Manejo en postcosecha de la papaya	- 6 -
2.2.1. Pérdidas postcosecha	- 8 -
2.2.2. Pérdidas por hongo patógenos.....	- 8 -
2.3. Micología predictiva.....	- 11 -
2.3.1. Modelos predictivos	- 13 -
2.3.2. Tipos de modelos	- 13 -
2.3.2.1. Modelos primarios	- 14 -
2.3.2.2. Modelos secundarios.....	- 16 -
2.3.2.3. Variables que influyen en el crecimiento fúngico	- 19 -
2.3.2.4. Ejemplos de modelos predictivos aplicados a hongos.....	- 21 -
CAPÍTULO 3. JUSTIFICACIÓN.....	- 24 -
CAPÍTULO 4. OBJETIVOS	- 26 -
4.1. Objetivo General	- 26 -
4.2. Objetivos Específicos.....	- 26 -
CAPÍTULO 5. MATERIALES Y MÉTODOS	- 28 -
5.1. Aislamiento e identificación del hongo fitopatógeno	- 28 -

5.1.1. Aislamiento y purificación	- 28 -
5.1.2. Caracterización morfológica del fitopatógeno	- 28 -
5.1.3. Identificación molecular del hongo fitopatógeno	- 29 -
5.1.4. Preparación del inóculo	- 30 -
5.1.5. Medio de cultivo agar papaya (ACP), inoculación e incubación	- 30 -
5.2. Modelo matemático en función de la Temperatura.....	- 31 -
5.2.1. Diseño estadístico	- 31 -
5.2.2. Modelo primario.....	- 31 -
5.2.3. Modelo secundario.....	- 32 -
5.3. Modelo matemático en función de la Humedad Relativa.....	- 33 -
5.3.1. Diseño estadístico.....	- 33 -
5.3.2. Modelo primario	- 33 -
5.3.3. Modelo secundario.....	- 34 -
5.4. Validación de los modelos en función de la temperatura y humedad relativa ...	- 34 -
CAPÍTULO 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	- 37 -
6.1. Identificación del hongo fitopatógeno	- 37 -
6.1.1. Identificación morfológica macro y microscópicamente	- 37 -
6.1.2. Identificación molecular.....	- 40 -
6.2. Modelo del crecimiento fúngico en función de la temperatura	- 43 -
6.2.1. Análisis estadístico preliminar	- 43 -
6.2.2. Modelo primario	- 48 -
6.2.3. Modelo secundario.....	- 50 -
6.3. Modelo del crecimiento fúngico en función de la humedad relativa	- 59 -
6.3.1. Análisis estadístico preliminar	- 59 -
6.3.2. Modelo primario	- 61 -
6.3.3. Modelo secundario.....	- 62 -
6.4. Validación de los modelos en función de temperatura y humedad relativa.....	- 71 -
CAPÍTULO 7. CONCLUSIONES	- 79 -
CAPÍTULO 8. BIBLIOGRAFÍA.....	- 81 -

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Concentración porcentual de la producción de papaya en el mundo.	- 4 -
Cuadro 2. Principales hongos patógenos que afectan la papaya.....	- 10 -
Cuadro 3. Principales modelos primarios aplicados al crecimiento de hongos.	- 15 -
Cuadro 4. Principales modelos secundarios aplicados a hongos.....	- 17 -
Cuadro 5. Acceso de nucleótidos en el GenBank de los hongos aislado en base a la región ITS.	- 41 -
Cuadro 6. Parámetros obtenidos del modelo de Rosso para las cinco cepas de <i>Alternaria alternata</i> aisladas de papaya.	- 50 -
Cuadro 7. Parámetros obtenidos del modelo polinomial para las cinco cepas de <i>Alternaria alternata</i> aisladas de papaya.	- 55 -
Cuadro 8. Parámetros obtenidos del modelo lineal de Arrhenius para las cinco cepas de <i>Alternaria alternata</i> aisladas de papaya.....	- 64 -
Cuadro 9. Parámetros obtenidos del modelo lineal de Arrhenius para las cinco cepas de <i>Alternaria alternata</i> aisladas de papaya.....	- 68 -
Cuadro 10. Factor de sesgo (B_f) y de precisión (A_f) obtenidos para el conjunto de datos (velocidad de crecimiento y tiempo de visibilidad) en la validación de <i>Alternaria alternata</i> en papaya.	¡Error! Marcador no definido.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Empaque y transporte de la papaya en poscosecha (Muñoz y Rodríguez, 2017)	- 6 -
Figura 2. Envoltura de malla de espuma (Muñoz y Rodríguez, 2017)	- 7 -
Figura 3. Hongos patógenos poscosecha de papaya: a) <i>Mucor</i> sp., b) y c) <i>Fusarium</i> spp., d) <i>Colletotrichum</i> spp. e) y f) <i>Rhizopus stolonifer</i> , g) <i>Alternaria alternata</i> , h) <i>Penicillium digitatum</i> , i) <i>Aspergillus</i> sp. (Bautista y cols., 2013)	- 9 -
Figura 4. Aislados de papaya (<i>Carica papaya</i> L.) del hongo <i>Alternaria</i> spp., en medio PDA de 5-7 días. a: haz b: envés y c: conidios, observados al microscopio 40X.	- 38 -
Figura 5. Productos obtenidos de la amplificación por PCR (a) obtenidos de Papaya en Tepic, Nayarit. Carril M: marcador molecular, carril 1: aislado CpA-01, carril 2: aislado CpA-02, carril 3: aislado CpA-03, carril 4: aislado CpA-04 y carril 5: aislado CpA-05 y carril B: control negativo.) Y el árbol filogénico construido en el software MEGA 7.0. el árbol filogenético (b) de la región ITS de ADNr para los aislados de <i>Alternaria alternata</i> spp.	- 42 -
Figura 6. Velocidad de crecimiento radial (mm/día) y fase lag de las cinco cepas de <i>A. alternata</i> en función a la temperatura.....	- 45 -
Figura 7. Velocidad de crecimiento radial y fase lag en función de las cinco cepas de <i>A. alternata</i>	- 46 -
Figura 8. Análisis preliminar a l ajuste de los modelos a: Ajuste de la curva de crecimiento de los hongos de <i>Alternaria alternata</i> al modelo de Baranyi. b: ajuste al efecto de la temperatura al modelo de Rosso (CMI)	- 47 -
Figura 9. Crecimiento de <i>A. alternata</i> en medio ACP al 5to día a 25°C.	- 49 -
Figura 10. Velocidad de crecimiento (μ) de las cinco cepas de <i>A. alternata</i> aisladas de papaya en función de la temperatura utilizando el modelo CMI.	- 52 -

Figura 11. Tiempo en que se hace visible la colonia (días; t_v) de las cinco cepas de *A. alternata* aisladas de papaya en función de la temperatura utilizando un modelo polinomial ($t_v = a + bT + cT^2$). - 57 -

Figura 12. Velocidad de crecimiento radial (mm/día) y fase lag (días) de las cinco cepas de *A. alternata* en función de la humedad relativa (HR). - 60 -

Figura 13. Velocidad de crecimiento y fase lag en función de las cinco cepas de *A. alternata*..... - 60 -

Figura 14. Velocidad de crecimiento (μ) de las cinco cepas de *A. alternata* aisladas de papaya en función de la Humedad Relativa utilizando el modelo de Arrhenius-Davey ($vel \mu = eA + BHR + CHR^2$). - 66 -

Figura 15. Tiempo de visibilidad (t_v) de las cinco cepas aisladas de papaya en función de la Humedad Relativa utilizando el modelo de Arrhenius-Davey ($t_v = eA + BHR + CHR^2$). - 70 -

Figura 16. Comparación de las velocidades de crecimiento del hongo *A. alternata* predichas vs observadas. a: en función de la temperatura y b: en función de la HR - 74 -

Figura 17. Comparación de los tiempos de visibilidad del micelio del hongo *A. alternata* predichos vs observados. a: en función de la temperatura y b: en función de la HR. - 75 -

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

CAPITULO 1. INTRODUCCIÓN

La papaya (*Carica papaya* L.) es un fruto característico de climas tropicales y uno de los cultivos de fruta de gran importancia. India y Brasil son los principales productores de papaya a nivel mundial y contribuyen con aproximadamente el 83 % de producción anual, donde México participa con el 6.18 % de esa producción (Champathi y cols., 2018). En lo que respecta al consumo de este fruto, México es uno de los principales países consumidores y exportadores de papaya (SAGARPA, 2018).

La papaya tiene un importante valor económico a nivel mundial por su alta rentabilidad y aceptación. Como fruto tropical es climatérico y provoca limitaciones postcosecha, en el almacenamiento y transporte. Este fruto es muy susceptible a daños mecánicos, constituyéndolo un hospedero de microorganismos, lo que causa una vida de anaquel corta, disminución en su calidad y pérdidas postcosecha. En este sentido, la estimación de pérdidas postcosecha de papaya varían entre el 40 al 100% dependiendo de la zona de producción, especialmente en países en vía de desarrollo donde el manejo del fruto no es el óptimo. Otras pérdidas postcosecha que se dan en papaya se deben a frutas blandas y daño mecánico (Champathi y cols., 2018). Sin embargo, la causa principal de pérdidas del fruto ha sido reportada principalmente por enfermedades causadas por hongos. Dentro de los principales hongos postcosecha, se encuentra el *Colletotrichum gloeosporioides*, *Alternaria* spp, *Fusarium* spp, *Rhizopus stolonifer*, entre otros (García y cols., 2003).

Considerando lo anterior, existen factores como la temperatura y humedad relativa del ambiente que favorecen el desarrollo de hongos patógenos, los cuales afectan directamente el almacenaje, transporte y calidad del fruto (García y cols., 2003). Los métodos de control fisicoquímicos para evitar daños y pérdidas en el fruto no han sido suficientes, cualquier factor intrínseco como la actividad de agua o los componentes del fruto podría ser determinante para el desarrollo de hongos y posteriores daños irreversibles. Los atributos de calidad e inocuidad alimentaria, la apariencia, textura, sabor, olor y valor nutritivo, son puestos en riesgo si no se desarrollan estrategias de control para el crecimiento de estos patógenos.

Por consiguiente, el interés por contrarrestar esta problemática va en aumento. Recientemente la Micología predictiva es una herramienta que ayuda a comprender y predecir el desarrollo de hongos en alimentos y materias primas. No obstante, en la literatura científica, pocos estudios han validado los modelos desarrollados para describir el crecimiento de hongos patógenos en frutos tropicales (Judet y cols., 2010); razón por la cual, el objetivo de esta tesis es aplicar un modelo matemático para predecir el crecimiento del hongo *Alternaria* spp., aislado de papaya (*Carica papaya* L.) en función de la temperatura y humedad relativa para controlar la gestión del manejo de papaya.

CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES

CAPITULO 2. ANTECEDENTES

2.1. Generalidades del fruto de papaya

La papaya (*Carica papaya* L.) forma parte de los frutos cultivados en climas tropicales y subtropicales, cuyo cultivo se ha adaptado bastante bien en áreas con suelos fértiles y lluvias abundantes (García y cols, 2003). En consecuencia, este fruto se caracteriza por su alta perecibilidad y susceptibilidad a ser atacado por varios hongos patógenos (Snowdon, 2009). Aun así, es un fruto que sigue siendo producido y consumido a nivel mundial.

2.1.1. Producción mundial y nacional de la papaya

La papaya (*Carica papaya* L.) es un grupo comparativamente nuevo en el comercio mundial de productos básicos. Ha surgido en el mercado internacional en importancia solo desde 1970 en adelante, gracias a los avances en el transporte, los acuerdos comerciales y las preferencias cambiantes de los consumidores a favor de esta fruta. El 83% de la producción mundial se ha concentrado en unos pocos países (cuadro 1) (Altendorf, 2017).

Cuadro 1. Concentración porcentual de la producción de papaya en el mundo.

PAÍS	PRODUCCIÓN (%)
India	38.61
Brasil	17.5
Indonesia	6.89
México	6.18

Etiopia	2.34
Congo	2.12
Colombia	2.08
Tailandia	1.95
Guatemala	1.85

Fuente: adaptado de Hewajulige y Dhekney., (2016)

México representa aproximadamente la mitad de las ventas globales de papaya, ocupando el 3ºer puesto a nivel mundial y 1ºer puesto como exportador de este fruto. En promedio, durante las últimas 10 décadas, México tuvo una producción de aproximadamente 768mil toneladas al año y un incremento en su comercialización (Sagarpa, 2018). En otros países como Colombia, la papaya es de gran importancia económica al ser el tercer cultivo frutícola con mayor número de hectáreas sembradas en dicho país, el departamento que mayor volumen representa de producción es el valle del cauca. Por otra parte, Colombia aumenta sus posibilidades de incursionar en el mercado internacional como puntos de partida a países como Europa y EE.UU., el principal desafío que debe enfrentar la industria de la papaya en Colombia es la mejora en el manejo y empaque, dada las exigencias de los países a exportar (Ica, 2017).

Al ser un fruto demandado tanto a nivel mundial como nacional, la papaya es muy susceptible al manejo que se le dé. A su vez, los principales problemas que enfrenta el mercado de la papaya y su exportación es la identificación de la madurez fisiológica óptima para así asegurar un adecuado manejo postcosecha a lo largo de la cadena agroalimentaria de la papaya (Sudhakar y Singh, 2011).

2.2. Manejo en postcosecha de la papaya

El manejo del cultivo de los frutos en precosecha tiene una influencia importante en su comportamiento postcosecha y un aspecto fundamental es que éstos continúan su proceso de maduración aún después de cosechados. Esto implica una serie de cambios estructurales (firmeza, textura etc.) y bioquímicos (transformaciones de almidón en azúcares, color, producción de etileno etc.) que aumenta las posibilidades de desarrollo de hongos patógenos. El transporte del fruto debe ser lo más rápido posible, dado el aumento de temperatura y humedad relativa limitarían los procesos de empaque y centros de distribución (Velázquez y Toledo, 2007). Debido a la fragilidad de la cáscara y del fruto, en general, la papaya debe ser manejada con mucho cuidado para evitar cualquier daño físico y mecánico. Comúnmente en países en vías de desarrollo, los frutos a granel una vez cosechados son envueltos en periódico para iniciar su proceso de maduración y trasladados usualmente en canastillas al centro de empaque (Muñoz y Rodríguez, 2017) (Fig. 1).



Figura 1. Empaque y transporte de la papaya en poscosecha (Muñoz y Rodríguez, 2017)

A pesar de la preferencia por las canastillas plásticas y la envoltura en periódico, estas prácticas no son recomendadas, ya que pone en riesgo la inocuidad del fruto. Entre las alternativas existentes, se encuentra el uso de mallas de espuma (Fig. 2), tiras de papel o alveolos, para mantener separadas las papayas y evitar el roce entre ellas. Aun así, en países como México y El Salvador, es común el uso de papel periódico. Por consiguiente, este usual e inadecuado manejo del fruto en poscosecha genera de manera crítica pérdidas a nivel mundial, aunque en países de tecnología rudimentaria puede alcanzar pérdidas totales (Muñoz y Rodríguez, 2017).



Figura 2. Envoltura de malla de espuma (Muñoz y Rodríguez, 2017)

Por otro lado, en varios países latinoamericanos todavía se acostumbra el transporte de la papaya en condiciones deficientes de almacenamiento. El transporte se realiza en vehículos en los que por lo general no existe control de temperatura ni humedad relativa y en los que además es común dejar el producto descubierto sin protección para la lluvia y el sol, lo que genera un rápido crecimiento de hongos patógenos y aumenta el porcentaje de pérdidas (Velázquez y Toledo, 2007).

2.2.1. Pérdidas postcosecha

A nivel mundial, las pérdidas postcosecha en papaya varían entre 40 y hasta el 100 %. Entre las principales causas de pérdidas se encuentra las operaciones de manipulación inadecuada del fruto durante su cosecha y postcosecha, un estado de madurez no correspondiente al establecido, recipientes de transporte inapropiados, daños físicos, daños mecánicos y contaminación por agentes patógenos (Champathi y cols., 2018), sin embargo, las pérdidas más significativas han sido reportadas por hongos patógenos, responsables de hasta un 100% (Muñoz y Rodríguez, 2017). Un estudio realizado en los mercados de la ciudad de New York, demostró que el 62 % de los envíos que se hicieron, el daño principal en las papayas se debía a diferentes hongos (Bautista y cols., 2013). Según los autores, las pudriciones postcosecha causadas por hongos se pueden dividir en tres tipos: pudriciones superficiales, pedunculares e internas. Sudhakar y cols., (2011) comentan que las enfermedades causadas por hongos son el problema más importante durante el manejo y almacenamiento de este fruto.

2.2.2. Pérdidas por hongo patógenos

Prácticamente, los frutos son altamente resistentes a la acción de hongos patógenos, esto cambia cuando llegan a su estado de madurez. La susceptibilidad de lesiones en los frutos se desarrolla más rápido durante la senescencia que en los frutos que están recién cosechados y madurados adecuadamente (García y cols., 2010). Un estudio realizado para el control de hongos postcosecha de la papaya, mostró que el fruto es un buen hospedero de varios microorganismos durante su almacenamiento, resaltando el género *Alternaria*, *Colletotrichum*, *Rhizopus*, *Fusarium*, *Penicillium* entre otros (Fig. 3).

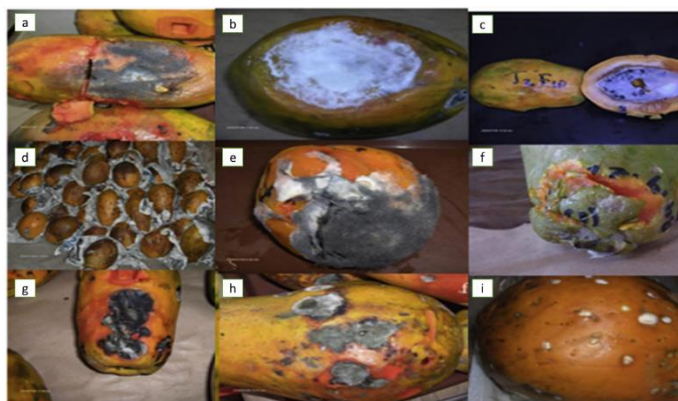


Figura 3. Hongos patógenos poscosecha de papaya: a) *Mucor* sp., b) y c) *Fusarium* spp., d) *Colletotrichum* spp. e) y f) *Rhizopus stolonifer*, g) *Alternaria alternata*, h) *Penicillium digitatum*, i) *Aspergillus* sp. (Bautista y cols., 2013)

La enfermedad más común de la papaya es la antracnosis ocasionada por el hongo *Colletotrichum gloeosporioides*, el cual podría generar pérdidas totales, dependiendo de la zona de producción y almacenamiento (López y cols., 2018). Tomando en cuenta el mecanismo de acción de los hongos, las pérdidas son generadas a raíz de infecciones latentes que ocurren durante el crecimiento y desarrollo del fruto. Asimismo, las mayores pérdidas en postcosecha se deben a podredumbre y se ven reflejadas principalmente en pudriciones superficiales, pedunculares o internas. En consecuencia, los hongos patógenos constituyen la principal limitación para el almacenamiento y el manejo en postcosecha de este fruto, logrando afectar completamente al fruto (cuadro 2) (Muñoz y Rodríguez, 2017).

Cuadro 2. Principales hongos patógenos que afectan la papaya.

HONGOS	ENFERMEDAD
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Antracnosis. Se producen cuando las hifas penetran en la cutícula y causan la afección en la fruta, viéndose como manchas hundidas, redondas y acuosas.
<i>Rhizopus stolonifer</i>	Pudrición blanda. Las esporas entran a través de las lesiones infligidas durante la recolección y el manejo. Los síntomas se reflejan a través de una pequeña área acuosa.
<i>Alternaria spp</i>	Alternariosis. Las esporas se encuentran en forma de bioaerosol en el aire y llegan al fruto, cuyos síntomas son lesiones en la fruta de color negro y en forma circular que muchas veces están cubiertas de esporas de color negro.
<i>Fusarium spp</i>	Podredumbre de la fruta. Las esporas de fusarium penetran a través de heridas a la superficie y posteriormente el tejido se observa acuoso y al finalizar la infección negro.
<i>Phytophthora sp</i>	Pudrición blanquecina acuosa. Las esporas se encuentran inicialmente en el pedúnculo, extendiéndose por toda la fruta de color blanquecino acuoso.

Fuente: (Snowdon, 2009) y (Bautista y cols., 2013)

Actualmente, las tecnologías para disminuir las pérdidas postcosecha provenientes de la actividad de los hongos patógenos continúan buscando alternativas para incrementar la vida de anaquel de los frutos. Particularmente, aquellas que controlan o modifican la atmósfera donde se está tratando el fruto, con la eliminación o adición de gases del ambiente que da como resultado una atmósfera de conservación del producto. Al igual que, controles físicos de la temperatura y humedad relativa a lo largo de toda la gestión en el manejo del fruto (Velázquez y Toledo, 2007).

Por otra parte, se aplican con más frecuencia al producto final tratamientos de control como fungicidas, ceras e irradiaciones gama o UV-visible. Sin embargo, en diversas ocasiones la dosis y frecuencia de aplicación de estas estrategias no son suficientes, puesto que proporcionan resistencia por parte del patógeno y residuos tóxicos para la salud de la persona. Además, algunos hongos como *Alternaria* spp, logran sintetizar toxinas llamadas micotoxinas, que pueden ser un peligro para la salud humana (García y cols., 2009). Por ello, es importante anteponerse a los patógenos postcosecha de manera que no se vea afectada la calidad del fruto y seguridad de la persona (García y cols., 2010). Recientemente, se ha estudiado la Micología predictiva como una herramienta que proporciona elementos de control necesarios para la toma de decisiones en las condiciones de manejo postcosecha de frutos y podría ser efectiva en la antelación de enfermedades del fruto.

2.3. Micología predictiva

La necesidad de garantizar la calidad microbiológica de los productos alimenticios ha estimulado el interés en el uso de modelos matemáticos predictivos para

cuantificar y predecir el comportamiento microbiano (Garcia y cols., 2009). La micología predictiva es una sub-área del campo de la microbiología predictiva, enfocada en el estudio y comportamiento de hongos deterioradores de alimentos, aquí los modelos matemáticos son una herramienta eficiente para evaluar cómo los factores ambientales individuales o combinados afectan en el crecimiento de los hongos que degradan los alimentos. Por otro lado, el modelado predictivo del crecimiento de hongos no ha recibido la misma atención que el modelado bacteriano, debido a la complejidad inherente que se asocia con la cuantificación del crecimiento en hongos y la recopilación de datos suficientes que sean adecuados y reproducibles (Membre y Dagnas, 2013). Por el contrario de las bacterias, que estas se reproducen por fisión binaria y normalmente crecen de manera homogénea y exponencial, los hongos a su vez cuentan con hifas fúngicas que pueden penetrar en la matriz tridimensional física del alimento (Garcia y cols., 2009).

Ahora bien, los modelos bacterianos ayudaron a tener una mejor comprensión de los factores que controlan el crecimiento de un microorganismo y de esta manera poder aplicarlos en el desarrollo de los hongos, para poder así modelarlos (Dantigny, 2016). De esta manera, se abrió paso a la micología predictiva a través del uso de modelos matemáticos empíricos que tuviesen en cuenta las especificidades del hongo en la germinación y proliferación del micelio (Membre y Dagnas, 2013). Siendo esta una herramienta útil para hacer predicciones sobre la extensión de la contaminación, el crecimiento y la producción de toxinas por parte de estos patógenos; sin embargo, actualmente no hay suficientes estudios que cuenten con un modelo predictivo estándar.

2.3.1. Modelos predictivos

Los modelos predictivos involucran varias etapas como la definición del objeto de estudio, identificación de los factores a ser estudiados, microorganismos relevantes, definición del tamaño del inóculo, definición del medio, el modelo matemático y la validación. Según Santos y cols (2015), en la etapa de identificación de los factores (intrínsecos y extrínsecos) se definen los parámetros (variables dependientes) que tengan mayor efecto en el crecimiento/inactivación del microorganismo seleccionado. Estos factores deben ser incluidos en el modelo, teniendo en cuenta aplicaciones futuras y limitaciones de su uso.

En la fase de selección de cepas, se debe considerar el uso de una cepa representativa o un cóctel de cepas, así como el uso de una cepa aislada del propio fruto. El tamaño del inóculo debe asegurar que la respuesta del microorganismo pueda ser modelada. Los estudios sugieren incluir el tamaño del inóculo como variable dependiente en el modelado (Santos y cols., 2015). Ahora bien, la literatura ha demostrado que el desarrollo de un modelo predictivo puede ser realizado tanto en medio sintético como en el propio alimento (Membre y Dagnas, 2013). Los modelos desarrollados en medios sintéticos pueden no simular correctamente lo que ocurre en el alimento, por lo que se hace necesaria una validación en el alimento que se pretende aplicar el modelo.

2.3.2. Tipos de modelos

Los modelos matemáticos se utilizan para predecir el crecimiento de diferentes microorganismos, también para estudiar la respuesta de éstos a los factores

ambientales y se pueden clasificar como primarios, secundarios o terciarios. Los modelos primarios describen el crecimiento de microorganismos en función del tiempo en condiciones específicas (García y cols., 2009). Los modelos secundarios se refieren al modelo primario relacionado con la influencia a factores ambientales, como la actividad del agua, el pH, la temperatura, etc., en la germinación y el crecimiento de los mohos. Los modelos terciarios combinan modelos primarios y secundarios con una interfaz de computadora, lo que proporciona una herramienta de predicción completa (García y cols., 2009).

2.3.2.1. Modelos primarios

Estos modelos describen el crecimiento de una población de microorganismos en función del tiempo y forman la base para adoptar estrategias para la inocuidad de los alimentos (García y cols., 2009). No obstante, el crecimiento de hongos implica la germinación y la extensión de hifas, formando finalmente el micelio. Para cuantificar el desarrollo fúngico, se analizan los datos de germinación y proliferación de micelio, a diferencia de las bacterias en que se estudia el crecimiento a través de las unidades formadoras de colonia (UFC). La germinación de hongos generalmente se revisa al microscopio y el número de esporas germinadas se grafica contra el tiempo. Por consiguiente, en el uso de modelos primarios se maneja la latencia antes de la germinación, el porcentaje máximo de esporas germinadas y el tiempo de germinación (el tiempo para germinar el 50 % de las esporas en el inóculo). En el cuadro 3 se muestran los modelos que comúnmente se utilizan en el crecimiento de hongo para modelos primarios.

Cuadro 3. Principales modelos primarios aplicados al crecimiento de hongos.

Tipo de crecimiento	Modelo	Ecuación
Germinación	Gompertz	(1) $P = P_{(m\acute{a}x)} * \exp \left\{ -\exp \left[\left(\frac{k * \exp(1)}{P_{m\acute{a}x}} \right) (\lambda - t) + 1 \right] \right\}$
	Función logística	(2) $P_{(t)} = \frac{P_{m\acute{a}x}}{1 + \exp[k(\tau - t)]}$
Proliferación del micelio	Baranyi	(3) $Y_{(t)} = Y_0 + \mu * A_{(t)} - \ln \left\{ 1 + \frac{[\exp(\mu * A_{(t)}) - 1]}{\exp(Y_{m\acute{a}x} - Y_0)} \right\}$ $A_{(t)} = t + \left(\frac{1}{\mu} \right) * \ln [\exp(-\mu * t) + \exp(-\mu * \lambda) - \exp(-\mu * t - \mu * \lambda)]$

Fuente: adaptado de Membre y Dagnas (2013)

(1). t (tiempo en horas). P_(t), y P_{máx}, son el porcentaje de esporas germinadas en el tiempo t. τ (horas) es el punto de inflexión y k (porcentaje por hora) está relacionado con la pendiente de la línea tangente al punto de inflexión. (3). Y_{máx}, Y (diámetro/radio de la colonia máximo en el tiempo), μ_{máx} (tasa de proliferación radial máxima), λ (latencia), son parámetros de crecimiento (crecimiento fúngico que incluye el proceso de germinación).

En los modelos de germinación, las esporas de hongos se diseminan en el medio ambiente y a su vez la germinación se puede considerar como el paso principal para enfocarse desde el punto de vista de la calidad de los alimentos, porque el producto se rechaza tan pronto como puedan ser visibles las hifas. El proceso de germinación involucra la iniciación de la activación bioquímica, incrementos de cambios morfológicos y de tasa metabólica. Varios estudios concuerdan que son muchos los factores que pueden afectar la cinética de la germinación en hongos y los tiempos de germinación de las esporas muchas veces no son valores ajustables (Gougouli y Koutsoumanis, 2012).en consecuencia, hay pocos estudios

sobre la cinética de la germinación; esta escasez puede explicarse por las dificultades para adquirir datos suficientes y reproducibles. Aun así, el aumento del porcentaje de esporas germinadas a lo largo del tiempo se ha modelado a través de Gompertz (García y cols., 2009).

Por otra parte, la proliferación de micelio es comúnmente evaluada a través de la medición del crecimiento radial visible (diámetro de la colonia) en función del tiempo. A través de los modelos primario desarrollado por Baranyi, es posible la obtención de los parámetros de latencia antes de la proliferación (λ) y la tasa de proliferación radial (μ) (Membre y Dagnas, 2013). El crecimiento radial visible se define como el tiempo requerido para que la colonia alcance un diámetro entre 3-5mm. De esta manera, los modelos primarios describen el aumento o declinación de la población microbiana en función del tiempo. Aquí, el método más simple y utilizado para fines de obtención de datos y modelado es la medición del diámetro, aunque no se puede aplicar en el análisis de alimentos. Para ello, en muchos casos el contenido de ergosterol se ha utilizado para cuantificar el crecimiento de hongos (García y cols., 2009). A través de los modelos primarios es posible la estimación de parámetros cinéticos como tasa de crecimiento radial y fase lag en hongos (Santos, 2015).

2.3.2.2. Modelos secundarios

Los modelos secundarios describen el efecto de las condiciones ambientales, representadas por factores intrínsecos (Actividad de agua (A_w), pH, agentes antimicrobianos, nutrientes) como extrínsecos (temperatura, atmósfera, humedad relativa). Por ello, se han desarrollado modelos para cuantificar dichos efectos en

la cinética de proliferación del micelio y, en cierta medida, en la cinética de germinación. Los parámetros de germinación o crecimiento (por ejemplo, la tasa de crecimiento máxima) son estimados a partir de modelos primarios se modelan en función de los factores intrínsecos y extrínsecos de los alimentos (García y cols., 2009). Dos de los parámetros más importantes que determinan la capacidad de los hongos para crecer en los alimentos son la actividad del agua y la temperatura. A diferencia de las bacterias, la actividad del agua tiene un mayor efecto sobre desarrollo del hongo que la temperatura. Pitt (1993) desarrollaron un modelo mecanicista que integra los datos de la literatura sobre el efecto de la temperatura, la acidez, el pH y el tamaño de la colonia en el crecimiento *in vitro* de hongos como *A. flavus* y de la producción de aflatoxinas. Los modelos desarrollados primero para bacterias se han aplicado al crecimiento de hongos y en general se usan tres tipos de modelos: Polinómicos, cardinal y regresión logística (Cuadro 4).

Cuadro 4. Principales modelos secundarios aplicados a hongos

Crecimiento del hongo	Modelo	Parámetros	Ecuaciones
Germinación y proliferación del micelio	Polinómicos y raíz cuadrada	λ, μ	(1) $Y = a_0 + \sum_{i=1}^3 a_i X_i + \sum_{i=1}^3 \sum_{j=1}^3 a_{ij} X_i X_j$ (2) $\sqrt{Y} = b(T - T_{min}) * [1 - e^{(c(T - T_{max}))}]$
Proliferación del micelio	Cardinal	λ, μ	(3) $\mu = \frac{\mu_{opt}(T - T_{max})(T - T_{min})^2}{(T_{opt} - T_{min})\{(T_{opt} - T_{min})(T - T_{opt}) - (T_{opt} - T_{max})(T - T_{opt})\}}$

Proliferación del micelio	Regresión logística	Límite de crecimiento/ Crecimiento	(4) $logit(P) = \ln\left(\frac{P}{1-P}\right) = a_0 + \sum_{i=1}^3 a_i x_i + \sum_{i=1}^3 \sum_{j=1}^3 a_{ij} x_i x_j$
------------------------------	------------------------	--	--

Fuente: adaptado de Membre y Dagnas (2013) y Garcia y cols., (2009)

(1) Y (respuesta cinética), a_0 y a_i , son parámetros estimados y X_i y X_j , son las variables independientes.

(2) Modificación del modelo polinomial con la implementación de la raíz cuadrada.

(3) Función o respuesta logística donde P es la probabilidad de crecimiento en un rango de 0-1.

Los modelos polinómicos se han utilizado ampliamente en Microbiología Predictiva para la evaluación cuantitativa de los efectos de diversos factores ambientales en el crecimiento de hongos. Por lo general, se construyen mediante análisis de regresión lineal múltiple y permiten que se tenga en cuenta cualquiera de los parámetros ambientales y sus interacciones (Garcia y cols., 2009). Por otro lado, Ratkowsky uso los modelos tipo raíz cuadrada para incluir todo el rango de temperaturas de un crecimiento biocinético, es poco el enfoque que ha tenido en el estudio del modelado en hongos. Aun así, es un modelo que fue usado para examinar la relación entre la temperatura y la tasa de crecimiento.

Rosso y cols (1993), propuso este modelo de temperatura que usa las tres temperaturas cardinales temperatura mínima (T_{min}), temperatura máxima (T_{max}), temperatura óptima (T_{opt}) y la tasa de crecimiento específica a la temperatura óptima. Este modelo se construyó empíricamente (observaciones y experiencia de los modelos de bacterias) como una herramienta para describir los datos sin el objetivo de una explicación mecanicista. Una gran ventaja de este modelo es que todos los parámetros tienen un significado fisiológico que facilita claramente las estimaciones de los parámetros iniciales. El modelo fue probado algunos años más

tarde en un conjunto de datos de crecimiento de hongos, teniendo en cuenta A_w como factor (Garcia y cols., 2009).

Otro tipo de modelo secundario son los modelos de probabilidad, estos modelos son útiles cuando el objetivo es determinar si el crecimiento del patógeno puede ocurrir o no en condiciones específicas. Experimentalmente, el enfoque es más simple que para otros casos; los operadores deben codificar las respuestas como 0 (ningún crecimiento) o de 1 (crecimiento) se obtiene en una cierta combinación de factores extrínsecos e intrínsecos y después de un cierto tiempo. Para determinar la probabilidad se utiliza una función matemática que use las técnicas de regresión logística, construyéndose a partir de respuestas límites de crecimiento/no crecimiento sobre los factores considerados o a menudo una vinculada a un modelo polinomial (Membre y Dagnas, 2013).

2.3.2.3. Variables que influyen en el crecimiento fúngico

Actividad de agua (A_w): La A_w está relacionada con el agua disponible en la matriz y generalmente es el factor dominante en el control de la estabilidad y el deterioro de los alimentos. Esta variable es el principal factor que influye en el crecimiento de los hongos a diferencia de las bacterias, dado que el hongo necesita disponer del agua libre (no asociada a solutos, etc.) para su desarrollo. La variabilidad de la A_w afectará el crecimiento de manera que el hongo necesitará más trabajo para obtenerla, disminuyendo su rendimiento (Greco y cols., 2017). Sobre la base de A_w , se pueden definir dos tipos de hongos: hongos xerófilos, que pueden crecer a bajas A_w (es decir, por debajo de 0.85), mientras que, los no aerófilos pueden crecer en A_w de 0.85 a 1. Algunas especies de *Eurotium* spp.,

Wallemia spp., y *Chrysosporium* spp., son xerófilas, mientras que algunas especies de *Penicillium* spp., y *Aspergillus* spp., no lo son (Membre y Dagnas, 2013).

Temperatura (T): El crecimiento del hongo estará siempre influenciado por la Temperatura, puesto que todos tienen un rango de temperatura óptima que favorece su crecimiento. Si hay una variación en las condiciones óptimas, el metabolismo se altera y no hay desarrollo del hongo. Generalmente, el crecimiento fúngico está dado de 25° a 45°C, aunque existen hongos que se pueden desarrollar en temperaturas mucho más bajas (Greco y cols., 2017). En el caso del hongo *Alternaria* spp, éste se desarrolla en un rango de temperatura óptima de 24°C a 26°C y humedades relativas mínimas (25-30%), hasta saturadas (90-95%).

Humedad relativa (HR): La humedad relativa del ambiente es una variable determinante para el inicio y desarrollo de la enfermedad. La humedad relativa es esencial para algunos patógenos, sobre todo en la etapa de germinación de esporas, formación del tubo germinativo y su posterior penetración. Suponiendo que hay suficientes nutrientes disponibles (caso de los alimentos), el crecimiento del hongo se controlará principalmente por la temperatura y la humedad relativa (López y cols., 2012).

La estrecha relación que existe entre los procesos de germinación, desarrollo de la enfermedad y las variables que influyen en el crecimiento de los hongos, abre la posibilidad de explicar y predecir el comportamiento de este tipo de organismos a través del uso de modelos de simulación matemática (López y cols., 2012). Si bien, no hay demasiados modelos validados, aun así, Judet y cols (2010) en su investigación validaron el desarrollo de un modelo para predecir el efecto

combinado de temperatura y A_w en la tasa de crecimiento radial del hongo. En donde demostraron que los modelos cardinales pueden validarse en productos agroalimentarios con una amplia gama de temperaturas y A_w . Asimismo, Sandoval-Contreras y cols (2017) validaron el modelo para predecir el efecto de la temperatura en las cepas de *Aspergillus niger*, demostrando que existe una variabilidad menor en los modelos predictivos debido a que el hongo crece más lento en la fruta que en el medio de cultivo.

2.3.2.4. Ejemplos de modelos predictivos aplicados a hongos

En este tipo de modelos dedicados a los hongos, las variables más importantes a incluir están en función de las condiciones óptimas para el crecimiento. Tal como nos indica Baert y cols (2007), que vieron el efecto de la temperatura de almacenamiento en la tasa de crecimiento y la fase lag de seis cepas de *Penicillium expansum* de hongos relacionados con manzanas. El estudio de las tasas de crecimiento y las fases lag se estimaron mediante regresión lineal y evaluaron varios modelos secundarios (cuadro 2, ecuación 2), en donde el modelo Arrhenius Davey proporcionó el mejor ajuste a los datos observados.

Asimismo, Sandoval-Contreras y cols (2017) evaluaron el efecto de la temperatura y tiempo en que se hacen visibles las colonias. Usaron un modelo secundario (modelo cardinal de Rosso) para describir el efecto de la temperatura en la tasa de crecimiento, teniendo un buen ajuste de resultados con el mismo. Finalmente, Sardella y cols (2018) estudiaron el efecto de la temperatura en la cinética de crecimiento del micelio en cuatro aislados de hongos poscosecha en pera. Utilizaron el modelo cardinal (cuadro 2, ecuación 3) para determinar la tasa de

crecimiento (μ) y la fase lag (λ) de cada aislamiento, logrando un buen ajuste de los datos. También, validaron el modelo en medios preparados de pulpa de pera triturada e inóculos en las peras, obteniendo como resultados predicciones correctas de *R. stolonifer* y *B. cinerea* y buena correlación para los hongos *P. expansum* y *A. alternata*.

CAPÍTULO 3. JUSTIFICACIÓN

CAPÍTULO 3. JUSTIFICACIÓN

La papaya es un fruto tropical que debido a sus características nutricionales es producido y consumido en diferentes países, lo que representa una gran importancia económica. Sin embargo, al ser un fruto climatérico con cáscara frágil, es susceptible a sufrir daños físicos, mecánicos y microbiológicos en su recolecta y manejo posterior, lo que lleva a ser un fruto altamente perecedero, con grandes pérdidas postcosecha. Al respecto, los daños microbiológicos, particularmente provocados por hongos, representan la principal preocupación de la comunidad agroindustrial y científica observada como causa directa de la pudrición del fruto. La irreversibilidad de estos daños, repercute directamente en la economía a nivel productor y empresa, así como mercados locales, regionales e internacionales. Ahora bien, pese a los diversos métodos de control físicos (temperatura, humedad relativa, etc.) y químicos (fungicidas) considerados para mitigar las pérdidas, no existe el cuidado riguroso que implica todo el manejo postcosecha. A partir de estos razonamientos, la presente tesis expone la micología predictiva, mediante el uso de modelos matemáticos, como una herramienta alternativa que describe el comportamiento y crecimiento del hongo al manipular parámetros ambientales (temperatura y humedad relativa) en el almacenamiento y transporte de la papaya, de manera que facilite el control y la predicción de la vida en anaquel del fruto.

Es por ello que, al formular un modelo matemático para predecir el crecimiento del hongo *Alternaria* spp., aislado de papaya (*Carica papaya* L.) en función de la temperatura y humedad relativa del ambiente permitirá controlar la calidad de papaya en su manejo postcosecha.

CAPÍTULO 4. OBJETIVOS

CAPÍTULO 4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo General

Aplicar un modelo matemático para predecir el crecimiento del hongo *Alternaria* spp., aislado de papaya (*Carica papaya* L.) en función de la temperatura y humedad relativa para determinar el comportamiento del hongo en postcosecha.

4.2. Objetivos Específicos

- Aislar e identificar morfológica y molecularmente el hongo fitopatógeno de la papaya (*Carica papaya* L.)
- Aplicar modelos matemáticos para predecir el crecimiento del hongo *Alternaria* spp. en función de la temperatura.
- Aplicar modelos matemáticos para predecir el crecimiento del hongo *Alternaria* spp. en función de la Humedad Relativa.
- Validar en papayas los modelos matemáticos desarrollados.

CAPÍTULO 5. MATERIALES Y MÉTODOS

CAPÍTULO 5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Aislamiento e identificación del hongo fitopatígeno

5.1.1. Aislamiento y purificación

El proceso de aislamiento y purificación de las cepas de hongo se llevó a cabo según el procedimiento de Guerra (2018) con algunas modificaciones. Se muestrearon papayas infectadas de los mercados de Tepic, Nayarit y se tomaron muestras de las lesiones característica de una infección por *Alternaria* spp. Los cortes fueron sembrados en cajas de agar papa-dextrosa (PDA) acidificado con ácido tartárico (1.4 % con respecto al medio). Las muestras fueron incubadas a 25°C durante siete días. Para obtener las cepas puras, se realizaron re-inoculaciones sucesivas en PDA hasta obtener un crecimiento puro y homogéneo.

5.1.2. Caracterización morfológica del fitopatígeno

Las colonias puras de los hongos fitopatógenos aislados se describieron conforme a métodos morfológicos tradicionales, típicos para el género *Alternaria* spp., (tipo de morfología, tipo de micelio, color y diámetro de las colonias) (Farrera y cols., 2007; Estrada y cols., 2017). La identificación microscópica, se realizó mediante técnicas de microcultivos. Para ello, se colocó una gasa estéril humedecida con agua destilada, una varilla de vidrio en una caja Petri y sobre esta un portaobjeto. Posteriormente se hizo un corte con ayuda de un bisturí estéril al medio de cultivo (PDA) en cuadrados de aproximadamente 1 x 1cm y luego se colocó un cuadrado en medio del portaobjeto. Con ayuda de un asa bacteriológica se tomaron inóculos del hongo a cultivar y se inoculo en los cuatro bordes del cuadro de agar, al finalizar

se colocó un cubre objeto sobre el medio de cultivo y se incubó a una temperatura de estrés (27°C) (Trujillo, 2010).

5.1.3. Identificación molecular del hongo fitopatógeno

Para la identificación molecular del hongo fitopatógeno se siguió el protocolo de Liu y cols (2011), para la extracción de ADN genómico con la siguiente modificación: se utilizó un buffer de extracción (0.576g de Na₂HCO₃ y 0.333g de NaCO₃. pH 9.6) en lugar de buffer de carbonato a 0.05M, adicionado con Tween 20. Del ADN extraído se tomó una alícuota de 1 µL para su amplificación por PCR. En cuanto a la reacción de PCR se ajustó a un volumen total de 25 µL por reacción (1 µL del ADN genómico, 5 µL de Buffer Green (X), 2.5 mM MgCL₂, 0.5 µM dNTP, 1.25 µM del cebador iniciador, 1.25 µM del cebador inverso, 1.25 µL DMSO (%), 0.125 µL polimerasa y 12.125 de agua °PCR). La reacción se llevó a cabo en un termociclador tal y como lo indica White y cols (1990), una vez obtenido los productos de PCR fueron separados en un gel de agarosa al 1.5% por electroforesis 90V por 1h. Se corrió el marcado 1kbplus (3 µL de KbPlus, 3 µL Redgel y 4 µL de AguaMQ), la muestra (7 µL de producto de PCR y 3 µL Redgel) y por último un control negativo (todos los reactivos de la PCR sin el ADN genómico). Al finalizar se visualizó el gel por luz UV. Los productos obtenidos fueron enviados a secuenciar al laboratorio Genewiz Global Inc. USA y una vez obtenidas las secuencias las búsquedas de similitud de secuencia se realizaron utilizando las bases de datos del Centro Nacional de Información de Biotecnología (NCBI) con el programa de Herramienta de Búsqueda de Alineamiento Local Básico (BLAST)

5.1.4. Preparación del inóculo

Para preparar el inóculo fue realizada una suspensión de esporas a partir de los aislados puros. Para ello, se sembró el hongo fitopatógeno en agar Czapek (medio de cultivo bajo en nutrientes) de 10-15 días aproximadamente a temperatura de estrés (13°C). A los cuales se les agregó una solución salina (0.85 % p/v) adicionado de Tween-80 (0,1%) y raspando la superficie de las placas. La suspensión resultante se filtró asépticamente a través de una gasa estéril para eliminar el micelio y se determinó la concentración de esporas por medio de una cámara de Neubauer. Se ajustó a una concentración final de 10^5 esporas/ml (Gilchrist, 2005).

5.1.5. Medio de cultivo agar papaya (ACP), inoculación e incubación

Para el estudio de los modelos *in vitro*, se realizó un medio de cultivo exclusivo en esta investigación. Se diseñó un medio natural que contuviese mínimo 4% de carbohidratos. Para ello, se tomó en cuenta la composición química de la cáscara de papaya (Stefanello y Rosa, 2012) sana con grado de madurez de consumo, en donde se adicionó 122 gr de cáscara finamente triturada y 15 gr de agar bacteriológico por litro y se les ajustó el pH a 4.6 ± 0.5 . Se esterilizó a 121°C por 15 min. Las placas de ACP se inocularon al centro de la placa por triplicado con 10 μ L de la solución de esporas de cada uno de los aislados. La incubación se llevó a cabo en dos fases: primero las placas de ACP inoculadas se incubaron por tratamiento de diferentes temperaturas (13, 18, 22, 25, 28, 30 y 35 °C) y HR constante (80 %). Segundo, las placas de ACP se incubaron por lotes a diferentes HR (40, 60, 75, 80 %) y temperatura constante (25°C). En ambos casos, se

revisaron a diario y tan pronto comenzó el crecimiento, los diámetros (mm) de la colonia se midieron en dos dimensiones con un vernier y se registraron.

5.2. Modelo matemático en función de la Temperatura

5.2.1. Diseño estadístico

De forma preliminar, se realizó un diseño factorial 3x5 con tres niveles de temperatura (13, 25 y 30°C) y cinco niveles que correspondieron a las cinco cepas aisladas de papaya. Para evaluar si las cepas aisladas eran diferentes estadísticamente, para ello se evaluaron las medias con un estadístico Fisher LSD y un α 0,05. Los datos fueron de velocidad de crecimiento fueron sometidos a un análisis de varianza, para evaluar la homogeneidad a través de la relación entre la media y la varianza. Asimismo, para determinar el comportamiento y ajuste previo de los datos obtenidos de las cepas se probó un modelo primario y secundario. El ajuste de las curvas se realizó con el programa Statgraphic Centurion XVII. En esta investigación no se tomó en cuenta la A_w , debido a que en el consumo de frutas frescas (no procesadas) la A_w debe rondar alrededor de 1 para que se considere de calidad (Sandoval-Contreras y cols., 2017).

5.2.2. Modelo primario

Una vez hecho el análisis estadístico y obtenido los datos de crecimiento de las cepas en el medio ACP, para poder obtener la velocidad de crecimiento (μ) y fase lag (λ) de las cinco cepas, se utilizó el modelo de Baranyi (Ec. 3, cuadro 3 de la sesión de antecedentes). El ajuste de los datos a las curvas se realizó con el programa Statgraphic Centurion XVII, utilizando una regresión lineal y el algoritmo

de Maquart en los modelos de Baranyi y Rosso respectivamente, con un 95% de confianza.

$$Y = Y_0 + \mu A - \ln \left\{ 1 + \frac{[\exp(\mu_{max}A) - 1]}{\exp(Y_{max} - Y_0)} \right\} \quad (\text{Ec. 3})$$

Donde

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

En la ecuación Y es el radio de la colonia (mm); Y_0 es el radio de la colonia al tiempo $t = 0$, Y_{max} es el radio máximo de la colonia en las cajas de Petri, y A es una integral variable que va desde 0 a t en función de la curvatura de la gráfica: μ_{max} (mm/d) es la velocidad de crecimiento máxima; λ (d) es la fase lag y t (d) es el tiempo.

5.2.3. Modelo secundario

Para describir el efecto de la temperatura en el crecimiento de las cepas aisladas de papaya, se utilizó un modelo cardinal con inflexión (CMI) desarrollado por Rosso y cols. (1993) (Ec. 3, cuadro 4 de la sesión de antecedentes). La bondad del ajuste se evaluó gráficamente y al calcular el coeficiente de determinación R^2 y los errores cuadráticos medios (CME).

$$\mu = \frac{\mu_{opt}(T - T_{max})(T - T_{min})^2}{(T_{opt} - T_{min})[(T_{opt} - T_{min})(T - T_{opt}) - (T_{opt} - T_{max})(T_{opt} + T_{min} - 2T)]} \quad (\text{Ec. 3})$$

Donde T_{max} , T_{min} y T_{opt} son los valores cardinales de temperatura máxima, mínima y óptima respectivamente, y μ_{opt} es la velocidad de crecimiento a la temperatura

óptima y T es la temperatura. También, fue usado un modelo polinomial (Ec. 1, cuadro 4 de la sesión de antecedentes) para calcular el tiempo en que se hace visible la colonia (t_v). El tiempo t_v se calculó utilizando la función Solver de Excel (Microsoft, Redmond, WA) utilizando los parámetros cinéticos obtenidos del modelo de Baranyi.

$$t_v = a + bT + cT^2 \quad (\text{Ec. 1})$$

Donde T es la temperatura., a , b y c son parámetros estimados del modelo.

5.3. Modelo matemático en función de la Humedad Relativa

5.3.1. Diseño estadístico

De forma preliminar, se realizó un diseño factorial 3x5 con tres niveles de Humedad Relativa (40, 60 y 80%) y cinco niveles que correspondieron a las cinco cepas aisladas de papaya. De la misma manera que se realizó con el factor ambiental (Temperatura), fue evaluadas las medias con un estadístico Fisher LSD y un α 0,05. Y se hizo un ajuste preliminar a los modelos primario y secundario. El ajuste de las curvas se realizó con el programa Statgraphic Centurion XVII.

5.3.2. Modelo primario

Una vez que se obtuvieron los datos de crecimiento de las cinco cepas en las distintas condiciones de incubación para HR, se realizó de igual manera que para la T , utilizando el modelo primario de Baranyi (Ec. 3, cuadro 3 de la sesión de antecedentes) para el cálculo de la velocidad de crecimiento (μ) y fase lag (λ).

5.3.3. Modelo secundario

Para describir el efecto de la Humedad Relativa en la velocidad de crecimiento de las cinco cepas aisladas, se utilizó un modelo secundario de Arrhenius modificado Davey (Ec. 4). La bondad de ajuste se evaluó con el programa Statgraphic Centurion XVII, utilizando una regresión no lineal y el algoritmo de Marquardt con un 95% de confianza.

$$vel (\mu) = e^{(A + \frac{B}{HR} + \frac{C}{HR^2})} \quad (\text{Ec. 4})$$

Donde, A , B y C son parámetros estimados por el modelo. Asimismo, fue calculado el tiempo en hacerse visible la colonia (t_v) usando la misma ecuación de Arrhenius-Davey (Ec 4) al cambiar la variable velocidad por tiempo visible. También, para el cálculo del t_v se hizo utilizando la función Solver como en el caso de la Temperatura.

5.4. Validación de los modelos en función de la temperatura y humedad relativa

La validación de ambos modelos (Temperatura y Humedad relativa), se realizó según la metodología de Sardella y cols (2018) con algunas modificaciones, de las cuales, para el caso de la temperatura se tomaron 5 papayas sanas con un grado de madurez fisiológica por cada condición de T , se sometieron a un tratamiento previo de calor a través de un baño a 65°C por 20 seg para inactivar cualquier microorganismo latente y se secaron a T ambiente. Posteriormente, se hicieron tres incisiones por cada papaya para luego inocular $10 \mu\text{L}$ de una suspensión con 1×10^6 esporas/mL e incubarse a 13, 22 y 25°C y HR cte. (80%). Asimismo, se tomaron 5

papayas sanas por cada condición de HR, se hizo el mismo paso previo que en la temperatura y se inocularon igualmente 10 μ L de una suspensión con 1×10^6 esporas/mL incubándose a 40, 75 y 80% y T cte. (25°C). En ambos casos, una vez que obtuvimos los datos de crecimiento se utilizó nuevamente el modelo primario de Baranyi y se hizo el ajuste correspondiente con el programa Statgraphic Centurion XVII. La validación matemática de ambos modelos (T y HR) fue hecha mediante el cálculo del factor de sesgo (B_f) y de precisión (A_f), como también el uso del parámetro estadístico RMSE el cual es una medida de la variabilidad residual entre los valores pronosticados y observados.

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum (V_p - V_o)^2}{n - p}}$$

$$B_f = 10 \left(\frac{\sum \log \left(\frac{V_p}{V_o} \right)}{n} \right)$$

$$A_f = 10 \left(\frac{\sum \left| \log \left(\frac{V_p}{V_o} \right) \right|}{n} \right)$$

Donde V_p , V_o y n , son el valor predicho, valor observado y el número de muestras respectivamente y p es el número de parámetros a estimar en el modelo.

CAPÍTULO 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CAPÍTULO 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Identificación del hongo fitopatígeno

6.1.1. Identificación morfológica macro y microscópicamente

Del total de las muestras recolectadas de papaya, se obtuvieron cinco cepas del hongo fitopatígeno las cuales fueron codificadas como CpA-01, CpA-02, CpA-03, CpA-04 y CpA-05. Estas se identificaron mediante el análisis macro y microscópico conforme a sus características morfológicas. Se observaron similitudes morfológicas en todos los aislados (Fig. 4), esto puede explicarse ya que el género *Alternaria* spp., presenta consistencias en su apariencia macroscópica en una diversa gama de medios. Las ligeras variaciones se deben a las diferentes capacidades de adaptación y absorción de los nutrientes (Govind y cols., 2016).

Los caracteres fenotípicos de los cinco aislados presentaron colonias de forma uniforme, con bordes continuos y filamentosos. El color del micelio de la mayoría de los aislados fue crema-grisáceo claro, con anillos concéntricos intermedios de color olivo-grisáceo, el micelio de los aislados CpA-02 y CpA-03 fue parcialmente inmerso, mientras que los otros fueron mucho más superficiales. La textura que presentaron todos los aislados fue semi-algodonosa. El crecimiento fue generalmente rápido, 4-7 días, con diámetro aproximado de 50 a 70 mm. Las colonias llevan consigo un margen blanquecino prominente cuando se cultivan en PDA (Fig. 4), esto concuerda con lo que reportó Troncoso y Tiznado (2014) y Elfar y cols (2018), quienes aislaron especies de *Alternaria* spp. de tomate, manzana, frutos cítricos y papa, indicando que las especies de *Alternaria* spp. se caracterizan con este crecimiento al ser sembrados en PDA, dado a la síntesis nueva de los nutrientes.

El envés de las colonias va de un color marrón oscuro a negro a excepción de la CpA-03 y CpA-05 que presentaron un color que va de marrón-crema claro con algunas zonas negras. El color del envés se debe a la producción de melanina que caracteriza a este género (Patriarca y Pinto, 2018). En especies de *Alternaria*, la clasificación se basa principalmente en la morfología y el desarrollo de los conidios y conidióforos y, en menor medida, en la morfología de la colonia y en las interacciones con el huésped (Basim y cols., 2016).

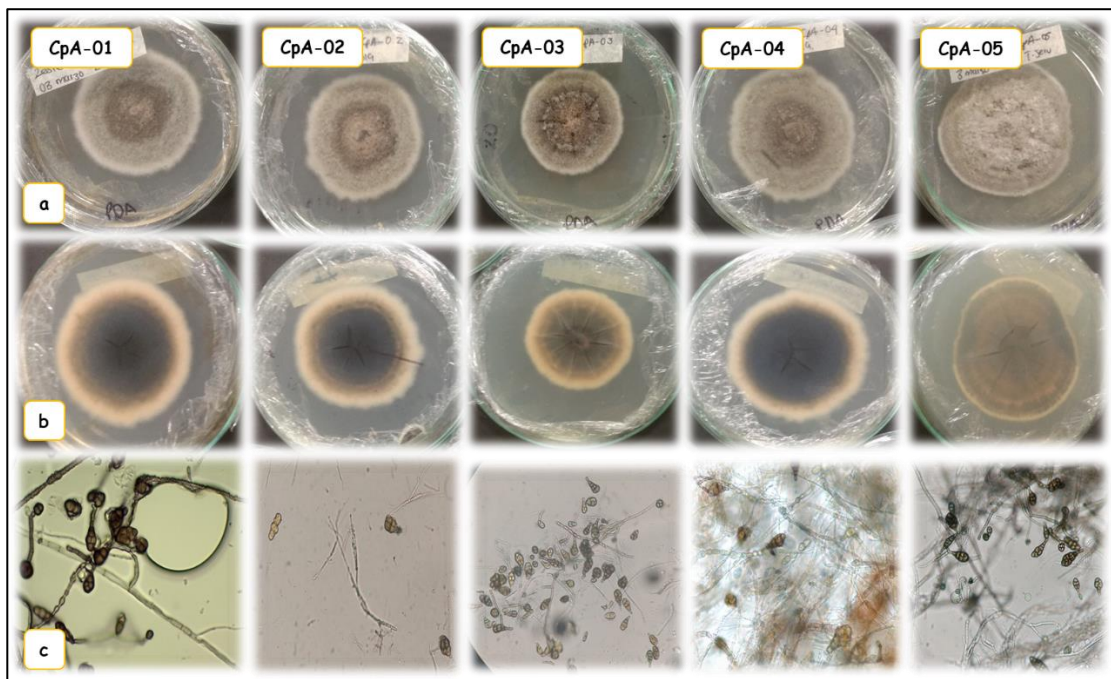


Figura 4. Aislados de papaya (*Carica papaya* L.) del hongo *Alternaria* spp., en medio PDA de 5-7 días. **a**: haz **b**: envés y **c**: conidios observados al microscopio 40X.

En cuanto a la caracterización microscópica, se han reportado varios medios para la obtención de los conidios (Govind y cols., 2016). En esta investigación, los cultivos no mostraron buena esporulación en el medio PDA y se requirió de un tiempo de entre 10 y 15 días a 13°C en el medio Czapek (Charlton, 1953). Debido

a que el género *Alternaria* spp. se clasifica como hongos imperfectos (no se le conoce su estado de reproducción sexual), algunos informes han reportado que factores como la disponibilidad de nutrientes, el medio, la temperatura, la humedad, el pH etc., pueden influir en la obtención y formación de conidios (Pitt y cols., 2014; Basim y cols., 2016; Govind y cols., 2016).

Del análisis microscópico, los conidios que se observaron corresponden con un color melanizado con aproximadamente 4 a 6 septos, la mayoría de las cepas presentó conidios simples a excepción de la CpA-03 y CpA-05 que se producen ramificados. Para todos los aislados, se encontraron conidios de formas alargadas, medianas, segmentadas y elipsoide. El cuerpo de los conidios puede estrecharse gradualmente hasta alcanzar la forma de un pico cónico, logrando hacer una identificación presuntiva como el género de hongo *Alternaria* spp. Estas características son consistentes con las obtenidas por Elfar y cols (2018) y Basim y cols (2016), quienes aislaron el hongo de manzana y olivos respectivamente. Sin embargo, estas estructuras pueden ser bastante complejas y presentar diversidad considerable dentro del género, incluso entre taxones estrechamente relacionados (Patriarca y Pinto, 2018). Por otra parte, las cepas CpA-01 y CpA-02 presentaron conidios ovoides en las primeras etapas de desarrollo y un poco elipsoidal en su desarrollo completo. En general, las cinco cepas presentaron tantos septos longitudinales como transversales, esto concuerda con lo descrito por Simmons (1967) en la tipificación del género de *Alternaria* spp. Dado que la clasificación por especie puede ser laboriosa, Xiao y Zhu (2015) clasificaron los conidios de *Alternaria* spp., aislados de arándanos como “conidios pequeños” menos de 60 micras y “conidios grandes” mayor a 60 micras, además, la clasificación mostró que, conidios pequeños del género *Alternaria* contiene especies que son saprófitos o patógenos postcosecha y dado a su naturaleza cosmopolita, se pueden

encontrar en una amplia gama de materiales y productos. Los resultados presentados, podrían sugerir que los hongos aislados son patógenos postcosecha. Diversos estudios han logrado aislar *A. alternata* de papaya mencionándolo como patógeno importante en postcosecha causante de la mancha o pudrición por *Alternaria* spp. (Torres, 2000; Mulkay y cols., 2010; Molar y cols., 2011; Lemes y cols., 2014; y Helal y cols., 2018).

Este género es muy conocido a su vez por ser patógenos en distintos productos. Una de las características más relevantes de las especies patogénicas del género *Alternaria*, es su capacidad de producir toxinas específicas para su hospedador, así como toxinas no específicas. De esta manera puede parasitar un gran rango de hospedadores (Patriarca y Pinto, 2018). Sin embargo, las condiciones de crecimiento pueden alterar las características de la colonia, lo que hace que la identificación mediante el uso de conidios y morfología de conidióforos sea bastante difícil y variada (Troncoso y Tiznado, 2014).

6.1.2. Identificación molecular

Las cinco cepas aisladas de papaya fueron identificadas molecularmente mediante amplificación y secuenciación de la región ITS1/ITS4 como *Alternaria alternata* (cuadro 4). Las secuencias que se obtuvieron para cada especie fúngica mostraron una similitud del 100% con las especies correspondientes de *Alternaria* en el GenBank. Este nivel de homología es suficiente para confirmar la identificación morfológica de los aislamientos obtenidos. No obstante, este estudio sugiere que hay variabilidad (Fig. 5b) dentro de la especie *A. alternata*, resultados que concuerdan con Basim y cols (2016), quienes usaron la región ITS1/ITS4 para

identificar *A. alternata* de olivos indicando que la especie fue diferente dentro de las cepas que muestrearon. Aun así, se debe considerar que se han reportado más de 1100 especies variables para el género *Alternaria* y el estudio de diversidad genética de hongos entre especies e intra especies resultaría muy diverso para este género. También, se ha revelado que las especies de *Alternaria* de conidios pequeños no podrían diferenciarse completamente entre especies (Chandra y cols., 2018).

Cuadro 5. Acceso de nucleótidos en el GenBank de los hongos aislado en base a la región ITS.

Aislado	Identificación	% de identidad	No. Acceso
CpA-01	<i>A. alternata</i>	100	MH 362764,1
CpA-02	<i>A. alternata</i>	100	MK 224472,1
CpA-03	<i>A. alternata</i>	100	MH 084283,1
CpA-04	<i>A. alternata</i>	100	MH 084261,1
CpA-05	<i>A. alternata</i>	100	MH 356763,1

Troncoso y Tizado (2014), informan que la identificación de *A. alternata* ha sido compleja, debido a la gran variabilidad dentro de la especie. Varios aislados de *A. alternata* que se hicieron en Japón mostraron genotipos diferentes dentro de la misma especie. Basim y cols (2016), indican que *A. alternata* muestra una flexibilidad sustancial y variable en su identificación que depende de varios factores que incluyen, la luz, la temperatura y la humedad relativa, así como las condiciones del sustrato.

Las cinco cepas de *A. alternata* que se aislaron dieron un producto de PCR aproximadamente de 500pb (Fig. 5a), similar a lo reportado por Ramezani y cols

(2019), para su identificación como *A. alternata* aislada de tomate y por White y cols (1990). Ambos estudios, señalan que se amplifica un tamaño aproximado de 500-550pb del ADN genómico fúngico para las regiones ITS1/ITS4 en gel agarosa. Trabajos previos han reportado que las variaciones en las condiciones de cultivo y el hospedero podrían influir enormemente en la especie. Se deben diferenciar si se utiliza el término “patotipo” en función de su especificidad al huésped (Troncoso y Tiznado, 2014).

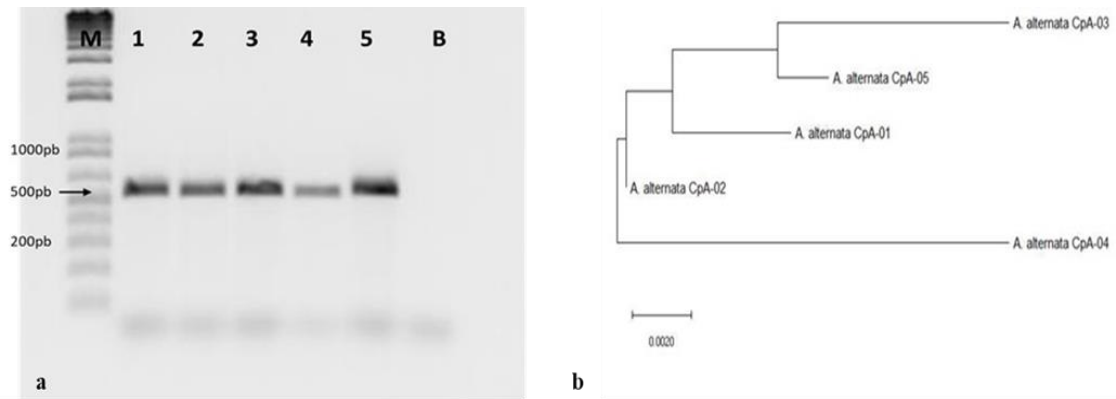


Figura 5. Productos obtenidos de la amplificación por PCR (a) obtenidos de Papaya en Tepic, Nayarit. Carril **M**: marcador molecular, carril **1**: aislado CpA-01, carril **2**: aislado CpA-02, carril **3**: aislado CpA-03, carril **4**: aislado CpA-04 y carril **5**: aislado CpA-05 y carril **B**: control negativo.) Y el árbol filogenético construido en el software MEGA 7.0. el árbol filogenético (b) de la región ITS de ADNr para los aislados de *Alternaria alternata* spp.

La Fig. 5 presenta el árbol construido mediante el método Neighbor-joining basados en las secuencias 18S e ITS del ADNr, con un bootstrap de 1.000 iteraciones y se muestra las variaciones que contienen las cepas en su secuencia de nucleótidos. Nishikawa y Nakashima (2018) describieron la variabilidad que presentó la especie *A. alternata* aislada de fresa, así como también la estrecha

relación filogenética en la misma especie, resultados similares se obtuvieron en este estudio. Esto se explica porque los genes que conforman los ITS del ADNr, tienen diferentes tasas de evolución, por lo que hay zonas del genoma altamente conservadas como otras muy variables (Vega, 2013).

La cepa CpA-03 y CpA-05 guardan una estrecha relación con el análisis morfológico descrito anteriormente. Si bien, se puede apreciar que los aislados no corresponden a una misma cepa (Fig. 5b), estos hechos sugerirían la evolución en el patotipo presentado por la especie y su procedencia, así como las condiciones presentadas en un mismo sustrato (Nishikawa y Nakashima, 2018). Con este estudio, se puede confirmar que *A. alternata* pertenece al grupo de las especies que son responsables del deterioro postcosecha de productos hortofrutícolas, que incluye especies saprófitas, endofíticas y patógenas. La naturaleza cosmopolita de las especies de *Alternaria* las hace importantes en una amplia gama de disciplinas. Como saprófitos, pueden provocar considerables pérdidas económicas a los agricultores y la industria de procesamiento de alimentos (Pavón y cols., 2010).

6.2. Modelo del crecimiento fúngico en función de la temperatura

6.2.1. Análisis estadístico preliminar

Los datos obtenidos del análisis estadístico preliminar mostraron que existen diferencias significativas ($p < 0.05$) en la media de las velocidades de crecimiento de cada una de las cinco cepas aisladas con respecto a las tres temperaturas evaluadas (Fig. 6). Se puede observar que, a condiciones de temperatura bajas o altas, la velocidad de crecimiento tiende a disminuir. A una temperatura de 25°C la velocidad aumentó significativamente. Estos cambios de velocidad guiados por la temperatura los ha reportado Sautour y cols (2001), indicando que *A. alternata* se

caracteriza por una fuerte disminución en la tasa de crecimiento radial a temperaturas bajas y a 26°C su velocidad tiende a aumentar. Varios autores (Troncoso y Tiznado, 2014; Belbahi y cols., 2016; Patriarca y Pinto, 2018; Sardella y cols., 2018) informan que esta especie tiende a aumentar la velocidad de crecimiento radial cerca de su temperatura óptima, misma que puede variar dependiendo del hospedero y las condiciones ambientales (T y HR). Estos datos sugieren que la temperatura influye en la velocidad de crecimiento del hongo.

Por otro lado, el análisis preliminar no mostró diferencias significativas ($p > 0.05$) de la temperatura en la fase lag (Fig. 6). Sin embargo, se observa una ligera correlación negativa (valores cercanos a -0.5; datos no mostrados). A medida que disminuye la velocidad de crecimiento aumenta su fase lag. Estos resultados pueden contrastarse con los obtenidos por Samapundo y cols (2007), quienes encontraron una relación inversa con la velocidad de crecimiento y la fase lag del hongo *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus*. Por su parte, Baert y cols (2007), quienes encontraron un aumento en la fase lag a medida que se alejaba de la temperatura óptima de crecimiento del hongo *P. expansum* aislado de manzana. *Alternaria alternata* es un hongo capaz de adaptarse a condiciones extremas, por lo que, no se considera significativas las diferencias en la fase lag a diferentes temperaturas (Tansey, 1972). Así mismo, la discrepancia de estos resultados con los reportados en la literatura se podría deber, al hecho de que el crecimiento de los hongos filamentosos es un fenómeno muy complejo que involucra cambios morfológicos, moleculares, celulares (Graü y cols., 2007) y a que la fase lag según Baty y cols (2004), es una etapa determinada por la cantidad de trabajo que debe realizar la célula para adaptarse a su nuevo entorno y la velocidad a la que puede realizar ese trabajo. En lo que concierne a las células como un estado fisiológico muy complejo, en la literatura no hay suficientes datos explícitos de la fase lag

debido a la falta de comprensión fisiológica, dado que es un evento que esta interconectado con la germinación y velocidad de crecimiento. En nuestro estudio fue manejado el mismo inoculo (1×10^5 esporas/mL) y las mismas condiciones del medio de cultivo (ACP) en todos los ensayos, lo que pudiera explicar que la temperatura no influyó significativamente, ya que según Baty y cols. (2004) la fase lag disminuye conforme se aumenta el tamaño del inóculo.

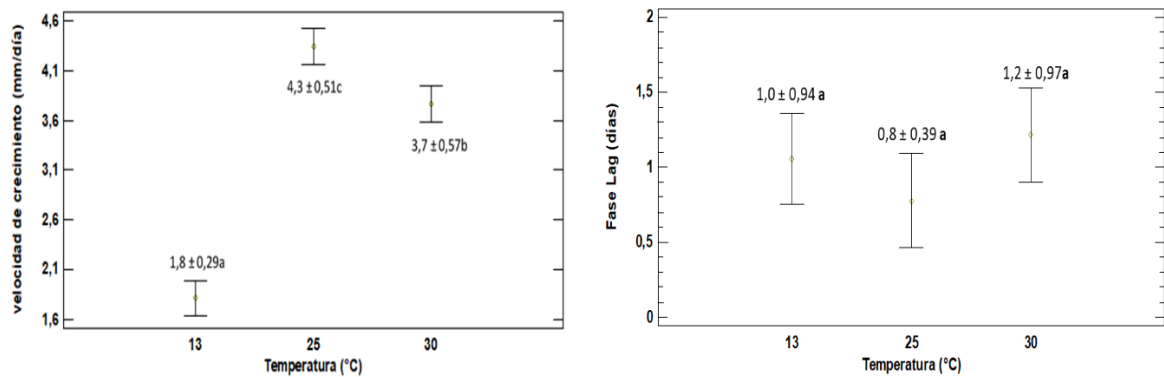


Figura 6. Velocidad de crecimiento radial (mm/día) y fase lag de las cinco cepas de *A. alternata* en función a la temperatura.

El análisis estadístico, también mostró que no hubo diferencias significativas ($p > 0.05$) en la velocidad de crecimiento para las cinco cepas de *Alternaria* aisladas (Fig. 7). Se puede observar que la velocidad mínima fue la CpA-05 (2.9 ± 0.97 mm/día) y la máxima la CpA-02 (3.7 ± 1.42 mm/día). Todas las cepas mostraron un comportamiento similar en cuanto a la velocidad de crecimiento. Estos resultados difieren con la velocidad de crecimiento reportada por Elfar y cols (2018) para (*A. tenuissima*, *A. arborescens* etc.) en especial para *A. alternata* (8.1 mm/día) aislada de manzana. El comportamiento diferente que reportan Elfar y cols. (2018) en las velocidades de crecimiento, se debió a las diferencias en las especies, la matriz usada y las condiciones de temperatura. El comportamiento similar en la

velocidad de crecimiento entre las cepas aisladas en este estudio pudiera relacionarse principalmente con que son especies del mismo género y las condiciones del medio ACP ($A_w \leq 1$) eran las mismas para cada cepa. Se ha reportado en la literatura que la A_w tiene una mayor influencia en el crecimiento miceliar de los hongos, debido a que estos utilizan la fracción de agua disponible para sus procesos de elongación y extensión de la hifa, y en la mayoría de las frutas frescas, la A_w es cercana a uno (Prusky y cols., 1981; Dagno y cols., 2010; Sandoval-Contreras y cols., 2017).

Por otra parte, el análisis estadístico mostró también que la fase lag tuvo un efecto significativo ($p < 0.05$) en cada una de las cepas (Fig. 7). Se puede ver que la CpA-02 fue la que más tardo en adaptarse y la fase lag de la CpA-04 fue mucho menor. Este resultado, fue similar a la reportada por Solis y cols. (2017) quienes observaron una fase de retraso aparente en medio PDA de 0.48 días para *A. alternata*.

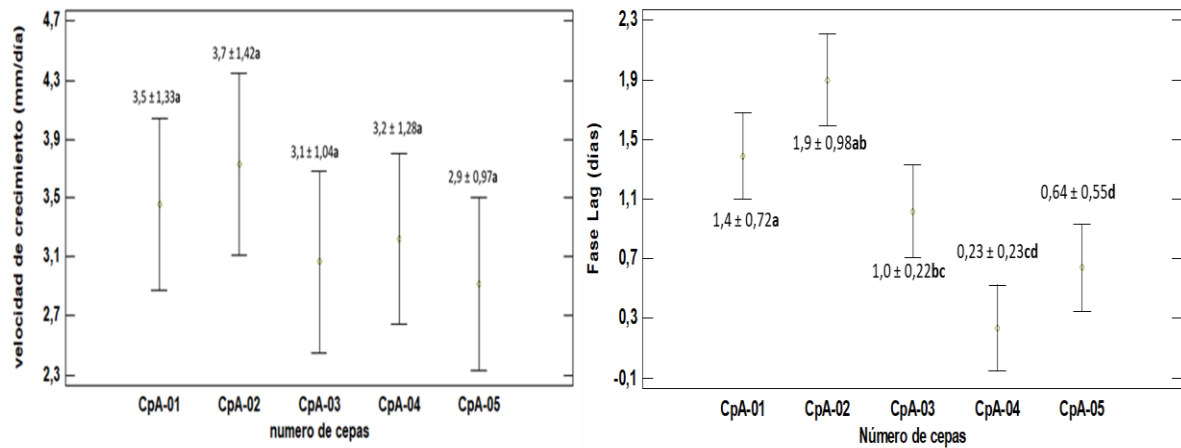


Figura 7. Velocidad de crecimiento radial y fase lag en función de las cinco cepas de *A. alternata*

Los resultados sugieren que las cinco cepas aisladas tienen un comportamiento completamente diferente. En esta etapa fisiológica las células de cada una de las cepas tendrán un comportamiento distinto y característico, así como probablemente se deba también a la naturaleza ambiental en las que se aislaron las cepas. La velocidad de crecimiento es una característica implícita del microorganismo, reflejando comportamientos similares en la misma especie. A diferencia, que su fase lag, esta se verá más afectada por afectada por variables, como el tiempo y la trayectoria ambiental (Carrillo y cols., 2014).

Por otro lado, se logró un ajuste del 99% al modelo primario de Baranyi (Fig. 8a) y del 86% al modelo secundario desarrollado por Rosso (CMI). Dichos resultados sugieren el uso del modelo CMI para poder describir el efecto de la temperatura en el crecimiento de las cinco cepas de *A. alternata* es el adecuado.

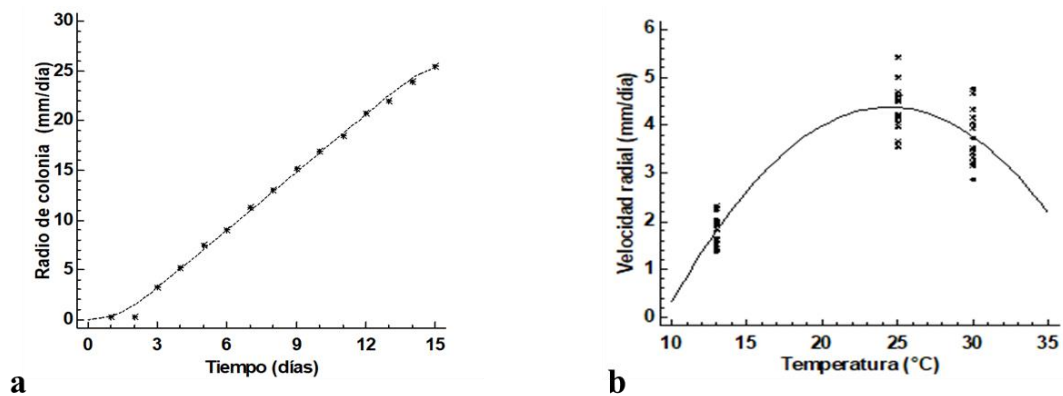


Figura 8. Análisis preliminar a l ajuste de los modelos **a**: Ajuste de la curva de crecimiento de los hongos de *Alternaria alternata* al modelo de Baranyi. **b**: ajuste al efecto de la temperatura al modelo de Rosso (CMI)

Los datos de crecimiento se examinaron para determinar el comportamiento de la varianza, indicando que las varianzas fueron homocedasticas (varianza constante) y hubo más variabilidad de datos a temperaturas alejadas de su crecimiento óptimo por lo cual no fue necesaria hacer transformaciones a los datos de crecimiento para el uso de los modelos. Este comportamiento en los hongos ha sido reportado por Gougouli y Koutsoumanis (2010), quienes indican que ocurre un aumento de la varianza en los parámetros cinéticos del crecimiento fúngico dado a las condiciones estresantes.

6.2.2. Modelo primario

El rango de temperaturas utilizado para la generación de los datos fue representativo a las temperaturas ambientales en los frutos de papaya para su manejo, transporte y almacenamiento, así como los cambios ambientales de temperatura que pueda sufrir durante toda la gestión del fruto aquí en México (Sudhakar y Singh, 2011). El crecimiento miceliar en el medio ACP para las cinco cepas a las diferentes temperaturas probadas, presentó características morfológicas diferentes en cuanto a color. Estas cepas crecidas en el medio ACP, tuvieron un color de micelio blanquecino (Fig. 9) y con el paso de los días cambió a un color blanco-grisáceo; esto ha sido informado por Chandra y cols (2018), quienes obtuvieron cepas de *Alternaria* de color blanco-grisáceo en un medio de Agar jugo V8 aislada de semillas de calabaza; así como por Simmons (1967), quien también ha reportado cepas alvinas de *A. alternata*.

Los datos de crecimiento miceliar radial en el medio ACP para las cinco cepas en función del tiempo, evaluadas a siete temperaturas y HR (85 %), fueron consistentes con el crecimiento típico de los hongos (fase lag, crecimiento lineal y

una desaceleración) a excepción para la temperatura 35°C en la cual ninguna de las cinco cepas de *A. alternata* creció. En general, el comportamiento de los datos en cuanto al crecimiento mostró un ajuste satisfactorio al modelo bifásico propuesto por Baranyi (Ec. 3). Por lo tanto, este modelo describió perfectamente el comportamiento en cuanto al crecimiento de los hongos y explico satisfactoriamente a los datos experimentales. El anterior comportamiento de linealidad en el crecimiento de los hongos se ha informado y modelado en varios estudios con diferentes hongos, indicando que en la fase lineal la distribución de los nutrientes es constante y acelerada en la zona de crecimiento apical de las hifas (Baert y cols., 2007; Lahlali y cols., 2007; Belbahi y cols., 2016).

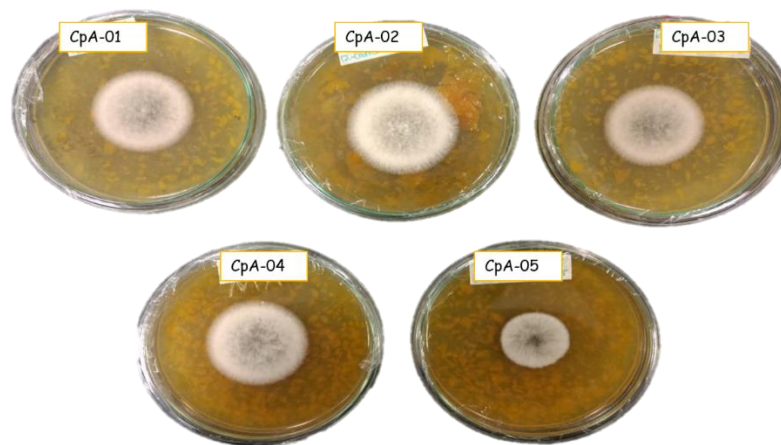


Figura 9. Crecimiento de *A. alternata* en medio ACP al 5to día a 25°C.

A partir del modelo de Baranyi, se estimaron los parámetros de velocidad de crecimiento (μ) y fase lag (λ), con ello se realizaron 15 gráficos por cada temperatura y las curvas que se obtuvieron fueron de forma similar en todos los casos, con un ajuste satisfactorio para todos ellos ($R^2 > 98\%$; datos no mostrados).

6.2.3. Modelo secundario

Para los modelos secundarios, se tomaron los parámetros de la velocidad de crecimiento obtenidos a partir del modelo de Baranyi. Los datos fueron ajustados satisfactoriamente al modelo CMI (Cuadro 4; Ec 3) para describir el efecto de la temperatura en la velocidad de crecimiento de las cinco cepas. Se puede observar que de los cinco aislados la CpA-01 tuvo una velocidad de crecimiento micelial alta con un valor estimado de $\mu_{opt} = 4.78$ mm/día (Cuadro 6). Las velocidades de crecimiento se pueden clasificar de la siguiente manera: CpA-01 > CpA-02 > CpA-04 > CpA-03 > CpA-05, estos resultados son consistentes con los valores de μ_{opt} que han sido reportados por varios autores (Sautour y cols., 2001, Sautour y cols., 2002) para cepas de *A. alternata*. Sin embargo, Sardella y cols. (2018) reportaron un valor de $\mu_{opt} = 12.5$ mm/día para *A. alternata* aislada de pera utilizado también el modelo CMI. La discrepancia con los resultados obtenidos en este estudio pudo deberse a la diferencia en los medios de cultivo, ya que el género *Alternaria* se comporta de forma diferente según su hospedero y las condiciones ambientales (Poursafar y cols., 2018).

Cuadro 6. Parámetros obtenidos del modelo de Rosso (CMI) para las cinco cepas de *A. alternata* aisladas de papaya.

Cepa	μ_{opt}				R^2	CME
	(mm/día)	T_{max} (°C)	T_{min} (°C)	T_{opt} (°C)		
CpA-01	4.78 ± 0.23	31.7 ± 1.71	-3.83 ± 5.32	27.22 ± 0.82	85	0.23
CpA-02	4.68 ± 0.29	32.5 ± 5.38	-6.57 ± 7.97	28.54 ± 0.88	85	0.25
CpA-03	3.99 ± 0.20	31.5 ± 1.75	-11.52 ± 7.76	27.15 ± 1,00	82	0.13

CpA-04	4.29 ± 0.18	32.3 ± 3.02	-5.39 ± 5.08	28.33 ± 0.53	92	0.10
CpA-05	3.31 ± 0.85	37.7 ± 63.62	-16.87 ± 37.2	31.2 ± 19.33	75	0.17

El modelo CMI estimó una temperatura óptima de crecimiento que varió entre 27 y 31°C dependiendo la cepa, aun así, la temperatura óptima de las cinco cepas estuvo cercana al valor de temperatura óptimo teórico-experimental de crecimiento (26-27°C) reportado por otros autores (Belbahi y cols., (2016); Troncoso y Tiznado, 2014). Estos autores, estudiaron el efecto de la temperatura en el crecimiento del hongo *A. alternata*. Con respecto a la T_{min} estimada. Los resultados que se obtuvieron en este trabajo se pueden comparar con algunos estudios que se han hecho para este género, en los que se reportan temperaturas de crecimiento bajo cero (Sommer, 1985; Sautour y cols., 2002; Sardella y cols., 2018) a excepción de la CpA-03 y 05 que estuvieron muy por debajo de lo reportado. La T_{max} estimada por el modelo varió de 31 a 37°C dependiendo de la cepa. Los valores de R^2 fueron aceptables entre 75 y 92% y los valores del cuadrado medio del error (CME) estuvieron cercanos a cero. Estos datos nos sugieren un ajuste satisfactorio del CMI al describir el efecto de la temperatura.

Al evaluar el efecto de la temperatura sobre la velocidad de crecimiento de las cinco cepas, se observa que la tendencia general en la velocidad de crecimiento es baja cuando la temperatura disminuye y aumenta paulatinamente conforme aumenta la temperatura llegando a un punto máximo, para luego mostrar un decremento a temperaturas mayores a los 30°C. Este comportamiento es típico para el crecimiento del género de *Alternaria* considerándose las distintas variaciones con respecto a la temperatura (Troncoso y Tiznado, 2014).

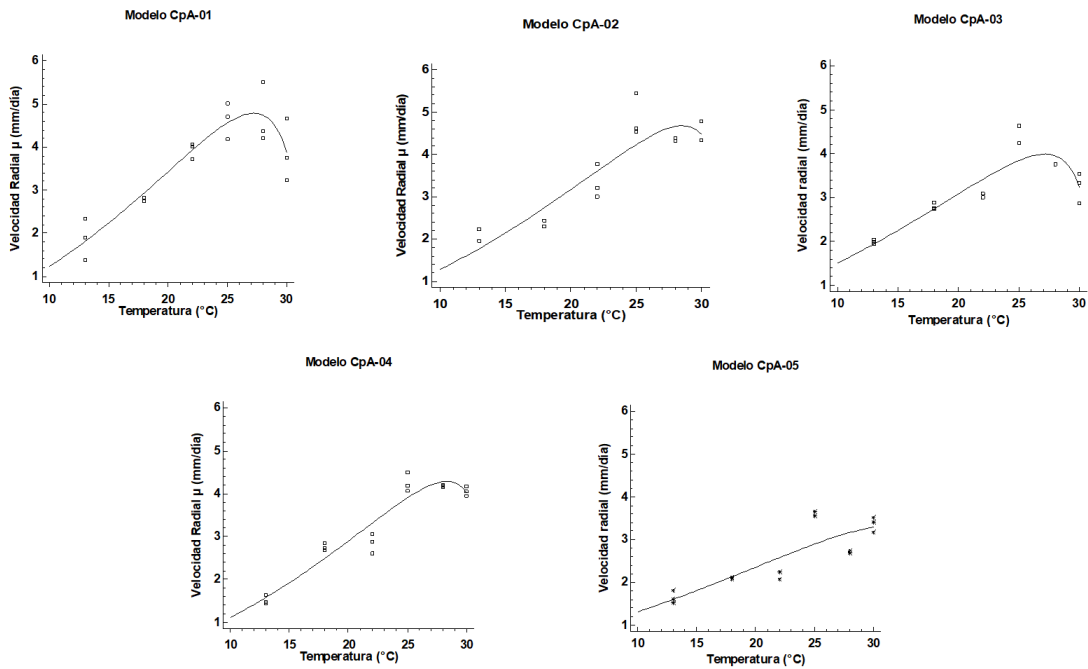


Figura 10. Velocidad de crecimiento (μ) de las cinco cepas de *A. alternata* aisladas de papaya en función de la temperatura utilizando el modelo CMI.

En esta investigación, los datos que se obtuvieron de los gráficos representan la mayoría de las condiciones que se pueden encontrar cuando se trata del crecimiento de hongos durante el manejo de la papaya. Para el modelo de la cepa CpA-01 y 03 la temperatura óptima fue de 27°C y es en la que presenta el valor máximo de crecimiento. Resultado similar de la estimación de la temperatura óptima obtuvo Belbahi y cols (2016) para *A. alternata*. Si bien, la temperatura experimental para este género varía dependiendo del hospedero, Mulkay y cols. (2010) informan que la pudrición generada por *A. alternata* en papaya puede darse a 27°C en los centros de acopio, misma temperatura se inician los procesos de infección (Troncoso y Tiznado., 2014).

A partir del modelo, se indicó una dependencia de la velocidad de crecimiento en función de la temperatura, es decir, la velocidad de crecimiento será baja a medida que la temperatura disminuye. La CpA-01 tuvo una T_{\min} estimada de hasta -3°C y la CpA-02 y 04 de hasta -6 y -5°C respectivamente. Si bien, el género *Alternaria* no se considera un hongo psicrófilo, los resultados obtenidos por medio del modelo predictivo concuerdan con los datos de crecimiento experimentales reportados por Domsch y cols. (1980) para *A. alternata* a -5°C . Otras investigaciones indican que esta especie es capaz de crecer a una temperatura de -2°C (Sommer, 1985). Sautour y cols. (2002) utilizaron un modelo CMI para evaluar el efecto de la temperatura en la velocidad de crecimiento de varios hongos, estimando una T_{\min} de -2°C para *A. alternata*, resultado similar al que se obtuvo para la CpA-01 en la presente investigación. Se documentado también que *A. alternata* puede causar lesiones significativas a temperaturas bajo cero en las frutas de hueso tales como, ciruela, melocotón y nectarina (Sommer, 1985). Por otra parte, la Fig. 10 muestra un leve descenso en la velocidad de crecimiento de todas las cepas a medida que la temperatura va aumentando por encima de temperatura óptima de crecimiento. Sardella y cols (2018) utilizaron un CMI en la velocidad de crecimiento de *A. alternata* simulado en un medio de pera. El modelo estimó una T_{\max} de 35°C , resultado similar y consistente con las T_{\max} que fueron estimadas para las cinco cepas utilizando el mismo modelo (CMI) en esta investigación. Si bien, no hubo crecimiento en el medio ACP a 35°C , la T_{\max} estimada fue de 37°C . Varios autores (Palou y cols., 2012; Troncoso y Tiznado, 2014) han reportado que *A. alternata* puede crecer a temperaturas entre 35 y 40°C . Estudios sugieren que las temperaturas de crecimiento para *Alternaria* pueden variar dependiendo de los nutrientes, matriz alimentaria y el ambiente (Basim y cols., 2016).

Estos resultados sugieren que la temperatura tiene un efecto significativo en la velocidad de crecimiento del hongo y los modelos aplicados para las cinco cepas de *A. alternata*, explican adecuadamente el comportamiento de los hongos en condiciones de diferentes temperaturas manejadas para la papaya. Gougouli y cols (2010) mencionan que dicho modelo (CMI) tiene un significado biológico, ya que puede proporcionar estimaciones de los valores mínimo y máximo de los factores ambientales que permiten el crecimiento, que no son fáciles determinar experimentalmente porque el crecimiento de hongos puede ocurrir después de varios meses de incubación a condiciones extremas.

Si bien, el crecimiento puede ser lento a altas temperaturas, así como a bajas, los modelos presentados en la investigación podrían apuntar a *A. alternata* puede crecer en condiciones de temperatura extremas en una matriz alimentaria como la papaya. Esto puede deberse a que *A. alternara* tiene la capacidad de combinar muchos ciclos de propagación asexual, lo que le facilita su adaptación al entorno siempre cambiante. Asimismo, esta especie puede ser capaz de causar enfermedades debido a sus toxinas no específicas para el huésped (Kgatle y cols., 2018).

La mayoría de los estudios que han sido publicados sobre micología predictiva generalmente se han enfocado en la velocidad de crecimiento, parámetro importante para predecir el alcance de la contaminación por el patógeno en el fruto (Sandoval-Contreras y cols., 2017). Sin embargo, es imperativo conocer el tiempo exacto en que el micelio empieza a aparecer, ya que éste es un indicativo de la calidad en un alimento. Para la mayoría de frutas frescas, el producto es rechazado tan pronto el micelio es visible, lo que ocurre poco después de la fase lag (Lahlali y cols., 2007; Sandoval-Contreras y cols., 2017). Por lo anterior, finalmente se calculó y modeló el tiempo en hacerse visible la colonia (t_v) a partir de los

parámetros de μ_{\max} y λ obtenidos del modelo primario (Baranyi; datos no mostrados). Se encontró una correlación negativa entre la media del t_v y la varianza (datos no mostrados). Estos datos son consistentes con lo reportado por Sandoval-Contreras y cols. (2017), quienes encontraron una correlación negativa en su reporte del t_v del hongo *A. niger* aislado de limones. Esto nos sugiere que no fue necesaria la transformación de los datos (homocedasticidad).

Las CpA-03 y CpA-04 son las que menos días tardaron en presentar visibilidad del micelio (2mm) (Cuadro 7). Este resultado congruente a su fase lag (Fig. 7), dado que ambas cepas tuvieron una menor fase lag a diferencia de la CpA-01 que relativamente tardaría más en aparecer a esa misma temperatura 25°C (Fig. 11). No obstante, las cinco cepas del hongo *A. alternata* aproximadamente el tiempo requerido para que formen una colonia visible es en un día y medio. Este resultado está de acuerdo con nuestras observaciones experimentales ya que, en un día y medio aproximadamente las cepas mostraron crecimiento visible en el medio natural ACP a una temperatura de incubación de 25°C.

Cuadro 7. Parámetros obtenidos del modelo polinomial para las cinco cepas de *Alternaria alternata* aisladas de papaya.

Cepa	a	b	c	R²	CME
CpA-01	7.63 ± 0.9	-0.48 ± 0,9	0.01 ± 0.002	90	0.04
CpA-02	8.09 ± 1.0	-0.57 ± 0,1	0.01 ± 0.002	90	0.05
CpA-03	3.36 ± 0.5	-0.15 ± 0,1	0.003 ± 0.001	83	0.01
CpA-04	8.87 ± 0.6	-0.66 ± 0,1	0.01 ± 0.001	95	0.02
CpA-05	2.79 ± 0.2	-0.10 ± 0,02	0.002 ± 0.001	88	0.004

La tendencia que hubo en los gráficos fue inversa a la tendencia que se mostró en la velocidad de crecimiento, es decir, una disminución en el tiempo visible a medida que la temperatura se acerca a la óptima de crecimiento y un aumento en el tiempo visible cuando las temperaturas son extremas. Como se puede observar en los gráficos, para los hongos CpA-01, CpA-02 y CpA-04 a temperaturas extremas, el tiempo en que tarda en aparecer el micelio fue mayor, obteniéndose tiempos de 3, 2.4 y 1.9 días a 13°C respectivamente (Fig. 11). En la literatura, no se ha reportado tiempos en que aparecen las colonias formadas por el género de hongo *Alternaria* spp. Sin embargo, se han reportado para las especies (*A. brassicola* y *A. aborences*) fase lag de hasta un día (Govind y cols., 2016). Esto nos podría sugerir que cuando aproximadamente su periodo de adaptación en un medio. Los modelos mostraron un ajuste satisfactorio en general para las cinco cepas (cuadro 7), con coeficientes de determinación que variaron de 83 a 95%, lo que sugiere una aceptable capacidad predictiva por el modelo polinomial. La respuesta del modelo fue reportada por Silva y cols. (2010) y Mousa (2011), quienes utilizaron un modelo polinomial para el hongo *A. nigri* en néctar de mango y *A. flavus* en arroz siendo estos satisfactorios. A pesar de que los parámetros (a, b y c) que arroja el modelo no comprenden un significado biológico a diferencia del modelo CMI; esto ha sido reportado por varios autores (Gougouli y Koutsoumanis, 2010; Belbahi y cols., 2016).

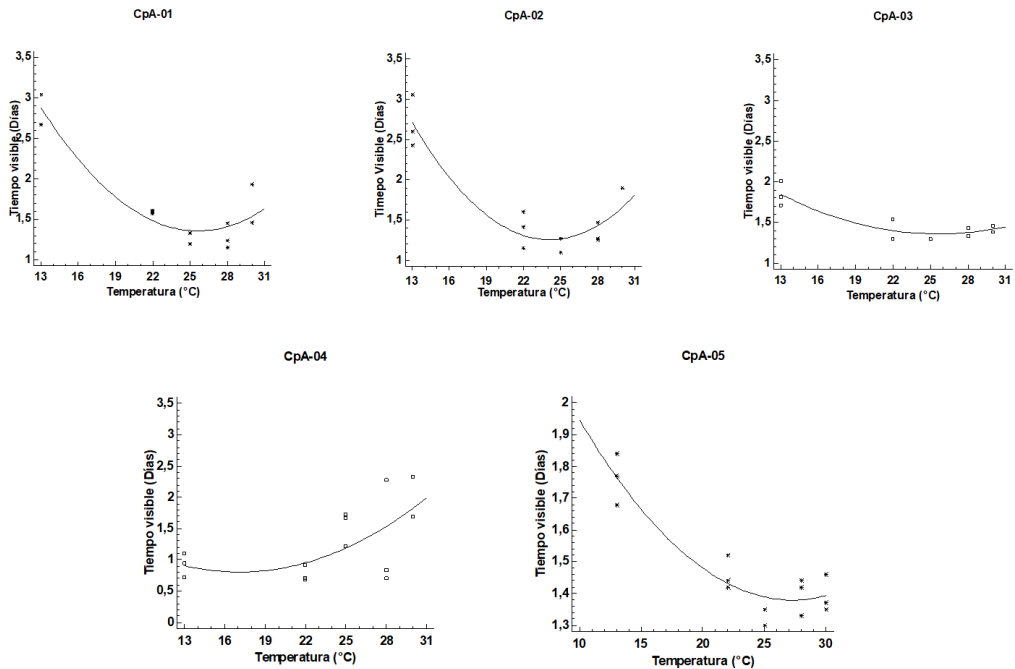


Figura 11. Tiempo en que se hace visible la colonia (días; t_v) de las cinco cepas de *A. alternata* aisladas de papaya en función de la temperatura utilizando un modelo polinomial ($t_v = a + bT + cT^2$).

La predicción en los gráficos muestra que para los cinco hongos tiende a ser más rápido el tiempo de visibilidad del micelio cuando está cercano a su temperatura óptima, este resultado difiere con los reportados por algunos autores Sandoval-Contreras y cols (2017) y Gougouli y cols (2011). Estos autores estimaron tiempos de hasta 4 y 3 días en aparecer el micelio a 25°C para los hongos *Aspergillus niger* y *Penicillium corylophilum* respectivamente. Para el caso de *A. niger* fue probado en limones y para *P. corylophilum* en yogurt. Esta discrepancia es debida al tipo de hongo que se usó y la matriz alimentaria probada, ya que el metabolismo de cada hongo se comportará y desarrollará de forma diferente como organismos

individuales y el medio es determinante a la hora de favorecer o no el crecimiento de un hongo patógeno (Agris, 2005).

Las predicciones arrojadas por el modelo usado (polinomial) en el tiempo en hacerse visible el micelio nos sugieren que la temperatura tiene un efecto importante en la aparición visible del micelio del hongo en frutos de papaya. De manera que podría ser rápida en temperatura óptima y más lenta en temperaturas extremas (bajas y altas). El retraso en aparecer el micelio se puede deber al hecho que algunas especies del género *Alternaria*, se han reportado como hongos capaces de disminuir casi por completo su metabolismo en condiciones desfavorables. Si bien, a esas temperaturas extremas hay reportes de crecimiento, este será mucho más lento ya que su metabolismo es bajo, adaptándose hasta presentar visibilidad de micelio (Narayanasamy, 2006; Troncoso y Tiznado, 2014; Basim y cols., 2016).

Los estudios sobre la cadena de manejo y distribución de la papaya han demostrado las diferentes temperaturas a las que se puede verse expuesta la papaya durante su transporte, venta minorista o almacenamiento. Si bien a menos de 7°C en un estado de madurez comercial el fruto puede presentar daños fisiológicos, se sabe que este género es capaz de crecer a temperaturas bajo cero, aun así, los rangos de temperatura manejados en la papaya se muestran a favor del patógeno (Sommer, 1985; González y cols., 1999; Martínez y González, 2006; Guzmán, 2007; Bernal, 2010). El buen ajuste de los datos al modelo, indicó el comportamiento en el tiempo de visibilidad que presentará el hongo, bajo diversos escenarios de temperatura. Esto podría ayudar a la toma de decisiones por parte del encargado en la gestión de la papaya, ya que tendría aproximadamente pocos días para que el patógeno se haga visible. Sin embargo, para tener confiabilidad

del modelo en la toma de decisiones se debe hacer una validación y posterior a ello, simulaciones computacionales (Pérez-Rodríguez., 2017).

6.3. Modelo del crecimiento fúngico en función de la humedad relativa

6.3.1. Análisis estadístico preliminar

Los datos obtenidos del análisis preliminar para la humedad relativa mostraron que hubo diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$), así como también las hubo ($p < 0.05$) para la fase lag. Como se puede apreciar (Fig.12), la velocidad de crecimiento aumenta a medida que la HR es alta y es inversamente proporcional a la fase lag (λ), ya que, λ disminuye cuando aumenta la velocidad. Dicho comportamiento es congruente con los que han reportados varios autores (Lahlali y cols., 2007; Samapundo y cols., 2007; Yue y cols., 2011) para la velocidad y fase lag de diferentes hongos. Esto se debe a que existe una relación estrecha entre la HR y la germinación de esporas de los hongos, haciendo que esta no solamente determine la germinación, sino que también tenga un efecto importante en la velocidad de crecimiento del micelio (Panasenko, 1967). La disponibilidad de agua en el ambiente ayudará al desarrollo óptimo de las células acortando así el periodo de adaptación del hongo en un determinado medio, reflejándose en un crecimiento más rápido (Swinnen y cols., 2004).

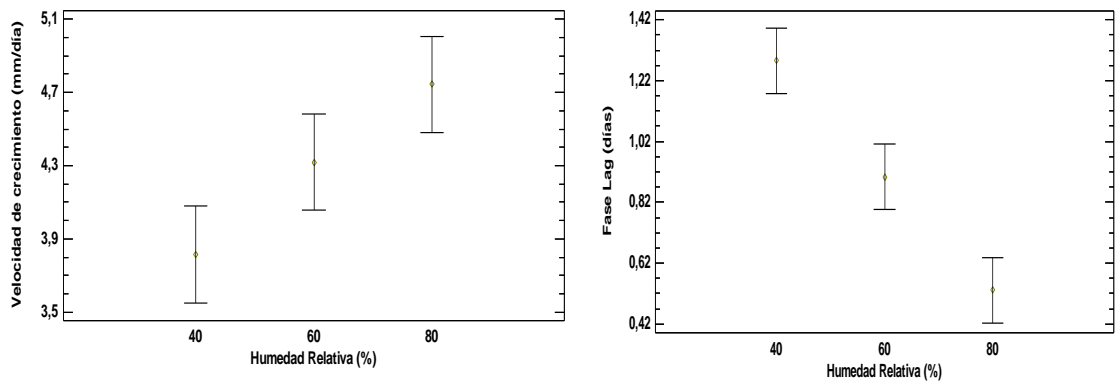


Figura 12. Velocidad de crecimiento radial (mm/día) y fase lag (días) de las cinco cepas de *A. alternata* en función de la humedad relativa (HR).

Por otro lado, el estadístico mostró que hubo diferencias ($p < 0.05$) para la velocidad de crecimiento en función de las cepas, así como también las hubo para su fase lag ($p < 0.05$). La Fig. 13 muestra que, la CpA-03 y CpA-05 son las que más se diferencian. Asimismo, se pudo apreciar que las diferencias en las cepas tanto para la velocidad de crecimiento, así como para su fase lag no están tan marcadas. Samapundo (2007) obtuvo resultados similares en el comportamiento del hongo *Aspergillus flavus*. Esto se presentó probablemente a que la temperatura (25°C) fue constante para cada cepa y no presenta variaciones marcadas en la disponibilidad de agua en el ambiente.

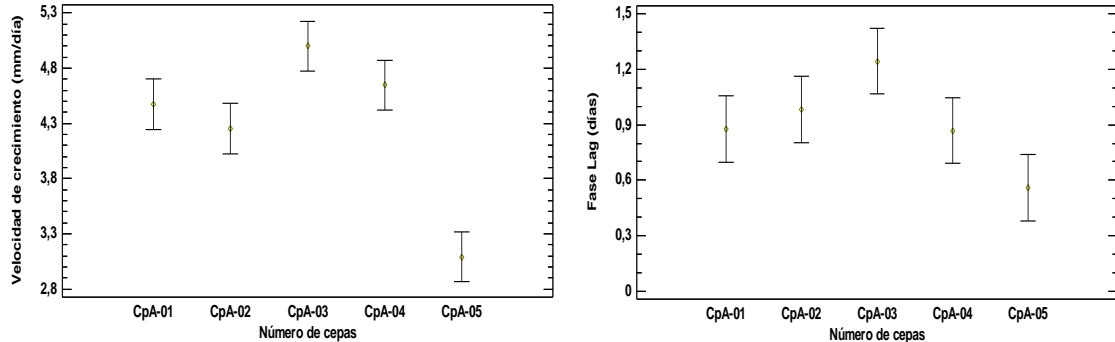


Figura 13. Velocidad de crecimiento y fase lag en función de las cinco cepas de *A. alternata* en función de la humedad relativa

Del mismo modo, se logró tener un ajuste satisfactorio de los datos preliminares, al modelo primario de Baranyi ($R^2 > 99\%$; datos no mostrados), lo cual nos sugiere

su uso para describir el crecimiento del hongo en función del tiempo. Sin embargo, no se presentó un ajuste satisfactorio ($R^2 < 20\%$; datos no mostrados) al modelo secundario (CMI) desarrollado por Rosso. A partir del análisis preliminar, los datos de cada una de las cepas fueron tomados individualmente en el desarrollo de modelos para cada una de las cepas.

6.3.2. Modelo primario

El rango de humedades relativas para el desarrollo de los modelos fue también representativo a los cambios en el ambiente que pueda sufrir la papaya durante su manejo y almacenamiento (Sudhakar y Singh, 2011). Del mismo modo, las características morfológicas que presentaron las cepas en los medios ACP en función de la HR fueron las mismas a las presentadas en las condiciones de temperatura (Fig.9). Así, los datos de crecimiento miceliar en los medios ACP a cuatro humedades relativas probadas y temperatura constante (25°C) fueron consistentes a la curva sigmoideal (fase lag, crecimiento lineal y una pequeña desaceleración) que presenta el modelo de Baranyi. Igualmente, a partir del modelo se logró obtener los parámetros cinéticos de velocidad de crecimiento (μ) y fase lag (λ) para cada una de las cepas (datos no mostrados).

Estos resultados nos muestran que el modelo primario desarrollado por Baranyi que se utilizó tanto para la temperatura, así como para la HR, describe adecuadamente los datos de crecimiento del hongo en función del tiempo. No obstante, el crecimiento de un hongo no se puede considerar como el crecimiento de un organismo unicelular. Dado a que sus múltiples células están conectadas en los llamados elementos hifales o micelios, que surgen del crecimiento de una espora y tras la germinación, el crecimiento de este se polariza rápidamente

mediante un mecanismo llamado ramificación (Nielsen, 1992). Varios autores (Lahlali y cols., 2007; Samapundo y cols., 2007; Gracia y cols., 2009; Membre y Dagnas, 2013; Sardella y cols., 2018) han logrado representar matemáticamente las tres fases predominantes del crecimiento de un hongo, señalando que el modelo primario de Baranyi proporcionaría parámetros cinéticos confiables y reproducibles al crecimiento de un hongo. De esta manera, al representar de manera adecuada el crecimiento, dicho parámetros pueden ser usados en los secundarios.

6.3.3. Modelo secundario

En cuanto al modelo secundario, el modelo que propuso Rosso (CMI) es uno de los más utilizados para describir el efecto de los factores ambientales en la velocidad de crecimiento de un hongo, ya que los parámetros incluidos en su ecuación algebraica (cuadro 4; Ecn. 3) dictan un significado e interpretación biológica (Dantigny y cols., 2005). En este estudio, los datos de crecimiento en función de la HR no lograron tener un ajuste satisfactorio a este modelo. Existen otros modelos secundarios como el modelo modificado de Arrhenius-Davey, que dicta el efecto de la temperatura y la A_w en el crecimiento de un hongo. Al ser un modelo empírico se pueden incluir desde un punto de vista práctico otros factores ambientales (HR, pH, etc.) dentro de dicho modelo. Su uso a estos nuevos factores se determinará a partir del grado de éxito con el que se ajustan los datos experimentales al modelo y se debe tener en cuenta que los valores determinados para los parámetros (A, B y C) de este modelo, reflejarán variables tales como el sustrato, historia térmica y técnicas de laboratorio (Davey, 1989). La inclusión de variables a los modelos secundarios debe ser aquellas que representen un cambio a través del tiempo. Por lo que en esta investigación no se tomó en cuenta el pH,

dado que este factor no es una variable que cambia drásticamente en frutas frescas y en los hongos este factor no es muy determinante a la hora del crecimiento (Baert y cols., 2007). También, para la inclusión de otro tipo de factores se toma en cuenta por el objeto de estudio, para este caso fue fruta fresca y no una matriz alimentaria formulada por lo que el pH no se consideró en el modelo. Al igual que en los modelos de temperatura, no hubo la necesidad de aplicar transformaciones a los datos de crecimiento de las cepas, ya que las varianzas fueron homocedásticas (datos no mostrados). No hubo una correlación entre la media y la varianza de los datos de acuerdo con lo que informó (Dantigny y Bensoussan, 2008) en la media y la varianza de los datos de crecimiento de los hongos *A. flavus* y *A. alternata*, lo que sugiere que no es necesaria hacer transformaciones.

Hasta donde sabemos, en la literatura de la micología predictiva, no existen reportes de modelos matemáticos predictivos en función de la HR y son pocos los que se encuentran en función de la A_w (García y cols., 2009). El contenido de agua en equilibrio con la atmósfera se expresa en términos de humedad relativa, por lo tanto, es la misma proporción que la actividad del agua, pero expresada como un porcentaje y esto sucederá cuando la A_w tienda al equilibrio con el medio. Esta relación de la A_w y HR ya se ha reportado por varios autores (Ayerst, (1969); Troller y Christian, (1978)). Los datos de crecimiento micelial de esta investigación mostraron un ajuste satisfactorio al modelo secundario de Arrhenius-Davey para la descripción del efecto de la HR en la velocidad de crecimiento de las cinco cepas. Los parámetros que se obtuvieron del modelo secundario de Arrhenius-Davey, se indican en el cuadro 8. Se calculó la velocidad de crecimiento por medio de dicho modelo (Ecn 4), obteniéndose velocidades que van de 3.3 mm/día a 5.44 mm/día a una humedad del 80%. Resultado que coincide con lo que reportó Vaquera y cols

(2014) para la velocidad de crecimiento de *A. alternata* (5.39 mm/día) a una $A_w > 0.9$, a diferencia de lo que se obtuvo en la temperatura para este estudio, siendo el valor más alto 4,78 mm/día. Lahlali y cols (2007), obtuvieron resultados similares en el comportamiento de la velocidad de *Botrytis cinerea* frente a la temperatura y A_w probados, indicando que la temperatura tiene menor influencia que la A_w . Esto que sugeriría que la velocidad de crecimiento del hongo podría aumentar con la A_w . Dagno y cols (2010), sugirieron de igual manera que la cantidad de agua disponible en el sustrato y el ambiente circundante es muy importante para la velocidad de crecimiento en un hongo, debido a que está relacionada a los eventos de germinación y proliferación del micelio.

Cuadro 8. Parámetros obtenidos del modelo lineal de Arrhenius para la velocidad de crecimiento de las cinco cepas de *Alternaria alternata* aisladas de papaya.

Cepa	A	B	C	R²	CME
CpA-01	3.23 ± 0.26	-184.02± 30.30	4510.6± 8x10 ² 1480.15±	89	0.03
CpA-02	2.14 ± 0.18	-66.72± 21.43	5.6x10 ² -221.66±	90	0.01
CpA-03	1.90 ± 0.18	-12.85± 20.76	5.5x10 ² -2807.54±	95	0.02
CpA-04	0.92 ± 0.12	89.03± 13.82	3.6x10 ² -371.17±	97	0.008
CpA-05	1.43 ± 0.41	-11.56± 47.67	1.26x10 ³	83	0.04

Si bien, los parámetros (A, B y C) obtenidos del modelo Arrhenius-Davey no presentan un significado e interpretación biológica en la importancia del valor de los coeficientes de regresión, el modelo parece tener buena concordancia en las

predicciones hechas a los datos experimentales. Puesto que, como se observa el coeficiente de determinación varió de (83% a 97%), esto nos sugiere el uso a la inclusión de este factor ambiental (HR) al modelo. Aun así, la extrapolación de los datos a través de la predicción hecha por el modelo se debe hacer con cierta precaución, tal como lo indicó Davey (1989). También, se obtuvo en los parámetros generados por el modelo (A, B y C), que al incluir este factor ambiental (HR) empíricamente se muestra una alta desviación estándar en dichos parámetros regresores. Varios estudios (Panagou y cols., (2003); Baert y cols., (2007); Tassou y cols., (2007); Garcia y cols., (2011)) obtuvieron igualmente una alta variabilidad en la desviación estándar de los parámetros estimados por el modelo Arrhenius-Davey al incluir factores ambientales tales como la pH, T y Aw respectivamente, esto se podría explicar al hecho que la presión de vapor de agua al interior y exterior del sistema que está influenciada por la humedad relativa y esta no es considerada por el modelo. Asimismo, ambos factores (pH y HR) se han incluido de forma empírica. Por lo tanto, para futuros usos del modelo con este factor, se requiere la interpretación de micólogos y matemáticos expertos (Reyes-Rosas y cols., 2012).

Se puede apreciar, la velocidad de crecimiento disminuye cuando la HR es baja, va aumentando paulatinamente a medida que la HR aumenta, a excepción de la cepa CpA-04, lo cual muestra crecimiento considerable a partir de una HR de 60% (Fig 14). Si bien, este género no es considerado xerófilo, Belbahi y cols (2016) indicaron un comportamiento xerotolerante para esta especie (crecimiento a $A_w < 0.85$), resultado consistente con los presentados en esta investigación. Esta cepa (CpA-04) fue la única que mostró un leve descenso a HR altas. Algunos hongos de este género han presentado el mismo comportamiento a $A_w > 95$ y

HR>95% (Alam y cols., (1996); Sautour y cols., (2002)) dado que la saturación tanto del medio como del ambiente genera un desbalance osmótico y microscópico de agua en las células lo cual no permitiría el desarrollo del micelio aéreo por lo que el crecimiento tiende a ser limitado o restringido.

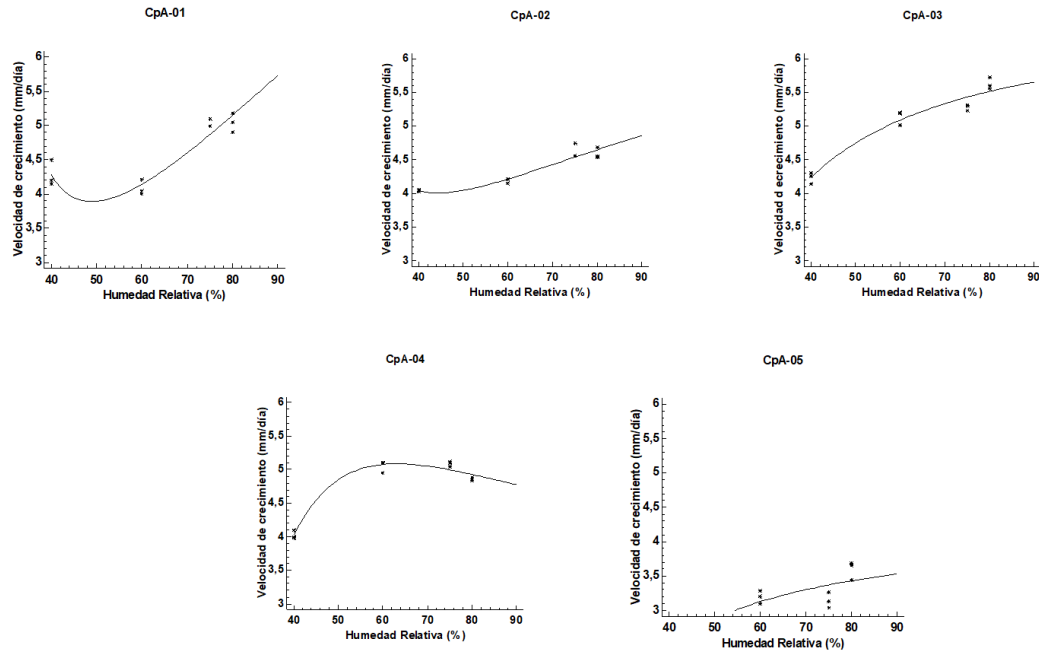


Figura 14. Velocidad de crecimiento (μ) de las cinco cepas de *A. alternata* aisladas de papaya en función de la Humedad Relativa utilizando el modelo de Arrhenius-Davey.

Las predicciones que se obtienen de los modelos en los gráficos revelan que a mayor HR la velocidad de crecimiento de las cepas estudiadas aumentará. Estos resultados son consistentes con los datos experimentales citados por (Humperson y Phelps, 1989) para *A. brassicicola*, indicando que la velocidad radial de la especie aumentará a una HR arriba del 80%. Este comportamiento se presenta debido a que la humedad relativa influirá considerablemente en la germinación, rebrote y

aumento vegetativo de la especie (Vakalounakis, (1986); Alam y cols., (1996); Green y Bailey, (2000); Andersen y cols., (2001); Sautour y cols., (2002); Govind y cols., (2016)).

Dado que los límites de HR no son tan amplios para el caso de los hongos (Panasenko, 1967), existen diversos estudios (Panasenko, (1967); Ayerst, (1969); Pardo y cols., (2005); Lahlali y cols., (2007); Dagno y cols., (2010); Yue y cols., (2011)) en donde se observó la influencia que ejerce la A_w del medio y la HR del ambiente en el crecimiento de un hongo. Se resaltó que a diferencia de aquellos hongos xerófilos (asociados a los deterioradores de granos o cereales), entre mayor sea la HR o una A_w alta se favorecerá la germinación y el desarrollo hifal, debido a la concentración de vapor del agua en el sistema que promueve estos fenómenos (germinación y crecimiento) (Alam y cols., 1996). Así también, entre más bajo sea este factor ambiental se reducirá o desacelerará el crecimiento del patógeno. Esto puede darse ya que a nivel microscópico puede ocurrir una condensación del agua alrededor de los conidios impidiendo a su vez su desarrollo y crecimiento (Panasenko, 1967).

En la micología predictiva, existe una tendencia en sustituir la fase lag por el tiempo de crecimiento visible. Esto se ha hecho debido a que la fase lag utilizada ampliamente en las bacterias, es un término erróneo cuando se aplica a los hongos, porque durante ese tiempo se produce la germinación de esporas y el crecimiento microscópico (es decir, alargamiento del tubo hifal, extensión de hifas y ramificación) (Burgain y cols., 2013). El tiempo de visibilidad del micelio es un parámetro útil en comparación a la fase lag, dado que en términos de calidad alimentaria un producto será rechazado tan pronto el micelio aparezca. Por tal

razón, al igual que en la temperatura, se modeló el tiempo en que se hace visible la colonia de *A. alternata* en función de la HR. En tal caso, tampoco hubo la necesidad de transformar los datos de crecimiento para el ajuste al modelo de Arrhenius-Davey debido a que presentó un comportamiento similar en la correlación de la media y varianza (datos no mostrados) como en el caso de la Temperatura. En el cuadro 9 se muestra un ajuste satisfactorio (81%-98%). Algunos estudios en la literatura (Davey, (1989); Yue y cols., (2011); Burgain y cols., (2013); Huchet y cols., (2013)) han obtenido R² similares en función de la Aw al uso de datos de crecimiento micelial y tiempo de visibilidad con dicho modelo.

Cuadro 9. Parámetros obtenidos del modelo lineal de Arrhenius para el tiempo en que se hace visible la colonia $tv = e^{\left(A + \frac{B}{HR} + \frac{C}{HR^2}\right)}$ de las cinco cepas de *Alternaria alternata* aisladas de papaya.

Cepa	A	B	C	R²	CME
			2673.78±		
CpA-01	1.62 ± 0.60	-146.48± 66.27	1.72x10 ³	92	0.007
			6995.34±		
CpA-02	3.33 ± 0.56	-330.53± 61.39	1.56x10 ³	97	0.007
			-61169.2±		
CpA-03	-11.22 ± 0.12	1667.27 ± 8.25	1.80x10 ³	98	0.003
			7422.19±		
CpA-04	2.92 ± 0.66	-311.78± 73.30	1.89x10 ³	82	0.01
		-532.30±	12099.3±		
CpA-05	5.14 ± 1.08	1.18x10 ²	3.02x10 ³	93	0.02

Se observa (Fig. 15) que la CpA-03 y CpA-04 son las que menor tiempo tardan 1 y 1.4 días respectivamente en presentar visibilidad del micelio a una HR de 80%,

calculada de la ecuación. La tendencia para el tiempo de visibilidad en función a esta variable, mostró (Fig. 15) que a HR bajas aumentará el tiempo de visibilidad e irá disminuyendo a medida que la HR aumente. Pocos son los estudios en la literatura que están relacionados al tiempo de visibilidad del micelio de un hongo con respecto a este factor ambiental (HR). Sandoval-Contreras y cols (2020) obtuvieron un tiempo de aproximadamente 1 día y medio a una HR del 80% para *C. gloeosporioides*, resultado similar a esta investigación. Asimismo, Burgain y cols (2013) encontraron que el tiempo de visibilidad del micelio para el hongo *Penicillium chrysogenum* tendía a ser menor a $A_w > 95\%$ utilizando el modelo de Arrhenius. No obstante, nuestros resultados difieren con los hallazgos de Huchet y cols (2013), ya que ellos estimaron un tiempo de hasta 26 días a una $A_w (>80\%)$ y 25°C para el hongo *Aspergillus candidus* en tortas horneadas quienes usaron también el modelo de Arrhenius. La diferencia notoria en el tiempo se debe a que el hongo que los investigadores probaron es de carácter medianamente xerófilo y su crecimiento será notorio en matrices de alimento con poca disponibilidad de agua y HR baja, caso contrario para el hongo *A. alternata*.

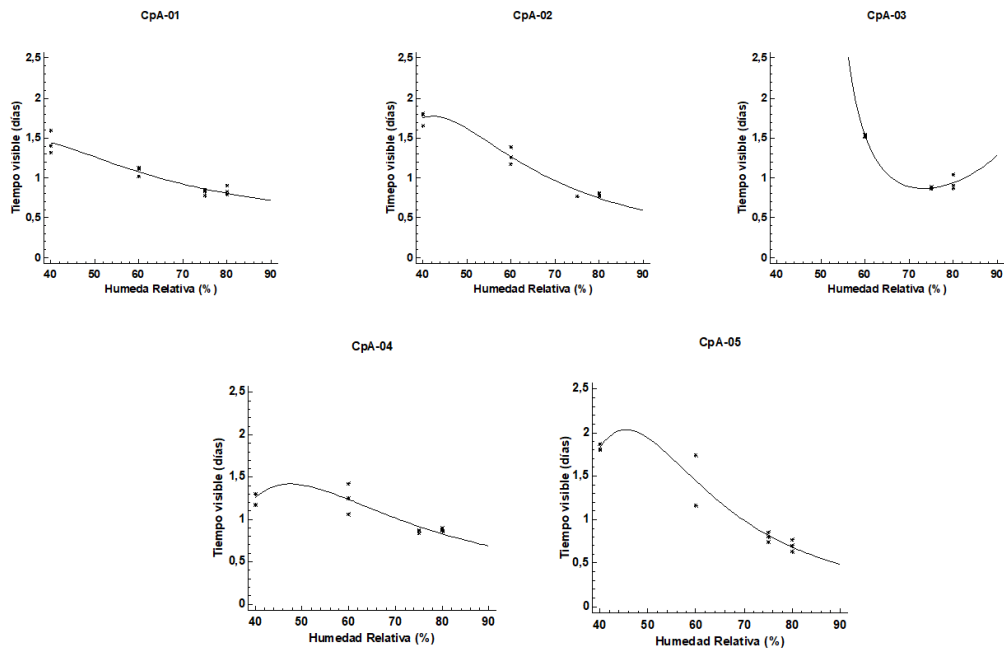


Figura 15. Tiempo de visibilidad (tv) de las cinco cepas aisladas de papaya en función de la Humedad Relativa utilizando el modelo de Arrhenius-Davey ($tv = e^{(A + \frac{B}{HR} + \frac{C}{HR^2})}$).

Esta respuesta en el crecimiento y tiempo de visibilidad que presenta *A. alternata* frente a la HR del ambiente, puede estar asociada al ajuste osmótico que proporciona una mayor turgencia en la célula por el aumento de la HR, expresándose en el crecimiento micelial. A su vez, el retraso en el crecimiento del hongo a medida que disminuye la HR, provoca un mayor potencial hídrico en los espacios intracelulares donde la hifa fúngica tiende a crecer. Si bien no se conoce el potencial hídrico que evita el crecimiento o detiene la patogénesis en un hongo, probablemente el aumento de éste al disminuir la HR, indicaría una pérdida de peso en la fruta lo que causaría el retraso en el desarrollo y crecimiento (visibilidad de micelio) del hongo (Prusky y cols., (1981) y Alam y cols., (1996)).

6.4. Validación de los modelos en función de temperatura y humedad relativa

La validación realizada en la matriz real del alimento (papaya) mostró (cuadro 10) que, para la velocidad de crecimiento del hongo *A. alternata* en función de la temperatura y con el uso del modelo CMI, se obtuvo un valor de 0.8 para B_f y 1.4 para A_f . Pérez-Rodríguez (2017), explica que un valor de uno para el B_f significa que las observaciones se distribuyen equitativamente por encima y por debajo de las predicciones. Así, nuestros resultados nos sugieren que al estar por debajo de uno, los valores de velocidad pronosticados y/o predichos fueron más bajos que los observados (modelo con riesgo de fallas), es decir, que la velocidad de crecimiento del hongo fue más lenta en la matriz real del alimento (papaya) que en el medio simulado. A su vez, el A_f indicará que tan cercanas están las predicciones de las observaciones. Cuanto más alejado este el valor de 1, menos precisa será la predicción (Ross, (1996); Pérez-rodríguez, (2017)). Nuestros resultados sugieren estimaciones precisas para la velocidad de crecimiento del hongo en función de la temperatura.

Cuadro 10. Factor de sesgo (B_f) y de precisión (A_f) obtenidos para el conjunto de datos (velocidad de crecimiento y tiempo de visibilidad) en la validación de *Alternaria alternata* en papaya.

Hongo	Matriz de alimento	Modelo	Variable	Factor ambiental	B_f	A_f	RMSE
	Papaya	Rosso	μ	T (°C)	0.8	1.4	1.3

<i>A. alternata</i>		Arrhenius-Davey		HR (%)	1.6	1.8	2.2
<i>A. alternata</i>	Papaya	Polinomia I	t_v	T (°C)	1.4	1.6	1.0
<i>A. alternata</i>		Arrhenius-Davey		HR (%)	1.6	1.7	0.8

Estos resultados concuerdan con los encontrados en un estudio reciente hecho por Sardella y cols (2018), ellos llevaron a cabo la validación de un modelo predictivo CMI (Rosso) en el efecto de la temperatura sobre la velocidad de crecimiento de varios hongos, incluido *A. alternata*. La validación la realizaron en peras, el factor de sesgo y precisión que arrojó el modelo fue de 0.88 y 1.13 respectivamente para *A. alternata*. Esta respuesta en la predicción, puede estar influenciada a la propia matriz del alimento y al mismo modelo en sí, ya que la composición del fruto es mucho más compleja, y el hongo no solo se enfrenta a la cutícula, sino que también a otros microorganismos saprofitos (Samapundo y cols., 2007). Sin embargo, el mismo autor (Pérez-rodríguez, 2017) indicó que es un rango aceptable para el factor de sesgo valores que van de 0.7 a 1.3. Con este resultado obtenido de A_f , podemos sugerir que el modelo desarrollado por Rosso, es un modelo preciso para describir la velocidad de crecimiento del hongo bajo la influencia de este factor ambiental (T). Por otro lado, se obtuvo un valor de B_f de 1,4 y uno de A_f de 1,8 para el modelo de Arrhenius-Davey en a velocidad de crecimiento del hongo *A. alternata* en función de la HR. Estos resultados se pueden comparar con los que fueron encontrados en un estudio realizado por Baert y cols (2007), quienes presentaron el mismo orden de magnitud para los valores de B_f y A_f determinados en la validación del modelo de Arrhenius-Davey en el efecto de la temperatura sobre el crecimiento de *P. expansum* realizado en manzanas.

También, varias investigaciones (Samapundo y cols., (2005) y Tassou y cols., (2007); Gracia y cols., (2011)) han obtenido buen rendimiento al uso de este modelo en la descripción de la velocidad de crecimiento para varios hongos como *Fusarium verticillioides*, *Aspergillus carbonarius*, *A. parasiticus* y en diferentes matrices de alimento (maíz, vino, café, etc.).

La mayoría de los resultados de B_f y A_f obtenidos en este estudio, están cercanos y por encima de 1. El factor de sesgo, nos indicaría que las predicciones hechas con el uso del modelo Arrhenius-Davey son más altas que las observadas, sugiriendo un modelo “seguro” dado que alberga un margen amplio de los valores. Lo que lo convierte en un modelo conservador. Sin embargo, se debe tener mucho cuidado en la extrapolación de los datos, puesto que los parámetros generados por el modelo no presentan una interpretación biológica y puede introducir grandes errores al modelo (Sundberg, 1998). Asimismo, el uso de este modelo (Arrhenius-Davey) para el tiempo de visibilidad del micelio del hongo influenciado por la HR, indicaron predicciones conservadoras. Ahora bien, otra manera de evaluar o de examinar la proximidad entre las observaciones y predicciones es a través de índices estadísticos como el RMSE (cuadro 10). En términos de rendimientos, las precisiones de las predicciones de los modelos tanto para la velocidad de crecimiento como para la visibilidad del micelio del hongo *A. alternata*, sugieren el siguiente orden Davey<Rosso y polinomial<Davey respectivamente, esto está en acuerdo con la literatura (Panagou y cols., (2003); Samapundo y cols., (2005); Tassou y cols., (2007); Garcia y cols., (2011); Mousa y cols., (2011)). Los autores señalan que, las precisiones de las predicciones en la velocidad de crecimiento, con el uso del modelo de Arrhenius-Davey son inferiores a las del uso con el modelo de Rosso. Sin embargo, estos valores pueden cambiar debido al

comportamiento que presentarán los datos de crecimiento de los distintos hongos y matrices, así como también las respectivas transformaciones hechas a los datos. Si bien, ambos modelos (polinomial y Davey) no cuentan con una interpretación biológica. Mousa y cols (2011) señala que el modelo de Arrhenius es mucho más preciso en la posibilidad de modelar el crecimiento de un hongo, bajo la influencia de ciertos factores ambientales incluidos de forma empírica. Esto se debe a que la ecuación de Arrhenius fue interpretada a partir de bacterias y Davey la extrapoló al análisis de hongos (Davey, 1989), caso contrario con el modelo polinomial, ya que este último carece de universalidad (Baranyi y cols., 1996).

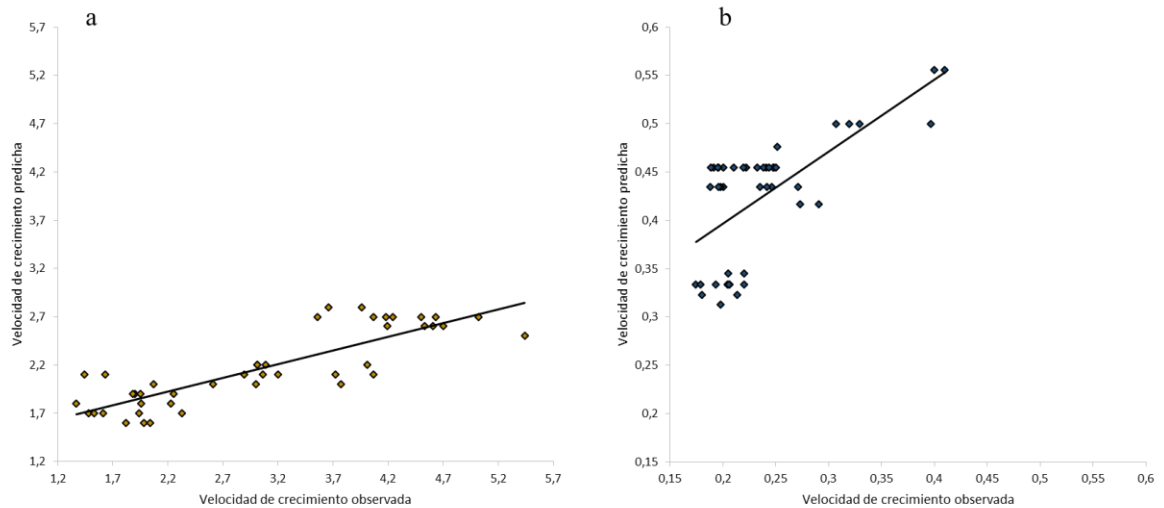


Figura 16. Comparación de las velocidades de crecimiento del hongo *A. alternata* predichas vs observadas. **a:** en función de la temperatura y **b:** en función de la HR

Como se puede visualizar, la ubicación y distribución de los datos a la línea de equivalencia (concordancia perfecta entre predicciones y observaciones) fue más homogénea para la velocidad de crecimiento en función de la temperatura, es decir, los datos de validación se distribuyeron uniformemente con buena

concordancia, a diferencia que en la HR. Pérez-Rodríguez (2017) señala que, si los puntos de datos se sitúan principalmente por encima de la línea de equivalencia ($B_f > 1$), el modelo se puede considerar “seguro” ya que sobrestima a los datos (velocidad de crecimiento y tiempo de visibilidad), de esta manera el modelo lograría tener un enfoque más conservador y preferido desde un punto de vista de seguridad alimentaria.

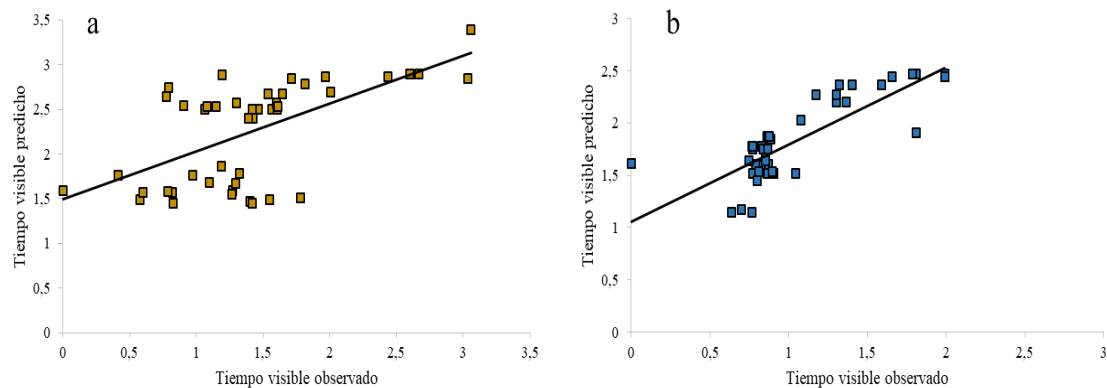


Figura 17. Comparación de los tiempos de visibilidad del micelio del hongo *A. alternata* predichos vs observados. **a:** en función de la temperatura y **b:** en función de la HR.

Caso contrario a que si los puntos se sitúan por debajo de la línea de equivalencia, el modelo será considerado “poco seguro”, ya que el modelo subestima a los datos (μ y t_v). Nuestros resultados en ambos gráficos (Fig. 16 y 17) confirman el rendimiento que presentan los modelos, apreciándose un enfoque más conservador de los datos. De esta manera se logra estipular una base al uso de estos modelos en la micología predictiva.

El rendimiento de los modelos explica que tan veraces son a la hora de realizar predicciones de un conjunto de datos de crecimiento. Todos los patrones de tendencia y comportamiento de *A. alternata* que se generaron a partir de los

modelos, significan los diferentes cambios que presentará el patógeno en la papaya bajo la influencia de la temperatura y humedad.

Alternaria alternata no se considera el patógeno principal de la papaya, aun así este es uno de los hongos que lleva consigo un mecanismo rápido de adaptación al ambiente y a su hospedero. Este es hongo capaz de infectar diferentes frutas, bajo un rango amplio a condiciones ambientales (Singh & Sudhakar Rao, 2011). La mayoría de productores de frutas (en especial la papaya) concuerdan que una de las problemáticas más destacadas son las enfermedades fúngicas, una vez son cosechados los frutos. En la gestión del manejo de la papaya los requisitos del mercado y la madurez fisiológica del fruto constituyen los aspectos básicos para determinar el momento de recolección. No obstante, también es importante considerar las condiciones climáticas y todo apoyo logístico, ya que permiten planear mejor la cosecha y responder a las eventualidades de manera segura. En dicha gestión, implica conocer los siguientes aspectos: la distancia en la que se encuentra el mercado, las posibles rutas, el personal disponible y capacitado, la disponibilidad de elementos y de vehículos para la cosecha y el transporte, los días, horas de compra y de despacho, el tiempo de espera y las condiciones de almacenamiento (temperatura y humedad relativa del contenedor, donde la HR debe estar en un rango de 80-90% para no deshidratar el fruto) en los puertos, entre otros. Así, nuestros resultados apuntan a que los modelos matemáticos predictivos contribuirían en la prevención y control de enfermedades fúngicas, apuntándose como una posible herramienta práctica y accesible, de fácil adaptación a través de softwares de forma que el productor pueda anticiparse a los diferentes escenarios ambientales. No obstante, para una herramienta de

predicción completa se debe extrapolar a una simulación computacional (modelos terciarios) antes de ser utilizada en predicciones.

CAPÍTULO 7. CONCLUSIONES

CAPÍTULO 7. CONCLUSIONES

Los hongos aislados de papaya se identificaron como *Alternaria alternata*. El patógeno puede ser capaz de afectar a este tipo de frutas y reducir su rendimiento y calidad.

El modelo de Rosso fue adecuado para predecir la velocidad de crecimiento del hongo *A. alternata* en función de la temperatura de manejo del fruto. Los parámetros que fueron estimados por el modelo de Rosso (μ_{opt} , T_{min} , T_{max} , T_{opt}), dieron información acerca de las condiciones que se necesitan para que el hongo presente o no un crecimiento.

El modelo polinomial y Arrhenius-Davey lograron predecir el tiempo de visibilidad del micelio de *A. alternata* en función de la temperatura y humedad relativa, respectivamente. Este es un parámetro que resulta útil para la gestión de la papaya.

El modelo de Arrhenius-Davey resulto adecuado para predecir el comportamiento que presentará *A. alternata* bajo el efecto de la humedad relativa en papaya. Para obtener una información precisa se necesitará estudiar más de cerca este fenómeno mediante simulaciones computacionales.

Se lograron validar las predicciones hechas por los modelos, estas resultaron adecuadas para la descripción del crecimiento real del hongo en papaya.

CAPÍTULO 8. BIBLIOGRAFÍA

CAPÍTULO 8. BIBLIOGRAFÍA

Agrios, G. (2005). Plant pathology (5ta edition) United States: Elsevier.

Alam, S., Joyce, D., y Wearing, A. (1996). Effects of equilibrium relative humidity on in vitro growth of *Botrytis cinerea* and *Alternaria alternata*. *Australian journal of experimental agriculture*, 383-388.

Altendorf, S. (2017). Perspectivas mundiales de las principales frutas tropicales. México. Recuperado de fao: <http://www.fao.org/economic/est/est-commodities/frutas-tropicales/es/>.

Andersen, B., Kroger, E. y Roberts, G. (2001). Chemical and morphological segregation of *Alternaria alternata*, *A. Gaisen* and *A. Longipes*. *Mycologia res*, 291-299.

Ayerst, G. (1969). The effects of moisture and temperature on growth and spore germination in some fungi. *Journal Stored production*, 5, 127-141.

Baert, K., Valero, A., Samapundo, S., y Bo, L. (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. Doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2007.07.006.

Basim, E., Basim, H., Abdulai, M., y Baki, D. (2016). Identification and characterization of *Alternaria alternata* causing leaf spot of olive tree (*olea europaea*) in turkey. *Crop protection*, 92, 79-88. Doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.cropro.2016.10.013>.

Baty, F., Laure-Marie., y Delignette-Muller. (2004). Estimating the bacterial lag time: which model, which precision? *International journal of food microbiology*, 91, 261-277.

Bautista-baños, S., Bello-Perez, A., Hernández-López, M., y Villanueva-Arce, R. (2013). A review of the management alternatives for controlling fungi on papaya fruit during the postharvest supply chain. *Crop protection*, 49, 8-20. Doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.cropro.2013.02.011>.

Belbahi, A., Legurinel, I., Loiseau, G., y Madani, K. (2016). Modelling the effect of temperature, water activity and carbon dioxide on the growth of *Aspergillus niger* and *Alternaria alternata* isolated from fresh data fruit. *Journal of applied microbiology*, 121(6), 1685-1698.

Bernal, A. (2010). Papaya: perfil comercial. México: Colima produce.

Bonner, D. y Fergus, C. (1960). The influence of temperature and relative humidity on growth and survival of silage fungi. *Mycologia*, 642-647.

Burgain, A., Bensoussa, M., y Dantigny, F. (2013). Effect of inoculum size and water activity on the time to visible growth of *Penicillium chrysogenum* colony. *International journal of food microbiology*, 180-183.

Burgain, A., Bensoussa, M., y Dantigny, F. (2015). Validation of a predictive model for the growth of *chalk* yeasts on bread. *International journal of food microbiology*, 47-54.

Carrillo-inungaray, L., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A. (2014). Effect of temperature, ph and water activity on *Penicillium digitatum* growth. *Journal of applied mathematics and physics*, 2, 930-937. Doi:<http://dx.doi.org/10.4236/jamp.2014.210105>.

Champathi, G., Tiwari, A., y Taranga, K. (2018). Efficacy of washing treatment for extending the post-harvest shelf-life of papaya (carica papaya). *International journal of chemical studies*, 4, 2173-2177.

Chandra, P., Xing, D., Lee, B., y Yu, H. (2018). Characterization and pathogenicity of *Alternaria burnsii* from seeds of *Cucurbita maxima* (Cucurbitaceae) in bangladesh. *Mycobiology*, 43(4), 384-391.

Charlton, M. (1953). The sporulation of *Alternaria solani* in culture. *Transactions british mycological society*, 350-355.

Dagno, K., Lahlai, R., Diourté, M., y Jijakli, M. (2010). Effect of temperature and water activity on sporegermination and mycelial growth of three fungal biocontrol agents against water hyacinth (*eichhornia crassipes*). *Journal of applied microbiology*, 521-528. Doi:[doi:10.1111/j.1365-2672.2010.04908.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2010.04908.x).

Dantigny, P., Judet-Correia, D., y Bensoussan, M. (2011). A new model for germination of fungi. *International journal of food microbiology*, 2(146), 176-181. Doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2011.02.022.

Dantigny, P. y Bensoussan, M. (2008). The logarithmic transformation should be avoided for stabilising the variance of mould growth rate. *International journal of food microbiology*, 121, 225-228.

Dantigny, P., Judet-Correia, D., y Bensoussan, M (2016). Relevant issues in predictive mycology. *Food science*, 11, 29–33. . Doi:10.1016/j.cofs.2016.08.011.

Dave, K. (1989). A predictive model for combined temperature and water activity on microbial growth during the growth phase. *Journal of applied bacteriology*, 483-488.

Domsch, K., Ververi, M., Adamopoulou, A. y Kaderides, K. (1980). Compendium of soil fungi (vol. 2). Reino unido: academic press (london).

Elfar, K., Zoffoli, J. y Latorre, A. (2018). Identification and characterization of *Alternaria* species associated with moldy core of apple in chile. *Plant disease*, 2-42. Doi:<http://dx.doi.org/10.1094/pdis-02-18-0282-re>.

Estrada, R., Carrilla-Fasio, J., Márquez-Zequera, I. y Cruz-Lachica, I. (2017). Identificación de hongos mucorales causantes de la pudrición blanda en frutos de papaya (*Carica papaya* L.) En México. *Revista mexicana de fitopatología*, 35(3), 397-417. Doi:<http://dx.doi.org/10.18781/r.mex.fit.1611-3>.

Farrera, P., Zambrano, B. y Ortiz, M. (2007). Identificación de hongos asociados a enfermedades del fruto de la fresa en el municipio Jáuregui del estado Táchira. *Revista de la facultad de agronomía*, 24(2), 268-281.

García, D., Ramos, J., Sanchis, V. y Marín, S. (2009). Predicting mycotoxins in foods: a review. *Food microbiology*, 8(26), 1–13. Doi:10.1016/j.fm.2009.05.014.

García, V., Cruz, S., García, A., y Rivera, S. (2010). Producción y manejo postcosecha de papaya maradol en la planicie huasteca (vol. 4). Tamaulipas: secretaria de agricultura, ganadería, desarrollo rural, pesca y alimentación.

García, L. (2003). Pawpaw: post-harvest operation. Obtenido de food and agriculture organization of the united nations. Recuperado de: http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/inpho/docs/post_harvest_compendium_-_pawpaw__papaya_.pdf.

Gilchrist-saavedra, G., Barrera-Necha L.L., Bautista-Baños S. y Bravo-Luna L. (2005). Guía práctica para la identificación de algunas enfermedades de trigo y cebada (2da edición). México: Almcnab.

González, S., Robles, J. y Zabaleta, J. (1999). La papaya, un mercado en expansión. México: Secretaría de agricultura, ganadería y desarrollo rural, 44.

Gougouli, M. y Koutsoumanis, P. (2010). Modelling growth of *Penicillium expansum* and *Aspergillus niger* at constant and fluctuating temperature conditions. *International journal of food microbiology*, 140, 254-262.

Gougouli, M., Koutsoumanis, P., y Konstantinos P. (2011). Modelling spore germination and mycelium growth kinetics of fungi in yogurt-type environment. Greece: aristothe university of thessaloniki.

Govind, S., Naresh, M. y Prabhu, D. (2016). *Alternaria* diseases of crucifers: biology, ecology and disease management. Springer. Doi:10.1007/978-981-10-0021-8.

Graü, D., Isaza J.H., Veloza L.A., Guevara C.A. y Ávila Y.P. (2007). Influencia de la actividad del agua, ph y temperatura en el crecimiento de *Aspergillus penicillioides* y *A. Terreus* aislados de la carne seca y salada de atún listado (katsuwonus pelamis). *Revista científica*, 18(2), 193 - 199.

Greco, M., Pardo, A., Pose, G. y Patriarca, A. (2017). Effect of water activity and temperature on the growth of Eurotium species isolated from animal feeds. *Revista iberoamerica de micología*, 1(35), 39-48.

Green, K. y Bailey, P. (2000). Influence of moisture and temperature on infection of canada thistle by *Alternaria cirsinoxia*. *Plant disease*, 1126-1132.

Guerra, L. (2018). Caracterización morfológica y molecular de *Alternaria alternata* hongo fitopatógeno causante del secamiento descendente del cáliz, en frutos de physalis peruviana en la sierra centro-norte del ecuador. Presentada como

requisito para optar al grado de doctorado en Ciencias. pontificia universidad católica del ecuador, Quito.

Guzmán, R. (2007). Producción y comercialización de la papaya (*Carica papaya* L.). Presentada como requisito para optar al grado de doctorado en ciencias en ecología y desarrollo sustentable. Tabasco, México.

Haralampu, S., Saguy, I. y Karel, M. (1985). Estimation of arrhenius model parameters using three least squares methods. *Journal of food processing and preservation*, 129-143.

Helal, B., Honsen, S. y Shamsi, S. (2018). Mycoflora associated with post-harvest disease of papaya (*Carica papaya* L.) And their pathogenic potentiality. *Journal Bot*, 47(3), 389-395.

Hewajulige, IGN. y Dhekney, SA. (2016). Papayas. *Encyclopedia of Food and Health*, 209-212. Doi:10.1016/b978-0-12-384947-2.00517-1.

Huchet, V., Pavan, S., Lochardet, M.L. y Postollec, F. (2013). Development and application of a predictive model of *Aspergillus candidus* growth as a tool to improve shelf life of bakery products. *Food microbiology*, 254-259.

Humpherson, A. y Phelps, J. (1989). Climatic factors influencing spore production in *Alternaria brassicae* and *Alternaria brassicicola*. *Ann. Appl. Biol*, 449-458.

Ica. (2017). Instituto colombiano agropecuario. Recuperado de: <https://www.ica.gov.co/periodico-virtual/prensa/2013/colombia-exporta-con-exito-papayas-a-canada.aspx>.

Judet, C.D., Ramos, J., Sanchis, V. y Marín, S. (2010). Validation of a predictive model for the growth of *Botrytis cinerea* and *Penicillium*. *International journal of food microbiology*, 12(142), 106–113. Doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2010.06.009.

Kgatle, M.G., Ramusi, T.M. y Aveling, A.S. (2018). *Alternaria alternata*, the causal agent of leaf blight of sunflower in south africa. *Eur journal plant pathology*, 151, 677-688.

Lahlali, R., Serrhini, M., Friel, D. y Jijakli, M. (2007). Predictive modelling of temperature and water activity (solutes) on the in vitro radial growth of *Botrytis cinerea* pers. *International journal of food microbiology*, 114, 1-9.

Lemes, M., Mulkay, V. y Jiménez, A. (2014). Actividad antifúngica de sales de quitosana in vitro sobre hongos causantes de enfermedades poscosecha en papaya (*Carica papaya*). *Fitosanidad*, 18(1), 33-40.

Liu, Y., Kuang, H., y Yu, W. (2011). Fast preparation of fungal dna for pcr screening. *Journal of microbiological methods*, 128, 170-172.

López, M., Sánchez, J., Baños, B. y Sánchez, D. (2018). Evaluación de películas biodegradables en el control de hongos poscosecha de la papaya. *Cultivos tropicales*, 39(1), 52-60.

López, R., Carranza, J., Villalobos, C., Zul, M., Centeno, H. y Sánchez, J. (2012). Efecto de la temperatura y humedad relativa en la germinación de esporangios de *Bremia lactucae* rege. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 3(5), 1039-1045.

Martínez, H. y González, A. (2006). Tecnología del manejo poscosecha de la papaya (*Carica papaya*) para el mercado fresco. *Centro agrícola*, 43-48.

Membre, S y Dagnas, M. (2013). Predicting and preventing mold spoilage of food products. *Journal of food protection*, 76(03), 538-551. Doi:10.4315/0362-028x. Jfp-12-349.

Molar, R., Estrada, R., Zequera, I., Leor, E. y Cruz, M. (2011). Hongos fitopatógenos en el cultivo de papaya mexicana. México: Sagarpa.

Mousa, W., Ghazali, F.M., Jinap, S., Ghazali, H.M. y Radu, S. (2011). Modelling the effect of water activity and temperature on growth rate and aflatoxin production by two isolates of *Aspergillus flavus* on paddy. *Journal of applied microbiology*, 111, 1262-1274. Doi:10.1111/j.1365-2672.2011.05134.x.

Mulkay, T., Paumier, A., Aranguren, M. y Herrera, O. (2010). Diagnóstico de las enfermedades fungosas de mayor incidencia durante la poscosecha de la papaya (*Carica papaya* L.), el mango (*Mangifera indica* L.) Y el aguacate (*Persea americana miller*) en tres localidades frutícolas de cuba. *Revista citrifrut*, 27(2), 23-30.

Muñoz, A. y Rodríguez, J. (2017). Manejo de cosecha y poscosecha de papaya. Colombia: corporación colombiana de investigación agropecuaria (Corpoica).

Narayanasamy, P. (2006). Causes and effects in postharvest pathogens and disease management. John Wiley & Sons.

Nielsen, J. (1992). Modelling the growth of filamentous fungi. *Advances in biochemical engineering/biotechnology* (vol. 46).

Nishikawa, C. y Nakashima, A. (2018). Morphological and molecular characterization of the strawberry black leaf spot pathogen referred to as the strawberry pathotype of *Alternaria alternata*. *Mycoscience*, 1-9. Doi:<https://doi.org/10.1016/j.myc.2018.05.003>.

Palou, I., Humperson, T. y Harali, F. (2012). First report of *Alternaria alternata* causing postharvest black spot of persimmon in Spain. *Plant Diseases*, 41- 42.

Panagou, E.Z., Skandamis, P.N. y Nychas, J.E. (2003). Modelling the combined effect of temperature, pH and aw on the growth rate of *Monascus ruber*, a heat-resistant fungus isolated from green table olives. *Journal of applied microbiology*, 146-156.

Panasenko, V. (1967). Ecology of microfungi. *The botanical*, 190-214.

Pardo, E., Marín, S., Sanchis, V. y Ramos, A.J. (2005). Impact of relative humidity and temperature on visible fungal growth and OTA production of ochratoxigenic *Aspergillus ochraceus* isolates on grapes. *Food microbiology*, 383-389.

Patriarca, A. y Pinto, V. (2018). *Alternaria*. Argentina: Elsevier.

Pavón, M., González, I., Pegels, N. y Martín, R. (2010). PCR detection and identification of *Alternaria* species-groups in processed foods based on the genetic marker alt a 1. *Food control*, 21, 1745-1756.

Pérez-rodríguez, F. (2017). Development and application of predictive microbiology models in foods. *Mathematical and statistical methods in food science and technology*. Doi:10.1002/9781118434635.

Pitt. (1993). A descriptive model of mold growth and aflatoxin formation as affected by environmental conditions. *Journal of food protection*, 56(2), 139-146.

Poursafar, A., Ghosta, Y., Orina, A. y Gnnibal, P. (2018). Taxonomic study on *Alternaria* sections infectoriae and pseudoalternaria associated with black (sooty) head mold of wheat and barley in iran. *Mycological progress*, 17, 343-356.

Ramezani, Y., Taheri, P. y Mamarabadi, M. (2019). Identification of *Alternaria* spp. Associated with tomato early blight in iran and investigating some of their virulence factors. *Journal of plant pathology*, 1-13. Doi:<https://doi.org/10.1007/s42161-019-00259-w>.

Reyes-Rosas, K., Rodríguez-García, P. y Zermeño-González, A. (2012). Evaluación de un modelo para estimar la temperatura y humedad relativa en el interior de invernadero con ventilación natural. *Revista chapingo serie horticultura*, 125-140.

Ross, T. (1996). Indices for performance evaluation of predictive models in food microbiology. *Journal of applied bacteriology*, 501-508.

Rosso, L., Lobry, R. y Flandrois, P. (1993). An unexpected correlation between cardinal temperatures of microbial growth highlighted by a new model. *Journal Theor. Biology*, 447-463.

Sagarpa, (2018). Secretaría de agricultura, ganadería, desarrollo rural, pesca y alimentación. Recuperado de: <https://www.gob.mx/sagarpa/prensa/aumenta-30-por-ciento-produccion-de-papaya-hecho-en-mexico-en-lapresenteadministracion?idiom=e>.

Samapundo, S., Meulenaer, B., Geeraerd, A.H. y Debevere, J.M. (2007). Predictive modelling of the individual and combined effect of water activity and temperature on the radial growth of *Fusarium verticillioides* and *F. proliferatum* on corn *International journal of food microbiology*, 118, 139-150.

Sandoval-Contreras T., Marín, S., Garrido-Sánchez, L. y 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. *Journal of food protection*, 80(7), 1090-1098. Doi:10.4315/0362-028x.jfp-16-408.

Sandoval-Contreras, T., Garrido-Sánchez, L., Ragazzo-Sánchez, J. y Calderón-Santoyo, M. (2020). A predictive model for the effect of the environmental conditions on the postharvest development of *Colletotrichum gloeosporioides* strains isolated from papaya (*Carica papaya* L.). *Journal of food protection*. Doi: 10.4315/JFP-19-493.

Santos, J. (2015). Modelagem preditiva da deterioração de pães integrais multigrãos por fungos filamentosos. Presentada como requisito para optar al grado de mestre en alimentos. Campinas, brasil.

Sardella, D., Gatt, R. y Valdramidis, P. (2018). Modelling the growth of pear postharvest fungal isolates at different temperatures. *Food microbiology*, manuscrito aceptado. Doi:10.1016/j.fm.2018.07.010.

Sautour, M., Dantigny, P., Divies, C. y Bensoussan, M. (2002). Comparison of the effects of temperature and water activity on growth rate of food spoilage moulds. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 28, 311-315.

Sautour, M., Dantigny, P., Divies, C. y Bensoussan, M. (2001). A temperature-type model for describing the relationship between fungal growth and water activity. *International journal of food microbiology*, 67, 63-69.

Silva, A.R., Sant´ana, A.S. y Massaguer, P.R. (2010). Modelling the lag time and growth rate of *Aspergillus* section *nigri* ioc 4573 in mango nectar as a function of temperature and pH. *Journal of applied microbiology*, 109, 1105-1116. Doi:10.1111/j.1365-2672.2010.04803.x.

Simmons, G. (1967). Typification of *Alternaria*, *Stemphylium*, and *Ulocladium*. *Mycological society of america*, 59(1), 67-92.

Snowdon, L. (2009). Chapter i: subtropical and tropical fruits. Post-harvest diseases and disorders of fruit and vegetables: general introduction and fruits (vol. 1). Wolfe scientific, 1990.

Solis, J., Martinez, B. y Orin, P. (2017). Caracterización química, variabilidad composicional y modelamiento matemático del efecto de aceites esenciales en *Alternaria alternata*. *Mexicana de fitopatología*, 35, 204-226. Doi:10.18781/r.mex.fit.1612-5.

Sommer, N.F. (1985). Role of controlled environments in suppression of postharvest diseases. *Plant pathology*, 7(3), 331-339. Doi:10.1080/07060668509501700.

Stefanello L. y Rosa, S. (2012). Composição centesimal de diferentes cascas de frutas. *Revista de ciencia y tecnología*, 17, 34-37.

Sudhakar, D.V. y Singh, S.P. (2011). Capitulo 6: papaya (*Carica papaya* L.). Postharvest biology and technology of tropical and subtropical fruits: mangosteen to white sapote. Yahia: Woodhead publishing limited.

Sundberg, R. (1998). Statistical aspects on fitting the arrhenius equation. *Chemometrics and intelligent laboratory systems*, 41, 249-252.

Swinnen, I.A.M., Bernaerts, K., Dens, E.J.J. y Van Impe, J.F. (2004). Predictive modelling of the microbial lag phase: a review. *International journal of food microbiology*, 94, 137-159.

Tansey, R. (1972). Effect of temperature on growth rate and development of the thermophilic fungus *Chaetomium thermophile*. *Mycologia*, 64(6), 1290-1299.

Tassou, C.C., Panagou, E.Z., Natskoulis, P. y Magan, N. (2007). Modelling the effect of temperature and water activity on the growth of two ochratoxigenic strains of *Aspergillus carbonarius* from greek wine grapes. *Journal of applied microbiology*, 2267-2276.

Torres, G. (2000). Caracterización del cultivo de la papaya como producto con potencial para exportación, con énfasis en el diagnóstico molecular y serológico de enfermedades.

Troncoso, R. y Tiznado S. (2014). *Alternaria alternata* (black rot, black spot) (4ta edición).

Trujillo, A. (2010). Micología médica básica. (4ta edición ed.). McGraw-hill companies, inc. Doi:isbn 978-607-15-0744-0.

Vakalounakis, J. (1986). Vegetative reversion of *Alternaria cichorii* conidiophores in relation to temperature and relative humidity. *Trans. Br. Mycol*, 655-658.

Vega, A. (2013). Identificación molecular de aislados de hongos nematófagos asociados a *Meloidogyne hapla* chitwood. Chile.

Velázquez, J. y Toledo, C. (2007). Manual de manejo postcosecha de frutas tropicales (papaya, piña, plátano, cítricos). Recuperado de: <http://www.fao.org/in-action/inpho/en/>. <Http://www.fao.org/3/a-ac304s.pdf>.

White, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics a guide to methods and aplicaciones. *Academy press*, 315-321.

Xiao, Y. y Zhu, L. (2015). Phylogenetic, morphological, and pathogenic characterization of *Alternaria* species associated with fruit rot of blueberry in california. *Etiology*, 105(12), 1555-1567. Doi:<http://dx.doi.org/10.1094/phyto-05-15-0122->.

Yue, S., Liu, X. y Kuang, S. (2011). Modeling the effect of temperature and water activity on the growth rate and lag phase of *Aspergillus flavus* during rice drying. *Drying technology*, 1306-1312.