

## PATOGENICIDAD DE *Rhizopus* sp. Y *Alternaria* sp. EN FRUTOS DE PERA Y MANZANA DURANTE POSTCOSECHA

Dagoberto Guillén-Sánchez<sup>1</sup>, Jesús Cuauhtemoc Hernández Toledano<sup>1</sup>, Daniel Nieto-Angel<sup>2</sup>, Marcelo Acosta-Ramos<sup>3</sup>, Víctor López-Martínez<sup>4</sup>, Iran Alía Tejacal<sup>4</sup>, Carlos Manuel Acosta Durán<sup>4</sup>.

<sup>1</sup>Universidad Autónoma del estado de Morelos, Campus Oriente, Nicolás Bravo s/n, Parque industrial Cuautla, Xalostoc, Morelos, México CP 62700. Correspondencia: [dagoquillen@yahoo.com](mailto:dagoquillen@yahoo.com);

<sup>2</sup>Especialidad de Fitopatología, Instituto de Fitosanidad, Colegio de Postgraduados. Km 36.5 Carr. México-Texcoco, Montecillo, Edo. de México, CP 56230;

<sup>3</sup>Departamento de Parasitología Agrícola, Universidad Autónoma Chapingo, Km 38.5 Carr. México-Texcoco, Chapingo, México, CP 56230;

<sup>4</sup>Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Av. Universidad 1001, Chamilpa, Cuernavaca, Morelos.

**Palabras clave:** *Postcosecha, severidad, incidencia, Malus domestica, Pyrus communis.*

---

### INTRODUCCIÓN

En el proceso productivo de un cultivo existen factores que pueden influir en el éxito o fracaso del producto final que es la cosecha. Las prácticas de cultivo se pueden realizar con eficiencia y obtener una buena producción, pero si durante y después de la cosecha no se hacen las actividades en forma correcta, todo el esfuerzo y recursos financieros invertidos pueden perderse en un tiempo breve (Agris, 1991).

Los factores que se deben considerar durante y después de la cosecha para tener un producto de calidad son la técnica de cosecha, sistema de

transporte, empaque y almacenamiento. Durante este periodo las enfermedades postcosecha constituyen un elemento muy importante porque además de que reducen la cantidad de la cosecha, también afectan considerablemente la calidad. La mayoría de los productos agrícolas, sean estos granos, frutos, vegetales, tubérculos, etc. son afectados por patógenos postcosecha con diferente grado. Las peras y manzanas no son la excepción. (Kampp, 1994).

Las enfermedades postcosecha de frutos y vegetales causan grandes pérdidas en la producción de alimentos (El-Ghaouth *et al.*, 1997). Más de 90

especies de hongos han sido descritas que causan pudriciones en manzanas durante el almacenamiento. Dos enfermedades postcosecha importantes son el moho azul causado por *Penicillium expansum* y el moho gris causado por *Botrytis cinerea*. Ambos organismos son patógenos que entran por heridas que causan extensas pérdidas postcosecha en todas las regiones donde se cultivan manzanas (Leibinger *et al.*, 1997).

Las principales enfermedades postcosecha que afectan a los frutos pomáceos son el moho azul (*Penicillium expansum*), moho gris (*Botrytis cinerea*), pudrición blanda (*Rhizopus stolonifer*), pudrición café (*Alternaria* spp) y pudrición amarga (*Glomerella cingulata*) (Janisiewicz, 1991; Creemers, 1989). Algunas veces se pueden encontrar más de un patógeno en un fruto podrido o bien la lesión puede ser invadida por organismos saprofitos, lo cual muchas veces pueden confundir en el diagnóstico de la enfermedad porque no se está seguro cual de los patógenos presentes es el responsable de la pudrición.

Los objetivos de este trabajo fueron aislar, identificar y realizar pruebas de patogenicidad de patógenos postcosecha involucrados en pudriciones de frutos de peras y manzanas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se obtuvieron frutos podridos de manzana y pera en el mercado de Texcoco, Estado de México. Los frutos se colocaron en cámara húmeda para

estimular la esporulación de los patógenos y realizar el aislamiento.

**Aislamiento.** Se cortaron fracciones de frutos de aproximadamente un cm<sup>2</sup> con una navaja de afeitar desinfectada, cuidando que se incluyera tejido sano y enfermo. Los tejidos se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 1.5 % durante 2 min, posteriormente se lavaron tres veces con agua destilada estéril durante 2 min. Después se secaron con papel absorbente estéril y se sembraron en Papa-Dextrosa-Agar (PDA) (40 g L<sup>-1</sup> agua, Bioxon®). Se colocaron cuatro fracciones de tejido por caja petri, se sellaron con kleen pack y colocaron a temperatura ambiente bajo luz blanca. Cuando se apreció el crecimiento de los patógenos, se hicieron reaislamientos en PDA para incrementar las colonias. Se determinó la frecuencia de aislamientos para cada patógeno y se purificaron las colonias.

**Identificación de los patógenos.** Se realizaron preparaciones temporales, para observar al microscopio compuesto, mediante "cintazos" con Diurex que posteriormente se colocaron sobre lactofenol en un portaobjeto. La identificación de los patógenos se hizo mediante claves taxonómicas.

**Cultivos monospóricos.** Los cultivos monospóricos se obtuvieron de colonias puras en esporulación de aproximadamente 15 d de edad. Una cantidad pequeña de micelio con esporulación se obtuvo con una aguja de disección y se suspendió en 10 mL de agua destilada estéril. La suspensión conidial se vertió en dos cajas de petri con agua agar durante 10 s en cada una y posteriormente se desechó. El exceso de agua se eliminó de las cajas al

colocarlas en forma invertida sobre toallas de papel, se sellaron con papel plástico (KleenPack®). Las colonias monospóricas de 24 h de edad fueron extraídas y colocadas en cajas de petri con PDA (una colonia/caja) que se sellaron e incubaron a  $20 \pm 2$  °C.

**Pruebas de patogenicidad.** Frutos de pera cultivar 'Anjou' y manzanas 'Golden Delicious' se adquirieron en la Central de abastos de la ciudad de México. Se seleccionaron frutos uniformes en tamaño y madurez (buen tamaño y lo mas verdes posible), sin daños y pudriciones.

**Preparación del inóculo.** Se vertieron 10 mL de agua destilada estéril en una caja petri con crecimiento monospórico y esporulación de los patógenos, se adicionó una gota de tween y se homogenizó con una aguja de disección, posteriormente la suspensión conidial se pasó por una delgada capa de algodón para eliminar restos de micelio y la suspensión se colocó en un tubo de ensayo, la cual constituyó la suspensión madre.

**Conteo del inóculo.** La concentración de conidios  $\text{mL}^{-1}$  de la suspensión madre se realizó con un hematocitómetro. Posteriormente se procedió a calcular la concentración deseada ( $100\ 000$  conidios  $\text{mL}^{-1}$ ) que se usó en la inoculación, de esta manera se aseguró que en una gota de suspensión se encontraran aproximadamente  $10\ 000$  conidios. El cálculo se realizó con la formula  $V_1C_1=V_2C_2$ , donde:

$V_1$ = Volumen de la suspensión madre  
 $C_1$ = Concentración (conidios  $\text{mL}^{-1}$ ) de la suspensión madre

$V_2$ = Volumen de la concentración deseada a inocular (10 mL)

$C_2$ = Concentración deseada, es la que se usó en la inoculación ( $100\ 000$  conidios  $\text{mL}^{-1}$ ).

$V_1 = V_2C_2/C_1$

Una vez calculado el volumen de la suspensión madre, se aforó a 10 mL con agua destilada estéril.

**Preparación de los frutos.** Para evaluar la severidad se realizó una herida circular de aproximadamente 3 mm de grosor con una aguja de disección en la parte central de una cara de los frutos. Para evaluar la incidencia se hicieron cinco heridas por fruto. Cada herida fue identificada con una marca realizada con un plumón de tinta de aceite. Los frutos se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 2 % durante cinco min, posteriormente se lavaron con agua destilada estéril por cinco minutos. Se secaron con toallas de papel absorbente estériles. Para evaluar incidencia se utilizaron cinco frutos de pera y cinco de manzana, mientras que para evaluar severidad se usaron cuatro frutos de cada especie para cada patógeno.

**Inoculación.** En cada herida se colocó una gota de la suspensión conidial con una pipeta pasteur y en el testigo se colocó una gota de agua destilada estéril.

**Incubación.** En platos de unicel se colocaron sanitas estériles húmedas, sobre éstas se colocaron tapas de caja petri de plástico esterilizadas y en cada tapa se colocó un fruto inoculado. Cada tratamiento se colocó en un plato. Los platos con los frutos se colocaron dentro de bolsas de polietileno transparente

para crear una atmósfera de alta humedad relativa, que son las condiciones óptimas para conseguir la infección. En todo el ensayo se mantuvo una humedad relativa alta dentro de la cámara húmeda.

**Variables determinadas.** La incidencia de las infecciones se evaluó dos veces por día hasta que se alcanzó el 100 %. Una infección se consideró exitosa cuando el grosor de la lesión fue de 2 mm. La severidad se evaluó cada 24 h hasta que la mayoría de la cara del fruto fue afectada y se hizo midiendo el diámetro de la lesión con un vernier.

**Reaislamientos.** Una vez que se culminó con las evaluaciones se procedió a realizar reaislamientos de los patógenos, para lo cual se siguió la metodología utilizada en los aislamientos al inicio del experimento.

**Diseño experimental.** Se usó un diseño completamente al azar. La unidad experimental fue un fruto con cuatro repeticiones, una herida por fruto para evaluar la severidad. Para evaluar incidencia fueron cinco frutos con cinco heridas por cada uno. Con los datos de severidad se realizó prueba de medias (Tukey,  $\alpha=0.5$ ) y se determinó el área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE) y la ABCPE estandarizada (ABCPE<sub>E</sub>) con la duración de la enfermedad. Se realizó prueba de medias del ABCPE y ABCPE<sub>E</sub>.

## RESULTADOS Y DISCUSION (AVANCES)

Identificación de los patógenos. Los patógenos aislados de los frutos de pera

correspondieron a *Rhizopus* sp. y *Alternaria* sp. Y en manzana solo sólo se aisló a *Alternaria* sp, con los cuales se realizaron las pruebas de patogenicidad.

**Frecuencias de aislamientos.** Para el caso de *Rhizopus* sp se obtuvo una frecuencia del 95 % en fruto de pera y 90 % para *Alternaria* sp en pera y manzana.

**Incidencia.** *Rhizopus* sp. en frutos de pera infectó el 100 % de heridas 57 h después de la inoculación (HDI), mientras que *Alternaria* sp lo realizó hasta las 113 HDI. En frutos de manzana *Alternaria* sp. alcanzó 100 % de incidencia 64 HDI. Estos resultados indican que los dos patógenos afectan los frutos de pera, variando en el periodo de incubación, lo cual se puede deber a las características patogénicas y a su capacidad reproductiva. *Rhizopus* sp en frutos de pera presentó el periodo de incubación más breve (Cuadro 1).

**Severidad.** En esta variable evaluada se determinó que *Rhizopus* sp. es más agresivo que *Alternaria* sp. porque a partir de las 45 h después de la inoculación, el tamaño de las lesiones siempre fue mayor y al final del periodo de evaluación (237 HDI) sus lesiones alcanzaron un diámetro de aproximadamente 9 cm en frutos de pera, muy superior al presentado en las lesiones inducidas por *Alternaria* sp. (Cuadro 1) que al final sus lesiones alcanzaron un diámetro de aproximadamente 5.5 cm.

En frutos de pera las lesiones causadas por *Rhizopus* sp presentaron una tasa de crecimiento 0.37 mm/día, mientras que las causadas por *Alternaria* sp

fueron de 0.23 mm/día. Estos resultados muestran la rapidez con que los patógenos colonizan los frutos y nos da

una idea de que en un tiempo breve pueden causar grandes pérdidas durante el periodo poscosecha.

Cuadro 1. Progreso promedio de las lesiones (diámetro en mm) inducidas por patógenos postcosecha en frutos de pera cv 'Anjou'.

Patógeno	Horas después de la inoculación									
	21	45	69	93	117	141	165	189	213	237
<i>Rhizopus</i>	5	9.2	15.2	23.1	32.3	40.5	50.8	64.2	69.5	89.2
<i>Alternaria</i>	5.5	8.5	11.2	12.8	22.8	27.7	33.7	41.3	46.2	55.6

Cuadro 2. Progreso promedio de las lesiones (diámetro en cm) inducidas por *Alternaria* sp en frutos de manzana cv 'Golden Delicious'.

Tamaño lesión (mm)	Horas después de la inoculación									
	59	83	107	131	155	179	203	227	251	275
	5.75	9.3	10.3	15.5	17.2	21.6	24.3	29.0	33.8	43.0

En frutos de manzana las lesiones inducidas por *Alternaria* sp presentaron una tasa de progreso de 0.15 mm/día (Cuadro 2).

Considerando la incidencia y severidad se puede decir que *Rhizopus* sp. resultó más agresivo que *Alternaria* sp en frutos de pera, mientras que *Alternaria* sp. presentó un comportamiento similar tanto en frutos de pera como en manzana.

*Rhizopus* sp y *Alternaria* sp causaron pudriciones blandas durante el desarrollo de las lesiones hasta que llegó un momento en que el tejido se rompió y empezó a escurrir un líquido amarillo con olor fermentado. También sobre las lesiones se observó una

abundante esporulación de los dos patógenos. Para el caso de *Rhizopus* sp no se observó crecimiento micelial pero sí abundante formación de esporangios. En las lesiones inducidas por *Alternaria* sp. se observó un crecimiento micelial de color blanco-gris (datos no mostrados).

*Rhizopus* sp presentó el crecimiento más rápido en medio de cultivo. Sus colonias son de color gris, sin mucho desarrollo micelial, pero con abundante esporulación. Las colonias de *Alternaria* sp. fue menor en velocidad de crecimiento que *Rhizopus* sp. Sus colonias fueron de color café claro y posteriormente café oscuro cuando presentó esporulación.

Las pudriciones blandas causadas por *Rhizopus stolonifer* se presentan en todo el mundo y afecta órganos carnosos de hortalizas, ornamentales y frutos cosechados, y es importante solo durante el almacenamiento, transporte y venta en el mercado de estos productos (Agrios, 1991). Este patógeno vive como saprofito y en ocasiones como un parásito débil. Casi todas las pudriciones blandas son causadas por este patógeno (Romero, 1988).

Para que ocurra la infección por estos hongos se requiere de heridas frescas y de que las esporas germinen antes de que se forme la lámina corchosa que restaura las heridas. Si esto se logra, la pudrición del sustrato es muy rápida (de 4 a 6 días) (Romero, 1988).

*Alternaria* sp. causa manchas en frutos de calabaza y manzana, pudrición del corazón de frutos de manzana y pudriciones de limones y naranjas. Los frutos afectados por este hongo casi siempre son atacados cuando se aproximan a la madurez. Inverna como micelio en los restos de plantas infectadas y en forma de esporas o micelio en semillas. Las esporas germinadas penetran a los tejidos susceptibles directamente o a través de heridas (Agrios, 1991). AK-toxin I es la principal toxina específica al hospedante producida por *A. alternata* de peras japonesas (*Pyrus pyrifolia*) causando la enfermedad mancha negra (Yanase y Nakatsuka, 1999). Causa infecciones latentes en frutos verdes donde el hongo penetra la cutícula de frutos jóvenes. La invasión es restringida a las células más superficiales, en donde el hongo permanece quiescente y continúa su desarrollo después de que el fruto empieza a madurar.

## CONCLUSIONES

*Rhizopus* sp. y *Alternaria* sp. causaron pudriciones blandas en frutos de pera y manzana durante poscosecha de 4.3 a 9.0 cm de diámetro durante nueve días. *Rhizopus* sp fue más agresivo que *Alternaria* sp en frutos de pera al colonizar más rápido los tejidos.

## LITERATURA CITADA

Agrios, G. N. 1991. Manual de enfermedades de las plantas. Editorial Limusa, México, D.F. 756 p.

Creemers, P. 1989. Chemical control parasitic storage diseases on apple and pear. *Acta Horticulturae* 258:645-653.

El-Ghaouth, A., Wilson, C.L., and Wisniewski, M. 1997. Antifungal activity of 2-deoxy-D-glucose on *Botrytis cinerea*, *Penicillium expansum*, and *Rhizopus stolonifer*. Ultrastructural and cytochemical aspects. *Phytopathology* 87:772-779.

Janisiewicz, W., Yourman, L., Roitman, J., and Mahoney, N. 1991. Postharvest control of blue mold and gray mold of apples and pears by dip treatment with pyrrolnitrin, a metabolite of *Pseudomonas cepacia*. *Plant Dis.* 75:490-494.

Kampp, J. 1994. Biological control of postharvest diseases of apples and pears. *Acta Horticulturae* 368:69-76.

Leibinger, W., Breuker, B. Hanhn, M. And Mendgen, K. 1997. Control of postharvest pathogens and colonization of the apple surface by antagonistic

microorganisms in the field.  
Phytopathology 87:1103-1110.

Romero, C. S. 1988. Hongos fitopatógenos. Universidad Autónoma Chapingo, Dirección de Patronato Universitario, A.C. 347 p.

Yanase, E. y Nakatsuka, S.I. 1999. Suppression of the AK-toxin productivity by *Alternaria alternata* Japanese pear pathotype by addition of unnatural beta-methyl phenylalanine. Proceedings-of-the-Kansai-Plant-Protection-Society 41:23-26.