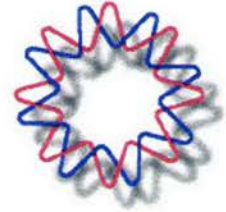




Universidad Nacional  
Autónoma de México

03072



Instituto de Biotecnología

---

“Control biológico de antracnosis en mango: aspectos de  
formulación y de evaluación precisa de la enfermedad”

**T E S I S**

que para obtener el grado de

**Maestra en Ciencias**

P r e s e n t a

Bióloga Karina Alejandra Balderas Ruíz

Cuernavaca, Mor., Octubre del 2004



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA**

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Balderas Ruiz  
Karina Alejandra

FECHA: 24-SEP-04

FIRMA: Balderas

El presente trabajo fue realizado bajo la asesoría del Dr. Enrique Galindo, del Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, en la Ciudad de Cuernavaca, Morelos.

Para la realización de este trabajo se contó con financiamiento del CONACyT (proyecto Z-001) CONACyT-SAGARPA (proyecto 741) y con el apoyo técnico del Dr. Gabriel Corkidi y la Ing. Blanca Taboada del Laboratorio de Imágenes del CCADET-UNAM, Unidad Morelos.



## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Enrique Galindo, le agradezco el tiempo y la confianza que me otorgó para la realización de este trabajo. Muy especialmente por su valiosa dirección en mi formación tanto académica como personal.

Al Dr. Leobardo Serrano y al Dr. Carlos Peña, Dra. Ma. Soledad Córdova y a la M. en C. Celia Flores por compartir sus conocimientos y experiencia, así como el apoyo técnico para el desarrollo de este trabajo en el Laboratorio 10 del Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis.

Al personal de la Unidad de Escalamiento y Planta Piloto del Instituto de Biotecnología: M. en B. Martín Patiño, Q. F. B. Myriam Ortiz, Ing. Verónica Albíter y al T. L. I. Mario Alberto Caro, por su valiosa colaboración en el desarrollo de las fermentaciones.

Al Laboratorio de Análisis y Visión del CCADET-UNAM (Unidad Morelos): Dr. Gabriel Corkidi y a la Ing. Blanca Taboada, por su valiosa colaboración en el desarrollo del sistema de análisis de imágenes.

Al Laboratorio de Fitopatología del CIAD (Culiacán): Dr. Armando Carrillo, M. en C. Raúl Allende y al T. L. Isidro Mendoza por la aportación del material biológico para los bioensayos.

A los miembros del Jurado, por sus críticas y sugerencias: Dr. Jesús Caballero, Dr. Enrique Galindo, Dr. Leopoldo Fucikovski, Dr. Gabriel Corkidi y Dr. Leobardo Serrano.

A las Sras. Lorena Salazar y Leticia Días, al Sr. Javier Dorantes, a las Sritas. Tania Panecatl y Erika Ruíz, por su apoyo en cuestiones técnico-administrativas.

A mis compañeros del Laboratorio EG-OTR y de la Maestría.

*A todas las Personas que he conocido durante mi feliz estancia en el IBt...*

*Con infinito Amor a Dios,  
a mis Padres y a mi Hermano,  
porque siempre están conmigo  
y hacen felices cada uno de mis días.*

*A mis Amigas y Amigos, por los muy gratos momentos compartidos...*

*Herlinda, Judith, Celia, Marisol, Lilia, Ana, Elydée, Tania y Vanne, Fernando, Leandro, Mainul,  
César, Mauricio, Boris, Adrián, Luis, Lucio y Jimmy...*

Todos y cada uno de ustedes son parte importante de esta etapa de mi vida

*Karina A.*

## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> Antracnosis en mango (adaptado de Arauz, 2000).	14
<b>Figura 2.</b> Escala hedónica reportada por Carrillo (2003).	17
<b>Figura 3.</b> Estrategia experimental desarrollada para la evaluación de diferentes formulaciones líquidas de <i>Rhodotorula minuta</i> y de la antracnosis poscosecha por análisis de imágenes.	21
<b>Figura 4.</b> Esquema experimental para la evaluación de diferentes formulaciones líquidas de <i>R. minuta</i> .	23
<b>Figura 5.</b> Sistema de análisis de imágenes implementado para la evaluación de la antracnosis en frutos de mango.	26
<b>Figura 6.</b> Evaluación cuantitativa de la antracnosis del mango por análisis de imágenes.	27
<b>Figura 7.</b> Proyección pseudocilíndrica 'equal-area' de la superficie de la fruta de mango.	29
<b>Figura 8.</b> Evaluación del control de la antracnosis por <i>R. minuta</i> en frutos de mango.	33
<b>Figura 9.</b> Actividad de agua a 4 °C en función de la concentración de glicerol.	35
<b>Figura 10.</b> Caracterización reológica de las formulaciones líquidas de <i>R. minuta</i> . Viscosidad (cp, evaluada a $\dot{\gamma}=200 \text{ s}^{-1}$ ) de las formulaciones en función de la concentración de glicerol y de xantana.	35

<b>Figura 11.</b> Aspecto de las diferentes formulaciones líquidas de <i>R. minuta</i> después de un mes de almacenamiento a 4 °C.	36
<b>Figura 12.</b> Vida de anaquel de formulaciones líquidas de <i>R. minuta</i> en función de la concentración de glicerol % (p/v)-xantana 5 g/L y almacenamiento a 4 °C.	37
<b>Figura 13.</b> Efecto de la concentración de UFC sobre la vida de anaquel de las formulaciones de <i>R. minuta</i> almacenadas a 4 °C.	40
<b>Figura 14.</b> Vida de anaquel de las formulaciones líquidas de <i>R. minuta</i> con 10 <sup>9</sup> UFC/mL iniciales, almacenadas a 4 °C.	42
<b>Figura 15.</b> Crecimiento de una mancha de antracnosis en un fruto de mango.	44
<b>Figura 16.</b> Frecuencia relativa de manchas de antracnosis en un fruto de mango durante 4 días de evaluación.	44
<b>Figura 17.</b> Área afectada por antracnosis en un fruto.	45
<b>Figura 18.</b> Desarrollo de antracnosis en función del tiempo de almacenamiento.	45
<b>Figura 19.</b> Frecuencia relativa del diámetro de las manchas de antracnosis en una población de 10 de frutos de mango en función del tiempo.	47
<b>Figura 20.</b> Crecimiento de manchas de antracnosis en diferentes frutos de mango.	48
<b>Figura 21.</b> Frecuencia acumulada del área de las manchas de antracnosis en una población de 10 de frutos de mango en función del tiempo.	48
<b>Figura 22.</b> Área (%) con antracnosis con respecto a la superficie total del fruto en función del tratamiento.	51

## Índice de figuras

### RESUMEN

<b>1</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1.1.	La antracnosis del mango	1
1.2.	Aspectos críticos del control biológico	2
1.3.	Formulación de agentes de control biológico	3
1.4.	<i>Rhodotorula minuta</i> como agente de control biológico	4
<b>2</b>	<b>ANTECEDENTES</b>	<b>6</b>
2.1.	Formulación de agentes de control biológico	6
2.2.	Tipos de formulaciones para agentes de control biológico	6
2.3.	Formulaciones sólidas	7
2.4.	Formulaciones líquidas	7
2.5.	Aspectos importantes para la formulación de agentes de control biológico	8
2.6.	Formulación para levaduras como agentes de control biológico	10
2.7.	Formulación de <i>R. minuta</i>	11
2.8.	La antracnosis del mango	13
2.9.	Ciclo de la enfermedad	13
2.10.	Síntomas de antracnosis en el mango	15
2.11.	Evaluación de la severidad de antracnosis <i>in vivo</i>	15
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>19</b>
<b>4</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>20</b>

4.1.	Estrategia experimental	20
4.2.	Cultivo para la producción de biomasa de <i>R. minuta</i>	20
4.3.	Recuperación de biomasa y resuspensión en amortiguador de fosfatos	21
4.4.	Preparación y caracterización de las formulaciones con glicerol, xantana o glicerol-xantana	22
4.5.	Sistema de análisis de imágenes para la evaluación cuantitativa de antracnosis en frutos de mango	25
4.6.	Proyección bidimensional de la superficie del mango	28
4.7.	Bioensayos en frutos de mango	30
4.8.	Desinfección superficial de los frutos de mango	31
4.9.	Almacenamiento de los frutos	31
4.10.	Cultivos para la obtención de conidios <i>C. gloeosporioides</i>	31
4.11.	Preparación de la suspensión del agente de control biológico	31
4.12.	Evaluación del desarrollo de la antracnosis	32
4.13.	<i>R. minuta</i> como tratamiento de control biológico poscosecha	32
<b>5</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>34</b>
5.1.	Formulación de <i>R. minuta</i>	34
5.2.	Actividad de agua en función de la concentración de glicerol en las soluciones	34
5.3.	Viscosidad de las soluciones en función de la concentración de glicerol y de xantana	34
5.4.	Vida de anaquel de la formulación de <i>R. minuta</i>	37
5.5.	Evaluación de la severidad de la antracnosis del mango por análisis de imágenes	42
5.6.	Desarrollo de la enfermedad	43
5.7.	<i>R. minuta</i> como tratamiento de control biológico poscosecha	49
<b>6</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>52</b>

<b>7</b>	<b>PERSPECTIVAS</b>	<b>53</b>
<b>8</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>54</b>
Anexo 1		61
Anexo 2		63
Anexo 3		64
Anexo 4		67
Anexo 5		69

## RESUMEN

En el desarrollo de sistemas de control biológico, uno de los principales obstáculos ha sido obtener formulaciones que conserven la viabilidad y la eficacia de antagonismo del agente de control biológico durante periodos de tiempo prolongados. Por otra parte, una limitante metodológica importante ha sido la cuantificación de la severidad de enfermedades poscosecha de una forma precisa y objetiva. En este trabajo se evaluaron los aspectos de formulación y de evaluación de la severidad de la enfermedad poscosecha. Como modelo de estudio se usó la levadura *Rhodotorula minuta*, la cual ha sido reportada como agente de control biológico de la antracnosis que causa el hongo *Colletotrichum gloeosporioides* en el cultivo de mango.

El desarrollo de la formulación de *R. minuta* se basó en la disminución de la actividad de agua ( $a_w$ , con la adición de glicerol) y en el incremento de la viscosidad ( $\eta$ , con la adición xantana) del medio de formulación, con el objetivo de conservar la viabilidad de la levadura y la suspensión de su biomasa durante el almacenamiento. El glicerol y la xantana se adicionaron a una solución amortiguadora a base de sales de fosfato. Las concentraciones de glicerol estuvieron entre 20 y 80 % (p/v), las de xantana entre 1 y 5 g/L, y se evaluaron formulaciones con todas las posibles combinaciones glicerol-xantana (20 en total). La concentración celular inicial en las formulaciones se ajustó a  $10^{10}$  UFC/mL. Después de un mes de almacenamiento a 4 °C se observó que las formulaciones con  $\eta$  mayor a 60 (cp), evitaron la sedimentación de biomasa de *R. minuta*. Por lo tanto, para evaluar la vida de anaquel (a 4 °C) de las formulaciones, se seleccionaron 3 condiciones: 20, 40 y 60 % de glicerol en mezcla con 5 g/L de xantana, que correspondieron a valores de  $a_w$  de 0.980, 0.905 y 0.793, respectivamente. La viabilidad de las células (al término de dos meses de almacenamiento) disminuyó drásticamente: 4 órdenes de magnitud para el caso de  $a_w \geq 0.905$  y de 9 órdenes de magnitud para  $a_w < 0.905$ . Posteriormente, se comparó la vida de anaquel de formulaciones con glicerol (20 %p/v), xantana (5 g/L), glicerol (20 % p/v)-xantana (5 g/L) o únicamente el amortiguador de fosfatos con *R. minuta* en dos concentraciones iniciales:  $10^{10}$  y  $10^9$  UFC/mL. Se encontró que, en todas las condiciones de formulación con *R. minuta* en  $10^{10}$  UFC/mL, la viabilidad de la levadura disminuyó rápidamente (3-4 órdenes de magnitud después de un mes de almacenamiento). Sin embargo, formulando con una concentración inicial de  $10^9$  UFC/mL, la viabilidad prácticamente no cambió después de 30 días de almacenamiento a 4 °C. La actividad de agua por la presencia de glicerol 20 % (p/v) en este formulado, evitó la contaminación por bacterias y permitió recuperar aproximadamente  $1 \times 10^7$  UFC/mL a los 6 meses de almacenamiento a 4 °C.

Para la evaluación de la severidad de la enfermedad, se aplicó un sistema de análisis de imágenes que permitió llevar a cabo la reconstrucción de una imagen bidimensional y con la corrección geométrica de ésta, obtener digitalmente la proyección cartográfica de la superficie total del fruto. Mediante las cartografías obtenidas fue posible seguir el crecimiento de manchas individuales en cada fruto, el área afectada por antracnosis con respecto a la superficie total del fruto analizado, la distribución de tamaños de manchas de cada fruto y el desarrollo de la enfermedad en la población de frutos del bioensayo de forma cuantitativa, precisa y detallada.



# 1 INTRODUCCIÓN

## 1.1. La antracnosis del mango

El mango es una de las frutas tropicales más apreciadas y populares, además de ser la más importante en el comercio Internacional. Los países cercanos al ecuador y a los trópicos son los mayores exportadores del fruto, siendo México el principal exportador de mango en el mundo, participando con el 33 % de la exportación mundial, seguido de Brasil, Pakistán, Filipinas y la India (Mora *et al.*, 2002). En México se cultivan cerca de 150,000 hectáreas de mango, de las cuales 38,000 son las proveedoras para exportación, cuyo principal destino es Estados Unidos (66 % del mango que entra a E. U. se produce en México). La producción que se destina a la exportación está concentrada en nueve estados del país, los cuales son: Campeche, Colima, Chiapas, Guerrero, Jalisco, Michoacán, Nayarit, Oaxaca y Sinaloa (Mora *et al.*, 2002).

En el caso del mango, la enfermedad más común en etapa de poscosecha es la antracnosis, ocasionada por el hongo *Colletotrichum gloeosporioides* en condiciones de alta temperatura y humedad relativa (Bósquez *et al.*, 1996). Los tratamientos precosecha para el control de antracnosis involucran la aspersion mensual de fungicidas como el oxiclورو de cobre ya sea solo o bien alternado con *Mancozeb* o *Benomil* (Sanders *et al.*, 2000). Sin embargo, en 1990, el uso de *Benomil* para el tratamiento poscosecha de fruta de mango fue restringido en Sudáfrica (principal zona de producción de mango en el mundo) debido a la aparición de cepas de *C. gloeosporioides* resistentes a este químico (Sanders *et al.*, 2000). En países tales como Japón, no permiten residuos de ningún fungicida sobre fruta importada (Rodney, 1994) y la aplicación de fungicidas químicos está totalmente restringido. Antes del empaque de la fruta, ésta debe ser sometida a un tratamiento de inmersión en agua caliente, el cual es el único actualmente aprobado por el Departamento de Agricultura de los E. U. A. en la etapa de poscosecha. Este tratamiento es una medida cuarentenaria para que la fruta vaya libre de huevos o larvas de mosca de la fruta antes de entrar a Estados Unidos (INIFAP, 1996). En México, el tratamiento poscosecha usado comúnmente para reducir la antracnosis del mango es la inmersión de los frutos en agua caliente (tratamiento hidrotérmico, 55 °C/ 5 min), en ocasiones con la incorporación de *Benomil* (INIFAP, 1996; INIFAP, 2002). Sin embargo, el uso continuo de

químicos puede generar la resistencia del patógeno (Spalding, 1982), daños al medio ambiente y a la salud humana por la presencia de residuos tóxicos, limitando también sus posibilidades de exportación.

## 1.2. Aspectos críticos del control biológico

En los últimos 15 años, el control biológico ha sido una importante alternativa ante el uso de plaguicidas altamente tóxicos que son utilizados para controlar las enfermedades y las plagas que afectan a las plantas y puede aplicarse tanto en la etapa precosecha como en la poscosecha de los cultivos. Actualmente, varios productos formulados para el biocontrol de fitopatógenos y/o promotores del crecimiento de plantas que inducen las defensas de la planta hospedera son comercializados en Estados Unidos (<http://www.oardc.ohio-tate.edu/apsbcc/productlist.htm>).

Los microorganismos que son utilizados como agentes de control biológico actúan mediante varios mecanismos de antagonismo: parasitismo, antibiosis, competencia por espacio/nutrientes o induciendo la resistencia del organismo hospedero al patógeno. Estos mecanismos generalmente afectan el crecimiento u otras actividades metabólicas de otros microorganismos y han sido aprovechados para el control biológico de un amplio rango de fitopatógenos causantes de problemas en muchos cultivos de importancia comercial (Paulitz y Bélanger, 2001; Inglis y Kawchuck, 2002; Janisiewicz y Korsten, 2002). Algunas de las características deseables de un antagonista que se pretende sea utilizado como agente de control biológico son (Wisniewski y Wilson, 1992):

- Alta eficacia en bajas concentraciones
- Estabilidad genética
- Mínimos requerimientos nutricionales
- Habilidad para sobrevivir a condiciones ambientales adversas
- Eficaz contra un amplio rango de fitopatógenos en diferentes variedades de frutas y vegetales
- Facilidad para crecer en medios de crecimiento de bajo costo
- Facilidad de formulación con una larga vida de anaquel

- Facilidad de manejo
- Inocuo a la salud humana
- Resistente a plaguicidas
- Compatibilidad con los procesos comerciales
- No patógeno

Para el desarrollo de sistemas de control biológico es necesario que, una vez seleccionado el agente antagonista a usar en contra del patógeno, se lleve a cabo el desarrollo del proceso para su producción y formulación así como pruebas en campo para evaluar su eficacia de biocontrol. Otros aspectos como el uso de mezclas de antagonistas, la manipulación fisiológica de los antagonistas, aplicaciones pre y poscosecha de los antagonistas e integración del control biológico con otros métodos para el control de enfermedades en plantas, han sido objeto de estudio (Janisiewicz y Korsten, 2002).

Varios grupos de trabajo han publicado estudios sobre el efecto de los sistemas de producción y formulación sobre el desempeño de los agentes de control biológico para enfermedades pre y poscosecha en condiciones semi-comerciales o comerciales (Pusey y Wilson, 1984; Korsten *et al.*, 1997; Viñas *et al.*, 1998; Abadias *et al.*, 2000; Abadias *et al.*, 2001; Helbig, 2001; Usall *et al.*, 2001; Patiño-Vera *et al.*, 2001; Patiño *et al.*, 2002; Abadias *et al.*, 2003; Torres *et al.*, 2003). Sin embargo, el principal obstáculo para la comercialización de los productos para control biológico ha sido obtener formulaciones que conserven la viabilidad y la eficacia de antagonismo del agente de control biológico durante largos periodos de tiempo (Emmert y Handelsman, 1999; Koch, 1999; Janisiewicz y Korsten, 2002).

### **1.3. Formulación de agentes de control biológico**

La eficacia de un producto de biocontrol está determinada principalmente por tres factores (Koch, 1999): las propiedades biológicas del agente de control biológico, el número de células viables y las propiedades de la formulación. La formulación es el procedimiento mediante el cual el agente biológico (una vez producido por fermentación), se logra conservar viable y en una presentación que facilite su aplicación y generalmente involucra la incorporación del

antagonista a un vehículo o un soporte inerte. En la formulación, los microorganismos son sometidos a un estado de latencia y son protegidos contra condiciones ambientales que pueden impactar negativamente su viabilidad. Las funciones del vehículo o material de soporte son estabilizar al microorganismo durante la preparación, distribución, almacenamiento y la aplicación final. Un buen vehículo o soporte debe tener características químicas y físicas que permitan su fácil manejo, no ser tóxico ni contaminante; ser biodegradable y que sea un producto que garantice una vida de anaquel del producto lo más prolongada posible. El soporte o vehículo puede ser sólido o líquido y puede estar constituido de una variedad de aditivos como viscosificantes, agentes suspendedores, sólidos inertes, entre otros. La forma de aplicación puede ser en polvo, gránulos, o bien en suspensión líquida (Bashan, 1998). Por lo general, las formulaciones se seleccionan considerando el tipo de aplicación. Las formulaciones para aspersión pueden ser polvos humectables o concentrados emulsificables y en ocasiones contienen aditivos que incrementan su adhesión a la planta, lo que permite que el antagonista esté el tiempo suficiente para que desarrolle su actividad antagónica hacia el patógeno, evitando así la enfermedad de la planta (Matthews, 1992).

#### **1.4. *Rhodotorula minuta* como agente de control biológico**

La levadura *R. minuta* ha sido reportada como agente de control biológico (Juárez, 2001; Carrillo, 2003) como una alternativa al uso de químicos para el control de antracnosis en mango. En ensayos *in vitro* se demostró de manera cualitativa que el mecanismo de antagonismo de *R. minuta* contra *C. gloeosporioides* es el de competencia por espacio, en cultivos duales se observó que el micelio del fitopatógeno no creció en la superficie que abarcó el crecimiento de la levadura (Jiménez, 2002). La actividad antagónica que se ha observado con especies del género *Rhodotorula* contra hongos fitopatógenos se ha definido como competencia por espacio y/o nutrientes, y se ha demostrado que está relacionado con la producción de sideróforos. Los sideróforos son compuestos de bajo peso molecular que tienen alta afinidad por iones hierro y que las levaduras de este género secretan cuando crecen en medios limitados de hierro (Calvente *et al.*, 1999). De esta forma las células compiten por el hierro presente en el ambiente, solubilizándolo en un complejo sideróforo-Fe<sup>2+</sup>, que les permite transportar este nutriente al interior de la célula para incorporarlo a su metabolismo. En bioensayos llevados a cabo en manzanas poscosecha, se ha demostrado que la presencia de ácido rhodotorulico sintetizado (en

condiciones de limitación de hierro) por cepas de *Rhodotorula*, limita el crecimiento micelial y la germinación de hongos fitopatógenos como *P. expansum* y *B. cinerea* (Calvente *et al.*, 1999; Calvente *et al.*, 2001). Los procesos de producción y formulación (prototipo) de este antagonista de *C. gloeosporioides* ya han sido evaluados a nivel de planta piloto (Jiménez, 2002). Jiménez (2002) reportó que un concentrado celular de *R. minuta* (con  $6 \times 10^9$  UFC/mL iniciales) en amortiguador de fosfatos permitía recuperar  $1 \times 10^7$  UFC/mL hasta el cuarto mes de almacenamiento en refrigeración (4 °C). Sin embargo, en esa formulación prototipo se observó la sedimentación de biomasa de *R. minuta* en el fondo del recipiente que la contenía y contaminación por agentes microbianos. La contaminación por agentes microbianos es un factor que puede impactar negativamente la viabilidad del agente de control biológico y acortar su vida de anaquel. Existe poca información disponible referente a aspectos de formulación para levaduras como agentes de control biológico. Por lo tanto, para continuar con el desarrollo de la formulación líquida de *R. minuta*, en este trabajo la propuesta fue disminuir la  $a_w$  del medio de formulación evaluado por Jiménez (2002) mediante la adición de glicerol, con el objetivo de reducir el metabolismo celular y usar goma xantana como viscosificante, para mantener en suspensión las células de la levadura en la formulación durante el almacenamiento.

*R. minuta* ya ha sido evaluada experimentalmente para el control de antracnosis en huertos de mango en Culiacán, Sinaloa, en etapa de precosecha y en condiciones comerciales de almacenamiento poscosecha (Patiño *et al.*, 2002; Carrillo, 2003). Carrillo (2003) encontró que *R. minuta* como agente de control biológico es eficaz para el control de antracnosis en mango en concentración de  $10^8$  UFC/mL, y que cuando es aplicada en mezcla con *B. subtilis*, estos agentes de control biológico son eficaces a razón de  $10^6$  y  $10^4$  UFC/mL para la levadura y la bacteria, respectivamente. Sin embargo, la severidad de antracnosis se ha evaluado utilizando como referencia una escala de niveles de severidad en función del tamaño de las manchas en los frutos (Smoot y Segall, 1963; Juárez, 2001; Carrillo, 2003). La información que se genera es el resultado de las observaciones y la experiencia de los evaluadores y se trata más bien de resultados que no son del todo objetivos y precisos. Por lo tanto, en este trabajo y con el fin de contar con herramientas para la evaluación de la enfermedad se aplicó un sistema de adquisición y análisis de imágenes para llevar a cabo el seguimiento del desarrollo de antracnosis y cuantificar en forma objetiva y precisa el área afectada por esta enfermedad en los frutos.

## 2 ANTECEDENTES

### 2.1. Formulación de agentes de control biológico

Para la formulación de agentes de control biológico se deben considerar diferentes aspectos. Después del proceso de producción (por cultivo en medio sólido o líquido) del agente de control biológico, la cosecha es el primer paso del proceso de formulación. En esta etapa generalmente se busca reducir el volumen del material que va a ser formulado. La siguiente etapa consiste en estabilizar al agente de control biológico en un medio de formulación (líquido o sólido). El objetivo de la estabilización es evitar el crecimiento y la pérdida de la viabilidad del agente de control biológico durante el transporte y almacenamiento del producto formulado. El medio de formulación también debe evitar el crecimiento de microorganismos contaminantes que puedan afectar la viabilidad del agente de control biológico. Las funciones básicas de los aditivos para la formulación son (Jones y Burges, 1998):

- Proteger al agente biológico de daños por factores ambientales adversos durante la distribución, el almacenamiento y la aplicación en campo.
- Facilitar el manejo y la aplicación del producto.
- Mejorar la actividad del microorganismo en el sitio de acción a través de incrementar su actividad, reproducción, contacto o interacción con el patógeno o plaga.

### 2.2. Tipos de formulaciones para agentes de control biológico

Para agentes de control biológico existen formulaciones sólidas (polvos o gránulos) y líquidas (suspensiones a base de agua, emulsiones agua-aceite o incluso agua-solvente orgánico). La elección del tipo de la formulación depende de varios factores, tales como la especie del microorganismo a formular, el tipo y localización de la plaga o patógeno, de la disponibilidad



de los materiales requeridos para la formulación, así como del equipo para su aplicación. Para la aplicación del producto, ya sea sólido o líquido, hay que asegurar que las propiedades de la formulación (*i.e.* tamaño de partícula, viscosidad del líquido) permitan su fácil manejo con los equipos de uso común en el campo (Jones y Burges, 1998).

### 2.3. Formulaciones sólidas

#### *Polvos*

Existen polvos para aplicación en seco sobre semillas y polvos humectables para aplicación como suspensión en agua. Son elaborados a base de vehículos o acarreadores inertes, generalmente minerales como arcillas o silicatos. Estos polvos tienen tamaño de partícula de 5-30  $\mu\text{m}$ . En ocasiones se requiere de la incorporación de aditivos que favorecen su adhesión sobre la superficie deseada (Matthews, 1992; Jones y Burges, 1998).

#### *Gránulos, pastillas, cápsulas y bloques*

Los acarreadores pueden ser arcillas, polímeros de almidón, fertilizantes en seco o residuos vegetales. La elección del acarreador depende (entre otros factores) de su desintegración en el agua. Este tipo de formulaciones, libera paulatinamente al agente de control biológico. Su tamaño va de 80-250  $\mu\text{m}$  para los gránulos, de varios cm para las pastillas y los bloques (Matthews, 1992; Jones y Burges, 1998).

#### *Polvos humectables*

Son polvos que se mezclan con agua justo antes de su aplicación. Estos polvos tienen tamaño de partícula de 5-30  $\mu\text{m}$ , o en su defecto deben pasar por una malla de 44  $\mu\text{m}$ . En este tipo de formulaciones, entre el 50 y el 80 % es la materia a formular; entre el 15 y el 45 % del formulado consiste de un acarreador inerte e hidrofílico fácilmente soluble en agua; del 1-10 % está constituido por un mineral (como silicato) para prevenir la formación de grumos y favorecer la fluidez al momento de la incorporación de la formulación en el agua y el 3-5 % es un dispersante, el cual neutraliza las interacciones atractivas entre las partículas, lo cual favorece la

uniformidad de la suspensión. En estos productos, también se requiere de la adición de un surfactante que permita reducir la tensión superficial en la interface líquido-sólido, para facilitar la incorporación del polvo al agua (Matthews, 1992; Jones y Burges, 1998).

## 2.4. Formulaciones líquidas

### *Suspensiones concentradas*

En este tipo de formulación, el material a formular representa entre el 10-40 % del volumen y requiere de la incorporación de 1-3 % de dispersante, 3-8 % de surfactante y de 35-65 % de acarreador líquido (agua o aceite). Debe evitarse la sedimentación de los sólidos durante el almacenamiento del producto, para lo cual pueden usarse arcillas coloidales, gomas (polisacáridos), celulosa o polímeros sintéticos que incrementen la viscosidad de la formulación. Es importante que la viscosidad de estas suspensiones permita su fácil manejo al momento de la aplicación (Jones y Burges, 1998).

### *Emulsiones*

En las emulsiones, el aceite es la fase dispersa y el líquido en el cual está suspendido (agua) es la fase continua; en las emulsiones invertidas sucede lo contrario (agua en aceite). En ambos tipos de emulsiones, se requiere de aditivos surfactantes para formar una emulsión homogénea y mantenerla estable (evitar la sedimentación de sólidos) durante su almacenamiento y en el tanque de mezclado antes de su aplicación (Jones y Burges, 1998).

## 2.5. Aspectos importantes para la formulación de agentes de control biológico

En el formulado, los microorganismos son sometidos a un estado de latencia y son protegidos contra condiciones que pueden afectar negativamente su viabilidad (*i.e.* temperatura, humedad relativa, contaminación). La forma más común de someter a un organismo a estado de latencia, natural o artificialmente, es a través de la remoción de agua. La disponibilidad de nutrientes, el pH, el oxígeno y la temperatura de almacenamiento son factores que también influyen en la estabilidad de un producto de control biológico (Jin *et al.*, 1995). Las formulaciones de agentes de



control biológico, deben tener una vida de anaquel de entre 1 ó 2 años para ser competitivas con otros productos para el control de plagas o enfermedades de plantas (Jones y Burges, 1998).

El objetivo principal del proceso de formulación es remover suficiente agua de tal forma que los procesos celulares normales (*i.e.* reacciones químicas y/o enzimáticas) se retarden o detengan. Los términos agua libre, agua ligada y agua de reserva, se utilizan para clasificar la localización de las moléculas de agua con respecto a la célula y a sus componentes. El agua libre es agua intercelular y una parte del agua intracelular. El agua ligada es parte del agua intracelular, la cual está directamente en combinación con las proteínas, los ácidos nucleicos, membranas u otras sustancias y es fundamental para su organización estructural. El agua de reserva se encuentra depositada en cavidades formadas por lípidos y otros componentes de la membrana y no debe ser removida de la célula. En términos termodinámicos, la actividad de agua ( $a_w$ ) en un sistema es la relación entre la presión de vapor del agua con solutos con respecto a la presión de vapor del agua pura (sin solutos) (Fraizer y Westhoff, 1993) y se utiliza para representar la porción de agua que está disponible (agua libre) en un sistema para sustentar las reacciones químicas o enzimáticas (Jin *et al.*, 1995). La escala de medición de este parámetro es de 0 (un sistema absolutamente seco) a 1 (agua pura). La  $a_w$  tiene una gran influencia en el crecimiento de los microorganismos: los que más agua requieren son las bacterias (cerca de 1), después las levaduras (>0.88) y finalmente los hongos filamentosos.

La formulación sólida es más común, ya que se ha encontrado que la vida de anaquel es más estable en productos de baja  $a_w$ . Por esta razón, es que la mayor parte de la investigación sobre aspectos de formulación se ha canalizado a establecer métodos para obtener formulaciones sólidas. Actualmente, existen equipos que remueven el agua (deshidratación o secado) por varios medios como el secado al vacío, en horno, por aspersión, por liofilización, por lecho fluidizado y por secado en atmósfera controlada. El proceso ideal para la formulación del microorganismo será aquel que sea altamente eficiente para remover el agua libre de la célula sin dañar su viabilidad (Jin *et al.*, 1995). Cuando la  $a_w$  del medio se desvía del valor óptimo, el cual es específico para cada especie de microorganismo, las células incrementan el gasto de energía para mantener el equilibrio termodinámico y por esta razón es que su capacidad para crecer en esas condiciones se ve afectada (Gervais, 1992).

## 2.6. Formulación para levaduras como agentes de control biológico

Levaduras de los géneros *Candida*, *Cryptococcus*, *Pichia* y *Rhodotorula* han sido reportadas como agentes de control biológico para hongos fitopatógenos de frutos en etapa de poscosecha (Calvente *et al.*, 1991; Chand-Goyal y Spotts, 1996; Krauss *et al.*, 2001). Sin embargo, los antecedentes de formulación son escasos. Generalmente, la liofilización (proceso en el cual el agua se elimina por sublimación) es el método más utilizado para preservar levaduras. Las ventajas de este método son que evita la contaminación del producto liofilizado durante el almacenamiento, mantiene la viabilidad de las células por largos periodos de tiempo y finalmente, que facilita su transporte y almacenamiento. El efecto de la velocidad de congelamiento (decremento de la temperatura por unidad de tiempo) y de sustancias que protegen a las células en el proceso de liofilización, han sido ampliamente estudiados. El principal objetivo ha sido conservar altos porcentajes de viabilidad y la estabilidad de las células fungales sometidas a procesos de liofilización. Sustancias como polímeros, azúcares, albumina, leche, miel, polioles y aminoácidos han sido evaluados como materiales protectores o de soporte para la liofilización (Berny y Hennebert, 1991). Con el uso de materiales de soporte apropiados y de velocidades de congelamiento óptimas, es posible que se conserve entre el 96-98 % de células viables de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* después de un proceso de liofilización (Berny y Hennebert, 1991). Sin embargo, se ha demostrado que levaduras como *Candida sake* son más sensibles que *S. cerevisiae*, aún utilizando las mismas sustancias como protectores, conservando menos del 20% de células viables después de un proceso de liofilización (Abadias *et al.*, 2001). *Candida sake* es un agente de control biológico para hongos fitopatógenos como *Penicillium expansum*, *Botrytis cinerea* y *Rhizopus nigricans*, que afectan manzanas en poscosecha (Viñas *et al.*, 1998). Para esta levadura, se ha evaluado la formulación sólida (Abadias *et al.*, 2001) y la líquida (Abadias *et al.*, 2003), y se ha encontrado que la formulación líquida es la mejor alternativa para mantener su viabilidad durante el almacenamiento. Las células de esta levadura conservaron el 85 % de viabilidad después de un proceso de liofilización para obtener una formulación sólida, pero la eficacia del producto seco contra la infección que causa *P. expansum* en manzanas disminuyó con respecto a la que mostraron las células frescas. La viabilidad de *C. sake* disminuyó más del 10 % después de dos meses de almacenamiento a 4 °C (Abadias *et al.*, 2001).

## 2.7. Formulación de *R. minuta*

La levadura *R. minuta* ha sido reportada como agente de control biológico (Juárez, 2001; Carrillo, 2003) como una alternativa al uso de químicos para el control de antracnosis en mango. Para *R. minuta*, Jiménez (2002) llevó a cabo el estudio de un proceso de fermentación sumergida para la producción de biomasa. En su trabajo, se seleccionó el medio de cultivo (C/N=8) a base de glucosa, sales y enriquecido con extracto de levadura para la producción de la levadura. En ese trabajo, se evaluó un amortiguador a base de sales de fosfatos, solución salina (0.85 % p/v) y agua destilada como medio de resuspensión para el almacenamiento (a 4 °C) de *R. minuta* ( $6 \times 10^9$  UFC/mL). En agua y en la solución salina fue posible recuperar  $7 \times 10^7$  UFC/mL y  $2 \times 10^6$  UFC/mL después de dos meses. Sin embargo, la contaminación por agentes microbianos afectó las evaluaciones de la vida de anaquel de estos formulados prototipo e impidió se llevaran a cabo más allá de los 3 meses de almacenamiento. La resuspensión en el amortiguador de fosfatos permitió recuperar hasta  $1 \times 10^7$  UFC/mL después de cuatro meses de almacenamiento a 4 °C, pero igualmente, la contaminación impidió continuar la evaluación de la vida de anaquel de la levadura en ese medio de preservación. La preservación en agua destilada, solución salina o en soluciones amortiguadoras de pH, son medios de preservación sencillos y económicos (Bueno y Gallardo, 1998) en contraste con otros métodos de preservación. Sin embargo, en el caso de las formulaciones líquidas un importante aspecto a considerar, es que el alto contenido de agua disminuye la estabilidad de los microorganismos. Por esta razón, es necesario utilizar un aditivo cuya función sea reducir la  $a_w$  del medio y así la actividad metabólica de las células para obtener productos para control biológico con una vida de anaquel lo más prolongada posible.

En medios líquidos se han utilizado principalmente azúcares y polioles como aditivos para la reducción de  $a_w$  del medio de formulación, con el fin de disminuir la disponibilidad de agua para las células microbianas (Abadias *et al.*, 2000; Torres *et al.*, 2003; Abadias *et al.*, 2003). La característica polar de éstas moléculas permite establecer puentes de hidrógeno con otras moléculas y por eso son utilizados como reductores de  $a_w$ . Se ha demostrado que para la misma concentración de polioliol, los de bajo peso molecular son mejores como depresores de  $a_w$  que aquellos de alto peso molecular y también son mejores que las sales o los azúcares. Por esta razón, el glicerol ( $C_3H_8O_3$ ; 1,2,3- propanotriol; trihidroxipropano) es un polioliol ampliamente

utilizado para reducir la  $a_w$ . Este compuesto es miscible en agua y alcohol. El glicerol es obtenido de aceites o grasas como un subproducto de la manufactura de detergentes o de ácidos grasos (Ninni *et al.*, 2000).

Otro aspecto a considerar, es que se requiere controlar la viscosidad del líquido para mantener en suspensión las células del agente de control biológico durante el almacenamiento. Generalmente, la goma xantana funciona como coloide hidrofílico para espesar, suspender y estabilizar emulsiones y otros sistemas a base de agua. Las soluciones acuosas de xantana son altamente viscosas en comparación con otras soluciones de polisacáridos preparadas a la misma concentración. La goma xantana es un carbohidrato natural de alto peso molecular producido por la bacteria *Xanthomonas campestris* (Galindo, 1994). Este polisacárido contiene D-glucosa y D-manosa, junto con ácido D-glucurónico. La estructura del polímero está hecha de unidades  $\beta$ -D-glucosa unidas en las posiciones 1-4- (idénticas a la estructura de la cadena principal de la celulosa). Unidas cada tercer glucosa en la posición 3-, se encuentran una rama de trisacárido que consiste de una unidad de ácido glucurónico entre dos unidades de manosa. La rigidez estructural de la molécula produce varias propiedades funcionales peculiares tales como la estabilidad al calor, viscosidad estable en soluciones fuertemente ácidas o básicas y resistencia a la degradación enzimática. La xantana es un polvo color blanco o cremoso, soluble en agua caliente o fría (Brito, *et al.*, 1993; Galindo, 1994; García-Ochoa *et al.*, 2000). La xantana es insoluble en solventes orgánicos pero es soluble en glicerol o en etilen glicol.

Las propiedades de la goma xantana y así como las del glicerol en solución, los hacen útiles como aditivos en un amplio rango de aplicaciones en la industria de alimentos, farmacéutica y cosmética (Brito, *et al.*, 1993; Galindo, 1994; García-Ochoa *et al.*, 2000; Ninni *et al.*, 2000).

En este trabajo se evaluaron los aspectos de formulación utilizando como modelo de estudio la formulación líquida de *R. minuta* como agente de control biológico. El desarrollo de la formulación líquida de *R. minuta*, se basó en la disminución de la actividad de agua ( $a_w$ , con la adición de glicerol) y en el incremento de la viscosidad ( $\eta$ , con la adición xantana) del medio de formulación reportado por Jiménez (2002), con el objetivo de conservar la viabilidad de la levadura y la suspensión de su biomasa durante el almacenamiento.

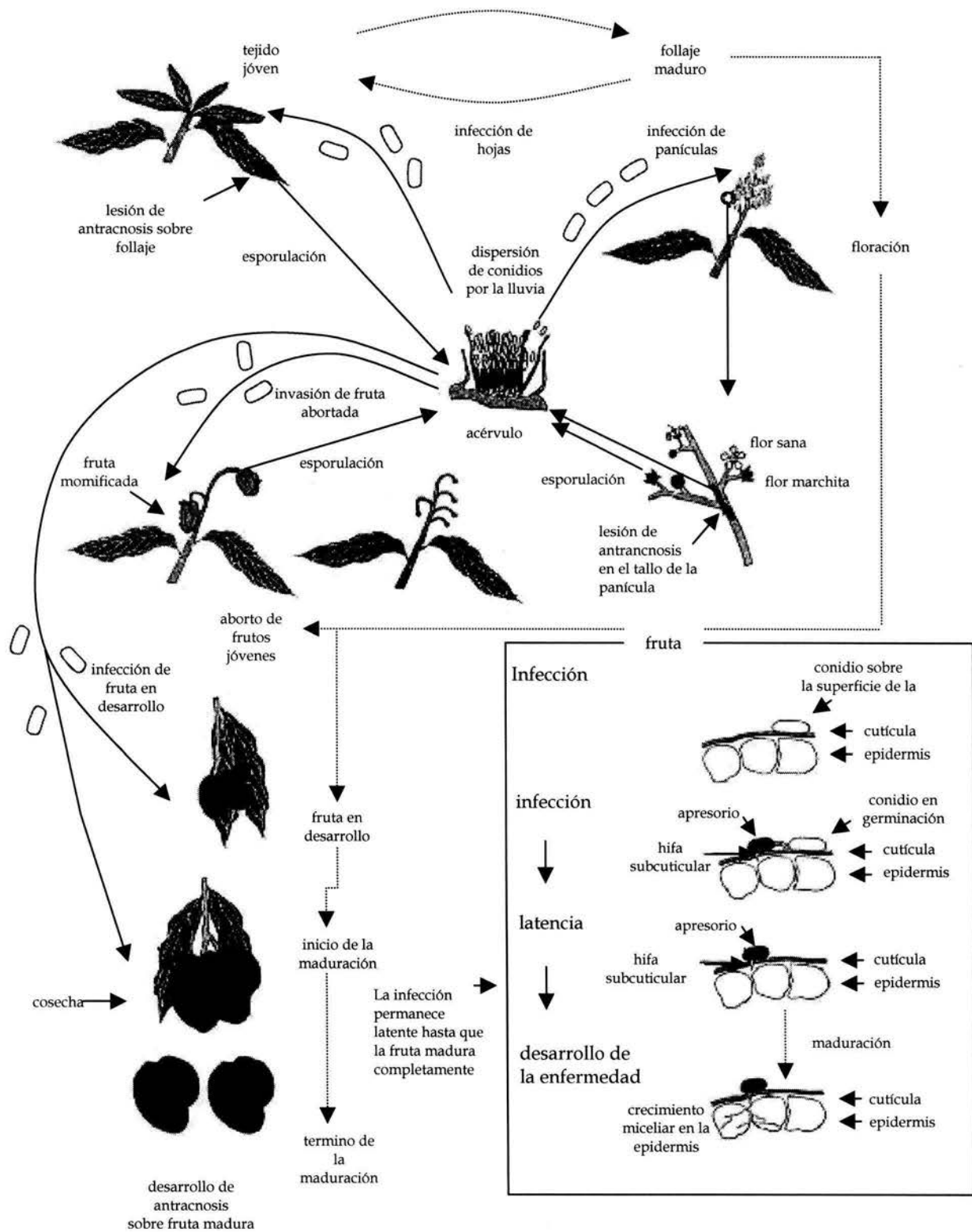
## 2.8. La antracnosis del mango

La antracnosis es una enfermedad de las plantas causada por hongos del género *Colletotrichum*, los cuales son considerados, a nivel mundial, como los principales patógenos de cultivos en poscosecha, por el daño que causan a los frutos de cultivos tropicales y subtropicales durante su almacenamiento (Freeman *et al.*, 1998). En el caso del mango (*Mangifera indica*), la antracnosis es la enfermedad más común, ocasionada por *Colletotrichum gloeosporioides* en condiciones de alta temperatura y humedad relativa (Bósquez *et al.*, 1996; Prusky, 1996; Arauz, 2000). La enfermedad es controlada con aplicaciones de fungicidas en tratamientos pre y poscosecha. El tratamiento poscosecha más comúnmente usado la inmersión de los frutos en agua caliente a 51 °C por 15 minutos o bien entre 54.4 y 55.8 °C por 5 minutos, así como el uso de fungicidas (INIFAP, 1996; INIFAP, 2002; Arauz, 2000). Sin embargo, el uso continuo de químicos puede generar la resistencia del patógeno (Spalding, 1982), daños al medio ambiente y a la salud humana por la presencia de residuos tóxicos, limitando también sus posibilidades de exportación. Países como Japón no permiten residuos de ningún fungicida sobre fruta importada (Rodney, 1994). Antes del empaque de la fruta, ésta debe ser sometida al tratamiento con agua caliente, que es actualmente el único aprobado por el Departamento de Agricultura de los E. U. A. Este tratamiento es una medida cuarentenaria para que la fruta vaya libre de huevos o larvas de mosca de la fruta antes de entrar a Estados Unidos (INIFAP, 1996) pero no para el control de antracnosis.

## 2.9. Ciclo de la enfermedad

En el campo, *Colletotrichum gloeosporioides* produce conidios sobre las lesiones en hojas, panículas y frutas momificadas. Los conidios pueden dispersarse con la lluvia hacia otras hojas o flores y causar infecciones secundarias, de tal forma que la enfermedad es policíclica en estos órganos. La fruta en desarrollo puede ser infectada y perdida en la precosecha. En el caso de la antracnosis poscosecha, la fruta en desarrollo se infecta en el campo pero las infecciones permanecen latentes hasta que la fruta madura, lo cual ocurre después de la cosecha. Una vez que inicia el periodo climatérico de la fruta, las manchas comienzan a desarrollarse (**figura 1**). No hay infección de fruta a fruta a menos que haya una fuente potencial de inóculo (*i.e.* frutos con lesiones de antracnosis con esporas de hongo).





**Figura 1.** Antracnosis en mango (adaptado de Arauz, 2000). Las líneas sólidas representan el ciclo de desarrollo de la infección. Las líneas punteadas representan la fenología (etapas del desarrollo) de los frutos de mango.

## 2.10. Síntomas de antracnosis en el mango

*Colletotrichum gloeosporioides* forma apresorios (estructuras de infección) y sintetiza enzimas que le permiten penetrar el tejido vegetal así como la asimilación de nutrientes obtenidos del mismo (Kahmann y Basse, 2001). Los síntomas se pueden presentar en las inflorescencias, ramas y en frutos jóvenes y maduros. En las hojas, la infección se manifiesta por la presencia de manchas pequeñas de color café oscuro, que posteriormente se alargan y convergen para formar manchas más grandes. La fruta infectada, a menudo madura prematuramente y, en estados avanzados de la infección, aparecen manchas negras, que aumentan de tamaño con el tiempo, pudriendo el fruto. La infección puede permanecer latente en la fruta inmadura, que tiene una apariencia sana hasta la cosecha pero la enfermedad se desarrolla rápidamente durante la maduración y se evidencia en el almacenamiento y en el curso de la comercialización (Bósquez *et al.*, 1996, Prusky, 1996; Arauz, 2000) lo cual afecta su precio en el mercado.

## 2.11. Evaluación de la severidad de antracnosis *in vivo*

Típicamente, la incidencia y severidad de las enfermedades poscosecha se evalúa de una forma cualitativa a través de observaciones del desarrollo de la infección en el fruto o vegetal. Los evaluadores implementan las escalas de niveles de severidad de antracnosis para determinar la eficacia de los tratamientos aplicados para el control de la enfermedad. La información se genera rápidamente pero depende de escalas arbitrarias y de la experiencia del observador y, en consecuencia, tiene baja precisión y reproducibilidad. En el caso del mango, la severidad de antracnosis se ha reportado en función del tamaño de las manchas (Smoot y Segall, 1963; Juárez, 2001; Carillo, 2003) o del número de manchas (Koomen y Jeffries, 1993). La justificación para el uso de este tipo de escalas, es que son una mejor alternativa para la evaluación del desarrollo (*i.e.* crecimiento radial) del patógeno que las evaluaciones en ensayos *in vitro* (*i.e.* ensayos de antagonismo en cultivos duales, antagonista-patógeno), en los cuales, los resultados no siempre coinciden con los encontrados en ensayos *in vivo*.

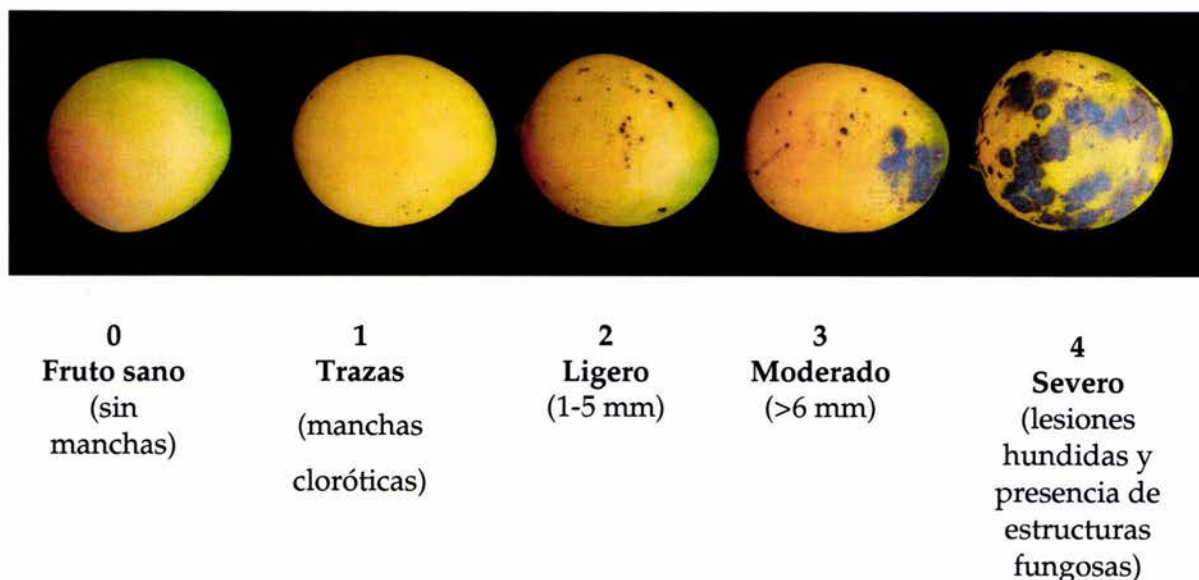
Por ejemplo, en los bioensayos desarrollados por Koomen y Jeffries (1993), la severidad de antracnosis se evaluó en frutos de mango (10 frutos por tratamiento y cada tratamiento con 3 réplicas) después de un periodo de almacenamiento de 10 días, con la siguiente escala: el nivel 1

correspondió a frutos sin manchas, el nivel 2 para frutos con 1-3 manchas, el nivel 3 con 4-6 manchas, el nivel 4 con 7-12 y el nivel 5 con más de 12 manchas en la superficie del fruto. La diferencia entre los tratamientos fue determinada por análisis de varianza a un nivel de significancia de  $P=0.05$ . El otro caso es la evaluación de la severidad de antracnosis con la escala que originalmente reportaron Smoot y Segall (1963), la cual que consiste en agrupar a los mangos (10 frutos por cada tratamiento a evaluar y cada tratamiento por triplicado) en niveles de severidad de antracnosis en función del tamaño de las manchas de antracnosis después de dos semanas de almacenamiento. En esta escala, en el nivel 1 se agrupan frutos con trazas de antracnosis (manchas <1 cm), el nivel 2 a frutos con síntomas ligeros (manchas de tamaño 1-2 cm), el nivel 3 a frutos con daño ligero (manchas 2-3 cm) y el nivel 4 a frutos con daño severo (manchas >3 cm). Los resultados se reportan como el promedio de severidad de antracnosis y los frutos de las dos últimas categorías se consideran no comercializables.

Sin importar qué escala sea utilizada para la evaluación de la severidad de antracnosis, el área total del fruto realmente afectada por antracnosis se desconoce. Por ello, la aplicación de diferentes criterios de evaluación podría generar conclusiones erróneas o incluso contradictorias. El problema radica en que es posible encontrar frutas con muchas manchas pequeñas u otras con solo una mancha de gran tamaño, y es probable que la misma fruta sea clasificada en diferente nivel de severidad dependiendo del criterio de evaluación.

Por otra parte, la falta de información permite que se hagan modificaciones a los métodos de evaluación existentes, sin aún haberlos validado o estandarizado. Por ejemplo, Juárez (2001) y Carrillo (2003) modificaron la escala de Smoot y Segall considerando tamaños mucho menores de manchas de antracnosis (**figura 2**). De la misma forma, la restricción para la comercialización de los frutos aplica a los niveles 3 y 4. Los datos obtenidos de la evaluación (30 frutos por tratamiento) generalmente no tienen distribución normal de la varianza y por lo tanto la estadística que se aplica es no paramétrica.





**Figura 2.** Escala hedónica reportada por Carrillo (2003).

La prueba que se aplica normalmente es un análisis de varianza de dos clasificaciones por rangos de Friedman. En esta prueba, los datos de  $k$  muestras están arreglados en una escala de medida ordinal. La prueba es útil para probar la hipótesis nula de que  $k$  muestras han sido obtenidas de la misma población, determinar la probabilidad de que las muestras procedan de la misma población, así como si la diferencia es significativa entre los tratamientos evaluados (Zar, 1999a).

Con este tipo de evaluaciones, la clasificación del fruto en el nivel de la escala, se debe a la experiencia de los evaluadores en la observación de manchas en los frutos y los resultados que se generan son principalmente cualitativos y subjetivos. Posteriormente, los datos resultantes de las evaluaciones con el uso de escalas hedónicas (cualitativas), se desarrolla el análisis estadístico y así se han propuesto diferentes tratamientos para el control de antracnosis en mango (Koomen y Jeffries, 1993; Carrillo, 2003).

En el desarrollo de sistemas de control biológico, el principal obstáculo ha sido obtener formulaciones que conserven la viabilidad y la eficacia de antagonismo del agente de control biológico durante largos periodos de tiempo. En este trabajo se evaluaron los aspectos de

formulación y de evaluación de severidad de la enfermedad usando como modelo de estudio a la levadura *Rhodotorula minuta*, la cual ha sido reportada como un agente de control biológico de la antracnosis que causa el hongo *Colletotrichum gloeosporioides* en el cultivo de mango.

Para *R. minuta*, no existen patentes que la reporten como agente de control biológico para antracnosis en mango, sin embargo, ya existen estudios referentes al aspectos del proceso de producción y de formulación (prototipo) de su biomasa, así como de pruebas de su eficacia como agente de control biológico para el control de antracnosis en cultivos de mango. En este trabajo se propone evaluar la vida de anaquel de la formulación líquida de *R. minuta* en amortiguador de fosfatos, con la adición de glicerol, con el objetivo principal de reducir el metabolismo celular, al disminuir la  $a_w$  del medio y usando también goma xantana como viscosificante, para mantener en suspensión las células de la levadura durante el almacenamiento. Por otra parte, ante la falta de un procedimiento estandarizado para evaluar y generar datos objetivos y cuantitativos de la severidad de antracnosis, en este trabajo se propone el uso de un sistema de análisis de imágenes para la evaluación (en laboratorio) de manchas de antracnosis en frutos poscosecha.

### 3 OBJETIVOS

- Evaluar soluciones con diferente actividad de agua ( $a_w$ ) y viscosidad para la formulación líquida del agente de control biológico *R. minuta*.
- Aplicar un sistema de análisis de imágenes para la evaluación objetiva y cuantitativa de manchas de antracnosis.

## 4 MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1. Estrategia experimental (figura 3)

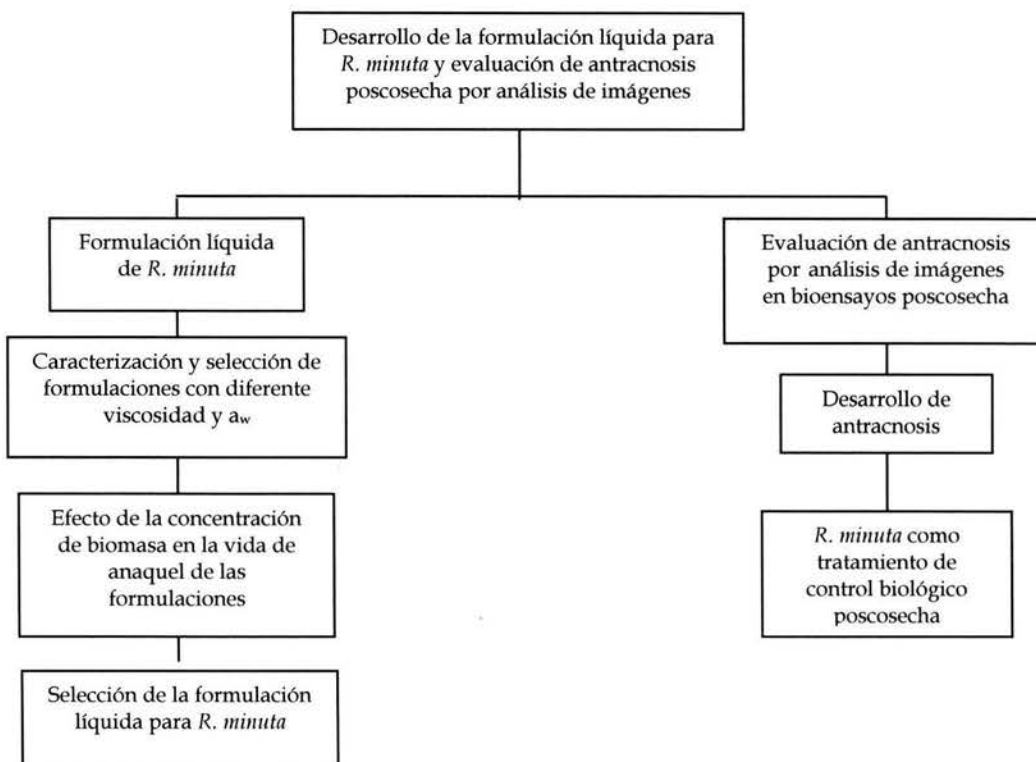
Trabajos previos desarrollados en el grupo del Dr. Galindo (en el marco de un proyecto de control biológico financiado por el Programa Especial de Biotecnología del CONACyT) demostraron que *R. minuta* tiene gran potencial como agente de control biológico para antracnosis en mango (Patiño *et al.*, 2002). En el presente trabajo se llevó a cabo la evaluación de diferentes condiciones de actividad de agua ( $a_w$ ) y de viscosidad ( $\eta$ ) para el desarrollo de una formulación líquida de *R. minuta*. Por otra parte, se implementó una técnica de análisis de imágenes para la evaluación objetiva y cuantitativa de antracnosis en bioensayos con frutas de mango poscochecha como una propuesta para estandarizar del método de evaluación de la infección, así como para la evaluación de la eficacia de tratamientos para el control de esta enfermedad. Para lograr lo anterior, se infectaron mangos artificialmente y fueron utilizados como un sistema modelo de antracnosis en mango para la evaluación de las manchas negras (típicas de esta infección) por análisis de imágenes y también para evaluar el efecto de la aplicación de *R. minuta* como tratamiento de control biológico en el desarrollo de antracnosis.

### 4.2. Cultivo para la producción de biomasa de *R. minuta*

La obtención de biomasa para la preparación de la suspensión de *R. minuta* en amortiguador de fosfatos se llevó a cabo bajo las condiciones previamente reportadas por Jiménez (2002). La levadura, que es actualmente conservada en tubos con medio PDA y almacenados a 4 °C, fue cultivada en cajas Petri con medio PDA (marca Difco) durante 72 hrs a 29 °C para activar la cepa. Del cultivo de la caja se tomaron tres asadas para la inoculación de 4 matraces Erlenmeyer de 250 mL con 25 mL c/u de medio PYD (almidón de papa 4 g/L, dextrosa 20 g/L y extracto de levadura 5 g/L) que fueron incubados durante 24 hrs a temperatura de 29 °C y agitación de 200 rpm (agitadora con control de temperatura, marca New Brunswick).

Los cultivos provenientes de estos matraces fueron utilizados como inóculos de un matraz de 2800 mL con 1000 mL (el 10 % de este volumen fue el inóculo) de medio PYD, el cual se incubó

bajo las mismas condiciones que los matraces de 250 mL. Para la producción en biorreactor de 14 L (marca New Brunswick), el cultivo desarrollado en el matraz de 2800 mL fue el inóculo de un fermentador con 10 L (el 10 % de este volumen fue el inóculo) de medio de cultivo para producción. El medio contiene (g/L): dextrosa 34.4, extracto de levadura 5.0,  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  7.4,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2.787,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  2.05, NaCl 0.1,  $\text{FeSO}_4$  0.005,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.073,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0.01 y  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0.0076. El cultivo de producción fue desarrollado por 22 hrs a 29 °C de temperatura, agitado a 240 rpm con tres turbinas Rushton de 6 paletas ( $D/T=1/2$ ), potencia de 0.5 W/L y 1 vvm de aireación.



**Figura 3.** Estrategia experimental desarrollada para la evaluación de diferentes formulaciones líquidas de *R. minuta* y de la antracnosis poscosecha por análisis de imágenes.

#### 4.3. Recuperación de biomasa y resuspensión en amortiguador de fosfatos

Las células de *R. minuta* fueron recuperadas por centrifugación (15,000 g; centrífuga tubular con diámetro de tazón  $1\frac{3}{4}$ , "Minisharpless") y posteriormente resuspendidas en amortiguador de fosfatos (NaCl 8.0 g/L,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  2.0 g/L, KCl 2.0 g/L,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  2.9 g/L; pH 6.8). Se determinaron las UFC/mL de la suspensión celular con la técnica de dilución seriada en

solución salina (NaCl 0.85 % p/v) y siembra en placa (cultivos en cajas Petri con medio PDA). Las células de *R. minuta* fueron resuspendidas en un volumen mínimo de amortiguador de fosfatos (1 g pasta húmeda/0.333 mL de amortiguador) concentrándolas hasta  $3 \times 10^{10}$  UFC/mL (Patiño *et al.*, 2002). La suspensión celular en amortiguador de fosfatos (formulación prototipo) se almacenó a 4 °C hasta su uso para el desarrollo de las formulaciones con glicerol y xantana o glicerol-xantana o en los bioensayos con mango.

#### 4.4. Preparación y caracterización de las formulaciones con glicerol, xantana o glicerol-xantana

Para el desarrollo de la formulación se evaluó el glicerol (como reductor de  $a_w$ ) y la goma xantana (como viscosificante) en diferentes concentraciones (**figura 4**). Las concentraciones probadas de glicerol fueron 20, 40, 60 y 80 (% p/v) y de xantana de 1, 2, 3, 4 y 5 g/L y todas las posibles combinaciones (20 en total). Para la preparación de las soluciones se utilizó el siguiente procedimiento:

1.- La fórmula  $C_1V_1=C_2V_2$ , se utilizó para calcular el volumen requerido para tener una concentración de  $10^9$  o  $10^{10}$  UFC/mL en la formulación.

En donde:

$C_1$ = concentración celular (UFC/mL) en la formulación prototipo

$V_1$ = volumen disponible de la formulación prototipo

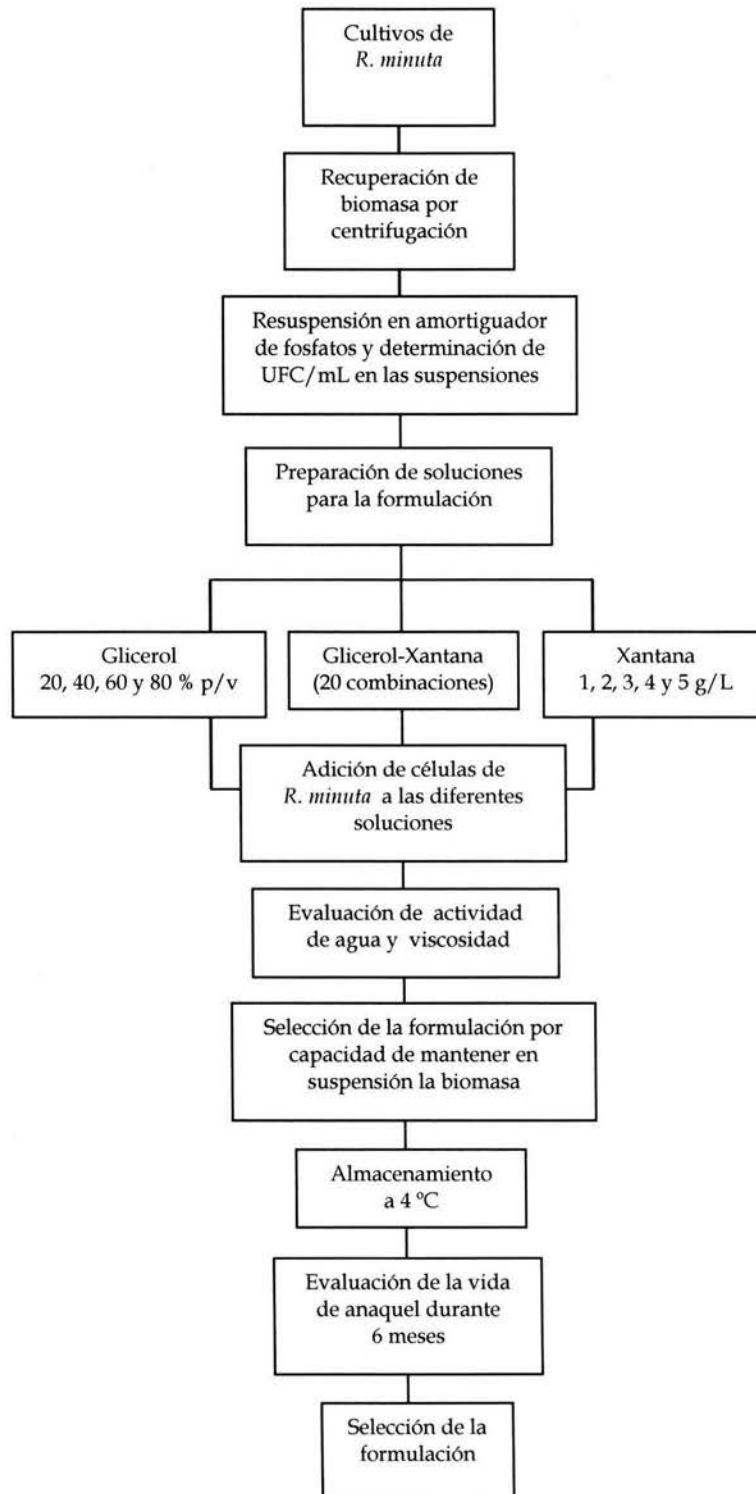
$C_2$ = concentración celular requerida para la nueva formulación

$V_2$ = volumen requerido para la nueva formulación

Despejando:

$$V_1 = \frac{C_2 V_2}{C_1}$$

La diferencia  $V_2-V_1$ , determina el volumen que se tiene disponible para disolver la xantana y el glicerol.



**Figura 4.** Esquema experimental para la evaluación de diferentes formulaciones líquidas de *R. minuta*.

Ejemplo:

Para la preparación de 30 mL de una formulación de *R. minuta* en  $10^{10}$  UFC/mL con glicerol 20 % (p/v) y xantana en 5 g/L, tenemos que:

$$V_1 = \frac{(1 \times 10^{10} \text{ UFC/mL}) (30 \text{ mL})}{3 \times 10^{10} \text{ UFC/mL}}$$

$V_1 = 10 \text{ mL}$

Se requieren 10 mL de formulación prototipo y quedan disponibles 20 mL para preparación del medio de formulación.

2.- Utilizando la misma fórmula pero ahora despejando  $C_1$ , se calculó el peso requerido de xantana y glicerol.

En este caso, se requirieron 6 gramos de glicerol y 0.15 gramos de xantana, para tener una solución de glicerol con 20 % (p/v) y xantana en 5 g/L en los 30 mL. Primero, el glicerol se disuelve en el amortiguador de fosfatos aforando a 20 mL, y posteriormente, se adicionó la xantana. La solución se mantuvo en agitación (agitación magnética) por 12 hrs. Finalmente, se esterilizaron en una autoclave (Tomy, modelo ES-315) a 121 °C por 15 min.

Una vez que las soluciones están a temperatura ambiente, los 10 mL de formulación prototipo de *R. minuta* son adicionados al medio de formulación glicerol-xantana en condiciones de esterilidad (en el área de la campana de flujo laminar). La mezcla es homogenizada por agitación con una espátula estéril. Finalmente, se colocaron 10 mL de formulación en tubos para centrífuga (Cornig) estériles y las formulaciones se almacenaron a 4 °C.

Se llevó a cabo la determinación de la actividad de agua en un higrómetro eléctrico (Novasina Aw PRINT TH500). En el higrómetro, la muestra se coloca en una cámara cerrada en condiciones de temperatura controlada. La determinación de  $a_w$  la hace un sensor instalado



dentro de la cámara, el cual contiene un compuesto higroscópico (cloruro de litio) que cambia de conductividad (que detecta el sensor) en función de la presión de vapor generada por la muestra dentro de la cámara. Las señales generadas por el sensor son convertidas a valores de  $a_w$  (relación entre la presión de vapor de una solución con respecto a la presión de vapor del agua pura (sin solutos)).

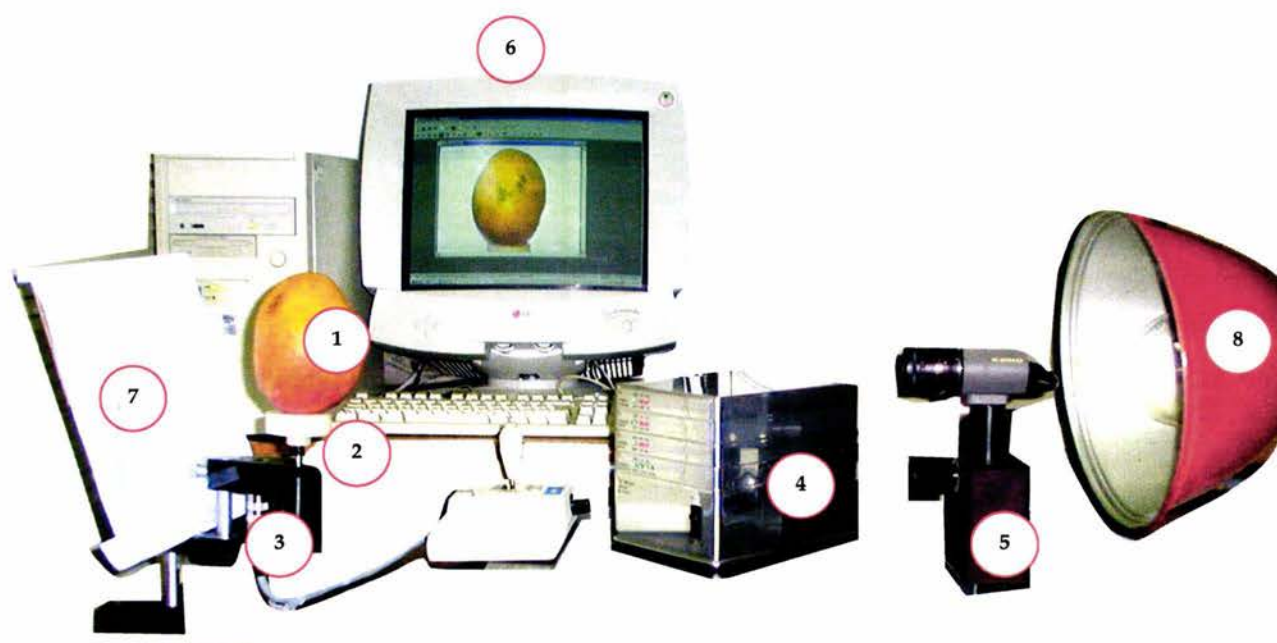
La caracterización reológica (en términos de viscosidad aparente) de las soluciones se llevó a cabo en un reómetro (Contraves Rheomat 120, con el dispositivo MS 0/115 a una  $\dot{\gamma}$  de  $200 \text{ s}^{-1}$ , que corresponde a una velocidad de rotación de 42.37 rpm). Para las evaluaciones de  $a_w$  y  $\eta$  se procuró que las formulaciones tuvieran  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  de temperatura.

Solo se seleccionaron las formulaciones que permitieron conservar en suspensión la biomasa de la levadura después de un mes de almacenamiento, para evaluar su vida de anaquel durante 6 meses (UFC/mL en los formulados en función del tiempo de almacenamiento a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ ).

#### **4.5. Sistema de análisis de imágenes para la evaluación cuantitativa de antracnosis en frutos de mango**

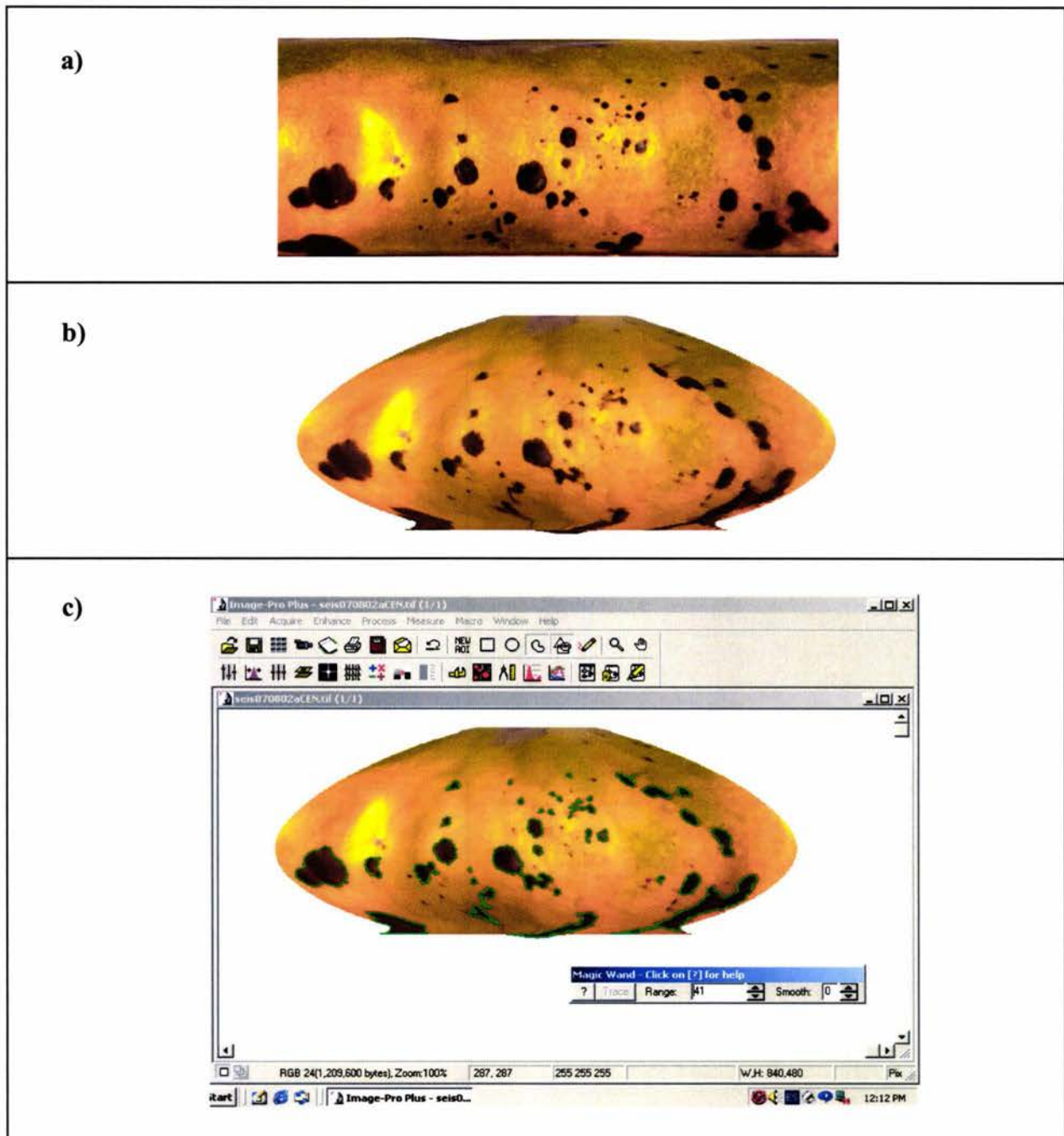
Para la evaluación cuantitativa de antracnosis en frutos de mango el Laboratorio de Imágenes del CCADET-UNAM (Unidad Morelos) implementó un sistema que permite evaluar objetiva y cuantitativamente el área afectada por antracnosis en los frutos, por medio de la proyección en dos dimensiones de la superficie tridimensional de cada fruto evaluado. El sistema (**figura 5**) está integrado por un soporte para colocar el mango, que a su vez está montado en un motor a pasos. Este motor a pasos está conectado a un controlador MAC 5000 (Ludl Electronics). El fruto es iluminado directamente con una lámpara incandescente de 300 watts y tiene un fondo blanco iluminado por una lámpara de 60 watts. Las imágenes son captadas con una cámara de TV Cohu Color RGB. El programa de adquisición de imágenes está formado por el "software" comercial *Image Pro Plus*, versión 4.1 en Windows 2000. El fruto rota grado a grado sobre su eje vertical, hasta completar un giro de  $360^\circ$ . Así, el sistema -controlado por un algoritmo desarrollado en el programa- realiza la adquisición de 360 imágenes de cada fruto (una imagen por cada grado de rotación del fruto en sincronía con la rotación del motor). El programa *Image Pro Plus* salvaguarda secuencialmente las imágenes, titulándolas automáticamente con el

nombre del experimento y números progresivos del 0 al 359. Posteriormente, un algoritmo del programa (elaborado específicamente para el desarrollo de este trabajo) lleva a cabo la reconstrucción de una imagen bidimensional (**figura 6a**) y con la corrección geométrica de ésta, se obtiene digitalmente la proyección cartográfica de la superficie total del fruto (**figura 6b**). Finalmente, se llevó a cabo la evaluación automática del área total de la superficie del fruto afectada con manchas de antracnosis en el plano reconstruido (**figura 6c**).



**Figura 5.** Sistema de análisis de imágenes implementado para la evaluación de antracnosis en frutos de mango. 1- fruto, 2- soporte mango, 3- motor a pasos, 4- controlador del motor a pasos Ludl MAC 5000, 5- cámara T.V, 6- monitor computadora, 7- mampara blanca como fondo (iluminado por una lámpara de 60 watts), 8- lámpara incandescente de 300 watts.

La severidad de la antracnosis se evaluó como el porcentaje de área ((sumatoria del área total de manchas negras/área total del mango)\*100) del fruto afectado por antracnosis. El diámetro promedio (longitud promedio de diámetros en intervalos de 2° que pasan a través del centroide del objeto medido) de las manchas en los frutos fue otro parámetro que pudo ser determinado con el análisis de imágenes.



**Figura 6.** Evaluación cuantitativa de la antracnosis del mango por análisis de imágenes: **a)** reconstrucción de la imagen bidimensional (proyección cilíndrica), **b)** corrección geométrica de la imagen (proyección pseudocilíndrica) y **c)** cuantificación automática de manchas de antracnosis en la proyección pseudocilíndrica con el programa *Image Pro Plus*.



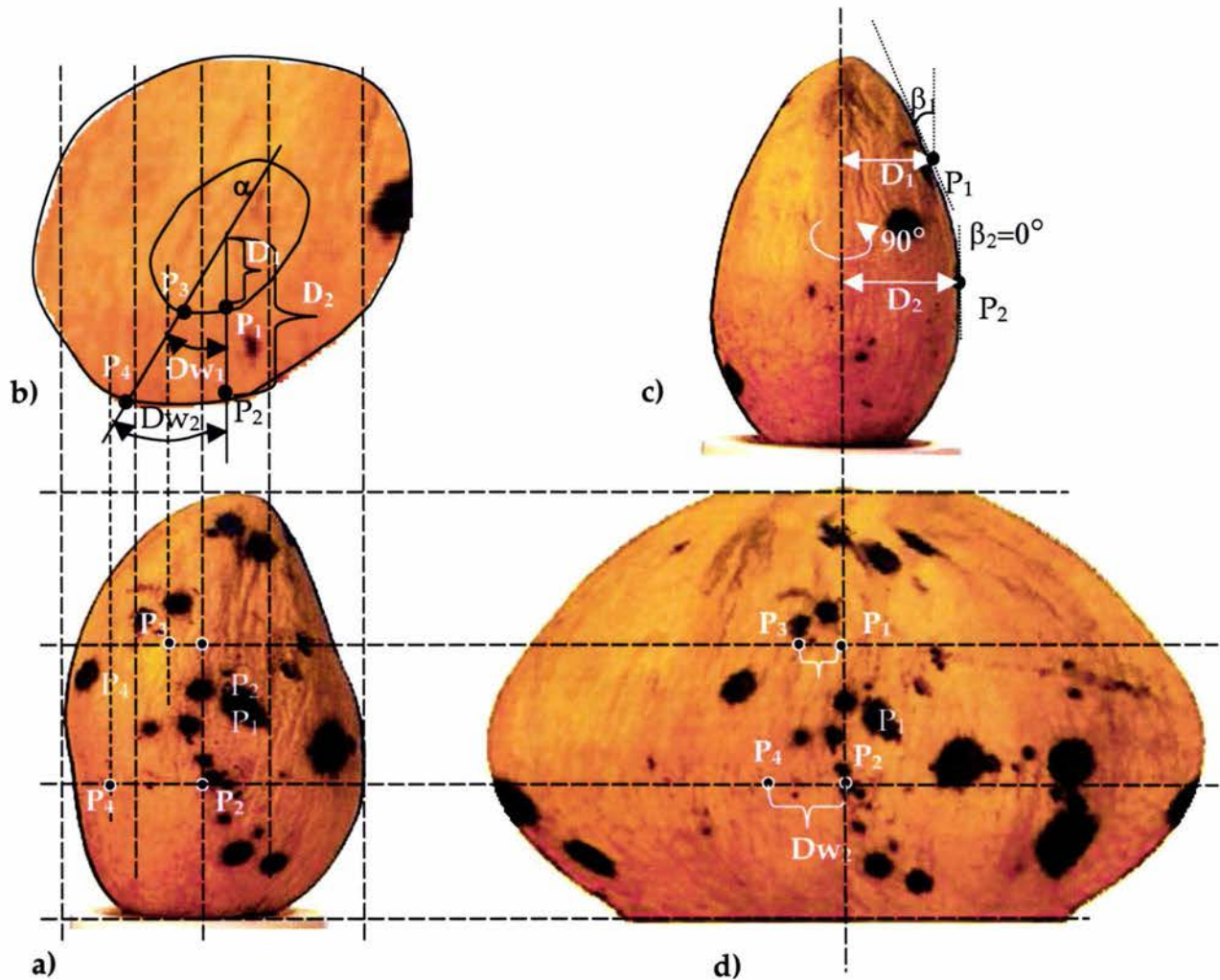
#### 4.6. Proyección bidimensional de la superficie del mango

La proyección “equal-area” mantiene una relación no distorsionada entre el área real de los objetos para ser mapeados y su proyección. En otras palabras, las áreas proyectadas de las manchas de antracnosis presentes en la imagen del mango, necesitan tener un área equivalente al área real de las manchas de antracnosis en el fruto. Para este propósito, se implementó una proyección pseudocilíndrica del mango.

La **figura 7** muestra la vista frontal de un fruto de mango (**figura 7a**), la vista superior (**figura 7b**), la imagen correspondiente al girarlo  $90^\circ$  (**figura 7c**) y la reconstrucción de la superficie del fruto en una proyección pseudocilíndrica (**figura 7d**). Con dos pares de puntos ( $P_1$ - $P_2$ ,  $P_3$ - $P_4$ ) en estas imágenes se mostrará el procedimiento para hacer la proyección pseudocilíndrica. Cada par de puntos está localizado en diferentes paralelos que cortan transversalmente el mango con respecto a su eje central alineado con el motor a pasos (**figura 7a**). Los puntos  $P_1$  y  $P_2$  están localizados sobre el meridiano  $0^\circ$  (ángulo inicial de rotación); los puntos  $P_1$  y  $P_3$  están localizados en el paralelo cercano al “polo norte” de la fruta de mango donde su diámetro (sección transversal) está significativamente reducida. Por el otro lado, los puntos  $P_2$  y  $P_4$  están localizados sobre el ecuador de la fruta de mango, donde el diámetro de su sección transversal es máximo.

Con el objetivo de trazar proyecciones de los primeros dos puntos  $P_1$  y  $P_2$  en el mapa de la **figura 7d**, primero se traza una referencia vertical, que es el correspondiente al meridiano  $0^\circ$  porque está alineado con el eje de rotación de la **figura 7c**. Este meridiano será la única línea vertical en el mapa porque las otras estarán deformadas con el objetivo de corregir las áreas proyectadas. La posición vertical de los puntos  $P_1$  y  $P_2$  sobre su meridiano estarán ponderadas por la tangente de la superficie del mango de esos puntos (ángulos  $\beta_1$  y  $\beta_2$ , **figura 7c**). Con el uso de este procedimiento, la deformación de la superficie curvada de la fruta de mango en la dirección vertical será corregida en el mapa (**figura 7d**). Los puntos con un ángulo  $\beta=0^\circ$  serán mapeados directamente sin ninguna corrección vertical. Para proyectar los puntos  $P_3$  y  $P_4$  se necesita conocer primero el desplazamiento angular de las distancias  $Dw_1$  y  $Dw_2$ . La **figura 7b** (vista superior de la fruta) muestra como estas distancias angulares  $Dw_1$  y  $Dw_2$  se mueven

para los puntos  $P_1$  y  $P_2$ , y que, para el mismo ángulo de rotación, éstos son significativamente de diferente magnitud.



**Figura 7.** Proyección pseudocilíndrica 'equal-area' de la superficie de la fruta de mango. a) vista frontal del mango: puntos  $P_1$  y  $P_3$  localizados en el polo norte y puntos  $P_2$  y  $P_4$  en el ecuador, b) vista superior: puntos  $P_1$  y  $P_2$  corresponden a la posición  $0^\circ$ ,  $D_1$  y  $D_2$  son las distancias correspondientes de los puntos comunes al eje vertical del mango, c) vista del mango al girarlo  $90^\circ$  para medir las distancias  $D_1$  y  $D_2$  y los ángulos  $\beta_1$  y  $\beta_2$  con relación a la tangente de la piel del fruto y d) proyección pseudocilíndrica 'equal-area' de los puntos  $P_1, P_2, P_3$  y  $P_4$ .



De hecho, la clásica proyección cilíndrica no toma en cuenta esta situación y considera de igual magnitud el desplazamiento de las distancias para los puntos mapeados; por esta razón, la proyección cilíndrica normalmente tiene una geometría rectangular o cuadrada, en las cuales los objetos cercanos a los polos están gradualmente distorsionados con áreas sobrestimadas. Como los incrementos de la rotación son pequeños ( $1^\circ$ ), podemos aproximar los valores de  $Dw_1$  a  $Dw_2$  a las distancias lineales:

$$Dw_1 = D_1 * \tan \alpha$$

Como tenemos las 360 imágenes adquiridas de la superficie de la fruta, las distancias  $D_1$  y  $D_2$  pueden ser medidas directamente en la imagen ortogonal del punto que será proyectado; en otras palabras, estas distancias pueden ser directamente medidas en la imagen de la fruta cuando está ha girado  $90^\circ$  (**figura 7c**). En la práctica, de cada imagen de las 360 adquiridas, solo el meridiano frontal que intersecta perpendicularmente el eje cámara-fruta es retenida para ser procesada. De esta forma, los 360 meridianos de la fruta de mango son mapeados.

#### 4.7. Bioensayos en frutos de mango

Se llevaron a cabo dos diferentes bioensayos: en el primer bioensayo los frutos fueron sometidos a un procedimiento de infección artificial con una suspensión del fitopatógeno (*C. gloeosporioides* en concentración de  $10^6$  conidios/mL) para evaluar el desarrollo de enfermedad en los frutos sometidos a estas condiciones. En el segundo bioensayo, se evaluó el efecto en el desarrollo de la antracnosis en frutos que fueron sometidos a un procedimiento de infección artificial y a un posterior tratamiento de control biológico poscosecha. Este tratamiento consistió en la inmersión de los frutos en agua caliente ( $55^\circ\text{C}/5$  min) y la posterior inmersión (10 min) en una suspensión del agente de control biológico (10 L de suspensión celular de *R. minuta* en concentración de  $10^6$  UFC/mL). En este bioensayo, la inmersión de los frutos en agua caliente ( $55^\circ\text{C}/5$  min) fue considerado el tratamiento testigo. No se consideraron otros tratamientos para este bioensayo debido a las limitaciones de espacio en la cámara de almacenamiento y al número de frutos que pueden ser manejados por día al utilizar el sistema de análisis de imágenes para la captura de las imágenes. La metodología de cada bioensayo se explica en las siguientes secciones.

#### **4.8. Desinfección superficial de los frutos de mango**

Para todos los bioensayos, los frutos fueron desinfectados superficialmente, sumergiéndolos en una solución de hipoclorito de sodio al 1 % por 10 minutos. Posteriormente, se lavaron con agua destilada (para retirar los residuos de cloro) y se dejaron secar antes de su uso.

#### **4.9. Almacenamiento de los frutos**

Los frutos se colocaron en una cámara de almacenamiento (ENVIRON-CAB™ Modelo 680A, Lab-Line Instruments, Inc.) con control de temperatura (°C) y humedad relativa (% HR), bajo las condiciones especificadas para los bioensayos.

#### **4.10. Cultivos para la obtención de conidios *C. gloeosporioides***

Para la obtención de conidios de *C. gloeosporioides* (proporcionado por el Laboratorio de Fitopatología del CIAD, Culiacán) se cultivó al hongo en cajas Petri con PDA y se mantuvo en incubación a 29 °C por 6 días (después de 72 hrs de incubación, las cajas fueron expuestas a la luz para estimular la esporulación). Los conidios fueron recuperados del medio de cultivo mediante lavados con solución salina (0.85 % p/v de NaCl y Tween 40 al 0.05 % p/v). La concentración de la suspensión (conidios/mL) se determinó mediante el conteo de conidios en una cámara de Neubauer y el uso del objetivo 40x de un microscopio óptico (Nikon Alphaphot, modelo 2452).

#### **4.11. Preparación de la suspensión del agente de control biológico**

Para el bioensayo de control biológico, se prepararon 10 L de una suspensión celular del *R. minuta* en concentración de  $10^6$  UFC/mL. Las células de la levadura fueron resuspendidas en solución salina (0.85 % p/v de NaCl).

#### 4.12. Evaluación del desarrollo de antracnosis

Después de la desinfección de frutos variedad "Manila", se llevó a cabo la infección artificial rociándolos con suspensiones de *C. gloeosporioides* con  $10^6$  conidios/mL. Esta concentración de patógeno fue la seleccionada para llevar a cabo los bioensayos de los tratamientos de control biológico poscosecha porque permitió la mejor evaluación del área de los frutos afectada por antracnosis con el sistema de análisis de imágenes (ver **anexo 1**). Los mangos se dejaron secar y se almacenaron en condiciones de temperatura y humedad relativa que favorecieron el desarrollo de la enfermedad (25 °C y 95 % HR). Se utilizaron 10 mangos por cada tratamiento. La severidad de la antracnosis se evaluó como el porcentaje del área del fruto afectado por antracnosis de los 4 a los 8 días posteriores a la inoculación del patógeno.

#### 4.13. *R. minuta* como tratamiento de control biológico poscosecha

Después de la desinfección de los frutos, se roció sobre los mangos una suspensión de  $10^6$  conidios/mL de *C. gloeosporioides*. Los frutos fueron almacenados por 12 h a 25 °C y 95 % HR (para favorecer el establecimiento del patógeno), y después de este tiempo, se aplicó el tratamiento hidrotérmico (sumergiéndolos en agua con temperatura de 55 °C por 5 minutos). El esquema experimental se ilustra en la **figura 8**.

Para la aplicación del tratamiento de control biológico, se sumergió a los frutos durante 10 minutos en una tina que contenía 10 L de suspensión celular de *R. minuta* en concentración de  $10^6$  UFC/mL. El otro tratamiento evaluado fue la inmersión en agua caliente (50 °C / 5 min), en vista de que es requerido cuando se trata de mangos de exportación (la variedad "Manila" no es considerada para exportación, pero se utilizó por su disponibilidad durante el periodo del experimento). Posteriormente, los frutos fueron colocados nuevamente en la cámara de almacenamiento. El área afectada por antracnosis en los frutos se evaluó con el sistema de análisis de imágenes. Para estos bioensayos se utilizaron 10 frutos por cada tratamiento.



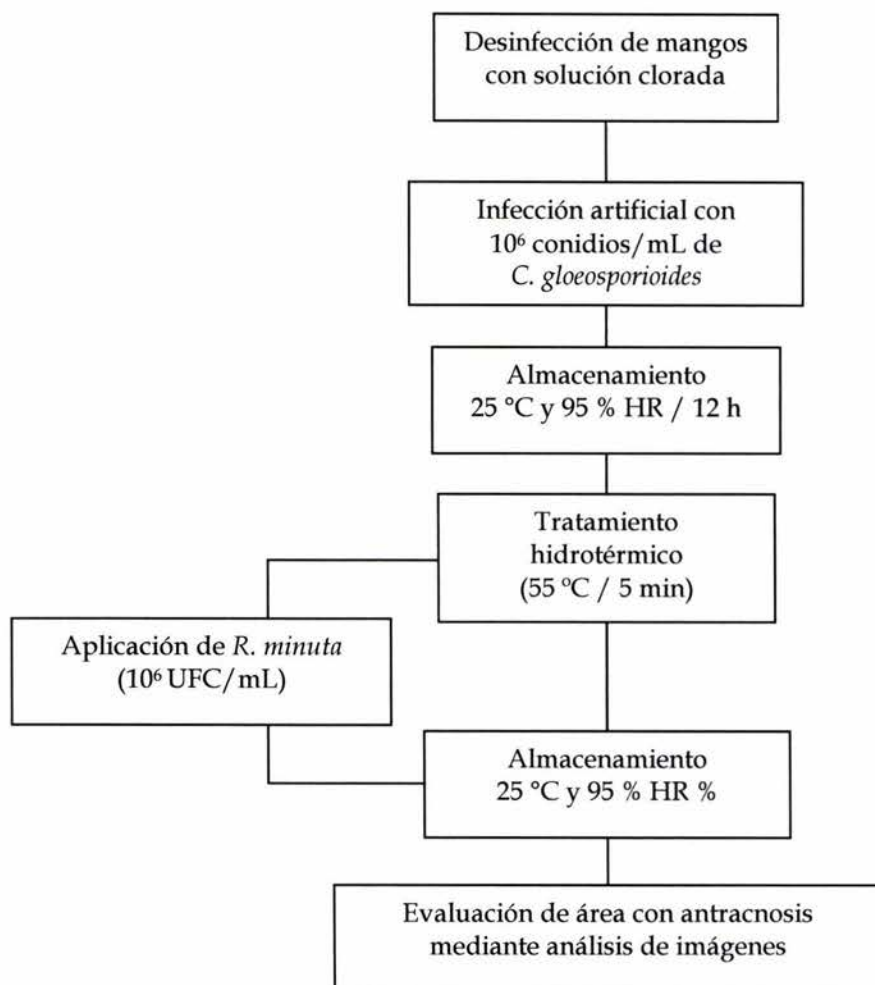


Figura 8. Evaluación del control de la antracnosis por *R. minuta* en frutos de mango.

## 5 RESULTADOS Y DISCUSION

### 5.1. Formulación de *R. minuta*

El desarrollo de la formulación de *R. minuta* se baso en la disminución de la actividad de agua ( $a_w$ , con la adición de glicerol) y en el incremento de la viscosidad ( $\eta$ , con la adición xantana) del medio de formulación, con el objetivo de conservar la viabilidad de la levadura y la suspensión de su biomasa durante el almacenamiento. El glicerol y la xantana se adicionaron a una solución amortiguadora a base de sales de fosfato. Las concentraciones de glicerol estuvieron entre 20 y 80 % (p/v), las de xantana entre 1 y 5 g/L, y se caracterizó la  $a_w$  y la  $\eta$  de formulaciones con todas las posibles combinaciones (20 en total) glicerol-xantana. Posteriormente, se seleccionaron formulaciones por su capacidad de mantener en suspensión la biomasa de *R. minuta* y por el valor de  $a_w$  para determinar las UFC/mL de esta levadura que se conservaron en esas condiciones de formulación durante su almacenamiento a 4 °C por un periodo de 6 meses.

### 5.2. Actividad de agua en función de la concentración de glicerol en las soluciones

En la **figura 9** se presenta la actividad de agua a 4 °C como función de la concentración de glicerol. La actividad de agua con 20, 40, 60 y 80 % (p/v) de glicerol en la solución fue de 0.980, 0.905, 0.793 y 0.643, respectivamente. Como se esperaba, la más baja actividad de agua se obtuvo con la concentración más alta de glicerol. La  $a_w$  del amortiguador de fosfatos fue de 0.997.

### 5.3. Viscosidad de las soluciones en función de la concentración de glicerol y de xantana

En la **figura 10** se presentan los resultados de viscosidad ( $\eta$ ) de las formulaciones de *R. minuta* en función de la concentración de glicerol y de xantana. En todos los casos, la viscosidad de las soluciones se incrementó al aumentar la concentración de los aditivos en la solución. La  $\eta$  de las soluciones estuvo entre 3 y 32 centipois (cp), cuando se adicionó (al amortiguador de fosfatos) entre 20 y 80 % p/v de glicerol y de 4 a 41 cp, cuando se adicionó xantana en concentración de 1 a 5 g/L. Con la adición de ambos aditivos (mezcla glicerol-xantana), la  $\eta$  que presentaron estas soluciones fue mayor que cuando se utilizó a los aditivos en forma separada (glicerol o xantana).

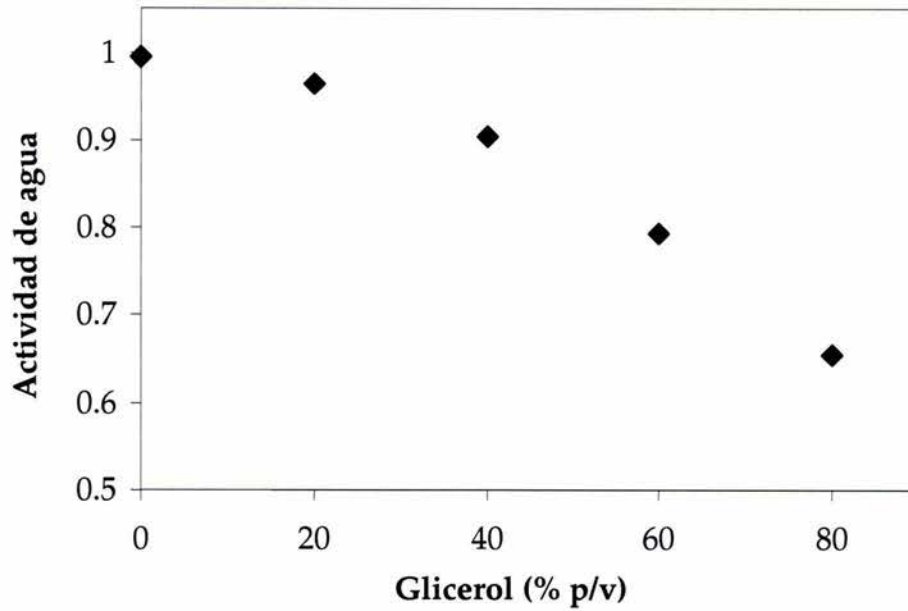


Figura 9. Actividad de agua a 4 °C en función de la concentración de glicerol.

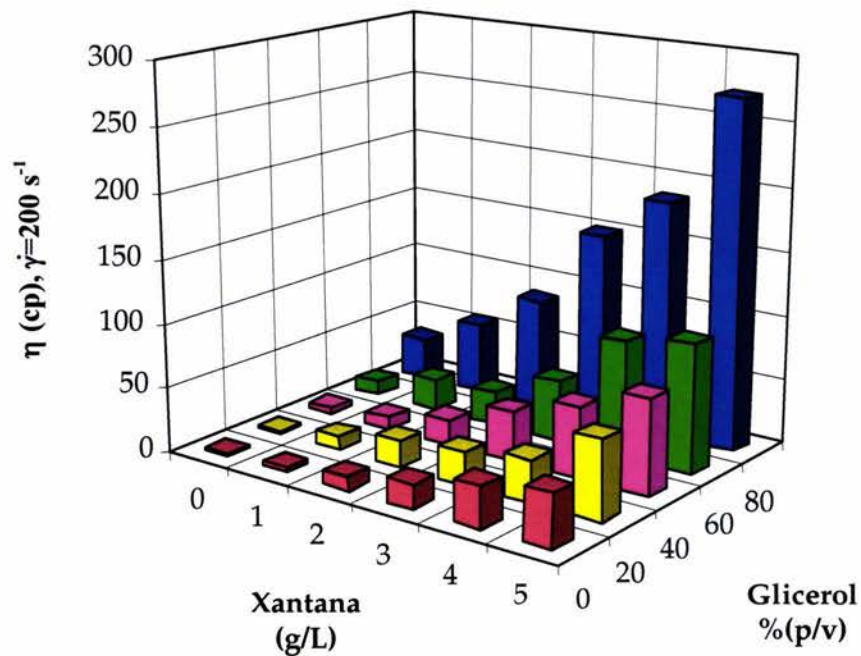
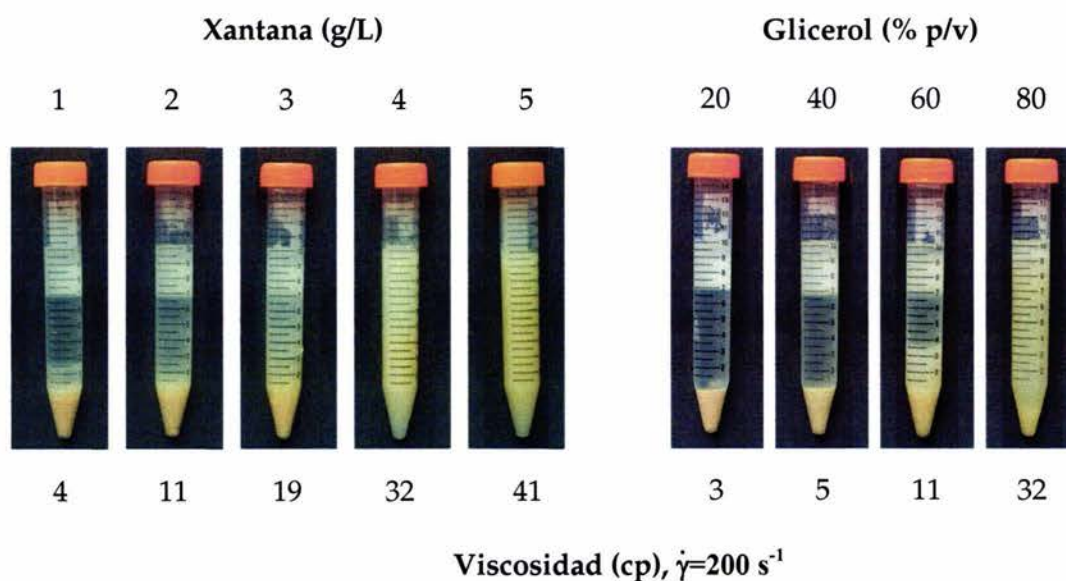


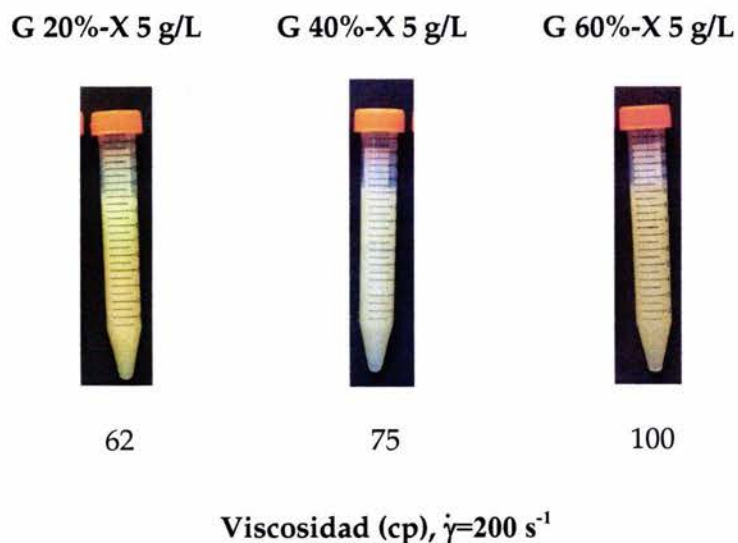
Figura 10. Caracterización reológica de las formulaciones líquidas de *R. minuta*. Viscosidad ( $\eta$  (cp), evaluada a  $\dot{\gamma}=200 \text{ s}^{-1}$ ) de las formulaciones en función de la concentración de glicerol y de xantana.

Después de un mes de almacenamiento a 4 °C se observó que las formulaciones con  $\eta > 60$  cp, evitaron la sedimentación de biomasa de *R. minuta*. Por lo tanto, para evaluar la vida de anaquel (a 4 °C) en formulaciones con diferente  $a_w$  y  $\eta > 60$  cp, se seleccionaron 3 condiciones de formulación: 20, 40 y 60 % de glicerol en mezcla con 5 g/L de xantana, que correspondieron  $a_w$  de 0.980, 0.905 y 0.793, y  $\eta_{ap}$  de 62, 75 y 100 cp, respectivamente (figura 11). La adición de xantana al amortiguador de fosfatos, no afectó la  $a_w$  en ninguna de las condiciones evaluadas.

a)



b)

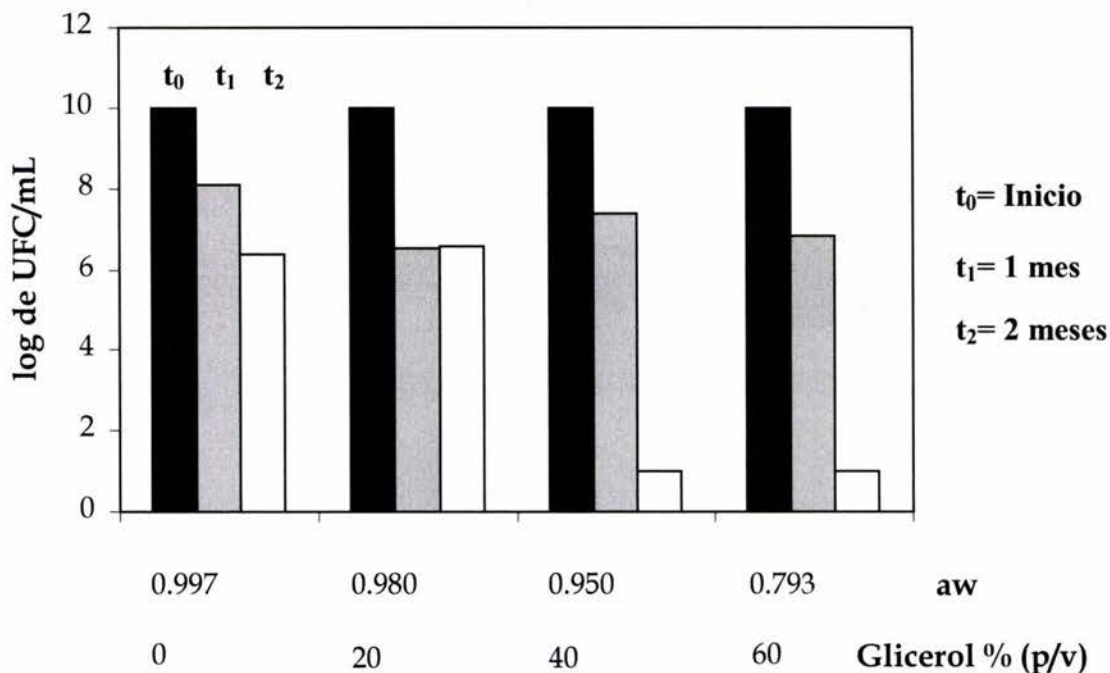


**Figura 11.** Aspecto de diferentes formulaciones líquidas de *R. minuta* después de un mes de almacenamiento a 4 °C.



#### 5.4. Vida de anaquel de la formulación de *R. minuta*

Como se ilustra en la **figura 12**, la viabilidad de las células disminuyó drásticamente en medios con baja  $a_w$  ( $<0.905$ ). La concentración de UFC/mL disminuyó aproximadamente 4 órdenes de magnitud al final de los dos primeros meses de almacenamiento en la formulación con  $a_w$  de 0.980 y el medio sin modificación de  $a_w$  (amortiguador de fosfatos,  $a_w=0.997$ ).



**Figura 12.** Vida de anaquel de formulaciones líquidas de *R. minuta* (con  $10^{10}$  UFC/mL iniciales) en función de la concentración de glicerol % (p/v)-xantana 5 g/L y almacenamiento a 4 °C.

El decremento tan rápido y drástico en las UFC/mL de las preparaciones con  $1 \times 10^{10}$  UFC/mL en medios de baja  $a_w$  (glicerol 40 %-xantana 5 g/L y glicerol 60 %-xantana 5 g/L) no era esperado. Se esperaba que, a bajas temperaturas y con baja actividad de agua, las UFC/mL de los concentrados se conservarían muy cercanas a las iniciales durante los primeros meses de almacenamiento. Resultados similares fueron reportados por Torres *et al* (2003) para la formulación líquida de *C. sake* (CPA-1) en medios con diferentes actividades de agua. Estos autores evaluaron el efecto del glicerol y del polietilenglicol (PEG) como agentes reductores de  $a_w$  en la formulación en líquido de *C. sake* (conteniendo  $5 \times 10^9$  UFC/mL) y la incorporación de

azúcares (trehalosa), aminoácidos (glutamato), polímeros (dextrina y carboximetil celulosa), polioles (eritrol y glicerol) o compuestos inertes (PEG 200 o 300) en diferentes concentraciones a un amortiguador a base de fosfato de potasio (0.05 M) con  $a_w=0.996$ . La  $a_w$  del medio de preservación fue modificada de 0.95 a 0.72 con la adición de glicerol o PEG. Para bajos niveles de  $a_w$  (0.721-0.901) con glicerol no mantuvieron la viabilidad de las células cuando las formulaciones fueron almacenadas a 20 °C y a 4 °C. Solo el amortiguador (alta  $a_w$ ) conservó el 50 % y el 70 % de células viables en 30 días de almacenamiento a 20 y 4 °C, respectivamente. Altos niveles de  $a_w$  (0.93-0.95) con la adición de glicerol o PEG conservaron la viabilidad de la levadura. La concentración de esos formulados fue más baja que la requerida para su aplicación en tratamientos de control biológico. Las células de *C. sake* mantuvieron viabilidades mayores al 60 % cuando azúcares como la trehalosa (5 %), polioles como el glicerol (5 %) y el PEG (5 %) fueron utilizados como agentes protectores en formulaciones almacenadas a 4 °C. La adición de lactosa (10 %) o trehalosa (1 %) fueron los mejores aditivos para la conservación de la viabilidad de la levadura, con 79 y 72 % de células viables durante 4 meses de almacenamiento a 4 °C en formulación líquida, respectivamente. Sus resultados indican que el decremento de la  $a_w$  en el medio de formulación no es suficiente para mantener la viabilidad de la levadura durante el almacenamiento a temperatura ambiente y a 4 °C. Estudios previos de la fisiología de *C. sake* indican que la levadura crecida en medios a diferentes  $a_w$  puede acumular compuestos endógenos (tales como trehalosa) que le ayudan a mantener su viabilidad durante el almacenamiento (Abadias *et al.*, 2000). La trehalosa es un compuesto citosólico de bajo peso molecular, es acumulado por las células de levadura en respuesta a condiciones adversas (*i.e.* deshidratación). Las evidencias experimentales sugieren que tiene un gran efecto sobre la  $a_w$  dentro de la célula, por lo tanto, su función puede estar relacionada a la de un osmolito, regulando el cambio de volumen celular durante el proceso de equilibrio de la presión osmótica, que experimenta la célula ante el cambio a medios hiper o hiposmóticos (Wiemken, 1990). Otras sustancias osmoreguladoras u osmolitos pueden ser el glicerol, azúcares, aminoácidos, o iones como el sodio y el potasio, entre otros.

Por su parte, Abadias *et al* (2003) evaluaron el efecto de la modificación de la  $a_w$  del medio de crecimiento y la  $a_w$  del medio de formulación con diferentes solutos, así como la temperatura de almacenamiento, sobre la viabilidad de *C. sake*. Esta levadura fue cultivada en medio líquido a base de melasas con actividad de agua no modificada ( $a_w=0.996$ ) y el mismo medio con  $a_w$



modificada a 0.98 con la adición de diferentes solutos (arabitol, eritrol, glicerol, glicina, manitol, prolina, sorbitol o trealosa). Las células del antagonista fueron preservadas en soluciones isotónicas preparadas con diferentes solutos (glucosa, glicerol, prolina, cloruro de sodio o sorbitol), tratando de conservar el potencial hídrico ( $\Psi$ ) de las células. La eficacia de las formulaciones líquidas almacenadas por diferentes periodos fue probado contra la infección por *P. expansum* en ensayos *in vivo* sobre manzanas variedad "Golden Delicious". La viabilidad de *C. sake* decreció rápidamente después de 10 días de almacenamiento a 25 °C sin importar los componentes del medio de crecimiento y de la solución de preservación. El mejor medio de crecimiento fue el no modificado y el modificado a  $a_w=0.98$  con la adición de glicerol o sorbitol en combinación con el medio de preservación isotónico preparado con trealosa (0.96 M), conservando 77 % de células viables después de 210 días de almacenamiento a 4 °C. Las células de esta formulación fueron igualmente eficaces contra *P. expansum* que las frescas (cultivadas y formuladas bajo las mismas condiciones). Las manzanas sin tratamiento de control biológico presentaron 98 % de incidencia de infección. En contraste, con la aplicación de células crecidas en el medio no modificado, en los adicionados con sorbitol o glicerol y preservadas por 7 meses en solución de trealosa, tuvieron entre el 2- 18 % de incidencia de infección por *P. expansum*, respectivamente.

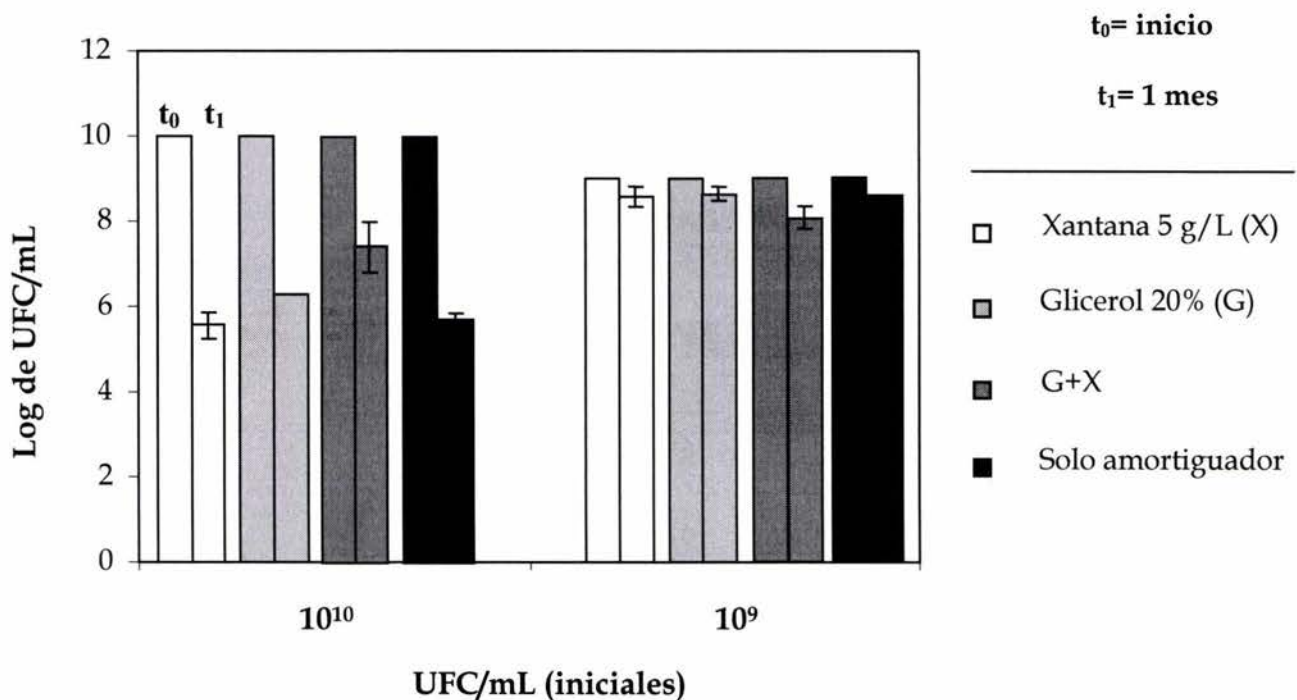
Es posible que el cambio de las células de *R. minuta* a medios de formulación de baja actividad de agua ( $a_w$  con respecto a la del amortiguador de fosfatos) haya causado el decremento del potencial hídrico celular a un nivel que afectó la viabilidad celular, como ha sido reportado para otros sistemas con la levadura *C. sake* (Abadias *et al.*, 2000).

Por otra parte, se observó la disminución de 4 órdenes de magnitud de las UFC/mL en las formulaciones de *R. minuta* conteniendo  $10^{10}$  UFC/mL (**figura 12**) en amortiguador a base de fosfatos (medio con alta  $a_w$ ). Jiménez (2002) reportó que la formulación prototipo de *R. minuta* en el amortiguador de fosfatos permitió recuperar hasta  $1 \times 10^7$  UFC/mL después de 4 meses de almacenamiento a 4 °C y la diferencia es que contenía *R. minuta* a razón de  $6 \times 10^9$  UFC/mL iniciales. Los resultados reportados por Jiménez (2002) y los reportados por Torres *et al* (2003) parecían indicar que la concentración celular en las formulaciones preparadas en el presente trabajo, era la principal causa del fenómeno observado y en segundo término la  $a_w$ . Por esta razón, se comparó la vida de anaquel de formulaciones con glicerol 20 % (p/v), xantana 5 g/L,



glicerol (20 % p/v)-xantana (5 g/L) o únicamente el amortiguador de fosfatos con *R. minuta* en concentración celular (inicial) de  $10^{10}$  UFC/mL y las mismas condiciones de formulación pero con *R. minuta* en  $10^9$  UFC/mL (inicial).

Se encontró que bajo todas las condiciones de formulación con *R. minuta* en la concentración inicial de  $10^{10}$  UFC/mL, la viabilidad de la levadura disminuyó rápidamente, en contraste a lo que se observó con las formulaciones que contenían *R. minuta* a razón de  $10^9$  UFC/mL (figura 13) aún en medios con alta  $a_w$  (sin glicerol).



**Figura 13.** Efecto de la concentración de UFC sobre la vida de anaquel de las formulaciones de *R. minuta* almacenadas a 4 °C. Todas las formulaciones contienen amortiguador de fosfatos.

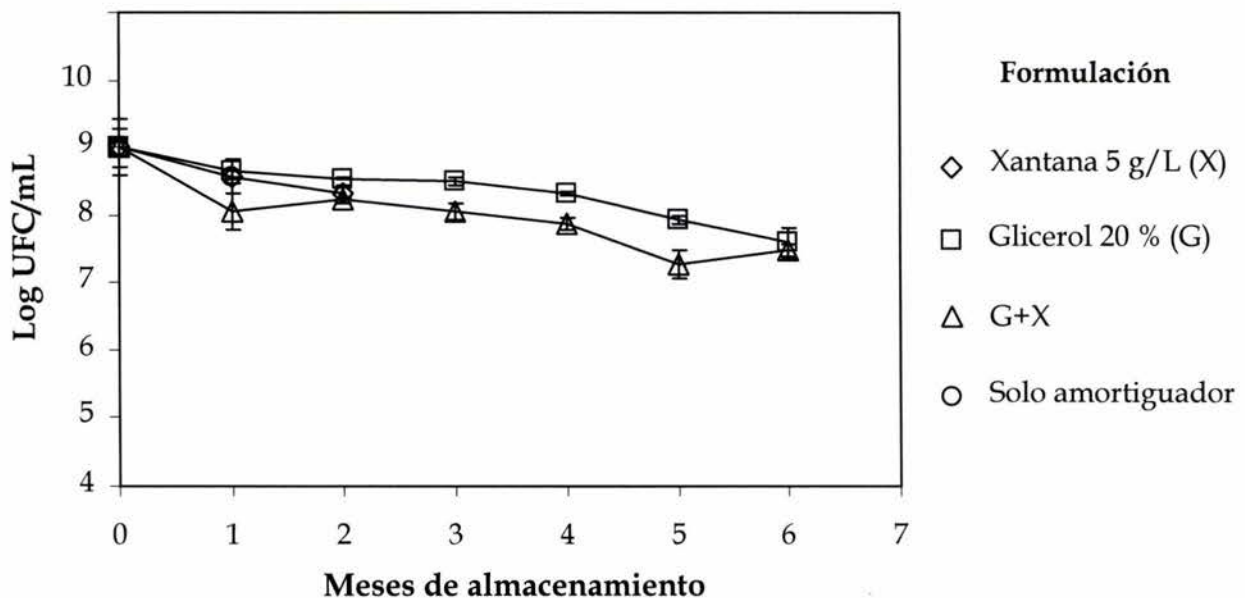
El cambio en UFC/mL después de un mes de almacenamiento fue mínimo en todas las condiciones de formulación con *R. minuta* a razón de  $10^9$  UFC/mL, aún en medios con  $a_w$  modificada (con glicerol), permitiendo conservar el mismo orden de magnitud de las UFC/mL con respecto a la concentración inicial. Por esta razón, se concluyó que la alta concentración celular (en términos de UFC/mL) en los formulados de *R. minuta* afectó la viabilidad de las células durante el almacenamiento.

Un fenómeno similar ya ha sido reportado para formulaciones líquidas de *Metarhizium anisopliae* a razón de  $10^8$  conidios /mL. Aunque no se conocen con exactitud las causas de este fenómeno, se cree que la acumulación de compuestos tóxicos en la formulación son la principal causa del rápido decremento en la viabilidad de los conidios (Burges, 1998). Un formulado con alta concentración de UFC/mL resultaría en un menor volumen del formulado, lo que permitiría que los requerimientos de espacio para el almacenamiento y los costos de transporte, fueran mínimos. Con alta concentración celular en la formulación, se favorece la rápida acumulación de metabolitos secundarios o de desecho que pueden ser tóxicos para las células (Burges, 1998). Por el contrario, al disminuir la concentración celular de la levadura y utilizando glicerol en 20 % p/v (medios con baja  $a_w$ ) como aditivo a la formulación, es probable que la acumulación de desechos o metabolitos tóxicos sea un proceso más lento.

Por otra parte, las formulaciones sin la adición de glicerol no permitieron llevar a cabo el seguimiento de la vida de anaquel de las formulaciones con *R. minuta* que contenían  $10^9$  UFC/mL a causa de contaminación, principalmente de bacterias, que afectaban las determinaciones del contenido de UFC/mL en los formulados. La contaminación por otros microorganismos ya había sido observado por Jiménez (2002) a los 2 meses cuando utilizó solución salina (NaCl al 0.85 % p/v) o agua destilada como medios de preservación para de *R. minuta* en almacenamiento a 4 °C y a los 4 meses en amortiguador de fostatos. Por esta razón, en este trabajo las condiciones de formulación únicamente en el amortiguador de fosfatos ya no fueron evaluadas más allá del primer mes de almacenamiento. En contraste, la  $a_w$  los medios de formulación con la mezcla glicerol/xantana y en las que contenían únicamente glicerol ( $a_w=0.980$ ) no se observó contaminación.

La presencia de glicerol en 20 % (p/v) en los formulados (con glicerol /xantana o únicamente glicerol) con *R. minuta* en concentración celular (inicial) de  $10^9$  UFC/mL, permitió recuperar aproximadamente  $1 \times 10^7$  UFC/mL a los 6 meses de almacenamiento a 4 °C (figura 14). Lo anterior representó 5 meses más de vida de anaquel de la formulación de *R. minuta* con respecto a la formulación basada solo en amortiguador de fosfatos preparada durante el desarrollo de este trabajo.

En vista que la alta concentración de la levadura en la formulación afectó negativamente su viabilidad, hasta los 5 meses de almacenamiento, la mejor condición para la formulación de *R. minuta* resultó ser aquella conteniendo glicerol en 20 % p/v y  $10^9$  UFC/mL iniciales. Sin embargo, la viscosidad de esta formulación no evita la sedimentación de biomasa de la levadura en el fondo del recipiente que la contiene. Por lo que, la mejor condición para la formulación de *R. minuta* resultó ser aquella conteniendo glicerol en 20 % p/v en mezcla con 5 g/L de xantana y  $10^9$  UFC/mL iniciales. En esta condición de formulación, la  $a_w$  del medio evita la contaminación por bacterias, la sedimentación de biomasa por la adición de xantana (5 g/L) y conserva  $10^7$  UFC/mL de *R. minuta* hasta los 6 meses de almacenamiento a 4 °C.



**Figura 14.** Vida de anaquel de las formulaciones de *R. minuta* (con  $10^9$  UFC/mL iniciales), almacenadas a 4 °C.

### 5.5. Evaluación de la severidad de antracnosis del mango por análisis de imágenes

En este trabajo se aplicó un sistema de análisis de imágenes para la evaluación cuantitativa y objetiva de manchas de antracnosis. Primeramente, se llevó a cabo la evaluación del desarrollo de antracnosis en función del tiempo de almacenamiento y posteriormente la evaluación de *R. minuta* como agente de control biológico para antracnosis en mangos poscosecha.



## 5.6. Desarrollo de la enfermedad

En este experimento se evaluó el porcentaje del área del fruto afectado por antracnosis de los 4 a los 8 días posteriores a la inoculación del patógeno, bajo condiciones de almacenamiento que favorecieron la enfermedad. Con el sistema de análisis de imágenes fue posible seguir el crecimiento de manchas individuales en cada fruto, el área afectada por antracnosis con respecto a la superficie total del fruto analizado, la distribución de tamaños de manchas en cada fruto y el desarrollo de la enfermedad en la población de frutos del bioensayo.

En la **figura 15** se muestra un ejemplo del seguimiento del crecimiento (en términos del diámetro promedio) de una mancha en una fruta de mango. En este caso se determinó que -al cuarto día de almacenamiento- la mancha que se muestra en las cartografías del fruto tuvo un diámetro promedio de 2.3 mm, la cual incrementó su tamaño a 4.4 mm hacia el octavo día, con una velocidad de crecimiento de 0.52 mm por día. Al analizar la distribución de los tamaños de las manchas (**figura 16**) se encontró que el 60 % de las manchas presentes en ese fruto (en el cuarto día de almacenamiento) tuvieron tamaños en el rango de 2 a 3 mm y, en el día 8, las de tamaños mayores a 5 mm fueron las de mayor frecuencia. Considerando ese mismo fruto, el crecimiento del hongo, afectó menos del 1 % del área total de ese fruto en el cuarto día y el 26 % en el octavo día (**figura 17**). Al evaluar el desarrollo de la enfermedad en la muestra poblacional de frutos en este bioensayo, se determinó que el área afectada por antracnosis fue en promedio menor al 1 % en términos de la superficie total de cada uno de los frutos evaluados y 15 % de los cuatro a los ocho días de almacenamiento, respectivamente (**figura 18**). En el **anexo 2** se muestra el aspecto de los mangos de los 4 a los 8 días de almacenamiento. Fue evidente una alta variación en la severidad de antracnosis entre los 10 frutos analizados. El análisis de varianza y la prueba de comparación múltiple de *Tukey* (Zar, 1999b) de estos resultados, indicaron que pueden encontrarse diferencias significativas (con  $\alpha=0.05$ ) en la severidad de antracnosis (promedio del porcentaje de área con antracnosis) entre el sexto y el octavo día de evaluación al menos en las condiciones de ese experimento (**ver anexo 3**).

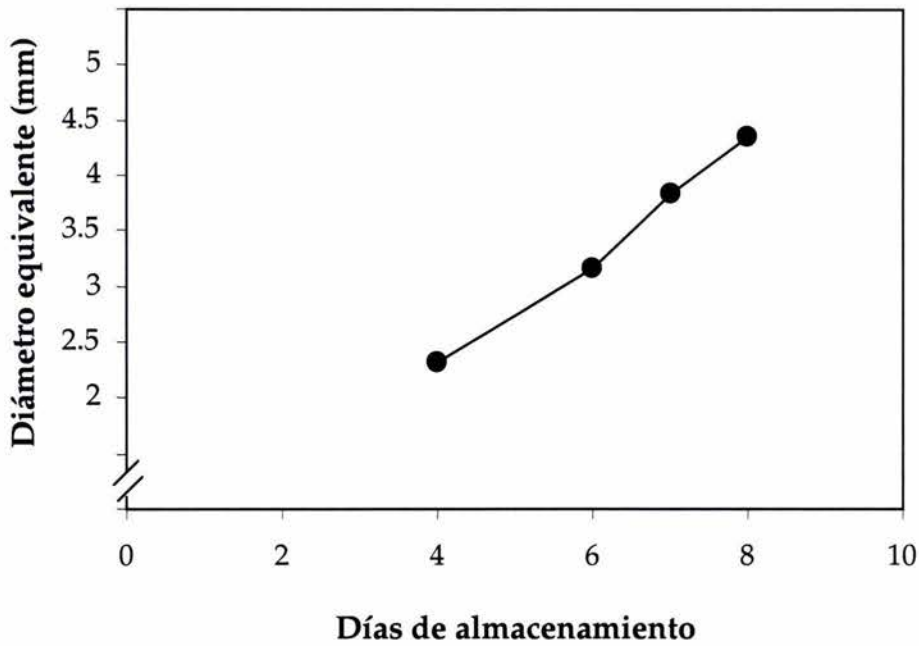


Figura 15. Crecimiento de una mancha de antracnosis en un fruto de mango.

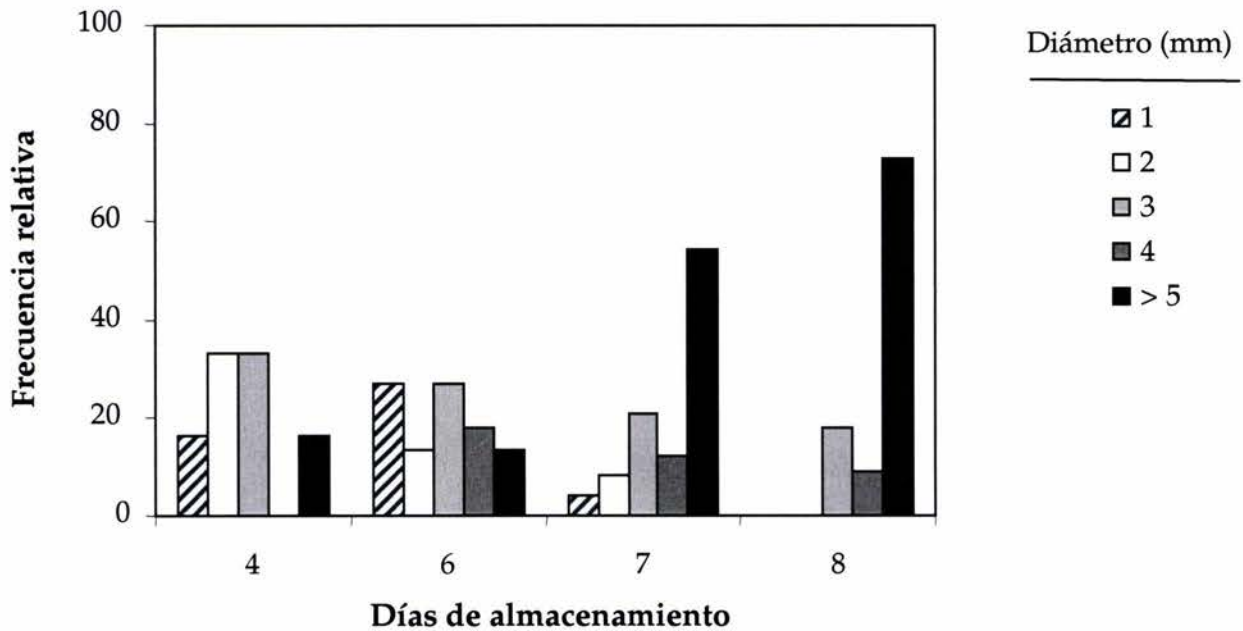


Figura 16. Frecuencia relativa de manchas de antracnosis en un fruto de mango durante 4 días de evaluación.

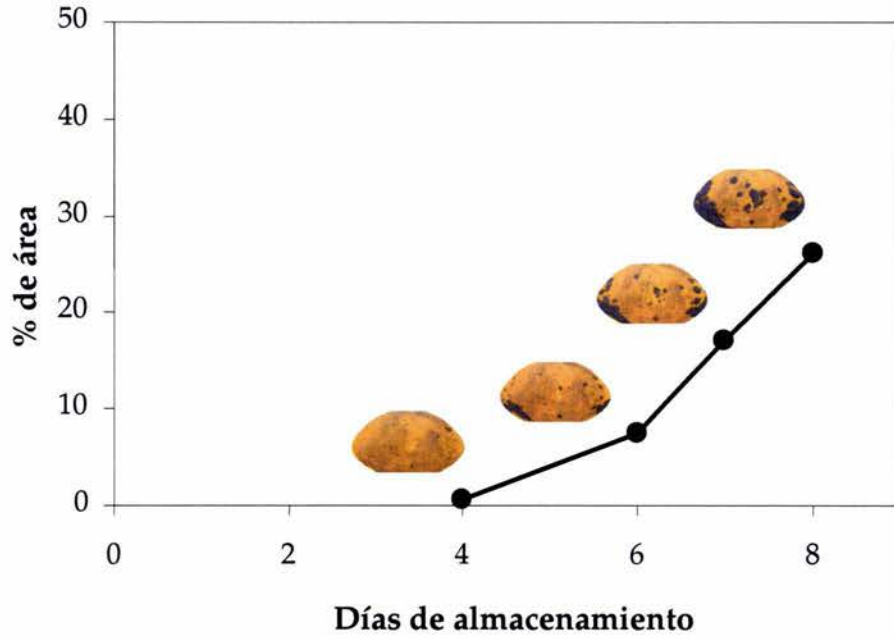


Figura 17. Área afectada por antracosis en un fruto en función del tiempo de almacenamiento.

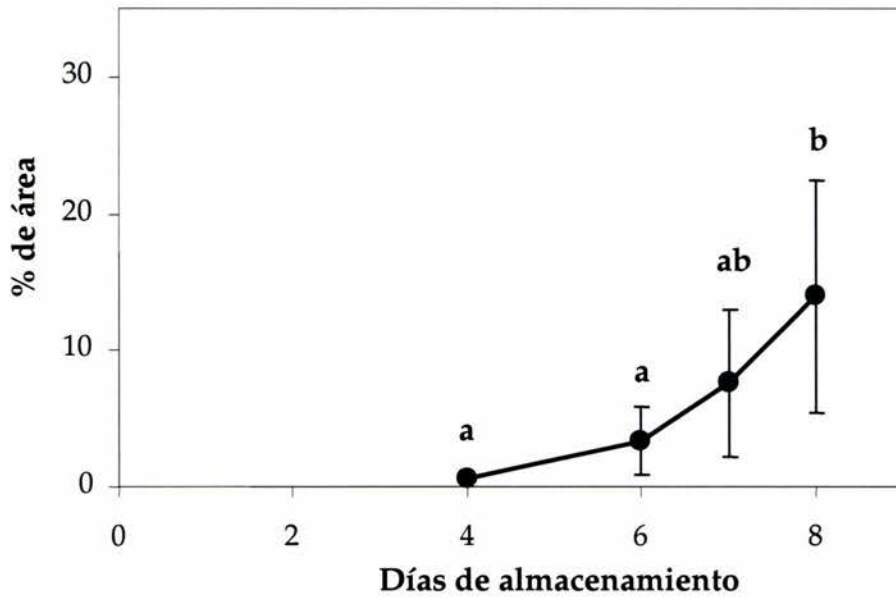


Figura 18. Desarrollo de antracosis en la muestra poblacional en función del tiempo de almacenamiento.

En la **figura 19** se muestra la frecuencia relativa de las manchas de un mismo tamaño en una población de 10 frutos de mango. Se encontró que, en el cuarto día, las manchas de 1.5 mm de diámetro promedio fueron las más frecuentes (frecuencia relativa del 37 %). Entre el día 6 y 7, las más frecuentes fueron las de 2 mm de diámetro promedio, representando el 20 % de todas las manchas evaluadas para ambos días. En el día 8, las de mayor frecuencia fueron aquellas de 3 mm, teniendo una frecuencia relativa del 17 % y manchas menores a 2 mm seguían apareciendo hasta ese día de almacenamiento. Manchas con diámetro promedio en el rango de 10 a 20 mm fueron el 20 % de las manchas presentes en los frutos al término del bioensayo.

Con el análisis de las imágenes fue posible evaluar el crecimiento de las manchas individualmente (solo de manchas que no convergieron con otras manchas durante los días de evaluación) entre diferentes frutos y se encontró que éstas tuvieron comportamiento muy diferente en cuanto a su crecimiento (**figura 20**). Se determinó también de forma muy precisa la frecuencia acumulada de manchas con un mismo tamaño en mangos con el mismo tiempo de almacenamiento y se encontró que fue altamente variable entre los frutos (**figura 21**). En esta misma figura, se muestra, como un ejemplo, el aspecto de los mangos a los 8 días de almacenamiento y como puede apreciarse, hubo alta variación en la severidad de antracnosis entre los frutos aún con el mismo tratamiento.

Típicamente, para la evaluación de antracnosis en frutos de mango poscosecha se hace uso de escalas de niveles de severidad de antracnosis (Smoot y Segall, 1963; Koomen y Jeffries, 1993; Juárez, 2001; Carrillo, 2003). La clasificación de los frutos se basa en las observaciones y la experiencia de los evaluadores y se generan resultados más bien cualitativos y subjetivos, con los cuales se efectúa el análisis estadístico de los resultados. En estas escalas, la mancha de mayor tamaño o el mayor número de manchas determina la severidad de la enfermedad en el fruto. Sin embargo, es posible encontrar frutas con muchas manchas pequeñas u otras con solo una mancha de gran tamaño. En este último caso es probable que la misma fruta sea clasificada en diferente nivel de severidad dependiendo de la escala utilizada para la evaluación, sin importar el área total afectada del fruto por antracnosis. En contraste, con las proyecciones pseudocilíndricas, el número de manchas y la dimensión del área infectada por el hongo, puede obtenerse fácilmente, para cada mancha que aparece sobre la superficie del mango.



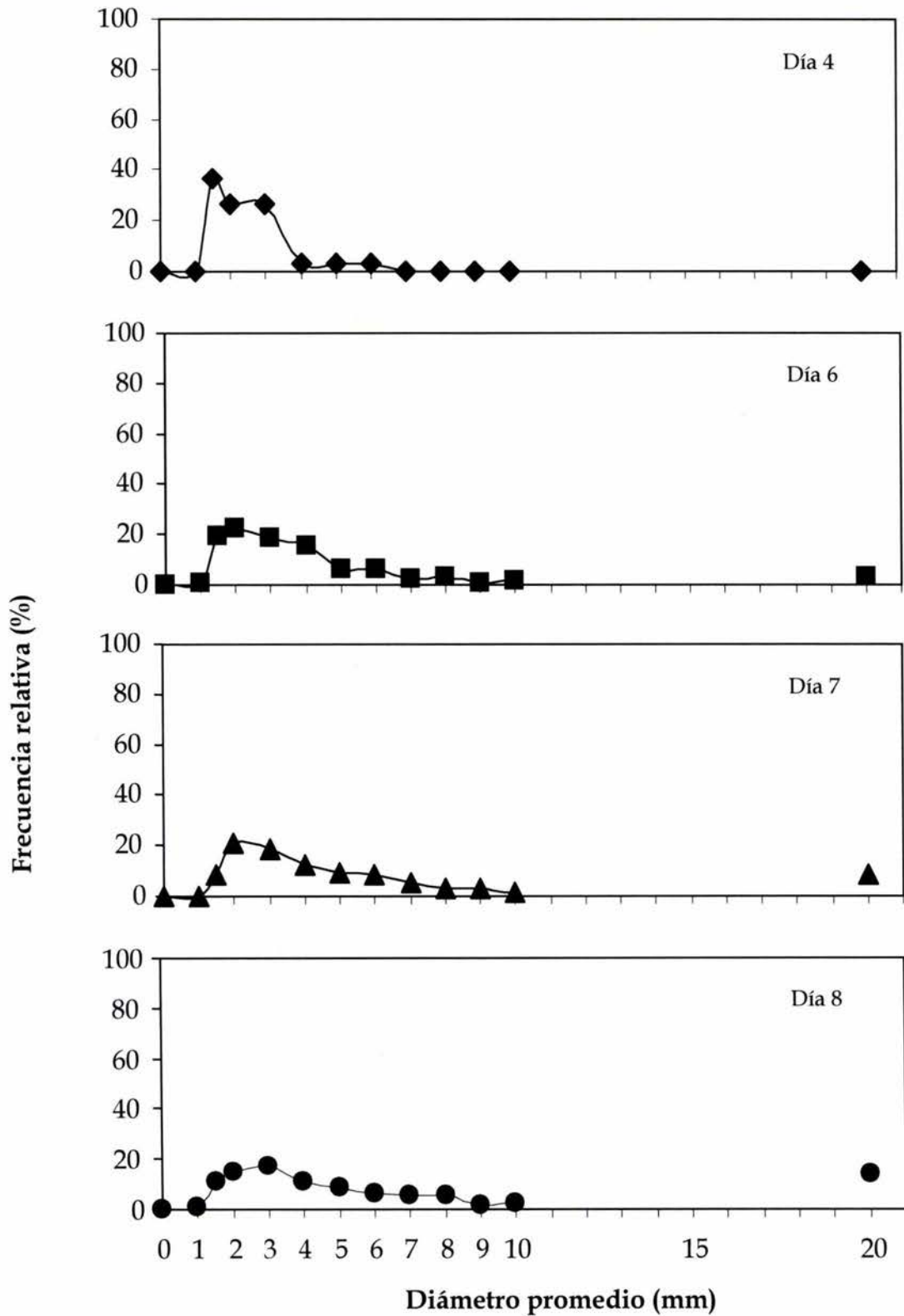


Figura 19. Frecuencia relativa del diámetro de las manchas de antracnosis en una población de 10 frutos de mango en función del tiempo.

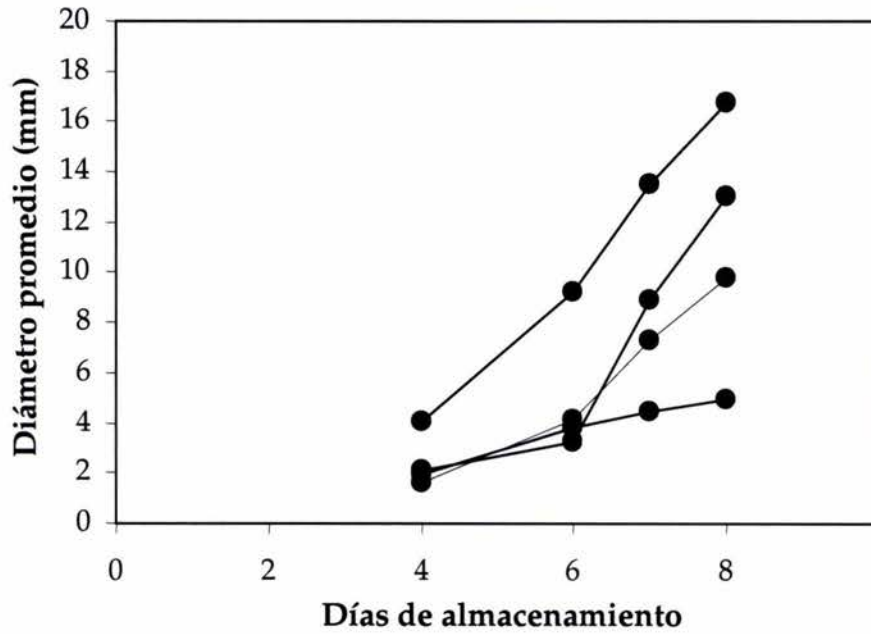
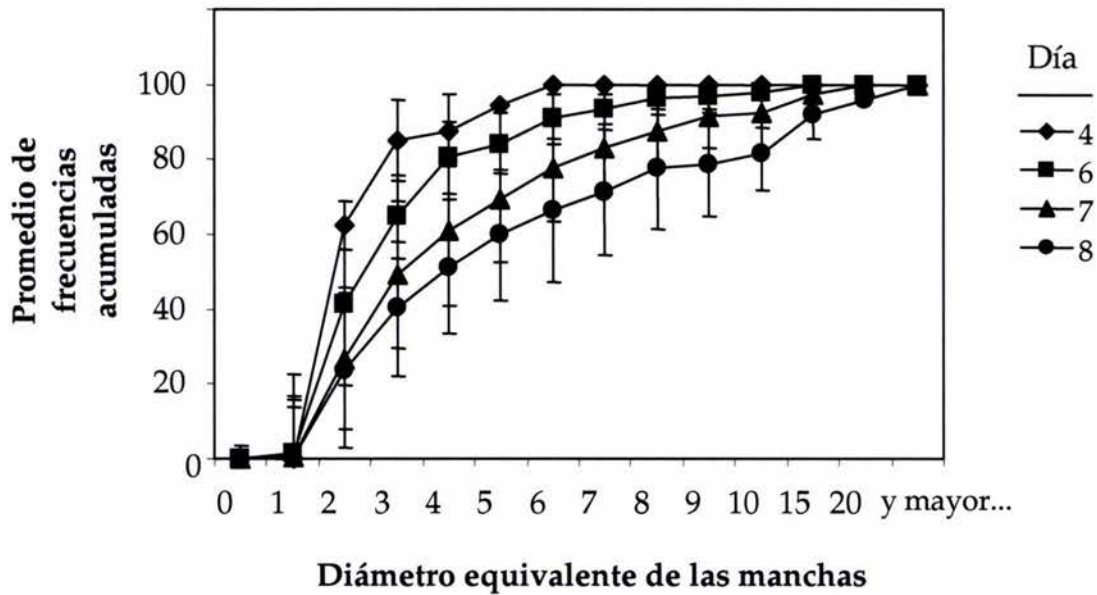


Figura 20. Crecimiento de diferentes manchas de antracnosis en frutos de mango.



Ejemplo: día 8



Figura 21. Frecuencia acumulada del área de las manchas de antracnosis en una población de 10 frutos de mango en función del tiempo.

La técnica de análisis de imágenes aplicada en este trabajo, permitió generar información del desarrollo de la enfermedad *in vivo* en bioensayos poscosecha. Como se demostró, la distribución de frecuencia del tamaño de las manchas puede ser caracterizada de forma muy precisa. En las condiciones probadas, fue evidente que para el mismo día de almacenamiento, el porcentaje de manchas con el mismo tamaño fue altamente variable entre las frutas evaluadas, indicando la gran complejidad del fenómeno. Esta complejidad no puede ser analizada a detalle con el uso de escalas hedónicas (basadas en escalas cualitativas) y cualquier “escala de severidad” podría estar sobresimplificando el fenómeno.

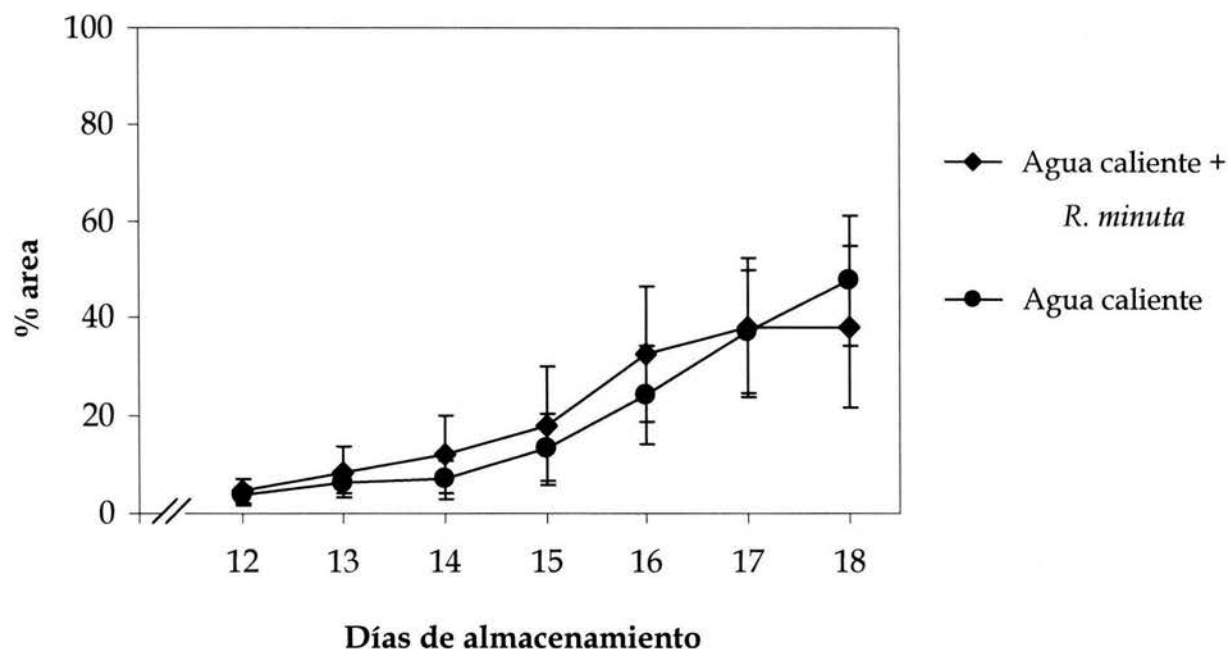
### 5.7. *R. minuta* como tratamiento de control biológico para antracnosis poscosecha

En el desarrollo de sistemas de control biológico, el principal obstáculo ha sido obtener formulaciones que conserven la viabilidad y la eficacia de antagonismo del agente de control biológico durante largos periodos de tiempo. En este trabajo se evaluaron los aspectos de formulación y de evaluación de severidad de la enfermedad usando como modelo de estudio a la levadura *Rhodotorula minuta*, la cual ha sido reportada como un agente de control biológico de la antracnosis que causa el hongo *Colletotrichum gloeosporioides* en el cultivo de mango.

Los resultados encontrados en otros trabajos, bajo otras condiciones experimentales y de análisis de resultados (otros tratamientos de control biológico, evaluación de severidad con escalas hedónicas y análisis estadístico no paramétrico) indican que *R. minuta* es un agente de control biológico para antracnosis en mango (Juárez, 2001; Carrillo, 2003); sin embargo, los datos de severidad han sido generados usando escalas hedónicas. De esta forma, Carrillo (2003) reportó que el control biológico de antracnosis con tratamientos aplicados a frutos en etapa de poscosecha. La aplicación de *R. minuta* en concentración de  $10^8$  UFC/mL, tuvo efectos estadísticamente significativos en el control de la severidad de antracnosis con respecto al tratamiento control (sin aplicación del agente de control biológico). Sin embargo, utilizar esa concentración de levadura en las suspensiones para los tratamientos de control biológico sería poco factible, ya que el volumen del producto formulado incrementaría considerablemente en función del tiempo de almacenamiento del formulado. Por ejemplo, con las condiciones de proceso establecidas por Jiménez (2002) para la producción de biomasa de *R. minuta*, se obtienen alrededor de  $1 \times 10^9$  UFC/mL. Si se produce un volumen de cultivo de 10 L, y consideramos que

perdemos un 40 % de células viables durante el proceso de recuperación de biomasa y resuspensión en 1 L de amortiguador de fosfatos, tenemos un formulado prototipo que contiene  $6 \times 10^9$  UFC/ mL. Entonces, si se cuenta con un formulado cuya concentración sea de  $6 \times 10^9$  UFC/mL, y se requieren 10 L de suspensión celular para hacer un tratamiento poscosecha que implique la inmersión de los frutos en una suspensión con concentración de  $10^8$  UFC/mL, requerimos aproximadamente de 167 mL de ese formulado. Esto significa que un cultivo de 10 L permite preparar aproximadamente 60 litros de una suspensión de *R. minuta* en concentración de  $10^8$  UFC/mL, si la formulación se utiliza antes de que transcurra un mes de almacenamiento a 4 °C. Sin embargo, los resultados de formulación presentados por Jiménez (2002) y los este trabajo, indican que las formulaciones de *R. minuta* conservaron alrededor de  $10^7$  UFC/mL entre los 2 y 6 meses de almacenamiento a 4 °C, por lo tanto el contenido de UFC/mL esos formulados no serían suficientes para llevar a cabo ese tratamiento de control biológico poscosecha. Por lo tanto, en este trabajo, se llevó a cabo un bioensayo para evaluar el efecto en el desarrollo de antracnosis utilizando suspensiones celulares de *R. minuta* con concentración (UFC/mL) de dos órdenes de magnitud menos que lo reportado por Carrillo (2003). Lo anterior representa que se requieren 1.67 mL para preparar 10 L de una suspensión de *R. minuta* en concentración de  $10^6$  UFC/mL, a partir de un formulado con concentración de  $6 \times 10^9$  UFC/mL (con esta concentración en la formulación, un cultivo de 10 L permitiría preparar 602 L para la inmersión de los mangos) ó 1 L de un formulado con 6 meses de almacenamiento que conserve  $1 \times 10^7$  UFC/mL para preparar el mismo volumen (10 L) de suspensión celular.

En la **figura 22** se muestran los resultados del promedio de área (%) afectada por antracnosis en función del tratamiento aplicado para el control de la enfermedad durante 18 días de almacenamiento. En este experimento, los síntomas de antracnosis fueron evidentes a los 12 días posteriores a la inoculación del patógeno. La aparición de las típicas manchas color negro coincidió con la maduración de los frutos, como ocurre normalmente (Bósquez *et al.*, 1996). Con el tratamiento hidrotérmico, el porcentaje promedio de área afectada por antracnosis fue del 4 al 47 % de la superficie total de los frutos de los 12 a los 18 días, respectivamente. El tratamiento hidrotérmico en combinación con la posterior aplicación del agente de control biológico fue del 1 al 38 % entre el día 1 y el día 18 de almacenamiento.



**Figura 22.** Área (%) con antracnosis con respecto a la superficie total del fruto en función del tratamiento.

Los resultados obtenidos por análisis de imágenes mostraron que *R. minuta* en concentración de  $10^6$  UFC/mL no mejoró el control en el desarrollo de antracnosis ya que no se encontraron diferencias significativas (con  $\alpha=0.05$ , ver **anexo 4**) con respecto al tratamiento con agua caliente bajo las condiciones de este experimento. En el **anexo 5** se muestra el aspecto de los mangos en las cartografías de los frutos analizados para este experimento (de los 12 a los 15 días de almacenamiento) y, como puede apreciarse, hubo alta variación en la severidad de antracnosis entre los frutos aún con el mismo tratamiento. Estos resultados indican que las suspensiones para la inmersión de los mangos requieren tener una concentración mayor a  $1 \times 10^6$  UFC/mL para un tratamiento de control biológico poscosecha con esta levadura. Por lo tanto, es necesario que los formulados de *R. minuta* conserven más de  $10^7$  UFC/mL para obtener el mayor rendimiento del volumen del producto formulado. Por lo tanto, aplicar este sistema de análisis de imágenes es una importante alternativa para estandarizar la evaluación de la enfermedad y el análisis de los resultados de otros tratamientos para el control de antracnosis (o de otros sistemas fitopatológicos). Este sistema es particularmente útil para hacer evaluaciones detalladas de laboratorio de enfermedades en sistemas biológicos cuyos síntomas sean la aparición de manchas.

## CONCLUSIONES

- Las suspensiones con  $\eta_{\dot{\gamma}=200 \text{ s}^{-1}} > 60 \text{ cp}$  evitaron la sedimentación de la biomasa de la levadura.
- La alta concentración celular ( $10^{10} \text{ UFC/mL}$ ) en la formulación afectó negativamente la viabilidad de la levadura.
- La adición de glicerol en 20 % (p/v) al amortiguador de fosfatos (formulación con  $a_w=0.980$ ), permitió evitar la contaminación por bacterias que afectaba la calidad del formulado.
- La adición de glicerol (20 % p/v)-xantana (5 g/L) al amortiguador de fosfatos permitió recuperar  $1 \times 10^7 \text{ UFC/mL}$  de un formulado con seis meses de almacenamiento cuando la concentración inicial de *R. minuta* fue de  $10^9 \text{ UFC/mL}$ .
- Se implementó y aplicó un sistema de análisis de imágenes que permite la evaluación de forma objetiva, cuantitativa y detallada de la severidad y evolución de antracnosis en frutos mango en etapa de poscosecha.
- El sistema de análisis de imágenes es particularmente útil para hacer evaluaciones detalladas de laboratorio de enfermedades en sistemas biológicos cuyos síntomas sean la aparición de manchas.
- La aplicación de *R. minuta* en  $10^6 \text{ UFC/mL}$  no fue diferente a un testigo basado en la inmersión de mangos en agua caliente en el control de antracnosis en frutos de mango poscosecha.

## 6 PERSPECTIVAS

Las condiciones de formulación establecidas en este trabajo permitirán la conservación de *R. minuta* con una vida de anaquel de al menos 6 meses y podrían ser evaluadas para la conservación de otras levaduras. Se pretende que el sistema de análisis de imágenes sea aplicado para la evaluación objetiva de la eficacia de diferentes tratamientos para el control (químico y/o biológico) de antracnosis.



## 7 BIBLIOGRAFÍA

- Abadias, M., Teixidó, N., Usall, J., Viñas, I. and Magan, N. (2000). Solute stresses affect growth patterns, endogenous water potentials and accumulation of sugars and sugar alcohols in cells of the biocontrol yeast *Candida sake*. *Journal of Applied Microbiology*, **89**: 1009-1017.
- Abadias, M., Benabarre, A. Teixidó, N. Usall, J. and Viñas, I. (2001). Effect of freeze drying and protectants on viability of the biocontrol yeast *Candida sake*. *International Journal of Food Microbiology*, **65**: 173-182.
- Abadias, M., Usall, J., Teixidó, N. and Viñas, I. (2003). Liquid formulation of the postharvest biocontrol agent *Candida sake* CPA-1 in isotonic solutions. *Phytopathology*, **93**: 436-442.
- Arauz, L. F. (2000). Mango anthracnose: economic impact and current options for integrated management. *Plant Disease*, **84** (6): 600-610.
- Bashan, Y. (1998). Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. *Biotechnology Advances*, **16** (4): 729-770.
- Berny, J. F. and Hennebert, G. L. (1991). Viability and stability of yeast cells and filamentous fungus during freeze drying: effects of protectants and cooling rates. *Mycologia*, **83**: 805-815.
- Bósquez, M. E., Ponce de León, G. L., Días de León, S. F., Kerbel, L. C. y Pérez-Flores, L. P. (1996). Fundamentos fisiológicos de la calidad poscosecha del mango. *Ciencia (México)*, **47**: 138-148.
- Brito, E., López, A. y Galindo, E. (1993). Biopolímeros. En: *Biotecnología Alimentaria*. Quintero, E., López, A. y García-Garibay, M. Eds. Limusa- Noriega Editores, México, D. F., pp. 423-451.

- Bueno, L. y Gallardo, R. (1998). Preservación de hongos filamentosos en agua destilada estéril. *Revista Iberoamericana de Micología*, **15**: 166-168.
- Burges, H. D. (1998). Formulation of mycoinsecticides: Effect of spore concentration on survival. En: *Formulation of Microbial Biopesticides*. Burges, H. D. Ed. Kluwer Academic Publishers, London, pp. 165.
- Carrillo, H. R. (2003). *Rhodotorula minuta* (Saito) Harrison y *Bacillus subtilis* (Ehrenberg) en control biológico de antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides* Penz) del mango (*Mangifera indica* L.). *Tesis de Licenciatura en Ciencias Agropecuarias*. Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Sinaloa.
- Calvente, V., Benuzzi, D. and De Tosetti, M. I. S. (1999). Antagonistic action of siderophores from *Rhodotorula glutinis* upon the postharvest pathogen *Penicillium expansum*. *International Biodeterioration and Biodegradation*, **43** (4): 167-172.
- Calvente, V. Orellano, De M. E., Sansone, G., Benuzzi, D. and De Tosetti, M. I. S. (2001). Effect of nitrogen source and pH on siderophore production by *Rhodotorula* strains and their application to biocontrol of phytopathogenic moulds. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, **43** (4): 167-172.
- Chand-Goyal, T. and Spott, R. A. (1996). Control of postharvest pear diseases using natural saprophytic yeast colonists and their combination with a low dosage of thiabendazole. *Postharvest Biology and Technology*, **7**: 51-64.
- Emmert, E. A. B. and Handelsman, J. (1999). Biocontrol of plant disease: a (Gram-) positive perspective. *FEMS Microbiology Letters*, **171**: 1-9.
- Fraizer, W. C. and Westhoff, D. C. (1993). Alimentos como sustrato de los microorganismos. En: *Microbiología de los Alimentos*. Ed. Acribia. S. A. España. pp. 3-21.

- Freeman, S., Katan, T. and Shabi, E. (1998). Characterization of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose diseases of various fruits. *Plant Disease*, **82** (6): 596-605.
- Galindo, E. (1994). Aspects of the process for xanthan production. *Food and Bioproducts Processing* (Trans. I. Chem. E., part C), **72**: 227-237.
- García-Ochoa, F., Santos, V. E., Casas, J. A. and Gómez, E. (2000). Xanthan gum: production, recovery and properties. *Biotechnology Advances*, **18**: 549-579.
- Gervais, P. Marechal, P. A. and Molin, P. (1992). Effects of the kinetics of osmotic pressure variation on yeast viability. *Biotechnology and Bioengineering*, **40**: 1435-1439.
- Helbig, J. (2001). Field and laboratoy investigations into effectiveness of *Rhodotorula glutinis* (isolate 10391) against *Botrytis cinerea* Pers. Ex Fr. in strawberry. *Journal of Plant Diseases and Protection*, **108** (4): 356-368.
- Inglis, G. D. and Kawchuk, L. M. (2002). Comparative degradation of oomycete, ascomycete and basidiomycete cell walls by mycoparasitic and biocontrol fungi. *Canadian Journal of Microbiology*, **48** (1): 60-70.
- INIFAP (1996). Manual para cultivar mango en la planicie costera del Golfo de México. Folleto técnico núm. 15. División Agrícola, pp. 92-94.
- INIFAP (2002). Guía técnica para la producción de mango en Sinaloa. Folleto técnico núm. 22. División Agrícola, pp. 6-8, 127-128.
- Janisiewicz, W. J. and Korsten, L. (2002). Biological control of postharvest diseases of fruits. *Annual Review of Phytopathology*, **40**: 411-41.
- Jiménez, B. (2002). Estudio de un proceso de fermentación sumergida para la producción de la levadura *Rhodotorula minuta*, antagonista del hongo *Colletotrichum gloeosporioides*, causante de la antracnosis en mango. *Tesis de Ingeniería Química*. Universidad Nacional Autónoma de México (desarrollada en la Planta Piloto del IBT-UNAM).

- Jin, X., Grigas, K., Chen, C., Panda, A. and Matheny, M. L. (1995). Method and composition for producing stable bacteria and bacterial formulations. *United States Patent*: 5,733,774.
- Jones, K.A. and Burges, H. D. (1998). Principles of formulation: Technology of formulation and application. En: *Formulation of Microbial Biopesticides*. Burges, H. D. Ed. Kluwer Academic Plubishers, London, pp. 7-30.
- Juárez, R. C. (2001). Microorganismos antagonistas para el control de antracnosis en mango cultivado en Sinaloa. *Tesis de Maestría en Ciencias de la Producción Agrícola*. Universidad Autónoma de Sinaloa.
- Kahmann, R. and Basse, C. (2001). Fungal gene expression during pathogenesis-related development and host plant colonization. *Current Opinion in Microbiology*, **4**: 374-380.
- Koch, E. (1999). Evaluation of commercial products for microbial control soil borne plant diseases. *Crop Protection*, **18**: 119-125.
- Koomen, I. and Jeffries, P. (1993). Effects of antagonistic microorganisms on the post-harvest development of *Colletotrichum gloeosporioides* on mango. *Plant Pathology* , **42**: 230-237.
- Korsten, L., De Villiers, E. E. Wehner, F. C. and Kotzé, J. M. (1997). Field sprays of *Bacillus subtilis* and fungicides for control of preharvest fruit diseases of avocado in South Africa. *Plant Disease*, **81**: 455-459.
- Krauss, U., Matthews, P., Bidwell, R., Hocart, M. and Anthony, F. (2001). Strain discrimination by fungal antagonists of *Colletotrichum musae*: implications for biocontrol or crown rot of banana. *Mycological Research*, **105** (1): 67-76.
- Matthews, G. A. (1992). Formulaciones. En: *Métodos para la aplicación de pesticidas*. Ed. C.E.C.S.A. México, pp. 57-75.

- Mora, A. A. Téliz, O. D. y Rebouças, S. J. (2002). Importancia del mango. En: *El mango: manejo y comercialización*. Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas y Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, México-Brasil.
- Ninni, I. Camargo, M. S. and Meireles, J.A. (2000). Water activity in polyol systems. *Journal of Chemistry Engineering Data*, 45: 654-660.
- Patiño-Vera, M., Allende R., Ortiz, M., García, R., Carrillo, A., Jiménez, B. Albiter, V. y Galindo, E. (2001). Identificación y caracterización de microorganismos con potencial antagonismo contra *Colletotrichum gloeosporioides*, causante de antracnosis en mango. *Memorias del IX Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería*. Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería, Veracruz, Ver. Clave OVI-5.
- Patiño V. M., Albiter, V., Ortiz, M., Jiménez, B., García, R., Carrillo, A., Allende, R. y Galindo, E. (2002). Escalamiento y desarrollo de dos formulados microbianos para su uso como agentes de control biológico para la antracnosis en mango. *Memorias del 3er Simposio Internacional Sobre Ingeniería de Bioprocesos*. Cuernavaca, Morelos.
- Paulitz, T. C. and Bélanger, R. R. (2001). Biological control in greenhouse systems. *Annual Review of Phytopathology*, 39: 103-33.
- Prusky, D. (1996). Pathogen quiescence in postharvest diseases. *Annual Review of Phytopathology*, 34: 413-34.
- Pusey, P. L. and Wilson, C. L. (1984). Postharvest biological control of stone fruit brown rot by *Bacillus subtilis*. *Plant Disease*, 68: 753-756.
- Rodney, G. R. (1994). Integrating biological control into postharvest disease management strategies. *HortScience*, 29 (7): 758-762.

- Sanders, G. M., Korsten, L. and Wehner, F. C. (2000). Survey of fungicide sensitivity in *Colletotrichum gloeosporioides* from different avocado and mango production areas in South Africa. *European Journal of Plant Pathology*, **106**: 745-752.
- Smoot, J. J. and Segall, R. H. 1963. Hot water as a postharvest diseases of selected commodities. In: Kader, A. A. Ed. *Postharvest Technology of Horticultural crops*. University of California Oakland, California. Pp. 117-160.
- Spalding, D. H. (1982). Resistance of mango pathogens to fungicides used to control postharvest diseases. *Plant Disease*, **66**: 1185-1186.
- Spiegel, M. R. (1991). Análisis de varianza: Experimentos de factor único. En: *Estadística*. Ed. McGraw-Hill/ Interamericana. España, pp. 375.
- Torres, R., Usall, J., Teixidó, N., Abadias, M. and Viñas, I. (2003). Liquid formulation of the biocontrol agent *Candida sake* by modifying water activity or adding protectants. *Journal of Applied Microbiology*, **94**: 330-339.
- Usall, J., Teixidó, N., Torres, R. Ochoa, X. and Viñas, I. (2001). Pilot test of *Candida sake* (CPA1) applications to control postharvest blue mold on apple fruit. *Postharvest Biology and Technology*, **21**: 147-156.
- Viñas, I. Usall, J. Teixidó, N. and Sanchis, V. (1998). Biological control of major postharvest on apple with *Candida sake*. *International Journal of Food Microbiology*, **40**: 9-16.
- Wiemken, A. (1990). Trehalose in yeast, stress protectant rather than reserve carbohydrate. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **58**: 209-217.
- Wisniewski, M. E. and Wilson, C. L. (1992). Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables: recent advances. *HortScience*, **27** (2): 94-98.

Zar, J. H. (1999a). Two-factor analysis of variance: Nonparametric randomized block or repeated-measures analysis of variance. En: *Biostatistical analysis*. Ed. Prentice-Hall, Inc., U.S.A., pp. 263-266.

Zar, J. H. (1999b). Multiple comparisons. En: *Biostatistical analysis*. Ed. Prentice-Hall, Inc., U.S.A., pp. 208-214.

Página de Internet:

Commercial biocontrol products available for use against plant pathogens.  
<http://www.oardc.ohio-state.edu/apsbcc/productlist.htm>

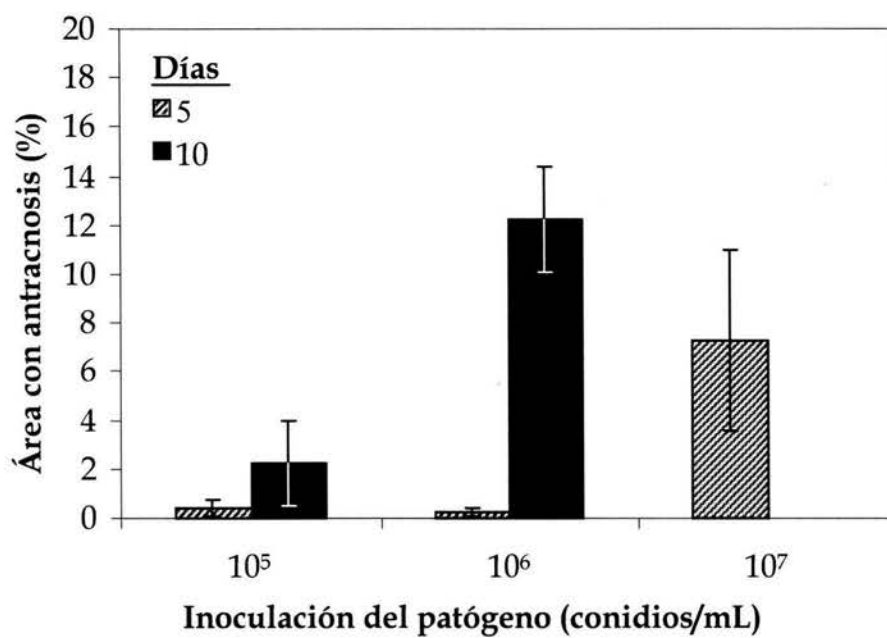


## ANEXO 1

### Severidad de antracnosis en frutos de mango en función de la concentración del patógeno.

Se llevaron a cabo bioensayos con mangos variedad "Haden" que fueron desinfectados superficialmente sumergiéndolos en una solución de hipoclorito de sodio al 1% por 10 minutos. Posteriormente, se llevó a cabo la infección artificial rociándolos con suspensiones de *C. gloeosporioides* con  $10^5$ ,  $10^6$  o  $10^7$  conidios/mL. Los frutos se dejaron secar y se almacenaron en condiciones de temperatura y humedad relativa (HR) que favorecieron el desarrollo de la enfermedad (25 °C y 95 % HR). El tratamiento testigo, consistió en mangos desinfectados y sin la posterior aplicación del patógeno. Se utilizaron 4 mangos por cada tratamiento.


































En este experimento se evaluó el porcentaje del área del fruto afectado por antracnosis a los 5 y 10 días posteriores a la inoculación del patógeno (**figura a**). Después de cinco días se observó que -para la inoculación con  $10^5$  y  $10^6$  conidios/mL- el área del mango afectada por antracnosis fue menor al 1 %, mientras que con  $10^7$  conidios/mL fue del 7.2 %. A los diez días, el área afectada por antracnosis fue de 2.2 y 12.3 % con la inoculación de  $10^5$  y  $10^6$  conidios/mL, respectivamente. Para los frutos inoculados con  $10^7$  conidios/mL no fue posible evaluar la enfermedad debido al muy rápido desarrollo de la enfermedad bajo esas condiciones, en contraste para el tratamiento testigo (mangos desinfectados pero sin la aplicación del patógeno) no fueron evidentes las características manchas de antracnosis aún a los diez días de almacenamiento en condiciones de alta temperatura y humedad relativa. Dado que la infección artificial con  $10^6$  conidios/mL de *C. gloeosporioides* permitió la mejor evaluación del área de los frutos afectada por antracnosis con el sistema de análisis de imágenes, esta concentración de patógeno fue la seleccionada para llevar a cabo bioensayos posteriores.



**Figura a.** Evaluación con análisis de imágenes del área (%) con antracnosis en frutos de mango en función de la concentración del patógeno.

## ANEXO 2

Cartografías pseudocilíndricas de los mangos infectados con  $10^6$  conidios/ mL de *C. gloeosporioides*. Evaluación del desarrollo y severidad (%) de la infección de los 4 a los 8 días de almacenamiento. Los números al lado de las cartografías indican el porcentaje del área con manchas, respecto al área total del fruto.

Días de almacenamiento			
4	6	7	8
 0.6 %	 8 %	 17 %	 26 %
 0.4 %	 5 %	 12 %	 19 %
	 0.7 %	 2 %	 7 %
 0.6 %	 7 %	 14 %	 28 %
	 4 %	 7 %	 16 %
	 0.2 %	 1 %	 3 %
	 2 %	 4 %	 9 %
	 0.8 %	 1 %	 5 %
	 2 %	 6 %	 11 %
	 5 %	 11 %	 20 %

**Nota:** los cuadros que no tienen cartografía, implica que no fueron tomadas las imágenes del fruto, debido a que no se observaron síntomas de antracnosis en ese día de almacenamiento.

## ANEXO 3

### Análisis de varianza de un factor

En un experimento de un factor, las medidas (u observaciones) se obtienen para  $a$  grupos independientes de muestras, donde el número de medidas en cada grupo es  $b$ . Entonces hablamos de  $a$  tratamientos, cada uno de los cuales tiene  $b$  repeticiones o replicas (Spiegel, 1991). Este análisis se aplicó para los datos presentados en la figura 17 para evaluar la existencia de diferencias estadísticamente significativas de la severidad antracnosis entre los días de evaluación. Se consideraron como tratamientos los días de almacenamiento (4 tratamientos) y para cada uno de los cuales se evaluaron 10 réplicas.

#### Resumen del análisis

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Día 4	3	1.60	0.53	0.02
Día 6	10	34.04	3.4	6.72
Día 7	10	77.09	7.70	31.77
Día 8	10	142.89	14.28	78.15

Dónde:

$H_0: \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \mu_4$  : El promedio de área (%) afectada por antracnosis fue la misma entre los días de evaluación.

$H_a: \mu_1 \neq \mu_2 \neq \mu_3 \neq \mu_4$  : El promedio de área (%) afectada por antracnosis fue diferente entre los días de evaluación.

## Origen de las variaciones

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados $S^2$	$F_{\text{calculado}}$	Probabilidad	Valor crítico para $F$
Entre grupos	772.69	3	257.56	7.11	0.0010057	2.93
Dentro de los grupos	1049.93	29	36.20			
Total	1822.63	32				

El análisis de varianza de un factor indicó que el valor de  $F_{\text{calculado}}$  es mayor que el valor crítico para  $F$ , por lo tanto, la  $H_0: \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \mu_4$  fue rechazada.

Para conocer la diferencias, se llevó a cabo la prueba de comparación múltiple de *Tukey* para grupos con diferente número de muestras (Zar, 1999b). Esta prueba es utilizada para determinar entre cuales medias existen diferencias comparando la hipótesis nula  $H_0: \mu_B = \mu_A$  contra la hipótesis alternativa  $H_A: \mu_B \neq \mu_A$ , donde los subíndices indican cualquier posible combinación de par de grupos, entre los  $k$  grupos de datos. El primer paso en el análisis es arreglar y numerar las medias en orden de magnitud creciente.

Posteriormente, calcular las diferencias entre pares de medias ( $X_B - X_A$ ) y el error estándar (SE) con  $SE = \sqrt{\frac{s^2}{n}}$  para  $n_A = n_B$  o  $SE = \sqrt{\frac{s^2}{2} \left( \frac{1}{n_A} + \frac{1}{n_B} \right)}$  para  $n_A \neq n_B$ .

El valor de  $q$  se calcula dividiendo la diferencia entre las medias por error estándar con la siguiente fórmula:

$$q = \frac{X_B - X_A}{SE}$$

Si el valor calculado de  $q$  es igual o mayor que el valor crítico ( $q_{\alpha, v, k}$  de las tablas de distribución para  $q$ ), entonces  $H_0: \mu_B = \mu_A$  se rechaza.



Entonces para la prueba tenemos que,

Muestra (i)	1	2	3	4
Arreglo de medias (%) por orden de magnitud ( $X_i$ )	0.53	3.4	7.71	14.29
Tamaño de la muestra (n)	3	10	10	10

Número de grupos	$k=4$
promedio de los cuadrados dentro de los grupos	$s^2 = 36.20$
grados de libertad	$\nu=29$
nivel de significancia	$\alpha=0.05$

Como  $n_1 \neq n_2$ ,  $n_1 \neq n_3$ ,  $n_1 \neq n_4$  el error estándar es de 2.80, y como  $n_2=n_3=n_4$  el error estándar es de 1.90.

Para probar cada  $H_0: \mu_B = \mu_A$ ,

Comparación (B vs A)	Diferencia ( $X_B - X_A$ )	SE	q	q $\alpha, \nu, k$ q 0.05, 29, 4	Conclusión
$H_0: \mu_4 = \mu_1$	13.76	2.8	4.91	3.901	rechazada
$H_0: \mu_4 = \mu_2$	10.89	1.9	5.73	3.901	rechazada
$H_0: \mu_4 = \mu_3$	6.58	1.9	3.46	3.901	aceptada
$H_0: \mu_3 = \mu_1$	7.18	2.8	2.56	3.901	aceptada
$H_0: \mu_3 = \mu_2$	4.31	1.9	2.26	3.901	aceptada
$H_0: \mu_2 = \mu_1$	2.87	2.8	1.02	3.901	aceptada

Con la prueba de Tukey se define que hay 2 poblaciones:  $\mu_1 = \mu_2 = \mu_3$ ,  $\mu_4 \neq \mu_3$ . Lo cual suele ocurrir para diseños experimentales con 4 grupos. El análisis no fue suficiente para definir a que población de frutos pertenece la media del grupo 3 (frutos con 7 días de almacenamiento) con respecto a las otras medias. Sin embargo, se puede concluir que  $\mu_4 \neq \mu_2 = \mu_1$ .

## ANEXO 4

### Análisis de varianza de un factor

El análisis de varianza de un factor también se aplicó para los datos presentados en la figura 21 para evaluar la existencia de diferencias estadísticamente significativas de la severidad antracnosis en función del tratamiento poscosecha (*R. minuta* o agua caliente). Se utilizaron los datos del día 17 de almacenamiento para ambos tratamientos evaluados.

#### Resumen del análisis

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
<i>R. minuta</i> (10 <sup>6</sup> UFC/mL)	8	185.3	23.16	761.29
Agua caliente	6	137	22.8	454.16

Dónde:

¿Existen diferencias significativas de la severidad antracnosis entre el tratamiento poscosecha con agua caliente y *R. minuta* (10<sup>6</sup> UFC/mL)?

**Hipótesis nula :** No existen diferencias significativas de la severidad antracnosis entre el tratamiento poscosecha con agua caliente y *R. minuta* (10<sup>6</sup> UFC/mL). Los tratamientos son iguales.

**Hipótesis alternativa:** Sí existen diferencias en la severidad antracnosis entre el tratamiento poscosecha con agua caliente y *R. minuta* (10<sup>6</sup> UFC/mL). Los tratamientos son diferentes.

*Origen de las variaciones*






















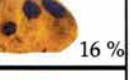





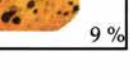
<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F<sub>calculado</sub></i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
<i>Entre grupos</i>	0.371	1	0.37	.000587	0.98	4.74
<i>Dentro de los grupos</i>	7599.9	12	633.32			
<i>Total</i>	7600	13				

El análisis indicó que el valor de  $F_{\text{calculado}}$  es menor que el valor crítico para  $F$ , por lo tanto, se acepta la hipótesis nula: no existen diferencias significativas de la severidad antracnosis entre los tratamientos para ese día de almacenamiento.

## ANEXO 5
































Cartografías pseudocilíndricas de los frutos de dos diferentes tratamientos poscosecha para el control de antracnosis: baño de agua caliente (55°C, 5 min, **tabla a**) y control biológico con *R. minuta* (10<sup>6</sup> UFC/mL, **tabla b**). Desarrollo de los 12 a los 18 días de almacenamiento a 20 °C y 80% HR. Los números al lado de las cartografías indican el porcentaje del área con manchas, respecto al área total del fruto.

**Tabla a.** Baño de agua caliente (55°C, 5 min)

Días de almacenamiento						
12	13	14	15	16	17	18
 2 %	 3 %	 6 %	 13 %	 27 %	 43 %	 52 %
	 6 %	 10 %	 19 %	 33 %	 52 %	 70 %
		 3 %	 5 %	 13 %	 27 %	
		 1 %	 3 %	 6 %	 10 %	 16 %
				 0.2 %	 1 %	 9 %
				 2 %	 4 %	 9 %

**Nota:** los cuadros que no tienen cartografía, implica que no fueron tomadas las imágenes del fruto, debido a que no se observaron síntomas de antracnosis en ese día de almacenamiento o a que el avanzado desarrollo de la enfermedad no permitía el manejo de los frutos para el análisis de imágenes.

**Tabla b.** Control biológico con *R. minuta* ( $10^6$  UFC/mL).

Días de almacenamiento						
12	13	14	15	16	17	18
 11%	 20%	 36%	 46%	 63%	 77%	
	 2%	 3%	 4%	 6%	 15%	 31%
 1%	 3%	 6%	 26%	 42%	 53%	
		 2%	 4%	 9%	 19%	 30%
				 0.2%	 2%	 6%
				 0.1%	 0.3%	 1%
					 2%	 4%

**Nota:** los cuadros que no tienen cartografía, implica que no fueron tomadas las imágenes del fruto, debido a que no se observaron síntomas de antracnosis en ese día de almacenamiento o a que el avanzado desarrollo de la enfermedad no permitía el manejo de los frutos para el análisis de imágenes.