

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA
Facultad de Ingeniería



Comparación del efecto antagonista de los bio controladores (BM® y Serenade®) aplicados en papaya Kaya Paya® (*Carica Papaya*) para retrasar los defectos de calidad del fruto en la post cosecha

Trabajo de graduación presentado por Belmaris Estefania Donis Salazar para optar al grado académico de Licenciada en Ciencias de los Alimentos

Guatemala,
2021

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA
Facultad de Ingeniería



Comparación del efecto antagonista de los bio controladores (BM® y Serenade®) aplicados en papaya Kaya Paya® (*Carica Papaya*) para retrasar los defectos de calidad del fruto en la post cosecha

Trabajo de graduación presentado por Belmaris Estefania Donis Salazar para optar al grado académico de Licenciada en Ciencias de los Alimentos


Guatemala,
2021

Vo.Bo.

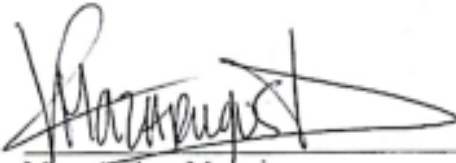


Msc. Ana Alicia Paz

Tribunal examinador:



Msc. Ana Silvia Colmenares



Msc. Andrea Mazariegos



Msc. Ana Alicia Paz

Fecha de aprobación del examen de graduación:

(Guatemala, 8 de diciembre de 2021)

Prólogo

El proyecto “Comparación del efecto antagonista de los bio controladores (BM® y Serenade®) aplicados en papaya Kaya Paya® (*Carica Papaya*) para retrasar los defectos de calidad del fruto en la post cosecha” se realizó en la planta de procesamiento “La Carreta”, una de las divisiones de negocios de Agropecuaria Popoyán, S.A.

“La Carreta” se dedica a la comercialización de una gran variedad de frutas y verduras, entre ellas la papaya Kaya Paya® (*Carica Papaya*), conocida cariñosamente en la empresa solamente como Kaya Paya®. La Kaya Paya® es variedad Tainung que se caracteriza por su gran sabor, dulzura y textura. Al comparar la variedad Tainung con la Maradol, que es su antecesora, la vida de anaquel es más larga lo que permite expandir los periodos de comercialización. Además, dentro de las variedades de papaya Maradol, Tainung, Sunrise y Hawaiana (híbrido), se reporta que la variedad más susceptible a antracnosis es Maradol.

Esta investigación tomó lugar al examinar los registros de pérdidas de la Kaya Paya® donde se analizó la merma de producción (la que se tiene en “La Carreta”) y la merma de ventas (la que se tiene en puntos de venta), donde se determinó que la merma del fruto ascendía el 30% del total de ingresos y se deben principalmente a defectos de calidad provocados por fitopatógenos. La enfermedad que ha mostrado mayor incidencia es la antracnosis causada por el hongo *Colletotrichum sp.*

La antracnosis se manifiesta como manchas anulares que son puntos focales para la pudrición y pérdida de turgencia; también puede presentar una colonización de hongos. El fitopatógeno se encuentra latente durante en estadios de maduración tempranos, pero a medida que el fruto va madurando el hongo comienza a desarrollarse junto con el fruto. Además, cualquier tipo de estrés del medio como temperatura, humedad o golpes pueden provocar que la incidencia de la enfermedad sea mucho más severa. La antracnosis en la Kaya Paya® ha significado una disminución en la vida de anaquel ya que con los defectos de calidad antes mencionados comprometen la calidad del fruto además de repercutir en la intensión de compra del cliente. También se han visto afectada de manera directa al cumplimiento de la demanda por los reprocesos y desvíos de materia prima que provocan los defectos de calidad en los frutos.

Debido a la importancia de esta problemática para todos los involucrados en la cadena de valor de la Kaya Paya® se decidió iniciar una investigación para conocer a profundidad la problemática y tratar de buscar una solución en la postcosecha. Como una alternativa preliminar se propuso tratar con bio controladores como un método de control biológico en los frutos y así retrasar los defectos de calidad causados por fitopatógenos. Los bio controladores propuestos son BM® y Serenade®. El control biológico es una alternativa comprometedora para el tratamiento de enfermedades en cultivos por lo que una investigación continua de este tema es fundamental para brindar soluciones efectivas y sostenibles en especial en Guatemala, que es un país meramente agrícola. Con esta investigación se tuvo la satisfacción de analizar metodologías y detallar resultados que puedan ser de ayuda para futuras experimentaciones en el mismo ámbito.

Durante el siguiente trabajo de graduación se analizaron posibles soluciones a los problemas post cosecha de las papayas Kaya Paya® (*Carica Papaya*) en Guatemala.

El primer agradecimiento es a Dios por permitir finalizar este proyecto de manera oportuna.

Gracias a Agropecuaria Popoyán, entidad a la que se le agradece abrir sus puertas para realizar esta investigación. Se tiene un agradecimiento especial a:

- Ing. Andrea Mazariegos por su guía e introducción a su equipo de trabajo durante toda la investigación, sus enseñanzas siempre me acompañaran.
- Doc. Vinicio Mendoza por su recepción e interés en el desarrollo del proyecto, muchísimas gracias por el apoyo.
- Ing. Joaquín Melgar por su ayuda para dar inicio al proyecto y por la confianza brindada, siempre le estaré agradecida.
- Al equipo del Centro de Excelencia Microbiano que estuvo involucrado.
- Ing. Josue Lopez por su colaboración en la realización de las pruebas en frutos y la ayuda en el área de campo.
- A Rosa Santos, Fernanda Flores, Katerin Ruiz y Lucia Ortega por la ayuda brindada.
- A todo el equipo operativo de “La Carreta” por la cálida bienvenida y su colaboración con todas las pruebas realizadas en la planta de procesamiento.

También agradezco cordialmente a la Universidad del Valle de Guatemala por todo el apoyo brindado durante el proyecto, gracias a todos los profesionales del departamento de Alimentos que me dieron el regalo de sus conocimientos, en especial a:

- Msc. Ing. Ana Alicia Paz por su constante consejo para obtener un trabajo de calidad, su asesoramiento y guía fueron vitales para poder avanzar y finalizar con éxito.
- Lic. Ana Silvia Colmenares por su disposición y seguimiento durante todo el proyecto, también agradezco la ayuda que me brindo para ingresar a la licenciatura.
- Lic. Víctor Hugo Jiménez por sus correcciones en el planteamiento del protocolo.

Un agradecimiento especial a mi familia por su esfuerzo y confianza.

- Gracias a mi madre Reina Salazar por su consejo, guía e impulso.
- A mi padre Román Donis por su sabiduría y consejos técnicos del área agrícola.
- A mis hermanas Jenifer Donis y Denisse Donis por sus observaciones y enseñanzas.

A mis compañeros

- Antonio Recinos por las sugerencias y puntos de vista durante la experimentación.
- Andrea Veliz y Monica Avalos por apoyarme durante el proceso.
- Rocío Diaz, Javier Samayoa, Juan José Orellana y Andrea Estrada por la continua ayuda que nos brindamos para avanzar en el proceso de tesis.

ÍNDICE

Prólogo	V
Listado de figuras	IX
Listado de ecuaciones	X
Listado de cuadros	XI
Resumen	XIV
Abstract	XV
I. Introducción	1
II. Antecedentes	2
A. Producción a nivel mundial de papaya (<i>Carica Papaya</i>).....	2
B. Importancia económica de la papaya a nivel mundial	2
C. Principales problemáticas de los cultivos de papaya a nivel mundial	3
D. El proceso de producción de papaya (<i>Carica Papaya</i>) y pérdidas asociadas ...	3
E. Consumo de papaya (<i>Carica Papaya</i>) y beneficios para la salud	5
F. Producción de papaya (<i>Carica Papaya</i>) en Guatemala	6
G. Producción de papaya en Petén	6
H. Problemática en “La Carreta”	7
I. Estudios relacionados con las pérdidas post cosecha de papaya (<i>Carica Papaya</i>)	10
J. Uso de biocontroladores en la post cosecha de papaya (<i>Carica Papaya</i>)	11
K. Objetivos del desarrollo del milenio	12
III. Justificación	14
IV. Objetivos	15
V. Hipótesis	16
VI. Marco teórico	17
A. Papaya (<i>Carica Papaya</i>)	17
B. Descripción botánica de la papaya (<i>Carica Papaya</i>)	17
C. Principales afecciones de la plantación.....	18
D. BM®	25
E. Serenade ®	25
F. Métodos de análisis estadístico	28

G. Métodos de análisis microbiológicos.....	30
VII. Metodología	37
A. Fase de identificación de microorganismos en el fruto	38
B. Fase de antagonismo.....	40
C. Fase de pruebas en frutos	41
VIII. Discusión y resultados	42
IX. Conclusiones	67
X. Recomendaciones.....	68
XI. Referencias bibliográficas	70
XII. Anexos.....	76
Parte I. Obtención de muestras vegetales	76
Parte II. Inoculación del microorganismo	78
Parte III. Sembrado de tejido	80
Parte IV. Caracterizar microorganismos predominantes.....	81
Parte V. Antagonismo <i>In Vitro</i>	81
Parte VI. Pruebas en frutos	82
Parte VII. Fase 1 de la metodología: Identificación de microorganismos en el fruto	84
Parte VIII. Fase 2 de la metodología: Antagonismo	94
Parte IX. Fase 3 de la metodología: Pruebas en frutos.....	127
Parte X. Metodología a seguir si los microorganismos usados resultan ser antagonistas de los fitopatógenos presentes en frutos	164
Parte XI. Análisis visual e imágenes importantes durante la investigación	172

Listado de figuras

Figura 1. Cartilla de maduración de papaya.....	8
Figura 2. Mermas de papaya	9
Figura 3. Defectos de calidad en rechazo de papaya	9
Figura 4. Síntomas típicos de antracnosis en los frutos	22
Figura 5. Manifestación de la meleira en los frutos de papaya mediante chorros de latex..	24
Figura 6. Manifestación de meleira en la carnaza de la papaya	25
Figura 7. Metodología para retardar los defectos de calidad de la papaya Kaya Paya® (Carica Papaya).....	37
Figura 8. Características de las muestras de papayas seleccionadas	77
Figura 9. Documentación de vida útil de frutos de papaya.....	77
Figura 10. Procedimiento de hisopado de papayas.....	78
Figura 11. Preparación solución diluyente (solución amortiguadora de fosfatos)	79
Figura 12. Preparación de agua peptonada 0.1%.....	79
Figura 13. Procedimiento para el sembrado de Tejido	80
Figura 14. Metodología para determinar el grado de antagonismo de un bio controlador en frutos	164
Figura 15. Fases de la metodología	165
Figura 16. Metodología para la fase de identificación de microorganismos en el fruto.....	165
Figura 17. Metodología para la fase de antagonismo completa	168
Figura 18. Metodología para la fase de pruebas en frutos completa	170

Listado de ecuaciones

Ecuación 1. Porcentaje de inhibición de microorganismo	81
--	----

Listado de cuadros

Cuadro 1. Crecimiento del sector papayero de Petén Guatemala, proyecto de agronegocios de Misión Taiwán	7
Cuadro 2. Diferentes especies de antracnosis y su manifestación en frutos	22
Cuadro 3. Información sobre propiedades físicas y químicas básicas.	27
Cuadro 4. Ejemplos de microorganismos antagonistas que inhiben el desarrollo micelial de fitopatógenos	34
Cuadro 5. Apariencia de los frutos de los 5 grupos de papayas el día del hisopado y sembrado de tejido para fase de caracterización de fitopatógenos en el fruto	43
Cuadro 6. Recuento de hongos y bacterias de los 5 grupos de papayas analizadas en el hisopado	48
Cuadro 7. Crecimiento de hongos de las muestras de tejido de los frutos de los 5 grupos de interés	50
Cuadro 8. Identificación de bacterias aisladas del hisopado de los 5 grupos de papayas analizados.	52
Cuadro 9. Identificación de hongos aislados de los hisopados y del sembrado de tejido de los 5 grupos analizados de papayas.....	55
Cuadro 10. Resultado de antagonismo de hongos fitopatógenos detectados contra las bacterias Bacillus Safensis (BM®) y Bacillus Subtilis (Serenade®)	57
Cuadro 11. Vida útil promedio de los frutos de papaya almacenados a temperatura ambiente y refrigeración tratados con BM®, Serenade® y sin tratamiento	63
Cuadro 12. Análisis ANOVA de 2 factores para determinar la significancia de las variables y su interacción en la vida útil de las papayas.....	64
Cuadro 13. Identificación y descripción de los grupos seleccionados de papayas para el análisis inicial	76
Cuadro 14. Matriz de decisión para la reducción de opciones de microorganismos.....	81
Cuadro 15. Defectos de calidad en papaya Kaya Paya ® (Carica Papaya)	82
Cuadro 16. Apariencia de papayas del grupo 1 durante el almacenamiento controlado a temperatura ambiente.....	84
Cuadro 17. Apariencia de papayas del grupo 2 durante el almacenamiento controlado a temperatura ambiente.....	87
Cuadro 18. Recuento y caracterización de bacterias de los hisopados de papayas de los 5 grupos de interés.	88
Cuadro 19. Recuento y caracterización de hongos de los hisopados de papayas de los 5 grupos de interés.....	89
Cuadro 20. Caracterización morfológica de los hongos presentes en la pulpa de papayas de los 5 grupos de interés.....	91
Cuadro 21. Proceso de separación de microorganismos en crecimiento mixto	92
Cuadro 22. Caracterización morfológica de antagonistas Bacillus Safensis (BM®) y Bacillus Subtilis (Serenade®) en agar y en microscopio	94
Cuadro 23. Ejemplo de antagonismos positivos de Bacillus Safensis (BM®)	95
Cuadro 24. Antagonismo bacteria contra bacteria, Organismos compitiendo: BM vs. Staphylococcus sp.....	96

Cuadro 25. Antagonismo bacteria contra bacteria, organismos compitiendo: Staphylococcus sp. vrs. BM.	98
Cuadro 26. Antagonismo bacteria contra bacteria, organismos compitiendo: BM vrs. Brevibacterium sp.	99
Cuadro 27. Antagonismo bacteria contra bacteria, organismos compitiendo: Brevibacterium sp vrs. BM.	101
Cuadro 28. Antagonismo bacteria contra bacteria, organismos compitiendo: BM vrs. Bacillus sp.	103
Cuadro 29. Antagonismo bacteria contra bacteria, organismos compitiendo: BM vrs. Bacillus sp.	104
Cuadro 30. Antagonismo bacteria contra bacteria, organismos compitiendo: Bacillus sp. vrs. BM.	106
Cuadro 31. Antagonismo bacteria contra bacteria, organismos compitiendo: BM vrs. Microbacterium sp.	108
Cuadro 32. Antagonismo bacteria contra bacteria, organismos compitiendo: Microbacterium sp. vrs. BM.	109
Cuadro 33. Antagonismo bacteria contra bacteria, organismos compitiendo: BM VRS. Rhodococcus sp.	111
Cuadro 34. Antagonismo bacteria contra bacteria, organismos compitiendo: Rhodococcus sp vrs. BM.	113
Cuadro 35. Antagonismo hongo contra bacteria, organismos compitiendo: Colletotrichum sp. vrs. BM en medio NA.	114
Cuadro 36. Antagonismo hongo contra bacteria, organismos compitiendo: Colletotrichum sp. vrs. BM, en medio PDA.	116
Cuadro 37. Antagonismo hongo contra bacteria, organismos compitiendo: Colletotrichum sp. vrs. Serenade, en medio NA.	118
Cuadro 38. Antagonismo hongo contra bacteria, organismos compitiendo: Colletotrichum sp. vrs. Serenade, en medio PDA.	119
Cuadro 39. Antagonismo hongo contra bacteria, organismos compitiendo: Fusarium solani vrs. BM, en medio NA.	121
Cuadro 40. Antagonismo hongo contra bacteria, organismos compitiendo: Fusarium solani vrs. BM, en medio PDA.	122
Cuadro 41. Antagonismo hongo contra bacteria, organismos compitiendo: Fusarium solani vrs. Serenade, en medio NA.	124
Cuadro 42. Antagonismo hongo contra bacteria, organismos compitiendo: Fusarium solani vrs. Serenade, en medio PDA.	125
Cuadro 43. Vida útil de papayas con tratamiento de BM® que se mantuvieron en temperatura de refrigeración y ambiente.	127
Cuadro 44. Vida útil de papayas con tratamiento de BM® que estuvieron en refrigeración.	132
Cuadro 45. Vida útil de papayas con tratamiento de Serenade® que se mantuvieron en temperatura de refrigeración y ambiente.	139
Cuadro 46. Vida útil de papayas con tratamiento de Serenade® que estuvieron en refrigeración.	144

Cuadro 47. Vida útil de papayas sin tratamiento que se mantuvieron en temperatura de refrigeración y temperatura ambiente	150
Cuadro 48. Vida útil de papayas sin tratamiento que estuvieron en refrigeración	155
Cuadro 49. Días de vida útil de cada muestra de papaya tratada con BM®, Serenade® y sin tratamiento (testigo) almacenadas a temperatura ambiente y en refrigeración	162
Cuadro 50. Análisis de datos de papayas almacenadas a temperatura ambiente	162
Cuadro 51. Análisis de datos de papayas almacenadas en refrigeración	162
Cuadro 52. Cuantificación de totales de datos de los grupos de variables temperatura y tratamiento.....	162
Cuadro 53. Análisis de varianza de 2 factores (Temperatura y tratamiento) para determinar si existe una diferencia significativa en la vida útil de las papayas de los grupos	163
Cuadro 54. Parámetros de falta de calidad de la merma de producción	172
Cuadro 55. Papaya Kaya paya® en supermercados de Guatemala	172

Resumen

La papaya (*Carica papaya*) es una especie de importancia en los trópicos por el alto rendimiento y valor nutritivo de su fruto además que es una fruta apetecida por su agradable sabor. Guatemala es el cuarto productor más grande a nivel Mesoamérica, la producción en el país se concentra en Petén que cuenta con las condiciones climáticas adecuadas para el cultivo. Además, la región tiene la ventaja de estar libre de la mosca blanca del mediterráneo por lo que se tiene facilidad para la exportación.

A pesar de todas las ventajas ambientales, climáticas y geográficas, la papaya tiene una serie de problemáticas asociadas al cultivo como virus, hongos, bacterias y una serie de fitopatógenos que limitan su comercialización y producen pérdidas significativas a los productores. Entre los fitopatógenos que con mayor frecuencia se asocian a la papaya son las especies del género *Colletotrichum sp* causantes de la antracnosis.

La empresa guatemalteca “La Carreta” se dedica a la venta y distribución de frutas y verduras en Guatemala, Honduras, El Salvador y Nicaragua. Entre los frutos que comercializa se encuentra la papaya Kaya Paya® (*Carica Papaya*). Este producto insignia de la marca, está presentando altos niveles de pérdidas post cosecha por defectos de calidad como pudrición del fruto, pérdida de turgencia y colonización de microorganismos como antracnosis. La colonización de fitopatógenos afecta la calidad del fruto, pero las heridas causadas en los frutos los vuelve susceptibles al ataque de patógenos dañinos para los seres humanos.

Las pérdidas post cosecha de la papaya han desencadenado una serie de problemáticas como pérdida de clientes, notas de crédito por incumplimiento, perdida de material de empaque, gasto de recursos ambientales en campo, reproceso, aumento de gastos de logística por los cambios en tiendas, venta en canales de venta secundarios a un precio menor ya que en promedio un 30% de los frutos que se desperdician por la severidad de los defectos de calidad. Esta problemática no solo tiene un eje económico sino también uno social, ya que en Guatemala uno de cada dos niños sufre algún grado de desnutrición por lo que disminuir el desperdicio de alimentos debe ser una meta con la que todas las empresas de la cadena de valor de los alimentos deben comprometerse.

Para poder proponer soluciones a esta problemática ya hay numerosos estudios donde se detallan métodos en la post cosecha que pueden minimizar las perdidas por ataques de fitopatógenos, como tratamientos de ácidos en solución, tratamientos térmicos de los frutos o inclusive el uso de recubrimientos especiales. Una de las propuestas más innovadoras que se ha empleado para tratar las enfermedades en el cultivo de la papaya (*Carica Papaya*) es el uso de biocontroladores. El fundamento de esta técnica es la introducción de microorganismos benéficos para controlar la población de otros microorganismos presentes en el medio. Su uso ha sido efectivo en el cultivo, pero son limitados los estudios que han determinado su efectividad en las aplicaciones post cosecha. El fin de esta investigación es poder ampliar la información disponible sobre el uso de bio controladores en la post cosecha de frutos como la papaya y poder ser de utilidad para métodos de control postcosecha de “La Carreta”.

Abstract

Papaya (*Carica papaya*) is a species of importance in the tropics due to the high yield and nutritional value of its fruit, as well as being a fruit that is desired for its pleasant taste. Especially in Guatemala, which is the fourth largest producer in Mesoamerica, production in the country is concentrated in Petén, which has suitable climatic conditions for cultivation. In addition, the area has the advantage of being free from the Mediterranean whitefly, so it is easy to export.

Despite all the environmental, climatic, and geographical advantages, papaya has a series of problems associated with cultivation such as viruses, fungi, bacteria and a series of phytopathogens that limit its commercialization and cause significant losses to producers. Among the phytopathogens most frequently associated with papaya are the species of the genus *Colletotrichum sp* that cause anthracnose.

The Guatemalan company "La Carreta" is dedicated to the sale and distribution of fruits and vegetables in Guatemala, Honduras, El Salvador, and Nicaragua. Among the fruits it sells is the Kaya Paya® papaya (*Carica Papaya*). This flagship product of the brand is presenting high levels of post-harvest losses due to quality defects such as fruit rot, loss of turgor and colonization of microorganisms such as anthracnose. The colonization of phytopathogens affects the quality of the fruit, but the wounds caused in the fruits make them susceptible to the attack of pathogens that are harmful to humans.

The post-harvest losses of papaya have triggered a series of problems such as loss of customers, credit notes due to non-compliance, loss of packaging material, reprocessing, increased logistics expenses due to changes in stores, sales in secondary sales channels to a lower price without counting on average 30% of the fruits that are wasted due to the severity of the quality defects they present. This problem not only has an economic axis but also a social one, since in Guatemala one in two children suffers some degree of malnutrition, so food waste should be a goal with which all companies in the value chain of food must compromise.

To propose solutions to this problem, there are already numerous studies that detail post-harvest methods that can minimize losses due to phytopathogen attacks, such as acid solutions in solution, heat treatments of fruits or even the use of special coatings. One of the most innovative proposals that has been used to treat diseases in papaya (*Carica Papaya*) is the use of bio controllers. The foundation of this technique is the introduction of beneficial microorganisms to control the population of other microorganisms present in the environment. Its use has been effective in cultivation, but studies that have determined its effectiveness in post-harvest applications are limited. The purpose of this research is to be able to expand the information available on the use of bio controllers in the post-harvest of fruits such as papaya and to be able to be useful for post-harvest control methods of "La Carreta".

I. Introducción

El presente documento muestra el proyecto de graduación “Comparación del efecto antagonista de los bio controladores (BM® y Serenade®) aplicados en papaya Kaya Paya® (*Carica Papaya*) para retrasar los defectos de calidad del fruto en la post cosecha”.

La papaya Kaya Paya® (*Carica Papaya*) se produce en Finca “La Potra”, ubicada en Santa Ana, Petén; donde se tiene una temperatura promedio de 35°C y clima templado. La Finca está ubicada a 496 kilómetros de la planta de procesamiento “La Carreta”, que vende y distribuye el fruto en Guatemala, El Salvador, Honduras y Nicaragua. Ambas empresas parte de “Agropecuaria Popoyán, S.A.”

Al analizar los registros de pérdidas de papaya se determinó que un 30% del total de papayas que han ingresado a planta han sido rechazadas por falta de calidad. Este porcentaje engloba la merma de producción y la merma de ventas. La merma de producción se debe a las cicatrices por el roce de los frutos durante el transporte y cicatrices severas que traen los frutos de campo. En cambio, la merma de ventas se debe a la colonización de los frutos con microorganismos, así como pérdida de turgencia y pudriciones.

Estos defectos de calidad aumentan los costos del producto por pérdidas de materia prima, readecuación de empaque, pérdida de material de empaque, notas de crédito por parte de los supermercados distribuidores, cambios de producto, retrasos en procesos operativos de otros productos en la planta “La Carreta” y lo más severo a largo plazo es la pérdida de clientes.

Debido a que una de las causas más relevantes en la pérdida de las características de calidad de la papaya es la colonización por fitopatógenos, es importante buscar tratamientos para controlarlos. Una de las opciones más innovadoras para tratar fitopatógenos es el control biológico, en donde se utilizan organismos vivos con objeto de controlar las poblaciones de otro organismo.

Los controladores biológicos utilizados en el estudio fueron BM® y Serenade®. El BM® tiene como compuesto activo el *Bacillus Safensis*. El Serenade® tiene el microorganismo activo *Bacillus Subtilis cepa* QST 713. Ambos han sido usados para tratar plantaciones de fresa y café. Debido a no presentan residualidad se evaluará su aplicación en la post cosecha de las papayas.

Durante la experimentación se identificaron los fitopatógenos *Colletrotrichum sp.* y *Fusarium sp.*, luego se evaluó el antagonismo de los biocontroladores BM® y Serenade® contra los fitopatógenos y se determinó que ninguno bio controlador logró tener un efecto antagónico. Finalmente, mediane una prueba piloto en frutos se determinó que no hubo una diferencia significativa entre la vida útil de los frutos sin tratamiento y los tratados con BM® o Serenade®. Con este estudio se logró brindar una recomendación certera a “La Carreta” sobre la falta de practicidad y efectividad que representaría el uso de estos bio controladores en la post cosecha del fruto. Se recomienda explorar otras opciones de bio controladores que ofrezcan un efecto antagónico contra los fitopatógenos como el hongo *Trichoderma spp.*

II. Antecedentes

A. Producción a nivel mundial de papaya (Carica Papaya)

La demanda por frutas tropicales ha venido creciendo de manera sostenida desde el 2,000. La papaya ha venido ganando un lugar privilegiado en la demanda de los consumidores del mundo y ello se refleja en las cifras de producción. Hoy en día, la papaya es la tercera fruta tropical más producida con 11.22 millones de toneladas, equivalente al 15.36% del total de producción de frutas tropicales (primer lugar el mango y segundo lugar la piña).

La papaya (*Carica papaya*) es una especie de mucha importancia en los trópicos por el alto rendimiento y valor nutritivo de su fruto, además que su cultivo presenta una serie de ventajas como: alta precocidad; ya que comienza a producir antes del primer año de cultivo, cosecha en forma escalonada debido a que el fruto se desarrolla de abajo hacia arriba y en esa misma secuencia, se presenta la maduración y, por último, la fruta es muy apetecida por su agradable sabor. (Cano, 2006)

Aun cuando el crecimiento en la oferta de papaya se debe en buena medida al incremento de la producción en la India, esta fruta se ha convertido en fuente de ingreso para muchos países de Asia y de América Latina. Más de la mitad de las exportaciones mundiales de papaya, tienen como destino los Estados Unidos ya que las exportaciones de papaya contribuyen a la creciente oferta de productos saludables en los mercados internacionales.

La papaya se produce en más de 60 países y su producción se concentra en naciones en vías de desarrollo. Asia ha sido la región en donde la producción de papaya ha crecido de manera más importante. Los principales países productores a nivel mundial son Brasil, México, Nigeria, India e Indonesia, con más del 90% de la producción total. Los principales tipos de papaya que se comercializan el mundo son la Solo-type, caracterizada por ser pequeña y conocida como papaya Hawaiana, que pesa entre 1.1 y 2.2 libras por fruta y la papaya grande, que puede llegar a pesar hasta 10 libras por fruta y es también conocida como papaya mexicana. (Pérez, 2012)

B. Importancia económica de la papaya a nivel mundial

Desde el punto de vista económico, es la especie más importante de frutas tropicales por su alto rendimiento, valor nutritivo y por ser, además, uno de los pocos frutales de producción continua durante todo el año. La papaya es muy consumida como fruta fresca, en bebidas, dulces, deshidratada y sus frutos verdes se emplean en ensaladas

Sus frutos son altamente codiciados a escala mundial, no solo por su valor nutritivo sino por las múltiples aplicaciones que tiene en ramas de la industria farmacéutica y de alimentos por ser rica en papaína (con propiedades antibacterianas) y quimo papaína, de donde se extrae el látex. La papaya es una planta que tiene muchos usos; las hojas se pueden emplear para ablandar carnes y reducir la nebulosidad en la cerveza durante su proceso de

elaboración. Se explora el uso de la papaya para producir una vacuna contra la tuberculosis, cisticercosis y otras enfermedades infecciosas en animales. (Pérez, 2012)

C. Principales problemáticas de los cultivos de papaya a nivel mundial

La calidad de la papaya durante su cultivo y comercialización está afectada por enfermedades como Antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*), el virus de la Mancha Anular de la Papaya (VMAP) y por malas prácticas de manejo de la fruta, lo que genera altas pérdidas postcosecha.

PSRV (papaya ringspot virus o virus anular de la papaya) ha causado la pérdida total de plantíos de papaya alrededor del mundo y es una gran limitante para el crecimiento de esta industria en el mundo. Un claro ejemplo de lo anterior es la casi desaparición de la industria de la papaya en Hawai ante una epidemia de PRSV en 1990. Los esfuerzos por restablecer la industria de la papaya en Hawai dieron como resultado dos variedades de papaya genéticamente modificada: SunUp y Rainbow, las cuales fueron liberadas al público e 1998. (Pérez, 2012)

Países como Jamaica, Taiwán y Tailandia; también han completado exitosamente la fase de pruebas de campo para variedades de papaya genéticamente modificada resistente al PRSV, sin embargo, aún no están autorizados para su comercialización. No obstante, incluso después de que se obtiene una variedad de papaya genéticamente modificada, esta debe enfrentar asuntos relacionados con la percepción del público con respecto a los transgénicos, los procedimientos asociados con la regulación de cada país y los derechos de propiedad intelectual; todos ellos, retardan la salida al mercado y la comercialización de la nueva variedad.

El segundo gran problema al que se enfrenta la industria mundial de la papaya tiene que ver con las pérdidas postcosecha a lo largo de los eslabones de la cadena de valor. Las principales causas de este tipo de pérdidas son las enfermedades causadas por hongos, desordenes fisiológicos, daño mecánico, o combinaciones de estos. En la región del Sudeste Asiático es común encontrar que las pérdidas postcosecha oscilan en un rango entre el 30% y el 60%. Aunque se han hecho algunos esfuerzos en el sentido de mitigar las pérdidas mediante la adopción de buenas prácticas; las mayores limitaciones se encuentran en el desarrollo de infraestructura, como vías de acceso y suministro de energía eléctrica. (Pérez, 2012)

D. El proceso de producción de papaya (Carica Papaya) y pérdidas asociadas

En la cadena de producción y comercialización, la cosecha es una de las actividades más importante, ya que en esta se consolida el esfuerzo de los productores. Si la papaya no es manipulada adecuadamente, en esta parte se puede presentar la disminución de la calidad de la fruta o pérdida total de la misma, debido a los daños que se presentan en los diferentes tipos de cortes, magulladuras, deshidratación y por lo consiguiente el desarrollo de podredumbres, entre otros. (Salazar Daza, 2020).

La postcosecha es el periodo transcurrido en el que el fruto es retirado de la planta hasta que ya es consumido, las frutas recolectadas de óptima calidad se deben mantener esa calidad hasta que este llega a su destino final. Durante este proceso de la postcosecha se debe tener un minucioso cuidado ya que estos procesos de acondicionamiento de la fruta se puede estropear sus características físicas, química y sensoriales.

Un aspecto fundamental a tener en cuenta en el manejo postcosecha de frutas es que estas continúan vivas aún después de cosechadas. En tal sentido, la fruta cosechada continúa respirando, madurando e iniciando procesos de senescencia, todo lo cual implica una serie de cambios estructurales, bioquímicos y de componentes. Asimismo, el producto cosechado está constantemente expuesto a la pérdida de agua debido a la transpiración y a otros fenómenos fisiológicos

La papaya es una fruta susceptible al manejo postcosecha por lo que requiere cuidados para evitar pérdidas y mermas de un alto costo económico. Las enfermedades postcosecha pueden iniciarse durante el desarrollo del fruto o después de la cosecha con la maduración fisiológica. Después de cosechados, los frutos pasan por una serie de transformaciones resultantes del metabolismo celular. El aumento de los azúcares solubles, de agua libre y de las pectinas es acompañado por la reducción de algunos componentes fenólicos y proteopectínicos, que tornan los frutos más sensibles al daño mecánico y al ataque de diversos microorganismos, principalmente de hongos causantes de pudrición.

Las enfermedades fúngicas constituyen la principal causa de pérdida de papaya durante la comercialización debido a la falta de controles fitosanitarios durante el cultivo y a un manejo inadecuado de almacenamiento. La naturaleza y frecuencia de estas enfermedades depende de un completo conocimiento del agente patógeno, la planta hospedera, el medio ambiente y sus interacciones. Las enfermedades fúngicas de mayor frecuencia reportadas en este fruto son la antracnosis causada por *C. gloeosporioides*, las pudriciones pedunculares causadas por *Lasiodiplodia theobromae* y *Phoma caricae-papayae* y la pudrición acuosa causada por *R. stolonifer*.

Aunque la infección por los hongos se puede producir en el estadio inmaduro, permanece latente y se desarrolla hasta que la fruta madura. Existen estrategias de control para evitar el daño causado por hongos: el manejo cuidadoso para minimizar el daño mecánico y evitar vías de penetración del inóculo fúngico; mantener la temperatura y humedad relativa óptimas durante las operaciones de post cosecha; la inmersión en agua caliente a 49°C y la aplicación de fungicidas.

El uso de fungicidas para el control de enfermedades que afectan los frutos de papaya ha sido ineficiente debido a que ciertas especies han presentado resistencia a los principios activos utilizados en el campo y durante la postcosecha. Esto puede ser consecuencia del uso excesivo de estos compuestos o por utilizar dosis inadecuadas. Se han encontrado altos niveles de resistencia a benzimidazoles y del benomilo. Es por eso que es común el uso de altas dosis de fungicidas o el uso de la combinación de dos o más productos químicos es una práctica común entre los productores del fruto. Esta falta de control de agroquímicos provoca que los fitopatógenos desarrollen resistencia secundaria o adquirida como consecuencia de

una exposición prolongada a los antifúngicos y un riesgo para la salud humana (Suárez *et al*, 2013).

El control de las enfermedades causadas por hongos postcosecha se basa principalmente en el uso de fungicidas sintéticos, con efectos nocivos para seres humanos y ambiente; debido a esto, se ha propuesto la utilización de otras alternativas solas o combinadas: aplicación de irradiaciones y el uso de antagonistas y compuestos naturales como los extractos y aceites esenciales, que han venido mostrando resultados prometedores. Existe la necesidad de reducir el uso de químicos sintéticos en la agricultura e incrementar el uso de alternativas naturales, entre ellas la utilización de aceites esenciales para el control de fitopatógenos.

Basados en los efectos nocivos de los plaguicidas, y en vías de concretar la seguridad agroalimentaria, la tendencia actual es la formulación y utilización de compuestos naturales que actúen como antimicrobianos y/o antioxidantes, capaces de reducir el deterioro de las frutas y hortalizas, aumentando su vida útil; estos compuestos pueden ser aromáticos volátiles, ácido acético jasmónico, glucosinolatos, aceites esenciales y extractos de plantas, porque cumplen con los estándares para el consumo de los alimentos naturales y sanos. (Guédez *et al*, 2014)

E. Consumo de papaya (*Carica Papaya*) y beneficios para la salud

El importante valor nutricional y económico de las frutas frescas es bien conocido. Las frutas junto a las hortalizas son los mejores transportadores de vitaminas, minerales esenciales, fibra dietaria, antioxidantes fenólicos, glucosinolatos y otras sustancias bioactivas. Además, proveen de carbohidratos, proteínas y calorías. Estos efectos nutricionales y promotores de la salud mejoran el bienestar humano y reducen el riesgo de varias enfermedades. (Salazar Daza, 2020).

El consumo de la papaya es ideal para el estreñimiento debido a su alto contenido en fibra esto le confiere propiedades laxantes, ejerce un efecto saciante lo que beneficia a las personas que llevan a cabo una dieta para la pérdida de peso. Así mismo, por su aporte de vitamina C y de provitamina A, se recomienda el consumo a quienes tienen mayores riesgos de sufrir carencias de dichas vitaminas.

La papaya se considera una gran fuente de antioxidantes (carotenos, vitaminas y flavonoides), vitamina B (ácido fólico y ácido pantoténico), minerales (potasio, magnesio, entre otros) y fibra, adicionalmente es fuente de la papaína (enzima digestiva) que se la utiliza en las industrias: carnes, cervecera, productos de belleza y cosmética farmacéuticas.

La papaya es una fruta de alto valor nutritivo y propiedades medicinales poseen características que han contribuido en el incremento del cultivo de la papaya, esta fruta se consume principalmente como fruta, además se usa como frutas en almíbar o cristalizada, jugos, encurtidos. También es laxante que se extraen principalmente del tallo y de los frutos verdes el cual contiene una enzima ya que favorece la digestión de las proteínas. (Salazar Daza, 2020).

F. Producción de papaya (*Carica Papaya*) en Guatemala

En Guatemala, la agricultura representa una de las actividades más importantes ya que emplea el 41% del total de personas económicamente activas. Debido a la importancia de la agricultura en la generación de empleo, muchos han sido los esfuerzos por diversificar la agricultura. Esto para evitar la dependencia de los ingresos generados por: el azúcar, el café y el banano, se estima que los ingresos generados por la exportación de estos productos en conjunto en 2011 representaron un 38.1% del PIB agrícola.

Siguiendo la línea de la diversificación aparece el sector de frutas que recientemente ha tenido mayor actividad con una tendencia a producir frutas de alto valor implícito como: papaya, mango y limón persa. Estos productos representan una oportunidad para el agricultor que practica agricultura de subsistencia, para obtener mayores ingresos a través de la producción de estas frutas de alto valor. Adicionalmente estos cultivos de mayor valor agregado van a contribuir positivamente al PIB del país. (Barreno & Marroquin, 2012).

La papaya se conoce por varios nombres: papaw, lechosa, mamoneiro y fruta bomba; es originaria de América tropical (México y Centroamérica), aunque actualmente se encuentra distribuida en los trópicos y subtrópicos del mundo. Es un fruto climatérico. (Cano, 2006)

El cultivo de papaya en Guatemala ha ido cambiando en la disposición de materiales propagativos y el área de cultivo, ya que años atrás un 85% se cultivaba sobre la base de materiales criollos cuya producción era destinada para: el consumo interno, el abastecimiento del mercado salvadoreño y la industria nacional.

A pesar del incremento en la producción, un alto porcentaje de la producción es consumida a nivel nacional. La papaya se ha convertido en un importante producto de exportación agrícola para los países en desarrollo, donde los ingresos de exportación de la fruta proporcionan un medio de vida para miles de personas, sobre todo en Asia y América Latina. Se estima que el cultivo de papaya en Petén generó alrededor de 65,880 jornales en 2012. Por lo que el sector representa una importante fuente de empleo para el Departamento de Petén. (Barreno & Marroquin, 2012).

G. Producción de papaya en Petén

La región de Petén tradicionalmente productora de madera, fibras del sector forestal y turismo, ha iniciado su incursión en otras actividades productivas como la producción de papaya, limón persa y otras frutas. Las características edafológicas, climáticas de Petén y su estatus fitosanitario de ser libre de la mosca del mediterráneo con la ayuda de MAGA-Petén y la Misión Taiwán, han propiciado un crecimiento rápido del sector productor de papaya lo que se puede ver en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Crecimiento del sector papayero de Petén Guatemala, proyecto de agronegocios de Misión Taiwán

Año	Número de productores de papaya	Área de cultivo de papaya (Ha)	Crecimiento DE área (%)
2204	2	8	
2005	2	12	50.00
2006	2	50	316.67
2007	3	150	200.00
2008	3	210	40.00
2009	7	450	114.29
2010	7	500	11.11

Fuente: (Barreno & Marroquín, 2012).

Tanto el número de productores como el área sembrada, el Petén muestra un gran dinamismo en la última década. Se puede observar que las tasas de crecimiento del sector en varios años son superiores al 100%. El crecimiento promedio anual durante el periodo del 2012 fue del 122% (Barreno & Marroquin, 2012).

El área de Petén es reconocida por la USDA (United State Department of Agriculture) como territorio libre mosca del mediterráneo desde el 28 de agosto de 2001 (Federal register 2001). Unos 29,500 km² del departamento de Petén tiene este estatus fitosanitario, de área libre de mosca del Mediterráneo. Lo que facilita la entrada de cualquier producto hortofrutícola al mercado estadounidense, convirtiendo al departamento de Petén en área con potencial para el establecimiento, explotación y exportación de cultivos hortofrutícolas sin barreras cuarentenarias por concepto de mosca del Mediterráneo. (Barreno & Marroquín, 2012).

H. Problemática en “La Carreta”

“La Carreta” es una comercializadora de frutas y verduras a nivel nacional e internacional, diferenciada por su sabor, frescura y valor nutricional; enfocados en incrementar la rentabilidad de los clientes con productos de alta calidad, generando valor de manera sostenible para los accionistas, colaboradores y proveedores. La visión de la empresa es ser la marca más importante en la alimentación diaria de los consumidores por el sabor, frescura y valor nutricional de sus productos.

En la actualidad “La Carreta” produce, exporta y comercializa frutas y vegetales frescos de la más alta calidad. Tiene más de 20 años de experiencia en producción de vegetales, el sello de confianza para el consumidor es “100% desde la semilla” acreditando el esfuerzo de utilizar las más modernas herramientas y sistemas tecnológicos de producción que permita ofrecer un producto de la más alta calidad.

La empresa cuenta con vegetales y frutas de consumo diario. La oferta es extensa en productos del campo, tanto de disponibilidad constante como estacional. Cuando la

corporación no puede producir un producto, cuentan con productores asociados que permitan mantener una oferta surtida y sostenida durante todo el ciclo de operación.

Entre los productos insignia de “La Carreta” se encuentra la papaya (*Carica Papaya*) variedad Kaya Paya®, donde el proveedor del fruto es la Finca “La Potra” ambas empresas parte “Agropecuaria Popayán, S.A.” El fruto en Guatemala es ampliamente comercializado en supermercados y también en plataformas digitales con reparto a domicilio. Los principales supermercados asociados a la distribución del fruto son Walmart, La Torre y Price Smart. El otro gran sector para la papaya es la exportación de la fruta a países centroamericanos como Honduras, El Salvador y Nicaragua.

Figura 1. Cartilla de maduración de papaya



Fuente: (“La Carreta” control de calidad, estadio de maduración de la papaya)

La papaya se cosecha en un estadio de maduración 1-2, en donde se tiene un mayor porcentaje de coloración verde, la carnaza es firme e idealmente tiene una cáscara homogénea y lisa. En estas condiciones de maduración llega la papaya a la planta. Antes de ingresar a la planta se elabora un muestreo de calidad a las papayas donde se analizan estándares de calidad como calibre, maduración y daño mecánico. También se examina el interior de la papaya con pruebas destructivas en busca de daño microbiológico o fitopatógenos que afecten el fruto.

Mediante registros de muestreos de control de calidad de “La Carreta” se determinó la presencia de fitopatógenos como Antracnosis y Meleira, ambas enfermedades que atacan al cultivo de la papaya. También se detecta daño mecánico en la cáscara, este puede ser causado por el roce del fruto con el árbol al ir creciendo o bien por el transporte y los procesos de trasiego.

Al ingreso de los frutos a la “La Carreta” los defectos causados por fitopatógenos son casi indetectables por eso la merma en el proceso productivo se debe a frutos con daño mecánico severo y cicatrices. Pero a medida que el fruto avanza en su madurez los defectos de calidad son más severos, y se da la merma de ventas en la cual la papaya en estadio de

maduración 3 en adelante (ver Figura 1) puede llegar a manifestar pudrición y ataque fúngico. En total se estima que se tiene un 30% de merma global en toda la línea de producción y distribución.

Debido a estos defectos de calidad se han tenido cambios de producto o incumplimiento de órdenes de compra, significando pérdida de clientes y notas de crédito que se suman a la pérdida de materia prima. Además del material de empaque desperdiciado, transporte, eliminación del producto de tiendas y reprocesos.

Figura 2. Mermas de papaya



Fuente: (Elaboración propia)

Figura 3. Defectos de calidad en rechazo de papaya



Fuente: (Elaboración propia)

En la Figura 3 se observan las mermas de ventas debido a defectos de calidad como el ataque fúngico, pérdida de turgencia o degradación de tejido. A pesar de tener el conocimiento de presencia de antracnosis y meleira en algunos frutos se desconoce la cepa y variaciones del microorganismo específico en el fruto en cuestión.

Actualmente el fruto tiene establecida una vida útil promedio de 13 días a partir de la cosecha donde el parámetro de finalización es la manifestación de defectos de calidad en el fruto. Debido a la vida útil se deben hacer esfuerzos considerables para tener el producto en bodega de almacenamiento el menor tiempo posible y garantizar la mayor cantidad de tiempo vida de anaquel para que este se venda con las características de calidad que garantiza la empresa que son riquísimo, fresco y saludable.

I. Estudios relacionados con las pérdidas post cosecha de papaya (*Carica Papaya*)

En “Aislamiento, identificación y sensibilidad a antifúngicos de hongos fitopatógenos de papaya cv. Maradol (*Carica papaya L.*)” por (Suárez *et al*, 2013) se determinó cómo los cultivos de papaya infectados con hongos fitopatógenos son tratados de manera rudimentaria, generando así microorganismos resistentes a fungicidas. El estudio determinó que para lograr tener un efecto inhibitorio en los hongos detectados debía emplearse una concentración mucho mayor a la recomendada en campo de los productos antifúngicos probados. Esto llevó a una conclusión de recomendar otros métodos para tratar los cultivos o la combinación de diferentes compuestos antifúngicos para obtener una acción inhibitoria.

En “Actividad antifúngica del aceite esencial de naranja (*Citrus sinensis L.*) sobre hongos postcosecha en frutos de lechosa (*Carica papaya L.*)” por (Guédez *et al*, 2014) se destaca cómo actualmente los aceites esenciales se consideran una alternativa a los fungicidas químicos para controlar estos hongos por lo que se evaluó la actividad antifúngica del aceite esencial de naranja (*Citrus sinensis L.*) sobre los hongos *Colletotrichum gloeosporioides*, *Penicillium indicum*, *Fusarium solani*, *Rhizopus stolonifer* y *Aspergillus flavus*, en medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA) en un diseño completamente al azar.

Los resultados mostraron que existe un efecto inhibidor del aceite esencial de naranja (AEN) en el crecimiento micelial de los hongos *in vitro*, superior al 80% a concentración de aceite esencial de 1%, y 100% de inhibición a concentraciones de 2,5% y 5% de aceite esencial ($p < 0,05$). Al ser utilizado como recubrimiento de los frutos, a concentraciones de 2,5% y 5%, disminuye la presencia de lesiones en los mismos, sin diferencias significativas ($p < 0,05$), con igual comportamiento en efectividad *in vitro* e *in vivo*. Se concluyó que el aceite esencial de naranja puede ser una alternativa factible, para el control natural y eficaz de hongos postcosecha, causantes de grandes pérdidas en frutas para exportación y consumo.

En “Control postcosecha de la antracnosis en papaya y sensibilidad de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Sacc. a fungicidas organosintéticos.” de (Zavala-León *et al*, 2005). Se evaluó el efecto de cinco fungicidas en el control de antracnosis en papaya cv. Maradol. El experimento comprendió dos etapas: *in vivo* e *in vitro*, en las cuales se evaluaron los fungicidas: benomilo, imazalil, procloraz, azoxystrobin, metil kresoxim y un testigo absoluto. Los resultados de la primera etapa indicaron que procloraz fue el fungicida con

mayores perspectivas en el control de la antracnosis con una efectividad promedio de 96.5 %, mientras, benomilo se situó como el menos eficiente al obtener una efectividad promedio de 15.71 %.

J. Uso de biocontroladores en la post cosecha de papaya (*Carica Papaya*)

En “Conservación de la papaya (*carica papaya*) con aplicación de bacterias ácido lácticas provenientes del mucilago de cacao (*Theobroma cacao* L.)” por (Salazar, 2020) se determinó que transcurrido el tiempo de 14 días de conservación, se pudo identificar que el T9 (10% BAL; 14 Días) mantuvo mejores propiedades al respecto de los demás tratamientos, esto debido a la aplicación de las BAL, prolongando su tiempo de vida útil del fruto.

En “Evaluación de películas biodegradables en el control de hongos postcosecha de la papaya.” de (Hernández-López *et al*, 2018) se tuvo como objetivo evaluar el efecto antimicótico de películas formuladas con quitosano y otros productos naturales. Las películas de quitosano combinadas con cera de abeja, ácido oleico y aceites esenciales de tomillo, canela y clavo, fueron evaluadas primeramente como inhibidores del crecimiento micelial *in vitro* de *Rhizopus stolonifer*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Alternaria alternata*, *Fusarium oxysporum* y *Penicillium digitatum*.

Los formulados que mejor respondieron *in vitro* fueron evaluados por inmersión de los frutos de papaya, determinado su efecto en el control de antracnosis (*C. gloeosporioides*), comparado con Sportak (procloraz) a 3 mL L⁻¹ como control comercial. Las películas a base de quitosano, cera de abeja/ácido oleico y aceites esenciales de canela y clavo al 1 %, inhibieron completamente el crecimiento micelial de los cinco hongos.

Los tratamientos aplicados por inmersión de frutos de papaya no presentaron un efecto significativo sobre la incidencia y severidad de la antracnosis. En cuanto a calidad, las películas biodegradables no afectaron el contenido de sólidos solubles totales en los frutos y pérdida de peso.

En “Compuestos gras para el control de patógenos postcosecha *in vitro* en mango (*Mangifera Indica* L.), piña (*Annas Comosus* L.) y papaya (*Carica Papaya* L.), y pruebas de eficacia *in vivo* en piña” de (Reyes Gätgens, 2012) se evaluó la eficacia de diferentes dosis de 6 compuestos (BHA, BCP, BCS, ACB, PC y SBP) denominados como GRAS (por sus siglas en inglés Generally Recognized as Safe) y catalogados como seguros para su uso en alimentos, con el objeto de analizar su eficacia *in vitro* en el control de hongos causantes de enfermedades postcosecha en piña, mango y papaya.

Los resultados indicaron que el BHA 1.2% y ACB 1% tienen la capacidad de inhibir el crecimiento de micelio de *Penicillium sp.* y *Fusarium spp.* Estos compuestos fueron capaces de controlar el moho del pedúnculo de la papaya, siendo el BHA el compuesto con mejores resultados, constituyéndose como una alternativa para el control del moho del pedúnculo de la papaya en la post cosecha.

Una investigación más profunda sobre el uso de biocontroladores podría brindar una solución viable para la reducción de los desperdicios de los frutos y aportar para poder alcanzar los objetivos de desarrollo del milenio.

K. Objetivos del desarrollo del milenio

La FAO afirma que en el mundo entre el 25% y el 50% de la producción de productos frutícolas se pierden después de la cosecha, como resultado de los procesos de descomposición, infestados por insectos y ataque de microorganismos. Estas pérdidas suelen ser mayores en zonas tropicales por las condiciones climáticas prevalecientes. Por otra parte, el comercio de los productos y la preocupación por el desarrollo de normas de calidad y de salud van en aumento.

Las frutas son productos altamente perecederos. Comúnmente, hasta un 23 % de las frutas y las hortalizas más perecederas se pierden debido a deterioros microbiológicos y fisiológicos, pérdida de agua, daño mecánico durante la cosecha, envasado y transporte, o a las inadecuadas condiciones de traslado. (Salazar Daza, 2020).

Los países de América Latina y el Caribe están avanzando en la prevención y reducción de las pérdidas y desperdicios de alimentos en el marco de los objetivos de desarrollo del milenio y hacia el cumplimiento de los objetivos de desarrollo sostenible. En concordancia con el plan de seguridad alimentaria, nutrición y erradicación del hambre, de la comunidad de estados latinoamericanos y caribeños (CELAC) 2025 y con la meta global aprobada en la agenda 2030 de desarrollo sostenible, la región ha asumido el compromiso de reducir a la mitad las pérdidas y desperdicios de alimentos *per cápita* en 2025. Para lograrlo, se conformó una alianza regional articulada a partir de comités nacionales.

La disminución de alimentos aptos para el consumo humano puede deberse a la pérdida de estos y a su desperdicio, dos conceptos diferentes. Según la FAO, la “pérdida de alimentos” se refiere a la disminución de la cantidad de alimentos en cualquier parte de la cadena de suministro que se relaciona con los alimentos comestibles disponibles para el consumo humano. Estas pérdidas de alimentos pueden tener lugar en la etapa de producción, postcosecha, almacenamiento y procesamiento, es decir, cuando los alimentos se pierden antes de llegar a su fase de producto final o a la venta minorista. Por ejemplo, las papayas cosechadas aptas para el consumo humano que se deterioran por un mal manejo postcosecha, se considera pérdida de alimentos.

Por otra parte, se entiende por “desperdicio de alimentos” a la disminución de alimentos aptos para el consumo humano que ocurre al final de la cadena alimentaria (ventas y consumo final), es decir, dice relación con el comportamiento de los vendedores y consumidores. Por ejemplo, cuando las papayas aptas para el consumo humano no se consumen debido a que se echan a perder o son descartados por los minoristas o los consumidores porque aparecen manchas, se considera un desperdicio de alimentos. (Recabarren, 2017).

Es así entonces como la pérdida y el desperdicio de alimentos (PDA), se relaciona con la merma de estos en las distintas etapas de la cadena de suministro de alimentos destinados al consumo humano, desde la producción inicial hasta su consumo final. Las pérdidas y

desperdicios de alimentos aptos para el consumo humano, conlleva además la pérdida de los recursos que fueron utilizados en su producción, como uso del suelo, nutrientes, agua, energía, insumos, maquinaria, combustibles, mano de obra, infraestructura, envases, materiales de embalaje, refrigeración, medios de transporte, etc.

A nivel mundial, se estima que se utilizan aproximadamente 1.400 millones de hectáreas para producir alimento que no es consumido, lo que representa una superficie mayor a la de Canadá e India juntos. Por otra parte, la producción de alimentos que no se consumen causa emisiones innecesarias de CO₂, contribuyendo así al calentamiento global y al cambio climático. La huella de carbono global asociada a la pérdida y desperdicios total de alimentos se estima que corresponde a un 8% del total de las emisiones globales.

Cabe señalar, además, que la mayor huella de carbono dentro de los alimentos desaprovechados se presenta en la fase de consumo (37%). Dado que la disponibilidad de los recursos naturales es limitada, y muchos de ellos son recursos no renovables, una reducción eficaz de las pérdidas y desperdicios de alimentos disminuirá la presión por aumentar su producción, para satisfacer las necesidades de una creciente población mundial, que en la actualidad supera los 7.550 millones de personas, y que al año 2050 se estima alcanzará los 9.000 millones. (Recabarren, 2017).

También se ven involucrados los objetivos del desarrollo sostenible. Los objetivos de desarrollo sostenible, también conocidos como objetivos mundiales, se adoptaron por todos los estados miembros en 2015 como un llamado universal para poner fin a la pobreza, proteger el planeta y garantizar que todas las personas gocen de paz y prosperidad para 2030.

Entre los objetivos que se ven afectados por el desperdicio de alimentos podemos mencionar 2. Hambre cero, 8. Trabajo decente y crecimiento económico y 12. Producción y consumo responsable. (Recabarren, 2017).

Además, esta problemática tiene especial importancia en Guatemala donde uno de cada dos niños menores de cinco años padecen desnutrición. Guatemala tiene la tasa de desnutrición crónica más alta de América Latina y unas de las más elevadas del mundo (49%). En algunas zonas rurales, especialmente en el Departamento de Chiquimula, alcanza el 80%. Lo más grave es la repetición del ciclo ya que se transmite de generación en generación. Una madre desnutrida va a dar a luz a un niño desnutrido, y si el niño no tiene una adecuada alimentación en los primeros dos años de vida, va a tener muchas dificultades: va a presentar una baja talla, el coeficiente intelectual no se va a desarrollar igual, el niño puede perder hasta el 40% de sus neuronas potenciales, va a tener muchos problemas de atención, y lo más seguro es que abandone los estudios, con lo que las oportunidades de trabajo también disminuyen. (Kac & García, 2010).

III. Justificación

La papaya (*Carica papaya*) es un fruto climatérico que pertenece a la familia botánica de las caricáceas, es considerada un fruto tropical y es apetecida debido a sus propiedades nutritivas, medicinales y su sabor. A nivel mundial la papaya se produce en más de 60 países (Montalván & Lizeth, 2018), los principales productores son Brasil, México, Nigeria, India e Indonesia, con más del 90% de la producción total. Según (Barreno & Marroquín, 2012) Guatemala está ubicada en cuarta posición en productividad de papaya a nivel Mesoamérica.

A pesar de la alta producción de Guatemala se han registrado pérdidas económicas para los productores debido a enfermedades del cultivo como antracnosis que genera defectos de calidad como pérdida de turgencia, pudrición y colonización del fruto por hongos. Dentro de los defectos de calidad también se encuentran el daño mecánico de los frutos por su transporte, cicatrices de campo y calibre fuera de especificaciones.

Estos defectos de calidad conllevan al desperdicio del fruto lo que implica un incumplimiento de los objetivos de desarrollo sostenible 2. Hambre cero, 8. Trabajo decente y crecimiento económico y 12. Producción y consumo responsable. Además, los fitopatógenos afectan de manera directa el rendimiento de los cultivos lo que indirectamente causa desperdicio del uso de tierra, agua y agroquímicos provocando un encarecimiento del proceso y del producto. Debido a esta serie de deficiencias en la cadena de valor de la papaya es indispensable una propuesta para la reducción de las pérdidas en la post cosecha del fruto.

Un plan de acción para lograr una reducción de las mermas de la papaya Kaya Paya® (*Carica papaya*) se llevará a cabo en “La Carreta”, empresa dedicada a la venta y distribución del fruto. El proveedor del fruto es la Finca productora “La Potra” ubicada en Santa Ana, Petén. Ambas empresas forman parte de “Agropecuaria Popoyán, S.A.”, caracterizada por ser líder en el sector agroindustrial en Guatemala. La papaya Kaya Paya® es la marca registrada de la empresa para la comercialización del fruto.

Los defectos de calidad en la papaya Kaya Paya® (*Carica papaya*) han generado para “La Carreta” incumplimiento de órdenes de compra, pérdida de clientes y notas de crédito que se suman a la pérdida de materia prima, material de empaque, transporte y reprocesos.

Para proponer una solución a esta problemática se ha propuesto tratar con bio controladores (BM® y Serenade®) los frutos en la post cosecha. Los bio controladores podrían ser una solución a la colonización de los frutos, funcionando como antagonistas del crecimiento de los microorganismos indeseados. Ambos productos han sido usados en cultivos solamente, por lo que debe comprobarse su efectividad en el fruto. También debe mencionarse que estos productos no tienen residualidad por lo que es apto su uso en la post cosecha.

En la experimentación se determinó que tanto el BM® como el Serenade® no tuvieron una acción antagonista contra los fitopatógenos *Colletotrichum sp.* y *Fusarium sp.* por lo que la experimentación terminó con la conclusión de buscar otros microorganismos capaces de ejercer un efecto directo sobre el desarrollo de los fitopatógenos.

IV. Objetivos

A. General

1. Comparar el efecto antagonista de los biocontroladores (BM® y Serenade®) como alternativas para retrasar los defectos de calidad causadas por fitopatógenos en la post cosecha de papaya Kaya Paya® (*Carica Papaya*).

B. Específicos

1. Identificar los microorganismos fitopatógenos presentes en la papaya Kaya Paya® (*Carica Papaya*) por medio de reconocimiento morfológico e identificación por PCR.
2. Determinar la eficacia de los bio controladores BM® y Serenade® como antagonistas contra los fitopatógenos aislados de los frutos de papaya Kaya Paya® (*Carica Papaya*) mediante enfrentamiento en medios de cultivo.
3. Establecer la efectividad de la aplicación de los antagonistas BM® y Serenade® en papayas Kaya Paya® (*Carica Papaya*) mediante un análisis de vida útil.

V. Hipótesis

H0

- El BM® o el Serenade® serán antagonistas efectivos contra los fitopatógenos aislados de los frutos de papaya Kaya Paya® (*Carica Papaya*) logrando retrasar la manifestación de defectos de calidad en el fruto.

HA

- El BM® o el Serenade® no serán antagonistas efectivos contra los fitopatógenos aislados de los frutos de papaya Kaya Paya® (*Carica Papaya*) al no tener un efecto positivo logrando retrasar la manifestación de defectos de calidad en el fruto.

VI. Marco teórico

A. Papaya (*Carica Papaya*)

La papaya (*Carica papaya L.*) es una planta natural de América tropical, cuyo origen se sitúa en varios países de esta región, ubicándose en las tierras bajas de la América Tropical o en una región que incluye el sureste de México hasta Costa Rica. La descripción más antigua de esta especie es la del cronista Oviedo en 1535, señalando su origen en la región de Panamá. El cultivo de la papaya se ha distribuido ampliamente a lo largo de trópicos y subtrópicos. Se supone que sus semillas se distribuyeron por el Caribe y sureste asiático durante las exploraciones en el Siglo XVI, y luego se extendió rápidamente a India, el Pacífico y África.

La papaya es una fruta climatérica. Las frutas climatéricas incrementan su ritmo respiratorio y producción de etileno durante su maduración organoléptica, de igual manera se asocian los cambios en la etapa de desarrollo como (color, sabor, aroma y textura) estos son rápidos, intensos y variados.

Las variedades más comercializadas de papaya son:

- Papaya hawaiana: En esta variedad tiene una forma de pera, su peso puede variar entre 400 y 800 gramos. Es la más dulce de su variedad y se la usa más frecuentemente en jugos. en el centro del fruto se acumulan docenas de semillas redondas negras, tiene un largo aproximado de 5 milímetros de largo están cubierta por un material transparente gelatinoso
- Papaya tainung (Formosa): Esta especie se destaca por que tiene su pulpa de color rojo y un fuerte aroma, su promedio es de 1.1 kilos. La madurez se identifica cuando el fruto se empieza a tomar un color amarillo pintón por los menos en un 40% de la superficie y se hace suave al tacto. La fruta de papaya requiere para la floración y otros cinco meses para la cosecha
- Papaya maradol: frutos alargados, cilíndricos y redondos y en su interior de color rojo salmón en su exterior de color naranja brillante cuando alcanza su madurez fisiológica largo oscila aproximadamente entre los 22 y 27 cm y el diámetro está entre los 9 y 13 cm. La cavidad (diámetro) mide entre los 3 y 4.5 cm, mientras que tiene un promedio de Grados Brix de 12 esta puede variar si existe la carencia del potasio asimilable en el suelo de la planta. (Cano, 2006)

B. Descripción botánica de la papaya (*Carica Papaya*)

La papaya es una planta semileñosa que puede alcanzar de 8 a 10 metros de altura, es una dicotiledónea de tronco hueco y de madera carnosa. La corteza de la planta es lisa o ligeramente rugosa y de color parduzco; está siempre marcada por las cicatrices que dejan

las hojas al caer, y, cuando se corta alguna parte de la planta, exuda un jugo lechoso claro. (Cano, 2006)

En la parte apical se desarrollan constantemente nuevas hojas, y a medida que el tallo va creciendo, las hojas viejas maduran y caen; este fenómeno deja libre el espacio en que ha de desarrollarse el fruto. Las hojas son lisas, palmeadas y normalmente con siete lóbulos de color verde oscuro en el haz y verde claro en el envés. (Cano, 2006)

El crecimiento comienza a detenerse luego de tres o cuatro años, las hojas y frutas disminuyen de tamaño y tienden a secarse, sin embargo, en condiciones favorables, la planta podría vivir entre 15 y 20 años. A nivel comercial no se recomienda tener la plantación más de dos años debido a que la planta adquiere una altura que dificulta las labores de cultivo, aumentan los problemas fitosanitarios y disminuye el rendimiento. (Cano, 2006)

Las flores se producen en las axilas de los pecíolos de las hojas. Las plantas son polígamas, con flores masculinas, femeninas o hermafroditas con grandes variaciones dentro de cada uno de ellos originando, por esta causa, un interesante complejo floral. Predominan las plantas dioicas, pero lo deseable en una plantación son las dioicas y hermafroditas. Se han desarrollado cultivares en cada uno de los países productores, para favorecer la producción de plantas hermafroditas. Esto se ve afectado por factores climáticos sobre todo por las fluctuaciones de las temperaturas, siendo las plantas femeninas más resistentes a estas condiciones.

La complejidad de sexos, múltiples combinaciones florales, facilidad de cruzamiento por viento o insectos, hacen difícil mantener la pureza de las variedades, si no se toman precauciones. Una variedad pierde su identidad en dos o tres generaciones; sin embargo, se puede evitar que esto suceda mediante polinización controlada. Por otra parte, se logra mayor homogeneidad usando variedades que posean solamente flores hermafroditas, o desarrollar mediante investigación algún método de reproducción asexual, que mantenga las características deseables de la variedad (Cano, 2006)

La papaya es una especie mucho más tolerante a temperaturas bajas que otras especies tropicales. El árbol puede resistir heladas ligeras cuando no es muy joven; sin embargo, temperaturas bajas retardan el crecimiento y reducen la cosecha dando frutos faltos de color e insípidos debido al bajo contenido de azúcares, y de menor tamaño. El fruto se cultiva con éxito en lugares donde la temperatura alcanza promedios entre los 22 y 26 °C. (Cano, 2006)

Las precipitaciones recomendadas para la papaya están en el orden de los 1 500 a 2 000 mm anuales, bien distribuidas durante todo el año.

C. Principales afecciones de la plantación

El cultivo de la papaya presenta serios problemas fitosanitarios ocasionados por enfermedades fúngicas, bacterianas y virales. Dentro de los hongos que inciden en este cultivo, se destacan: *Cercospora papayae* Hansf, *Colletotrichum gloesporioides* (Penz) Sacc., *Rhizoctonia* sp., *Oidium caricae* F. Noack, *Cladosporium* sp., *Phomosis caricae*-

papayae Petrak. Además, inciden enfermedades asociadas a procariotes como: *Bunchy top*, *Erwinia papayae* sp. nov., *Pseudomonas caricae-papayae* Robbs.

Las enfermedades virales tienen gran importancia en *C. papaya*, y pueden ocasionar su pérdida total. Luego del PRSV (virus anular de la papaya), otras enfermedades virales son consideradas importantes en la producción de papaya a nivel mundial. El amarillamiento letal (Papaya lethal yellowing virus, PLYV), la necrosis apical (Papaya apical necrosis virus, PANV); la necrosis droopy (Papaya droopy necrotic virus, PDNV); la meleira (Papaya meleira virus, PMeV) y el mosaico de la papaya (Papaya mosaic virus, PapMV).

Para diagnosticar la enfermedad de una planta es conveniente determinar primero si la enfermedad es ocasionada por un patógeno o por algún factor ambiental. En cualquier caso, para hacer un diagnóstico correcto, es necesario hacer un examen detallado de los síntomas y un estudio de otras características aun cuando no estén relacionadas con los síntomas propios de esa enfermedad. (Cano, 2006)

1. Fitopatógenos

Las enfermedades ocasionadas por patógenos se caracterizan por la presencia de éstos en la superficie de sus plantas hospederas o dentro de ellas. La presencia activa de esos patógenos en la superficie de una planta podría indicar que son la causa de la enfermedad. En algunos casos su detección e identificación puede lograrse a simple vista, o mediante examen microscópico (en el caso de hongos, bacterias y nemátodos). Si no hay patógenos en la superficie de las plantas enfermas, será necesario buscar entonces síntomas adicionales y en especial, signos que se encuentran dentro de la planta enferma. Por lo común, esos patógenos están en los límites de los tejidos infectados, en los tejidos vasculares, en la base de la planta y en las raíces o sobre ellas. (Cano, 2006)

Actualmente en varias plantaciones de Guatemala el diagnóstico de una enfermedad bacteriana y la identificación de la bacteria que la ocasiona se basa principalmente en los síntomas de la enfermedad, debido al elevado costo de los análisis bacteriológicos. Sin embargo, un diagnóstico por sintomatología puede conducir a controles equivocados, ya que en cualquier parte de una planta enferma pueden encontrarse miles de bacterias y aun cuando pueden observarse en el microscopio carecen de características morfológicas distintivas que faciliten su identificación. Por lo tanto, se debe tener precaución al hacer el diagnóstico, para eliminar la posibilidad de que las bacterias observadas sean saprófitas, esto es, que se desarrollen en los tejidos muertos que fueron destruidos por cualquier otra causa. La forma más segura de comprobar que la bacteria observada es el patógeno, consiste en aislarla y hacerla crecer en un cultivo puro, utilizar una sola colonia para reinocular una planta hospedera susceptible y reproducir los síntomas de la enfermedad, para verificar que es el mismo patógeno. (Cano, 2006)

Desde el punto de vista experimental, el estudio de hongos endófitos tiene varios desafíos, siendo uno de los más limitantes la imposibilidad de esporular que presentan muchos de los aislamientos en medios de cultivo; por esta razón es común encontrar en los reportes de este tipo de investigaciones, la ocurrencia de una alta frecuencia de hongos categorizados morfológicamente como *Mycelia sterilia*.

Afortunadamente, la disponibilidad actual que ofrecen las técnicas moleculares para complementar los estudios taxonómicos de hongos brinda herramientas que posibilitan la identificación de hongos endófitos, aún en ausencia de esporas.

El conocimiento de la diversidad de hongos endófitos asociados a tejidos infectados por fitopatógenos es fundamental para la comprensión de las interacciones hospedante-patógeno y puede ser fuente importante de posibles agentes de control biológico o de promoción de mecanismos de defensa en las plantas.

El ciclo de la enfermedad es una serie de eventos sucesivos, más o menos distintos, que propician el desarrollo y prevalencia de la enfermedad y el patógeno. Este incluye: inoculación, penetración, establecimiento de la infección, colonización (invasión), crecimiento, reproducción, dispersión y supervivencia del patógeno en ausencia de su hospedante. (Cano, 2006)

2. Fitopatógenos principales del fruto

Las bacterias fitopatógenas presentan una forma celular baciliforme, rígidas o ligeramente curvas, con una prominente pared celular y poseen un metabolismo aeróbico o anaerobio facultativo. La mayoría de las bacterias fitopatógenas se desarrollan principalmente como organismos parásitos en las plantas hospederas y parcialmente como saprófitos en el suelo; sin embargo, hay grandes diferencias entre especies, en cuanto al grado de desarrollo en uno u otro ambiente. La mayoría de las especies fitopatógenas son bacilos Gram negativo y pertenecen a los géneros *Pseudomonas*, *Xantomonas*, *Erwinia* y *Agrobacterium*. Los pocos ejemplos de bacilos Gram positivo que afectan a las plantas pertenecen al género *Corynebacterium*. Las infecciones causadas por bacterias fitopatógenas generalmente se manifiestan por síntomas como clorosis, enanismo, marchitamiento, necrosis, pudrición, sarnas y agallas o tumores, que ocasionan grandes pérdidas en cultivos comerciales. (Cano, 2006)

Para el combate de las enfermedades del cultivo, se han utilizado diversos métodos; por sus altos costos, el combate químico solo se recomienda cuando la plantación es de escala comercial. Entre los fungicidas más recomendados están: benomol, mancobez, hidróxido de cobre y clorotalonil; como bactericidas, la mezcla de estreptomycin, oxitetraciclina y sulfato de cobre inclusive el extracto de semilla de naranja. (Loaiza & Rivera, 2000).

3. Bacterias

En el caso de las bacterias, invaden los tejidos de manera extracelular, aunque también pueden crecer dentro, cuando se disuelvan los constituyentes de la pared. Las bacterias vasculares invaden los vasos xilemáticos. (Cano, 2006)

Las bacterias fitopatógenas ocasionan el desarrollo de tantos tipos de síntomas en las plantas que infectan como los que producen los hongos. Producen manchas y tizones foliares, pudriciones blandas de frutos, raíces y órganos almacenados, marchitamientos, crecimientos excesivos, sarnas, cánceres, etc. Cualquiera de estos tipos de síntomas puede ser producido

por bacterias patógenas capaces de ocasionar distintos tipos de enfermedades; sin embargo, las especies de *Agrobacterium* solo producen crecimientos excesivos o proliferación de los órganos. Por otra parte, los crecimientos excesivos también pueden ser producidos por ciertas especies de *Corynebacterium* y *Pseudomonas*. (Cano, 2006)

4. Hongos

Los hongos son de las afecciones más comunes y de las más severas que pueden darse en el cultivo y en especial en el fruto. Por lo que su estudio y caracterización son vitales para poder detectar ataques en específico que puedan colocar el cultivo en peligro.

a. Antracnosis

Entre las principales enfermedades que afectan el fruto se destacan la antracnosis, que ataca hojas, peciolo y frutos. La antracnosis es la enfermedad que ocasiona la mayor parte de pérdidas postcosecha, es la más importante del fruto.

Este hongo pertenece a la Clase de los Deuteromicetes, Subclase *Coelomycetidae*, Orden *Melanconiales*, del género *Colletotrichum* que se caracteriza por tener un micelio definido y producir sus conidios en acervulos. Además, de la especie *C. gloeosporioides* (la más frecuente), existen otras como *Colletotrichum acutatum*, *C. demtium*, entre otras, siendo sus estados perfectos hongo *Glomerella cingulata* y *G. cingulata* var. *Minor*, todos capaces de causar antracnosis. (Calderón, 2012). Los síntomas característicos de esta enfermedad son lesiones circulares hundidas en frutos que se tornan de diversos colores tales como negro, marrón o blanco (Crema); ó bien la combinación de ambos, dependiendo de la especie involucrada.

Por otra parte, en los peciolo de las hojas se forman pequeños puntos negros, que permanecen cuando estos caen al suelo, lugar desde el cual pueden ocurrir infecciones posteriores para las plantas a su alrededor.

Algunas variaciones de la sintomatología de la enfermedad son:

- Exudado gomoso y luego pequeñas manchas de un cm de diámetro, rojizos y de aspecto seco, posteriormente tienden a hundirse en los bordes, el centro tiende a levantarse, seguidamente convalecen y abarcan grandes áreas del fruto.
- Otras lesiones no convalecen, o si lo hacen mantienen un borde bien definido.
- Se ha visto como algunas toman color café generalizado, mientras otras solo se oscurecen en el centro de la lesión de color café o negro.
- La lesión puede penetrar mucho en la parte central, otras penetran menos, pero presenta más cantidad de lesiones poco definidas, además, puede darse el caso que no penetren y solo se mantengan a nivel de epidermis.
- Una variación es la denominada “chorreadas”, lesiones que corren a todo lo largo del fruto, color café de aspecto acuoso, con muchos acérvalos en forma de costra. (Calderón, 2012).

La enfermedad se ve favorecida por condiciones de alta humedad y temperatura. La infección puede iniciarse a partir de las dos primeras semanas del desarrollo del fruto, la fuente de inóculo perfectamente puede provenir de los peciolo aun colgantes de las hojas senescentes; sin embargo, el patógeno permanece latente hasta que el fruto alcanza la fase climatérica. (Calderón, 2012).




Los frutos verdes, aun cuando estén infectados, usualmente no manifiestan síntomas, pero cuando el proceso de manifestación se inicia, rápidamente aparecen las lesiones. (Loaiza & Rivera, 2000).

Figura 4. Síntomas típicos de antracnosis en los frutos



Fuente: (elaboración propia)

Cuadro 2. Diferentes especies de antracnosis y su manifestación en frutos

<i>Colletotrichum Truncatum (Capsici).</i>	<i>Colletotrichum Gloeosporioides.</i>	<i>Colletotrichum Acutatum</i> en combinación con <i>Colletotrichum Truncatum.</i>
		
Manchas negras severas con textura filamentososa	Depresiones de la cascará con tonalidades café claro.	Manchas blancas o crema con textura algodonosa

Fuente: Imágenes (elaboración propia) e información de identificación (Calderón, 2012).

b. Mancha bacteriana

Otra enfermedad es la mancha bacteriana de la hoja, donde provoca serios daños en el follaje de plantaciones comerciales; el agente causal ha sido identificado como *Pseudomonas sp.* También ha sido reportado como *Pseudomonas carica-papayae*. La sintomatología observada consiste en áreas cloróticas irregulares, ubicadas a ambos lados de la nervadura central y luego sobre las nervaduras secundarias, con puntos necróticos en el centro de color café negruzco; las cuales tienden a cubrir por completo la lámina foliar. (Loaiza & Rivera, 2000).

c. Pudrición de la base del tallo

Posibles causantes: *Phythium spp.*, *Rhizoctonia spp.* Y *Fusarium spp.* Estos hongos atacan las plántulas a nivel de los viveros y después del trasplante, provocándoles una muerte paulatina; sin embargo, cuando van madurando y lignificando sus tejidos, desarrollan una resistencia al daño por estos hongos. Cuando las plántulas de papaya son trasplantadas muy jóvenes al campo, se producen problemas con estos hongos, al presentarse lluvias abundantes y frecuentes, por lo que debe monitorearse constantemente para establecer las estrategias de control. (Calderón, 2012).

5. Virus en el cultivo

A nivel mundial, uno de los principales problemas fitosanitarios que los productores de papaya deben enfrentar son aquellos de origen viral, esto debido a la devastación que producen sobre los cultivos y a la falta de medidas de protección efectivas a nivel de campo.

a. Virus de la mancha Anular de la papaya

El PRSV causa múltiples síntomas en *C. papaya*. Los síntomas dependen del aislado viral, el estado de desarrollo y nivel nutricional de la planta, grado de infección y de las temperaturas existentes. Los síntomas producidos por el PRSV en condiciones de campo varían desde mosaico ligero, parches formados por áreas verde claro y verde oscuro alternadas en las hojas y zonas abultadas de color verde oscuro (islas verdes). Cuando la infección es severa se produce la deformación y reducción de la lámina foliar hasta alcanzar la filiformidad.

En la zona superior del tallo y los pecíolos se forman manchas de apariencia aceitosa. En la superficie de los frutos afectados se producen manchas en forma de anillos concéntricos, que en casos severos pueden provocar ligera deformación y reducción del tamaño de estos. El mosaico formado en las hojas de plantas de papaya infectadas con el PRSV está asociado con la disminución de pigmentos fotosintéticos. En frutos verdes, los anillos de apariencia aceitosa que se forman resaltan por su color más intenso.

Cuando estos maduran los síntomas persisten, mostrando un color naranja castaño más oscuro. Cuando la infección ocurre en la etapa inicial del cultivo, antes de los dos meses de plantado, no se producen frutos. Si las plantas son infectadas en una etapa más avanzada se reducen los rendimientos, disminuye el contenido de azúcar de los frutos y la calidad de estos

es pobre. Se ha señalado que la manifestación de los síntomas es más marcada en la época de invierno

b. Meleira

La Meleira es un virus que afecta al ecosistema del cultivo, actuando de manera sistémica. Papaya meleira virus (PMeV) es el agente causal de la enfermedad conocida en Brasil como meleira, término usado para referirse a la enfermedad “pegajosa” de la papaya. Esta enfermedad fue reportada por primera vez en 1980 en Brasil (Kitajima *et al.* 1989). En 2008, síntomas de meleira fueron por primera vez observados y reportados en México (Perez-Brito *et al.* 2012). El síntoma más notorio de meleira es la exudación espontánea de látex de consistencia acuosa, que al secarse en la superficie de los frutos los oscurece dándoles un aspecto desagradable, dificultando su comercialización.

A PMeV se lo describe como una partícula viral de tipo isométrica con un tamaño aproximado de 50 nm de diámetro y un genoma que consiste en una molécula de ARN de doble cadena de 8.8 kpb. (Cornejo, 2018).

Investigaciones recientes en plantas con síntomas de meleira demostraron la presencia de un virus adicional cuyo genoma es homólogo a PpVQ (70% identidad a nivel de nucleótidos). Debido a su asociación con meleira, el virus ha sido denominado PMeV-2 en Brasil y PMeV-Mx en México. Estudios complementarios de microscopía electrónica y secuenciación de la siguiente generación, determinaron que solo las plantas que contenían infecciones mixtas de PMeV y PMeV-2/PMeV-Mx mostraban síntomas característicos de la enfermedad; mientras que aquellas con infecciones simples, es decir sólo con PMeV, resultaron asintomáticas. El estudio evidenció, además, que al carecer de un gen que codifique para la proteína de 7 la cápside, PMeV-2 encapsida su genoma en la cápside proteica de PMeV tampoco se mostraban síntomas de la enfermedad. (Sa Antunes *et al.* 2016).

Figura 5. Manifestación de la meleira en los frutos de papaya mediante chorros de latex



Fuente: (elaboración propia)

Figura 6. Manifestación de meleira en la carnaza de la papaya



Fuente: (elaboración propia)

D. BM®

El *Bacillus Sanfensis* es una bacteria con excelentes propiedades antisépticas, fungicidas, con un gran potencial para ser utilizada en control biológico de plagas y cultivos. Su codificación por parte de la empresa distribuidora (“Micsa, S.A.”) para la venta comercial es BM®.

Es Gram positiva, formadora de esporas, durante su ciclo de vida genera enzimas y metabolitos secundarios que son los que actúan para generar inhibición sobre los microorganismos. Ejerce una acción sistemática en el cultivo; esto quiere decir que tiene entrada a la planta por la raíz y llega a los frutos, teniendo una acción fungicida.

El BM® se ha utilizado ampliamente en cultivos de fresa, en intervalos de 1 mes, sin generar residuos y actuando como una biobarrera que se multiplica y continúa su acción a través del tiempo. Debido a su origen y la ausencia de residualidad es un controlador de cultivos orgánico

E. Serenade®

Son metabolitos de una bacteria que controla enfermedades foliares bacterianas y de hongos (roya, cenicilla, moho gris, mildiú y tizón)

Características del fungicida químico

- vida máxima del cultivo con protección es de 7 días
- Está compuesto de metabolitos secundarios y una porción de las enzimas
- Tiene un olor característico a pudrición

Serenade® contiene la bacteria benéfica *Bacillus subtilis* (cepa QST 713) que previene y cura enfermedades foliares de la planta causadas por hongos patógenos de las clases *Deuteromycetes*, *Oomycetes* y *Ascomycetes*, así como patógenos bacterianos como *Erwinia*, *Xanthomonas* y *Pseudomonas*. Serenade® forma una capa protectora de toxinas naturales

alrededor de la superficie de la planta inhibiendo la unión del patógeno al tejido de la planta. La capa consiste en tres grupos de lipopéptidos que detienen la germinación de las esporas de los fitopatógenos y perforan las membranas de su micelio y tubos germinativos. *Bacillus subtilis* también induce la resistencia sistémica natural de las plantas contra patógenos bacterianos y fungosos. El producto se presenta en polvo (Serenade MAX) y líquido (Serenade ASO). (Lahlali *et al*, 2011).

1. Beneficios

- Es eficaz contra patógenos resistentes a fungicidas químicos
- No es tóxico para insectos y hongos benéficos
- Puede ser aplicado hasta el día de la cosecha
(Lahlali *et al*, 2011).

2. Compatibilidad

Fungicidas: Los siguientes fungicidas se pueden mezclar en el mismo tanque: Azoxystrobin, Clorotalonil, hidróxido de cobre, óxido cuproso, Cyprodinil, Dicloran, Fenhexamida, Iprodione, Kresoxim-metil, Mancozeb, Myclobutanil, bicarbonato de potasio y azufre.

Bactericidas: *Bacillus subtilis* no es compatible con antibióticos como oxytetracyclina, estreptomina y sulfato de gentamicina, pero estos productos se pueden utilizar en un programa de rotación.

Insecticidas: Los siguientes insecticidas se pueden mezclar en el mismo tanque: Abamectina, *Bacillus thuringiensis*, Cryolite, Dimetoato, Imidacloprid y Spinosad.

Adyuvantes: No se combina con adyuvantes tipo penetrantes. Las siguientes marcas son incompatibles: Activator 90, Kinetic, Hyper-Active, Sylgard 309, Gavicide Super 90, JMS Stylet. Las siguientes marcas compatibles pueden mezclarse en el mismo tanque: Bond, Nufilm P, CoHere, R11, Hasten, R56, Intac, Spray Aide, Nufilm 17, Tactic, Organic Adhesive.

Insectos: No es tóxico para abejas melíferas, crisopas, avispas parasíticas y catarinitas. (Lahlali *et al*, 2011).

3. Dosificación y aplicación

Aplicaciones preventivas: Diluya SerenadeMR MAX (polvo) en agua y asperje una dosis mínima de 2-3kg/Ha.

El producto líquido (SerenadeMR ASO) se aplica en una dosis de 3-5L/Ha repita las aplicaciones en intervalos de una semana según se requiera. En condiciones de riesgo aumente la dosis.

Aplicaciones curativas: Diluya SerenadeMR MAX (polvo) en agua y asperje una cantidad mínima de 4kg/Ha.

SerenadeMR ASO (líquido) se aplica en una dosis de 5L/Ha. Se repite la aplicación después de una semana según se requiera. En problemas severos combine con una dosis baja de fungicidas compatibles. (Lahlali *et al*, 2011).

4. Ingredientes

- SerenadeMR MAX (polvo): *Bacillus subtilis* QST 713
- SerenadeMR ASO (líquido): *Bacillus subtilis* QST 713
- *Bacillus subtilis* (contenido (w/w): $\geq 1\%$ - $\leq 5\%$)
- Ingredientes inertes (transportadores y dispersantes): 90% (Reiss & Jørgensen, 2017)

5. Intervalo de aplicación

Se debe aplicar de acuerdo con las evaluaciones de campo que indican el comportamiento de la enfermedad y la relación de las condiciones de clima. El intervalo varía entre 8 a 10 días. (Reiss & Jørgensen, 2017)

6. Residualidad

No hay restricciones (0 días). (Reiss & Jørgensen, 2017)

7. Fitotoxicidad

No se ha reportado fitotoxicidad de Serenade® 1,34 SC cuando se usa según las recomendaciones de dosis y aplicación. (Reiss & Jørgensen, 2017)

8. Compatibilidad

No se debe mezclar Serenade 1,34 SC ® con otros plaguicidas, surfactantes o fertilizantes, sin antes realizar una prueba de compatibilidad. (Reiss & Jørgensen, 2017)

9. Propiedades físicas y químicas

Cuadro 3. Información sobre propiedades físicas y químicas básicas.

<i>Color</i>	<i>Café claro</i>
<i>Olor</i>	Dulce terroso
<i>pH</i>	4.8-6.0
<i>Punto de ebullición</i>	>100 °C
<i>Densidad</i>	1.042 g/cm ³
<i>Solubilidad en agua</i>	Dispersable

Extraído de: (Reiss & Jørgensen, 2017)

F. Métodos de análisis estadístico

1. Muestreo

Tomar una muestra aleatoria simple garantiza que cada muestra de algún tamaño dado tenga la misma probabilidad de ser seleccionada. En el muestreo aleatorio simple, se seleccionan muestras mediante métodos que permiten que cada posible muestra de tamaño n tenga una igual probabilidad de ser seleccionada y que cada elemento de la población total tenga una oportunidad igual de ser incluido en la muestra. Para ser aplicado se deben cumplir las siguientes condiciones: a. Las características de la población deben ser homogéneas a la variable de interés. b. Se debe conocer el tamaño de la población. c. Se debe tener un listado de todos los elementos de la población. Cuando las muestras son tomadas estrictamente al azar sin ninguna referencia predeterminada en relación con la ubicación de los puntos de muestreo y donde cada muestra tiene la misma probabilidad de ser escogida.

El universo para muestrear está constituido por todos los individuos presentes en el hábitat de nuestro interés. En el caso de las plagas agrícolas, las plantas de un determinado cultivo constituyen el hábitat el objeto a evaluación y esta pudiese ser la primera aproximación a la definición de la unidad de muestreo. No obstante, no siempre ocurre una distribución uniforme de los individuos sobre la planta, por lo que una reducción de términos de que revisar, puede llevarnos a la selección de determinada parte de la planta (raíces, hojas, frutos, etc.) como unidad de muestreo, en virtud de que se ha precisado el concepto de hábitat. En consecuencia, lo verdaderamente importante es la definición del hábitat a ser muestreado, teniendo presente que dentro del mismo es factible diferenciar aquella parte que tiene un interés particular a los fines del muestreo; esa parte se constituirá en el lugar hacia donde se enfocara el muestreo y los componentes individuales de la misma pasaran a representar las unidades de muestreo. (Calderón, 2012).

2. Análisis ANOVA

Los modelos de ANOVA (ANalysis Of VAriance) son técnicas de Análisis Multivariante de dependencia, que se utilizan para analizar datos procedentes de diseños con una o más variables independientes cualitativas (medidas en escalas nominales u ordinales) y una variable dependiente cuantitativa (medida con una escala de intervalo o de razón). En este contexto, las variables independientes se suelen denominar factores (y sus diferentes estados posibles o valores son niveles o tratamientos) y la variable dependiente se conoce como respuesta.

Los modelos ANOVA permiten, básicamente, comparar los valores medios que toma la variable dependiente en J poblaciones en las que los niveles de factores son distintos, con la finalidad de determinar si existen diferencias significativas según dichos niveles o si, por el contrario, la respuesta en cada población es independiente de los niveles de factores. Se trata, por tanto, de un contraste paramétrico que extiende al caso de J poblaciones el contraste de la igualdad de medias entre dos poblaciones independientes.

Aunque existen muchos y muy diferentes modelos de ANOVA, puede obtenerse una clasificación bastante simple de los mismos atendiendo a tres criterios: el número de factores,

el tipo de muestreo efectuado sobre los niveles de los factores y el tipo de aleatorización utilizada para seleccionar las muestras representativas de cada población y agrupar sus elementos (o unidades experimentales) en los distintos grupos que se desea comparar.

Según el número de factores, se llama ANOVA de un factor al modelo en el que existe una única variable independiente; en cambio, si el modelo consta de más de un factor se le denomina modelo factorial o se habla de Análisis de Varianza Factorial.

En cuanto al muestreo de niveles, se refiere a la forma de establecer los niveles de cada factor. Esto depende, normalmente, de los intereses del investigador. Si se fijan únicamente aquellos niveles del factor que realmente interesa estudiar, estamos ante un modelo de ANOVA de efectos fijos (también llamado modelo I) mientras que, si los niveles se seleccionan aleatoriamente de entre todos los posibles, se trata de un modelo ANOVA de efectos aleatorios (o modelo II).

Las distinciones basadas en el tipo de aleatorización son equivalentes a las que se establecen al hablar de muestras independientes y muestras relacionadas. Como en todo experimento estadístico en el que no resulta posible trabajar con la población en su totalidad, se deben elegir muestras aleatorias y asignarse también aleatoriamente sus elementos a los diferentes niveles o tratamientos, para asegurar que no se cometan errores sistemáticos.

Para poder aplicar esta técnica, es necesario que se verifiquen las siguientes condiciones previas:

- Independencia: los individuos estudiados han de ser independientes unos de otros.
- Aleatoriedad: las muestras o grupos objeto de estudio deben haberse obtenido de forma aleatoria.
- Normalidad: las muestras o grupos analizados deben seguir una distribución Normal. Homocedasticidad: debe haber igualdad de varianzas en las muestras o grupos estudiados. (Ordan, Melgar & Rubio, 2010).

3. Diferencia de medias con LSD

El método LSD de Fisher se utiliza en el ANOVA para crear intervalos de confianza para todas las diferencias en parejas entre las medias de los niveles de los factores, controlando al mismo tiempo la tasa de error individual en un nivel especificado.

Posteriormente, el método LSD de Fisher utiliza la tasa de error individual y varias comparaciones para calcular el nivel de confianza simultáneo para todos los intervalos de confianza. Este nivel de confianza simultáneo es la probabilidad de que todos los intervalos de confianza contengan la diferencia verdadera. Es importante considerar la tasa de error por familia al realizar comparaciones múltiples, porque las probabilidades de cometer un error de tipo I para una serie de comparaciones son mayores que la tasa de error de cualquier comparación individual. (Ordan, Melgar & Rubio, 2010).

G. Métodos de análisis microbiológicos

1. Hisopado

Para el análisis de microorganismos presentes en superficies existen 3 métodos de toma de muestras de acuerdo con el tipo de superficie a examinar: Hisopado (superficies inertes), esponja (superficies de áreas extensas /animales) y con enjuague (superficies vivas). Hisopado: La técnica consiste en impregnar un hisopo estéril en un medio diluyente y friccionarlos en las áreas de muestreo.

Como limitaciones del método está la calidad del hisopo utilizado en la técnica de hisopado de superficies, puesto que en los hisopos convencionales estériles la composición del algodón es perjudicial para los microorganismos. Los ácidos grasos presentes en el algodón destruyen las bacterias antes de que puedan ser analizados, la varilla del hisopo también afecta la técnica, los ejes típicos de madera contienen los mismos ácidos grasos que pueden reaccionar con los microorganismos. Una opción son las barras de plástico; aunque la nueva tecnología permite el uso de alambre de aluminio e incluso rayón, para una varilla segura.

Otro aspecto con respecto a las técnicas de hisopado es la cantidad de microorganismos que se liberan del hisopo. El CLSI (Instituto de Normas de Laboratorio y Clínicas) designa las normas para hisopos y su aplicación en particular, para evitar el análisis incorrecto de los microbios no liberados. El botón de esponja o espuma debe estar bien enrollado ni suelto ni apretado. Se ha demostrado que microorganismos quedan atrapados dentro de los botones bien enrollados, causando sólo una liberación de un 30 a 50 por ciento de la muestra. (Naranjo, 2015)

2. Sembrado y aislado

En la naturaleza, los microorganismos se encuentran formando poblaciones mixtas con otros tipos de microorganismos. Los cultivos de estas mezclas se llaman por ello cultivos mixtos. Sin embargo, el conocimiento de los microorganismos se consigue mediante el estudio de cepas aisladas, cultivadas en el laboratorio en cultivos puros (o axénicos).

En ocasiones el estudio molecular conduce a la caracterización de los microorganismos, aún en poblaciones mixtas. Sin embargo, la identificación bacteriana y la caracterización completa solo es posible tras el aislamiento de la bacteria y la obtención de cultivos puros. Por ello el primer problema al estudiar una bacteria es su aislamiento del resto de los microorganismos presentes (en una muestra patológica, de agua, de suelo, de alimentos, etc.). Una vez que se ha logrado el aislamiento es posible obtener la bacteria de interés en cultivo puro.

Aislado es la separación de un determinado microorganismo del resto de microorganismos que le acompañan. El método más usual es la siembra por estría sobre un medio de cultivo sólido adecuado dispuesto en una placa de petri.

Para ello se toma una pequeña cantidad de muestra con un asa de platino y se reparte sobre la superficie del medio de cultivo. Sobre el medio quedan separadas e inmovilizadas las células bacterianas. Tras la incubación en condiciones adecuadas, cada célula viable origina una colonia visible resultado de sucesivas divisiones celulares. Cada colonia bacteriana tiene unas características determinadas en cuanto a su forma, borde, elevación, tamaño, consistencia.

Los tipos de bacterias presentes en la muestra original es visible como tipos diferentes de colonias. A partir de colonias separadas suficientemente es posible obtener un cultivo puro de cada uno de los tipos de bacterias presentes en la muestra original.

El éxito del aislamiento, de la separación sobre el medio de cultivo, depende de la superficie sobre la que se ha distribuido la muestra. Es muy importante realizar el mayor número de estrías posible. En las primeras estrías aparecerán colonias confluentes o una masa continua de microorganismos. En las estrías finales deberán aparecer colonias separadas unas de otras. El aislamiento requiere un reducido inóculo de partida. La sucesiva disminución del tamaño de la población sobre el asa (por descarga sobre el medio de cultivo) al recorrer el medio de cultivo, debe asegurar que finalmente algunas células queden suficientemente separadas (aisladas unas de otras) sobre la superficie

Las bacterias generalmente crecen mejor en medios neutros o ligeramente alcalinos. Muchas especies no crecen en los medios tradicionalmente utilizados para el cultivo de hongos. El agar nutritivo, es un medio satisfactorio para el aislamiento y mantenimiento de la mayoría de las bacterias fitopatógenas. Para mantener o guardar un cultivo, es necesario prevenir la exagerada acidificación del medio, que puede inactivar el cultivo. (Cano, 2006)

3. Antagonismo microbiano

El antagonismo microbiano es una relación deletérea o negativa; es la inhibición, deterioro o muerte de un microorganismo por acción de otro. En el mundo biológico existe una interacción continua entre los patógenos potenciales y sus antagonistas, de forma tal que estos últimos contribuyen para que en la mayoría de los casos no desarrollen la enfermedad. En las plantas, los microorganismos están en un equilibrio dinámico en su superficie en condiciones naturales.

Cuando las poblaciones de organismos se encuentran reducidas debido a las acciones naturales de sus depredadores, parásitos, antagonistas y enfermedades, el proceso se conoce como “control natural”, pero cuando se utiliza para el control de plagas es llamado control biológico o biocontrol. En patología vegetal el término es aplicado para el uso de antagonistas microbianos que suprimen enfermedades, así como el uso de huéspedes patógenos específicos para el control de malezas.

El antagonismo microbiano está dado por la inhibición, deterioro o muerte de alguna especie de microorganismos por la acción de otra; o una relación entre dos poblaciones en la cual una de ellas causa efectos deletéreos o negativos a la otra. Numerosos microorganismos saprófitos de la rizosfera y de la filosfera, así como la epiflora que existe en la superficie de la hoja, protegen a las plantas contra patógenos; en los últimos años se ha incrementado el

interés en este fenómeno ya que se puede utilizar en su protección reduciendo infecciones. Por lo que se ha tratado de aprovechar las relaciones antagonistas entre las poblaciones microbianas, para controlar patógenos vegetales debido al efecto antagónico.

Las características óptimas que debe poseer un antagonista microbiano útil en cultivos vegetales son las siguientes: ser genéticamente estable, eficaz a bajas concentraciones, hábil para sobrevivir condiciones adversas del medio ambiente, incluyendo refrigeración y almacenamiento controlado, resistente al ataque de hiperparásitos, efectivo para una amplia gama de microorganismos patógenos en una variedad de frutas y hortalizas, fácil de producir en medios de bajo costo, resistente a los fungicidas, compatible con procedimientos de procesos comerciales, poder establecerse con rapidez para minimizar la destrucción realizada por la plaga, no ser patogénico en el hospedero y que no produzca metabolitos secundarios dañinos a la salud humana. (Pérez, Terrón & Muñoz-Rojas, 2014).

4. Hongos antagonistas

Los hongos antagonistas son componentes naturales del suelo, encontrándose en materiales vegetales en estado de descomposición en numerosos suelos de uso agrícola y tiene la capacidad de adaptarse a varios ambientes. Uno de los géneros más importantes en el control de plagas es *Trichoderma* los cuales actúan contra un amplio rango de hongos fitopatógenos transmitidos por suelo y por aire, usándose en campo e invernadero. Además son más utilizados debido a su ubicuidad, a su facilidad para ser aislados y cultivados ya que no afectan a plantas superiores.

No es fácil determinar con precisión los mecanismos que intervienen en las interacciones entre los antagonistas y los patógenos sobre la planta. En general los antagonistas no tienen un único modo de acción y la multiplicidad de modos de acción es una característica a seleccionar en un antagonista. Esto se debe a que los riesgos de seleccionar al patógeno por resistencia al antagonista se reducen al actuar éste último por varios mecanismos. El riesgo de resistencia se reduce también mediante el uso de combinaciones de antagonistas de diferente modo de acción. Se han descrito varios mecanismos de acción de los antagonistas para controlar el desarrollo de patógenos. (Cook and Baker 1983).

- **Antibiosis.** Es el proceso en el cual el producto o productos metabólicos de un organismo inhibe directamente o mata o otros organismos. Generalmente estos organismos son saprófitos y tienen una especie blanco no específica y dependen de los recursos de carbono en el suelo. Los antibióticos actúan en áreas no localizadas para mantener su posición en la superficie del sustrato para excluir a los organismos patógenos durante un periodo de tiempo largo.
- **Competencia.** Se puede definir como los efectos dañinos de un organismo sobre otro, debido a la utilización de un mismo recurso del medio ambiente. Estos recursos pueden ser nutrientes, oxígeno y espacio. El espacio y el oxígeno son probablemente variables importantes que pueden cambiar a la rizosfera para generar una disminución en el establecimiento de microorganismos patógenos. El carbono, nitrógeno y

nutrientes son elementos importantes que determinan el desarrollo e infección de los fitopatógenos en competencia con otros microorganismos.

- **Mico parasitismo.** Los términos mico parasitismo, hiper parasitismo, parasitismo directo o parasitismo entre hongos son usados con referencia al fenómeno de parasitismo de un hongo sobre otro. El mico parasitismo incluye una gran variedad de interacciones que generan daños morfológicos tales como, cobertura de las hifas del hongo patógeno, penetración y parasitismo directo por la producción de haustorios y lisis de una hifa por otra.

Recomendaciones al emplear hongos antagonistas

- Los hongos antagonistas se emplean como preventivos, para proteger a los cultivos antes de que la enfermedad se desarrolle. Se utilizan en aspersión y como cobertura de semillas antes de ser sembradas, al momento del trasplante y en el agua de riego, especialmente si este es por goteo ya que así protegerá a las raíces y cuello de la planta del ataque de los hongos de suelo, en aplicaciones foliares cuando se detectan los primeros síntomas de infección por hongos fitopatógenos.
- La programación de aplicación de los hongos antagonistas no debe coincidir con aplicaciones de fungicidas, azufrados, etc.
- En el empleo de los hongos antagonistas, se debe tener en cuenta la materia orgánica existente en el suelo ya que esta ayudará al desarrollo de los hongos antagonistas ejerciendo un mejor control de la enfermedad. Utilizar agua potable, de río o de pozo (las aguas turbias, de río o de pozo, se deben dejar reposar por lo menos 30 minutos antes de utilizarla).
- La dureza y la acidez del agua son factores importantes para el buen funcionamiento de los hongos antagonistas; la dureza debe ser menor a 150 ppm (carbonatos) y el pH menor de 7. El empleo de ablandadores de agua disminuye la dureza, bajando también el pH. Las aguas duras inhiben la geminación de las conidias.
- La aplicación de los hongos antagonistas debe hacerse, preferentemente, por la tarde, cuando la radiación solar no es muy fuerte.
- El éxito de la aplicación y el control con hongos antagonistas depende también de la elección de los equipos de aspersión. Se utilizan equipos (mochilas) convencionales, utilizando boquilla cónica de gotas finas, de tal manera que se obtenga una aplicación uniforme mojando bien la planta. Los equipos deberán ser nuevos o limpios, libres de residuos químicos, los cuales inhiben la viabilidad de las conidias. Tener especial cuidado en la limpieza del equipo cuando anteriormente se ha utilizado para la aplicación de fungicidas.

(Ramírez *et al*, 2013)

Cuadro 4. Ejemplos de microorganismos antagonistas que inhiben el desarrollo micelial de fitopatógenos

Antagonista	Inhibición (%)	
	<i>Rhizoctonia Solani</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>
<i>Trichoderma Lignorum</i>	74.6	66.7
<i>T. harzianum</i>	70.8	65.9
<i>Bacillus subtilis</i>	69.0	27.3
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	58.7	44.1

Extraído de: (Paredes *et al*, 2009)

5. Métodos de detección molecular

Los métodos microbiológicos clásicos implican, generalmente, el uso de un apropiado cultivo de pre-enriquecimiento y enriquecimiento, el aislamiento en medios selectivos y la posterior confirmación mediante pruebas bioquímicas morfológicas y/o serológicas. Todo esto es laborioso, la obtención de resultados puede tomar días o semanas y, adicionalmente, presentan baja sensibilidad. Aunado a ello, se ha demostrado que algunas células bacterianas pueden entrar en un estado viable pero no cultivable (VPNC), debido al procesamiento al que se sujeta el alimento, lo que imposibilita el uso de los métodos de cultivo como herramienta de diagnóstico. Una serie de métodos moleculares alternativos, rápidos y sensibles para la detección, identificación y cuantificación de patógenos transmitidos por alimentos han sido desarrollados para superar estos inconvenientes.

Los primeros métodos de identificación molecular fueron la hibridación ADN-ADN, el análisis de secuencias del ADNr 16S, la hibridación con una sonda específica y el análisis RFLP o ribotipificación. En contraste con las características fisiológicas y bioquímicas, la identificación molecular se basa en la composición constitutiva de los ácidos nucleicos más que en los productos de su expresión. Estos métodos moleculares se utilizan a menudo en asociación con la identificación microbiológica convencional.

Existen diferentes herramientas para la detección, diferenciación e identificación de microorganismos, entre las que se encuentran métodos fenotípicos, bioquímicos, inmunológicos y moleculares. A pesar de que el método de caracterización fenotípica es el estándar para la identificación de la mayoría de los microorganismos, los métodos moleculares también son una herramienta indispensable en la mayoría de los estudios que surgieron como consecuencia de los procesos de identificación bioquímica y fenotípica.

Sistemas comerciales como kits basados en el uso de la enzima TAG polimerasa se desarrollaron inicialmente para ser usados en aislamientos humanos, de comida o bebidas con el fin de identificar cepas desconocidas; y de allí las pruebas moleculares empezaron a formar parte complementaria o alternativa a las pruebas fenotípicas, determinando una mayor especificidad y sensibilidad de los ensayos.

Se conoce que el trabajo de identificación a nivel molecular de hongos filamentosos, constituye una de las tareas más complejas debido a la composición de estos, haciendo de la

extracción de ADN uno de los procesos más importantes de los métodos moleculares, en los que se ve involucrada directamente la composición de la membrana celular, constituida por un 10% en proteínas y glicoproteínas; seguida de un 8% de lípidos e iones inorgánicos, tales como calcio, fosforo y magnesio, micro elementos fundamentales en la clasificación taxonómica. (Garzón, 2013)

Dentro de estos ensayos moleculares el método de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una de las primeras técnicas de la generación molecular cuyo propósito es la ampliación de un fragmento de ADN de la muestra que se somete a estudio. Existen varias modalidades de esta técnica como polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción PCR-RFLP, (PCRtr) PCR en tiempo real, RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA), PMM (Polymorphic Microsatellite Markers) y MLST (Multilocus Sequencing Typing). (Garzón, 2013)

Los métodos moleculares como PCR agilizan la identificación analizando regiones específicas dentro de genes. Las secuencias de espaciadores transcritos internos (ITS) y regiones como el factor de elongación 1-alfa (TEF 1- α) son las más utilizadas en la identificación, como código de barras estándar para hongos y una vez identificados ejercer medidas para controlar su proliferación. (Lafuente-Rincón *et al*, 2016)

6. Secuencias Diana

Con fines de identificación molecular se suele amplificar regiones diana multicopia y sitios altamente conservados ya que hace fácil la amplificación en todos los hongos (18). Las regiones diana multicopia utilizadas generalmente son los genes ribosomales. El ribosoma de células eucariotas tiene dos subunidades de ARN ribosomal (ARNr): 40S y 60S, que están codificados por tres genes: el gen 5.8S, la subunidad pequeña (18S) y por último la subunidad grande (28S), los cuales están separados por regiones espaciadores de transcripción interna (ITS). La subunidad 18S una de las más utilizada en comparaciones taxonómicas de base filogenética (24), así como la región ITS, debido a que estas últimas son intrones variables, ya que acumula mutaciones neutrales a través del tiempo, permitiendo distinguir entre organismos genéticamente relacionados a nivel de especie y subespecie. (Garzón, 2013)

Otra de las regiones ampliamente utilizada para la identificación de hongos, es la correspondiente al gen de β -tubulina, una proteína que constituye los microtúbulos de las células 16 eucariotas. A pesar de que esta proteína es altamente conservada entre eucariotas, la comparación de regiones intrónicas permite diferencias entre individuos de una misma especie. (Garzón, 2013)

La secuencia nucleotídica del gen de β -tubulina ha formado parte de análisis filogenéticos donde los polimorfismos en el intrón 3 han sido los más utilizados en estudios. Las regiones ITS no siempre proporcionan una buena resolución para especies filogenéticamente próximas, el análisis de una segunda región, como el gen de β -tubulina, puede ser necesario para asegurar una identificación adecuada.

Así lo lograron determinar Gonzalez et al. (2007) cuando realizaron un análisis de diversidad genética de una población de *Colletotrichum spp.* a partir de la comparación en la

distribución de subunidades e intrones en secuencias de ARNr (ITS) y β tubulina, basados en estudios de O'Donnel et al. en los que reportó que hay 3.5 veces más información filogenética en los genes de la β -tubulina que en los genes de ARNr. (Garzón, 2013)

7. Secuenciación y Filogenia

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es la técnica de diagnóstico molecular más ampliamente utilizada debido a su protocolo rápido y de fácil uso. Por lo general, 2-3 h son necesarias para completar una PCR, pero hoy en día se están desarrollando sistemas de PCR más avanzados para generar un resultado en cuestión de minutos.

Una vez son obtenidos las secuencias de las regiones amplificadas se procede a hacer una comparación de estas secuencias con las reportadas en las bases internacionales, como GenBank. Esta comparación permite la identificación de las especies fúngicas, incluso puede hasta tipificar cepas de una misma especie. (Garzón, 2013)

Debido a la gran importancia de las secuencias, los métodos filogenéticos deben ser cuidadosamente elegidos para hacer una buena inferencia de la información génica y así determinar hipótesis evolutivas confiables. Estas hipótesis por lo general se expresan en forma de árboles filogenéticos, que son representaciones diagramáticas en las cuales se describe estas relaciones, que a partir de un análisis cuidadoso es posible establecer cuantitativamente el parecido entre dos o más secuencias cuyo resultado es expresado en porcentaje de identidad o similitud entre los organismos en estudio. Una vez obtenido este porcentaje se identifica cada individuo y se seleccionan los genes que deberán ser publicados en la base de datos internacional GenBank. (Garzón, 2013)

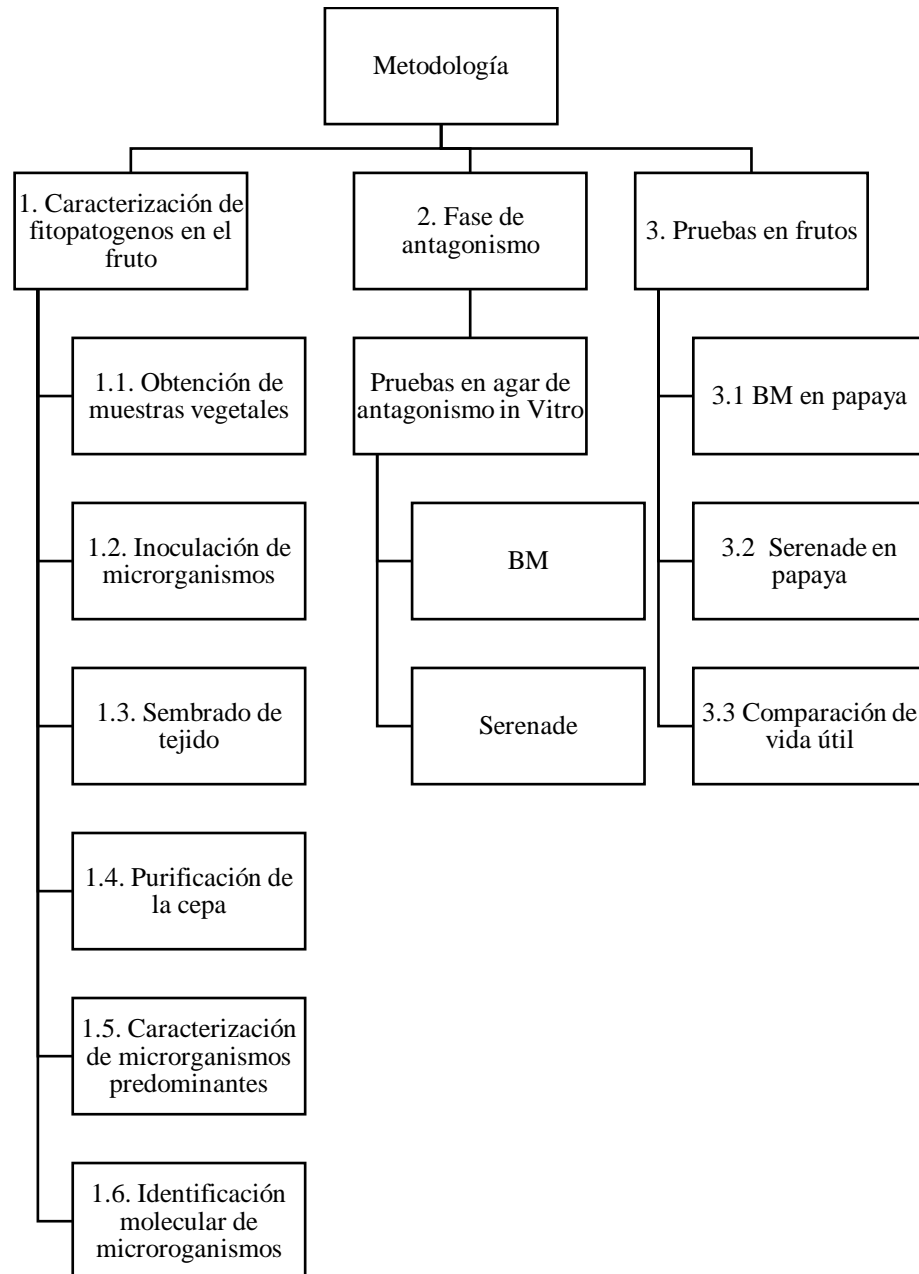
8. Amplificación basada en la secuencia de ácidos nucleicos

Aunque menos desarrollada que la PCR, hay una serie de reportes en la literatura sobre los ensayos de amplificación basada en la secuencia de ácidos nucleicos (NASBA), incluyendo algunos que utilizan la metodología de tiempo real, para detectar ARNm de patógenos asociados a alimentos. Otros informes sobre el uso de esta tecnología para la detección de patógenos en alimentos se prevén con mucho interés, debido a su capacidad para detectar organismos viables. (Garzón, 2013)

VII. Metodología

Las pruebas de control microbiológico se realizaron en tres fases, primero se identificaron los microorganismos fitopatógenos de los frutos, posteriormente se realizaron pruebas de antagonismo in vitro con los bio controladores para determinar su grado de antagonismo y finalmente se realizó una prueba piloto en frutos para poder comparar los resultados obtenidos en el laboratorio. Ver Figura 7 para visualizar todas las fases de la metodología.

Figura 7. Metodología para retardar los defectos de calidad de la papaya Kaya Paya® (Carica Papaya)



A. Fase de identificación de microorganismos en el fruto

La primera fase se realizó con el fin de identificar los microorganismos fitopatógenos de los frutos tanto bacterias como hongos que estén relacionados con problemas de los cultivos y frutos.

1. Obtención de muestras vegetales

Se realizó un muestreo a 5 lotes distintos de papayas, considerando el grado de madurez, el proceso de producción, el ambiente de almacenamiento y las papayas que son rechazadas. (Ver cuadro 15, parte I Anexos)

El muestreo fue completamente aleatorio tomando 4 papayas de cada lote, para ver la incidencia del ataque de fitopatógenos durante su desarrollo hasta la madurez.

Se documentó la apariencia de los frutos almacenados en condiciones controladas durante su maduración hasta la manifestación de microorganismos para empezar a documentar los defectos de calidad en la postcosecha. Para el procedimiento de documentación y características del fruto ver parte I, de la sección de Anexos.

2. Inoculación de microorganismo

a. Hisopado

Se hisoparon los frutos en un cuadrado de 5x5 cm, seleccionando áreas en específico donde no se tengan manifestaciones de crecimiento de microorganismos, daños en la carnaza o pudriciones. Se utilizó un molde de 5x5 cm para delimitar. (Para el procedimiento de hisopado y preparación de insumos ver parte II, sección de anexos)

b. Sembrado del inóculo del hisopado

Se trabajó en triplicado, sembrando 3 unidades en cada medio seleccionado para la experimentación. Medios de trabajo:

- **PCA:** para recuento de bacterias. Preparación y utilización descrita en “Agar para métodos estándar PCA” (Condalab, 2019)
- **Sabouraud:** para recuento de hongos. Preparación y utilización descrita en: “SABOURAUD AGAR” (BIO RAD, 2019)

3. Sembrado de tejido

3 partes de cada fruto se sembraron en 1 sola caja de Petri:

- Pedúnculo del fruto

- Parte con heridas visibles en la carnaza
- Parte de la carnaza sin heridas aparentes.

Se documentó el crecimiento que se obtuvo en cada caja de agar en el día 4 y 8. (Para el procedimiento de sembrado de tejido ver parte III, sección de Anexos)

4. Purificación de la cepa

a. Al finalizar el periodo de incubación mediante el método de resiembra se obtuvo un crecimiento individual de los microorganismos. Se procedió como se indica en: “Técnicas de aislamiento, identificación, selección de cepas de *Rhizobium*, *Azospirillum* y producción de inoculantes.” (Morote & Palomino, 2019) Se sembrará en el agar Sabouraud para recuento de hongos y en Agar PCA para bacterias.

5. Caracterizar microorganismos predominantes

a. Se identificaron los microorganismos aislados mediante morfología comparando con la base de datos de referencia: Blastn y Blastx (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Se uso una matriz de decisión de selección como guía (cuadro 16, parte IV de anexos). Algunos microorganismos no pudieron identificarse morfológicamente por lo que se reservaron para la identificación molecular.

6. Identificación molecular de microorganismos

a. Para la identificación de la especie del microorganismo se usará PCR. Se utilizará el procedimiento descrito en: “Identificación molecular de hongos aislados de tejidos de frijol con síntomas de antracnosis.” (Berrouet, Sánchez, & Montoya, 2014).

Con las siguientes especificaciones: Extracción de ADN, amplificación por PCR, secuenciación y análisis de identidad del marcador ITS1-5.8S-ITS2 (ribosomal internal transcribed spacer) para hongos y del marcador ARNr 16S para bacterias. Para el análisis de identidad de la secuencia de ADN obtenida, se utilizó la base de datos de nucleótidos del NCBI utilizando la herramienta Basic Local Alignment Search Tool para nucleótidos – BLAST®N 2.8.0+ (National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine); excluyendo muestras no cultivadas/ambientales, optimizada para secuencias altamente similares (megablast).

Se procederá en el antagonismo con los microorganismos que sean fitopatógenos identificados para cultivos de papaya.

B. Fase de antagonismo

Durante esta fase se realizaron pruebas microbiológicas de enfrentamiento de los bio controladores contra los microorganismos fitopatógenos aislados de la fase de identificación de fitopatógenos en el fruto.

1. Conservación del Microorganismo fitopatógeno de interés

Cada microorganismo fitopatógeno de interés (aislado de la etapa anterior) se almaceno en cepario para tener las cepas de reserva y las cepas de trabajo.

2. Siembra de BM® en medio de cultivo

Como se describe en la sección 1.2.2. utilizando Agar Natural, trabajando en triplicado. BM en una dilución estándar de 1×10^{-6} . Se cultivó en aerobiosis a 25 ± 2 ° C durante 24 horas. Se conservaron imágenes del crecimiento de la bacteria para reconocerla en el antagonismo.

3. Siembra de Serenade® en medio de cultivo

Como se describe en la sección 2.2. utilizando Serenade®.

4. Pruebas In vitro de Antagonismo BM® contra el fitopatógeno

a. Se procedió a las pruebas de antagonismo utilizando BM® (*Bacillus Safensis*). Se evaluará el porcentaje de inhibición del crecimiento del microorganismo fitopatógeno por acción del antagonista. La metodología usada se basa en: “Contribución al estudio del control biológico del fusarium oxysporum, Rhizoctonia Solani y pythium sp. mediante diferentes especies de *trichoderma*.” (Arcos, Elias, & Antonio, 1984)

b. ¿Como evidenciar que es antagonista?

La actividad inhibitoria se cuantificó observando la presencia de halos de inhibición como prueba positiva. (Ver cuadro 25, parte VIII de anexos).

5. Pruebas In vitro de Antagonismo Serenade® contra el fitopatógeno

Las pruebas de antagonismo se realizarán como se describe en la sección 2.4. utilizando Serenade®.

C. Fase de pruebas en frutos

Durante esta fase se cumplió con el objetivo de extrapolar los resultados obtenidos en la fase de antagonismos a frutos para poder ver los efectos que tendrían los tratamientos de BM® y Serenade® en la post cosecha.

1. Prueba piloto de BM® en frutos

Utilizar una concentración de 2 g/L de BM® (dosificación recomendada para campo) y por aspersion se humedecieron de manera leve doce papayas.

- Se almacenaron 6 papayas a 16°C
- Se almacenaron 6 papayas a 25°C
- Se midió la vida útil de los frutos de cada tratamiento (días en condiciones libres de defectos), utilizando como punto de corte de vida útil los indicados en la parte VI, de la sección de anexos.
- Se utilizaron 15 frutos sin ningún tratamiento con las mismas condiciones como testigos.

2. Prueba piloto de Serenade® en frutos

Se utilizó una concentración de 1.6 g/L de Serenade® (dosificación recomendada para campo). Se procedió como se describe en el punto 3.1.

3. Comparación de Vida Útil

En los tres grupos de análisis:

- Papayas tratadas con BM®
- Papayas tratadas con Serenade®
- Papayas testigo

Con los datos de vida útil de la sección 3.1 y 3.2 determinar si hay una diferencia significativa entre cada tratamiento mediante un análisis estadístico de Anova de 2 factores con un porcentaje de error del 5%.

La metodología descrita anteriormente fue la utilizada dado que los bio controladores seleccionados para el estudio BM® y Serenade® no fueron antagonistas de los fitopatógenos aislados de los frutos. Para las pruebas de control biológico donde se obtenga un resultado satisfactorio en la fase de antagonismo seguir los pasos descritos en la parte X de la sección de anexos.

VIII. Discusión y resultados

La papaya (*Carica papaya*) es una especie de importancia en los trópicos por el alto rendimiento y valor nutritivo de su fruto además que es apetecida por su agradable sabor. Guatemala es el cuarto productor más grande a nivel Mesoamérica, la producción en el país se concentra en Petén que cuenta con las condiciones de horas luz, precipitación fluvial y nutrientes adecuadas para el cultivo. Además, el país tiene la ventaja de estar libre de la mosca blanca del mediterráneo por lo que se tiene facilidad para la exportación.

A pesar de todas las ventajas competitivas de la papaya, esta presenta una serie de problemáticas asociadas al cultivo como virus, hongos, bacterias y una serie de fitopatógenos que limitan su comercialización y produciendo pérdidas significativas. Una de las propuestas más innovadoras para tratar las enfermedades en el cultivo de la papaya (*Carica Papaya*) son los bio controladores. El fundamento de esta técnica es la introducción de microorganismos benéficos para controlar la población de otros microorganismos presentes en el medio.

En Guatemala, la empresa “La Carreta” se dedica a la venta y distribución de frutas y vegetales. Entre los frutos que comercializa se encuentra la papaya Kaya Paya® (*Carica Papaya*). La Kaya Paya® presenta altos niveles de pérdidas post cosecha por defectos de calidad como pudrición del fruto, pérdida de turgencia y colonización de microorganismos como antracnosis. Estos defectos de calidad han representado un 30% de pérdidas además de repercutir en la limitación de la comercialización, pérdidas de clientes, notas de crédito, incumplimiento de ventas y pérdida de recursos materiales y financieros.













La experimentación tuvo como objetivo comparar el efecto antagonista de los bio controladores (BM® y Serenade®) como alternativas para retrasar los defectos de calidad causadas por fitopatógenos en la post cosecha de papaya Kaya Paya® (*Carica Papaya*) para poder dar una recomendación a la empresa sobre la factibilidad del uso de los bio controladores en la post cosecha. Los resultados se presentan en orden descrito en la metodología, iniciando en la primera fase de identificación de fitopatógenos en los frutos, seguido por los resultados de los antagonismos y finalmente la vida útil promedio de los frutos usados en la prueba piloto junto con su respectivo análisis estadístico.









Fase 1. Identificación de fitopatógenos en los frutos

A continuación, se muestran los resultados del muestreo de 5 lotes distintos de frutos que tenían características críticas de almacenamiento como refrigeración, temperatura ambiente, manipulación y estadio de maduración. Los frutos seleccionados fueron hisopados para poder obtener un índice de contaminación exterior mediante conteo de bacterias y hongos, estos mismos microorganismos fueron identificados morfológicamente para poder aislarlos e identificarlos genéticamente. En simultáneo se realizó un sembrado de tejido de los frutos para poder determinar el grado de contaminación interna y compararlo con la contaminación externa. Los hongos observados en el sembrado de tejido también fueron aislados e identificados. La identificación de microorganismos es necesaria para poder ligar manifestaciones físicas con fitopatógenos de cultivos que pueden estar relacionados.

Se seleccionaron 5 grupos de papayas con características distintivas como el almacenamiento en refrigeración, almacenamiento a temperatura ambiente, procesamiento, adecuación de empaque, papayas descartadas en el proceso de producción y estadio de maduración (ver Cuadro 13 de anexos). Las cicatrices, daño mecánico y quemaduras son los motivos principales de la merma de producción y se vieron en algunos frutos, pero debido a que los tratamientos propuestos no ofrecen una solución o reducción de estos defectos no serán determinantes para la experimentación. Para ver defectos de calidad de la merma de producción ver Cuadro 54 de anexos.

Cuadro 5. Apariencia de los frutos de los 5 grupos de papayas el día del hisopado y sembrado de tejido para fase de caracterización de fitopatógenos en el fruto

01/03/2021	Papaya 1	Papaya 2	Papaya 3	Papaya 4
Grupo 1 Papayas almacenadas 15 días en ambiente controlado a temperatura ambiente				
Grupo 2 Papayas almacenadas 8 días en ambiente controlado a temperatura ambiente				
Grupo 3 Papayas almacenadas 15 días, almacenadas en refrigeración de 12-16°C.				

01/03/2021	Papaya 1	Papaya 2	Papaya 3	Papaya 4
Grupo 4 Papayas almacenadas 15 días, frutos de la merma de producción temperatura ambiente				
Grupo 5 Papayas de la entrega del día, no estuvieron almacenadas.				

El grupo 1 de papayas fue tomado de un nuevo lote de entrega de papayas y los 4 frutos se almacenaron en un ambiente controlado. Un ambiente controlado para fines del experimento se refiere a temperatura ambiente (25°C), sin manipulación constante (solamente para fotografiar los frutos) y sin contacto con personas que no sean el experimentador. Los frutos fueron almacenados por 15 días y durante la documentación de su vida útil (Cuadro 17, parte VIII Anexos) no se manifestaron defectos de calidad como colonización de microorganismos, solamente deterioro de la firmeza de la cascara en los frutos 2 y 3. También debido a la cantidad de tiempo almacenadas empezaron a mostrar cicatrices en la cascara.

El grupo 2 fueron papayas tomadas de un nuevo lote de entrega y se almacenaron en un ambiente controlado. Las papayas fueron almacenadas un total de 8 días. Los frutos de este grupo no manifestaron pudrición o colonización de microorganismos. Los defectos más evidentes de los frutos eran las cicatrices (daño mecánico) del fruto 7 y del fruto 8 que no afecto a la firmeza ni a la maduración. (Cuadro 18, parte VIII Anexos).

El grupo 3 fueron papayas que fueron almacenadas 15 días en refrigeración de 12 a 16°C en cuarto frío con el resto de las papayas en tránsito en proceso de venta para supermercados. Estos frutos no se apartaron de ninguna manera especial durante su vida útil para que pudieran sufrir el movimiento y readecuación que se da por el continuo flujo de material que tiene el cuarto frío. Estos frutos presentaron un grado de maduración menor que las papayas del grupo 1, también presentaron colonización de microorganismos en los 4 frutos. El microorganismo principal presente es un hongo blanco algodonoso que se encuentra encima de heridas de la carnaza.

Las papayas del grupo 4 fueron las que presentaron los defectos de calidad más severos de todos los grupos. Estas papayas fueron almacenadas por un total de 15 días en la bodega seca de la planta de procesamiento “La Carreta” a temperatura ambiente. Estas papayas sufrieron el proceso de adecuación en bodega, selección y descarte por parte de producción debido a defectos como cicatrices, daño mecánico, marcas circulares café (indicios de antracnosis) y por daño en el pedúnculo. Estos frutos son el peor escenario de daño a los frutos y gracias al proceso de selección de los frutos antes de proceder al despacho para la venta, se impide la llegada de estos frutos al supermercado.

Los frutos de los grupos 3 y 4 no fueron documentados durante su vida útil para evitar una separación del lote de entrada y evitar afectar la calidad final. Esto se debe a que los frutos de las tarimas que están en tránsito de venta tienen un flujo contante del cual se sospecha se puedan originar un grado de daño mecánico que puede estar ligado a la manifestación de microorganismos. Entonces un aislamiento de los frutos pudo haber provocado una disminución de la severidad de las afecciones de calidad, por lo que para futuras experimentaciones se recomienda seguir con la misma metodología para obtener resultados certeros.

El grupo 5 fue el grupo control, ya que eran papayas en estadio de maduración 1 (ver Figura 1, Antecedentes) que fueron seleccionadas de la entrega de papayas el día que se realizó el hisopado y sembrado de tejido de los frutos. Las papayas no presentan defectos aparentes como daño mecánico, pudrición, degradación, ablandamiento o colonización de microorganismos, pero debido a que la infección por hongos se puede dar en estadio inmaduro fueron vitales para poder determinar la contaminación de los frutos y si cuentan ya con hongos es estado latente. (Suárez *et al*, 2013).

Se observó que los frutos con la menos incidencia de defectos de calidad fueron los que estuvieron almacenados en condiciones controladas (grupo 1 y grupo 2), seguidos del grupo 3 que manifestaron colonización de microorganismos y por último los frutos del grupo 4 que presentaron la mayor cantidad de defectos desde colonización, puntos suaves, marcas en la carnaza hasta una pudrición total. Los frutos del grupo 1 no tuvieron colonización ni marcas severas durante los 15 días de almacenamiento y los frutos del grupo 2 tampoco tuvieron manifestaciones de colonización durante los 8 días que fueron almacenados. Los frutos del grupo 3 empezaron a presentar puntos suaves a los 8 días de almacenamiento y colonización de hongo blanco a los 11 días. En cambio, los frutos del grupo 4 presentaron en el día 5 marcas profundas en la carnaza que en el día 7 estaban colonizadas por completo por microorganismos y en el día 13 los frutos ya presentaban una pérdida severa de la turgencia.

Con las observaciones de esta etapa se puede sugerir a “La Carreta” un control adecuado en los cuartos de refrigeración para poder disminuir la contaminación que pueda producirse durante el acondicionamiento del producto, ya que el estadio de maduración era 2-3 pero ya se presentaba incidencia de microorganismos. Además, es vital poder tener un control de la temperatura (12 - 14°C) desde la carga en campo hasta la entrega en la planta, ya que los cambios bruscos pueden provocar condensación de agua y cambios en los patrones de respiración del fruto, estos cambios bruscos pueden inducir el desarrollo de hongos causantes de enfermedades como la antracnosis si el fruto viene infectado de campo. Debido

a que el almacenamiento en condiciones controladas no es una opción viable para la empresa se recomienda una revisión de las características como roce entre frutos, control de temperatura con pocas fluctuaciones y evitar movimientos bruscos durante el traslado que puedan causar daño mecánico. (Molina, Gómez & Umaña, 2017).

Los defectos de calidad observados durante esta fase de la experimentación se relacionan estrechamente con los síntomas iniciales de la antracnosis en frutos de papaya que consisten en lesiones circulares, hundidas, blandas, limitadas por un halo café claro y translúcido, que se desarrollan en la epidermis de la fruta y aumentan de tamaño hasta observarse lesiones húmedas y colonias de esporas de color naranja o rosado en la parte central de la lesión. La variación en los síntomas se asocia a las diferencias en genotipo del hospedante y la presencia de diferentes especies del patógeno. Por lo que es de vital importancia la identificación de defectos que puedan ligarse a fitopatógenos para corroborar si estos están presentes en los frutos en la fase 2.

Entre los fitopatógenos más comunes en papaya se encuentra la antracnosis. La infección con antracnosis ocurre desde que el fruto está en campo, permaneciendo generalmente latente hasta la cosecha para desarrollarse junto con la maduración del fruto. El hongo puede habitar en frutos caídos, hojas senescentes, hospederos alternos o en otro tipo de material orgánico. El conidio (estructura reproductiva) puede dispersarse por medio del viento o el agua y una vez dispersadas éstas se adhieren a la superficie del fruto y pueden germinar a las 24 horas produciendo el tubo germinal el cual penetra la cutícula del fruto. Después de la penetración de la cutícula las hifas pueden colonizar la pared celular del fruto. Los primeros síntomas (incubación) pueden ser visibles después de 8 días y la producción de estructuras reproductiva del hongo dentro de la lesión (periodo de latencia) se presenta a partir de los 15 días aproximadamente. Por lo que las manifestaciones antes descritas se deben al proceso de crecimiento y reproducción del hongo, alimentándose del fruto hasta causar la pudrición de este.

El paso de selección de los frutos de distintos lotes de interés fue vital ya que no solo permitió dar una vista a la calidad final de cada fruto dependiendo del proceso de almacenamiento y adecuación, sino que también se lograron identificar de manera visual los parámetros de finalización de vida útil que se utilizarían para la prueba piloto en frutos (ver Cuadro 16 de la sección VI de anexos). En esta fase de la metodología se observaron las incidencias y las características de los defectos de calidad de los frutos, comprobando que el desarrollo de posibles hongos en los frutos concuerda con la maduración del, esto puede deberse a la disponibilidad de nutrientes para el hongo ya que durante la maduración se da un proceso de hidrólisis donde carbohidratos complejos pasan a ser carbohidratos simples que pueden ser digeribles por estos microorganismos. (Molina, Gómez & Umaña, 2017).

El primer parámetro de finalización de vida útil son los puntos suaves o focos de pérdida de turgencia, estas heridas en los frutos regularmente se encuentran en marcas circulares y concéntricas. Por lo regular las manifestaciones externas no son solamente un problema de la cáscara si no que llegan a repercutir en la carnaza. El segundo parámetro es la pudrición del pedúnculo, este parámetro usualmente se observa en etapas tardías de la maduración. El pedúnculo es el epicentro de las reacciones enzimáticas ya que es la parte por la cual el fruto se encontraba unido al árbol y si no se tiene un buen tratamiento de curado

después del corte fácilmente pueden darse infecciones que pueden pudrir en su totalidad el fruto.

El tercer parámetro de finalización de vida útil es la deshidratación severa y envejecimiento del fruto, al igual que el parámetro anterior este defecto se presenta en estadios tardíos de la maduración y puede ser muy severo si el fruto no cuenta con recubrimientos que ayuden a disminuir la permeación de agua. Además, este parámetro pocas veces es visualizado si la afección por fitopatógenos es muy severa, ya que antes ocurriría una colonización que desencadenaría una pudrición del fruto. El cuarto parámetro es la manifestación de manchas oscuras, este tipo de manchas están ligadas con la antracnosis e inician con el desarrollo de marcas severas en la carnaza que a los pocos días terminan colonizadas en su totalidad por hongos. Este tipo de marcas se dan por lo regular en la parte central del fruto, que también es la parte que puede estar más expuesta al daño mecánico por roce.

El quinto parámetro como se indicaba anteriormente es la colonización por microorganismos que en su gran mayoría son hongos. La colonización puede estar antecedida por marcas oscuras en la cascara o no, pero la gravedad de la afección de la carnaza es similar. Según observación de estos primeros lotes de frutos el hongo que tuvo mayor presencia fue uno blanco, con apariencia algodonosa que también podría encontrarse con un hongo negro. El sexto parámetro es la pudrición de la carnaza, la pudrición esta antecedida por la colonización exterior de microorganismos. La pudrición es uno de los parámetros más críticos, ya que los frutos pueden fácilmente desmoronarse por una pérdida total de la turgencia. Esta pudrición, aunque puede manifestarse exteriormente, de manera interna puede extenderse en todo el fruto ya que la contaminación se encuentra en el interior. Esto se debe a que la mayoría de los fitopatógenos entran de manera sistemática a las plantas por lo que también llegan a los frutos por la misma vía de alimentación.

Estos parámetros pueden tener diferentes representaciones o variar su intensidad, pero en los casos de vida útil analizados durante la primera etapa engloban todos los defectos de calidad. Esta fase de la metodología resalta la importancia de la post cosecha en cualquier producto fresco, la combinación de temperatura, ventilación, daño mecánico, limpieza, transporte y manipulación son factores decisivos que pueden ser causantes de estrés que aceleren los defectos de calidad. Además, también se observó como de un mismo lote de papayas se puede tener una amplia gama de factores diferentes como estadio de maduración y posibles daños mecánicos como cicatrices, golpes, roces y demás defectos que son el motivo por el cual es vital un proceso de selección durante la adecuación del empaque protector a la fruta.

Al finalizar este periodo de observación se puede concluir que la manifestación de los defectos de calidad está estrechamente relacionada con la maduración de los frutos, ya que a mayor grado de maduración alcanzados eran más notorios los defectos como pudrición y colonización de hongos. También se logró determinar que no todos los frutos presentan el mismo tipo de colonización de hongos y tienen diferentes características físicas. Finalmente, esta observación permitió conocer también factores claves que suceden en la planta “La Carreta” como temperatura de almacenamiento, tiempo de almacenamiento y cuartos refrigerados que contienen el fruto hasta su despacho.

Los cinco grupos de papayas seleccionados fueron sometidos a un hisopado en la superficie para la detección y cuantificación de hongos y bacterias. De este análisis se obtuvo el índice de contaminación de los frutos que establece una relación entre la apariencia de los frutos y su grado de infestación además de aislar microorganismos que puedan causar un efecto directo en la calidad de los frutos. Estos análisis fueron necesarios para poder determinar cómo afectan las condiciones ambientales a la calidad exterior de los frutos y poder expresar estos resultados como mejoras para el proceso post cosecha. El sembrado de tejido es una técnica muy efectiva para conocer la contaminación real de los frutos y así conocer los microorganismos internos que puedan causar afecciones.

Cuadro 6. Recuento de hongos y bacterias de los 5 grupos de papayas analizadas en el hisopado

Identificación	UFC/cm ²		Observaciones
	Bacterias (PCA)	Hongos (Sabouraud)	
Frutos de papaya Grupo 1 (almacenadas 15 días a temperatura ambiente en ambiente controlado)	20.4	0.0	No se observaron hongos, solo bacterias.
Frutos de papaya Grupo 2 (Almacenadas 8 días a temperatura ambiente en ambiente controlado)	5.1	0.02	Se aisló una bacteria para identificación y se observó presencia de posible <i>Fusarium sp.</i>
Frutos de papaya Grupo 3 (Almacenadas 15 días en refrigeración de 12-16°C)	1.7	0.0	No se observaron hongos, solo bacterias, se aislaron 2 para identificación
Frutos de papaya Grupo 4 (15 días en bodega a temperatura ambiente, tomadas de la merma de producción)	642.9	9.5	Se observó crecimiento de hongos, posible <i>Colletrotrichum sp.</i> Se aisló para identificación y antagonismo.
Frutos de papaya Grupo 5 (No fueron almacenadas, se tomaron de la entrega del día)	0.2	0.0	No se observaron hongos, solo bacterias, se aisló una para identificación.

En el grupo de papayas 1 no se observaron hongos solamente bacterias, el conteo total de bacterias fue de 20.4 UFC/cm². Los frutos del grupo 2 presentaron una carga de 5.1 UFC/cm² bacterias y hongos 0.02 UFC/cm²; en la caja de hongos se observó un hongo con características muy similares a *Fusarium sp.*, la mayoría de las especies de este género son reportadas como contaminantes ambientales, pero algunas como el *Fusarium Solani* son fitopatógenos reportados de la papaya. Este hongo se aisló para determinar la especie. Ver Cuadro 19 y 20 de la sección VII de anexos para conteos de bacterias y hongos.

El grupo 3 tuvo menor grado de contaminación al compararlo con los primeros 2 grupos de análisis (Bacterias 1.7 UFC/cm² y sin presencia de hongos) a pesar de presentar un crecimiento notorio de microorganismos, esto puede deberse a que la metodología de hisopada empleada toma en cuenta la contaminación añadida por factores externos por lo que se realizó una limpieza superficial con etanol al 70%. Por este motivo posiblemente la contaminación visible de los frutos se debió a microorganismos oportunistas que llegaron a colonizar heridas leves de los frutos. Adicionalmente, los frutos no sufrieron manipulación hasta el día del análisis reduciendo importantemente la principal causa de contaminación cruzada en la industria de alimentos que son las manos sucias. (Lamela, 2018)

El grupo 4 fue el más contaminado con el mayor recuento de bacterias (642 UFC/cm²) y de hongos (9.5 UFC/cm²). Esto puede deberse a las condiciones de almacenamiento y de manipulación constante que sufrieron los frutos. Al colocarse todos los frutos rechazados juntos también se da una contaminación directa entre diferentes tipos de bacterias y hongos que cada uno pueda poseer. Se observó el crecimiento de posible *Colletotrichum sp.* por lo que se aisló para identificación.



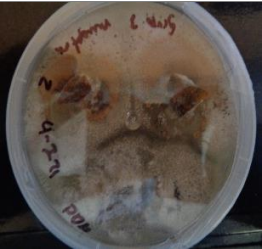


Los conteos del grupo 5 fueron los menos contaminados (Bacterias 0.2 UFC/cm² y sin presencia de hongos) lo que puede ser un indicador del estado de latencia de hongos en estadios de maduración temprana pero debido a la distribución no homogénea de los fitopatógenos en plantaciones también pudo tratarse de frutos que no fueron contaminados. Esta última característica es determinante en el estudio de fitopatógenos en plantas ya que se necesita un sistema de muestreo aleatorio y lo bastante representativo para lograr caracterizar con amplitud los microorganismos que pueden estar aquejando a las plantas y repercutiendo en la calidad de los frutos. (Suárez *et al.*, 2013).

Al comparar los resultados de los recuentos con la contaminación exterior analizada en el parte anterior se vio una relación ya que entre mayor fue la degradación exterior también fue más alto el índice de contaminación del recuento. Por ejemplo, el grupo 4 que era el que presentaba la mayor pudrición y colonización fue el que presentó también la mayor carga de contaminación. Al analizar el grupo 1 solamente tuvo una carga de bacterias de 20.4 UFC/cm² que coincide con los resultados de apariencia obtenidos, las bacterias pueden ser ambientales o pudieron transferirse a los frutos durante su manipulación. Los frutos del grupo 2 presentaban una carga de contaminación de 5.1 UFC/cm² bacterias y 0.02 UFC/cm² hongos, lo que también se pudo observar con la ausencia de manifestaciones de defectos en los frutos. Por otro lado los frutos del grupo 3 presentaron una carga bacterias de 1.7 UFC/cm² y sin presencia de hongos, pero de manera exterior si se visualizaron colonizaciones de hongos blancos algodonosos, pudo deberse solamente a contaminación exterior o también al grado de maduración de la fruta que fue retrasado por la refrigeración. El Grupo 4 fue el que no tuvo defectos de calidad aparentes por lo que tampoco presentó un índice de contaminación elevado.

Junto con el índice de contaminación exterior se realizó un sembrado de tejido que da un índice de contaminación interna. El sembrado de tejido es una técnica muy efectiva para conocer la contaminación real de los frutos y así establecer una comparación entre la contaminación interna y externa. Para este análisis se seleccionaron tres partes de cada fruto: pedúnculo, carnaza con heridas visibles y carnaza sin heridas aparentes. Se seleccionó el

pedúnculo ya que es la parte por donde ingresan los nutrientes de la planta madre y un posible foco de infección si no se cura de manera adecuada en la post cosecha, también carnaza con heridas aparentes ya que pueden detectarse microorganismos detonantes y carnaza sin heridas aparentes para poder observar la distribución de la contaminación interior, aunque la manifestación física se concentre en puntos focales donde se manifieste pudrición o colonización de microorganismos.

Cuadro 7. Crecimiento de hongos de las muestras de tejido de los frutos de los 5 grupos de interés

Identificación	Sembrado Agar PDA	Descripción
Grupo 1 (15 días de almacenamiento en ambiente controlado)		Un crecimiento mixto de hongos se observa con crecimiento predominante de un hongo blanco posible <i>Fusarium sp.</i> El hongo predominante se observa como una colonia blanca con pequeños puntos centrales anaranjados claros y con una textura más filamentosa (con puntas).
Grupo 2 (8 días de almacenamiento en ambiente controlado)		Un crecimiento mixto de hongos, se observa un crecimiento predominante de un hongo con apariencia naranja posible <i>Colletotrichum sp.</i> La mayor cantidad de la superficie de la caja tiene una coloración naranja oscura con pequeños puntos negros a lo largo de la colonia.
Grupo 3 (15 días en refrigeración de 12-16°C)		Crecimiento mixto de hongos, no se logro identificar uno predominante o con características conocidas para categorizarlo como una especie reconocida de fitopatogenos. Habia una mezcla de colonias filamentosas con apariencia algodonosa. Se prosiguió al aislamiento.
Grupo 4 (15 días a t ambiente de merma de producción)		Crecimiento aparente de un solo tipo de hongo o varias colonias de hongos con características visuales muy similares. Se observó un color blanco algodonosa y con pequeños puntos negros que parecían ser homogeos en las 3 colonías grandes que sobresalieron.
Grupo 5 (No fueron almacenadas, se tomaron de la entrega del día)		No se observó un crecimiento significativos de hongos en la muestra de ninguna de las 3 partes usadas del fruto. Se nota una pequeña colonia blanca en un solo de los trozos, al comparar con el resto de cajas hay una menor cantidad de contaminación interna. No se aislaron hongos.

Para observar el sembrado de tejido de los 5 grupos en el día 4 y 8 de análisis ver Cuadro 21 de la sección VII de anexos. En el grupo 1 se observó como hongo predominante posible *Fusarium sp.* El hongo predominante se observa como una colonia blanca con pequeños puntos centrales anaranjados claros y con una textura más filamentosa (con puntas). La presencia se nota en la mayoría de la caja con pequeños crecimientos de hongos de color verde en la parte inferior de la caja. En el grupo 2 se observó un crecimiento mixto de muchas colonias de hongos de distintos colores. El hongo predominante es uno de apariencia naranja que puede ser *Colletrotrichum sp.* Ambos grupos presentaron una baja contaminación exterior en los hisopados, pero en esta prueba de contaminación interna mostraron incidencia de hongos posibles fitopatógenos que al no mostrar afecciones físicas visibles no pudieron identificarse con la metodología anterior.

El grupo 3 presentó un crecimiento mixto de hongos donde no se logró identificar un predominante o con características morfológicas específicas para clasificarlo alguna especie bajo una familia de organismos. La contaminación interna tampoco parece tener una relación con el grado de contaminación mostrada en los hisopados de superficies, donde no se detectaron hongos. La apariencia de los hongos del sembrado de tejido del grupo 3 fue muy similar a la del grupo 2. En el grupo 4 se dio el crecimiento aparente de un solo tipo de hongo o varias colonias de hongos con características visuales muy similares. La caja tenía una colonia blanca algodonosa y con puntos centricos negros.

En la siembra de tejido del grupo 5 la contaminación interna fue baja al comparar con el resto de muestras. Se notaron pequeños crecimientos aislados que no mostraron un desarrollo predominante. Esto puede deberse a que frutos con poca maduración tienden a tener posibles hongos contaminantes en estado de latencia y que estos se van desarrollando a medida que van estando disponibles más nutrientes durante la maduración. También puede estar involucrada la distribución no homogénea de los fitopatógenos en los frutos.

Del índice de contaminación interna se lograron obtener los resultados más significativos sobre la contaminación de los frutos ya que en cada crecimiento mediante morfología se lograron distinguir microorganismos fitopatógenos como *Colletrotrichum sp.* y *Fusarium sp.* Entre los distintos lotes solamente varió la intensidad del crecimiento como se puede observar al comparar el crecimiento del grupo 4 y del grupo 5, donde el crecimiento del grupo 4 colonizó por complejo el medio mientras que el crecimiento del grupo 5 solamente fueron puntos aislados de colonias anaranjadas. Esta variación puede corroborar que los microorganismos se encuentran pueden estar presentes en el fruto, pero los factores externos estrés como cambios de temperatura, daño mecánico, manipulación y acondicionamiento serán críticos para manifestaciones externas de defectos como colonización o pudrición. De este análisis se resalta la importancia de las buenas prácticas post cosecha ya que estas pueden ayudar a disminuir la severidad de afecciones en la postcosecha como se analizó en la primera parte.

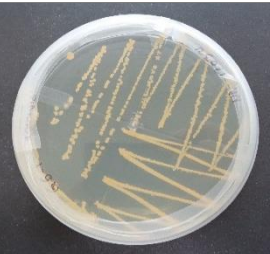



Además de una mirada a la contaminación presente en el interior y en el exterior de los frutos se aislaron varios microorganismos para su identificación molecular. La identificación molecular tiene la finalidad de identificar con género y especie (dependiendo de la calidad de la extracción de ADN) los microorganismos y así definir si se trata de fitopatógenos de la

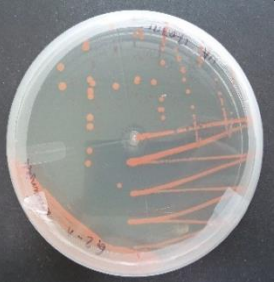
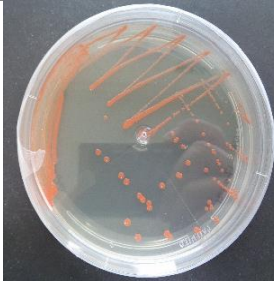


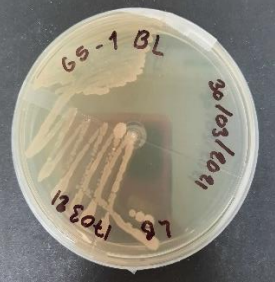





papaya. Algunos microorganismos fueron eliminados o seleccionados para seguir con la identificación basándose en la matriz de decisión del Cuadro 15 de la sección IV de Anexos.

También en la parte VII de anexos en el Cuadro 22 se pueden observar algunas de las imágenes de los crecimientos en conjunto de varios microorganismos, estos crecimientos “mixtos” fueron necesarios para obtener crecimientos individuales de los microorganismos de interés. En las imágenes de crecimiento mixto también se muestra la vista microscópica de las hifas de los microorganismos de interés y el crecimiento de varios hongos en el mismo medio. El proceso de purificación tuvo varias dificultades, ya que varios hongos parecían crecer en conjunto a pesar de las múltiples repeticiones realizadas para la separación. En algunos casos se observaba en caja de Petri un crecimiento “individual” con una sola colonia homogénea, de un solo color y con una morfología muy específica, pero al analizar en el microscopio se lograban ver hifas de distintos tipos lo que indicaba una contaminación y tener que volver a repetir el proceso de aislamiento. Al final de esta fase se determinó que más importante que una apariencia individual de crecimiento es vital lograr un crecimiento de hifas individual para garantizar una separación exitosa y proceder con la extracción de ADN para la identificación específica de género y especie.

A continuación, se presentan los resultados obtenidos del aislamiento de las bacterias de los sembrados de superficies y tejido de los frutos. Se aislaron 7 bacterias que podrían tener algún efecto fitopatógeno o contaminante mediante una identificación morfológica preliminar. Se realizó una identificación de ADN mediante el marcador ARNr 16S, además de una identificación de crecimiento en agar natural y se detalla la importancia de la bacteria para el estudio. Si la bacteria no tiene reportes de patogenicidad en plantas serán rechazadas para la siguiente etapa de la investigación ya que posiblemente no se trate de microorganismos que causen defectos post cosecha como los observados en la primera etapa.

Cuadro 8. Identificación de bacterias aisladas del hisopado de los 5 grupos de papayas analizados.

Identificación	Frente	Fondo	Relevancia
<p><i>Staphylococcus gallinarum</i></p> <p>100% de identidad</p>			Sin reportes de patogenicidad en plantas
<p><i>Brevibacterium sp.</i></p> <p>100% de identidad</p>			Sin reportes de patogenicidad en plantas

Identificación	Frente	Fondo	Relevancia
<p><i>Rhodococcus</i> <i>sp.</i></p> <p>100% de identidad</p>			Sin reportes de patogenicidad en plantas
<p><i>Microbacterium</i> <i>sp.</i></p> <p>100% de identidad</p>			Sin reportes de patogenicidad en plantas
<p><i>Bacillus</i> <i>sp.</i></p> <p>100% de identidad</p>			Sin reportes de patogenicidad en plantas
<p><i>Kocuria</i> <i>sp.</i></p> <p>100% de identidad</p>			Sin reportes de patogenicidad en plantas
<p><i>Staphylococcus</i> <i>sp.,</i></p> <p>100% de identidad</p>			Sin reportes de patogenicidad en plantas

Entre las bacterias identificadas no se encontró ninguna que fuera un fitopatógeno reportado para papaya por lo que para fines de la experimentación dejaron de ser significativas. Entre las bacterias aisladas se encontraba el *Staphylococcus gallinarum* que como su nombre indica puede encontrarse en aves de corral, pero se ha visto también en heridas de seres humanos y en infecciones de enfermos de hepatitis. (Pérez *et al*, 2017). *Brevibacterium sp.* es un género de bacterias que se pueden encontrar en la piel de los seres humanos y también es utilizada para las fermentaciones de ciertos tipos de quesos.

Rhodococcus sp. es un microorganismo que puede causar neumonía y abscesos pulmonares en mamíferos en crecimiento como los potros, también se ha encontrado esporádicamente en gato, el perro y el cerdo. El género bacteriano *Microbacterium sp.*, pertenece al grupo de las actino bacterias y ha sido descrito como un organismo endófito o asociado a la rizosfera de plantas en zonas áridas y salinas, con actividad promotora de crecimiento vegetal a través de diferentes mecanismos. (Pantoja, Mendoza & Valero, 2018).


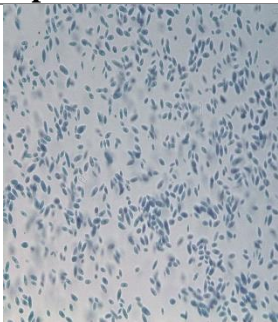
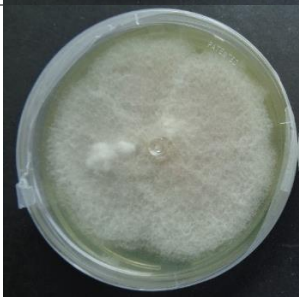
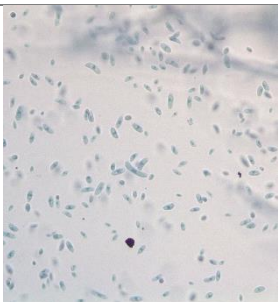
Bacillus sp se encuentra ampliamente distribuido en los agro-sistemas y una de sus principales aplicaciones es el control de enfermedades de cultivos agrícolas. Por lo que sería recomendable continuar con el estudio de esta bacteria para poder determinar si podría ser un antagonista viable contra microorganismos fitopatógenos. (Villarreal *et al*, 2018). *Kocuria spp.* es parte del microbiota de la piel y orofaringe y muchas de las especies se han aislados de muestras de origen ambiental y animal (suelos, agua marina, carnes, pollos). (Silva, 2012).

Staphylococcus sp tiene un crecimiento muy similar a *Staphylococcus gallinarum*, por lo que puede tratarse de la misma bacteria que por la calidad de la secuenciación no pudo lograrse definir el género. Además, ya que no hay un género de *Staphylococcus sp* que haya sido reportado como fitopatógeno no será necesario seguir con la bacteria para el estudio. Una fuente de error que debe considerarse en la secuenciación molecular es la degradación por la que pasa el producto de ADN durante su purificación además de los diferentes picos de identidad obtenidos. (Pérez *et al*, 2017).

En conclusión, se determinó que ninguna de las bacterias aisladas durante la experimentación era de interés para el estudio por no cumplir con el criterio de ser fitopatógenos conocidos de la papaya (*Carica papaya*). Este resultado indicó que los posibles vectores causantes de enfermedades en el cultivo y en los frutos podrían ser hongos, por lo que el resto de la experimentación se centraría en opciones más estudiadas con mayor referencia sobre el análisis de hongos causantes de afecciones de la cosecha.

Para realizar la identificación genética de los hongos se utilizaron secuencias de ADN que se identificaron con el marcador ITS1-5.8S-ITS2(ribosomal internal transcribed spacer). Los hongos fueron los aislamientos que necesitaron más resiembra por eso fueron las muestras que llevaron más tiempo en obtenerse por el tiempo de crecimiento y esporulación además del crecimiento mixto que presentaron varios microorganismos, por lo que para futuras experimentaciones se recomienda tomar en cuenta que este puede ser el periodo de tiempo más significativo de la experimentación y realizarlo con la debida anticipación.

Cuadro 9. Identificación de hongos aislados de los hisopados y del sembrado de tejido de los 5 grupos analizados de papayas

Identificación	Figura	Apariencia de hifas	Relevancia
<p><i>Colletotrichum spp.</i></p> <p>100% identidad</p>			<p>Las especies reportadas como fitopatógenos en plantas son:</p> <p><i>Colletotrichum Truncatum</i>, <i>Colletotrichum Gloeosporioides</i> y <i>Colletotrichum Acutatum</i></p>
<p><i>Fusarium Solani</i></p> <p>100% identidad</p>			<p>Reportado como causante de necrosis en cultivos, es un fitopatógeno conocido.</p>

Por parte de los hongos se logró la identificación molecular del género *Colletotrichum sp.* Esta generó cuenta con varias especies como *Colletotrichum Truncatum* (Capsici), *Colletotrichum gloeosporioides* y *Colletotrichum Acutatum* que causa una enfermedad conocida como antracnosis, la cual se presenta en plantas y frutos. Para ver la manifestación física de cada especie ver Cuadro 2 de la sección de marco teórico. Al observar las conidias aisladas de pudieron observar pequeños bastoncitos alargados y con forma cilíndrica que usualmente están ligadas al *Colletotrichum gloeosporioides*. (Landro-Valenzuela *et al.* 2016).

El fruto desde su formación y desarrollo en la planta, y hasta la postcosecha sufre daños por *Colletotrichum* dependiendo de las condiciones climáticas. Los síntomas característicos de esta enfermedad son lesiones circulares hundidas en frutos que se tornan de diversos colores tales como negro, marrón o blanco; ó bien la combinación de ambos, dependiendo de la especie involucrada. La propagación es tan drástica ya que en las hojas de la planta se forman pequeños puntos negros que al caer al suelo propagan la infección a las plantas de alrededor. La aparición de antracnosis influye en los rendimientos y la calidad de los cultivos. (Landro-Valenzuela *et al.* 2016).

La antracnosis se ve favorecida con temperaturas cercanas a 28°C, en un rango de 20 a 30°C y una humedad relativa del aire sobre 95% ya que se requiere de agua libre para la germinación de las conidias. En zonas productoras de México el periodo más crítico se presenta entre septiembre y marzo. (Landro-Valenzuela *et al.* 2016).

Al igual que con las bacterias la calidad de la secuencia y la degradación del proceso de purificación influyen en la especificidad del resultado, logrando identificar el género y la

especie para el *Fusarium Solani* mientras que solamente el género para *Colletotrichum spp.* Por lo que para futuras experimentaciones se recomienda repetir el proceso de extracción y de identificación ya que en especial para el *Colletotrichum spp.* se conocen al menos 4 especies que están ligadas a la antracnosis y para cada una de las especies se cuenta con tratamientos específicos que pueden ir desde el tratamiento foliar hasta aplicación de nutrientes como calcio. (Landro-Valenzuela *et al.* 2016).

Fusarium Solani es un conocido fitopatógeno que causa síntomas como necrosamiento de tejido vascular, marchitez, pudrición de raíz, muerte descendente y acortamiento de entrenudos. Hay reportes de su incidencia en plantaciones de piñón en México (Herrera-Parra *et al.* 2017), en Algodón en Adamawa, Nigeria (Chimbekujwo, 2000). También se ha identificado como un factor causal de la disminución y la mortalidad de los árboles de Coral (*Erythrina variegata*) en la isla de Okinawa, Japón. (Takashina *et al.* 2020)

Fusarium solani es la especie más común y extendida de *Fusarium* que causa la pudrición de la papaya en Hawai, India y Filipinas. En México, se ha informado que *F. solani* causa la pudrición del collar de las plántulas. Es un patógeno débil que requiere algún tipo de factor predisponente que estresa o daña la fruta antes de que se establezca. A menudo se ve como un invasor secundario en lesiones causadas por otros hongos como la antracnosis. También se sabe que el hongo causa la pudrición de los frutos de papaya jóvenes (3-5 cm de largo), especialmente durante el clima húmedo.

El hongo ingresa a la cavidad de la semilla a través del extremo de la flor, donde se propaga rápidamente dentro de la fruta y hace que la fruta aborte y caiga del árbol. Las lesiones en los frutos son pequeñas, de hasta 15 mm, deprimidas y generalmente cubiertas por una combinación de micelios blancos y masas conidiales. Pueden aparecer tanto en la superficie de la fruta como en el extremo del tallo. Se ha visto que los aerosoles preventivos de campo y los baños de agua caliente pueden ayudar a controlar la pudrición de la fruta por *Fusarium*. (Nishijima, 1993)

En conclusión, ambos hongos identificados *Fusarium Solani* y *Colletotrichum spp.* son fitopatógenos conocidos de la papaya (*Carica papaya*) por lo que se utilizaron para la siguiente fase del estudio donde se determinará la acción que tienen los bio controladores *Bacillus Safensis* (BM®) y el *Bacillus Subtilis* (Serenade®) sobre los microorganismos.

Fase 2. Antagonismo

Los fungicidas en precosecha o postcosecha constituyen la principal forma de reducir las pérdidas asociadas a fitopatógenos. Sin embargo, el uso indiscriminado ha tenido como consecuencia la resistencia de los microorganismos patógenos. Por otro lado, su uso está ampliamente restringido debido a la preocupación por los residuos tóxicos y los riesgos ocasionados a la salud. Por ello, existe la necesidad de manejar la enfermedad con alternativas amigables con el medio ambiente, entre estas alternativas se encuentra el uso de microorganismos como agentes de control biológico. (Landro-Valenzuela *et al.* 2016).

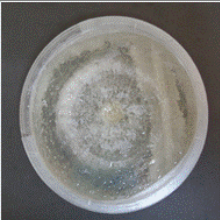
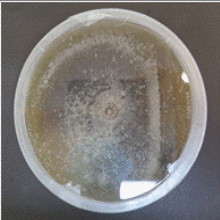
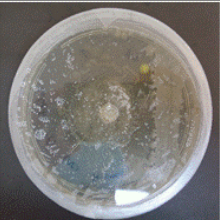
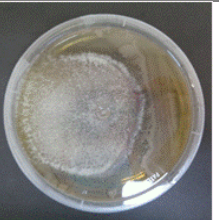
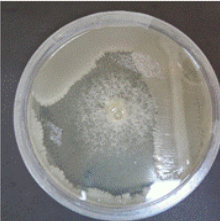
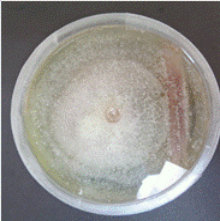
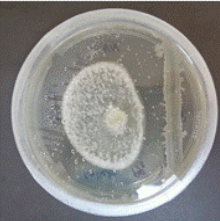

Los agentes de control biológico además de ofrecer una alternativa sustentable también tienen ventajas como la falta de residualidad por lo que pueden aplicarse sin necesitar periodos de carencia en plantación o como esta experimentación lo plantea directo en frutos.

Los bio controlares pueden ofrecer un recubrimiento a los frutos para evitar que las manifestaciones de los fitopatógenos sean tan severas y así reducir los defectos de calidad en la post cosecha. La principal acción sería en la cascará para impedir heridas visibles en el fruto que se dan durante el desarrollo del hongo y así poder impedir defectos colaterales al desarrollo del hongo.

Los agentes de control biológicos propuestos para el control de estos fitopatógenos en la post cosecha se encuentra el *Bacillus Safensis* (BM®) y el *Bacillus Subtillis* (Serenade®). Antes de poder comprobar su acción en los frutos se comprobó la eficacia de los antagonistas en medios de cultivo enfrentándolos a los fitopatógenos mediante la técnica de sembrado dual.

El primer paso para poder proceder con el antagonismo fue identificar morfológicamente a los microorganismos propuestos como antagonistas. Ver Cuadro 23 de la parte VIII de Anexos. El *Bacillus Safensis* (BM®) en agar natural tuvo un crecimiento de colonias blancas cremosas y brillantes, los bordes eran lisos y tenían una pequeña cúpula. La vista en microscopio mostraba una colonia viscosa y rugosa. En cambio, el *Bacillus Subtillis* (Serenade®) se presentó como colonias opacas de color crema, los bordes eran irregulares y una apariencia plana de las colonias. En microscopio se observó una colonia irregular con picos en los bordes y filamentosa en el interior.

Cuadro 10. Resultado de antagonismo de hongos fitopatógenos detectados contra las bacterias *Bacillus Safensis* (BM®) y *Bacillus Subtilis* (Serenade®)

<i>Bacillus Safensis</i> (BM®) contra				
	<i>Colletotrichum sp. en medio NA</i>	<i>Colletotrichum sp. en PDA</i>	<i>Fusarium solani en medio NA</i>	<i>Fusarium solani en medio PDA</i>
Resultado	BM® no es antagonista	BM® no es antagonista	BM® no es antagonista	BM® no es antagonista
<i>Bacillus Subtilis</i> (Serenade®) contra				
	<i>Colletotrichum sp. en medio NA</i>	<i>Colletotrichum sp. en PDA</i>	<i>Fusarium solani en medio NA</i>	<i>Fusarium solani en medio PDA</i>
Resultado	Serenade® no es antagonista	Serenade® no es antagonista	Serenade® no es antagonista	Serenade® no es antagonista

Para los antagonismos la técnica empleada (Arcos, Elias, & Antonio, 1984) toma en cuenta que para un antagonismo de hongo contra bacteria deben tenerse igualdad de condiciones para poder favorecer en igual medida los factores nutricionales e intrínsecos de cada tipo de microorganismo, para poder lograrse se realiza una corrida de antagonismo en agar natural para favorecer a las bacterias y en agar PDA para favorecer a los hongos. Los antagonismos se realizaron para los dos hongos identificados como fitopatógenos (*Colletotrichum sp.* y *Fusarium solani*) con los posibles antagonistas *Bacillus Safensis* (BM®) y *Bacillus Subilis* (Serenade®). Para determinar si las bacterias empleadas actuarían como antagonistas con los fitopatógenos se debía evidenciar un halo de inhibición del crecimiento por parte de la bacteria. Para ver ejemplos de halos de inhibición ver Cuadro 24 de la parte VIII de anexos.

Los halos de inhibición son un parámetro de inhibición efectivo ya que son una representación clara de la reducción del crecimiento de microorganismos a controlar, los halos pueden presentarse con intensidad o de manera leve dependiendo de la efectividad del antagonista. Los halos se observan cuando el antagonista presenta un mecanismo de defensa en específico que puede ir desde la producción de metabolitos tóxicos hasta un parasitismo. También hay otros parámetros para medir el antagonismo como el crecimiento radial y el porcentaje de inhibición donde se usa la ecuación 1 para cuantificar los resultados, pero debido a que en ningún enfrentamiento se mostró un halo de inhibición el parámetro fue únicamente presencia o ausencia para definir si se tenía un antagonista.

En el caso de *Bacillus Safensis* (BM®) contra *Colletotrichum sp.* no se lograron ver halos de inhibición en ninguna repetición o medio. En el caso del antagonismo en agar natural (favoreciendo a la bacteria) no vio un crecimiento predominante ni una colonización de la caja por parte de la bacteria, al contrario, se vio el desarrollo del hongo desde el centro de la caja de forma radial. No se vio presencia de colonias de *Bacillus Safensis* (BM®) en la caja. En 2 de las repeticiones se vio un crecimiento disminuido mientras que en una repetición el hongo tenía casi por completo colonizado el medio. Ver Cuadro 36 de la parte VIII de anexos.

En el caso del antagonismo en agar PDA el hongo tuvo un crecimiento mucho más intenso y rápido al comparar con el agar natural. El hongo tuvo una esporulación intensa, en el día 5 las 3 repeticiones estaban completamente colonizadas por un hongo blanco filamentoso, notándose claramente la ventaja del medio para el hongo. No hubo presencia notable de colonias de bacterias blancas y redondas que pudieran estar relacionadas con el BM®. Un aspecto por resaltar es que desde el día 6 del antagonismo se presentaron sedimentaciones en de color marrón oscuro en lugares donde antes había colonización por el hongo. Por ese motivo para futuras experimentaciones sería recomendable probar con otro microorganismo que ofrezca una acción antagónica contra el fitopatógeno como el hongo *Trichoderma spp.*

En el caso de *Bacillus Safensis* (BM®) contra *Fusarium solani* tampoco se lograron ver halos de inhibición en ninguna repetición o medio. En el antagonismo en agar natural (favoreciendo a la bacteria) se vio un crecimiento de una colonia de bacterias en las orillas de la caja de Petri rodeando al hongo que se encontraba en el centro, ambos crecieron y no tuvieron contacto. Hubo un crecimiento de bacterias mucho mayor al comparar contra *Colletotrichum sp.* No se vio presencia de colonias de *Bacillus Safensis* (BM®) como se

caracterizó en el Cuadro 23 de la parte VIII de Anexos, más bien fue una masa homogénea de color crema. En las repeticiones se vio un crecimiento de hongo y de bacteria de forma similar donde ligeramente llegaban a tener contacto. Ver Cuadro 40 de la parte VIII de anexos.

En el caso del antagonismo en agar PDA *Fusarium solani* tuvo un crecimiento mucho más marcado, de un hongo blanco y algodonoso que fue creciendo de forma radial. No hubo presencia de bacterias o de otros microorganismos. El hongo tenía una estructura más homogénea y predominante al comparar con el agar natural. En las tres repeticiones en el día 6 se vio una marca café en el fondo de la caja en las partes donde el hongo no logró desarrollarse, las marcas eran intensas y oscuras casi como suciedad. Fue la segunda tanda de antagonismos en la que se vio este comportamiento en agar PDA. Ver Cuadro 41 de la parte VIII de anexos.

Al analizar los antagonismos por 7 días con las 3 repeticiones de cada medio utilizado para cada uno de los fitopatógenos estudiados se determinó que el BM® no ejerce una acción antagónica contra el hongo de la familia de *Colletotrichum spp.* que se identificó y *Fusarium solani*. El BM® tuvo un crecimiento más lento que los hongos además que no se identificaron colonias blancas y redondas en ninguno de las repeticiones.

En el caso del *Bacillus Subtilis* (Serenade®) contra *Colletotrichum spp.* no se identificaron halos de inhibición en ninguna repetición o variación de los antagonismos. En el antagonismo donde se utilizó agar natural como medio (favoreciendo a la bacteria) se vio un crecimiento radial del hongo sin presencia de colonias de bacterias, el hongo cubrió la parte central de la caja y no se expandió hasta los bordes. En el día 7 del antagonismo se vieron pequeños túmulos de colonias de bacterias en las orillas de la caja. (Ver Cuadro 38 de la parte VIII de anexos)

En agar PDA (ver Cuadro 39 de la parte VIII de anexos) el hongo presentó un crecimiento mucho más rápido y extenso. Se observó un hongo blanco con apariencia algodonosa que cubrió la mayor parte del medio, no se observaron colonias de bacterias en ninguna de las 3 repeticiones. Al igual que las repeticiones de los antagonismos anteriores en medio PDA presento una sedimentación en la parte no colonizada de la caja, la sedimentación era café con tonalidades claras y oscuras, la textura y apariencia final tenía similitud con depósitos calcio y otras durezas que usualmente se encuentran en el agua.

En el antagonismo de *Bacillus Subtilis* (Serenade®) contra *Fusarium solani* tampoco se lograron visualizar colonias de bacterias que pudieran ejercer un halo de inhibición contra el hongo. En el medio natural (ver Cuadro 42 de la parte VIII de anexos) el hongo creció de manera moderada desde el centro de la caja y se vieron depósitos de bacterias en las orillas de la caja. Las bacterias y el hongo tuvieron un contacto leve en dos repeticiones, pero no presentaron ningún tipo de interferencia o impedimento, solamente ambos microorganismos dejaron de expandirse por la dirección en la que se encontraba el otro.

Finalmente, con la iteración realizada en medio PDA (ver Cuadro 43 de la parte VIII de anexos) el hongo presentó un crecimiento más rápido y con una apariencia mucho más vistosa. El microorganismo se miraba como una masa algodonosa blanca y esponjosa que se

expandía de manera no uniforme por la caja. No se observaron colonias de bacterias visibles en ninguna de las tres repeticiones, ni tampoco sedimentaciones. Al igual que el resto de los antagonismos realizados en medio PDA dos de las repeticiones presentaron una sedimentación de color marrón claro con tonalidades rojas que se originaban desde el centro de la caja en algunos cuadrantes donde el hongo no había colonizado.

Al analizar los antagonismos de *Bacillus Subtilis* (Serenade®) por 7 días con las tres repeticiones de cada medio utilizado para cada uno de los fitopatógenos estudiados se determinó que este no ejerce una acción antagónica contra el hongo de la familia de *Colletotrichum spp.* que se identificó y *Fusarium solani*. Tampoco se lograron identificar las colonias cremas con bordes irregulares en ninguna repetición.

Las sedimentaciones color café en los antagonismos realizados en medio PDA de los dos fitopatógenos y los dos posibles antagonistas, pueden deberse a reacciones de la interacción del hongo contra la bacteria, subproductos de los microorganismos, metabolitos causados por estrés, reacciones de las bacterias al crecimiento en el medio de hongos u oxidaciones. Se necesita una más amplia investigación en los antagonismos de hongo contra bacteria para poder determinar la posible causa de las marcas.

De manera adicional a la experimentación de antagonismos para ampliar la información disponible sobre el BM® para futuras experimentaciones a pesar de que ninguna bacteria fue identificada como posible fitopatógeno se procedió a realizar algunas pruebas de antagonismo de bacteria contra bacteria utilizando el BM® y los sujetos *Staphylococcus sp.*, *Brevibacterium sp.*, *Bacillus sp.*, *Microbacterium sp.* y *Rhodococcus sp.* En ningún caso de enfrentamiento se logró ver alguna acción inhibitoria, al contrario, se notó un crecimiento dual en equilibrio en donde no hubo competencia. Tampoco hubo una diferencia significativa entre el microorganismo que era la base para el enfrentamiento (el antagonista o los sujetos de prueba). Ver cuadros 25 al 35 de la parte VIII de anexos.

En los enfrentamientos de bacteria contra bacteria se pudieron observar las colonias de *Bacillus Safensis* (BM®) esparcidas de manera individual en los medios, mientras que por ejemplo el *Rhodococcus sp.* colonizo por completo el fondo del medio y debido al color rosa intenso que tiene la colonia en el día 7 del antagonismo la caja se miraba rosada con pequeñas colonias blancas creciendo por todo el medio. (ver Cuadro 35 de la parte VIII de anexos). La velocidad de crecimiento del BM® fue baja al comparar con el resto de microorganismo.

Los antagonistas usualmente tienen tres tipos de mecanismos; cuando presentan el mecanismo de antibiosis el producto o productos metabólicos inhibe o mata a otros organismos. Este tipo de antagonistas son saprófitos y dependen de los recursos de carbono en el suelo. En el mecanismo de competencia se producen efectos dañinos sobre otros microorganismos debido a la utilización de un mismo recurso del medio ambiente. Estos recursos pueden ser nutrientes, oxígeno y espacio. También pueden presentar un mecanismo de parasitismo, entre los parasitismos se puede dar mico parasitismo, hiper parasitismo, parasitismo directo o parasitismo entre hongos. El mico parasitismo incluye daños morfológicos como cobertura de las hifas del hongo patógeno, penetración y parasitismo directo por la producción de haustorios y lisis de una hifa por otra.

Un antagonista útil en cultivos vegetales debe ser genéticamente estable, eficaz a bajas concentraciones, hábil para sobrevivir condiciones adversas del medio ambiente, incluyendo refrigeración y almacenamiento controlado, resistente al ataque de hiperparásitos, efectivo para una amplia gama de microorganismos patógenos en una variedad de frutas y hortalizas, fácil de producir en medios de bajo costo, resistente a los fungicidas, compatible con procedimientos de procesos comerciales, poder establecerse con rapidez para minimizar la destrucción realizada por la plaga, no ser patógeno en el hospedero y que no produzca metabolitos secundarios dañinos a la salud humana. (Pérez, Terrón & Muñoz-Rojas, 2014). Debido a que el *Bacillus Subtilis* (Serenade®) y *Bacillus Safensis* (BM®) no presentaron características antagonistas ante los fitopatógenos *Colletotrichum spp.* y *Fusarium solani* se concluye que no ofrecerán un efecto de reducción del crecimiento de los hongos.

Entre los microorganismos que han presentado antagonismo contra la antracnosis se encuentra el hongo *Trichoderma spp.*, es considerado el antagonista más estudiado para el control de fitopatógenos. En alternativas para el control de *Colletotrichum spp.* (Landeró *et al*, 2016) se realiza una integración de los resultados mencionando que entre los mecanismos de acción que permiten el control de patógenos a *Trichoderma spp.* se encuentra la competencia por el sustrato, parasitismo, antibiosis, desactivación de enzimas del patógeno, penetración y resistencia inducida, principalmente.

En Alternativas para el control de *Colletotrichum spp.* (Landeró *et al*, 2016) se empleó bacterias antagonistas y extractos de plantas con propiedades fungitóxicas, para evaluar los efectos de la antracnosis sobre algunas características físicas, químicas y fisiológicas de frutos de papaya Maradol roja. Los resultados mostraron que dos cepas de *B. firmus* y cuatro de *Pseudomonas fluorescens* redujeron *in vitro* el crecimiento de *C. gloeosporioides*. Algunos ejemplos de microorganismos antagonistas utilizados exitosamente para controlar enfermedades en poscosecha son: *B. licheniformis* contra *C. gloeosporioides* en mango.

Otra alternativa para el control de *Colletotrichum spp.* Se ha visto a través de la manipulación de genes con técnicas de ingeniería genética permitiendo disminuir la síntesis de etileno, considerada la hormona de la madurez en especies vegetales. El *Colletotrichum spp.*, se desarrolla en el fruto cuando este inicia su maduración. Para disminuir la síntesis de etileno se desarrollaron plantas a las cuales se les ha silenciado los genes ACC oxidasa mostrando diversas alteraciones. Frutos en poscosecha también han sido sometidos a este tipo de técnicas, retrasando la madurez en el caso del jitomate, además de detener la descomposición debida a la presencia de *C. gloeosporioides*, cuya infección estuvo detenida hasta la aplicación de etileno externo. (Landeró *et al*, 2016)

Según los resultados y el análisis descrito anteriormente se puede concluir que los bio controladores *Bacillus Safensis* (BM®) y *Bacillus Subtilis* (Serenade®) no ofrecen una solución efectiva para el control de los fitopatógenos *Colletotrichum spp.* y *Fusarium solani*. Mediante estas pruebas de antagonismos se puede determinar que los bio controladores no ofrecerán una reducción de los defectos de calidad en la post cosecha de los frutos de papaya Kaya Paya® (*Carica papaya*). Debido a que los mismos fitopatógenos que se encuentran en frutos deben encontrarse en plantación, sustentando esta afirmación por el mecanismo de infección de los frutos anteriormente descrito, se puede determinar que tampoco sería

recomendable una aplicación en campo de los bio controladores debido a que no podrán ejercer una acción de control sobre la colonización de microorganismos entre plantas vecinas.

Este resultado se pudo deber a que las bacterias usadas como alternativas de control biológico no presentan las características claves de un antagonista ser eficaz a bajas concentraciones, resistente al ataque de hiperparásitos, efectivo para una amplia gama de microorganismos patógenos en una variedad de frutas y hortalizas y finalmente poder establecerse con rapidez para minimizar la destrucción realizada por la plaga. Debido a la falta de estas características en los antagonismos se observó que los hongos colonizaron los medios (bacterias y hongos) casi por completo mientras que las bacterias apenas mostraron un leve crecimiento. Según este resultado se puede afirmar la acción del *Bacillus Safensis* (BM®) y *Bacillus Subtilis* (Serenade®) sobre los fitopatógenos *Colletotrichum spp.* y *Fusarium solani* por lo que si desea conocerse el efecto antagonista que estos bio controladores pudieran tener sobre otros frutos con otra gama de fitopatógenos deben realizarse las pruebas pertinentes.

Fase 3. Prueba piloto en frutos

A pesar de que las bacterias *Bacillus Safensis* (BM®) y *Bacillus Subtilis* (Serenade®) no tuvieron una acción inhibitoria sobre los hongos *Colletotrichum sp.* y *Fusarium solani* se procedió a realizar una prueba piloto en frutos para poder ver el efecto de la aplicación de los tratamientos en las características físicas y en la vida útil en la papaya. También se quería comprobar si los sedimentos café que se observaron en los antagonismos en medio PDA se presentarían también en los frutos, además de descartar si este tipo de manifestación café podría deberse a algún mecanismo de antagonismo o metabolitos que reaccionaban con el medio de cultivo. Debido a que se trata solamente de una prueba piloto se seleccionaron solamente 12 frutos para cada tratamiento (BM® y Serenade®) y 12 frutos que serán utilizados como control, todas las papayas seleccionadas pertenecen a un mismo lote para disminuir el ruido de la experimentación. El parámetro crítico durante esta prueba es la vida útil, midiendo el tiempo de cada fruto y luego realizando un promedio de cada grupo de estudio para realizar el análisis respectivo.

En la prueba de frutos a cada tratamiento se le asignaron 2 variables de estudio que fueron temperatura ambiente (25°C) y temperatura de refrigeración (16°C) para poder ver efecto conjunto que estas variables tendrían con los tratamientos de los bio controladores, ya que uno de los parámetros claves para un antagonista es tener la capacidad de sobrevivir condiciones adversas del medio ambiente, incluyendo refrigeración y almacenamiento controlado. Se seleccionaron estas temperaturas ya que durante el almacenamiento de los frutos antes de su despacho se conservan a entre 12 a 16°C y la vida de anaquel es a temperatura ambiente. En total se tuvieron 6 grupos de estudio, 3 grupos a temperatura ambiente de los cuales 6 frutos fueron tratados con BM®, 6 con Serenade® y 6 sin tratamiento; 3 grupos en refrigerados a 16°C de 6 frutos tratados con BM®, 6 frutos tratados con Serenade® y 6 sin tratamiento. El estudio está diseñado como un ANOVA de 2 factores.

Los frutos estuvieron en un ambiente controlado, con un control de temperatura para cada caso utilizando aire acondicionado en cada bodega de almacenamiento. El control de aire acondicionado fue necesario ya que las fluctuaciones de temperatura pueden ser un factor

de ruido en la experimentación sobre todo por la ubicación de la planta de “La Carreta” en Amatlán que puede tener temperaturas de hasta 30°C a medio día. Los frutos solamente se manipularon para tomarles foto y hacer revisiones de calidad para poder determinar si tenía características para finalizar la vida útil. Una parte clave de la metodología es la limpieza de manos antes de tocar los frutos y lavarse las manos antes de tocar las papayas de cualquier otro grupo para evitar contaminación cruzada.

Cuadro 11. Vida útil promedio de los frutos de papaya almacenados a temperatura ambiente y refrigeración tratados con BM®, Serenade® y sin tratamiento

Almacenamiento	T ambiente (25°C)			Refrigeración (16°C)		
Tratamiento	BM	Serenade	Testigo	BM	Serenade	Testigo
Vida útil promedio	7	9	10	13	12	11
Varianza	3.9	3.0	4.3	2.3	5.4	5.9

Después de la observación de los frutos se obtuvieron los datos de vida útil tomando como parámetros de finalización los citados en el cuadro 16 de la parte VI de anexos. A 25°C los frutos tratados con BM® tuvieron un promedio de vida útil de 7 días, los tratados con Serenade® 9 días y los testigos tuvieron 10 días. La varianza de la vida útil fue de 3.9, 3 y 4.3 días respectivamente. Estos resultados indican a simple vista que no hay una mejora en la vida útil de los frutos al comparar con los frutos sin tratamiento y en el peor de los casos los tratamientos tienen un resultado negativo disminuyendo la vida útil. La varianza observada entre cada grupo de interés se pudo deber a que la maduración de los frutos no fue homogénea a pesar de que pertenecían al mismo lote ya que durante la vida útil unos frutos alcanzaron un 100% de coloración naranja mucho más rápido que otros. Además, como se mencionó con anterioridad la distribución de fitopatógenos en el cultivo es aleatoria y en cada fruto pueden tenerse manifestaciones distintas. Los factores externos también tienen gran influencia sobre la vida útil final, ya que factores de estrés como cambios de temperatura bruscos, humedad alta y golpes pueden aumentar la incidencia de manifestación de microorganismos.

Los frutos almacenados en refrigeración (16°C) tuvieron mayor vida útil con comparar con los frutos almacenados a temperatura ambiente esto debido a que en refrigeración la tasa de respiración de los frutos disminuye y consigo la síntesis de etileno por lo que los microorganismos también se ven obligados a ralentizar su crecimiento. Los frutos tratados con BM® tuvieron 13 días de vida útil, Serenade® 12 días y los frutos sin tratamiento 11 días. La varianza de vida útil es de 2.3 días para BM®, 5.4 para Serenade® y 5.9 para testigos. Los frutos tuvieron una maduración más lenta al comparar con los que estaban a temperatura ambiente, por lo que también retardo la manifestación de defectos de calidad, pero no la severidad de las manifestaciones ya que cuando los frutos alcanzaron la madurez de consumo los defectos de calidad se hicieron presentes y con mayor intensidad que en los frutos a temperatura ambiente. Para observar los frutos durante su vida útil ver Parte IX de anexos.

Para determinar la significancia de los datos obtenidos se realizó un análisis Anova de 2 factores donde se consideraron la temperatura de almacenamiento y el bio controlador

utilizado para el tratamiento. También se analizó la interacción de los dos factores sobre la vida útil de los frutos. Se plantearon las hipótesis nulas indicando que no se tendría una diferencia significativa entre la temperatura de almacenamiento, la aplicación de bio controladores y la interacción de los dos factores. Como hipótesis alternativa se planteó que si existe diferencia significativa entre la temperatura, la aplicación de bio controladores y al interacción de los dos factores.

Cuadro 12. Análisis ANOVA de 2 factores para determinar la significancia de las variables y su interacción en la vida útil de las papayas

Variable	Hipótesis Nula	Hipótesis alternativa	Valor F	Valor Crítico	Resultado
Temperatura	Ho= No hay diferencia significativa entre la temperatura de almacenamiento	H1= Hay una diferencia significativa entre la temperatura de almacenamiento	21.19	4.17	Se rechaza hipótesis nula
Bio controladores	Ho= No hay diferencia significativa entre la aplicación de bio controladores	H1= Hay una diferencia significativa entre la aplicación de los bio controladores	0.45	3.31	No se rechaza hipótesis nula
Interacción	Ho= No hay diferencia significativa entre las interacciones de bio controlador y temperatura	H1= Hay diferencia significativa entre las interacciones de bio controladores y temperatura	2.93	3.31	No se rechaza hipótesis nula

Según la prueba estadística con el factor F en el que se fundamenta el análisis Anova se determinó que hay una diferencia significativa en la vida útil de los frutos por la temperatura de almacenamiento utilizada por lo que se rechaza la hipótesis nula por la alternativa con un 95% de confianza indicando que la temperatura de almacenamiento si influye de manera directa en la vida útil de los frutos. Al analizar el efecto de los bio controladores sobre la vida útil de los frutos se determinó con un 95% de confianza que no hay una diferencia significativa por lo que no se rechaza la hipótesis nula. Una parte que resultó de interés fue evaluar la interacción de los dos factores sobre la vida útil, pero con un 95% de confianza no se rechaza la hipótesis nula indicando que la interacción de los bio controladores y la temperatura no presentan una diferencia significativa en la vida útil. Este último resultado implica que la diferencia en la vida útil que se dio entre los grupos se debió únicamente a la temperatura además de los factores externos intrínsecos de cada fruto.

Con esta prueba estadística se finalizó el análisis de factibilidad de aplicación de bio controladores en la post cosecha a la papaya, concluyendo robustamente que los resultados

obtenidos apuntan a que una aplicación de los bio controladores en los frutos no sería efectiva para retardar los defectos de calidad causados por fitopatógenos, al contrario, la vida útil se vería afectada negativamente acortando los días sin presencia de defectos de calidad. El respaldo obtenido mediante las pruebas de antagonismo hasta los resultados en frutos indica que la aplicación de los bio controladores no solo tendría un efecto negativo, sino que también presentaría un paso adicional al proceso productivo del fruto aumentando los costos de mano de obra y de insumos sin un resultado positivo en el alargamiento de la exposición de los frutos en super mercados. Para ver imágenes de los frutos en supermercados de Guatemala ver cuadro

El estudio fue de gran significancia para la empresa primero por lograr identificar con género y especie algunos de los fitopatógenos presentes que han causado estragos en los rendimientos confirmando la presencia de antracnosis por género y detectando también *Fusarium solani*. Con el conocimiento profundo de estos microorganismos se pueden analizar alternativas de control más específicas y efectivas para minimizar la propagación de la antracnosis (*Colletotrichum sp.*) y del *Fusarium solani*.

Debido a que durante la colonización de la planta con antracnosis se presenta la fase inicial o biotrófica en la cual el hongo se alimenta de las células vivas de la planta y el patógeno se establece en la planta, y la segunda fase necrotrófica en donde los recursos se obtienen de las células muertas de la planta a causa del ataque del patógeno, observándose los primeros síntomas de la enfermedad. Además, como se ha confirmado la presencia de múltiples especies de *Colletotrichum* como agentes causales de antracnosis de papaya en Brasil, Estados Unidos, en el estado de la Florida, México y Trinidad y Tobago; no se descarta que este sea el caso también en la plantación “La Potra” en Guatemala. En Florida, México y Trinidad y Tobago, *C. gloeosporioides* y *C. truncatum* (sinónimo *C. capsici*) infectan papaya, mientras que en Brasil se ha identificado a *C. brevisporum*, *C. magnum* y *C. gloeosporioides*. De manera que *C. gloeosporioides* y *C. truncatum* presentan una amplia distribución geográfica como causantes de antracnosis en papaya.

Adicionalmente, *C. gloeosporioides* tiene la capacidad de quiescencia, es decir, permanece invernando en los restos de plantas infectadas, desechos vegetales, así como en las semillas permitiendo sobrevivir por largo tiempo y causar infección cuando se presenten las condiciones adecuadas, que generalmente es el momento de la maduración del fruto. Pero también en plantas necróticas que se encuentran en el cultivo que son fuentes de contaminación en el mismo cultivo. Se recomienda para el control de la antracnosis realizar en campo limpieza de los residuos presentes en los suelos como hojas y frutos, además de realizar podas de las hojas que presenten afecciones como cambios de color y manchas. Esta medida también ayuda de manera directa para el control del *Fusarium solani* ya que el fitopatógeno puede infectar frutos mediante el contacto con tejido necrótico.

Además, las condiciones en la post cosecha son vitales para poder evitar situaciones de estrés en el fruto que intensifiquen las manifestaciones de hongos en la post cosecha por eso es importante que una vez se almacenen las frutas a temperaturas de entre 12 a 14 °C no se den saltos en las temperaturas, ya que se ocasionaría la condensación del agua y el desarrollo del hongo. También asegurar la cadena de transporte refrigerado desde la plantación y cuidar todas las medidas de inocuidad como lavado de manos, superficies y ambientes para evitar

que contaminación externa pueda infectar el fruto mediante las heridas que este pueda llegar a desarrollar.

Debido a que la Kaya Paya® es variedad Tainung que se caracteriza por su gran sabor, dulzura y textura. Al comparar la variedad Tainung con la Maradol, que es su antecesora, la vida de anaquel es más larga lo que permite expandir los periodos de comercialización y permitir su venta en territorios más lejanos a la zona de cultivo. Además, dentro de las diferentes variedades de papaya tales como Maradol, Tainung, Sunrise y Hawaiana (híbrido), se reporta que la variedad más susceptible a antracnosis es Maradol; por lo que el fruto tiene una ventaja competitiva ante otras variedades y un buen control en la post cosecha ayudaría al control de los defectos de calidad y evitar problemas a gran escala donde los frutos presenten una manifestación más intensa de las características de la enfermedad. (Molina, Gómez & Umaña, 2017).

Y además no se descarta la opción de seguir analizando bio controladores como agentes antagonistas de los fitopatógenos del cultivo y de los frutos por lo que una prueba de antagonismo con el hongo *Trichoderma spp.*, que es considerado el antagonista más estudiado para el control de fitopatógenos puede ser una alternativa viable para poder tener un agente directo que pueda ayudar a contrarrestar los defectos de la enfermedad. En la investigación alternativas para el control de *Colletotrichum spp.* (Landeró *et al*, 2016) se realiza una integración de los resultados mencionando que entre los mecanismos de acción que permiten el control de patógenos a *Trichoderma spp.* se encuentra la competencia por el sustrato, parasitismo, antibiosis, desactivación de enzimas del patógeno, penetración y resistencia inducida, principalmente mecanismos que al estar comprobados puedan ser efectivos contra los fitopatógenos aislados e identificados. (Molina, Gómez & Umaña, 2017).

En la experimentación tuvo un enfoque en la post cosecha por lo que no se hicieron pruebas en plantas, pero si se tiene interés en extrapolar estos resultados a la aplicación foliar o sistemática en plantación se recomienda realizar las pruebas pertinentes como infección de plantas y tratamiento directo de bio controladores a pequeña escala para poder analizar los efectos que se tienen durante la colonización de los bio controladores de manera sistemática. Una prueba controlada y representativa con frutos puede ofrecer una vista completa de la acción que tienen los bio controladores analizados en el estudio y así involucrar a los productores en el plan de acción contra los fitopatógenos. (Molina, Gómez & Umaña, 2017).

IX. Conclusiones

- Se lograron identificar como microorganismos fitopatógenos a la especie *Fusarium Solani* y el género *Colletotrichum spp* microorganismos causantes de defectos de calidad en la post cosecha en la papaya Kaya Paya® (*Carica Papaya*) indicando que defectos como marcas en la carnaza, colonización de microorganismos, pérdida de turgencia y pudrición son sintomatologías de las enfermedades que estos fitopatógenos causan; implicando además una disminución de la vida útil del fruto y pérdidas de hasta el 30% de la producción.
- Se determinó mediante enfrentamiento dual en igualdad de condiciones que los bio controladores BM® y Serenade® no son antagonistas de los fitopatógenos *Fusarium Solani* y *Colletotrichum spp* ya que no se presentaron halos de inhibición en ninguna variante de la prueba de antagonismo, por lo que el uso de estos agentes de control biológico no generaría un impacto positivo retrasando los defectos postcosecha que causan los fitopatógenos por lo que deben explorarse otras alternativas para tratar las enfermedades de los frutos.
- Mediante una prueba piloto en frutos se estableció que la aplicación de los bio controladores BM® y Serenade® en papayas Kaya Paya® (*Carica Papaya*) no tienen un efecto significativo en el alargamiento de la vida útil, al contrario, con una significancia del 95% la aplicación de estos bio controladores en los frutos representaría una desventaja en la cadena de valor del producto por el gasto adicional en mano de obra y recursos.
- El estudio logró comparar los efectos de los bio controladores BM® y Serenade® como alternativas para retrasar los defectos de calidad causadas por fitopatógenos *Fusarium Solani* y *Colletotrichum spp* en la post cosecha de papaya Kaya Paya® (*Carica Papaya*) determinando que ningún tratamiento presenta efectividad en pruebas de antagonismo y en pruebas en frutos por lo que es necesario explorar otras alternativas para el control de las enfermedades.

X. Recomendaciones

- Como principal medida de acción se le recomienda a la “La Carreta” un seguimiento más riguroso a las condiciones de almacenamiento que pueda tener el fruto durante la cadena de valor, ya que durante el estudio se demostró la importancia de las condiciones post cosecha y el efecto que pueden tener sobre la intensidad de las manifestaciones del fruto. Se debe tener un control de temperatura desde la carga de los frutos en la plantación donde debe tenerse almacenamiento refrigerado (12 a 14°C) durante el periodo de espera para la recepción del producto no debe apagarse la refrigeración y al finalizar el muestreo de calidad realizar de manera inmediata el traslado a los cuartos de almacenamiento.
- También se recomienda que la selección y adecuación con el material de los frutos de empaque por parte de producción se haga en pequeños lotes de no más de una tarima a la vez, para poder completar el proceso lo antes posible y evitar variaciones de temperatura que lleguen a afectar la tasa de respiración de los frutos y así provocar manifestaciones más intensas de las enfermedades que aquejan a los frutos. También debe mejorarse el área en la que se coloca la merma de producción, ya que el producto puede ser aprovechado para la venta en mercados; pero debido a las condiciones de temperatura y poca ventilación de la bodega seca los frutos que ya presentan defectos están más susceptibles a presentar afecciones graves de calidad.
- Como plan a largo plazo se recomienda a la empresa un plan de acción que incluya a la plantación, ya que a pesar de que “La Carreta” se dedica únicamente a la postcosecha la calidad de los frutos viene de campo y cualquier esfuerzo que desea realizarse será mucho más fructífero con el apoyo de la plantación. Debido a que la fase necrotrófica de la antracnosis los recursos se obtienen de las células muertas de la planta y esta es la etapa en la que se da la infección de los frutos es vital un control de los desechos orgánicos en plantación eliminando todos los frutos caídos y hojas marchitas para que el hongo no tenga un hospedero y no pueda difundirse a las plantas jóvenes.
- Además, como se ha confirmado la presencia de múltiples especies de *Colletotrichum* como agentes causales de antracnosis de papaya en Brasil, Estados Unidos, en el estado de la Florida, México y Trinidad y Tobago; no se descarta que este sea el caso también en la plantación “La Potra” en Guatemala, por lo que debe repetirse el proceso de extracción de ADN y de identificación molecular para obtener las especies de antracnosis que están aquejando la plantación. Con un conocimiento de la especie se pueden determinar tratamientos mucho más específicos que van desde el tratamiento foliar hasta el enriquecimiento de la tierra con nutrientes como el calcio.
- Y de manera general, el estudio de bio controladores ha cobrado gran importancia entre las técnicas de control de enfermedades en plantaciones por lo que a pesar de que los resultados de este estudio no fueron los esperados se recomienda explorar

otras opciones de antagonistas conocidos de la antracnosis como el hongo *Trichoderma spp.* (Landeró *et al*, 2016).

- Además, se recomienda a “Agropecuaria Popoyán, S.A.” antes de aplicar cualquier tratamiento de bio controladores, enriquecimiento o tratamiento foliar realizar antes una prueba piloto en plantas jóvenes donde se tengan infecciones controladas simulando condiciones de campo y evaluando la efectividad de los tratamientos como se describe en (Landeró *et al*, 2016) ya que esta prueba piloto puede dar indicios a pequeña escala de la efectividad de los tratamientos y evitar inversiones innecesarias alternativas que no tengan los efectos deseados.
- También se recomienda replicar la metodología descrita en este trabajo de graduación en la parte X de anexos al momento de evaluar otros agentes de control biológico como posibles alternativas para la reducción de defectos de calidad en la post cosecha, tomando en cuenta cada parte desde una identificación lo más precisa posible seguido del antagonismo *In vitro* que ofrece resultados certeros sobre el poder antagonista y finalmente la prueba en frutos que da una vista global del efecto que el bio controlador pueda tener ya en condiciones reales en la post cosecha.

XI. Referencias bibliográficas

- Abreu, P., Antunes, T., Magaña, A., Pérez, D., Tapia, R., Ventura, J. & Fernandes, P. (2015). *A current overview of the Papaya meleira virus, an unusual plant virus*. *Viruses*, 7(4), 1853-1870. DOI: <https://doi.org/10.3390/v7041853>
- Arcos, O., Elias, P., & Antonio, R. (1989). *Contribución al estudio del control biológico del fusarium oxysporum, Rhizoctonia Solani y pythium sp. mediante diferentes especies de trichoderma*.
- Barreno, A. & Marroquin, C. (2012). *Caracterización económica de la producción comercial del cultivo de papaya (Carica papaya L.) en el departamento de Petén, Guatemala*. Extraído de: <https://bdigital.zamorano.edu/bitstream/11036/947/1/AGN-2012-T004.pdf>
- Bello, E., Loaiza, M., Pajón, C., & Restrepo, D. (2012). *Empleo de un recubrimiento formulado con propóleos para el manejo poscosecha de frutos de papaya (Carica papaya L. cv. Hawaiiana)*. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 65(1), 6497-6506. Extraído de: <https://revistas.unal.edu.co/index.php/refame/article/view/30778/30896>
- Berrouet, K., Sánchez, P., & Montoya, M. (2014). *Identificación molecular de hongos aislados de tejidos de frijol con síntomas de antracnosis*. *Acta Biológica Colombiana*, 19(2), 143-154. Extraído de: <https://www.redalyc.org/pdf/3190/319030502002.pdf>
- BIO RAD. (2019) *Sabouraud agar*. Extraído de: https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/inserts/CDG/es/56524_2019_07_ES.pdf
- Cano, H. (2006) *Determinación de bacterias fitopatógenas en cultivos de papaya (Carica papaya) en finca La Estancia, municipio de La Libertad, Petén, Guatemala*. Universidad de San Carlos de Guatemala. Extraído de: <https://biblioteca-farmacia.usac.edu.gt/Tesis/QB825.pdf>
- Calderón Sagastume, E. (2012). *Diagnóstico de las principales plagas de insectos y patógenos de los cultivos de papaya (Carica papaya L.) y maíz (Zea mays L.), en la Finca La Vega El Zapotillo, en el Municipio de Chiquimula y servicios realizados en la carrera de Agronomía del centro Universitario de Oriente (CUNORI), Guatemala, CA (Doctoral dissertation, Universidad de San Carlos de Guatemala)*. Extraído de: <http://www.repositorio.usac.edu.gt/6261/1/Efra%C3%ADnCalder%C3%B3nSagastume.pdf>
- Chimbekujwo, I. (2000). *Frequency and pathogenicity of fusarium wilts (Fusarium solani and Fusarium equiseti) of cotton (Gossypium hirsutum) in Adamawa in Nigeria*. *Revista de Biología Tropical*, 48(1), 01-05. Retrieved September 10, 2021, from http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-77442000000100001&lng=en&tlng=en.
- Condalab. (2019). *Agar para métodos estándar PCA*. Extraído de: https://www.condalab.com/int/en/index.php?controller=attachment&id_attachment=10968
- Cornejo, J. (2018). *Papaya virus q (PpVQ): transmisión y su posible asociación con PRSV y PMeV*. Escuela superior politécnica del litoral. Guayaquil, Ecuador. pp 5-7 <https://www.dspace.espol.edu.ec/retrieve/131675/D-109006.pdf>

- de Araújo, M., Tavares, É., da Silva, F., de Almeida, L., & Júnior, M. (2007). *Molecular detection of Papaya meleira virus in the latex of Carica papaya by RT-PCR. Journal of virological methods.* 146(1-2), 305-310. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2007.07.022>
- Garzón, N. (2013) *Caracterización e identificación molecular de hongos de suelo aislados de los páramos de Guasca y Cruz Verde, Cundinamarca-Colombia.* Pontificia universidad Javeriana, Bogotá, Colombia. Extraído de: <https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/14584/GarzonGrajalesNatalia2013.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Gil, C. G. (2018). *Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS): una revisión crítica. Papeles de relaciones ecosociales y cambio global.* 140, 107-118. Extraído de: <https://www.redalyc.org/pdf/832/83242580001.pdf>
- Guédez, C., Cañizalez, L., Avendaño, L., Scorza, J., Castillo, C., Olivar, R., Méndez, Y., & Sánchez, L. (2014). *Actividad antifúngica del aceite esencial de naranja (Citrus sinensis L.) sobre hongos postcosecha en frutos de lechosa (Carica papaya L.).* Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología, 34(2), 81-87. Recuperado en 12 de mayo de 2021, de http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S131525562014000200007&lng=es&tlng=es.
- Hernández, M., Guillén, J., Bautista, S. & Guillén, D. (2018). *Evaluación de películas biodegradables en el control de hongos postcosecha de la papaya. Cultivos Tropicales.* 39(1), 52-60. Recuperado en 12 de mayo de 2021, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S025859362018000100006&lng=es&tlng=es.
- Hernández, A., Bautista, S., Velázquez, M., & Hernández, A. (2007). *Uso de Microorganismos Antagonistas en el Control de Enfermedades Postcosecha en Frutos.* Revista mexicana de fitopatología, 25(1), 66-74. Recuperado en 03 de octubre de 2021, de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-33092007000100009&lng=es&tlng=es.
- Herrera-Parra, E., Cristóbal-Alejo, J., Martínez-Bolaños, M., Hernández-Arenas, M., & López-Guillén, G. (2017). *Primer registro de Fusarium solani y F. equiseti en plantaciones de Jatropha curcas en México.* Revista mexicana de fitopatología, 35(1), 150-161. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1608-1>
- Kac, G., & García Alvear, J. (2010). *Epidemiología de la desnutrición en Latinoamérica: situación actual.* Nutrición Hospitalaria, 25, 50-56. Extraído de: https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0212-16112010000900008
- Kitajima, E., Rodrigues, C., Silveira, J., Alves, F., Ventura, J., Aragao, F. (1993). *Association of isometric viruslike particles, restricted to laticifers, with "meleira" ("Sticky disease") of papaya (Carica papaya).* Fitopatologia Brasileira, 18:118–22.
- Lafuente-Rincón D., Barboza-Corona J., Salcedo-Hernández R., Abraham-Juárez R., Valadez-Lira J., Quistián-Martínez D. & De la Fuente-Salcido N. (2016). *Identificación molecular de hongos fitopatógenos de fresa por pcr (its y ef-1a) y susceptibilidad a bacteriocinas de Bacillus thuringiensis.* Universidad Autónoma de

- Coahuila, Mexico. Vol. 1, No.1 (2016) 417-422. Extraído de: <http://www.fcb.uanl.mx/IDCyTA/files/volume1/1/3/72.pdf>
- Lahlali, R., Peng, G., McGregor, L., Gossen, B., Hwang, S., & McDonald, M. (2011). *Mechanisms of the biofungicide Serenade (Bacillus subtilis QST713) in suppressing clubroot*. *Biocontrol science and technology*, 21(11), 1351-1362. DOI: <https://doi.org/10.1080/09583157.2011.618263>
 - Lamela, J. (2018). *Contaminación cruzada en las industrias alimentarias, aptitud microbiana para sobrevivir*. In Workshop MRAMA (No. 17). Extraído de: https://ddd.uab.cat/pub/poncom/2018/235656/mrama_a2018n17r2.pdf
 - Landero, N., Lara, F., Andrade, P., Aguilar, L. & Aguado, G. (2016). *Alternativas para el control de Colletotrichum spp*. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 7(5), 1189-1198. Recuperado en 13 de septiembre de 2021, de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-09342016000501189&lng=es&tlng=es.
 - Loaiza, J. E., & Rivera, G. (2000). *Potencial biocida de extractos de Gliricidia sepium contra patógenos del cultivo de la papaya (Carica papaya)*. *Agronomía Costarricense*, 24(1), 29-36. Extraído de: <https://www.redalyc.org/pdf/436/43624103.pdf>
 - Maciel-Zambolim, E., Kunieda-Alonso, S., Matsuoka, K., De Carvalho, M. G., & Zerbini, F. M. (2003). *Purification and some properties of Papaya meleira virus, a novel virus infecting papayas in Brazil*. *Plant Pathology*, 52(3), 389-394. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.2003.00855.x>
 - MAGA. (2019). *Manual de buenas prácticas agrícolas*. Extraído de: <https://www.maga.gob.gt/download/manualbpam.PDF>
 - Massa, S., Caruso, M., Trovatelli, F., & Tosques, M. (1998). *Comparison of plate count agar and R2A medium for enumeration of heterotrophic bacteria in natural mineral water*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 14(5), 727-730.
 - Meneses, Durango and Garcia. (2009). *Antifungal activity against postharvest fungi by extracts from Colombian propolis*. *Química Nova*, 32(8): 2011–2017.
 - Montalván, G., & Lizeth, D. (2018). *Efecto de los ácidos acético y cítrico para control de antracnosis (Colletotrichum sp.) en poscosecha de papaya (Carica papaya L.)* (Bachelor's thesis, Quito: UCE). <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/17067/1/T-UCE-0004-CAG-041.pdf>
 - Molina, Gómez & Umaña. (2017). *Identificación de especies del género Colletotrichum asociadas a la antracnosis en papaya (Carica papaya L.)* En Costa Rica. *Agronomía Costarricense*, 41(1), 69-80. <https://dx.doi.org/10.15517/rac.v41i1.29752>
 - Morote, C. & Palomino, M. (2019). *Técnicas de aislamiento, identificación, selección de cepas de Rhizobium, Azospirillum y producción de inoculantes*. *Investigación*, 27(1), 175-195.
 - Naranjo Plaza, M. (2015). *Análisis de superficies con identificación de cepas nativas de quirófano, cuartos de recuperación y baños, mediante la técnica de hisopado de superficies, antes y después del uso de desinfectantes en la Clínica de Unidades Médicas de la ciudad de Quito* (Bachelor's thesis, Quito/PUCE/2015). Extraído de: <http://repositorio.puce.edu.ec/bitstream/handle/22000/7709/Tesis%20Lourdes%20Naranjo1.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

- Nishijima, W. (1993) Fusarium solani: pudrición de frutos y plántulas de papaya (patógeno de enfermedades de las plantas). Universidad de Hawaii, Departamento de Fitopatología. Extraído de: http://www.extento.hawaii.edu/kbase/crop/Type/f_solan.htm#:~:text=solani%20has%20been%20reported%20to,other%20fungi%20such%20as%20anthracnose.
- Ordán, J., Melgar, M., & Rubio, C. (2010). *Métodos estadísticos y econométricos en la empresa y para finanzas*. Extraído de: <https://dspace-libros.metabiblioteca.com.co/handle/001/362>
- Pantoja, M. Mendoza, S. & Valero, N. (2018). *Diseño de un medio de cultivo para la producción de biomasa de Microbacterium sp. (BSC3) para la generación de materia orgánica humificada a partir de lignito*. Revista Colombiana de Biotecnología, 20(1), 31-41. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v20n1.62764>
- Paredes-Escalante, J., Carrillo-Fasio, J., García-Estrada, R., Allende-Molar, R., Sañudo-Barajas, J., & Valdez-Torres, J. (2009). *Microorganismos Antagonistas para el Control del Complejo de Hongos Causantes de la Rabia del Garbanzo (Cicer arietinum L.) en el Estado de Sinaloa, México*. Revista mexicana de fitopatología, 27(1), 27-35. Recuperado en 18 de enero de 2022, de [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-33092009000100004&lng=es&tlng=es.](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-33092009000100004&lng=es&tlng=es)
- Pérez, R., Terrón, T., & Muñoz-Rojas, J. (2014). *Antagonismo microbiano asociado a cepas bacterianas provenientes de jitomate (Lycopersicon esculentum Mill) y maíz (Zea Mays)*. Revista Iberoamericana de Ciencias, 1(3), 53-60. Extraído de: <http://www.reibci.org/publicados/2014/agosto/3300118.pdf>
- Ramírez, H., Ramírez, W., Cantoral, B., & Del Aguila, B. (2013) *Manual de producción y uso de hongos antagonistas*. Extraído de: <https://www.senasa.gob.pe/senasa/descargasarchivos/2017/09/Manual-de-Producci%C3%B3n-y-Uso-de-Hongos-Antagonistas.pdf>
- Recabarren, P. E. (2017). *Pérdida y desperdicios de alimentos: diciembre de 2017. Santiago de Chile: Oficina de Estudios y Políticas Agrarias-Odepa-*. Extraído de: <https://www.odepa.gob.cl/wp-content/uploads/2017/12/residuosFinal.pdf>
- Reiss, A., & Jørgensen, L. (2017). *Biological control of yellow rust of wheat (Puccinia striiformis) with Serenade® ASO (Bacillus subtilis strain QST713)*. Crop protection, 93, 1-8. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2016.11.009>
- Reyes Gätgens, D. (2012). *Compuestos gras para el control de patógenos poscosecha in vitro en mango (Mangifera Indica L.), piña (Ananas Comosus L.) y papaya (Carica Papaya L.), y pruebas de eficacia in vivo en piña*. Extraído de: <http://repositorio.sibdi.ucr.ac.cr:8080/jspui/bitstream/123456789/2272/1/33699.pdf>
- Rodrigues, S., Da Cunha, M., Ventura, J., & Fernandes, P. (2009). *Effects of the Papaya meleira virus on papaya latex structure and composition*. Plant cell reports, 28(5), 861-871. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00299-009-0673-7>
- Sá Antunes, T., Amaral, R., Ventura, J., Godinho, M., Amaral, J., Souza, F. (2016). *The dsRNA Virus Papaya Meleira Virus and an ssRNA Virus Are Associated with Papaya Sticky Disease*. PLoS ONE 11(5): e0155240. doi:10.1371/journal.pone.0155240.

- Sáez Vega, A., Solarte Vasquez, J., Martínez Moreno, A. & Habeych Narváez, D. (2004). *Evaluación de un medio de cultivo a partir del fruto de Prosopis Juliflora*. Revista Universidad EAFIT, 40(135), 9-17.
- Salazar Daza, D. (2020). *Conservación de la papaya (Carica papaya L.) con aplicación de bacterias ácido lácticas provenientes del mucilago de cacao (Theobroma cacao) (Bachelor's thesis, Quevedo: UTEQ)*. Extraído de: <https://repositorio.uteq.edu.ec/bitstream/43000/5262/1/T-UTEQ%20-0100.pdf>
- Silva, F. (2012). *Kocuria spp.* Revista chilena de infectología. 29(2), 215-216. <https://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182012000200015>
- Suárez, M. L., Mendoza, I., Monroy, J. A., de la Cruz, J., Angulo, O., & González, O. (2013). *Aislamiento, identificación y sensibilidad a antifúngicos de hongos fitopatógenos de papaya cv. Maradol (Carica papaya L.)*. Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha, 14(2), 115-124. Extraído de: <https://www.redalyc.org/pdf/813/81329290004.pdf>
- Takashina, K., Izumi, C., Hisashi K., Norikazu, K., Chiaki, G. & Keiko. K. (2020). *Patogenicidad y distribución de aislados de Fusarium solani asociados con la disminución de Erythrina en Japón*. APS Journals. DOI: <https://doi.org/10.1094/PDIS-01-19-0044-RE>
- Perez-Brito, D., Tapia-Tussell, R., Cortes-Velazquez, A., Quijano-Ramayo, A., Nexticapan-Garcez, A., Martín-Mex, R. (2012). *First report of Papaya meleira virus (PMeV) in Mexico*. African Journal of Biotechnology. 11:13564–70.
- Pérez Batista, O. (2012). *Caracterización biológica del Virus de la mancha anular de la papaya en Carica papaya L. var. Maradol roja en Cuba (Doctoral dissertation, Universidad Central Marta Abreu de Las Villas)*. Extraído de: <https://dspace.uclv.edu.cu/handle/123456789/1865>
- Pérez, C. Ferreiro, B., Iglesias, E., Camba, M., Borrajo, M. & Novoa, E. (2017). *Enterococcus gallinarum y síndrome de Chilaiiditi en diálisis peritoneal*. Nefrología (Madrid), 37(2), 213-214. <https://dx.doi.org/10.1016/j.nefro.2016.09.001>
- Townsend, D., & Naqui, A. (1998). *Comparison of SimPlate TotalTM Plate Count Test with Plate Count Agar Method for Detection and Quantitation of Bacteria in Food*. Journal of AOAC International, 81(3), 563-570.
- Varela, P., & Reyes, A. (2011). *Análisis crítico del diseño factorial 2k sobre casos aplicados*. Scientia et technica, 1(47), 101-106. Extraído de: <https://revistas.utp.edu.co/index.php/revistaciencia/article/view/523>
- Velasco Belalcazar, M. (2016). *Caracterización de bacterias antagonicas a Fusarium sp, asociadas a Capsicum frutescens en Guacarí y Bolivar, Valle del Cauca*. Extraído de: [https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/56917/2018-Martha Lucia Velasco Belalcazar.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/56917/2018-Martha%20Lucia%20Velasco%20Belalcazar.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- Villamil, J., Blanco, J., & Viteri, S. (2012). *In vitro evaluation of Native Microorganisms for their Antagonism against Moniliophthora roreri Cif & Parin Cocoa (Theobroma cacao L.)*. Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín, 65(1), 6305. Extraído de: <http://www.scielo.org.co/pdf/rfnam/v65n1/v65n1a02.pdf>
- Villarreal, M., Villa, E., Cira, L., Estrada, M., Parra, F. & Santos, S. (2018). *El género Bacillus como agente de control biológico y sus implicaciones en la bioseguridad*

agrícola. Revista mexicana de fitopatología, 36(1), 95-130. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1706-5>

- Zavala-León, M. J., Tun-Suárez, J. M., Cristóbal-Alejo, J., Ruiz-Sánchez, E., Gutiérrez-Alonso, O., Vázquez-Calderón, M., & Méndez-González, R. (2005). *Control postcosecha de la antracnosis en papaya y sensibilidad de Colletotrichum gloeosporioides (Penz.) Sacc. a fungicidas organosintéticos*. Revista chapingo serie horticultura, 11(2), 251-255. Extraído de: <https://www.redalyc.org/pdf/609/60911210.pdf>

XII. Anexos

Parte I. Obtención de muestras vegetales

Cuadro 13. Identificación y descripción de los grupos seleccionados de papayas para el análisis inicial

Identificación	Fecha de selección	Identificación de características de los frutos
Grupo 1	12/02/2021	Primer muestreo al lote de papayas para de papayas para fase de caracterización de fitopatógenos en el fruto, fecha de ingreso a planta 11/02/2021
Grupo 2	23/02/2021	Segundo muestreo al lote de papayas para fase de caracterización de fitopatógenos en el fruto, fecha de ingreso a planta 21/02/2021
Grupo 3	01/03/2021	Tercer muestreo al lote de papayas para de papayas para fase de caracterización de fitopatógenos en el fruto, fecha de ingreso a planta 11/02/2021. Las papayas se almacenaron en refrigeración 12-16°C.
Grupo 4	01/03/2021	Cuarto muestreo al lote de papayas para de papayas para fase de caracterización de fitopatógenos en el fruto, fecha de ingreso a planta 11/02/2021. Estas papayas fueron tomadas de las papayas rechazadas durante el proceso de selección de producción.
Grupo 5	01/03/2021	Fase de caracterización de fitopatógenos en el fruto, fecha de ingreso a planta 01/03/2021. Papayas en estadio de maduración 1 tomadas como muestras del fruto sin manifestaciones de pudrición de la entrega de materia prima de ese día.

Figura 8. Características de las muestras de papayas seleccionadas

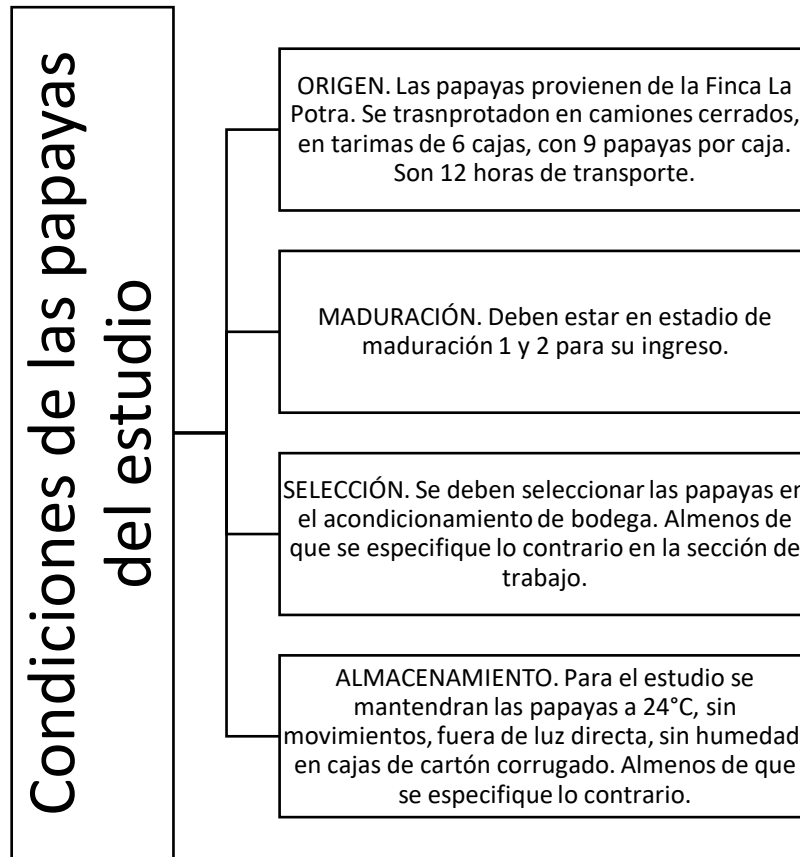
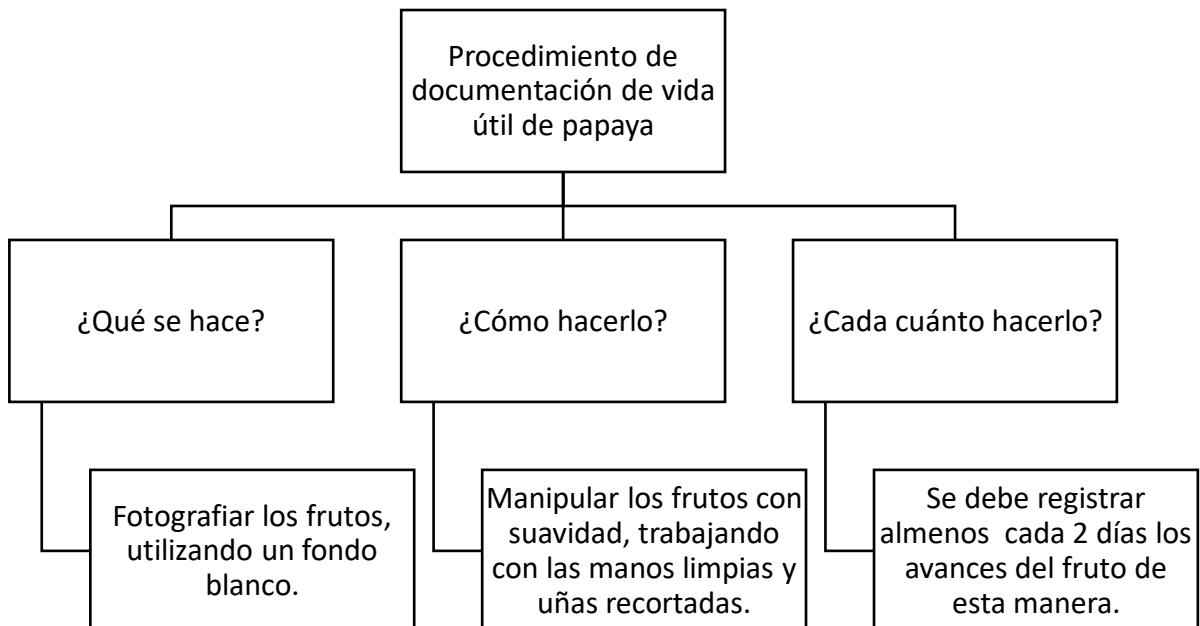


Figura 9. Documentación de vida útil de frutos de papaya



Parte II. Inoculación del microorganismo

Figura 10. Procedimiento de hisopado de papayas

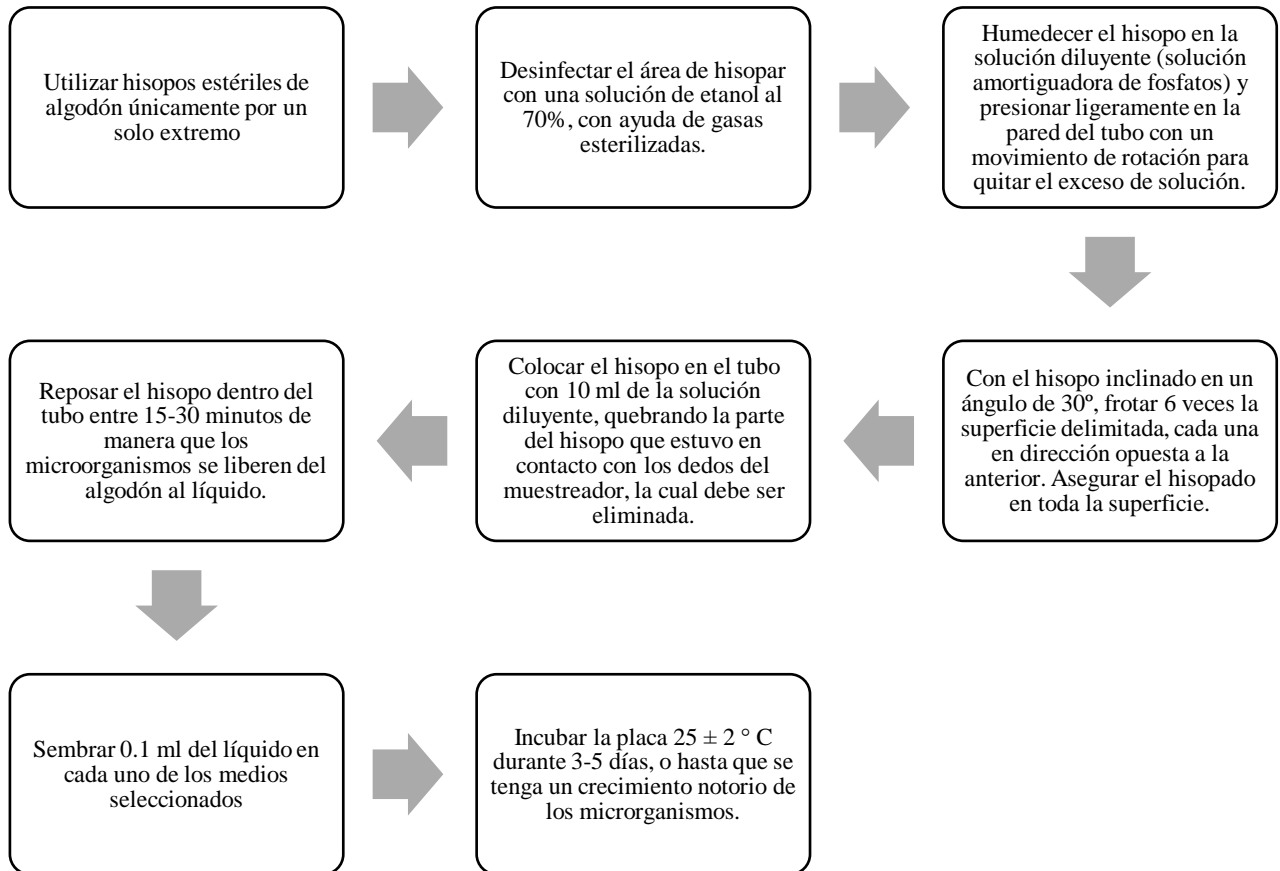


Figura 11. Preparación solución diluyente (solución amortiguadora de fosfatos)

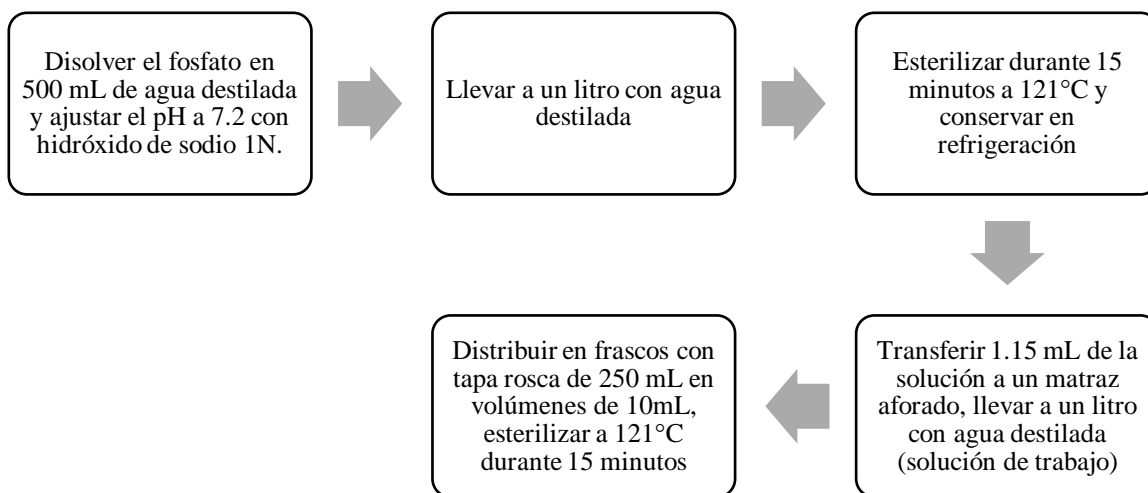
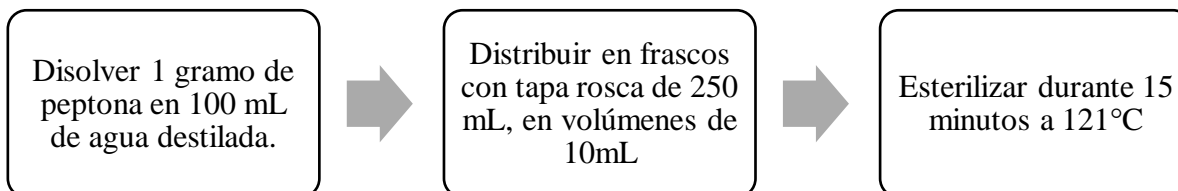
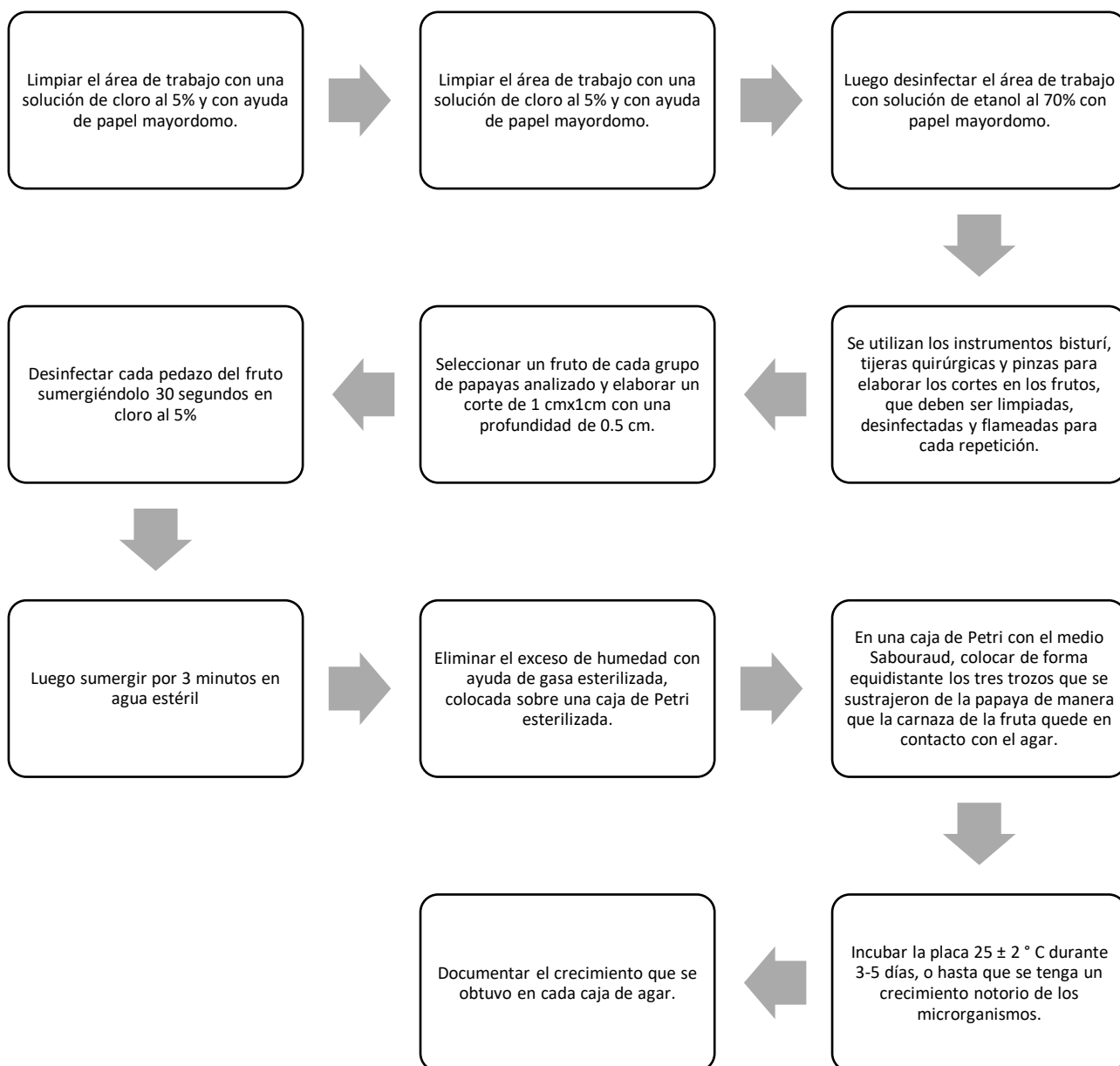


Figura 12. Preparación de agua peptonada 0.1%



Parte III. Sembrado de tejido

Figura 13. Procedimiento para el sembrado de tejido



Parte IV. Caracterizar microorganismos predominantes

Cuadro 14. Matriz de decisión para la reducción de opciones de microorganismos

Criterio	Definición	Positivo	Negativo
Microorganismo ambiental conocido	¿Es un microorganismo que está en el ambiente, común y no presenta un peligro para el fruto o para las personas?	Descartar este microorganismo	Continuar
Microorganismo predominante, no identificado	Es un microorganismo que no es identificado como ambiental, y se manifestó su crecimiento en al menos 3 grupos de estudio en diferentes repeticiones	Continuar	Descartar
Fito patogenicidad	¿Es un patógeno conocido? ¿Causa una enfermedad específica del fruto?	Continuar	Descartar

Parte V. Antagonismo *In Vitro*

Ecuación 1. Porcentaje de inhibición de microorganismo




$$\% \text{ de inhibición} = \left(\frac{R1 - R2}{R1} \right) * 100$$

Donde:

- R2 representa el crecimiento del hongo en presencia de bacterias
- R1 el crecimiento del control.

Parte VI. Pruebas en frutos

Cuadro 15. Defectos de calidad en papaya Kaya Paya ® (Carica Papaya)

Parámetro	Imagen
Puntos suaves (focos de pérdida de turgencia)	 A photograph of a yellow papaya with several dark, sunken spots on its surface, indicating soft spots or loss of turgor.
Pudrición del pedúnculo	 A photograph showing the stem area of a papaya that is severely rotted and discolored, with a dark, hollowed-out center.
Deshidratación severa y envejecimiento del fruto	 A photograph of a papaya that is severely wilted and shriveled, with a dark, mottled appearance, indicating dehydration and aging. A small yellow and green sticker is visible on the fruit.

Manifestación de manchas oscuras



Colonización del fruto















Pudrición de la carnaza

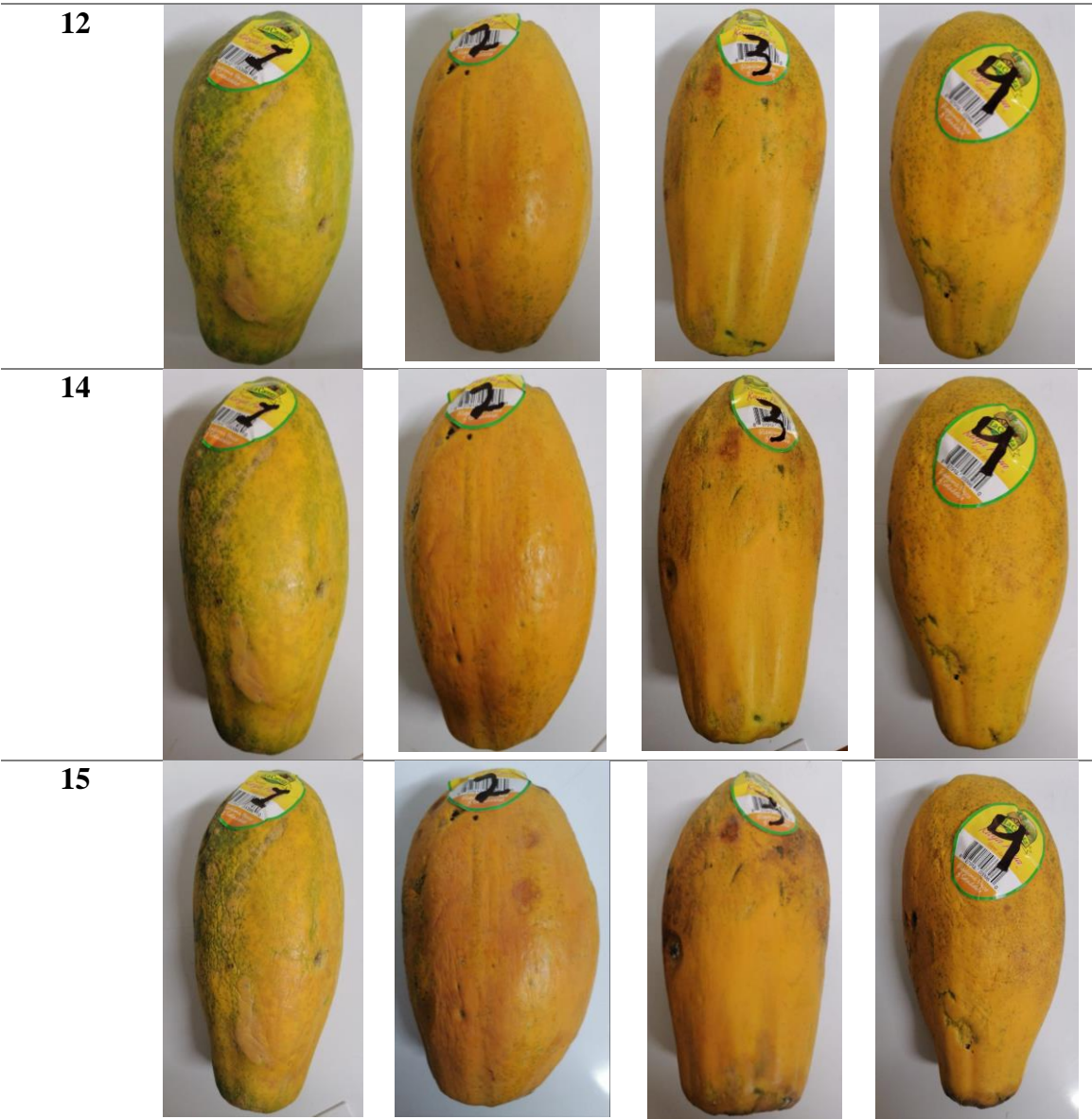


Parte VII. Fase 1 de la metodología: Identificación de microorganismos en el fruto











Cuadro 16. Apariencia de papayas del grupo 1 durante el almacenamiento controlado a temperatura ambiente

Días	Papaya 1	Papaya 2	Papaya 3	Papaya 4
1				
4				
5				





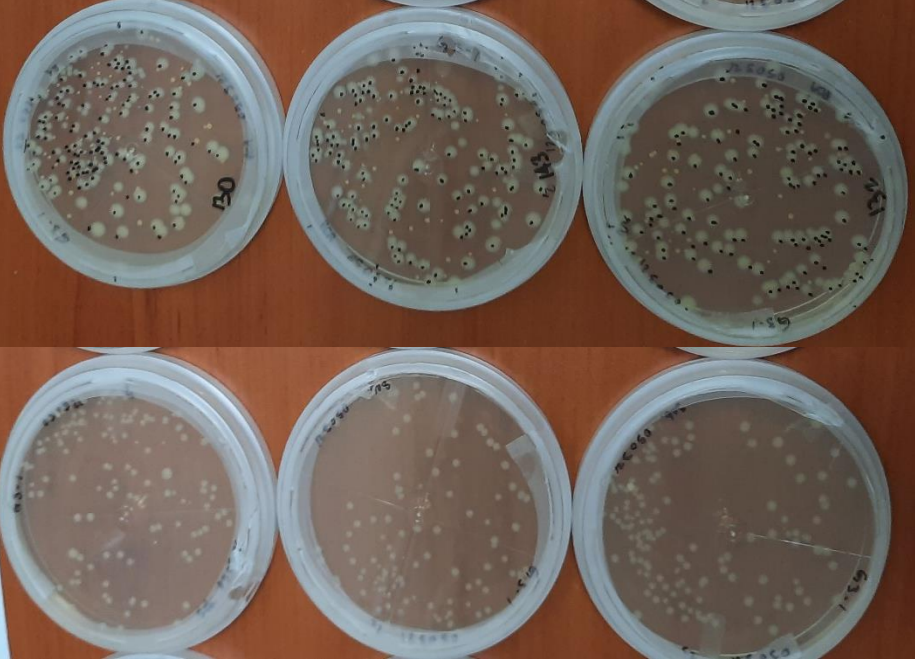
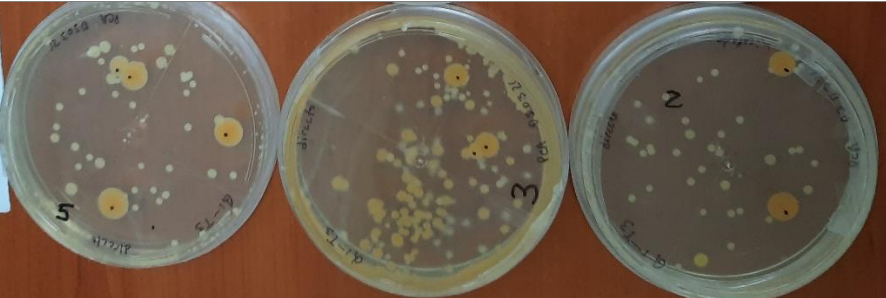
Cuadro 17. Apariencia de papayas del grupo 2 durante el almacenamiento controlado a temperatura ambiente

Días	Muestra 5	Muestra 6	Muestra 7	Muestra 8
1				
3				
5				




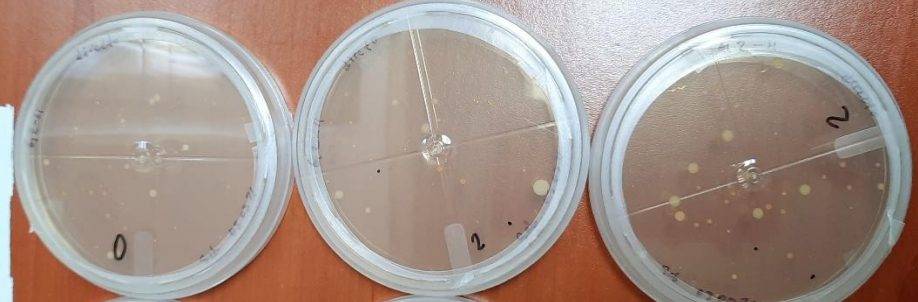
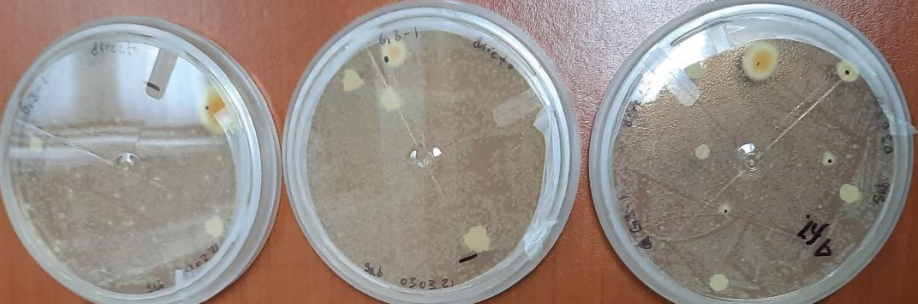

Cuadro 18. Recuento y caracterización de bacterias de los hisopados de papayas de los 5 grupos de interés.

Identificación	Conteo de bacterias en agar PCA
<p>Grupo 1</p> <p>(almacenadas 15 días a temperatura ambiente en ambiente controlado)</p>	
<p>Grupo 2</p> <p>(Almacenadas 8 días a temperatura ambiente en ambiente controlado)</p>	
<p>Grupo 3</p> <p>(Almacenadas 15 días en refrigeración de 12-16°C)</p>	






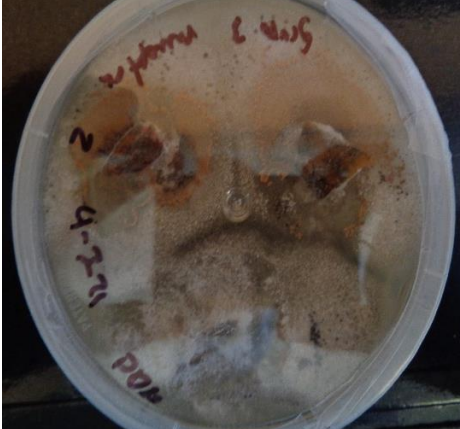
<p>Grupo 4</p> <p>(15 días en bodega a temperatura ambiente, tomadas de la merma de producción)</p> <p>En este grupo se realizó una dilución para poder efectuar el conteo</p>	
<p>Grupo 5</p> <p>(No fueron almacenadas, se tomaron de la entrega del día)</p>	

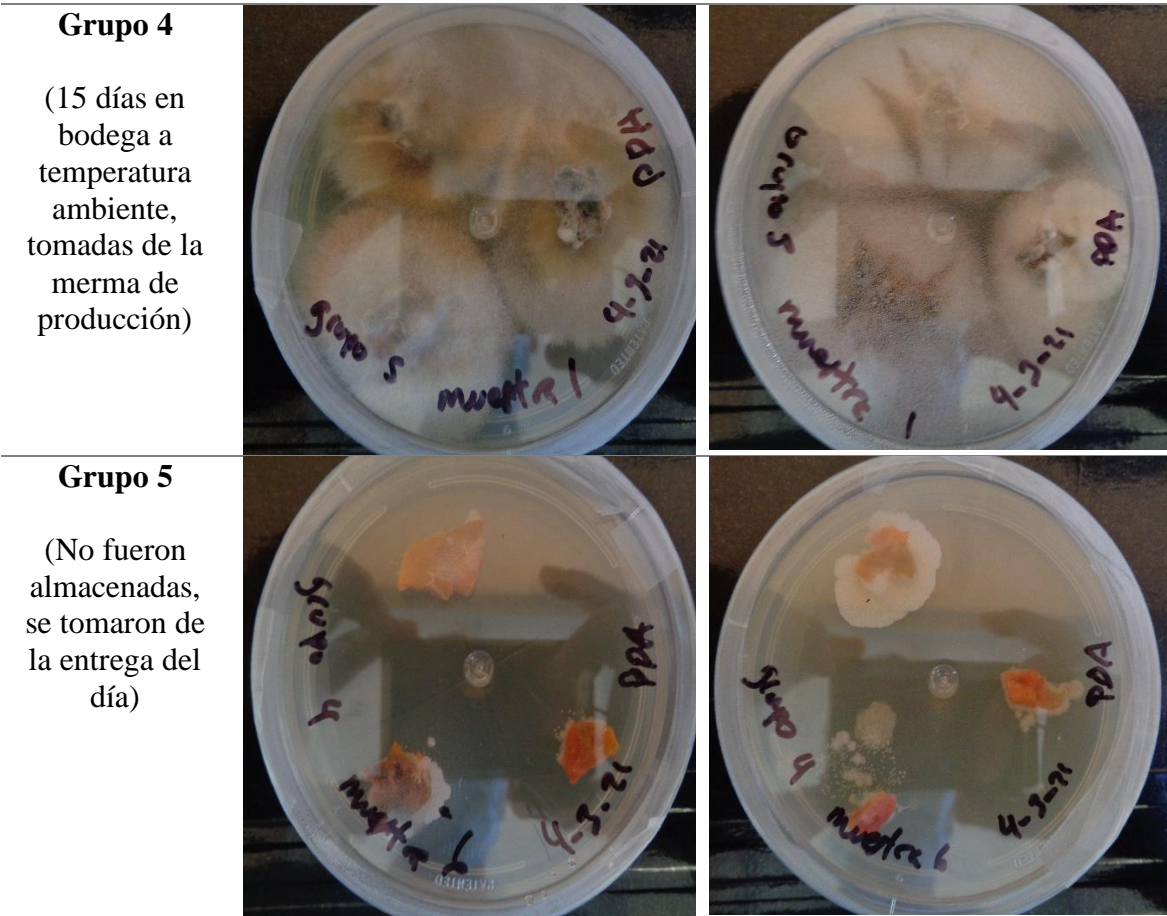
Cuadro 19. Recuento y caracterización de hongos de los hisopados de papayas de los 5 grupos de interés.

Identificación	Conteo de hongos en agar Sabouraud
<p>Grupo 1</p> <p>(almacenadas 15 días a temperatura ambiente en ambiente controlado)</p>	



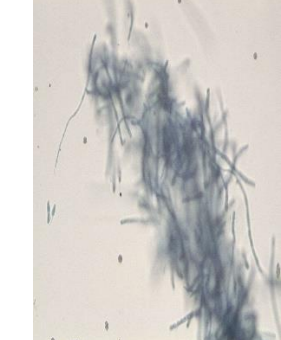
<p>Grupo 2</p> <p>(Almacenadas 8 días a temperatura ambiente en ambiente controlado)</p>	
<p>Grupo 3</p> <p>(Almacenadas 15 días en refrigeración de 12-16°C)</p>	
<p>Grupo 4</p> <p>(15 días a temperatura ambiente, de la merma de producción)</p>	
<p>Grupo 5</p> <p>(No fueron almacenadas, se tomaron de la entrega del día)</p>	

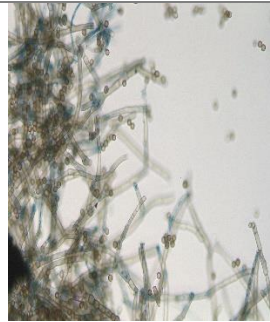
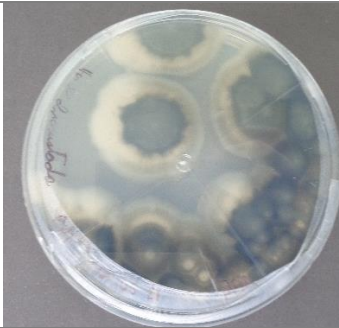
Cuadro 20. Caracterización morfológica de los hongos presentes en la pulpa de papayas de los 5 grupos de interés.

Identificación	Apariencia en día 4	Apariencia en día 8
<p>Grupo 1</p> <p>(almacenadas 15 días a temperatura ambiente en ambiente controlado)</p>		
<p>Grupo 2</p> <p>(Almacenadas 8 días a temperatura ambiente en ambiente controlado)</p>		
<p>Grupo 3</p> <p>(Almacenadas 15 días en refrigeración de 12-16°C)</p>		

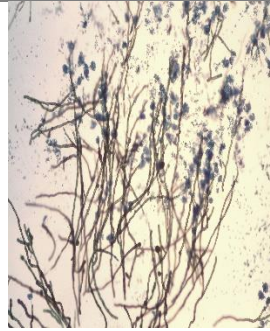


Cuadro 21. Proceso de separación de microorganismos en crecimiento mixto

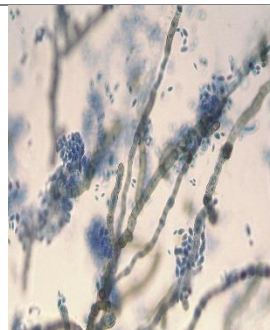
Crecimiento en agar	Montaje	Montaje	Conclusión
			<p>Continuar purificación</p>



Continuar
purificación




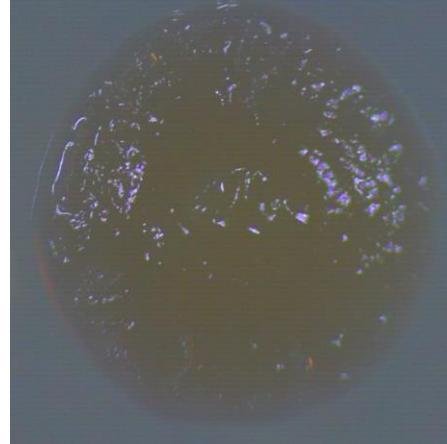


Continuar
purificación



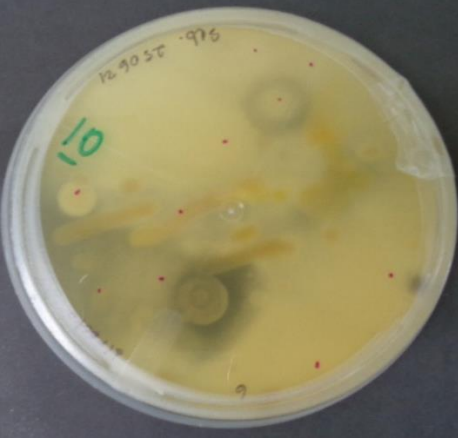
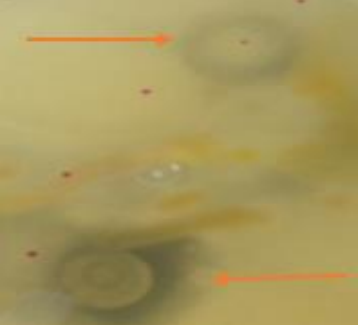
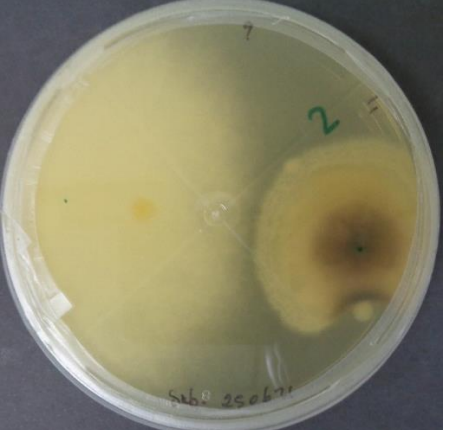
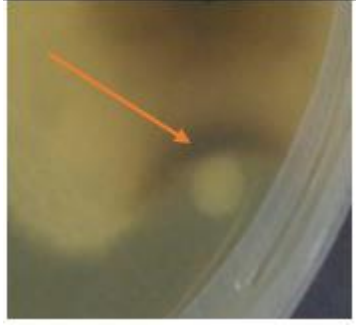

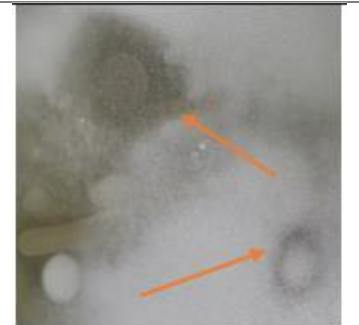
Continuar
purificación

Parte VIII. Fase 2 de la metodología: Antagonismo

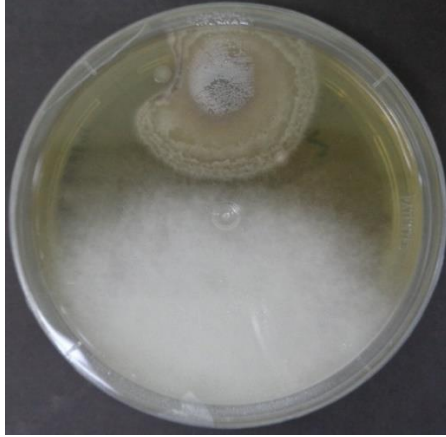
Cuadro 22. Caracterización morfológica de antagonistas *Bacillus Safensis* (BM®) y *Bacillus Subtilis* (Serenade®) en agar y en microscopio

Identificación	Crecimiento en agar natural	Vista en microscopio
<i>Bacillus Safensis</i> (BM®)		
<i>Bacillus Subtilis</i> (Serenade®)		

Cuadro 23. Ejemplo de antagonismos positivos de *Bacillus Safensis* (BM®)

Tipo de antagonismo	Figura	¿Cómo se da la inhibición?
Hongo - bacteria		 <p data-bbox="974 695 1357 800">Halo de inhibición marcado y severo, ejemplo claro del BM como antagonista.</p>
Hongo - bacteria		 <p data-bbox="974 1136 1357 1232">Inhibición parcial del crecimiento del hongo sobre la colonia del BM.</p>
Hongo - bacteria		 <p data-bbox="974 1568 1357 1665">Inhibición del crecimiento del hongo. Halo de inhibición marcado.</p>

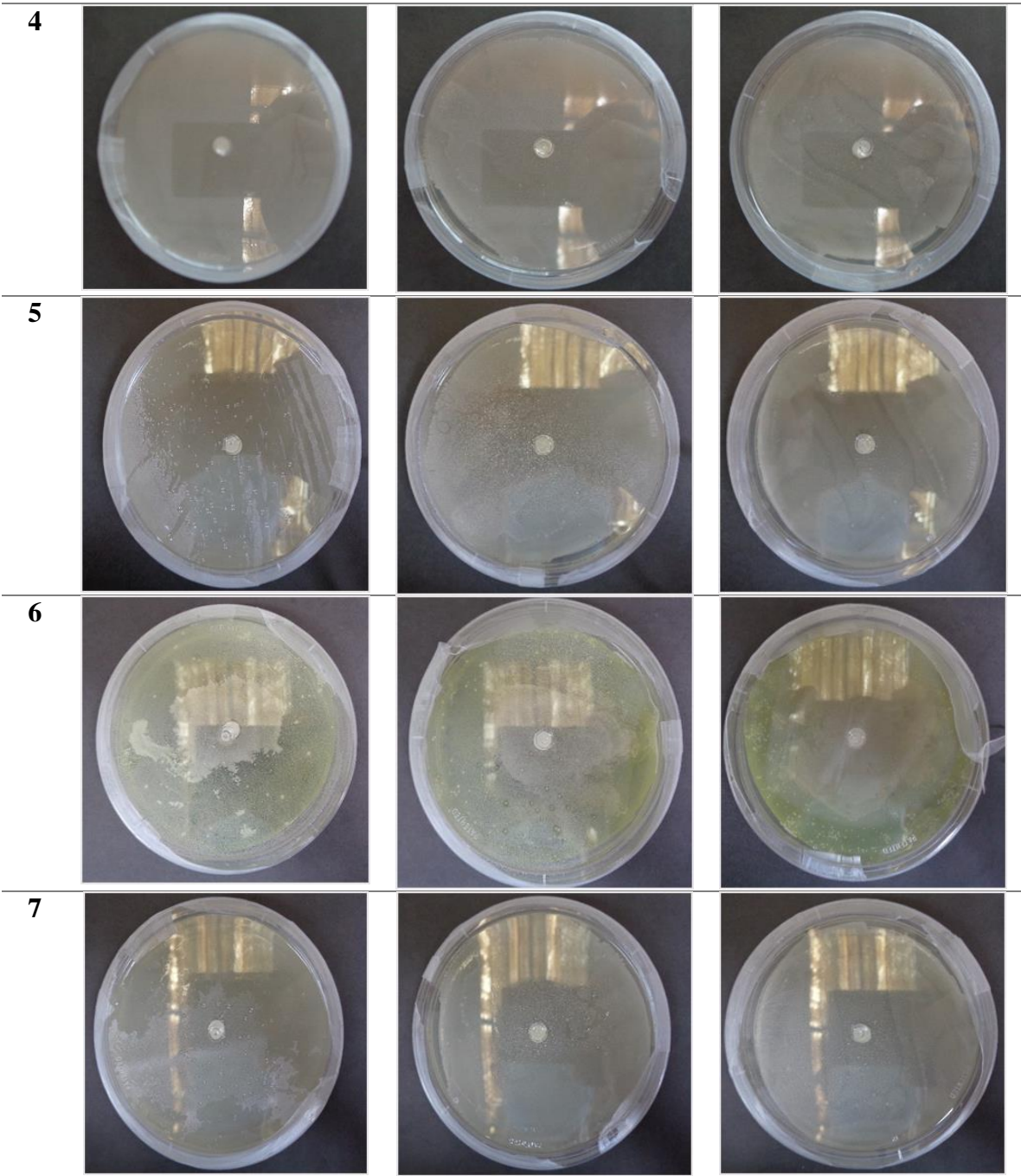
Hongo - bacteria



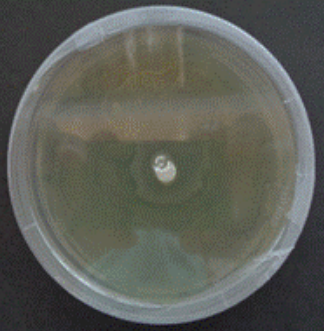
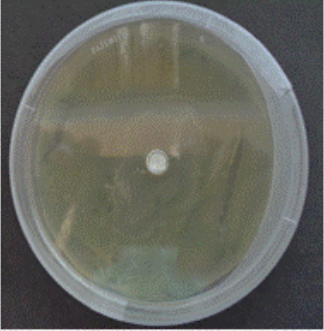
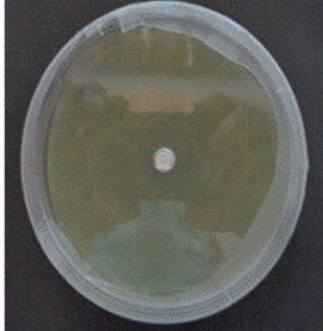
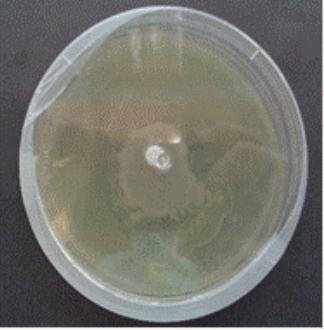
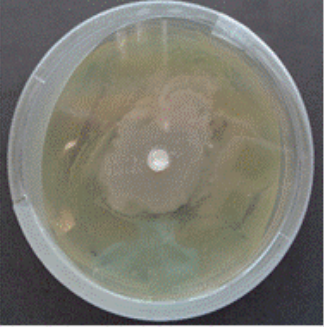
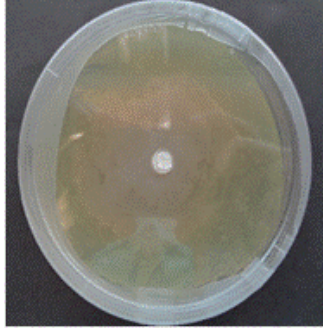

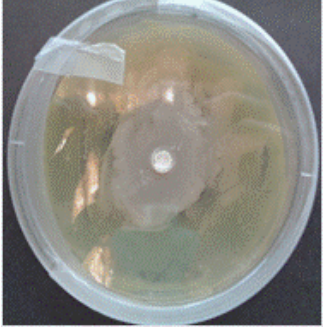
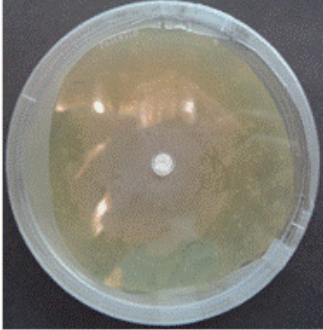
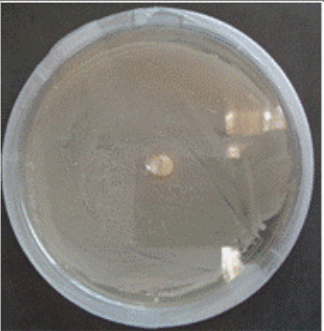
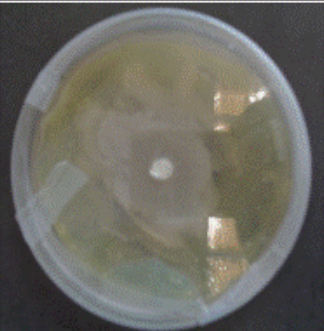
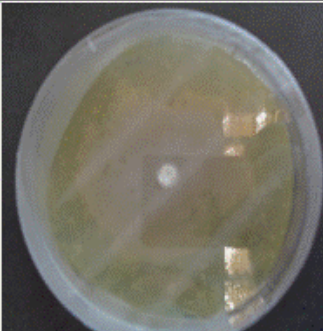
Inhibió el crecimiento del hongo, nunca hubo una interacción entre colonias.

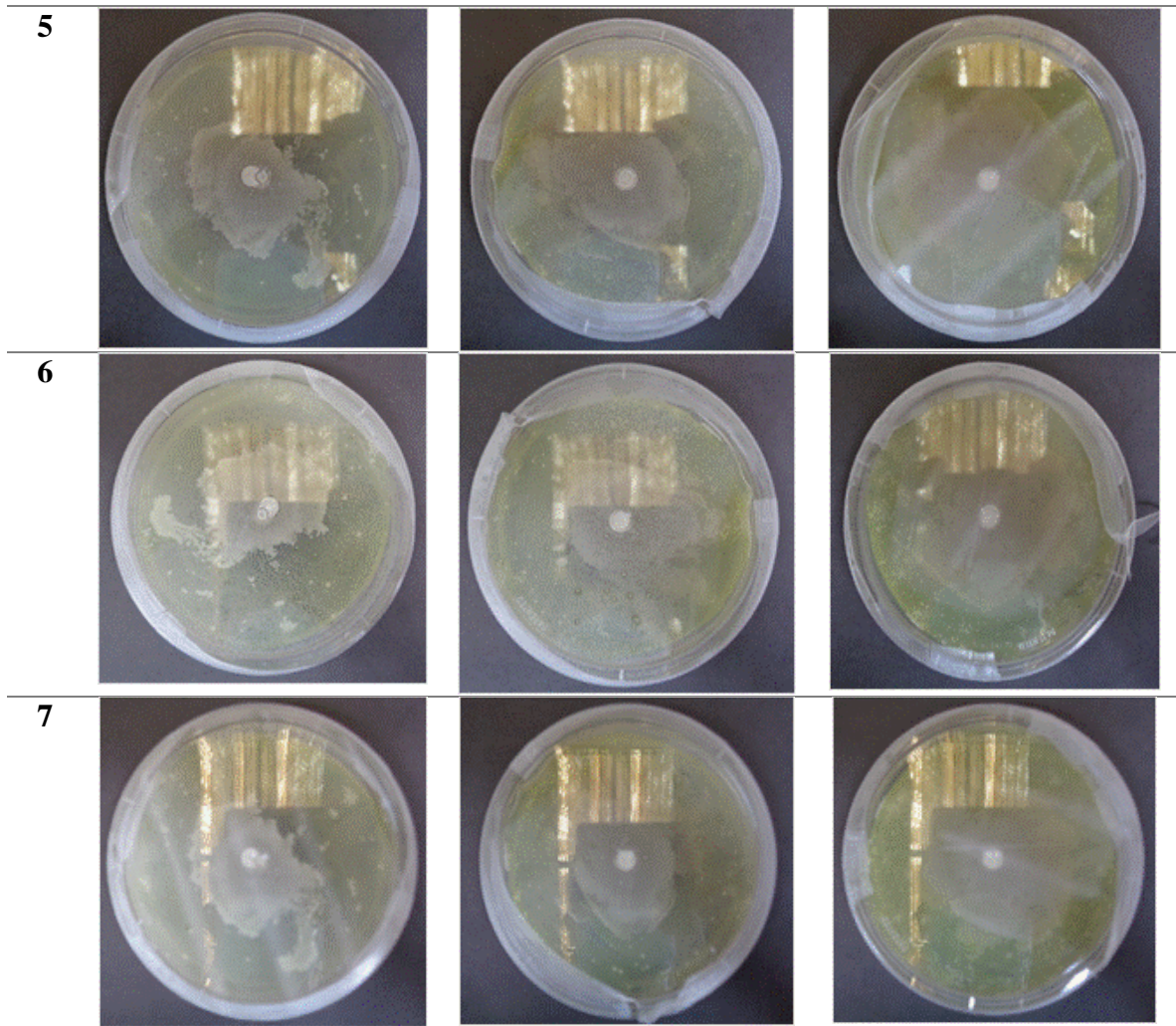
Cuadro 24. Antagonismo bacteria contra bacteria, Organismos compitiendo: BM vrs. *Staphylococcus sp.*

Día	Repetición 1	Repetición 2	Repetición 3
1			
2			
3			

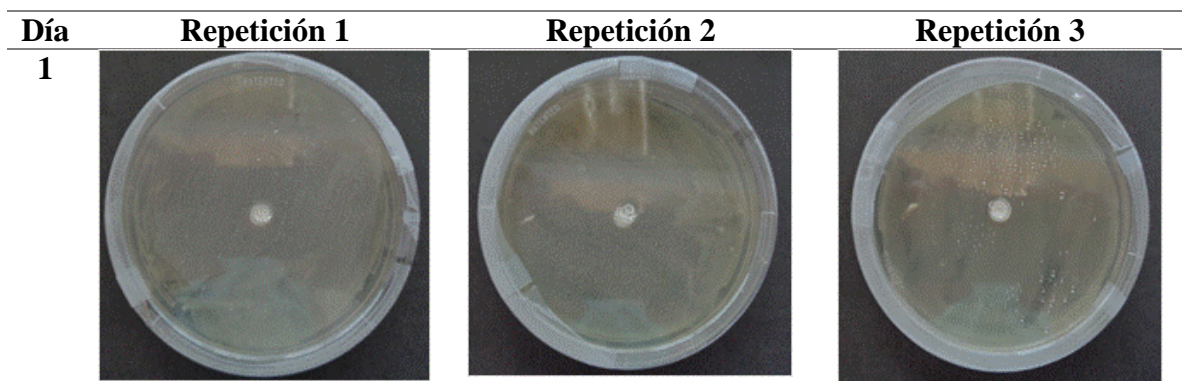


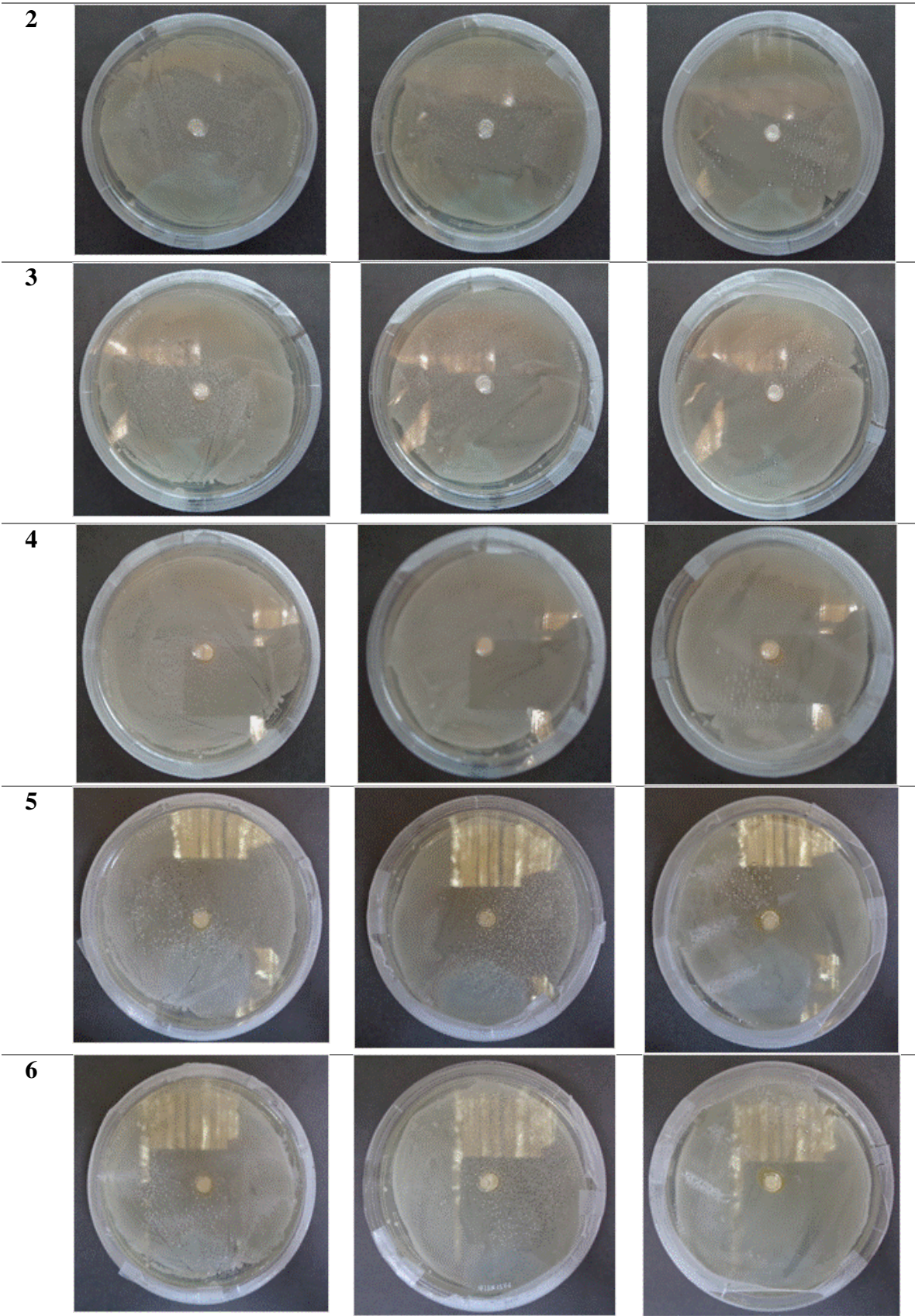
Cuadro 25. Antagonismo bacteria contra bacteria, organismos compitiendo: *Staphylococcus* sp. vrs. BM.

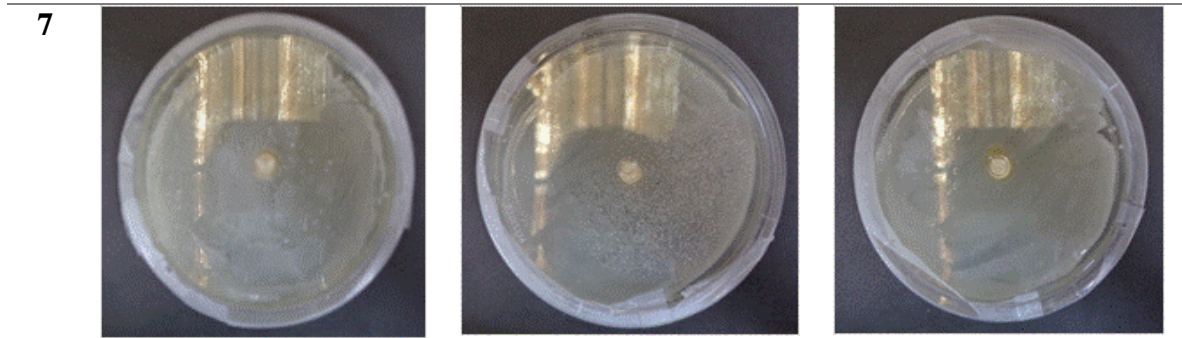
Día	Repetición 1	Repetición 2	Repetición 3
1			
2			
3			
4			



Cuadro 26. Antagonismo bacteria contra bacteria, organismos compitiendo: BM vrs. *Brevibacterium sp*

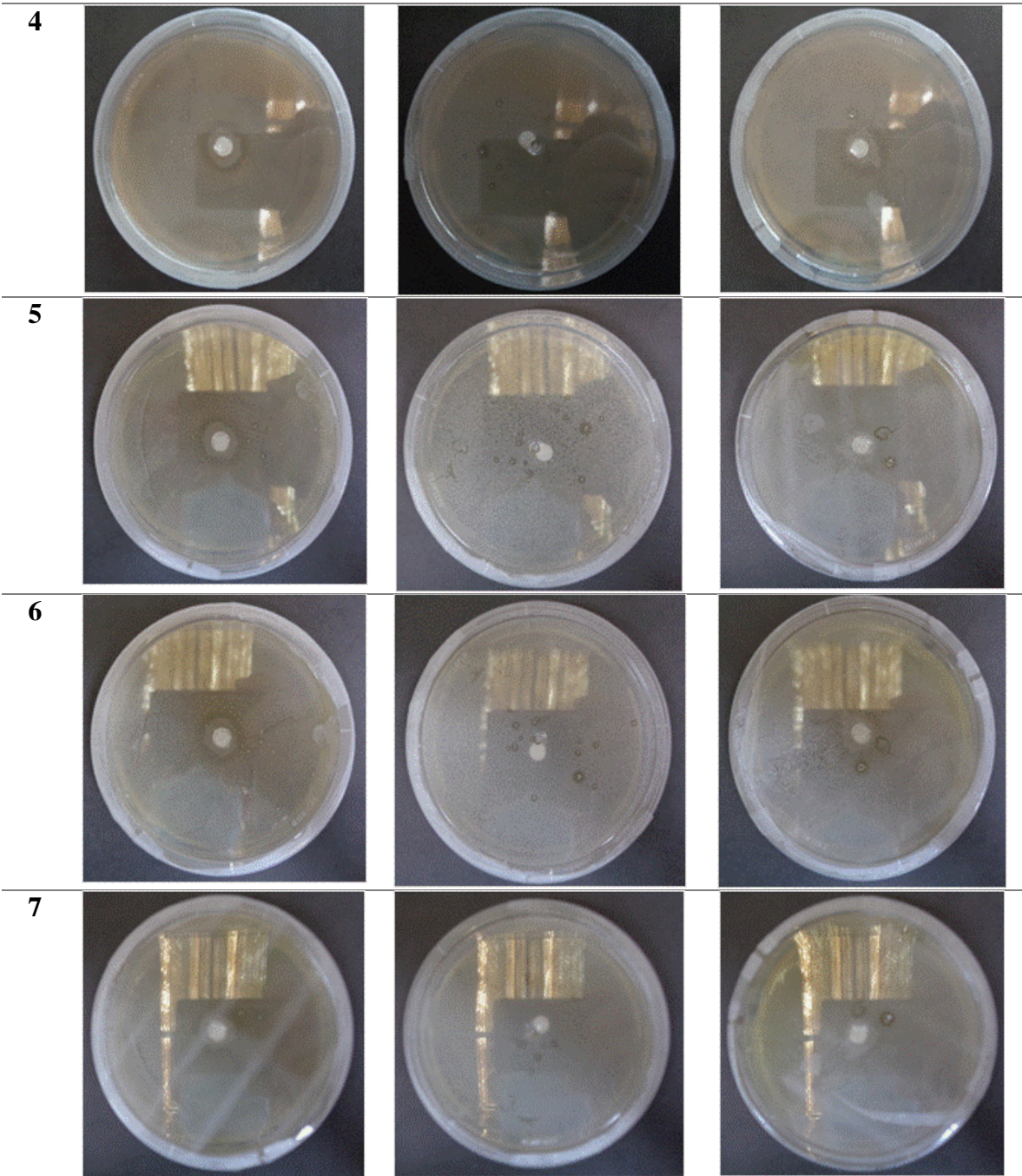




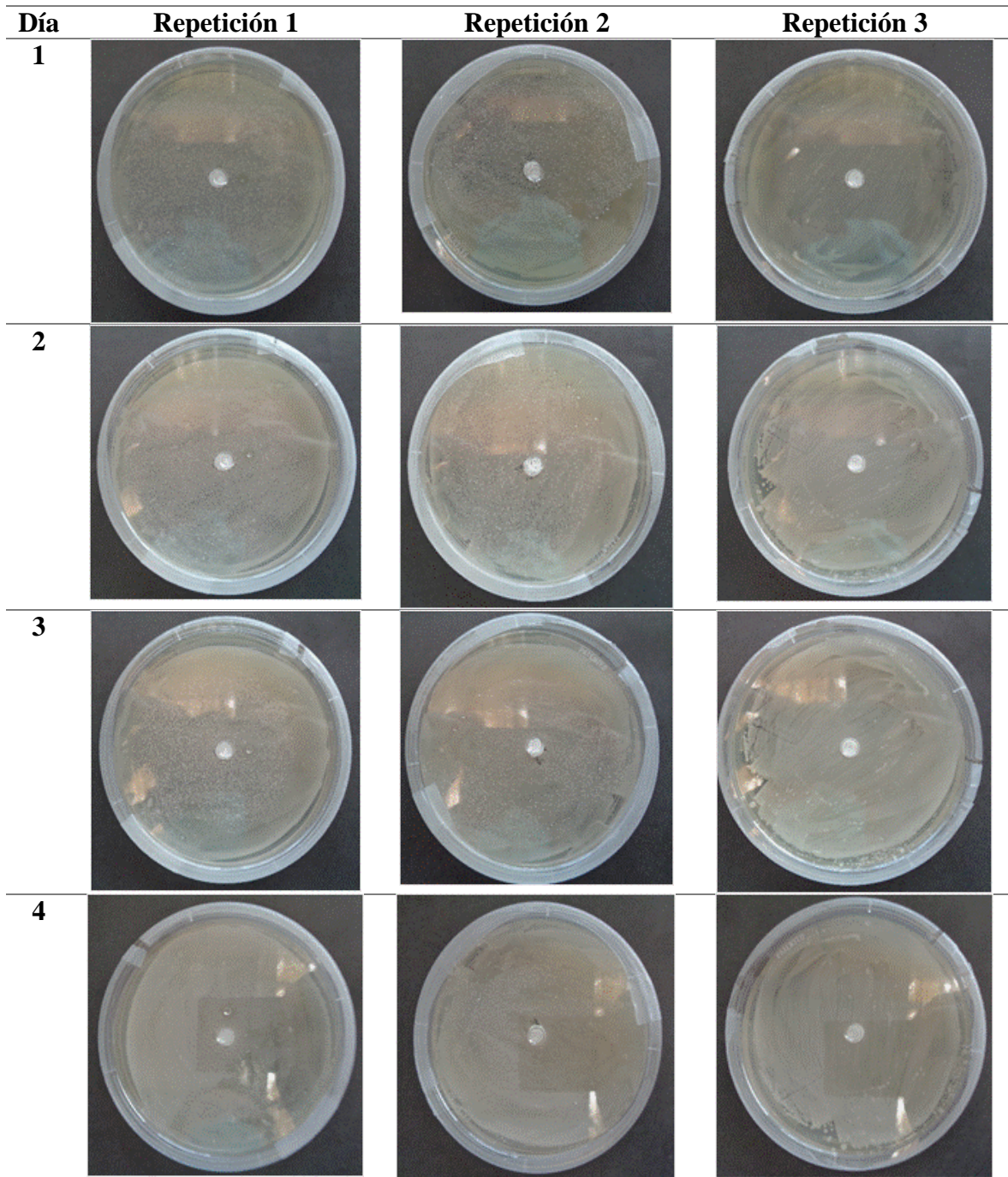


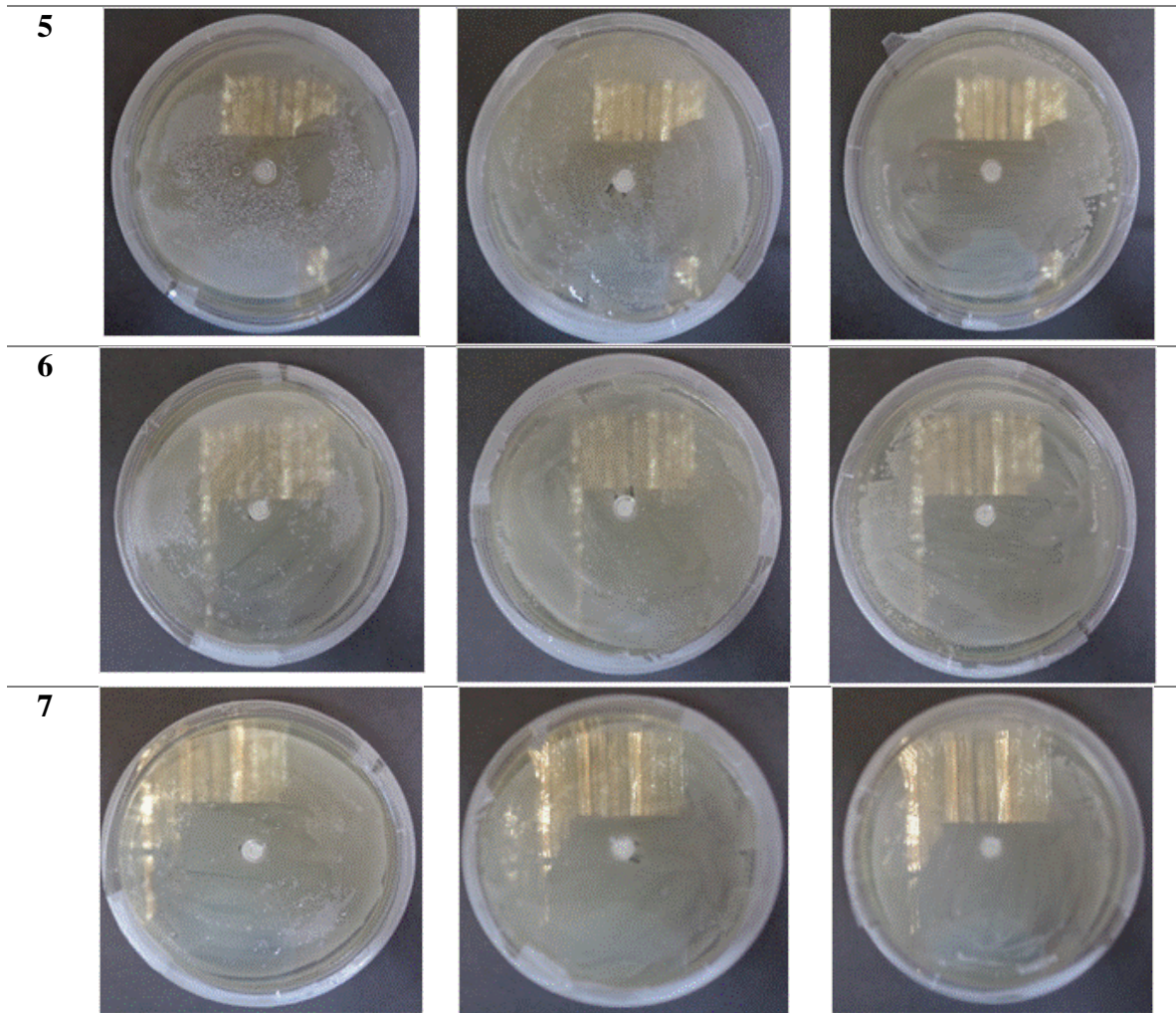
Cuadro 27. Antagonismo bacteria contra bacteria, organismos compitiendo: *Brevibacterium* sp vs. BM

Día	Repetición 1	Repetición 2	Repetición 3
1			
2			
3			

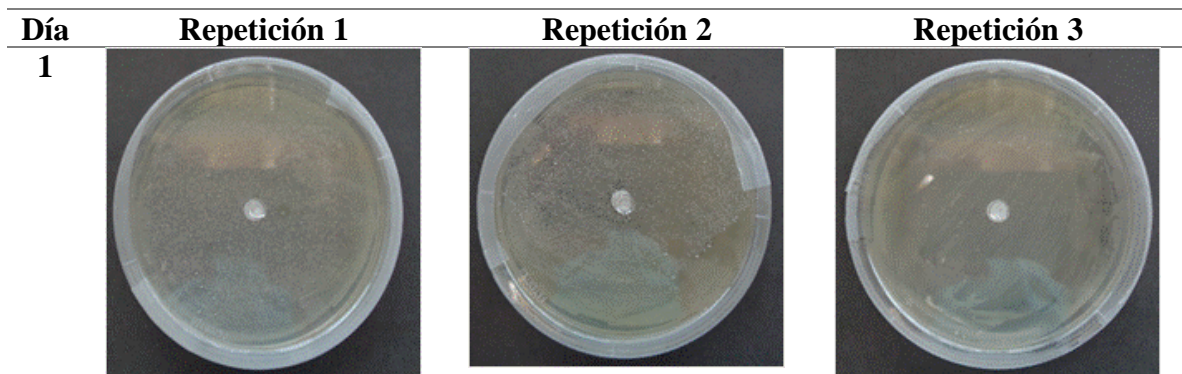


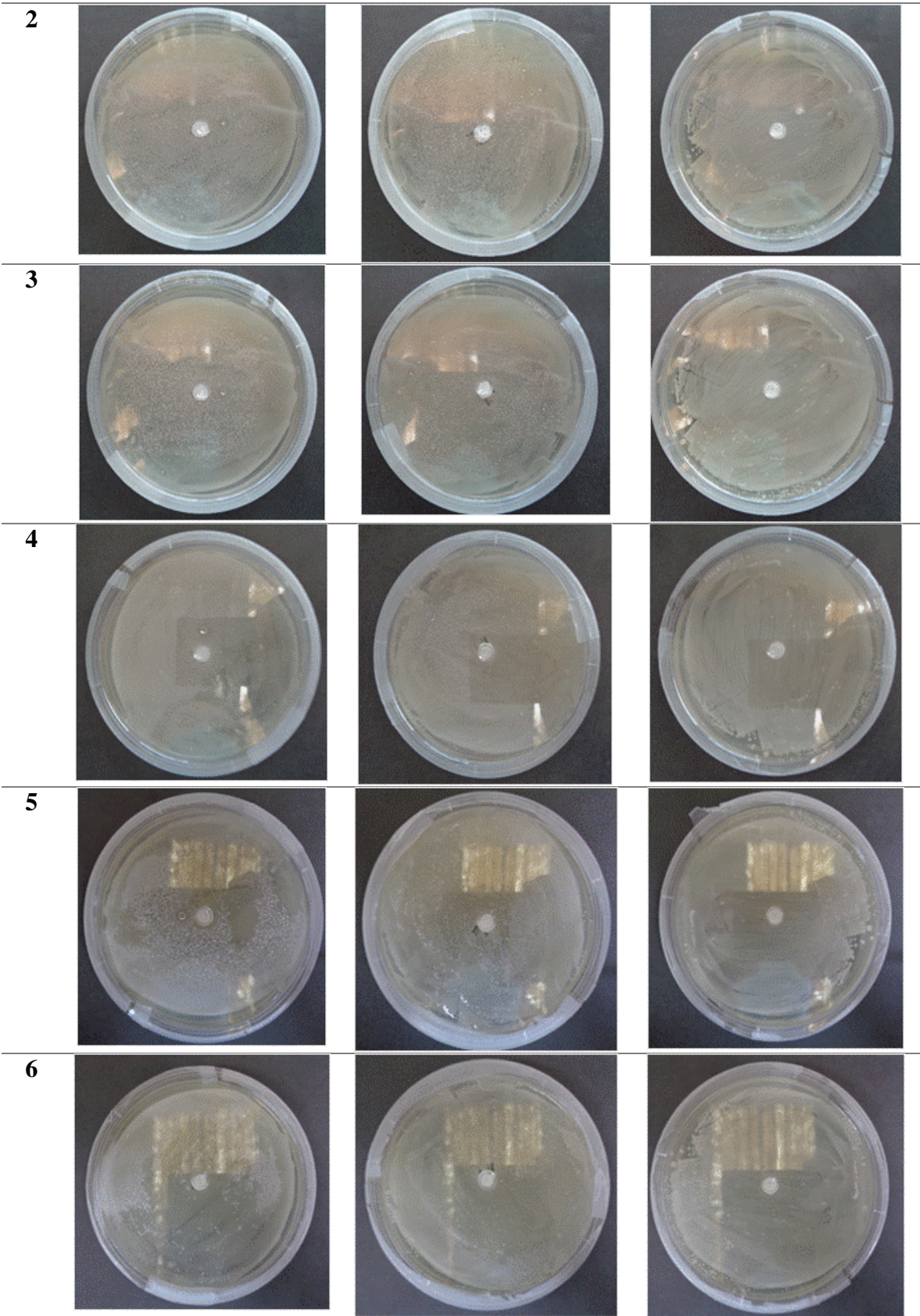
Cuadro 28. Antagonismo bacteria contra bacteria, organismos compitiendo: BM vrs. *Bacillus sp.*

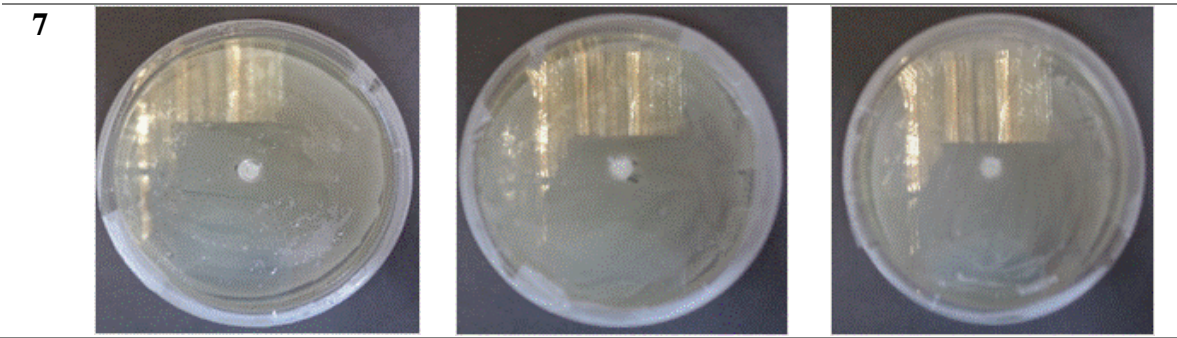




Cuadro 29. Antagonismo bacteria contra bacteria, organismos compitiendo: BM vs. *Bacillus sp.*

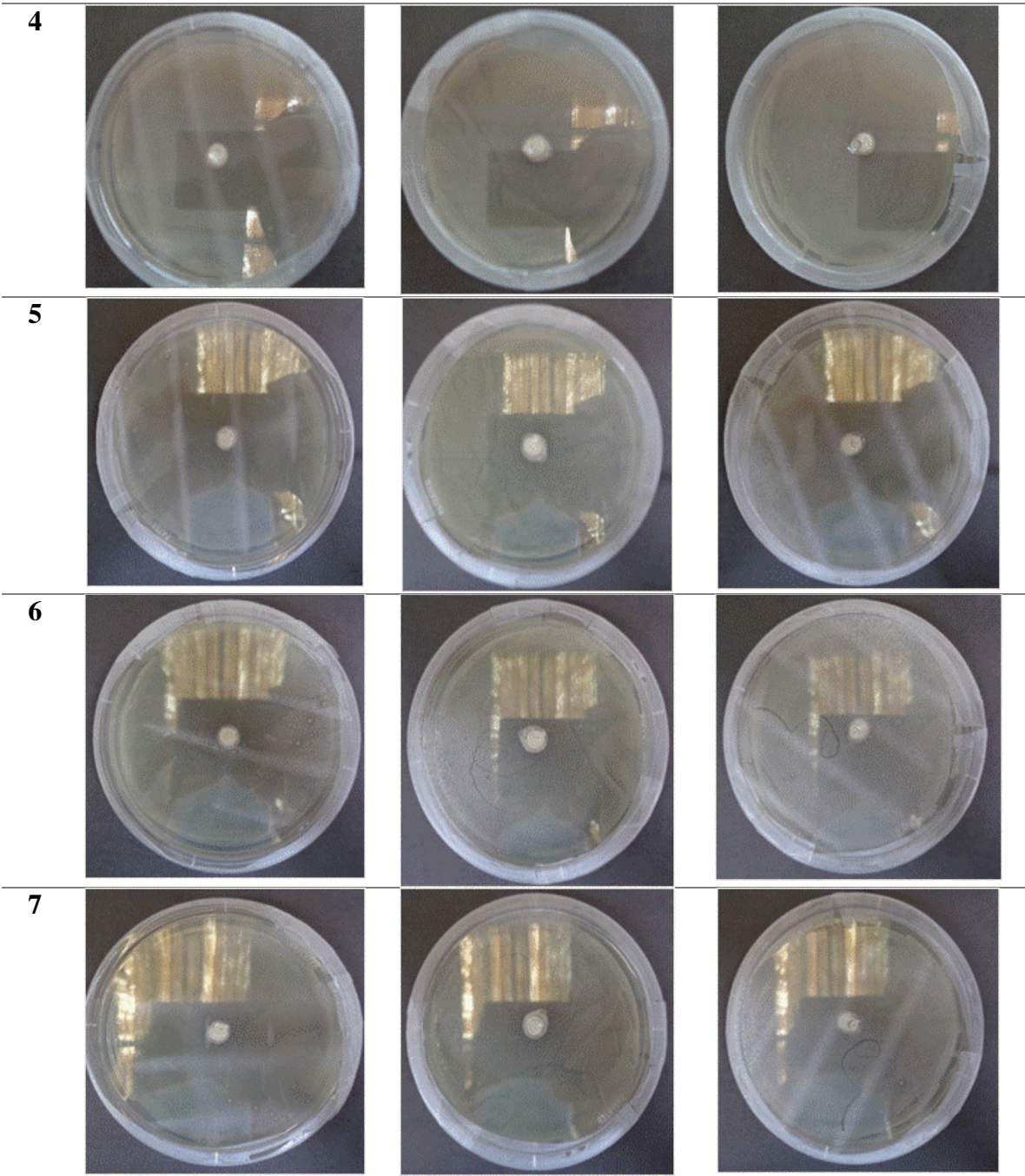




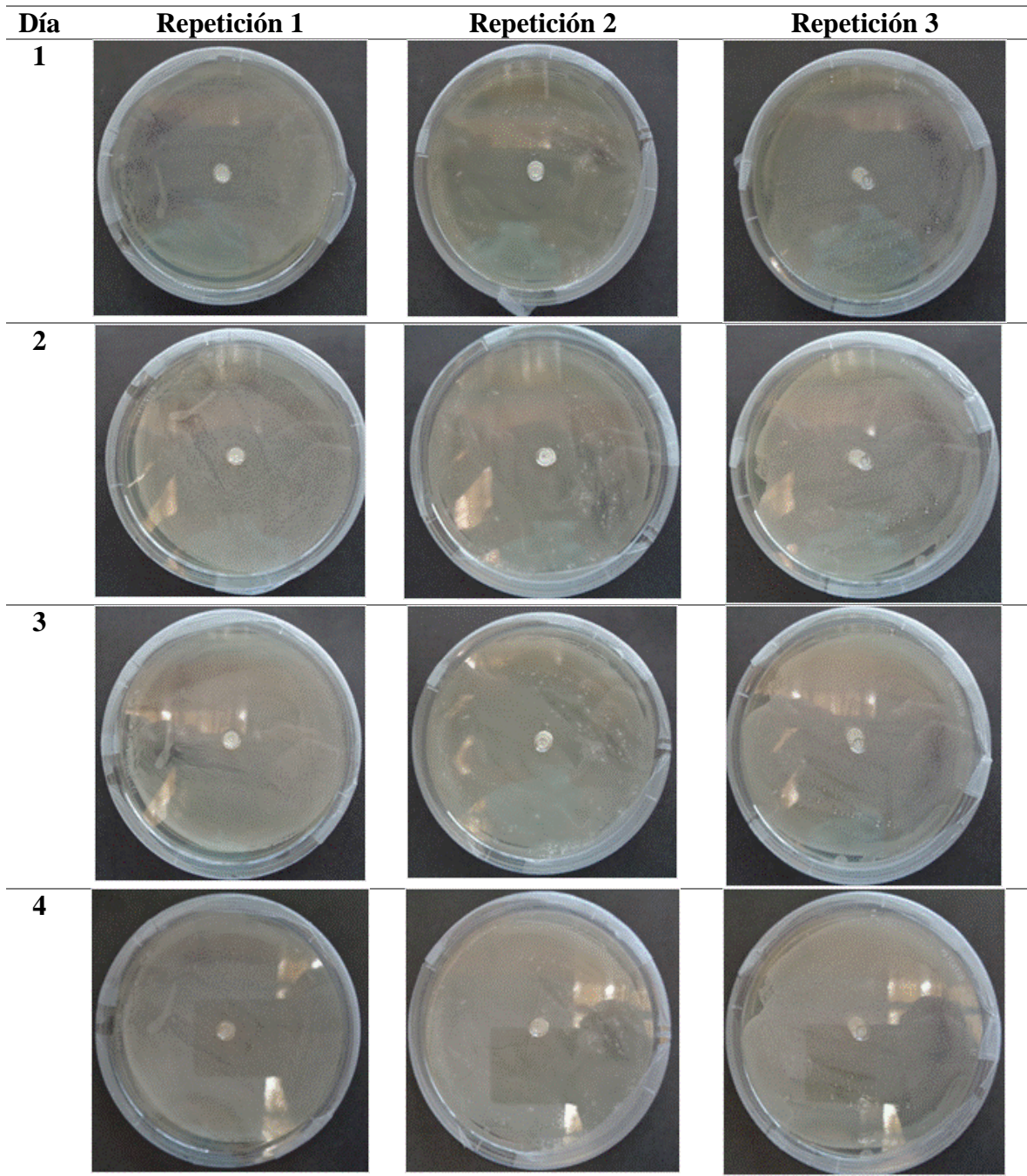


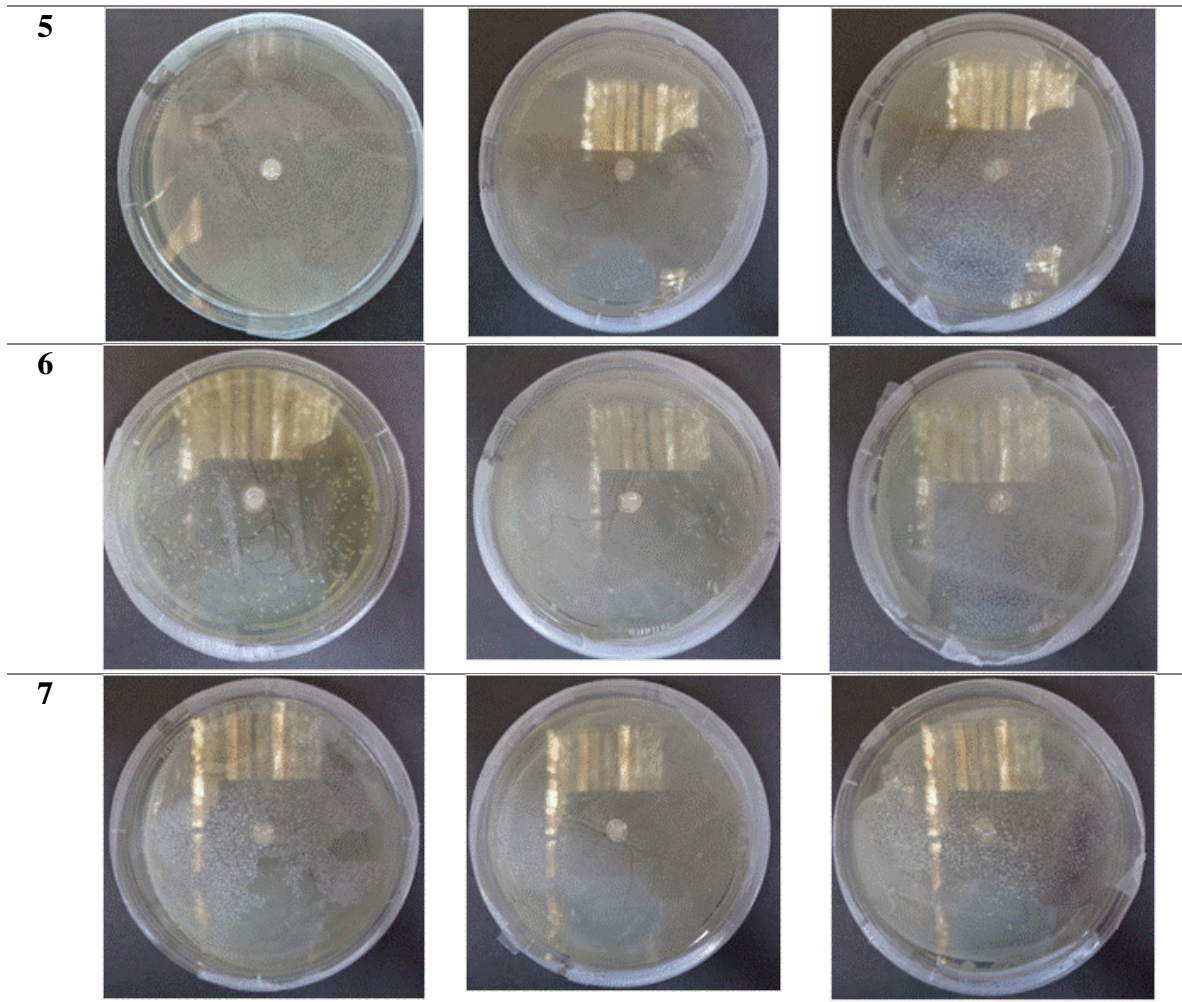
Cuadro 30. Antagonismo bacteria contra bacteria, organismos compitiendo: *Bacillus sp.* vrs. BM

Día	Repetición 1	Repetición 2	Repetición 3
1			
2			
3			

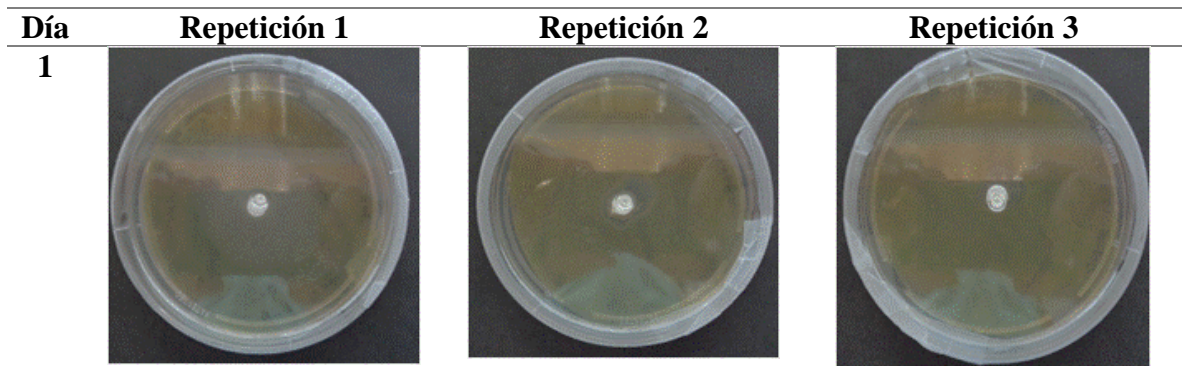


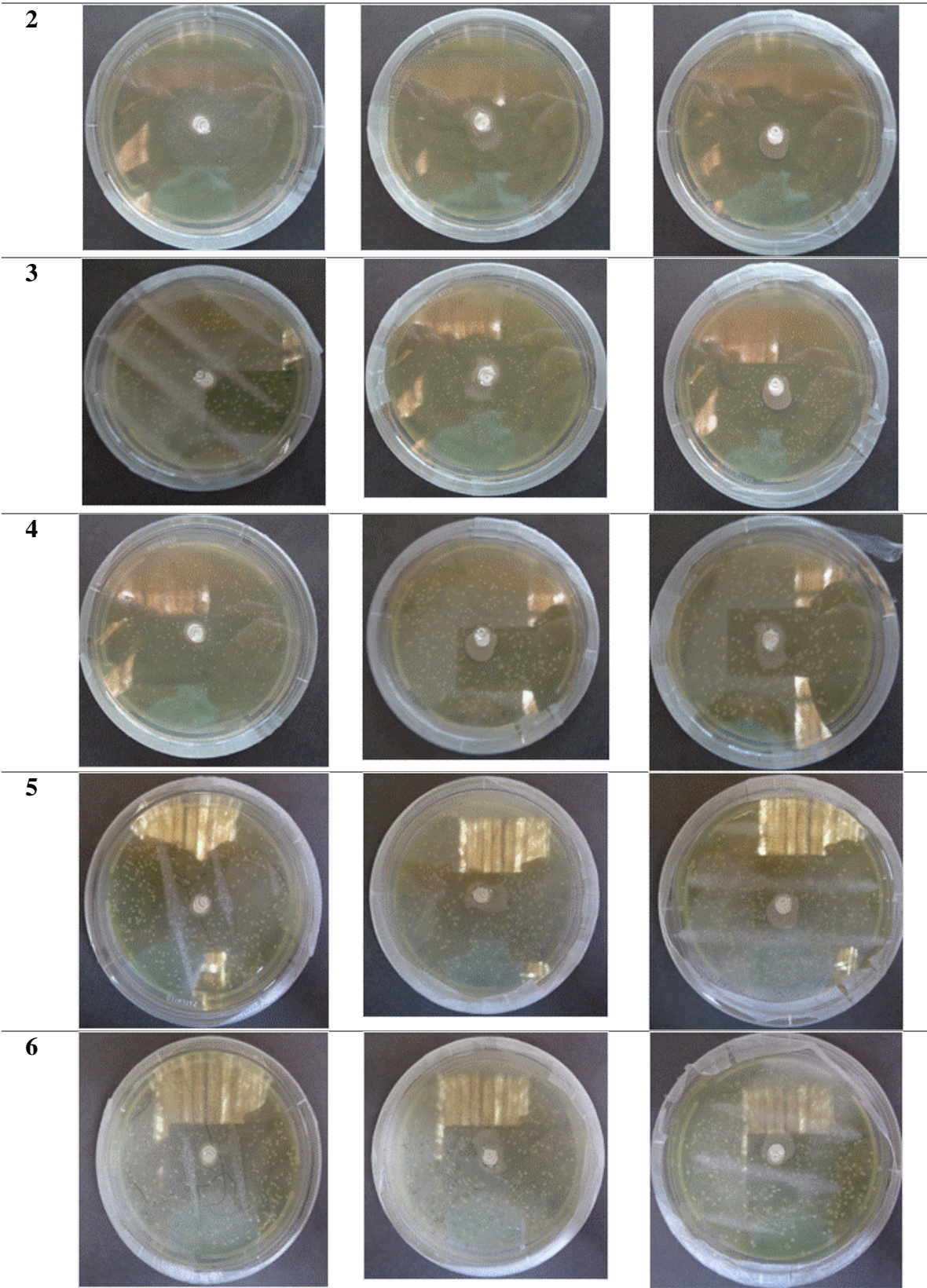
Cuadro 31. Antagonismo bacteria contra bacteria, organismos compitiendo: BM vrs. *Microbacterium sp.*

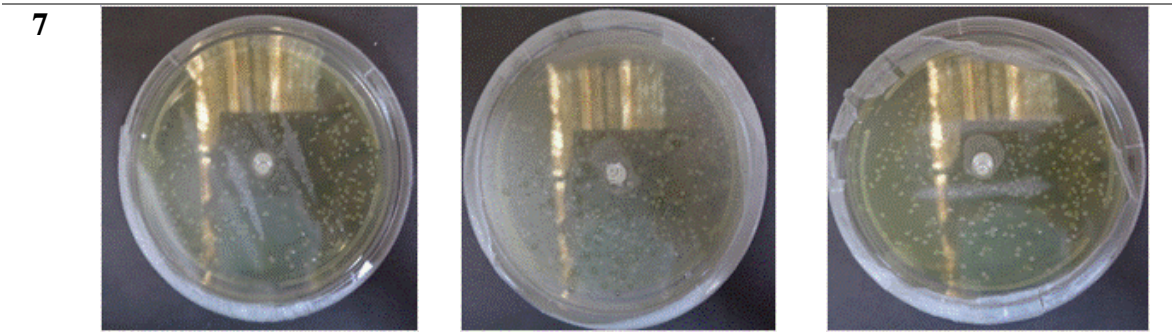




Cuadro 32. Antagonismo bacteria contra bacteria, organismos compitiendo:
Microbacterium sp. vs. BM



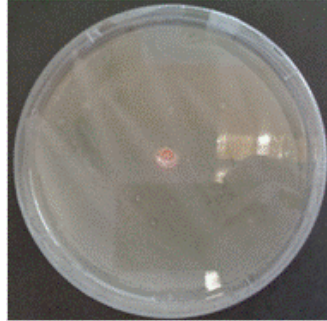
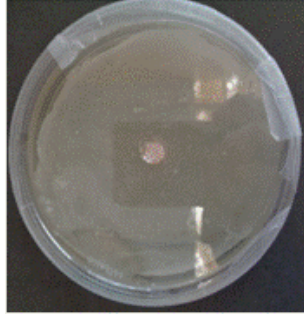
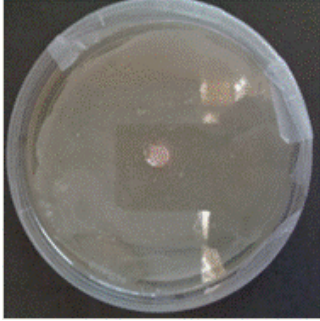




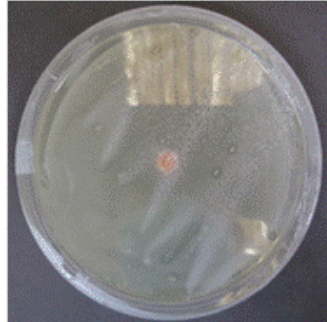
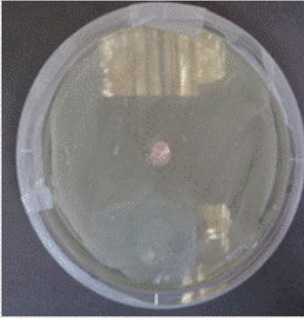
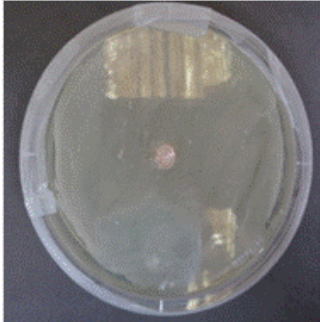
Cuadro 33. Antagonismo bacteria contra bacteria, organismos compitiendo: BM VRS.
Rhodococcus sp

Día	Repetición 1	Repetición 2	Repetición 3
1			
2			
3			

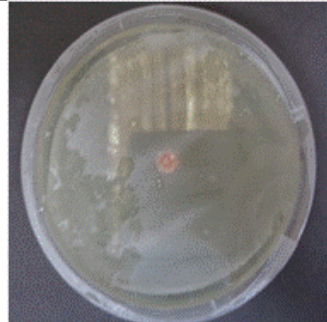
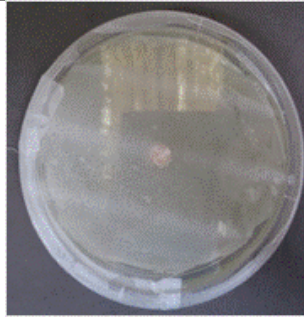
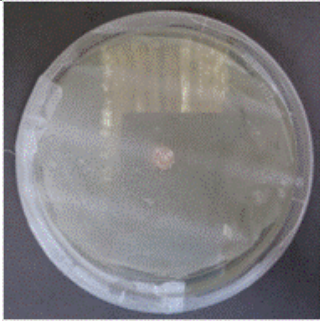
4



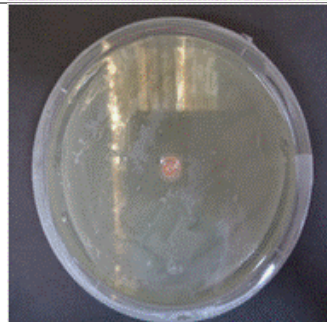
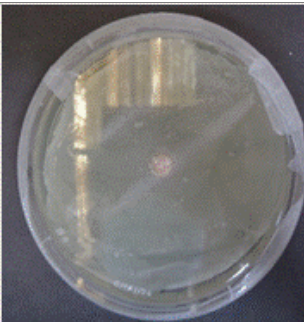
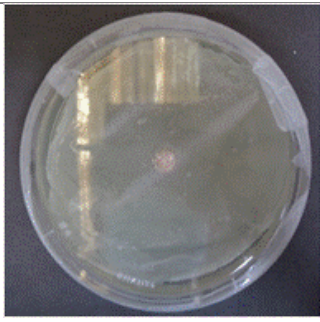
5



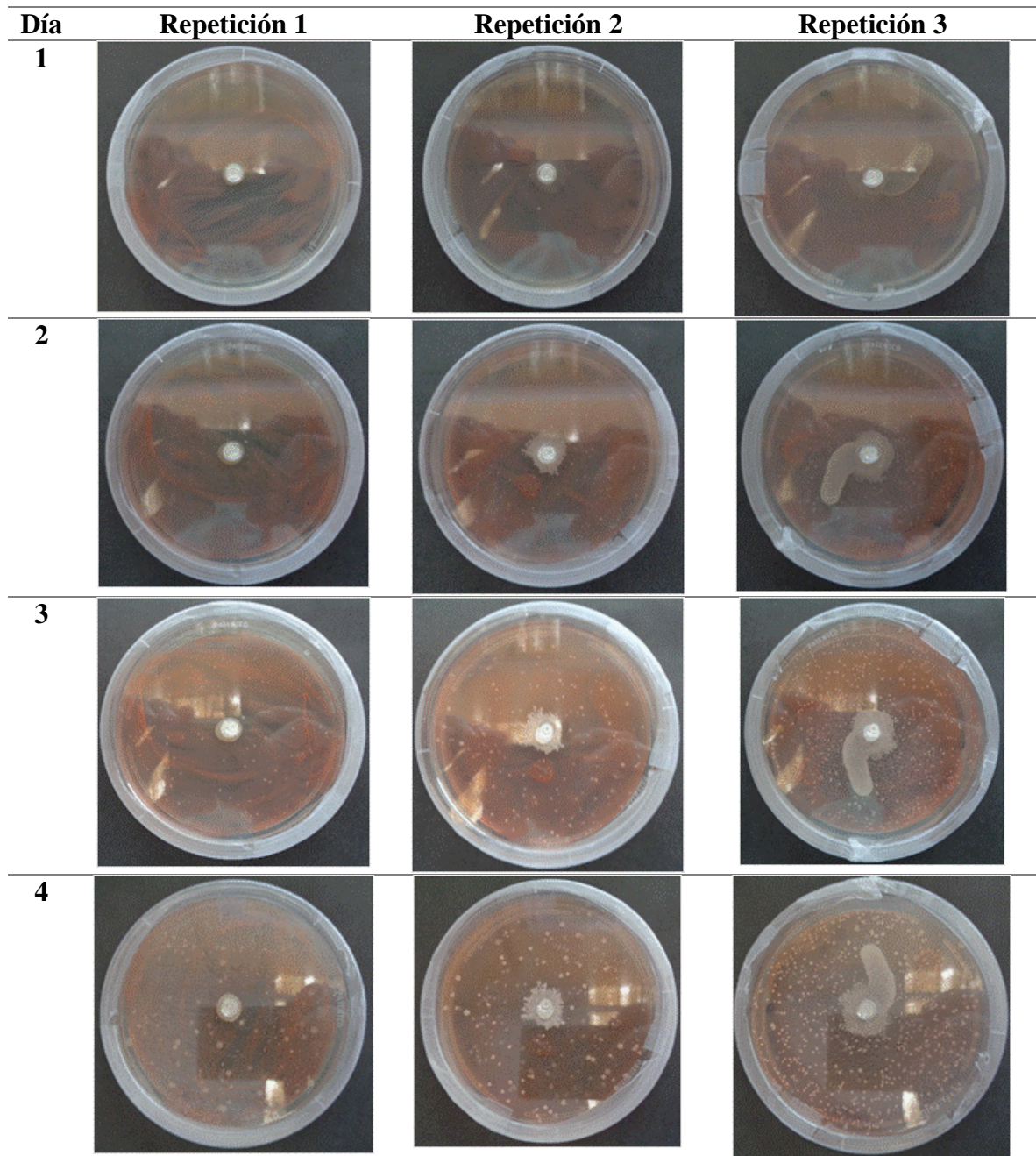
6

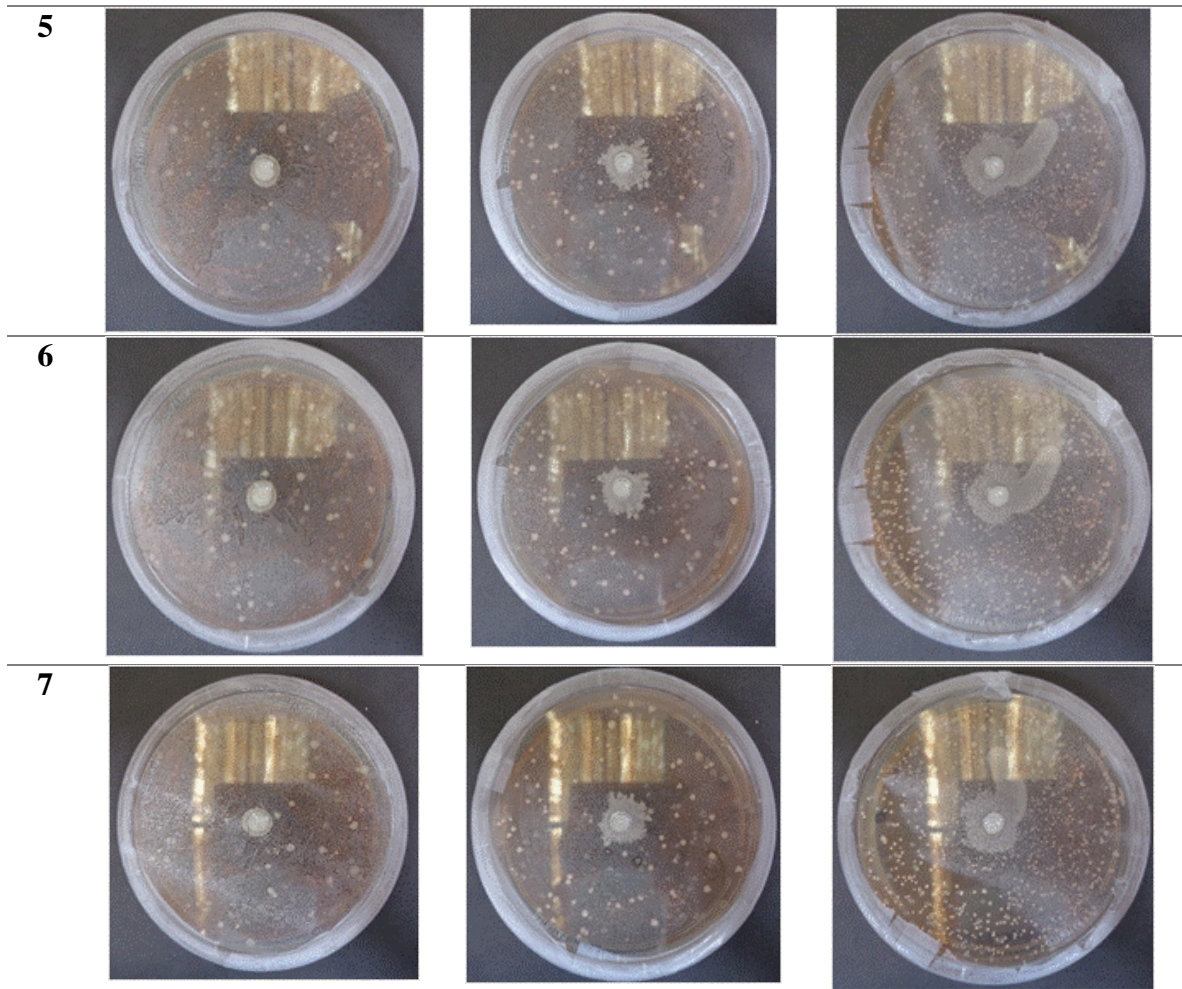


7

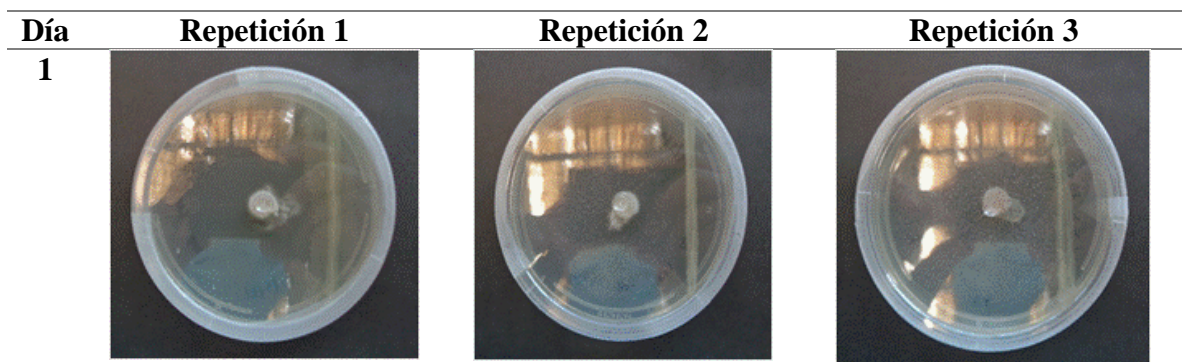


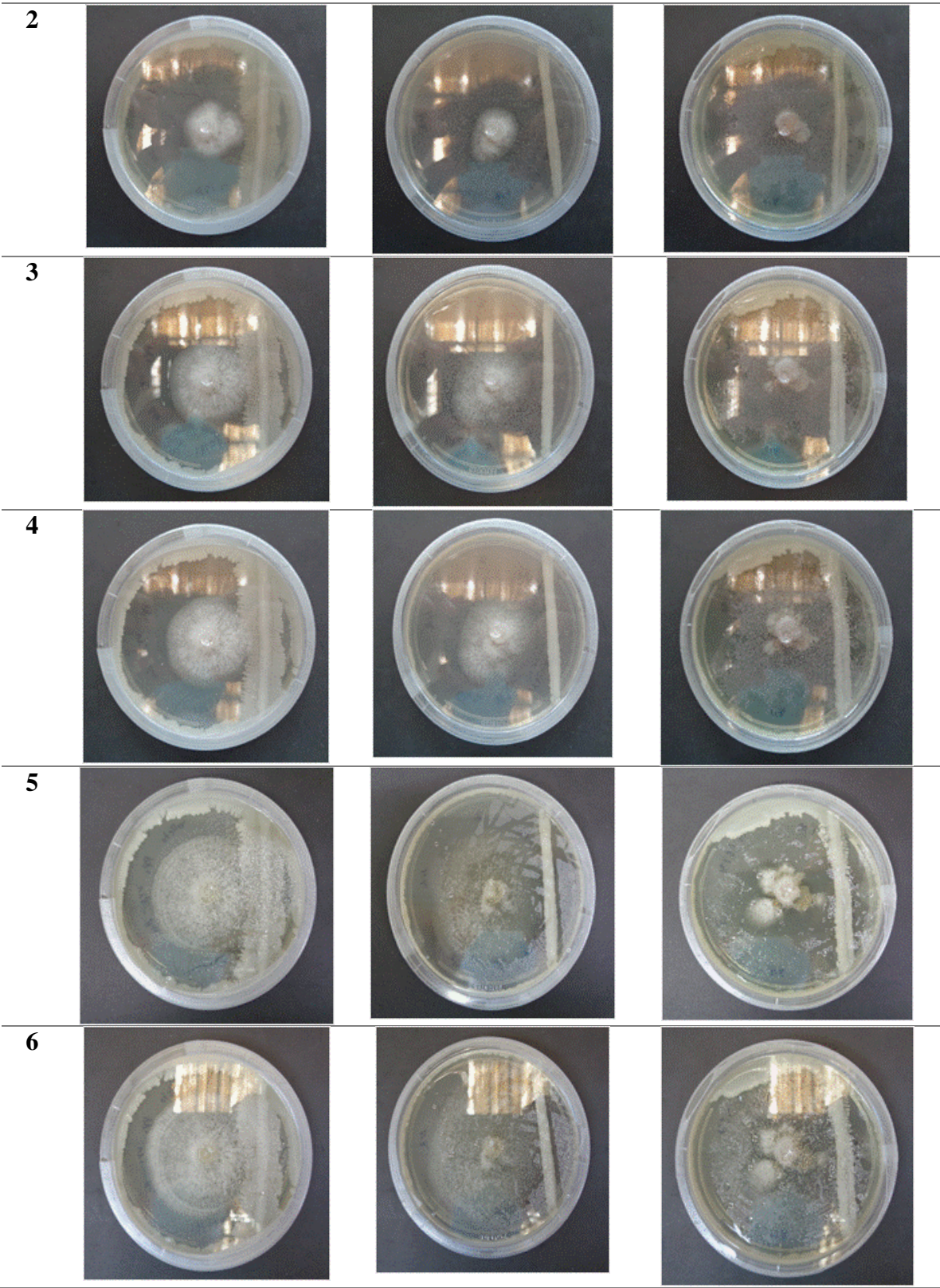
Cuadro 34. Antagonismo bacteria contra bacteria, organismos compitiendo: *Rhodococcus* sp vs. BM

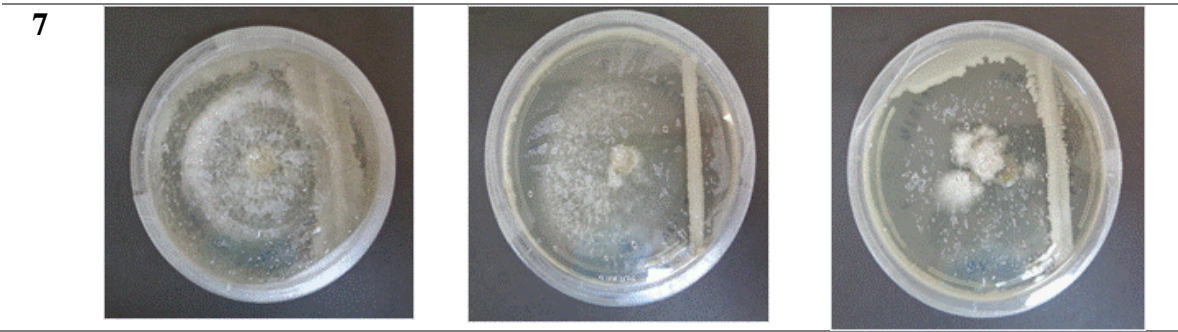




Cuadro 35. Antagonismo hongo contra bacteria, organismos compitiendo: *Colletotrichum* sp. vrs. BM en medio NA

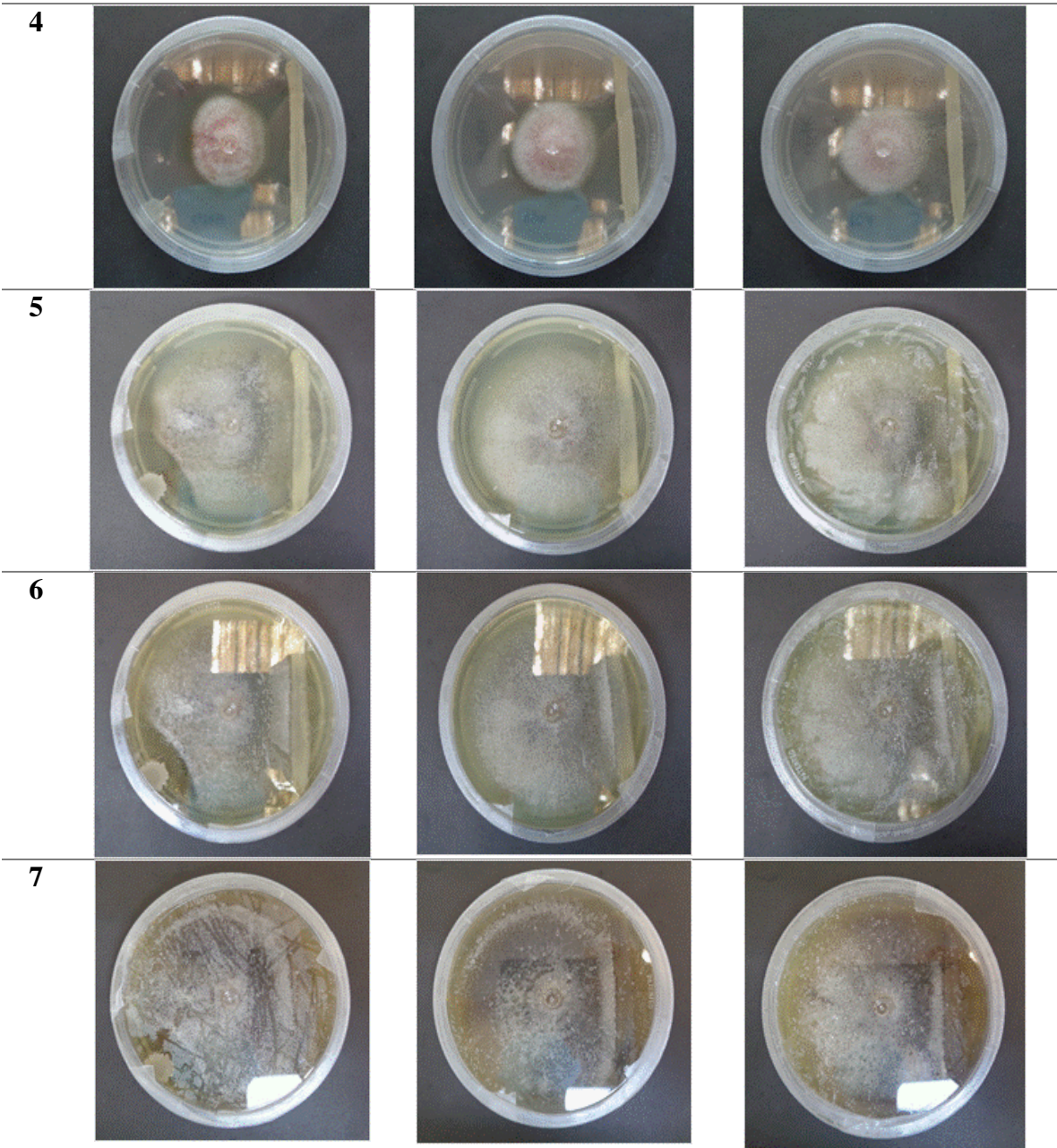




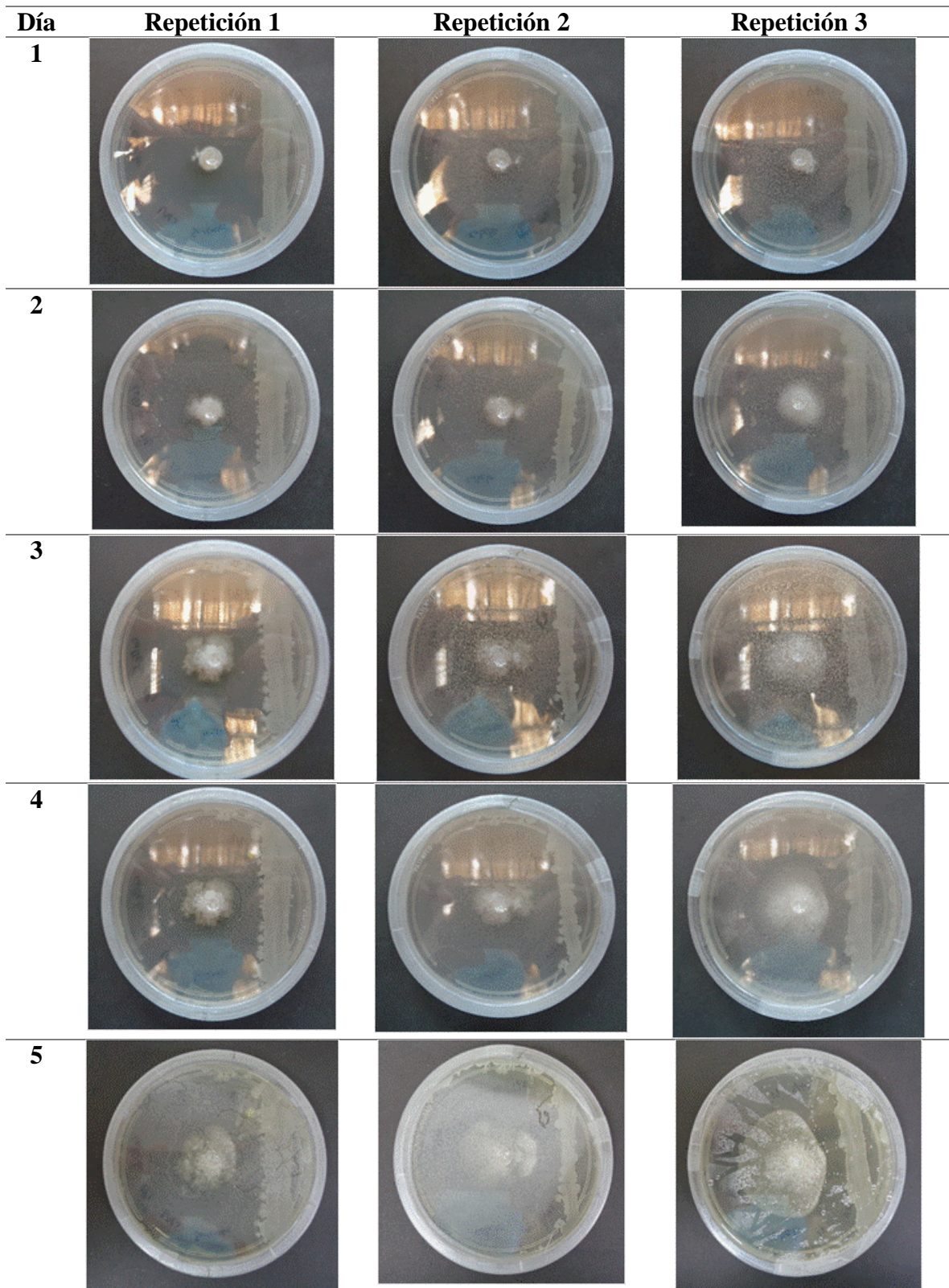


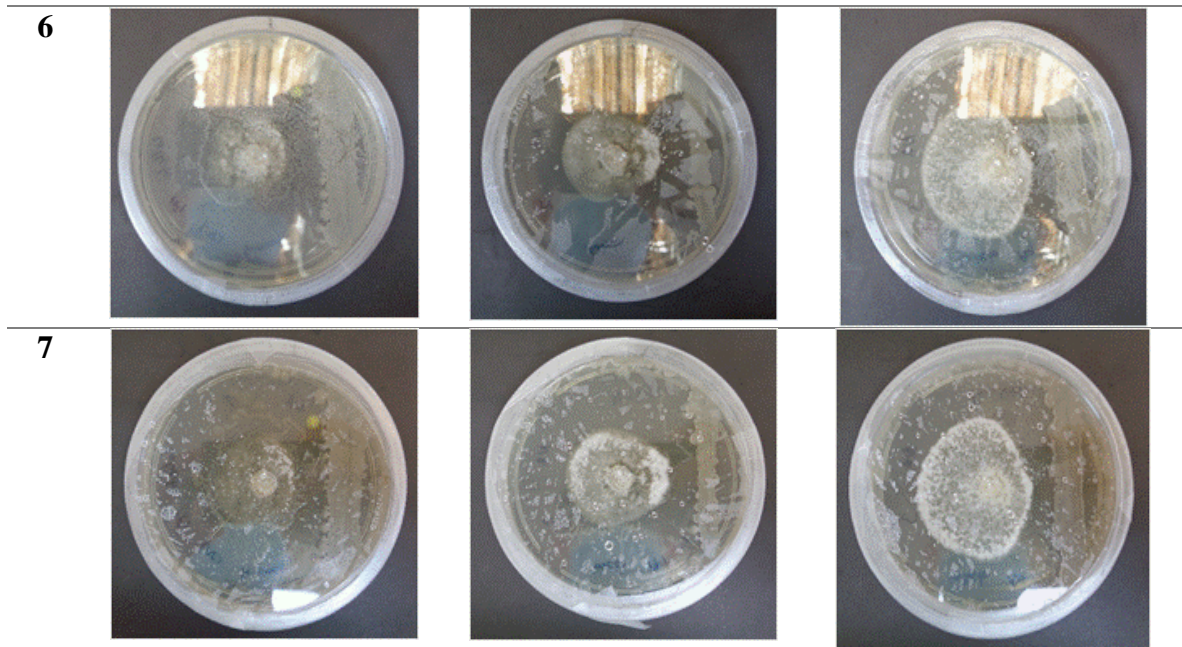
Cuadro 36. Antagonismo hongo contra bacteria, organismos compitiendo: *Colletotrichum* sp. vrs. BM, en medio PDA

Día	Repetición 1	Repetición 2	Repetición 3
1			
2			
3			

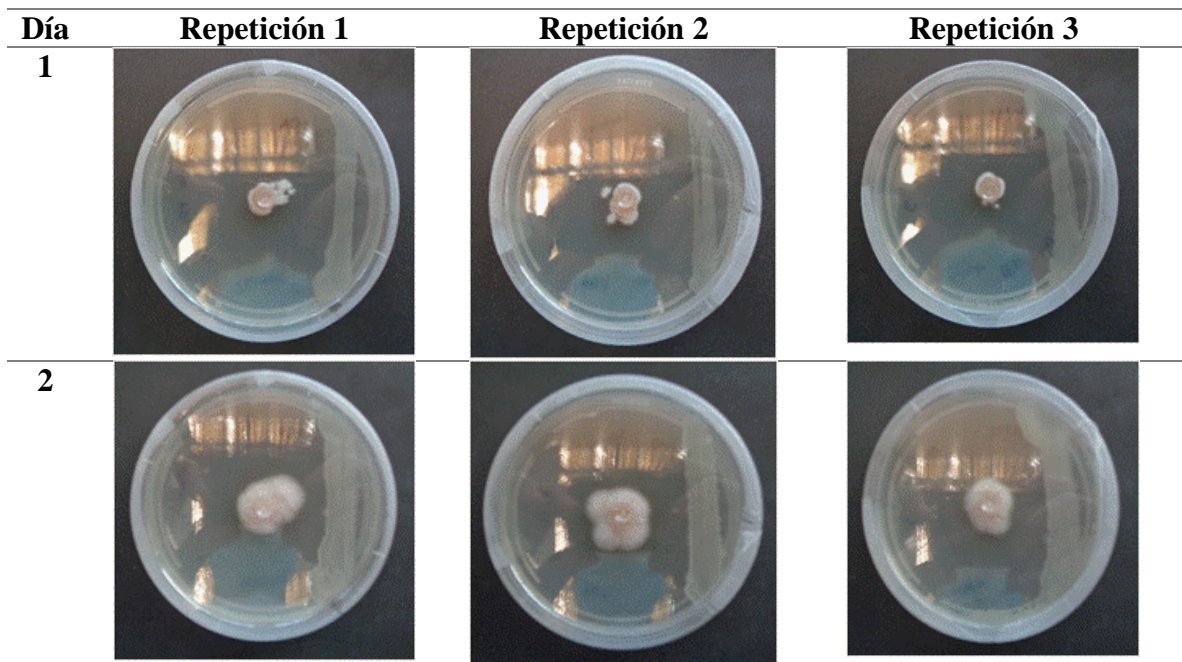


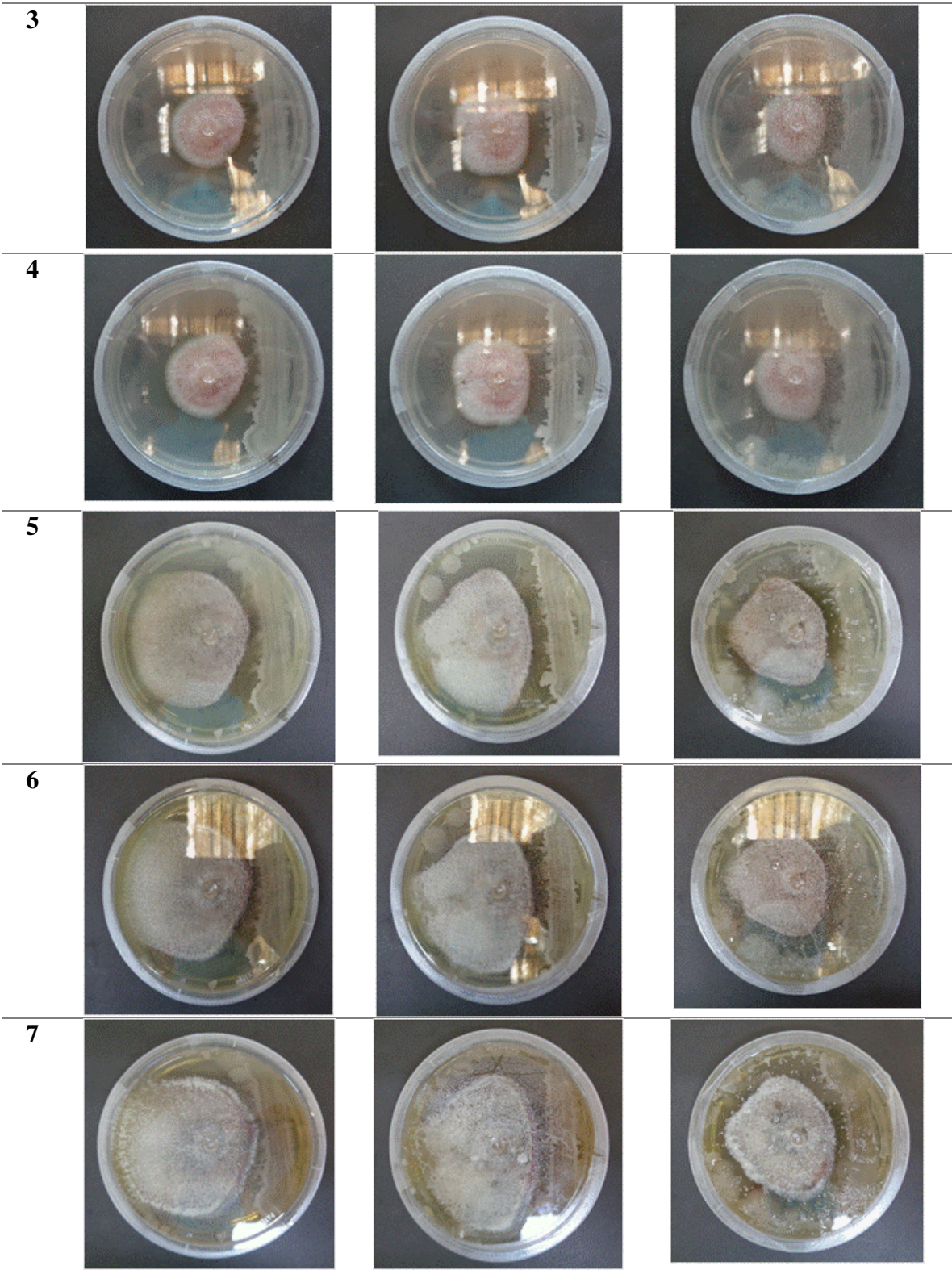
Cuadro 37. Antagonismo hongo contra bacteria, organismos compitiendo: *Colletotrichum* sp. vrs. Serenade, en medio NA.



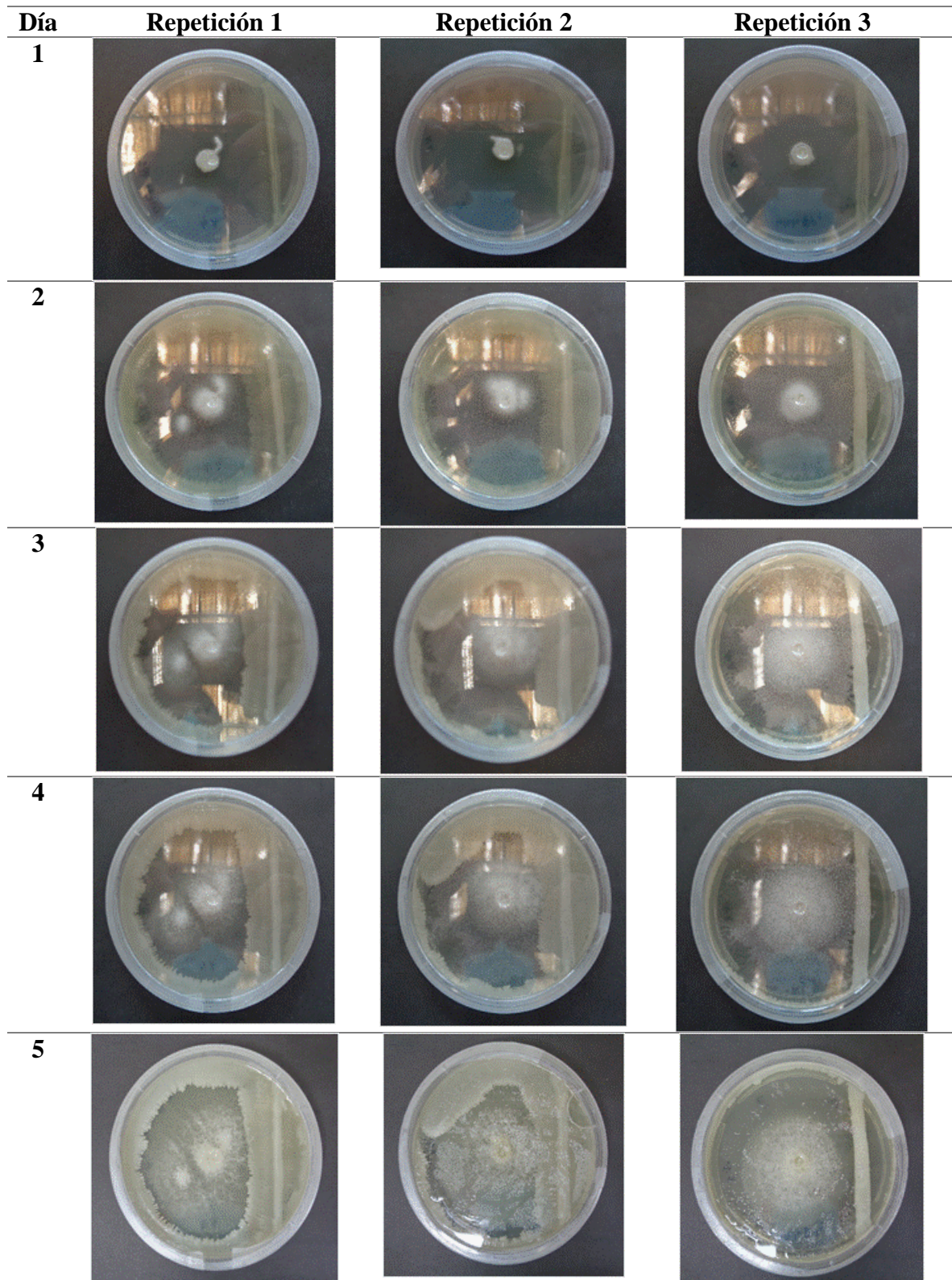


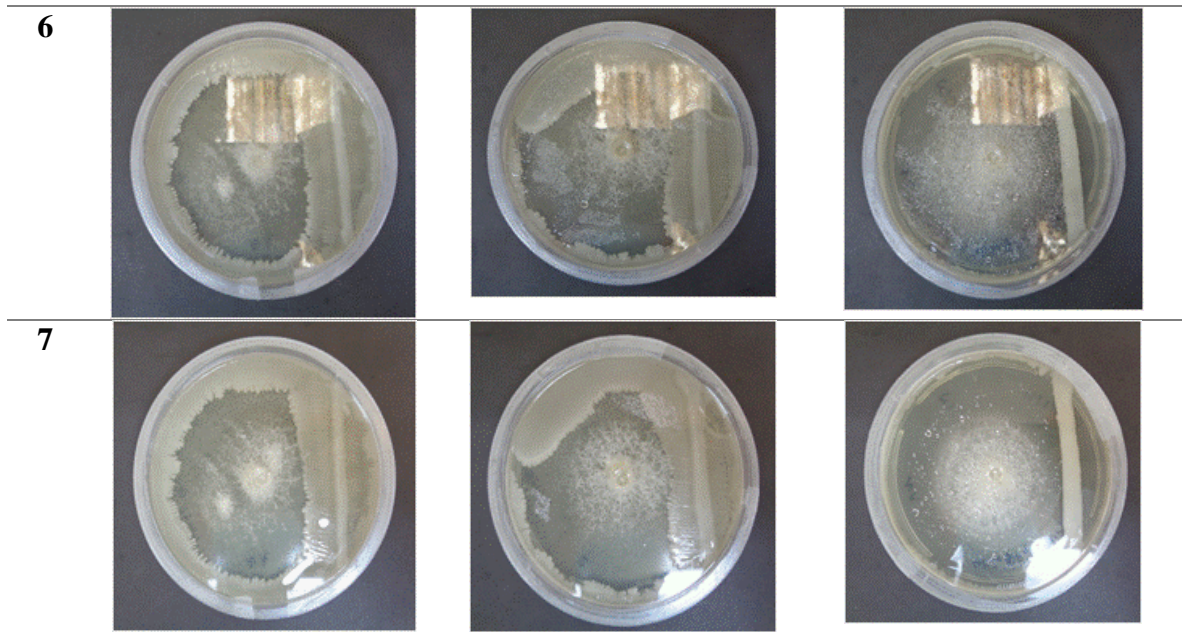
Cuadro 38. Antagonismo hongo contra bacteria, organismos compitiendo: *Colletotrichum sp.* vrs. Serenade, en medio PDA.



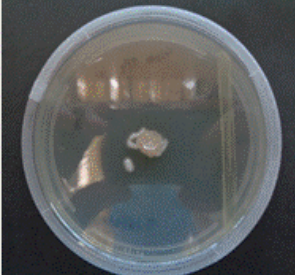
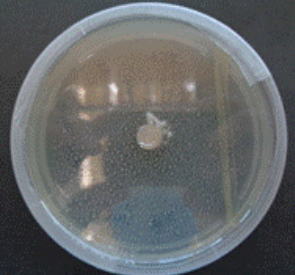
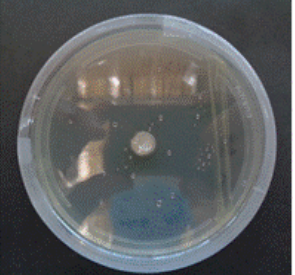
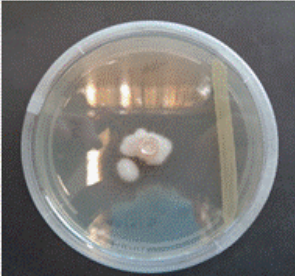
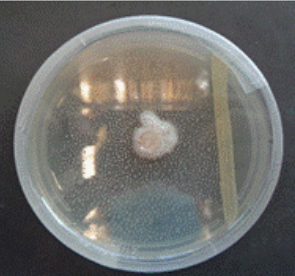
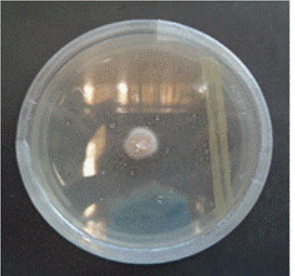
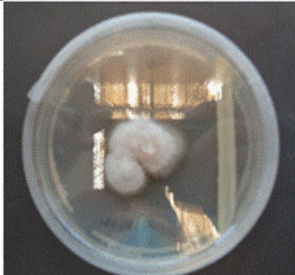
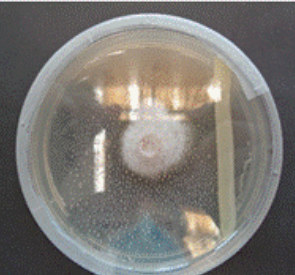
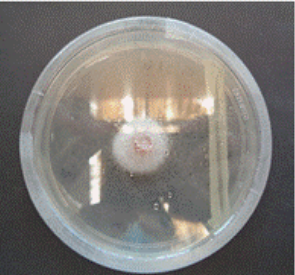


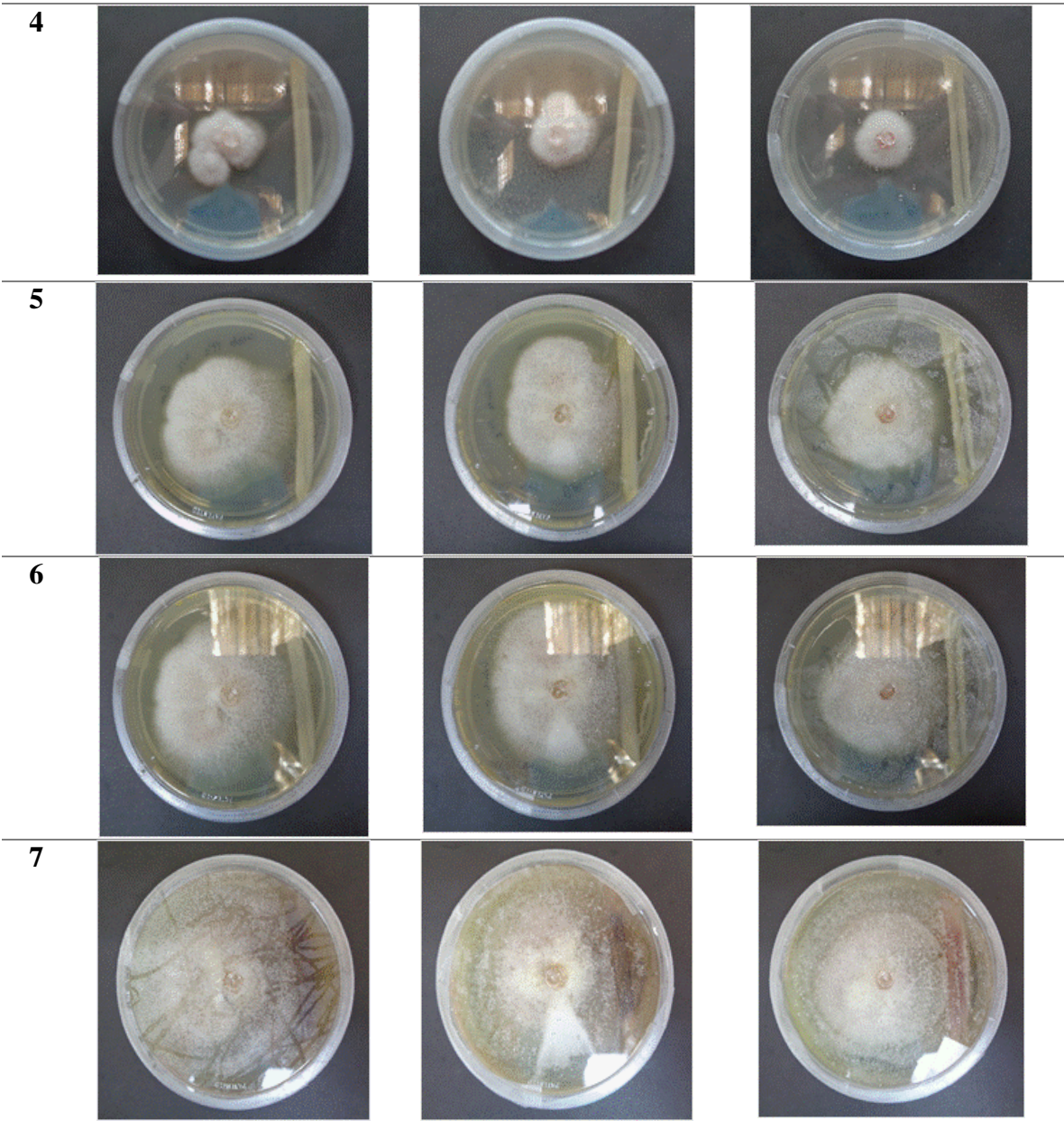
Cuadro 39. Antagonismo hongo contra bacteria, organismos compitiendo: *Fusarium solani* vs. BM, en medio NA.



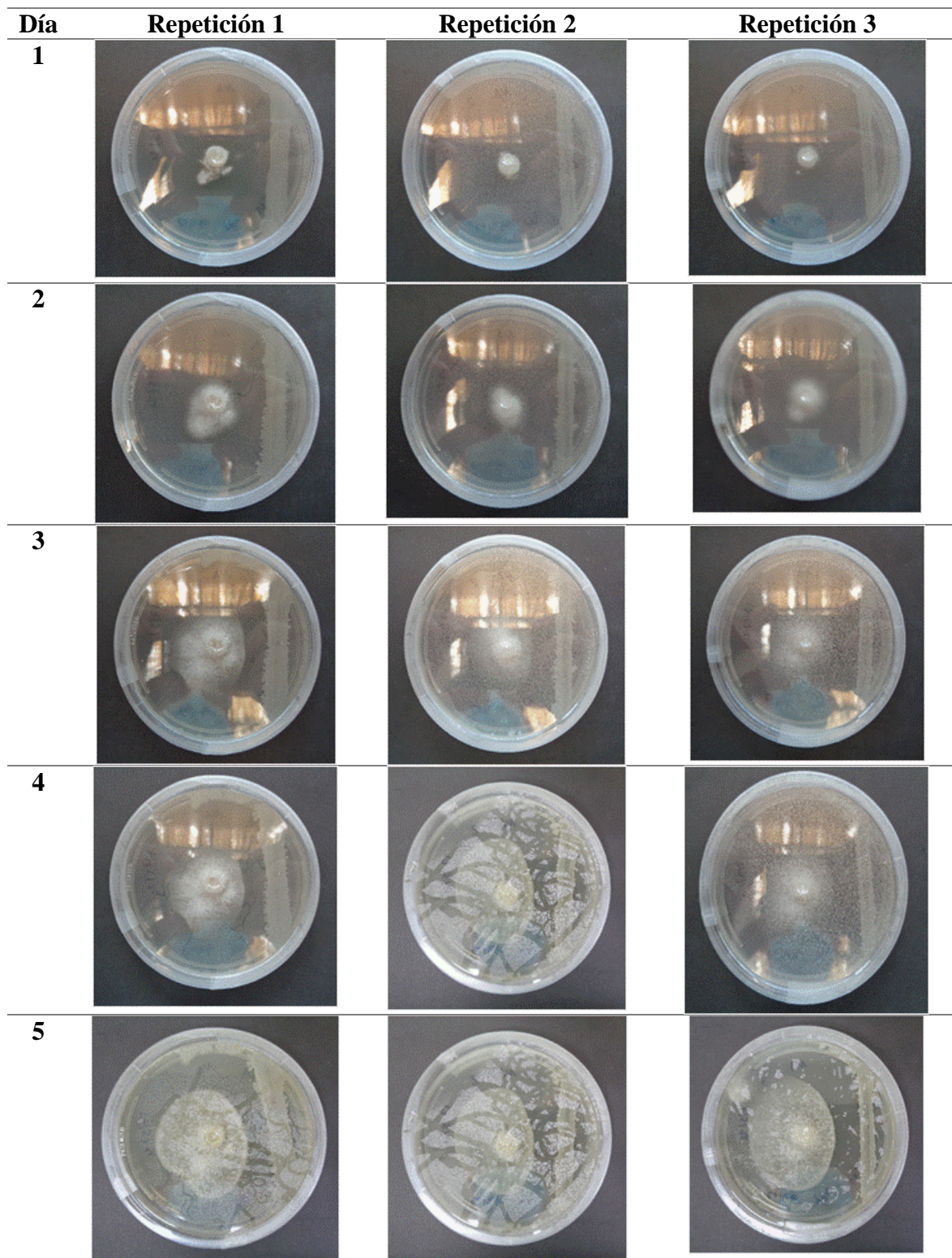


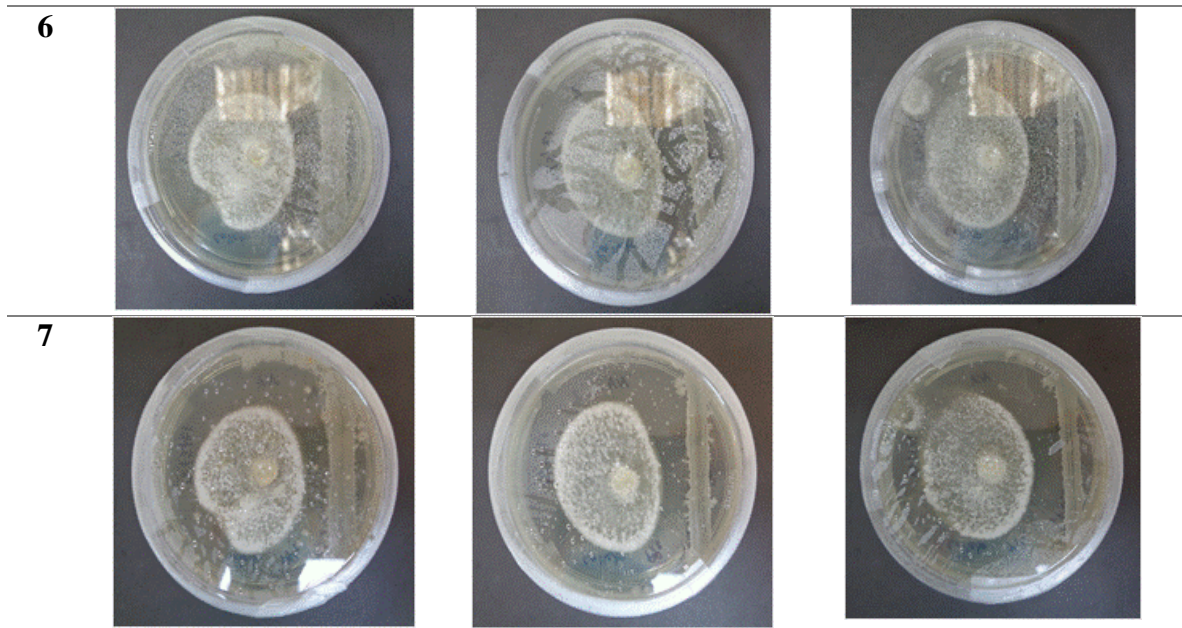
Cuadro 40. Antagonismo hongo contra bacteria, organismos compitiendo: *Fusarium solani* vs. BM, en medio PDA.

Día	Repetición 1	Repetición 2	Repetición 3
1			
2			
3			

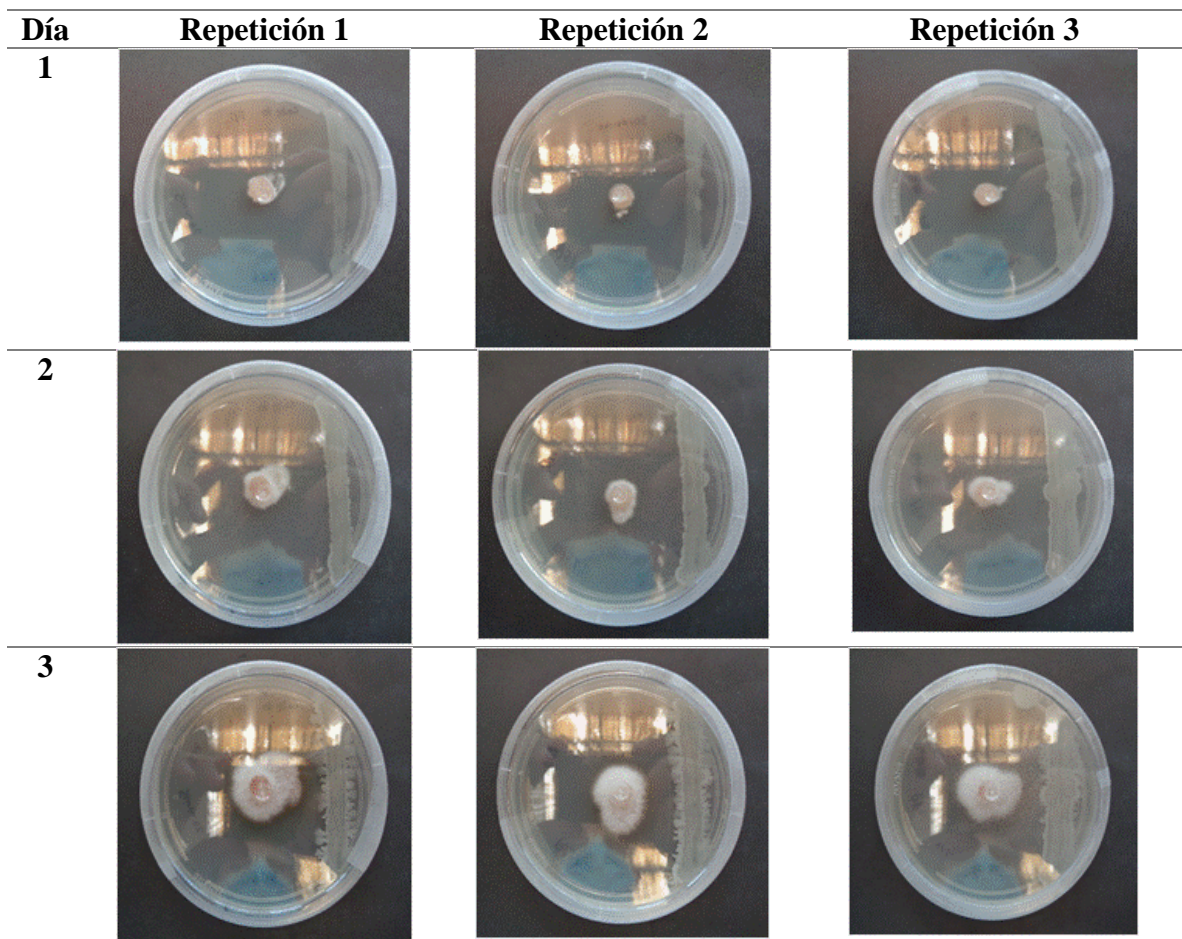


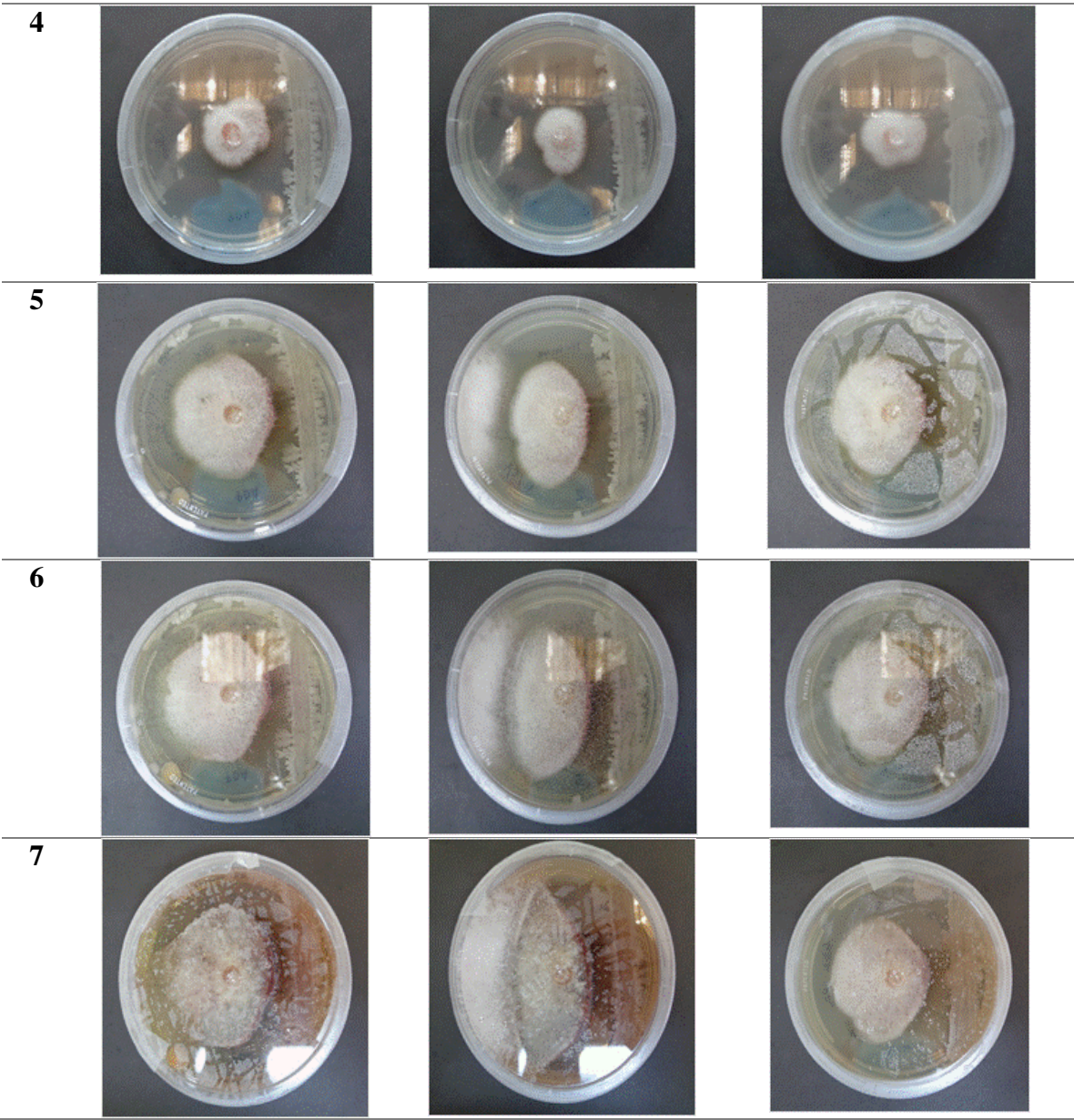
Cuadro 41. Antagonismo hongo contra bacteria, organismos compitiendo: *Fusarium solani* vs. Serenade, en medio NA.











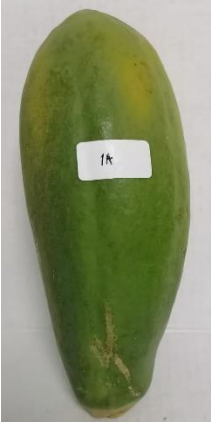





Cuadro 42. Antagonismo hongo contra bacteria, organismos compitiendo: *Fusarium solani* vs. Serenade, en medio PDA.



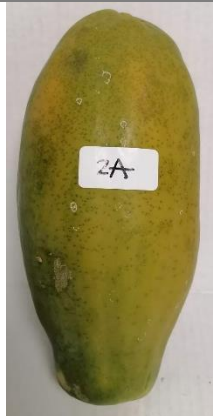


Parte IX. Fase 3 de la metodología: Pruebas en frutos

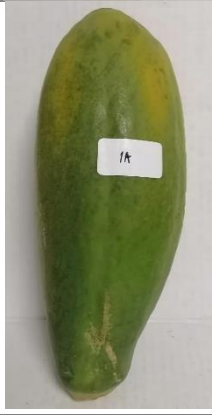
Cuadro 43. Vida útil de papayas con tratamiento de BM® que se mantuvieron en temperatura de refrigeración y ambiente

Días	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 4	Muestra 5	Muestra 6
1	 A papaya sample labeled 1A, showing a green base with a small yellow-orange spot at the top.	 A papaya sample labeled 2A, showing a green base with a larger yellow-orange spot at the top.	 A papaya sample labeled 3A, showing a green base with a yellow-orange spot at the top.	 A papaya sample labeled 4A, showing a green base with a yellow-orange spot at the top.	 A papaya sample labeled 5A, showing a green base with a yellow-orange spot at the top.	 A papaya sample labeled 6A, showing a green base with a yellow-orange spot at the top and a small white lesion.
2	 A papaya sample labeled 1A, showing a green base with a small yellow-orange spot at the top.	 A papaya sample labeled 2A, showing a green base with a larger yellow-orange spot at the top.	 A papaya sample labeled 3A, showing a green base with a yellow-orange spot at the top.	 A papaya sample labeled 4A, showing a green base with a yellow-orange spot at the top.	 A papaya sample labeled 5A, showing a green base with a yellow-orange spot at the top.	 A papaya sample labeled 6A, showing a green base with a yellow-orange spot at the top.

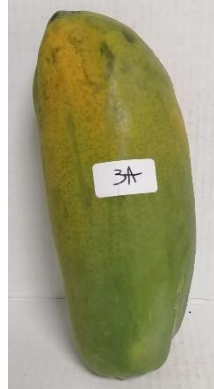
3



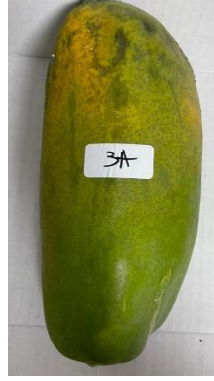
4



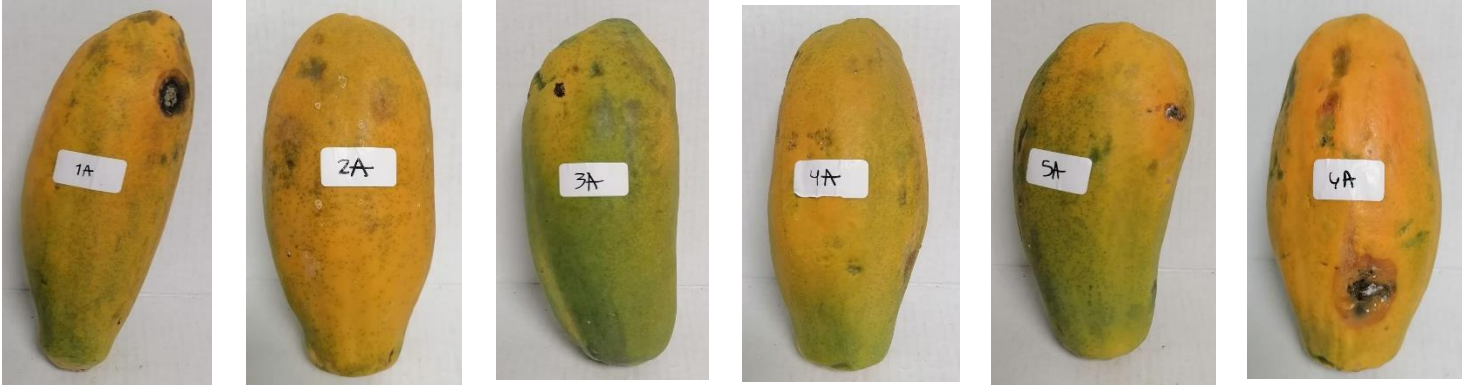
5



6



7



8



9







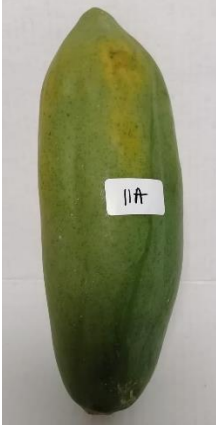


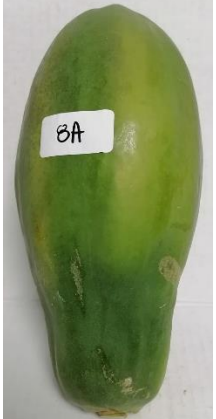
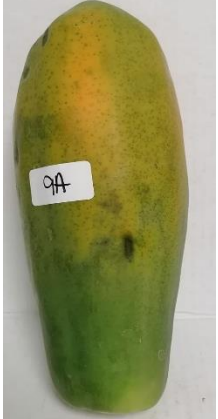

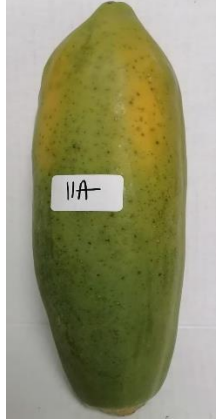

10



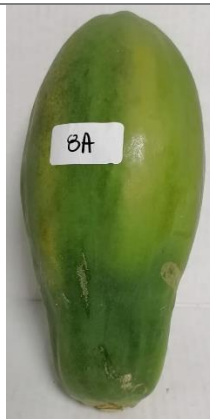
11



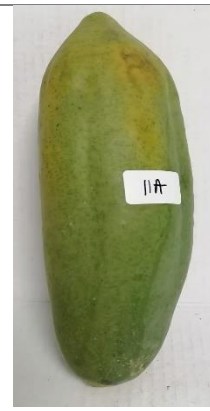
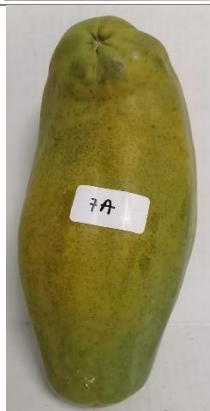
Cuadro 44. Vida útil de papayas con tratamiento de BM® que estuvieron en refrigeración

Días	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 4	Muestra 5	Muestra 6
1	 A papaya sample labeled 7A, showing a green to yellowish-green color.	 A papaya sample labeled 8A, showing a green to yellowish-green color.	 A papaya sample labeled 9A, showing a green to yellowish-green color.	 A papaya sample labeled 10A, showing a green to yellowish-green color.	 A papaya sample labeled 11A, showing a green to yellowish-green color.	 A papaya sample labeled 12A, showing a green to yellowish-green color.
2	 A papaya sample labeled 7A, showing a green to yellowish-green color.	 A papaya sample labeled 8A, showing a green to yellowish-green color.	 A papaya sample labeled 9A, showing a green to yellowish-green color.	 A papaya sample labeled 10A, showing a green to yellowish-green color.	 A papaya sample labeled 11A, showing a green to yellowish-green color.	 A papaya sample labeled 12A, showing a green to yellowish-green color.

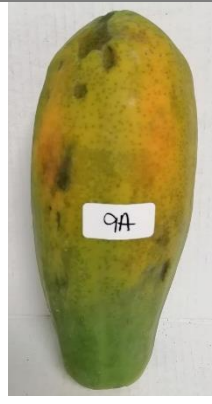
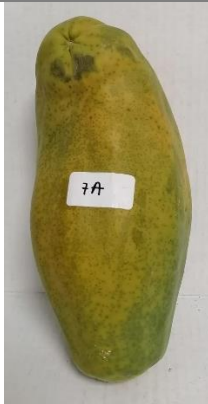
3



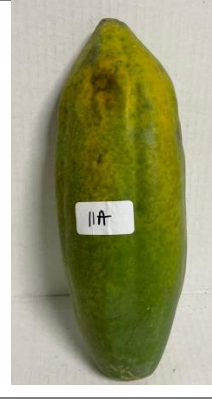
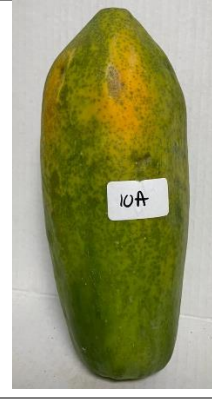
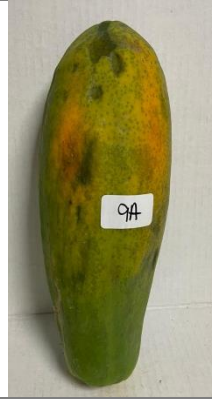
4



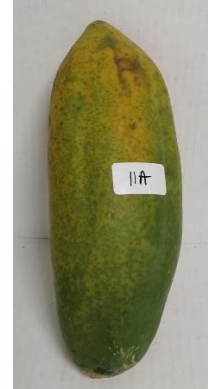
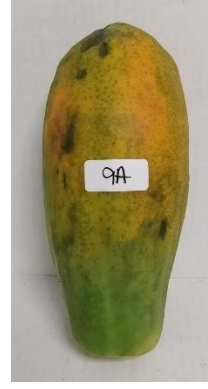
5



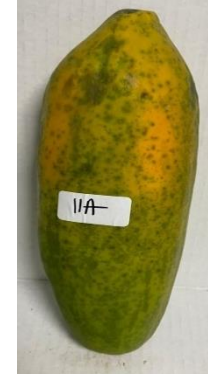
6



7



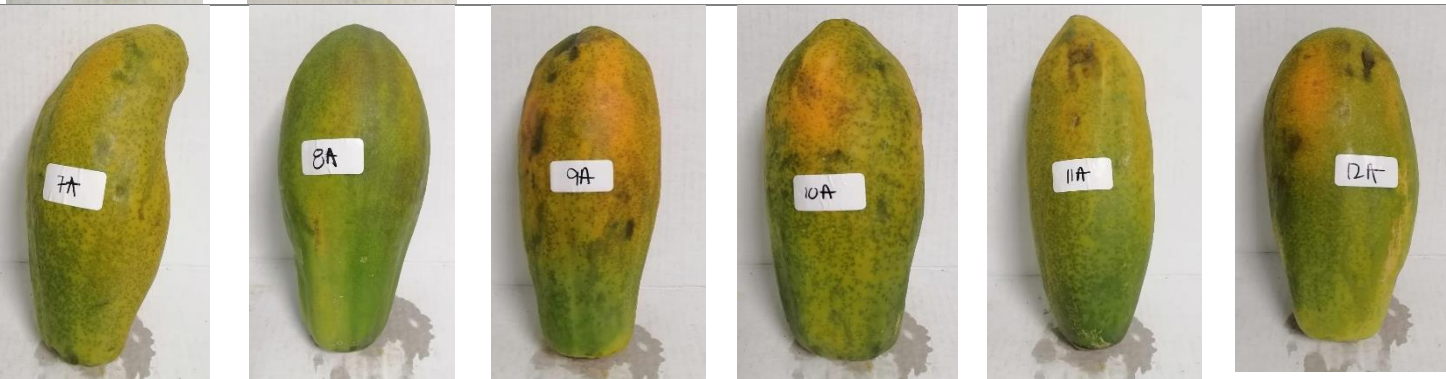
8



9



10



11



12



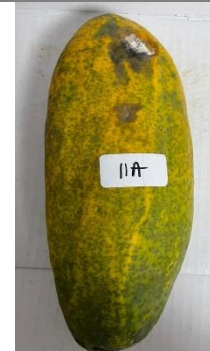
13



14




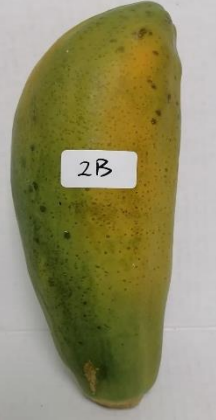




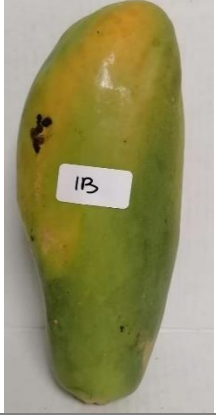
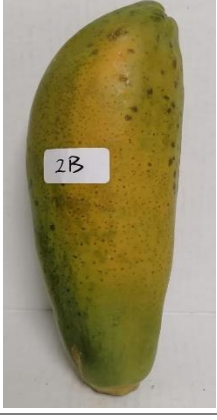

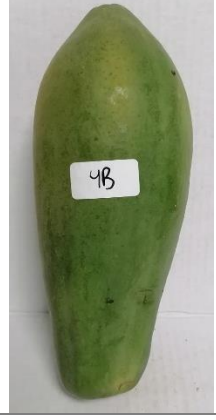


15



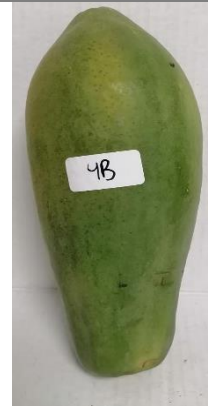
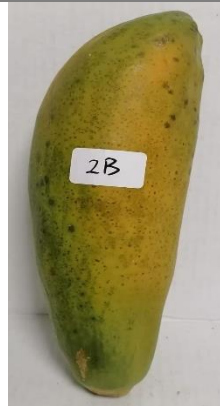
16



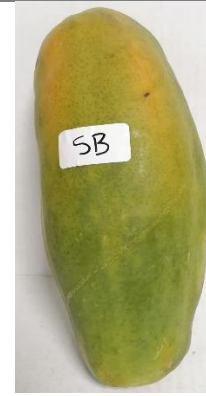
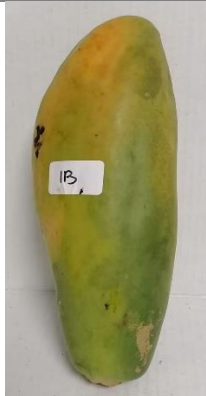
Cuadro 45. Vida útil de papayas con tratamiento de Serenade® que se mantuvieron en temperatura de refrigeración y ambiente

Días	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 4	Muestra 5	Muestra 6
1	 A papaya sample labeled '1B' showing a green base with yellow-orange ripening at the top.	 A papaya sample labeled '2B' showing a green base with yellow-orange ripening at the top.	 A papaya sample labeled '3B' showing a green base with yellow-orange ripening at the top.	 A papaya sample labeled '4B' showing a green base with yellow-orange ripening at the top.	 A papaya sample labeled '5B' showing a green base with yellow-orange ripening at the top.	 A papaya sample labeled '6B' showing a green base with yellow-orange ripening at the top.
2	 A papaya sample labeled '1B' showing a green base with yellow-orange ripening at the top.	 A papaya sample labeled '2B' showing a green base with yellow-orange ripening at the top.	 A papaya sample labeled '3B' showing a green base with yellow-orange ripening at the top.	 A papaya sample labeled '4B' showing a green base with yellow-orange ripening at the top.	 A papaya sample labeled '5B' showing a green base with yellow-orange ripening at the top.	 A papaya sample labeled '6B' showing a green base with yellow-orange ripening at the top.

3



4



5



6



7



8



9



10



11



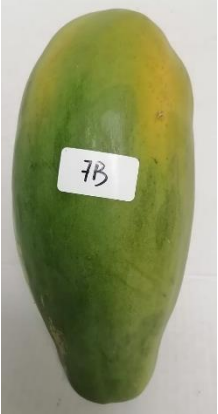

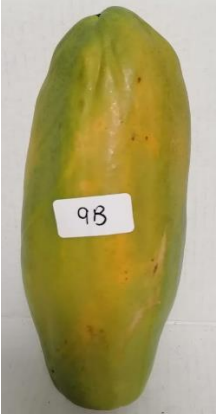
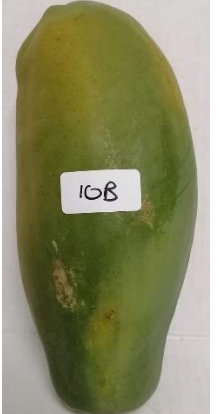


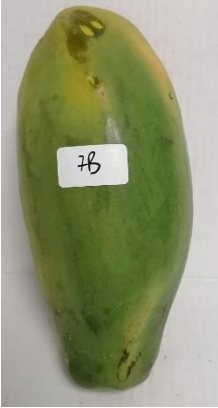

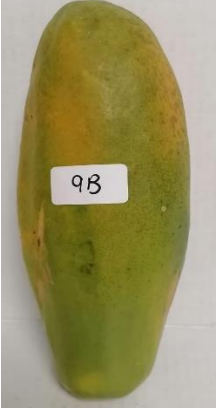



12



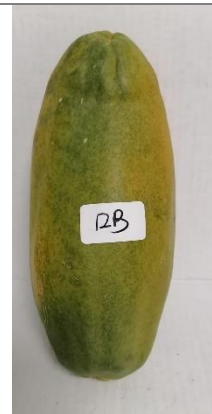
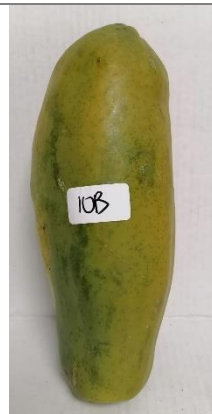
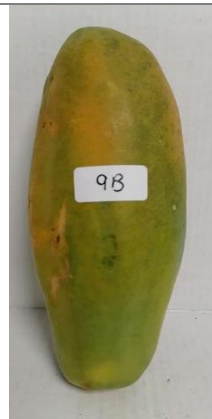
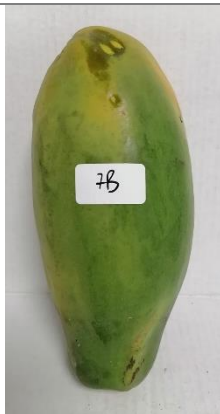
13



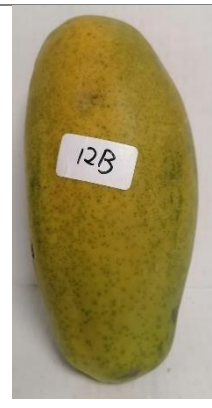
Cuadro 46. Vida útil de papayas con tratamiento de Serenade® que estuvieron en refrigeración

Días	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 4	Muestra 5	Muestra 6
1	 A green papaya with a small yellowish spot on the right side. A white label with '7B' is attached to the middle.	 A green papaya with a larger yellowish spot on the right side. A white label with '8B' is attached to the middle.	 A green papaya with a yellowish spot on the right side. A white label with '9B' is attached to the middle.	 A green papaya with a yellowish spot on the right side. A white label with '10B' is attached to the middle.	 A green papaya with a yellowish spot on the right side. A white label with '11B' is attached to the middle.	 A green papaya with a yellowish spot on the right side. A white label with '12B' is attached to the middle.
2	 A green papaya with a yellowish spot on the right side. A white label with '7B' is attached to the middle.	 A green papaya with a yellowish spot on the right side. A white label with '8B' is attached to the middle.	 A green papaya with a yellowish spot on the right side. A white label with '9B' is attached to the middle.	 A green papaya with a yellowish spot on the right side. A white label with '10B' is attached to the middle.	 A green papaya with a yellowish spot on the right side. A white label with '11B' is attached to the middle.	 A green papaya with a yellowish spot on the right side. A white label with '12B' is attached to the middle.

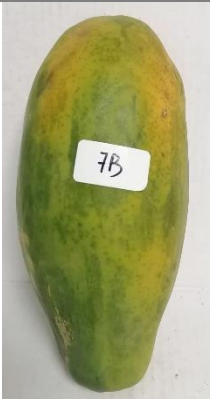
3



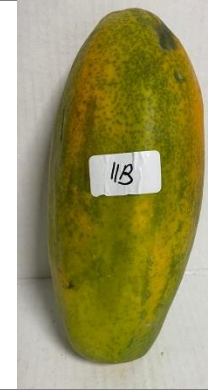
4



5



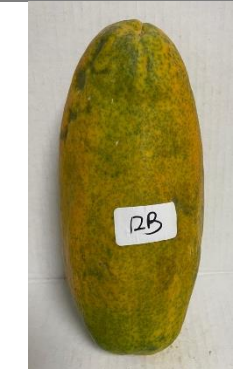
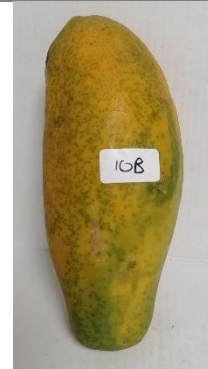
6



7



8



9



10



11



12



13



14



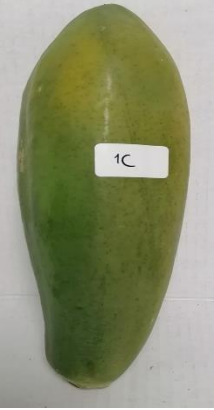

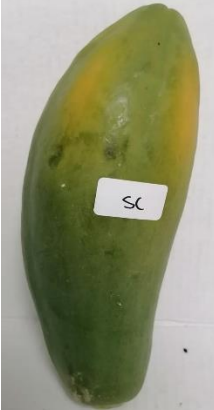
15



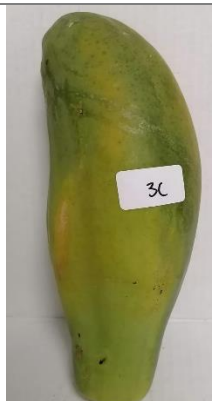
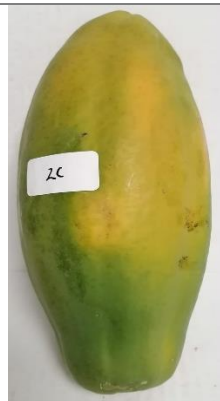
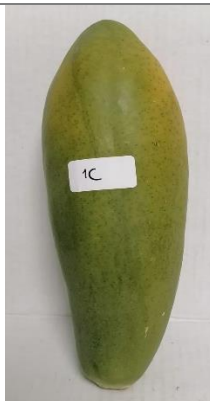
16



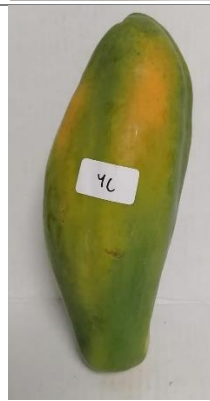
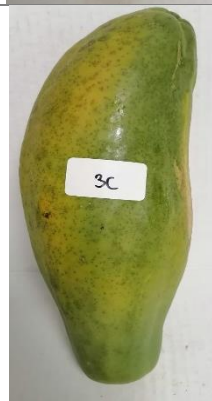
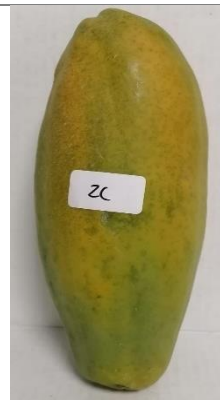
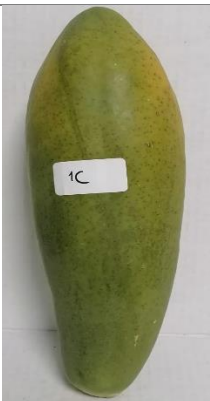
Cuadro 47. Vida útil de papayas sin tratamiento que se mantuvieron en temperatura de refrigeración y temperatura ambiente

Días	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 4	Muestra 5	Muestra 6
1						

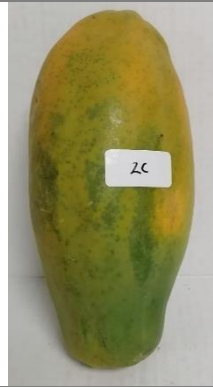
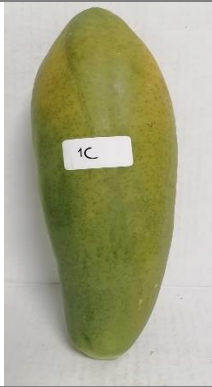
2



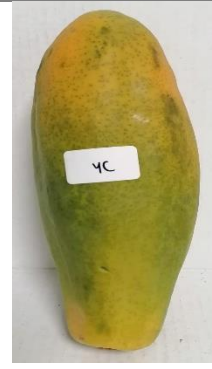
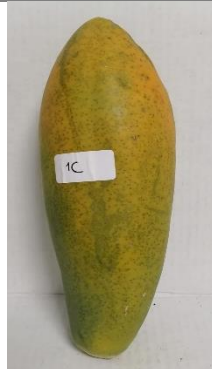
3



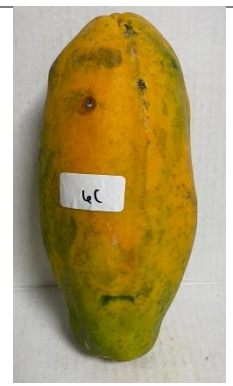
4



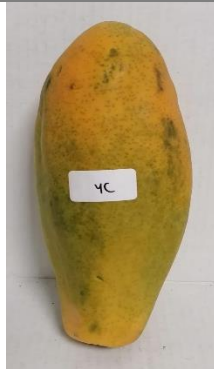
5



6



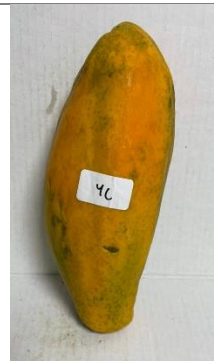
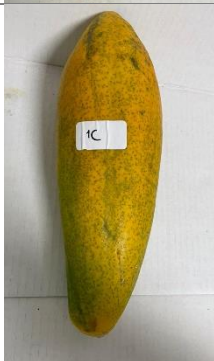
7



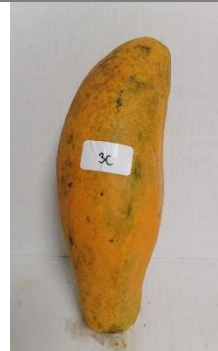
8



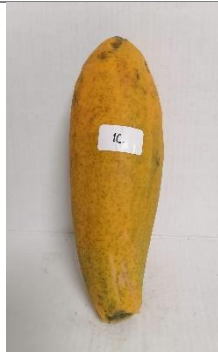
9



10



11



12



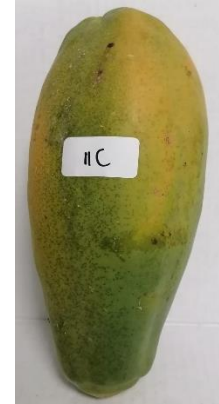
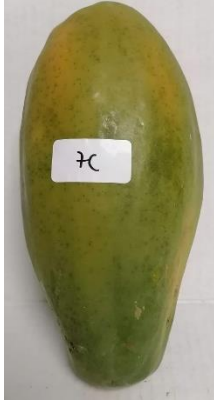
13



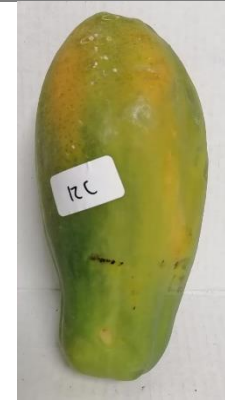
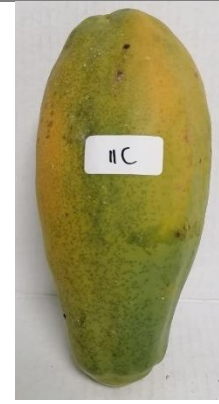
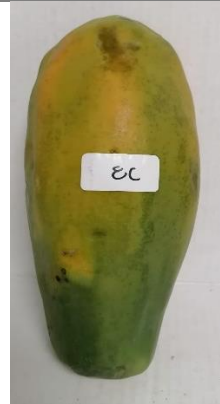
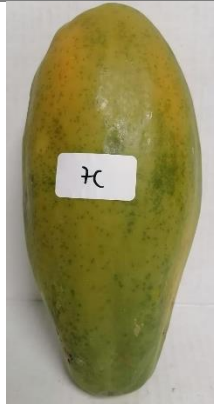
Cuadro 48. Vida útil de papayas sin tratamiento que estuvieron en refrigeración

Días	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 4	Muestra 5	Muestra 6
1	A papaya sample, green and yellow, labeled 7C.	A papaya sample, green and yellow, labeled 8C.	A papaya sample, green and yellow, labeled 9C.	A papaya sample, green and yellow, labeled 10C.	A papaya sample, green and yellow, labeled 11C.	A papaya sample, green and yellow, labeled 12C.

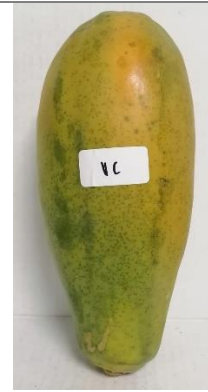
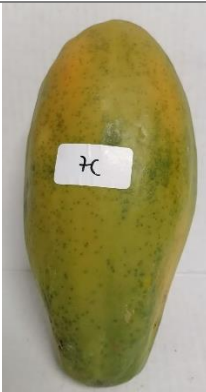
2



3



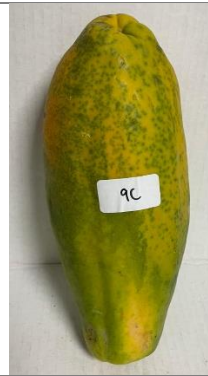
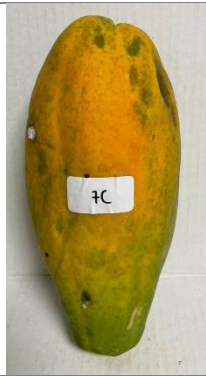
4



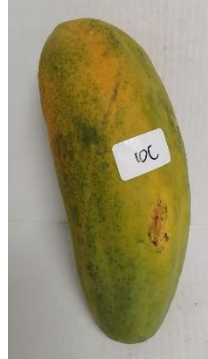
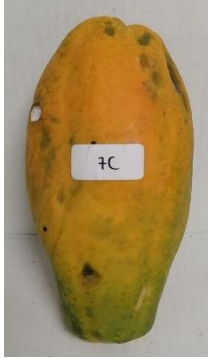
5



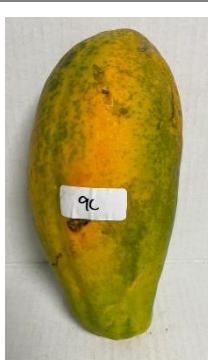
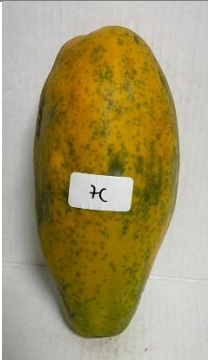
6



7



8



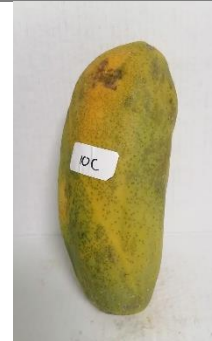
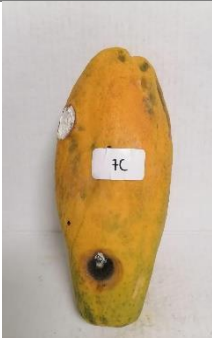
9



10



11



12



13



14



15



16



Cuadro 49. Días de vida útil de cada muestra de papaya tratada con BM®, Serenade® y sin tratamiento (testigo) almacenadas a temperatura ambiente y en refrigeración

Días seguidos	T ambiente			Refrigeración		
	Muestra de papaya	BM	Serenade	Testigo	BM	Serenade
Papaya 1	5	9	12	11	10	9
Papaya 2	8	7	10	15	15	7
Papaya 3	10	9	11	11	10	10
Papaya 4	8	12	10	13	12	13
Papaya 5	8	8	7	12	11	12
Papaya 6	5	10	7	13	15	13
Promedio	7.3	9.2	9.5	12.5	12.2	10.7
Varianza	3.9	3.0	4.3	2.3	5.4	5.9

Cuadro 50. Análisis de datos de papayas almacenadas a temperatura ambiente

RESUMEN	BM	Serenade	Testigo	Total
Cuenta	6	6	6	18
Suma	44	55	57	156
Promedio	7.3	9.2	9.5	8.7
Varianza	3.9	3.0	4.3	4.2

Cuadro 51. Análisis de datos de papayas almacenadas en refrigeración

RESUMEN	BM	Serenade	Testigo	Total
Cuenta	6	6	6	18
Suma	75	73	64	212
Promedio	12.5	12.2	10.7	11.8
Varianza	2.3	5.4	5.9	4.7

Cuadro 52. Cuantificación de totales de datos de los grupos de variables temperatura y tratamiento

RESUMEN	BM	Serenade	Testigo
Cuenta	12	12	12
Suma	119	128	121
Promedio	9.9	10.7	10.1
Varianza	10.1	6.2	5.0

Cuadro 53. Análisis de varianza de 2 factores (Temperatura y tratamiento) para determinar si existe una diferencia significativa en la vida útil de las papayas de los grupos

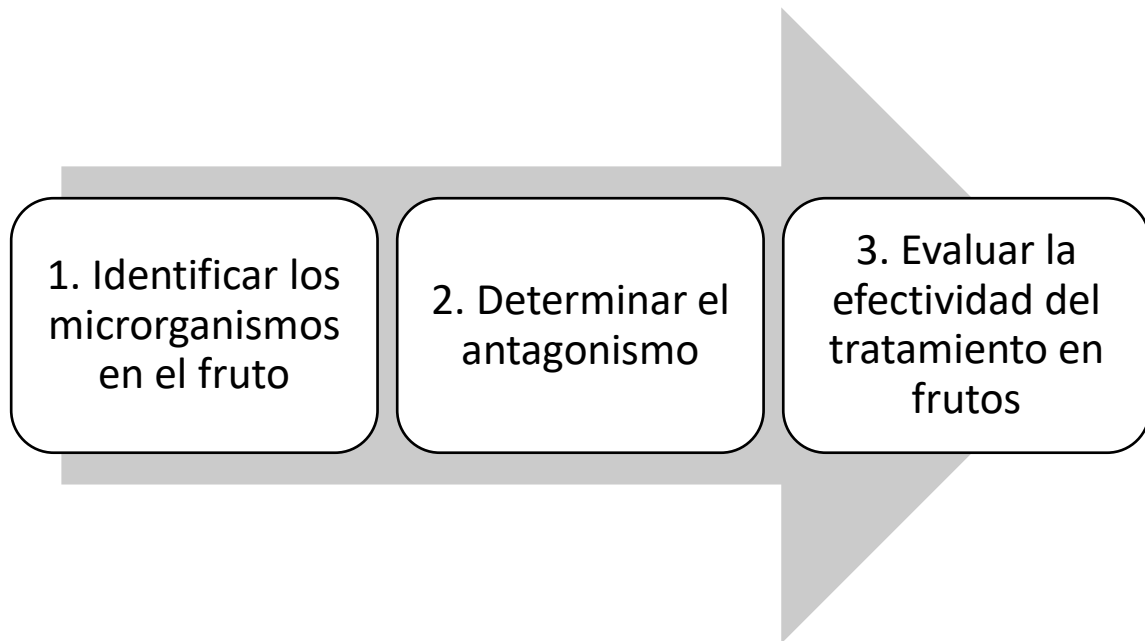
<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrado</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Temperatura	87.1	1	87.1	21.2	0.0001	4.2
Tratamiento	3.7	2	1.9	0.5	0.6402	3.3
Interacción	24.1	2	12.0	2.9	0.0691	3.3
Dentro del grupo	123.3	30	4.1			
Total	238.2	35				

Parte X. Metodología a seguir si los microorganismos usados resultan ser antagonistas de los fitopatógenos presentes en frutos

Figura 14. Metodología para determinar el grado de antagonismo de un bio controlador en frutos

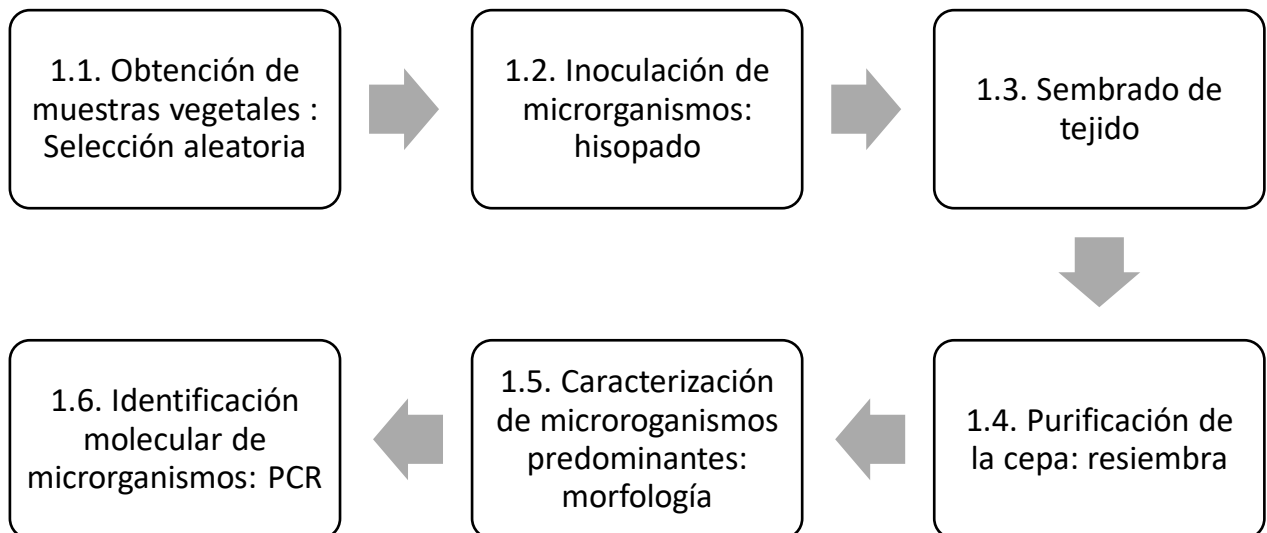


Figura 15. Fases de la metodología



A. Fase de identificación de microorganismos en el fruto

Figura 16. Metodología para la fase de identificación de microorganismos en el fruto



1. **Obtención de muestras vegetales**

Realizar un muestreo a los lotes de interés del fruto. Considera factores como maduración, lugar de almacenamiento, temperatura de almacenamiento y manipulación.

Documentar la apariencia de los frutos almacenados en condiciones controladas durante su vida útil para empezar a documentar los defectos de calidad en la postcosecha. Para el procedimiento de documentación y características del fruto ver parte I, de la sección de Anexos.

2. **Inoculación de microorganismo**

a. **Hisopado**

Hisopar los frutos en un cuadrado de 5x5 cm, seleccionando áreas en específico donde no se tengan manifestaciones de crecimiento de microorganismos, daños en la carnaza o pudriciones. Utilizar un molde de 5x5 cm para delimitar. (Para el procedimiento de hisopado y preparación de insumos ver parte II, sección de anexos)

b. **Sembrado del inóculo del hisopado**

Trabajar en triplicado, sembrando 3 unidades en cada medio seleccionado para la experimentación. Medios de trabajo:

• **PCA:** para recuento de bacterias. Preparación y utilización descrita en “Agar para métodos estándar PCA” (Condalab, 2019)

• **Sabouraud:** para recuento de hongos. Preparación y utilización descrita en: “SABOURAUD AGAR” (BIO RAD, 2019)

3. **Sembrado de tejido**

3 partes de cada fruto deben ser sembradas en una sola caja de Petri:

- Pedúnculo del fruto
- Parte con heridas visibles en la carnaza
- Parte de la carnaza sin heridas aparentes.

Documentar el crecimiento que se obtuvo en cada caja de agar en el día 4 y 8. (Para el procedimiento de sembrado de tejido ver parte III, sección de Anexos)

4. **Purificación de la cepa**

a. Al finalizar el periodo de incubación mediante el método de resiembra obtener un crecimiento individual de los microorganismos. Proceder como se indica en: “Técnicas de

aislamiento, identificación, selección de cepas de *Rhizobium*, *Azospirillum* y producción de inoculantes.” (Morote & Palomino, 2019) Se sembrará en el agar Sabouraud para recuento de hongos y en Agar PCA para bacterias.

5. Caracterizar microorganismos predominantes

a. Identificar los microorganismos aislados mediante morfología comparando con la base de datos de referencia: Blastn y Blastx (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Si algunos microorganismos no pueden ser identificados deben ser descartados con la identificación molecular.

6. Identificación molecular de microorganismos

a. Para la identificación de la especie del microorganismo se usará PCR. Utilizar procedimiento descrito en: “Identificación molecular de hongos aislados de tejidos de fríjol con síntomas de antracnosis.” (Berrouet, Sánchez, & Montoya, 2014).

Extracción de ADN, amplificación por PCR, secuenciación y análisis de identidad del marcador ITS1-5.8S-ITS2 (ribosomal internal transcribed spacer) para hongos y del marcador ARNr 16S para bacterias. Para el análisis de identidad de la secuencia de ADN obtenida, se utilizó la base de datos de nucleótidos del NCBI utilizando la herramienta Basic Local Alignment Search Tool para nucleótidos – BLAST®N 2.8.0+ (National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine); excluyendo muestras no cultivadas/ambientales, optimizada para secuencias altamente similares (megablast).

Proceder en el antagonismo con los microorganismos que sean fitopatógenos identificados para el cultivo en cuestión.

B. Fase de antagonismo

Figura 17. Metodología para la fase de antagonismo completa



1. Conservación del Microorganismo fitopatógeno de interés

Cada microorganismo fitopatógeno de interés (aislado de la etapa anterior) debe almacenarse para tener las cepas de reserva y las cepas de trabajo.

2. Siembra de Antagonista en medio de cultivo

Dependerán las condiciones si es bacteria u hongo el microorganismo en cuestión. Para bacterias se tienen los siguientes estándares: Como se describe en la sección 1.2.2. utilizando Agar Natural, trabajando en triplicado. Cultivar en aerobiosis a 25 ± 2 ° C durante 24 horas. Conservar imágenes del crecimiento de la bacteria para reconocerla en el antagonismo.

3. Pruebas *in vitro* de del posible antagonista contra el fitopatógeno

Evaluar el porcentaje de inhibición del crecimiento del microorganismo fitopatógeno por acción del antagonista.

Metodología de referencia para el procedimiento: “Contribución al estudio del control biológico del fusarium oxysporum, Rhizoctonia Solani y pythium sp. mediante diferentes especies de trichoderma.” (Arcos, Elias, & Antonio, 1984)

a. ¿Como evidenciar que es antagonista?

- Se muestran marcados halos de inhibición de bacterias contra el crecimiento del organismo competidor (Ver cuadro 25, parte VIII de

anexos). Una inhibición del 70% como mínimo. (Para la ecuación de cálculo de porcentaje de inhibición ver parte V, sección de anexos)

4. Determinación de concentración óptima de aplicación

Las pruebas de antagonismo se realizarán como se indica en la parte 2.3 con las siguientes modificaciones: como antagonista se utilizarán soluciones del antagonista empleando agua como diluyente, pueden utilizarse las siguientes concentraciones:

1 g/L	3 g/L	5 g/L	7 g/L	10 g/L
-------	-------	-------	-------	--------

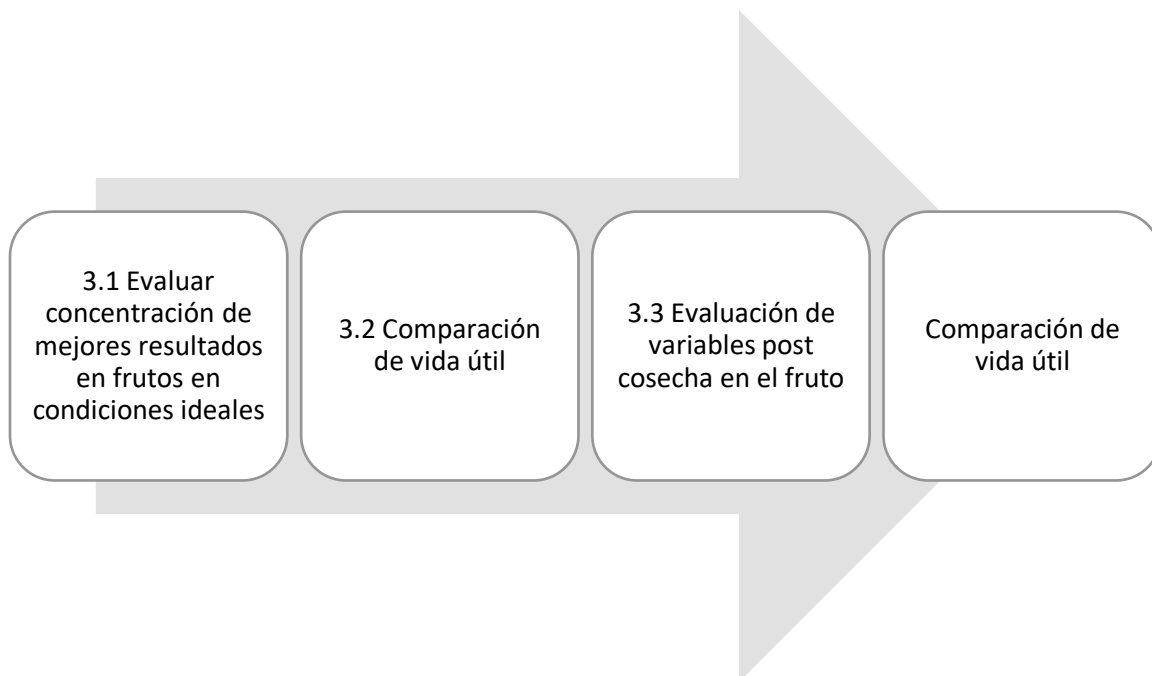
Las cajas Petri serán incubadas a 25 °C. Durante un período de 10 días, cada día se registrará el crecimiento de la colonia del fitopatógeno.

Utilizar un diseño experimental completamente al azar (DCA), con tres repeticiones por tratamiento. El testigo consistirá en siembras de solo el patógeno en el centro de cajas Petri. La unidad experimental consistirá en una caja Petri con fitopatógeno en presencia o ausencia del antagonista.

Determinar cuál es la concentración más baja que logra tener una acción inhibitoria para poder extrapolar el tratamiento a frutos. Un porcentaje mínimo de inhibición puede ser el 70% para proceder a las pruebas en frutos.

C. Pruebas en frutos

Figura 18. Metodología para la fase de pruebas en frutos completa



El mejor tratamiento de cada bio controlador (de BM® Y Serenade®) se procederán a probar en los frutos.

1. Evaluar la concentración con mejores resultados en frutos en condiciones ideales

Por aspersión humedecer de manera leve quince frutos con la concentración de antagonista elegida en la sección 2.4 Utilizar como control quince frutos sin rociar.

- Almacenar frutos los frutos a las mejores condiciones controladas dependiendo las exigencias de respiración y maduración. Analizar periódicamente con un examen visual de calidad (según los parámetros establecidos). En esta parte es vital dar las mejores condiciones para el experimento, aunque no sean las reales para los frutos.
- Medir la vida útil de los frutos (días en condiciones libres de defectos).

2. Comparación de Vida Útil

En los grupos de análisis:

- Papayas tratadas
- Papayas testigo

Con los datos de vida útil de la sección 3.1 determinar si hay una diferencia significativa entre cada tratamiento mediante un análisis estadístico de Anova de 1 factor con un porcentaje de error del 5%. También utilizar un análisis de diferencia de medias LSD para medir el porcentaje de diferencia. Si el antagonista resulta tener una diferencia significativa sobre la vida útil. Utilizar el tratamiento en la fase 3.3.

3. Evaluación de variables de la post cosecha en el tratamiento

Por aspersión humedecer de manera leve 30 frutos con el tratamiento y trabajar también con 30 frutos testigo.

Esta parte de la experimentación se introducen las variables de almacenamiento. Se evaluará si el tratamiento seguirá siendo efectivo a pesar de las condiciones de manejo post cosecha habituales. Para la selección de los frutos ver la parte I, sección de Anexos.



- Medir vida útil como se describe en la parte 3.1.

4. Comparación de Vida Útil

Determinar si hay una diferencia significativa de la vida útil de los frutos utilizando un análisis estadístico de Anova de 1 factor con un porcentaje de error del 5%. En base a los resultados tomar las medidas adecuadas.

Parte XI. Análisis visual e imágenes importantes durante la investigación

Cuadro 54. Parámetros de falta de calidad de la merma de producción

Parámetro	Daño mecánico	Cicatrices
Apariencia		

Cuadro 55. Papaya Kaya paya® en supermercados de Guatemala



