



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE QUERETARO

FACULTAD DE QUIMICA



DEPARTAMENTO DE INVESTIGACION Y POSGRADO EN ALIMENTOS
(DIPA)

PROGRAMA DE POSGRADO EN ALIMENTOS DEL CENTRO DE LA REPUBLICA
(PROPAC)

USO DE ETANOL, ACETONA, β -IONONA, 2-NONANONA, HEXANAL Y
HEXANOL PARA EL CONTROL DE ENFERMEDADES POSCOSECHA DE
GUAYABA (*Psidium guajava* L.)

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA
DE ALIMENTOS

PRESENTA:

GUSTAVO CORNEJO PEREZ

QUERETARO, QRO., JUNIO DE 1997

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE QUERETARO

FACULTAD DE QUIMICA

MAESTRIA EN CIENCIA Y TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

USO DE ETANOL, ACETONA, β -IONONA, 2-NONANONA, HEXANAL Y HEXANOL
PARA EL CONTROL DE ENFERMEDADES POSCOSECHA DE GUAYABA

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

Presenta

JOSE GUSTAVO GORNFIO PEREZ

Dirigido por

DR. EDMUNDO MERCADO SILVA

SINODALES

DR. EDMUNDO MERCADO SILVA

Presidente

DR. SALVADOR PEREZ GONZALEZ

Secretario

DRA. MARITA CANTWELL

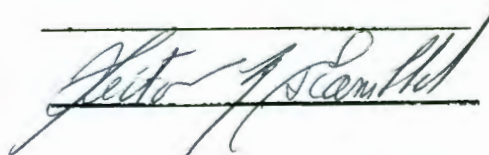
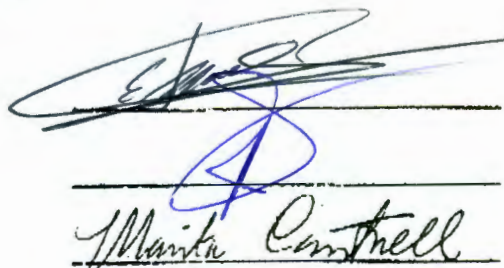
Vocal

DR. DANIEL NIETO ANGEL

Suplente

DR. HECTOR MAURICIO ESCAMILLA SANTANA

Suplente



M.C.M. José Merced Esparza García
Director de la Facultad de Química



M.C. Carlos Isaac Silva Barrón
Director de Estudios de Posgrado

El presente trabajo se desarrolló en el laboratorio de Fisiología y Bioquímica de Poscosecha, del Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos, de la Facultad de Ciencias Químicas, de la Universidad Autónoma de Querétaro bajo la asesoría del Dr. Edmundo Mercado Silva.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma de Querétaro y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo institucional y económico, recibido para la realización de mis estudios de maestría.

Al personal del laboratorio de Frutopatología del Colegio de Postgraduados de Chapingo por el asesoramiento recibido en parte del trabajo experimental.

Al Dr. Edmundo Mercado Silva, por la dirección de esta tesis y por todos sus consejos.

A los profesores:

DR. Salvador Pérez González

DRA. Marita Cantwell

DR. Daniel Nieto Angel

DR. Hector Mauricio Escamilla Santana

Por sus acertados comentarios en la revisión de este trabajo.

INDICE

I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCION	3
III. REVISION DE LITERATURA	3
3.1 IMPORTANCIA ECONOMICA DEL FRUTO DE LA GUAYABA	3
3.2 METODOS DE CONSERVACION DEL FRUTO DE GUAYABA	4
3.2.1 Bajas temperaturas	4
3.2.2 Atmósferas controladas y modificadas	5
3.2.2.1 Empacado de guayaba en bolsa de plástico	5
3.2.2.2 Almacenamiento de guayaba en atmósferas controladas	6
3.3 AGENTES FITOSANITARIOS DEL FRUTO DE LA GUAYABA	7
3.3.1 Precosecha	7
3.3.2 Poscosecha	7
3.4 CONTROL QUIMICO DE LAS ENFERMEDADES DEL FRUTO DE LA GUAYABA	9
3.5 CONTROL BIOLÓGICO DE LAS ENFERMEDADES DEL FRUTO DE LA GUAYABA	12
3.6 COMPUESTOS VOLATILES CON EFECTO FUNGICIDA	13
3.7 IDENTIFICACION DE VOLATILES DEL FRUTO DE LA GUAYABA	17
IV. OBJETIVOS	25
4.1 OBJETIVO GENERAL	25
4.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS	25
V. HIPOTESIS	26
VI. MATERIALES Y METODOS	27
6.1 ORIGEN DE LOS FRUTOS	27
6.2 TRATAMIENTO DE LOS FRUTOS	27
6.3 AISLAMIENTO DE HONGOS FITOPATOGENOS	27
6.4 IDENTIFICACION DE LOS HONGOS FITOPATOGENOS	28
6.5 REPRODUCCION DE LA SINTOMATOLOGIA DE LAS ENFERMEDADES ..	28
6.5.1 Inoculación en campo	28
6.5.2 Inoculación en el laboratorio	29
6.6 ESPORULACION DE HONGOS FITOPATOGENOS PARA LOS DIFERENTES ENSAYOS	29
6.6.1 Medios de esporulación utilizados	30
6.7 OBTENCION DE ESPORAS DE LOS CULTIVOS PUROS	32
6.8 AJUSTE DE LA CONCENTRACION DE ESPORAS REQUERIDA	32
6.9 ENSAYOS "in vitro"	33
6.9.1 Ensayos exploratorios	33
6.9.2 Ensayos definitivos	38

6.10 ENSAYOS " <i>in vivo</i> "	38
6.10.1 Desarrollo de los experimentos	38
6.10.2 Estudio de los tiempos de exposición	42
6.11 ANALISIS DEL "espacio de cabeza" EN LOS ENSAYOS " <i>in vitro</i> " E " <i>in vivo</i> "	43
6.12 ANALISIS ESTADISTICO	45
6.12.1 Ensayos " <i>in vitro</i> "	45
6.12.2 Ensayos " <i>in vivo</i> "	45
VII. RESULTADOS	46
7.1 MANEJO POSCOSECHA DEL FRUTO DE GUAYABA	46
7.2 AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE HONGOS FITOPATOGENOS CAUSANTES DE ENFERMEDADES POSCOSECHA DEL FRUTO DE LA GUAYABA	50
7.2.1 Manifestaciones macroscópicas de las enfermedades	58
7.3 REPRODUCCION DE LA SINTOMATOLOGÍA	61
7.3.1 Inoculaciones en campo	61
7.3.2 Inoculaciones en el laboratorio	62
7.3.3 Esporulación de los hongos	63
7.4 ENSAYOS " <i>in vitro</i> "	64
7.4.1 Pruebas exploratorias	64
7.4.2 Pruebas definitivas	71
7.4.3 Análisis del "espacio de cabeza"	80
7.5 ENSAYOS " <i>in vivo</i> "	82
7.5.1 Estudios de los efectos de los compuestos volátiles sobre la germinación de las espore de los hongos.	82
7.5.1.1 Efectos del Etanol	82
7.5.1.2 Efectos de la 2-nonanona	84
7.5.1.3 Efecto del hexanal	84
7.5.2 Efectos de los compuestos volátiles sobre los frutos	89
7.5.3 Análisis de "espacio de cabeza"	90
VIII. CONCLUSIONES	92
IX. LITERATURA CITADA	94

LISTA DE FIGURAS

Fig. 1. Sistema de flujo continuo para la aplicación de los compuestos volátiles a los frutos de guayaba.	42
Fig. 2. Proceso de selección y empaque de los frutos de guayaba en forma manual y (*) los puntos de riesgo de problemas fitopatológicos	48
Fig. 3. Proceso de selección y empaque de los frutos de guayaba en forma automatizada y (*) los puntos de riesgo de problemas fitopatológicos	49
Fig. 4. Esquema del acérvulo (a), conidios (b) y conidióforos(c) de <i>Pestalotia</i> sp..	51
Fig 5. Esporas de <i>Pestalotia</i> sp.	51
Fig. 6. Esquema del acérvulo (a), conidios (b) y conidióforos (c) de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	53
Fig. 7. Conidios de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	53
Fig. 8. Esquema del esporangióforo (a), esporas (b) y zigospora (c) de <i>Rhizopus</i> sp..	55
Fig. 9. Esporas de <i>Rhizopus</i> sp.	55
Fig. 10. Sintomatología de <i>Pestalotia</i> sp.	58
Fig. 11. Sintomatología de <i>Rhizopus</i> sp.	59
Fig. 12. Sintomatología de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	60
Fig. 13. Efecto de la concentración de etanol sobre la germinación de esporas de <i>Pestalotia</i> sp. (a), <i>Rhizopus</i> sp. (b) y <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> en medio PDA..	73
Fig. 14. Efecto de la concentración de acetona sobre la germinación de esporas de <i>Pestalotia</i> sp. (a), <i>Rhizopus</i> sp. (b) y <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> en medio PDA.	74
Fig. 15. Efecto de la concentración de β -ionona sobre la germinación de esporas de <i>Pestalotia</i> sp. (a), <i>Rhizopus</i> sp. (b) y <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> en medio PDA.	76
Fig. 16. Efecto de la concentración de 2-nonanona sobre la germinación de esporas de <i>Pestalotia</i> sp. (a), <i>Rhizopus</i> sp. (b) y <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> en medio PDA.	76
Fig. 17. Efecto de la concentración de hexanal sobre la germinación de esporas de <i>Pestalotia</i> sp. (a), <i>Rhizopus</i> sp. (b) y <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> en medio PDA..	77
Fig. 18. Efecto de la concentración de hexanol sobre la germinación de esporas de <i>Pestalotia</i> sp. (a), <i>Rhizopus</i> sp. (b) y <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> en medio PDA..	78
Fig. 19. Análisis con cromatografía de gases del contenido de etanol (a), 2-nonanona (b) y hexanal (c) en el "espacio de cabeza" de los recipientes en los ensayos "in vitro". .	81
Fig. 20 . Efecto del tiempo de exposición a vapores de etanol sobre la germinación de las esporas de <i>Pestalotia</i> sp. (a), <i>Rhizopus</i> sp. (b) y <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (c) inoculadas en frutas de guayaba. Después del tratamiento los frutos fueron almacenados a 20°C/ 10 días.	83
Fig. 21. Efecto del tiempo de exposición a vapores de 2-nonanona sobre la germinación de las esporas de <i>Pestalotia</i> sp. (a), <i>Rhizopus</i> sp. (b) y <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (c) inoculadas en frutas de guayaba. Después del tratamiento los frutos fueron almacenados a 20°C/ 10 días.	87
Fig. 22. Efecto del tiempo de exposición a vapores de hexanal sobre la germinación de las esporas de <i>Pestalotia</i> sp. (a), <i>Rhizopus</i> sp. (b) y <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (c) inoculadas en frutas de guayaba. Después del tratamiento los frutos fueron almacenados a 20°C/ 10 días	88

Fig. 23. Análisis con cromatografía de gases del contenido de etanol (a), 2-nonanona (b) y (c) hexanal en el "espacio de cabeza" de los recipientes en los ensayos *"in vivo"*. . . 91

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Principales estados productores del fruto de guayaba en el año 1994.	3
Tabla 2. Lista de los aldehídos y cetonas que forman el aroma de del fruto de la guayaba.	21
Tabla 3. Lista de alcoholes y ácidos orgánicos que forman el aroma del fruto de la guayaba. ...	22
Tabla 4. Lista de esteres que forman el aroma del fruto de la guayaba.	23
Tabla 5. Lista de los hidrocarburos y compuestos misceláneos que forman el aroma del fruto de la guayaba.	24
Tabla 6. Concentraciones de etanol (a) y acetona (b) utilizadas en las pruebas exploratorias de los ensayos " <i>in vitro</i> ".	35
Tabla 7. Concentraciones de β -ionona (a) y 2-nonanona (b) utilizadas en las pruebas exploratorias de los ensayos " <i>in vitro</i> ".	36
Tabla 8. Concentraciones de hexanal (a) y hexanol (b) utilizadas en las pruebas exploratorias de los ensayos " <i>in vitro</i> ".	37
Tabla 9. Concentración de etanol (a) y acetona (b) utilizadas para las pruebas definitivas de los ensayos " <i>in vitro</i> ".	39
Tabla 10. Concentración de β -ionona (a) y 2-nonanona, (b) utilizadas para las pruebas definitivas de los ensayos " <i>in vitro</i> ".	40
Tabla 11. Concentración de hexanal (a) y hexanol (b) utilizadas para las pruebas definitivas de los ensayos " <i>in vitro</i> ".	41
Tabla 12. Porcentajes de los frutos infectados en el campo.	62
Tabla 13. Porcentaje de frutos infectados en el laboratorio.	62
Tabla 14. Concentraciones de las suspensiones de esporas obtenidas en diferentes medios de cultivo	63
Tabla 15. Efecto de la concentración de etanol (a), acetona (b) y β -ionona (c) sobre la germinación de las esporas de <i>Pestalotia</i> sp. en las pruebas exploratorias de los ensayos " <i>in vitro</i> ". Los datos son el promedio de 27 determinaciones.	65
Tabla 16. Efecto de la concentración de 2-nonanona (d), hexanal (e) y hexanol (f) sobre la germinación de las esporas de <i>Pestalotia</i> sp. en las pruebas exploratorias de los ensayos " <i>in vitro</i> ". Los datos son el promedio de 27 determinaciones.	66
Tabla 17. Efecto de la concentración de etanol (a), acetona (b) y β -ionona (c) sobre la germinación de las esporas de <i>Rhizopus</i> sp. en las pruebas exploratorias de los ensayos " <i>in vitro</i> ". Los datos son el promedio de 27 determinaciones	67
Tabla 18. Efecto de la concentración de 2-nonanona (d), hexanal (e) y hexanol (f) sobre la germinación de las esporas de <i>Rhizopus</i> sp. en las pruebas exploratorias de los ensayos " <i>in vitro</i> ". Los datos son el promedio de 27 determinaciones.	68
Tabla 19. Efecto de la concentración de etanol (a), acetona (b) y β -ionona (c) sobre la germinación de las esporas de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> en las pruebas exploratorias de los ensayos " <i>in vitro</i> ". Los datos son el promedio de 27 determinaciones.	69
Tabla 20. Efecto de la concentración de 2-nonanona (d), hexanal (e) y hexanol (f) sobre la germinación de las esporas de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> en las pruebas exploratorias de los ensayos " <i>in vitro</i> ". Los datos son el promedio de 27 determinaciones.	70
Tabla 21. Concentraciones con efecto fungicida de compuestos volátiles adheridos directamente en medio PDA.	79

Tabla 22. Tiempos de exposición a compuestos volátiles para controlar hongos fitopatógenos causantes de enfermedades poscosecha.	89
--	----

I. RESUMEN

Las enfermedades poscosecha de guayaba en México son una causa importante de pérdida durante el proceso de manejo; hasta el momento existen escasos reportes de los agentes causales de enfermedades poscosecha y su control. Uno de los objetivos del trabajo fue identificar algunos de los principales agentes causales de estas enfermedades y realizar estudios para su control a través de compuestos volátiles con efecto antifúngico presentes en el aroma de la guayaba. Se colectaron muestras de frutas infectadas procedentes de Calvillo, Ags. y Jalpa, Zac., de las cuales se identificaron algunos de los principales agentes causales de enfermedades poscosecha entre ellos, los géneros de hongos *Pestalotia* sp., *Rhizopus* sp., así como la especie *Colletotrichum gloeosporioides*.

Estos microorganismos se propagaron en medios para obtener un gran número de esporas con las cuales se realizaron ensayos "*in vitro*" e "*in vivo*".

Los ensayos "*in vitro*" se realizaron en medios de cultivo inoculados con las diferentes suspensiones de esporas de los géneros y especie aislados e identificados. Otro de los objetivos fue evaluar el potencial de cinco compuestos volátiles como etanol, acetona, β -ionona, hexanal y hexanol, volátiles presentes en el aroma del fruto de la guayaba.

También se estudió el efecto de 2-nonanona la cual no está presente en el aroma de este fruto, pero hay antecedentes de ser un compuesto con efecto fungicida. Los niveles de inoculación utilizados fueron: 4×10^4 esporas/ml para *Pestalotia* sp. y *Colletotrichum gloeosporioides* y 4×10^5 esporas/ml para *Rhizopus* sp..

La germinación de esporas de *Pestalotia* sp. fue inhibida con 30,000 μ l/L de etanol y acetona, 1,200 μ l/L de β -ionona, 15,000 μ l/L de 2-nonanona, 1100 μ l/L de hexanal y 1,400 μ l/L de hexanol. La germinación de la suspensión de esporas de *Rhizopus* sp. fue controlado con 50,000 μ l/L de etanol y acetona; 40,000 μ l/L de β -ionona, 30,000 μ l/L de 2-nonanona, 1,200 μ l/L de hexanal y 1,300 μ l/L de hexanol.

Mientras que la germinación de la suspensión de *Colletotrichum gloeosporioides* fue inhibida con 30,000 μ l/L de etanol y acetona, 1,000 μ l/L de β -ionona, 15,000 μ l/L de 2-nonanona, 900 μ l/L de hexanal y 1,400 μ l/L de hexanol.

Los ensayos "*in vivo*" fueron llevados en frutos inoculados con 20 μ /L de las suspensiones de esporas para provocar su infección y puestos bajo una corriente de aire previamente burbujeado en las respectivas soluciones de etanol al 40 %, 2-nonanona al 3 % y hexanal a 0.01 % respectivamente.

La infección de cada hongo en particular fue controlada cuando la corriente de aire con el volátil se aplicó durante 48 horas, pero el fruto también sufrió daños. La aplicación durante 4 horas de los compuesto volátiles mostró que la infección fue controlada hasta 8 días sin que el fruto presentara daños.

II. INTRODUCCION

Entre los recursos productivos de gran importancia en la economía de los países en vías de desarrollo se encuentran los frutos. México tiene un gran potencial para la producción hortofrutícola con 20 especies propias de climas templados, tropicales y subtropicales, entre ellas destaca la guayaba (*Psidium guajava* L.). México ocupa el segundo lugar después de la India en la producción de guayaba a nivel mundial con un volumen anual de 185,000 toneladas. (Unión Regional de productores de guayaba del estado de Zacatecas, 1995). Jeffries y Jeger (1990) mencionan que no existen datos disponibles sobre la magnitud de las pérdidas resultantes de las enfermedades que afectan a frutos, vegetales y raíces comerciales durante su vida poscosecha. Sin embargo, en países subdesarrollados debido a la falta de tecnología y facilidades para almacenamiento las pérdidas pueden variar en un rango del 20 al 50 %. Datos conservadores indican que la cantidad de alimentos perdidos en el mundo pueden alimentar a una población de 200 y 300 millones por año. Por esta razón, es primordial controlar las pérdidas debidas a enfermedades poscosecha a niveles muy bajos (Kelman, 1989).

La guayaba esta sujeta a diferentes enfermedades poscosecha que son causadas por hongos como *Pestalotia* sp., *Rhizopus* sp., *Colletotrichum gloeosporioides*, *Dothiorella* sp., *Cystosporina* sp., *Mucor* sp., *Penicillium* sp., *Botryodiplodia theobromae*, *Phomopsis psidii*, *Fusarium solani*, *Pestalotiopsis versicolor* entre otros (Majumdar y Pathak, 1989; Lakshminarayana y Moreno, 1978).

El fruto de guayaba libera muchos compuestos volátiles durante su maduración (Chyau y col., 1992; Charg-Cherm y Chung-May, 1989; Nishimura y col., 1989; Askar y col., 1986; Idstein y Schreier, 1985; McLeod y Gonzalez de Troconis, 1982), algunos de estos compuestos tienen efecto fungicida (Vaughn y col., 1993) aunque hasta el momento ninguno se usa comercialmente para controlar o retardar enfermedades poscosecha.

El control de enfermedades poscosecha puede lograrse por medios físicos tales como atmósferas controladas, refrigeración; con medios químicos como el uso de fungicidas (Paster y col., 1988); o por control biológico el cual consiste en usar microorganismos antagónicos a los fitopatógenos (Wisniewski y Wilson, 1992; Wilson y Pusey, 1985; Pusey y Wilson, 1984).

El control químico mediante el uso de fungicidas es el más ampliamente utilizado para retardar o inhibir las enfermedades poscosecha, sin embargo, su uso ha traído problemas de salud pública y de contaminación ambiental, lo cual ha llevado a los gobiernos a establecer medidas cada vez más estrictas para su uso (Delp, 1980). Por estas razones actualmente muchos investigadores buscan formas alternativas para controlar las enfermedades poscosecha.

Una fuente interesante de productos para el control de enfermedades poscosecha son los compuestos volátiles constituyentes del aroma de las mismas frutas ya que tienen actividad fungicida (Vaughn y col., 1993; French 1992).

Davis y Smoot (1972) reportaron que los aldehídos de 5 y 6 átomos de carbono obtenidos del aroma de los cítricos inhibieron el desarrollo de *Penicillium digitatum*; Wilson y Pusey (1985) reportaron que el benzaldehído protegió a duraznos de la pudrición causada por *Rhizopus* sp. Prasad y Stadelbacher (1973); Pesis y Avissar (1989) reportaron que los vapores de acetaldehído en concentraciones de 0.25 y 0.50 % aplicados durante 70 minutos controlaron las enfermedades poscosecha de frambuesa y fresa.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el potencial de seis compuestos volátiles para inhibir el crecimiento en ensayos "in vitro" de *Pestalotia* sp., *Rhizopus* sp. y *Colletotrichum gloeosporioides*. Cinco de los seis están presentes en el aroma de guayaba. Por lo cual se estudio el efecto de la aplicación de corrientes de aire con etanol, 2-nonanona y hexanal sobre frutos inoculadas con los distintos hongos para determinar la posibilidad de la utilización de estos compuestos en el control de enfermedades poscosecha de guayaba.

III. REVISION DE LITERATURA

3.1 IMPORTANCIA ECONOMICA DEL FRUTO DE LA GUAYABA

Después de la India, México ocupa el segundo lugar a nivel mundial en la producción de guayaba con un volumen total de aproximadamente 185,000 toneladas. La principal zona productora la constituyen los estados de Aguascalientes y Zacatecas, quienes aportan 59 y 29%, mientras que Michoacán aporta el 6% de la producción nacional, el resto se distribuye entre los estados de Jalisco, Guanajuato, Querétaro y otras entidades de la República (Tabla 1.).

Tabla 1. Principales estados productores del fruto de guayaba en el año 1994.

Estado	Sup. sembrada	Sup. cosechada	Prod. Ton.	Rend.* Ton/Ha.
Aguascalientes	7,594	6,939	108,433	15.62
Zacatecas	5,235	4,971	54,016	10.86
Michoacán	1,567	1,567	11,705	7.469
Guanajuato	511	497	2,226	8.52
Jalisco	500	355	3,582	10.098
México	303	303	2,226	7.54
Querétaro	30	30	105	3.5
Otras	366	309	7,653	12
Total	15,740	14,602	184,364	126

* Rendimiento promedio

Fuente: SARH. 1994. Secretaria de Agricultura y Recursos Hidráulicos. Subsecretaria de Agricultura. Dirección General de Política Agrícola, Sistema Producto Guayaba.

El valor de la producción se estima en 300 millones de pesos (Comunicación personal, Unión Regional de Productores de Guayaba del Estado de Zacatecas, 1996). La importancia de este fruto estriba en que es una especie resistente a condiciones extremas de suelos pobres y bajos requerimientos hídricos (Yadava 1996). Aunque la principal época de producción en México se encuentra en los meses de Octubre a Diciembre debido a programas de manejo como riegos, la época de producción se ha ampliado hasta 10 meses con lo que prácticamente se tiene fruta durante todo el año. Su consumo dentro del país es como fruto fresco aproximadamente 79 % de la producción (SARH. 1994) lo cual implica mayores riesgos en su manejo para cualquiera de los mercados en los que se comercializa la fruta.

Desde el punto de vista del comercio internacional el mercado de especialidades en EUA, se está incrementando, en forma geométrica debido a la diversidad étnica de la población, así como a las recomendaciones federales para consumir el doble de frutas y hortalizas frescas. Por estos motivos se están demandando grandes cantidades de frutos tropicales (Yadava, 1996). Para entrar en este mercado será necesario resolver muchos problemas fitosanitarios, como el control de enfermedades poscosecha entre los que se tienen mayores restricciones en el uso de fungicidas sintéticos.

3.2 METODOS DE CONSERVACION DEL FRUTO DE GUAYABA.

La conservación en fresco de este fruto en México, es prácticamente nula. Aunque existen reportes con experiencias valiosas en distintas partes del mundo.

3.2.1 Bajas temperaturas

Vásquez-Ochoa y Colinas-León (1990) realizaron estudios para alargar la vida de anaquel del fruto de la guayaba en distintos estados de madurez mediante las combinaciones de diferentes temperaturas (3.5, 7 y 11°C) y humedades relativas (HR) de 80 y 88%. Los frutos de guayaba se clasificaron de acuerdo al color externo en tres estados denominados: estado I (verde maduro) fruto que presenta

una fuerte tonalidad verde, estado II (verde alimonado) fruto que presenta una ligera tonalidad verde-amarilla, estado III (amarillo firme) fruto que muestra una tonalidad amarilla. Los frutos del estado I (verde maduro) mantenidos a temperaturas de 3.5 y 7°C se conservaron por 4 semanas, pero sufrieron daños por frío. Los frutos almacenados a 11°C y HR de 80-88% así como a 7°C con una HR de 88% presentaron desarrollo de hongos a las 2 semanas, mientras que los frutos del estado III (amarillo firme) presentaron el desarrollo de hongos solo en una semana. Estos investigadores encontraron que los frutos del estado II (verde alimonado) tuvieron menos cambios organolépticos, mayor calidad en su presentación y podrían ser almacenados a 3.5 y 7°C con HR de 80 y 80 % durante 3 semanas.

3.2.2 Atmósferas controladas y modificadas

Es posible mantener la calidad inicial de un producto durante su transporte y distribución utilizando sistemas de conservación adicional al control de temperatura. La conservación en atmósfera controlada o modificada, implica la manipulación de los niveles de CO₂ y O₂; otros gases como el CO, C₂H₄, propileno y acetileno son algunas veces incluidos (Brecht, 1980). La calidad de un producto agrícola fresco depende principalmente de la selección y manejo cuidadoso de la materia prima; considerando la cosecha en la madurez óptima, cuidado durante el manejo y reducción de la carga microbiana (Zagory y Kader, 1988) además de esto es importante la conservación posterior por métodos adecuados de almacenamiento y transporte seleccionados de acuerdo a las características del producto en cuestión. Se ha probado que se obtienen mejores resultados al combinar 2 o más técnicas apropiadas para la conservación de la mayoría de los productos, entre ellos frutos frescos, como es reportado por Picón y col., (1993).

3.2.2.1 Empacado de guayaba en bolsa de plástico.

Khedkar y col., (1982) llevaron un estudio de almacenamiento a temperatura ambiente de guayabas (variedad *L-49*) empacadas en bolsas de polietileno de calibre 100, 200 y 300 mils de espesor y otras tratadas con waxol aplicado de capa protectora para evaluar la eficacia de los tratamientos se registro

la pérdida de peso, el porcentaje de pulpa, sólidos solubles, acidez titulable, contenido de ácido ascórbico y evaluación sensorial. Los frutos almacenados a temperatura ambiente y sin tratamiento presentaron una pérdida de peso del 36.76 % en el octavo día; los frutos almacenados en las bolsas de calibre 300 mils presentaron mejor calidad al final aunque no se registraron variaciones en la acidez y en el contenido de sólidos solubles en los frutos empacados con las películas de otros calibres.

Por otra parte los frutos tratados con waxol mostraron un incremento en la acidez, el contenido de ácido ascórbico final fue el 50 % del original de todos los tratamientos excepto para las bolsas de calibre 300 mils. De estos resultados se concluye que el polietileno de calibre 300 mils es el más adecuado para la conservación de los frutos en un período de 10 días. Adsule y Tandon (1983) reportaron resultados de un estudio del empaque de frutos de guayaba en 2 estados de madurez (verde-amarilla y amarillo firme) en bolsas de polietileno de baja densidad de calibre 200, 400 y 600 mils de espesor a temperatura ambiente que varió de 17 a 23°C. Los resultados indicaron un incremento significativo en el contenido de sólidos solubles totales e índice de acidez, se encontró que los frutos sin tratamiento mostraron una mayor reducción en el contenido de ácido ascórbico, humedad y firmeza que los empacados en las bolsas; en la evaluación sensorial de 10 días de almacenamiento la mejor calidad final se obtuvo con las bolsas de 600 mils.

3.2.2.2 Almacenamiento de guayaba en atmósferas controladas

Pal y Buescher (1993) llevaron a cabo un estudio para observar el efecto de una atmósfera con exceso de CO₂, sin restricción de oxígeno y temperatura ambiente sobre la respiración y producción de etileno de guayaba, plátano, cebolla, naranja, tomate y papa. Estos investigadores encontraron que a niveles de 0, 10, 20 y 30 % de CO₂, la respiración (consumo de O₂) de la guayaba permaneció constante en un valor promedio de 6.7 µl/h Kg para 0 % de CO₂ mientras que 0.5 µl/h Kg para 30 % de CO₂, los investigadores concluyen que los tratamientos reducen la producción de etileno, por lo cual se inhiben los procesos de maduración del fruto extendiendo su vida de anaquel. El uso de atmósferas controladas y modificadas no han tenido un efecto notable sobre el control de enfermedades causada por hongos fitopatógenos en las condiciones donde se aumenta la calidad del fruto, por otro lado, se observó que el fruto de guayaba es altamente sensible a la modificación drástica de la composición atmosférica por lo que esta opción se ve considerablemente disminuida.

3.3 AGENTES FITOSANITARIOS DEL FRUTO DE LA GUAYABA

3.3.1 Precosecha

Aunque nuestro estudio se enfocó directamente a controlar algunas de las enfermedades poscosecha de guayaba, sin embargo, existen enfermedades precosecha que merman la producción y calidad de este fruto entre las cuales podemos citar las siguientes: (Dirección General de Información Agropecuaria, Forestal y Fauna Silvestre, SAGAR. 1994)

mosca de la fruta	<i>Ceratitis capitata</i> <i>Anastrepha striata</i> <i>Anastrepha obliqua</i>
asfixia radicular	<i>Phytophthora</i> sp.
nematodos	<i>Meloidogyne</i> sp.
clavo	<i>Pestalotia</i> sp. y <i>Gloeosporium</i> sp.

3.3.2 Poscosecha

Existen escasos reportes de las enfermedades poscosecha de guayaba, tanto en México, como en otras partes del mundo.

Singh y Bhargava (1977) observaron que los géneros *Gloeosporium psidii* Delacr., *Phoma psidii* P. Henn. y *Pestalotia psidii* Pat. fueron los principales agentes causales de enfermedades durante transporte y comercialización en 3 variedades de guayaba en la India. Los resultados mostraron que *Gloeosporium psidii*, *Phoma psidii*, *Pestalotia psidii* causan enfermedades muy severas sobre la variedad *Allahabad Safeda* y *Chitidar*; no obstante la variedad *Apple guava* fue moderadamente resistente a las enfermedades provocadas por los géneros *Phoma psidii* y *Pestalotia psidii*. *Gloeosporium psidii* fue el género más problemático, causando daños muy severos, ya que es capaz de penetrar por el extremo distal de fruto y otras aberturas naturales. La mayor resistencia a las enfermedades de la variedad *Apple guava* se atribuyó a lo grueso de la piel o posiblemente a la presencia de algunos compuestos antifúngicos en esta variedad.

Lakshminarayana y Moreno (1978) reportaron que los microorganismos causantes de pudriciones en la guayaba mexicana en el campo, almacenamiento y comercialización, son los siguientes géneros de hongos: *Pestalotia* sp., *Colletotrichum* sp., *Dothiorella* sp., *Cytosporina* sp., *Mucor* sp., *Penicillium* sp., *Botryodiplodia* sp. y *Phomopsis* sp.

Pandey y Dwivedi (1987) observaron la micoflora asociada a semillas sanas y enfermas de guayaba. Las muestras fueron colectadas en Chiraigaon, India; se logró identificar 25 géneros de hongos, de las semillas aparentemente sanas se aislaron los géneros: *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus luchuensis*, *Aspergillus terreus*, *Cladosporium cladosporioides*, *Penicillium citrinum*, *Penicillium chrysogenum* y *Rhizopus stolonifer*. De las semillas que presentaron sintomatología de enfermedades se aislaron *Alternaria alternata*, *Alternaria tenuissima*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Lasodiplodia theobromae*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Curvularia lunata*, *Drechslera australiensis*, *Fusarium oxysporum*, *Gliocladium roseum*, *Penicillium citrinum*, *Trichoderma harzianum*.

Majumdar y Pathak (1989) hicieron un estudio de muestras procedentes de los mercados de Jaipur, India. Durante 2 años de muestreo se encontraron que algunos de los hongos causales de enfermedades poscosecha de guayaba frecuentemente aislados fueron: *Botryodiplodia theobromae*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium solani*, *Pestalotiopsis versicolor*, *Phomopsis psidii*, *Phytophthora nicotianae* var. *parasítica* y *Rhizopus arrhizus*.

En este estudio se determinó que las pudriciones más comunes fueron causadas por *Colletotrichum gloeosporioides* seguida por la de *Botryodiplodia theobromae*; además se observó una tendencia estacional de ciertas enfermedades, en los meses de invierno siendo los géneros más comunes *Phomopsis psidii* y *Phytophthora nicotianae* var. *parasítica*.

Madhukar y Reddy (1990) realizaron un estudio en el cual observaron la incidencia estacional de las enfermedades poscosecha de guayaba en la zona productora Warangal, India. En esta región el fruto de la guayaba sufre de enfermedades poscosecha, las cuales provocan pérdidas de 9 %. Los géneros *Colletotrichum gloeosporioides*, *Pestalotiopsis versicolor*, *Acremonium terricola* y *Rhizoctonia*

solani prevalecieron durante el verano, época en la cual existen temperatura y humedad altas. Por otro lado, *Alternaria alternata*, *Drechslera hawaiiensis*, *Fusarium solani* y *Sclerotium rolfsii* fueron aislados esporádicamente causando pérdidas mínimas, al final de la cosecha donde las temperaturas son templadas y la humedad baja se aislaron los géneros *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus*, *Chaetomium globosum*, *Cladosporium cladosporoides*, *Paecilomyces variotii*, *Paecilomyces decumbens* y *Rhizopus stolonifer* los cuales fueron reportados como parásitos débiles y patógenos secundarios de la fruta sobremadura.

Badyal y Sumbali (1992) reportaron la aparición de nuevas enfermedades poscosecha de guayaba en Jammu, India. Los géneros de hongos involucrados fueron *Penicillium chrysogenum*, Thom, *Rhizopus oryzae* Went y Prinsen Geerligts, y *Ceratocystis adiposa* E. Butler, C. Moreau (I.M.I 327363). Ellos observaron que los frutos maduros fueron más susceptible a las enfermedades que los frutos inmaduros. La incidencia de *Penicillium chrysogenum* fue muy notoria en los meses de invierno sobre los frutos maduros que presentaron daños provocados durante la cosecha y el transporte. El género *Rhizopus oryzae* fue el que causó más pudrición sobre los frutos sobremaduros y dañados, la pudrición causada por este género avanza rápidamente de las guayabas enfermas a las sanas y en 2-3 días, todos los frutos son una masa de pudrición. Mientras, que el género *Ceratocystis adiposa* necesita condiciones de alta temperatura y humedad para provocar la enfermedad, la cual se presenta como manchas pequeñas de color café o negro que al transcurrir el tiempo se unen y todos los frutos se tornan de un color oscuro.

3.4 CONTROL QUIMICO DE LAS ENFERMEDADES DEL FRUTO DE LA GUAYABA

Khanna y Chandra (1975) utilizaron un fungicida llamado Aretan en el control de enfermedades poscosecha de guayaba causadas por *Pestalotia psidii* y *Colletotrichum gloeosporioides*. Se realizaron ensayos "*in vitro*" en los cuales los hongos fueron controlados con 1 y 50 ppm de Aretan respectivamente. En ensayos "*in vitro*" las concentraciones que mostraron ser efectivas fueron evaluadas "*in vivo*", para verificar su efecto sobre guayabas de la variedad "*Safeda*" infectadas artificialmente. Los resultados indican que las guayabas tratadas con Aretan no presentaron síntomas

de alguna enfermedad, mientras en el testigo hubo una alta incidencia de frutos enfermos. Se demostró que el Aretan puede ser empleado para controlar las enfermedades poscosecha de guayaba causadas por *Pestalotia psidii* y *Colletotrichum gloeosporioides*.

Singh y Bhargava (1977) demostraron la eficacia del Benlate [metil 1-(butilcarbamoil)-2-benzimidazolcarbamato] para controlar enfermedades de poscosecha de guayaba causadas por *Pestalotia psidii* Pat., *Phoma psidii* P. Henn y *Gloeosporium psidii* Declar. El Benlate disuelto en una emulsión agua-aceite (2 % v/v) con una concentración de 3000 ppm fue efectivo en el control de *Pestalotia psidii*, *Phoma psidii* y *Gloeosporium psidii*, por otro lado, se determinó la presencia de un oligosacárido en los tejidos de los frutos infectados con *Pestalotia psidii* y *Phoma psidii*, tal vez sintetizado como defensa contra estos hongos.

Gupta y Mukherjee (1980) realizaron un estudio para controlar enfermedades poscosecha de guayaba causadas por *Gloeosporium psidii* y *Pestalotia psidii* con un regulador de crecimiento llamado morfactin. La aplicación de 0 y 10 ppm permitía el desarrollo de los hongos después de 12-15 días de almacenamiento a temperatura ambiente, en los tratamientos con 100 ppm mostró un 25 % de desarrollo de los hongos después de 15 días. A mayores concentraciones no hubo desarrollo de los hongos, pero el color de la piel se torno obscura, en este experimento se observó que *Gloeosporium psidii* y *Pestalotia psidii* fueron los principales géneros de hongos causales de las enfermedades. Se recomendó el uso de 100 ppm de morfactin para el control del desarrollo de los hongos sin ocasionar daños en la coloración de la piel.

Singh y Sharma (1982) usaron 5 fumigantes para controlar la antracnosis de la guayaba causada por *Colletotrichum gloeosporioides*. Los fumigantes empleados fueron metabisulfito de sodio, cloro, carbonato de amonio, difenil-amina y benzoato de sodio. Ninguno de estos compuestos inhibió completamente la germinación de las esporas de *Colletotrichum gloeosporioides*. Sin embargo, el metabisulfito de sodio y cloro resultaron más efectivos comparados con el carbonato de amonio, difenil-amina y benzoato de sodio. Estos fumigantes se pueden emplear en lugares donde se va a almacenar guayaba para eliminar posibles agente causales de enfermedades poscosecha.

Arya (1988) realizó aspersiones de diferentes fungicidas como el Captan [cis-N-(Triclorometil)-4-ciclohexano-1,2-dicarboximida] y Dithane M-45 [manganeso-etilen bisditiocarbamato] para el control de *Phomopsis psidii* en ensayos "in vivo". Estos mostraron ser efectivos en concentraciones de 750 hasta 1250 ppm respectivamente. Por otro lado, los fungicidas no-sistémicos Difolotan [cis-N-(1,1,2,2-tetracloroetil) tio 4-ciclohexano-1,2-dicarboximida] y Dhitane fueron los más efectivos para el control de la enfermedad. El Bavistin [2-(etoxicarba-nilamino)-benzimidazol] (fungicida sistémico) redujo en un 80 % el desarrollo de la enfermedad.

Pandey (1988) hizo un estudio del efecto de diferentes fungicidas sobre hongos filoplanos y patógenos del fruto de la guayaba, los fungicidas fueron aplicados varias veces durante las estaciones de verano e invierno, en concentraciones de 500, 1500 y 3000 ppm. En verano se utilizó Benomyl [Metil 1-(butilcarbamoil)-2-benzimidazolcarbamato] y Captan [cis-N-(Triclorometil) tio-4-ciclohexano-1,2-dicarboximida], encontrando que en la primera aplicación de Benomyl durante el verano a concentraciones de 500 y 1500 ppm se redujo en 77 y 92 % la población de *Colletotrichum gloeosporioides* respectivamente, mientras que el crecimiento de *Pestalotia psidii* se redujo en un 67 y 90 % respectivamente.

El Captan aplicado varias veces durante el verano a una concentración de 3,000 ppm, mostró que en la segunda y tercera aplicaciones inhibió el crecimiento de *Colletotrichum gloeosporioides*, mientras que estos tratamientos no fueron efectivos para reducir el desarrollo de *Pestalotia psidii*, la inhibición del desarrollo fue directamente proporcional a la concentración del Captan aplicado.

A concentraciones de 3000, 1500 y 500 ppm la población de *Pestalotia psidii* se redujo en 93, 40 y 65% respectivamente. En el invierno se utilizaron 4 fungicidas: Benomyl, Captan, Mancozeb [Zinc-Manganeso etilen bisditiocarbamato] y Dichlone [2,3-dicloro-1,4-naftolquinona], todos los tratamientos fueron efectivos para disminuir las poblaciones de hongos filoplanos y patógenos. En las tres primeras aplicaciones de Benomyl las poblaciones de los hongos disminuyeron considerablemente. Mancozeb en concentraciones de 50 y 500 ppm causó una marcada disminución en la población de la micoflora filoplana; por otro lado Captan y Dichlone no fueron efectivos para eliminar a los hongos filoplanos. Algunos géneros como *Alternaria alternata*, *Aspergillus niger*,

Curvularia lunata, *Drechslera australiensis*, *Fusarium oxysporum* y *Penicillium citrinum* fueron resistentes y se aislaron después de la quinta aplicación de los fungicidas. Otros géneros como: *Absidia corymbifera*, *Acremonium furcatum*, *Acrophialophora fusipora*, *Memmoniella echinata* y *Leptosphaerulina trifolii* fueron aislados del control pero no de los tratamientos.

En general, Benomyl en concentraciones de 2000 y 3000 ppm redujo de forma considerable las poblaciones de los hongos patógenos y filoplanos. Siendo una buena opción para el control de enfermedades de guayaba, por otro lado, se observó que había diferencias entre la efectividad de los fungicidas, quizá esto pueda ser debida a factores tales como la absorción del mismo por la superficie de los frutos, a los diferentes modos de acción sobre los microorganismos, a los cambios en el metabolismo de plantas o a las condiciones climáticas que afectan tanto al hospedero como al patógeno.

Khanna y Chandra (1989) realizaron un experimento en el que emplearon 4 diferentes drogas homeopáticas obtenidas de otras especies de plantas para controlar pudriciones de mango (*Pestalotia mangifera*), la pudrición de guayaba (*Pestalotia psidii*) y la pudrición de tomate (*Fusarium roseum*). Las drogas fueron incluidas en diferentes coadyuvantes que modificaron la tensión superficial del producto. Las drogas obtenidas de la especie *Kali iodatum* con niveles de actividad de 190, 87 y 149 incluidas en el detergente controlaron las pudriciones de mango, guayaba y tomate respectivamente.

En la actualidad los compuestos sintéticos están siendo prohibidos ya que causan problemas de salud pública, contaminación ambiental y aumento de la resistencia de los géneros microbianos a tales compuestos, por estas razones los investigadores han propuesto la utilización de métodos alternativos

3.5 CONTROL BIOLÓGICO DE LAS ENFERMEDADES DEL FRUTO DE LA GUAYABA

Como alternativa al uso de agentes químicos se ha usado el control biológico para disminuir las enfermedades del fruto de la guayaba, sin embargo, se han realizado relativamente pocos trabajos sobre este tema:

Pandey y col., (1993) estudiaron tanto en ensayos "*in vitro*" como "*in vivo*" las interacciones antagónicas que se presentan entre hongos filoplanos y patógenos del fruto de la guayaba, los resultados mostraron que los cultivos de *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum* y *Penicillium citrinum* fueron antagónicos a *Colletotrichum gloeosporioides* inhibiendo en un 50 % su crecimiento micelial. Mientras, que los géneros *Cephalosporium roseo-griseum* y *Fusarium oxysporum* inhibieron el crecimiento de *Pestalotia psidii*, los resultados mostraron que los microorganismos filoplanos presentes en la guayaba pueden ser utilizados para el control biológico de microorganismos causales de enfermedades del mismo fruto, el desarrollo de los patógenos fue afectado por los saprófitos en los ensayos "*in vitro*" como "*in vivo*".

3.6 COMPUESTOS VOLATILES CON EFECTO FUNGICIDA

Desde hace varios años se ha suscitado interés por el estudio de diferentes compuestos volátiles como un tratamiento alternativo para controlar microorganismos fitopatógenos.

Davis y Smoot (1972) evaluaron el efecto sobre la germinación de esporas de *Penicillium digitatum* de diferentes grupos químicos (aldehídos, ésteres, alcoholes y terpenos) presentes en el aroma de los cítricos, encontraron que el grupo de los aldehídos alifáticos inhibieron en un 50 % la germinación de las esporas de este hongo, los aldehídos evaluados fueron butiraldehído, heptanal, octanal, nonanal, decanal, citral y citronelal, los más efectivos fueron el hexanal, heptanal y nonanal. Los grupos de alcoholes, ésteres y terpenos no tuvieron efecto sobre la germinación.

Los alcoholes (nerol, 2-hexanol, octanol, nonanol, decanol, geraniol y citrolol), así como los ésteres (butírate etílico, acetato citronelil, metil isovalerato) y los terpenos (terpinoleno, β -pineno, miriceno, para-cimeno y limoneno), no tuvieron efecto sobre la germinación de las esporas de *Penicillium digitatum*. Las concentraciones empleadas en el experimento de los aldehídos de 5, 6, 7, 8 y 9 átomos de carbono fueron 0.255 M, 0.0563 M, 0.0028 M Y 0.00077 respectivamente. El efecto fungicida se incrementó conforme aumentó la longitud de la cadena de los aldehídos.

Prasad y Stadelbacher (1973) utilizaron vapores de acetaldehído para controlar enfermedades poscosecha de frambuesa causada por *Botrytis cinerea*, los tratamientos de acetaldehído en concentraciones de 0.25 y 0.50 % aplicados durante 70 minutos fueron efectivos para controlar este microorganismo.

Rines y col., (1974) estudiaron el efecto del nonanal y la 6-metil-5-hepten-2-ona como estimuladores de la germinación de esporas de *Puccinia graminis* var. *tritici*, encontrando que el nonanal y la 6-metil-5-hepten-2-ona en concentraciones de 50-500 ppm tienen tal efecto, pero a concentraciones entre 2,000 y 5,000 ppm muestran un efecto fungicida, es importante señalar que el nonanal y otros volátiles pueden ser utilizados como estimuladores o inhibidores de la germinación de esporas, señalándose como una alternativa para resolver problemas agrícolas.

Paster y col., (1988) mencionan que el uso de métodos físicos para el control de enfermedades es caro y algunos fungicidas (ácidos orgánicos de bajo peso molecular y sus sales) son corrosivos a los recipientes metálicos, además su efecto es limitado por un período de tiempo corto ya que los microorganismos adquieren resistencia a tales compuestos, por estos motivos existe la necesidad de usar materiales nuevos que sean útiles en el control de microorganismos causantes de pérdidas en el almacenamiento de granos y productores de aflatoxinas, para eliminar estos problemas se propuso el uso de alcohol alílico como una opción, ya que es un compuesto que se encuentra naturalmente en algunas plantas comestibles y tiene efectos insecticida y fungicida.

Cuando el alcohol alílico fue aplicado por 24 horas a una concentración de 50 o 75 mg/L solamente un 20 y 10 % de los granos fue infestado por los hongos. Al aumentar el tiempo de exposición a 48 horas con una concentración de 50 mg/L hubo un 5 % de infestación a los 14 días, en tanto, que los granos expuestos 72 horas a una concentración de 50 mg/L, quedaron estériles por 6 meses a una temperatura de almacenamiento de 26°C. El alcohol alílico es una alternativa para sustituir fungicidas sintéticos ya que es un compuesto natural que presenta este efecto y se puede aplicar fácilmente en los almacenes.

Gardner y col., (1990) observaron el efecto que tuvieron los vapores de hexanal sobre la germinación de semillas de soya (*Glycine max* var *Century*) y el comportamiento de la micoflora asociada. El hexanal fue vaporizado en un sistema de aire húmedo con un flujo de 100 ml/min, los investigadores observaron que en los tratamientos sin hexanal había un gran desarrollo de los hongos *Alternaria* sp, *Aspergillus* sp, *Fusarium* sp. y *Penicillium* sp. sobre la testa de la semilla. Mientras, que en los tratamientos con hexanal no se desarrollaba ningún hongo, demostrándose el efecto fungicida del compuesto sobre los géneros antes mencionados. También, se compararon las toxicidades relativas de 2 compuestos relacionados con el hexanal ya que hay evidencias que estos compuestos son sintetizados en la ruta de la lipoxigenasa siendo el trans-2-hexenal y 2-nonenal. El orden de la inhibición del crecimiento de los hongos fue trans-2-hexenal, seguido por hexanal y trans-2-nonenal respectivamente.

Pesis y Avissar (1989) experimentaron con la aplicación de vapores de acetaldehído para controlar enfermedades poscosecha de fresa causadas por *Rhizopus stolonifer* y *Botrytis cinerea*. Observaron que concentraciones de 1,500 a 5,000 μL en periodos de tiempo de 1-4 horas, fueron efectivos para retardar estas enfermedades.

French (1992) hizo una revisión bibliográfica sobre compuestos volátiles constituyentes del aroma de vegetales menciona que estos, pueden ser estimuladores o inhibidores de la germinación de esporas de hongos. Muchos de los compuestos inhiben la germinación a altas concentraciones (250 a 1000 μL), probablemente causando daño físico a las esporas. Existen buenas expectativas en cuanto al uso de compuestos volátiles para resolver problemas agrícolas, utilizándolos como estimuladores de una germinación prematura bajo condiciones desfavorables.

Actualmente se realizan investigaciones de más compuestos estimuladores o inhibidores que serán utilizados para controlar enfermedades de plantas, esto se está logrando mediante escrutinios de un gran número de volátiles que afectan a diferentes microorganismos. Por ahora se sabe que los compuestos de aroma juegan una gran variedad de papeles biológicos, incluyendo la regulación del desarrollo microbiano. En la naturaleza, la difusión de señales físicas o químicas pueden iniciar o

retardar la germinación o el desarrollo de plantas y hongos. En el futuro, será necesaria más investigación para conocer e identificar los transmisores y receptores que se encuentran en los organismos ya que juegan un papel muy importante en el comportamiento de especies animales y vegetales, esta información será muy útil en el control de enfermedades de plantas.

Vaughn y col., (1993) estudiaron el efecto de 15 compuestos volátiles producidos por la frambuesa y fresa sobre los géneros *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea* y *Colletotrichum* sp., el benzaldehído a 0.04 $\mu\text{l/ml}$ inhibió completamente los cultivos aislados de *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea* y *Colletotrichum gloeosporioides*, mientras que el hexanol, E-2-hexanal y 2-nonanona a una concentración de 0.1 $\mu\text{l/ml}$ también inhibieron estos hongos. Así mismo indicaron que la 2-nonanona encapsulada en almidón redujo las pudriciones en estos frutos en contenedores cerrados después de 7 días a 10°C.

Sholberg y Gaunce (1995) observaron los efectos que tuvieron las aplicaciones de vapores de ácido acético para controlar enfermedades poscosecha de manzana, tomates, uvas, peras, kiwis y naranjas causadas por *Penicillium expansum* Link y *Botrytis cinerea* Pers. Los investigadores observaron en los ensayos "in vitro" que al aplicar continuamente 5.4 mg de ácido acético/L a temperaturas de 2 y 22°C, la germinación de las esporas de *Penicillium expansum* y *Botrytis cinerea* se redujo hasta 14%. Cuando se aplicaron 8 y 10 mg de ácido acético/L a 22°C y 2°C respectivamente, la germinación de las esporas de estos microorganismos fue controlada al 100 %. Las manzanas, uvas, kiwis, tomates y peras "Anjou" inoculadas con esporas de *Botrytis cinerea* y fumigadas durante 24 horas con 2.0 y 5.7 mg ácido acético/L a 5°C no presentaron la enfermedad por 7 días a 22°C. Para controlar la germinación de las esporas de *Penicillium expansum* en manzanas y peras fue necesario aplicar dosis de 38.8 y 50.0 mg de ácido acético/L en cada fruta respectivamente.

Entre otros compuestos identificados se encontraron los benzoatos y acetatos, esterés fenilpropil y cinamoil, estos últimos se cree pertenecen al grupo de los derivados de fenilpropano, por otro lado, se piensa que los alcoholes alifáticos detectados en la pulpa de la guayaba se originan del metabolismo de los ácidos grasos. Los compuestos insaturados de cadena corta están relacionados con la peroxidación de lípidos, mientras que los de cadena larga son productos de la α -oxidación de los ácidos grasos.

El fenilpropanol, el alcohol cinámico y el eugenol son productos de la reducción de los ácidos cinámicos, otro grupo de compuestos identificados fueron los norcarotenoides los cuales son productos de la biodegradación de los terpenos, en este grupo se incluye el 4-oxodihidro- α -ionol detectado solamente en los residuos de la destilación de la pulpa, quizá sea un producto de la hidroxilación de megastigmadienones los cuales se han reportado en tabaco y "fruto de la pasión". Otro grupo interesante de constituyentes del aroma de la guayaba fue el representado por las 3-(2H)-furanonas, por otro lado, se logró caracterizar algunos compuestos heteroatómicos que contienen nitrógeno y azufre. Los di y trisulfitos fueron detectados en las muestras de pulpa de guayaba, quizá su presencia pueda ser entendida por la degradación enzimática de sulfóxidos de cisteína. Otro grupo importante detectado fue el de los compuestos de tiofenos, pirazinas y tiazoles de estos se conoce muy poco hasta el momento; comúnmente se encuentran como productos de reacciones químicas de los sabores.

Chang-Cherm y Chung-May (1989) utilizando sistemas acoplados de cromatografía de gases-espectroscopía de masas y cromatografía de gases-espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier identificaron los compuestos volátiles de las partes interna y externa de la guayaba. Se identificó un total de 44 compuestos entre los cuales se encontraron 20 esterés, 11 alcoholes, 8 carbonilos, 4 hidrocarburos y un compuesto con clasificación miscelánea. Ocho compuestos, también reportados como componentes específicos del aroma de guayaba, fueron el 3-metil 2-butanona, el acetato isobutílico, el carbonato dietil, el 1,8-cineol, el etil 9-decenoato, el etilfenil propanato, el aldehído cinámico y el viridiflorol. Al comparar la cantidad total de volátiles en la parte interna con la externa del fruto de la guayaba se encontró que en la primera hay una concentración más elevada

de estos compuestos que en la parte externa. El (Z)-ocimeno, β y τ -cariofileno se encontraron en mayor concentración en la pulpa externa, siendo el β -cariofileno el hidrocarburo de más alta concentración en esta parte.

Los aldehídos con seis átomos de carbonos como el n-hexenal, (z)-3-hexenal y (E)-hexenal fueron los de más alta concentración en la pulpa interior de la guayaba, sin embargo, los alcoholes con seis carbonos como: el n-hexanol, (E)-hexen-1-ol, (Z)-hexen-1-ol fueron los prevalecientes en la pulpa externa. Al parecer estos compuestos se derivan de la degradación oxidativa de los ácidos linoléico y linolénico. Se cree que los compuestos de seis átomos de carbono son los responsables del olor característico de los vegetales cuando están en su etapa inmadura. El grupo de los ésteres representa cuantitativa y cualitativamente un lugar muy importante entre los volátiles del aroma de la guayaba, además, se cree que son sintetizados durante la α -oxidación de los ácidos grasos insaturados en las semillas de los frutos.

Nishimura y col., (1989) identificaron los compuestos volátiles de las guayabas de pulpa blanca y pulpa rosa. Las muestras fueron analizadas por técnicas de cromatografía capilar de gas y un sistema acoplado de cromatografía de gases-espectroscopía de masas, se identificaron un total de 122 compuestos entre ellos: 13 aldehídos, 17 cetonas, 31 alcoholes, 10 ácidos, 28 ésteres, 10 hidrocarburos y 13 compuestos clasificados como misceláneos. Tomando como base el área total bajo los picos de los cromatogramas, los aldehídos de C6 como (E)-3-hexenal, (Z)-3-hexenal, (Z)-2-hexenal y (E)-2-hexenal representaron 8 % del área en las guayabas de pulpa blanca, mientras las guayabas de pulpa rosa fue de 3.4 %. Los alcoholes de C6 conjuntaron 4 y 2 % respectivamente. Por ello la cantidad total de aldehídos, alcoholes y ácidos orgánicos de C6 comprendieron el 20 % del aroma de las guayabas de pulpa blanca y el 44 % de las de pulpa rosa.

Del grupo de los terpenos se identificaron el α -cariofileno, el limoneno, el α -humuleno y el α -cariofileno. El limoneno y el bisaboleno han sido reportados en altas concentraciones en la mayoría de las especies de guayaba, pero el limoneno no fue detectado en puré enlatado y si lo fue en la fruta fresca, mientras el bisaboleno no fue detectado en el puré enlatado y si en la fruta fresca. Por otro

lado, se detectó un compuesto que contiene azufre, el mercapto-hexanol, el cual fue encontrado en la fruta fresca por primera vez y fue hallado en una proporción de 3.1 y 0.6 % para las frutas de pulpa blanca y pulpa rosa. Los investigadores indicaron que las diferencias de olor y sabor entre las guayabas de pulpa blanca y rosa puede deberse en parte a este compuesto.

Chang-Cherg y col., (1992) encontraron diferencias entre compuestos volátiles y no volátiles de muestras de guayaba en 2 diferentes estados de desarrollo. Los compuestos volátiles de los 2 estados de desarrollo fueron aislados por la técnica de destilación al vacío mediante la extracción con solventes. Posteriormente fueron identificados con cromatografía de gases y espectrofotometría de infrarrojo, solamente se encontraron diferencias cuantitativas y no cualitativas entre los constituyentes del aroma de la guayaba. Un total de doce esteres, ocho alcoholes, siete hidrocarburos, cinco carbonilos, un ácido y un compuesto con clasificación miscelánea fueron identificados, los aldehídos y las cetonas fueron encontrados en concentraciones altas en la fruta madura, mientras que los esteres lo fueron en la fruta verde. Los constituyentes volátiles que se encontraron en mayor concentración en la fruta verde fueron el 1,8-cineol, (E)-2-hexenal y (E)-2-hexenal, por otro lado, el etil hexanoato y acetato (Z)-3-hexenil fueron los que se encontraron en mayor concentración en la fruta madura. Otros grupos importantes de compuestos fueron los hidrocarburos entre los cuales el β -cariofileno fue encontrado en los dos estados de desarrollo del fruto de la guayaba.

Una observación importante fue que la concentración de estos hidrocarburos disminuye conforme la fruta va madurando. El otro grupo de constituyentes del aroma del fruto de la guayaba está representado por los derivados cinámicos, entre los cuales se incluye aldehído, alcohol y acetato cinámicos.

Como un resumen de los trabajos sobre la composición del aroma de guayaba, en las tablas siguientes se enlistan los grupos químicos que lo conforman.

Tabla 2. Lista de los aldehídos y cetonas que forman el aroma de del fruto de la guayaba.

ALDEHIDOS	REFERENCIAS*
Acetaldehído	1,5
Hexanal	1,2,3,4,5,6
(E)-3-hexanal	2,4,5,6
(Z)-3-hexanal	2,4,5
(Z)-2-hexanal	5
(E)-2-hexanal	2,5
Furfural	1,3,5
(E,E)-2-4-heptadienal	2,5
Benzaldehído	1,2,3,5
5-metilfurfural	1,5
m-hidroxibenzaldehído	5
aldehído cimamílico	3,4,5,6
CETONAS	
Acetona	1,5
3-pentanona	2,5
2,3-butadienona	5
2,4-dimetil-3-pentanona	5
2-acetilfuran	5
2-propionilfuran	5
3,3,5-trimetil-2-ciclohexanona	5
Metil-benzilcetona	5
5-etil-2(5H)-furanona	5
p-metilacetofuranona	5
Furfurilpentil cetona	5
Furfurilhexil cetona	5
β -ionona	3,5
2,5-dimetil-4-hidroxi 3(2H)-furanona	5
Dihidroximetilionona	5
5,6-epoxi- β -ionona	5
p-metoxiacetofenona	5

Tabla 3. Lista de alcoholes y ácidos orgánicos que forman el aroma del fruto de la guayaba.

ALCOHOLES	REFERENCIAS*
Alcohol isobutilico	5
Alcohol isopropílico	5
Pentanol	2,3
Ciclopentanol	5
Hexanol	5
Linalool	2
2-decanol	3
Mentol	4
Alcohol furfúrico	5
a-terpineol	5
Decanol	2,5
6-mercaptohexanol	5
Alcohol benzílico	5
Alcohol feniletílico	5
Metileugenol	5
Alcohol 3-fenilpropílico	2,5
β -nerolidol	5
Eugenol	2,5
α -cadinol	5
t-cadinol	5
τ -cadinol	5
δ -cadinol	5
Alcohol cinámico	2,3,4,5,6
ACIDOS	2,5
Acético	
Isobutanoico	5
butanoico	2,5
isopentanoico	5
2-etilbutanoico	5
pentanoico	5
hexanoico	2,5,6
5-hexanoico	5
Octanoico	2,5
	2,5

Tabla 4. Lista de esteres que forman el aroma del fruto de la guayaba.

ESTERES	REFERENCIAS*
Acetato etílico	1,2,3,4,5,6
Propionato etílico	2,5,6
Butanoato metílico	5
Butanoato etílico	1,2,3,4,5,6
Hexanoato etílico	1,2,5,6
Acetato (Z)-3-hexenil	2,4,5,6
Octanoato etílico	1,2,4,5,6
Octanoato octílico	1,3,4,5,6
β -hidroxibutanoato etílico	5
Benzoato metílico	2,5
benzoato etílico	3,4,5,6
t-hexalactona	5
Acetato benzílico	5
Heptanoato (2)-3-hexenil	5
Acetato feniletílico	5
Propanoato etilfenílico	5
t-octalactona	3,5
Acetato 3-fenilpropílico	5
Decanoato hexílico	5
Acetato (2)-9-tetradecílico	5
Cinamato etílico	4,5
δ -decalactona	5
Acetato cinámico	2,4,5,6
t-decalactona	3,5
Ftalato dietílico	5
t-dodecalactona	5

Tabla 5. Lista de los hidrocarburos y compuestos misceláneos que forman el aroma del fruto de la guayaba.

HIDROCARBUROS	REFERENCIAS*
Tolueno	1,5
o-xileno	5
m-xileno	5
p-xileno	5
limoneno	1,3,5
t-terpineno	5
β -cariofileno	1,3,4,5,6
α -humuleno	1,5
β -bisaboleno	1,5
α -pineno	3
β -pineno	3
Miriceno	3
α -copaeno	3
COMPUESTOS MISCELANEOS	
Mercaptano	5
2-metil,5-propilfuran	1,5
2-pentilfuran	5
N,N-dimetilformamida	5
Oxido (Z)-linalool	5
Eter dietilformamida	5
N-metilpirrolidona	5
Eter dietilenglicolmonobutil	5
Dimetil sulfona	5
Fenol	5

Referencias*

- 1 Macleod, A. J y N. González de Troconis (1982).
- 2 Idstein, H. y P. Schreier (1985).
- 3 Askar y col., (1986).
- 4 Chyau y col., (1989).
- 5 Nishimura y col., (1989).
- 6 Chyau y col., (1992).

Dentro de ellos algunos han sido utilizados por otros investigadores como una posible alternativa para controlar las enfermedades poscosecha en frutos.

IV. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar el potencial de algunos compuestos volátiles constituyentes del aroma del fruto de la guayaba como una posible alternativa para el control de enfermedades poscosecha de este fruto.

4.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- A. Aislar e identificar algunos de los principales agentes fitopatógenos causales de enfermedades poscosecha del fruto de guayaba (*Psidium guajava* L).
- B. Definir mediante ensayos "*in vitro*" la concentración de algunos de los compuestos volátiles constituyentes del aroma a la cual se observe un efecto fungicida sobre los agentes fitopatógenos causales de enfermedades poscosecha del fruto de guayaba.
- C. Definir en ensayos "*in vivo*" de algunos compuestos volátiles las concentraciones que demuestren un efecto fungicida contra los agentes causales de enfermedades poscosecha de este fruto.

V. HIPOTESIS

Ho El aumento en la concentración de compuestos volátiles constituyentes del aroma del fruto de la guayaba permiten el control de las enfermedades poscosecha del mismo. Sin dañar la calidad del fruto.

VI. MATERIALES Y METODOS

6.1 ORIGEN DE LOS FRUTOS

Los frutos utilizados en el presente estudio se obtuvieron de dos huertas ubicadas en las dos principales regiones productoras del país: Calvillo, Ags. y Jalpa, Zac. Para este estudio en particular se eligieron frutos de la variedad "*media china*" los cuales se caracterizan por su color de pulpa amarillo. Los frutos fueron elegidos en un estado de madurez de consumo y con visibles daños patológicos. Se realizaron los muestreos en la zona de producción durante los meses de Noviembre y Diciembre del año de 1994, siendo la principal época de producción de este fruto. Las características macroscópicas generales de las zonas afectadas de los frutos fueron registradas para servir de comparación en los posteriores estudios de reproducción de las enfermedades.

6.2 TRATAMIENTO DE LOS FRUTOS

Los frutos recolectados fueron colocados en bolsas de papel estéril y transportados al laboratorio de frutipatología del Colegio de Postgraduados en Montecillo, Edo de México. Para el conocimiento de los agentes causales de las enfermedades se siguieron los postulados Koch, estos consisten en: observación de la sintomatología de la enfermedad, aislamiento e identificación del microorganismo causante de la enfermedad, inoculación en hospederos susceptibles y reproducción de la sintomatología.

6.3 AISLAMIENTO DE HONGOS FITOPATOGENOS

En el laboratorio los frutos fueron desinfectados superficialmente sumergiéndolos en una solución de hipoclorito de sodio al 1 % durante un minuto; posteriormente, secados con papel esterilizado en autoclave. Se procedió al aislamiento de microorganismos de la siguiente forma: A partir de las áreas afectadas del fruto se obtuvieron de tres a cuatro secciones de tejido por cada uno de los frutos, estas fueron colocadas en una cámara húmeda (caja petri con 100 % de humedad relativa) e incubadas a

25°C durante 24 a 48 horas, los cortes de los tejidos fueron observados hasta que los hongos patógenos desarrollaron micelio. Se tomaron diez muestras distintas de este micelio mediante aguja de disección estéril y se transfirieron a diez cajas de petri con medio de cultivo PDA (agar papa dextrosa), realizándose la siembra del mismo en el centro de las cajas, una vez inoculadas con el micelio fueron incubadas a 25°C durante períodos que variaron de 24 a 120 horas con el fin de lograr un pleno desarrollo del microorganismo.

6.4 IDENTIFICACION DE LOS HONGOS FITOPATOGENOS

Para la identificación de los hongos causantes de las enfermedades poscosecha se utilizaron las claves de identificación de Alexopoulos y Mims (1979) y las de Barnett y Hunter (1972). Para esto, los cultivos puros fueron incubados a 25°C durante 10 días y fueron registradas sus características macroscópicas de las colonia como color, aspecto y formación de cuerpos fructíferos así como las microscópicas, forma de micelio y la forma de la espora.

6.5 REPRODUCCION DE LA SINTOMATOLOGIA DE LAS ENFERMEDADES

Con las esporas que produjeron cada microorganismo en medio PDA, se realizaron los ensayos para reproducir los síntomas de las enfermedades; los cuales consistieron en inoculaciones en campo y en laboratorio.

6.5.1 Inoculación en campo

Para la producción de las esporas en poblaciones altas de los diferentes hongos se utilizó un medio de grano de trigo preparado de la siguiente forma:

El grano de trigo fue llevado a ebullición durante 30 min en agua; una vez realizada esta operación, se colocaron aproximadamente 30 g de trigo en frascos de vidrio de 125 ml y se esterilizó a 1.2 Kg/cm² y 15 min. A partir de los cultivos puros en el medio PDA se transfirió una hasada de propágulos de cada hongo al medio de trigo y se incubaron durante 10 días a temperatura ambiente.

En esta condición se trasladaron los cultivos al campo de experimentación. Se seleccionaron 75 frutos en estado de madurez amarillo firme para realizar las inoculaciones de cada uno de los microorganismos identificados. Cada fruto fue desinfectado "*in situ*" con alcohol etílico al 70% aplicado con hisopo, sobre cada fruto se hicieron tres perforaciones pequeñas en las que se aplicaron las distintas suspensiones de esporas. Después de 2 semanas los frutos fueron observados, recolectados y llevados al laboratorio para reiniciar su aislamiento e identificación de los mismos y comprobar los postulados de Koch.

6.5.2 Inoculación en el laboratorio

Con el objeto de reproducir de igual forma la sintomatología de las enfermedades en el laboratorio se realizaron inoculaciones de distintos frutos. Los cultivos puros fueron llevados a esporulación en medio PDA durante diez días a temperatura ambiente. Cuando los cultivos habían esporulado se inocularon matraces Erlenmeyer de 250 ml con medio PDA incubándose nuevamente durante 10 días a temperatura ambiente. Con los cultivos ya esporulados se obtuvo una suspensión de esporas mediante la adición de 100 ml de agua destilada estéril y agitación con una barra magnética sobre la superficie del agar. Los frutos a inocular fueron desinfectados con alcohol etílico al 70 % aplicado con la ayuda de un hisopo. Para la inoculación se hicieron perforaciones de 5 mm de diámetro por 8 mm de profundidad en las cuales fueron depositados 20 μ l de las suspensiones de esporas, los frutos inoculados fueron mantenidos en una cámara de crecimiento a 25°C y 85 % de HR durante diez días, las observaciones de las zonas inoculadas fueron realizadas diariamente hasta observar el desarrollo de la enfermedad.

6.6 ESPORULACION DE HONGOS FITOPATOGENOS PARA LOS DIFERENTES ENSAYOS

De acuerdo a los estudios desarrollados por Vaughn y col., (1993) y Sholberg y Gaunce (1995) se usaron niveles de 4×10^4 y 10^5 esporas por mililitro de suspensión, es decir, un paquete saturado de esporas donde no quedaría espacio para otro material. De acuerdo a estos autores, por este medio

se asegura el completo desarrollo del microorganismo en los distintos ensayos tanto "*in vitro*" como "*in vivo*". También estos autores indicaron que los resultados obtenidos en los estudios de control de crecimiento de estos microorganismos son más representativos si se parte de poblaciones muy altas. Las esporulaciones que se obtuvieron en el medio PDA fueron muy pobres por lo que se realizaron diferentes estudios para lograr una esporulación abundante que permitiera obtener los niveles de esporas requeridos.

6.6.1 Medios de esporulación utilizados

Para inducir la esporulación de los cultivos puros se utilizaron diferentes medios que han sido probados para este efecto.

Agar harina de maíz. Este medio es útil para el aislamiento y esporulación de algunas especies de hongos.

Preparación: 50 g de harina de maíz se suspendieron en 500 ml/L de agua y la suspensión fue tratada a 60°C durante una hora con el objeto de extraer la mayor cantidad de almidón posible. Después del tratamiento la suspensión fue filtrada con gasa y el filtrado se aforó a un litro con agua destilada. A la suspensión se agregaron 18 g de agar, se mezclaron y se esterilizaron en autoclave a 1.2 Kg/cm² durante 15 minutos (French y Hebert, 1980)

Agar de ejotes. Este medio es recomendado para la esporulación de especies de *Colletotrichum* sp. en medios sintéticos.

Preparación: En una licuadora, se molieron 400 g de ejotes frescos en agua destilada, la mezcla fue filtrada con gasa, el filtrado se aforó a un litro con agua destilada y se agregaron 18 g de agar. La mezcla fue esterilizada en autoclave a 1.2 Kg/cm² durante 15 minutos (Dhingra y Sinclair, 1985).

Agar papa dextrosa (PDA). Es utilizado para promover el crecimiento de un gran número de hongos cultivables y para el aislamiento de estos cuando no hay contaminación bacteriana.

Preparación: Se disolvieron 39.5 g Agar Papa Dextrosa en un litro de agua destilada, posteriormente fue esterilizado en autoclave a 1.2 Kg/cm² durante 15 minutos (French y Hebert, 1980).

Agar V-8. Este medio ha sido utilizado para hacer esporular a muchos géneros de hongos y para ello se utiliza el jugo V-8 de la compañía Campbell Soup Co. el cual contiene extractos de tomate, zanahoria, apio, perejil, lechuga, betabel, espinaca y berro.

Preparación: El contenido de un frasco o una lata de jugo V-8 se aforó a un litro con agua destilada, se agregaron 3 g de carbonato de calcio y 18 g de agar. La mezcla fue esterilizada en autoclave a 1.2 Kg/cm² durante 15 minutos (Vaughn y col., 1993).

Agar nutritivo. Este se utiliza para el aislamiento, identificación y conservación de las cepas bacterianas y de hongos.

Preparación: Se disolvieron 18 g de agar en un litro de agua. El medio disuelto fue esterilizado en autoclave a 1.2 Kg/cm² durante 15 minutos (French y Hebert, 1980).

Agar agua acidificado. Este medio es apropiado para el aislamiento de hongos radiculares, vasculares y foliares. La acidez y carencia de nutrientes hace que las bacterias no se desarrollen, con lo que es menos complicado la obtención de un cultivo libre de bacterias contaminantes.

Preparación: Se disolvieron 18 g de agar en un litro de agua destilada, la mezcla se esterilizó en autoclave a 1.2 Kg/cm² durante 15 min y posteriormente se agregaron 2 ml de ácido láctico (French y Hebert, 1980)

Agar Capek-Dox. Este medio se ha utilizado para hacer esporular a muchos hongos en medios sintéticos.

Preparación: 45.4 g del medio se disolvieron en un litro de agua destilada. El medio disuelto se esterilizó en autoclave a 1.2 Kg/cm² durante 15 minutos (Dhingra y Sinclair, 1980).

6.7 OBTENCION DE ESPORAS DE LOS CULTIVOS PUROS

Treinta ml de cada uno de los 7 medios de cultivo fueron puestos en matraces Erlenmeyer de un volumen de 250 ml e inoculados con una asada de micelio proveniente de los cultivos puros. Los matraces fueron incubados a 25°C durante 10 días, después del período de incubación, a cada matraz se les agregaron 100 ml de agua destilada estéril, una gota de TWEEN 20 (polioxietileno sorbitan monolaurato) y una barra magnética estéril; cada matraz se colocó sobre un agitador magnético para dar una agitación suave y de esta forma obtener las suspensiones de esporas de cada uno de los hongos que crecieron en cada medio de cultivo. Las suspensiones fueron filtradas con gasa estéril con el objeto de retirar el micelio y otros propágulos de los hongos.

6.8 AJUSTE DE LA CONCENTRACION DE ESPORAS REQUERIDA

Para el conteo de esporas inicial y final se utilizó un hematocitómetro (American Optical Corp., Buffalo, N.Y. EUA.) o cámara de Neubauer el cual consiste de una pieza de vidrio con una área profunda en forma de H en el centro que conforma las áreas de conteo. Tiene altos relieves que mantienen el cubreobjetos a la distancia adecuada arriba de esas áreas. El cubreobjetos y la plataforma de conteo están pulidos para asegurar el contacto de sus superficies con los altos relieves del portaobjetos especial. Cada una de las áreas de conteo tiene un rayado Neubauer de 9 mm² (3 mm por lado) dividido en nueve cuadrados principales (C.P) de 1 mm por lado y están divididos en 16 cuadrados menores de 0.05 mm por lado. El cálculo de la concentración de esporas se realizó utilizando la formula de French y Hebert (1980) y que se expresa de la siguiente forma:

$$N = n \times 2000$$

donde,

N = concentración de esporas (esporas/ml)

n = número de esporas en 5 cuadrados principales

Las concentraciones de esporas usadas en los estudios fue de 4×10^4 esporas/ml para *Pestalotia* sp. y *Colletotrichum gloeosporioides*, mientras para *Rhizopus* sp. fue de 4×10^5 esporas/ml, estas concentraciones fueron elegidas en base a las metodologías reportadas por Vaughn y col., (1993). Para obtener estas concentraciones fue necesario hacer diluciones con agua destilada estéril de las suspensiones obtenidas inicialmente y así lograr las concentraciones deseadas, la cual fue verificada mediante la misma metodología.

6.9 ENSAYOS "in vitro"

Se eligieron los siguientes compuestos para probar su actividad antifúngica el etanol, la acetona, la β -ionona, la 2-nonanona y el hexanol (Idstein y Scheier, 1985 y Vaughn y col., 1993), así como el hexanal (Gardner 1990). Para estos estudios se utilizaron los compuestos puros grado analítico de la compañía Aldrich Chemical Co., Milwaukee, WI. EUA con los siguientes niveles de pureza: Etanol absoluto 99%, acetona 99%, β -ionona 96%, 2-nonanona 99%, hexanal 96% y hexanol 97%.

6.9.1 Ensayos exploratorios

De acuerdo con los estudios toxicológicos reportados por Heath (1978) se señala que los compuestos usados en este trabajo son utilizados como fortificantes de aroma que están aprobados por la FDA como sustancias GRAS (generalmente reconocidas como seguras); además de estar presentes en el aroma de la guayaba, fundamentado en lo anterior se eligieron los siguientes seis compuestos

Alcoholes:

Etanol

Hexanol

Cetonas:

Acetona

β -ionona

2-nonanona

Aldehído:

Hexanal

Aunque la 2-nonanona no está reportada como parte del aroma de la guayaba, si está reportada con efectos fungicidas al igual que los anteriores volátiles.

Para establecer los límites aproximados de las concentraciones máximas que podrían soportar cada uno de los microorganismos aislados se realizaron ensayos exploratorios, en los cuales, se incrementó en múltiplos de 10 las concentraciones de cada uno de los volátiles y se observó al final de los períodos de incubación el grado de inhibición de crecimiento. Para cada concentración estudiada se utilizaron 10 tubos.

En las Tablas 6, 7 y 8 se muestran las concentraciones de los volátiles utilizadas para los ensayos exploratorios "*in vitro*". A cada tubo ensaye con tapón de rosca se les vertía 4.5 ml/l de medio de cultivo PDA sin gelificar y 0.5 ml/l de una solución de los compuestos volátiles de una concentración tal que en los 5 ml totales de cada tubo se obtuviera las concentraciones deseadas de cada volátil. Los tubos fueron agitados con un Vortex (Maxi mix II, Thermolyne, Dubuque, Iowa, EUA) para homogeneizar el volátil dentro del medio.

Los tubos se colocaron en forma inclinada y se dejaron enfriar a temperatura ambiente, los tubos con el medio gelificado se dejaron reposar durante 24 horas para verificar la existencia de contaminación bacteriana o de hongos, los tubos que presentaron contaminación fueron eliminados. Los tubos sin contaminación se sembraron con 20 μ l/L de las suspensiones de esporas de *Pestalotia* sp., *Rhizopus* sp. y *Colletotrichum gloeosporioides* respectivamente. Se incubaron a 25°C durante 10 días en una cámara de crecimiento (Convicon Products Co., Winnipeg, Man., Canada)

Tabla 6. Concentraciones de etanol (a) y acetona (b) utilizadas en las pruebas exploratorias de los ensayos "in vitro".

a)

No. MUESTRAS / HONGO	CONCENTRACION DE ETANOL EN μL		
	<i>Pestalotia sp.</i>	<i>Rhizopus sp.</i>	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>
10	100	1000	100
10	1000	10000	1000
10	10000	20000	10000
10	20000	40000	20000
10	30000	50000	30000
10	40000	60000	40000

b)

No. MUESTRAS / HONGO	CONCENTRACION DE ACETONA EN μL		
	<i>Pestalotia sp.</i>	<i>Rhizopus sp.</i>	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>
10	100	1000	100
10	1000	10000	1000
10	10000	20000	10000
10	20000	40000	20000
10	30000	50000	30000
10	40000	60000	40000

Tabla 7. Concentraciones de β -ionona (a) y 2-nonanona (b) utilizadas en las pruebas exploratorias de los ensayos "in vitro".

a)

No. MUESTRAS HONGO	CONCENTRACION DE β -IONONA EN μ l/L		
	<i>Pestalotia sp.</i>	<i>Rhizopus sp.</i>	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>
10	10	100	10
10	100	1000	100
10	500	10000	500
10	1000	20000	1000
10	1500	40000	1500
10	2000	50000	2000

b)

No. MUESTRAS HONGO	CONCENTRACION DE 2-NONANONA EN μ l/L		
	<i>Pestalotia sp.</i>	<i>Rhizopus sp.</i>	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>
10	10	100	10
10	100	1000	100
10	1000	10000	1000
10	10000	15000	10000
10	15000	30000	15000
10	20000	40000	20000

Tabla 8. Concentraciones de hexanal (a) y hexanol (b) utilizadas en las pruebas exploratorias de los ensayos "in vitro".

a)

No. MUESTRAS / HONGO	CONCENTRACION DE HEXANAL EN μL		
	<i>Pestalotia sp.</i>	<i>Rhizopus sp.</i>	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>
10	10	10	10
10	100	100	100
10	1000	1000	1000
10	1500	1500	1500
10	2000	2000	2000
10	2500	2500	2500

b)

No. MUESTRAS / HONGO	CONCENTRACION DE HEXANOL EN μL		
	<i>Pestalotia sp.</i>	<i>Rhizopus sp.</i>	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>
10	10	10	10
10	100	100	100
10	1000	1000	1000
10	1500	1500	1500
10	2000	2000	2000
10	2500	2500	2500

6.9.2 Ensayos definitivos.

A partir de las concentraciones en las cuales ya no se observó crecimiento en los estudios exploratorios se estableció el rango de concentraciones a estudiar en forma definitiva. Este estudio se realizó de la forma descrita en el apartado anterior pero se incremento el número de repeticiones a 27 para cada microorganismo y para cada concentración estudiada. Las concentraciones utilizadas se muestran en las Tablas 9, 10 y 11.

6.10 ENSAYOS "in vivo"

Para los estudios "in vivo" se utilizó una instalación de flujo de aire continuo con una velocidad de 100 a 130 ml/min de flujo de aire, este era humidificado antes de pasar por las soluciones de volátiles y los frutos, en la (figura 1) se muestra el sistema utilizado. Se eligieron tres compuestos de los seis estudiados en ensayos "in vitro" y estos se aplicaron sobre frutos de guayaba infectados por cada uno de los microorganismos identificados, estos compuestos fueron; etanol, 2-nonanona y hexanal en las concentraciones mínimas que mostraron inhibición del crecimiento de cada uno de los hongos en los ensayos "in vitro".

6.10.1 Desarrollo de los experimentos

Para cada ensayo se eligieron 120 frutos de guayaba sanos y sin daños aparentes en estado de madurez amarillo firme; los frutos fueron desinfectados por inmersión en una solución de hipoclorito de sodio al 1 % durante 1 minuto; posteriormente se les hizo una perforación de 5 mm de diámetro por 8 mm de profundidad con una sonda de acero inoxidable la cual era flameada para su esterilización entre cada una de los ensayos. En las perforaciones eran depositados 20 μ L de cada una de las suspensiones de esporas de *Pestalotia* sp. y *Colletotrichum gloeosporioides* a una concentración de 4×10^4 esporas/ml, mientras que para *Rhizopus* sp. fue de 4×10^5 esporas/ml.

Tabla 9. Concentración de etanol (a) y acetona (b) utilizadas para las pruebas definitivas de los ensayos "in vitro".

a)

No. MUESTRAS HONGO	CONCENTRACION DE ETANOL EN μ /L		
	<i>Pestalotia sp.</i>	<i>Rhizopus sp.</i>	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>
27	1000	10000	1000
27	10000	20000	10000
27	20000	40000	20000
27	25000	45000	25000
27	30000	50000	30000

b)

No. MUESTRAS HONGO	CONCENTRACION DE ACETONA EN μ /L		
	<i>Pestalotia sp.</i>	<i>Rhizopus sp.</i>	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>
27	1000	10000	1000
27	10000	20000	10000
27	20000	40000	20000
27	25000	45000	25000
27	30000	50000	30000

Tabla 10. Concentración de β -ionona (a) y 2-nonanona, (b) utilizadas para las pruebas definitivas de los ensayos "in vitro".

a)

No. MUESTRAS HONGO	CONCENTRACION DE β -IONONA EN μ l/L		
	<i>Pestalotia sp.</i>	<i>Rhizopus sp.</i>	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>
27	10	10000	10
27	100	20000	100
27	1000	30000	500
27	1100	35000	900
27	1200	40000	1000

b)

No. MUESTRAS HONGO	CONCENTRACION DE 2-NONANONA EN μ l/L		
	<i>Pestalotia sp.</i>	<i>Rhizopus sp.</i>	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>
27	1000	10000	1000
27	10000	15000	10000
27	13000	20000	13000
27	14000	25000	14000
27	15000	30000	15000

Tabla 11. Concentración de hexanal (a) y hexanol (b) utilizadas para las pruebas definitivas de los ensayos "in vitro".

a)

No. MUESTRAS HONGO	CONCENTRACION DE HEXANAL EN μL		
	<i>Pestalotia sp.</i>	<i>Rhizopus sp.</i>	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>
27	100	100	100
27	500	500	300
27	900	1000	500
27	1000	1100	800
27	1100	1200	900

b)

No. MUESTRAS HONGO	CONCENTRACION DE HEXANOL EN μL		
	<i>Pestalotia sp.</i>	<i>Rhizopus sp.</i>	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>
27	100	100	100
27	1000	500	1000
27	1100	1000	1100
27	1200	1100	1200
27	1400	1200	1400

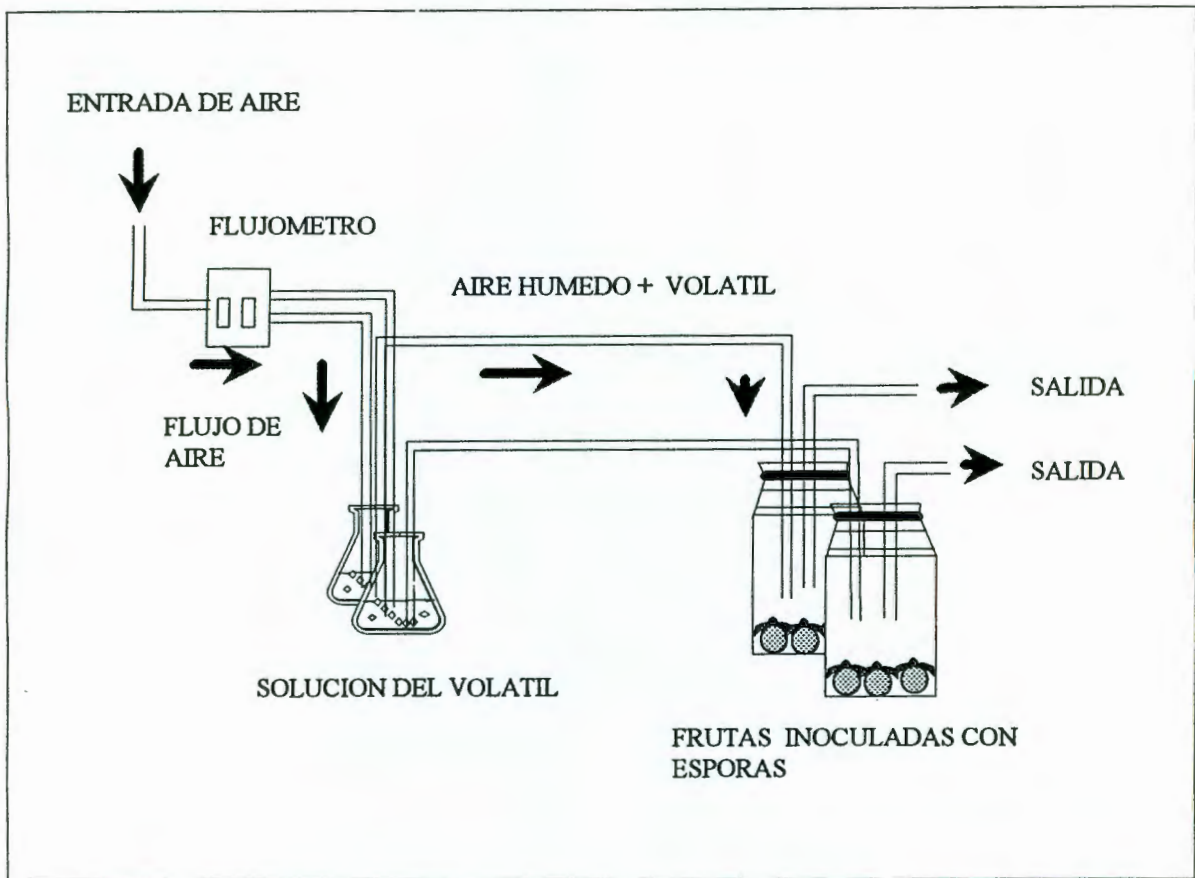


Fig. 1. Sistema de flujo continuo para la aplicación de los compuestos volátiles a los frutos de guayaba.

6.10.2 Estudio de los tiempos de exposición

Los 120 frutos de guayaba inoculados se dividieron en subgrupos de 10 guayabas, cada grupo se colocó en uno de 12 recipientes de vidrio con 3 litros de capacidad, estos se acoplaron al sistema de flujo de aire que pasaba por la solución de los compuestos volátiles. Las muestras fueron expuestas

durante 2, 4, 6, 24 y 48 horas, con etanol al 40 %, 2-nonanona al 3 % y hexanal al 0.01 %. Al final de cada tiempo se retiraron los recipientes, los frutos fueron colocados sobre charolas de plástico y puestos en una cámara de ambiente controlado a 25°C y 85 % de humedad relativa. Para efectos de comparación se corrió un grupo testigo, el cual también consistió de 10 frutos con las mismas características, con las perforaciones descritas y a las mismas inoculaciones de los microorganismos en estudio pero solo se expuso a la corriente de aire con un 85% de humedad relativa. Se hicieron evaluaciones visuales de los frutos a los 10 días, al final de dicho período se midieron los diámetros de las lesiones en cada uno de los frutos.

6.11 ANALISIS DEL "espacio de cabeza" EN LOS ENSAYOS "in vitro" E "in vivo"

La cuantificación de cada uno de los compuestos volátiles en estudio se realizó mediante cromatografía de gases; el fundamento de esta técnica se basa en una partición gas-líquido, donde, la muestra se introduce como gas en la cabeza de la columna los componentes tienen una solubilidad finita en la fase estacionaria se distribuyen entre esta y la fase gaseosa, según un coeficiente de reparto en base a dicha solubilidad. Se logra entonces la elusión por medio de la circulación de un gas inerte a través de la columna. La velocidad de los distintos gases a lo largo de la columna depende de su tendencia a disolverse en la fase estacionaria. Un coeficiente de reparto que favorezca al disolvente, da como resultado una baja velocidad; por el contrario, aquellos componentes cuya solubilidad en la fase estacionaria es despreciable se desplazan rápidamente por la columna. Teóricamente se obtiene curvas de elusión en forma de campanas de Gauss.

Para determinar la concentración de hexanal y 2-nonanona se tomaron muestras de 10 µl del "espacio de cabeza" que fueron inyectadas a un cromatógrafo de gases Varian modelo 3700 (Varian Associates, Inc. Walnut Creek, CA.EUA.) equipado con una columna empacada DEGS con 10 % de Carbowax (Alltech Associates, Inc. Deerfield, IL. EUA.) de 1/8" D:I X 2 m; utilizando nitrógeno como gas acarreador. Se usó un detector de ionización de flama y un integrador Varian 4400 (Varian Associates, Inc. Walnut Creek, CA. EUA.).

Las condiciones instrumentales para la cuantificación fueron:

Temperatura del horno:	250°C
Temperatura del inyector:	200°C
Temperatura del detector:	180°C
Flujo del aire:	80 ml/min
Flujo del Hidrógeno	40 ml/min
Flujo del Nitrógeno	60 ml/min

Las condiciones de integración fueron:

Velocidad de la carta:	0.5 cm/min
Atenuación	16

Las concentraciones de 2-nonanona y hexanal se calcularon por la interpolación de las unidades de área dada por el integrador e interpoladas en una curva de calibración definida para cada componente bajo las condiciones descritas anteriormente. Para la cuantificación de la concentración de etanol, se empleó el mismo equipo cromatográfico equipado con una columna empacada Porapak N (Varian Associates, Inc. Walnut Creek, CA.EUA.) de 1/8" D.I x 2 m, utilizando nitrógeno como gas acarreador. El detector de ionización de flama e integrador Varian 4400 (Varian Associates, Inc. Walnut Creek CA. EUA.).

Las condiciones instrumentales para la cuantificación fueron:

Temperatura del horno:	160 °C
Temperatura del inyector:	200 °C
Temperatura del detector	230 °C
Flujo de aire:	80 ml/min
Flujo de hidrógeno:	40 ml/min
Flujo de nitrógeno:	60 ml/min

Las condiciones de integración fueron:

Velocidad de carta: 0.5 cm/min

Atenuación: 16

La concentración del etanol en el "espacio de cabeza" de las muestras se calculó por la interpolación a partir de una curva de calibración definida bajo las condiciones descritas anteriormente.

6.12 ANALISIS ESTADISTICO

6.12.1 Ensayos "*in vitro*"

Las observaciones del crecimiento de los hongos en los ensayos "*in vitro*" se realizaron en 27 tubos para cada tratamiento y se utilizó una escala subjetiva del 0 al 100 la cual correspondía al porcentaje del área cubierta por el crecimiento del microorganismo en cuestión. Se siguió un diseño completamente al azar y se aplicó un análisis de varianza para evaluar el efecto de los tratamientos utilizando el paquete estadístico Statgraphics version. 5.0 (Statistical Graphics Corporation, Maryland, EUA.).

6.12.2 Ensayos "*in vivo*"

Las observaciones de las áreas afectadas se realizó mediante la medición del diámetro de la misma en cada fruto en milímetros. Se realizaron un total de 20 mediciones por tratamiento, se siguió un diseño completamente al azar y se aplicó un análisis de varianza para evaluar el efecto de los tratamientos empleando el paquete estadístico anterior, el análisis se realizó con el objeto de conocer cual fue el tiempo más adecuado de exposición.

3.7 IDENTIFICACION DE VOLATILES DEL FRUTO DE LA GUAYABA

Con el objeto de identificar los posibles compuestos presentes en el aroma del fruto de la guayaba con posibilidades antifúngicas se revisaron distintos trabajos.

MacLeod y Gonzalez de Troconis (1982) identificaron 52 compuestos volátiles en el aroma de guayaba a través de sistemas acoplados cromatografía de gases-espectroscopía de masas. Se observó que el aroma de la guayaba esta constituido por diferentes grupos químicos entre los cuales se encuentran los aldehídos, cetonas, esterés, sesquiterpenos, alcoholes y otros compuestos que no fueron identificados. De los 52 compuestos identificados, 39 fueron esterés, siendo los más importantes etil acetato, etil hexanoato y etil butanoato, estos son parte muy importantes en el aroma de guayaba y se agrupan en dos series, la primera formada por los esterés etílicos y la segunda incluye los acetatos, también, se identificaron 2 monoterpenos el limoneno y el miriceno, así como, 5 sesquiterpenos entre ellos α -copaeno, α -humuleno, α -selineno, β -cariofileno y β -bisaboleno.

Idstein y Schreier (1985) identificaron 154 compuestos volátiles de los cuales 116 fueron descritos por primera vez como constituyentes del aroma de la guayaba, cuantitativamente los aldehídos y los alcoholes de seis carbonos fueron los constituyentes predominantes en las muestras. Los compuestos fueron identificados con técnicas de cromatografía capilar de gases y por un sistema acoplado cromatografía de gases-espectrofotometría de masas. Se identificaron un total de 41 carbonilos, 35 esterés, 25 alcoholes, 22 hidrocarburos, 13 ácidos, 9 compuestos conteniendo azufre y 9 compuestos con clasificación diversa. De los carbonilos, los aldehídos, constituyen el 50% y todos ocupan un lugar en el aroma de la guayaba; muchos de estos compuestos son productos de la peroxidación de ácidos grasos insaturados. Entre los compuestos cetónicos considerados como productos de la degradación de los lípidos se encuentran el 1-penten-3-ol y el 1-octen-3-ol, siendo el mayor constituyente de este grupo la 3-hidroxi-2-butanona quizá esta sea un producto de la biogénesis de valina y leucina, otra clase importante son los esterés, los cuales son derivados de la α -oxidación de los ácidos grasos.

VII. RESULTADOS Y DISCUSION

7.1 MANEJO POSCOSECHA DEL FRUTO DE GUAYABA

El manejo poscosecha del fruto de la guayaba dentro de la zona de Calvillo, Ags. y Jalpa, Zac. no es simple, se pueden observar distintos procedimientos de manejo, los cuales van desde operaciones de recolección y empaque en la propia huerta de producción hasta sistemas en los que se trasladan los frutos a una empacadora en donde son clasificados por tamaño y color en forma automatizada.

En las (figura 2 y 3) se muestran los diagramas de flujo en los cuales se presentan los diferentes procedimientos que recibe este fruto durante su manejo poscosecha. En las regiones productoras de guayaba existen dos sistemas de selección y empaque, uno manual y otro automatizado, los dos sistemas requieren de mejorarse ya que los frutos son muy sensibles a los daños mecánicos y estos se manifiestan durante la maduración de los mismos, los frutos tienen una consistencia suave y muestran el mal manejo que reciben durante todo el proceso anterior.

El sistema manual consta de diferentes operaciones que conforman todo el proceso, dentro del cual se puede decir que hay cinco puntos donde se acentúan los problemas fitopatológicos; el primero es durante el corte ya que al separar los frutos del árbol, estos sufren lesiones donde se pueden dar las condiciones para el desarrollo de las enfermedades. El segundo punto es durante el vaciado de las cubetas de plástico a las cajas de madera en la huerta, en este punto es donde hay una gran posibilidad de infección de los frutos ya que son de una madera no lisa sin algún proceso de limpieza, además tienen astillas y clavos que causan daños mecánicos y sirven de entrada a los microorganismos acentuando los problemas fitopatológicos.

El tercer punto donde existe una notable oportunidad para que los frutos se infecten es al llegar al centro de selección, aquí estos se vacían en una rampa de madera con una abertura en su parte media por donde se desechan los frutos que no cumplen con los requisitos solicitados por el comprador. En esta rampa los frutos se separan por tamaño y color en forma manual y de acuerdo a los estándares

establecidos para este fruto (los cuales son muy variables entre cada productor y comprador). Conforme se hace la selección de los frutos se empaacan en cajas de madera de 13 Kg, durante todo este proceso los frutos continúan sufriendo daños mecánicos. La costumbre de llenar las cajas de madera o cartón por arriba de su volumen, trae problemas en el estibado de las cajas lo que ocasiona daños por compresión, más los que infringen las cajas de madera (astillas, clavos y golpes). Esto constituye el cuarto punto crítico que facilita la infección. Durante el transporte se incrementan los daños por los efectos de sobrellenado y vibración.

En el sistema automatizado se observan cuatro puntos críticos que acentúan los problemas fitopatológicos, el primer punto es durante la cosecha ya que no se utilizan las cajas de madera, en su lugar se usan cajas de plástico de 22 Kg las cuales no son sometidas a un proceso de limpieza, convirtiéndose en un punto de inóculo cada vez más concentrado.

La selección por tamaño se realiza en forma mecánica, lo cual, utilizando una máquina que permite seleccionar por tamaño o color, en ambos casos se utiliza un haz de luz que al paso de la fruta detecta el color (en este caso se analiza la luz reflejada por el fruto) o el tamaño (en este caso la máquina calcula el diámetro de la fruta por el tiempo que deja de incidir el haz de la luz sobre la fotocelda).

La computadora almacena los datos y determina el punto donde el fruto sera clasificado. También se utilizaron bandas divergentes y actualmente se utilizan clasificadoras de rodillos, lo cual ha incrementado la eficiencia de la operación. Sin embargo, en algunos casos los daños por abrasión aumentan en esta operación. El empaque se realiza en cajas de madera y cartón las cuales se sobrellenan por las exigencias del mercado y por lo tanto los daños por compresión y se incrementaron siendo el cuarto punto. En términos generales podemos decir que el manejo poscosecha de guayaba es deficiente porque los frutos sufren de daños mecánicos en las distintas etapas de los sistemas de manejo poscosecha. Estos daños son vías de entrada de los microorganismos fitopatógenos.

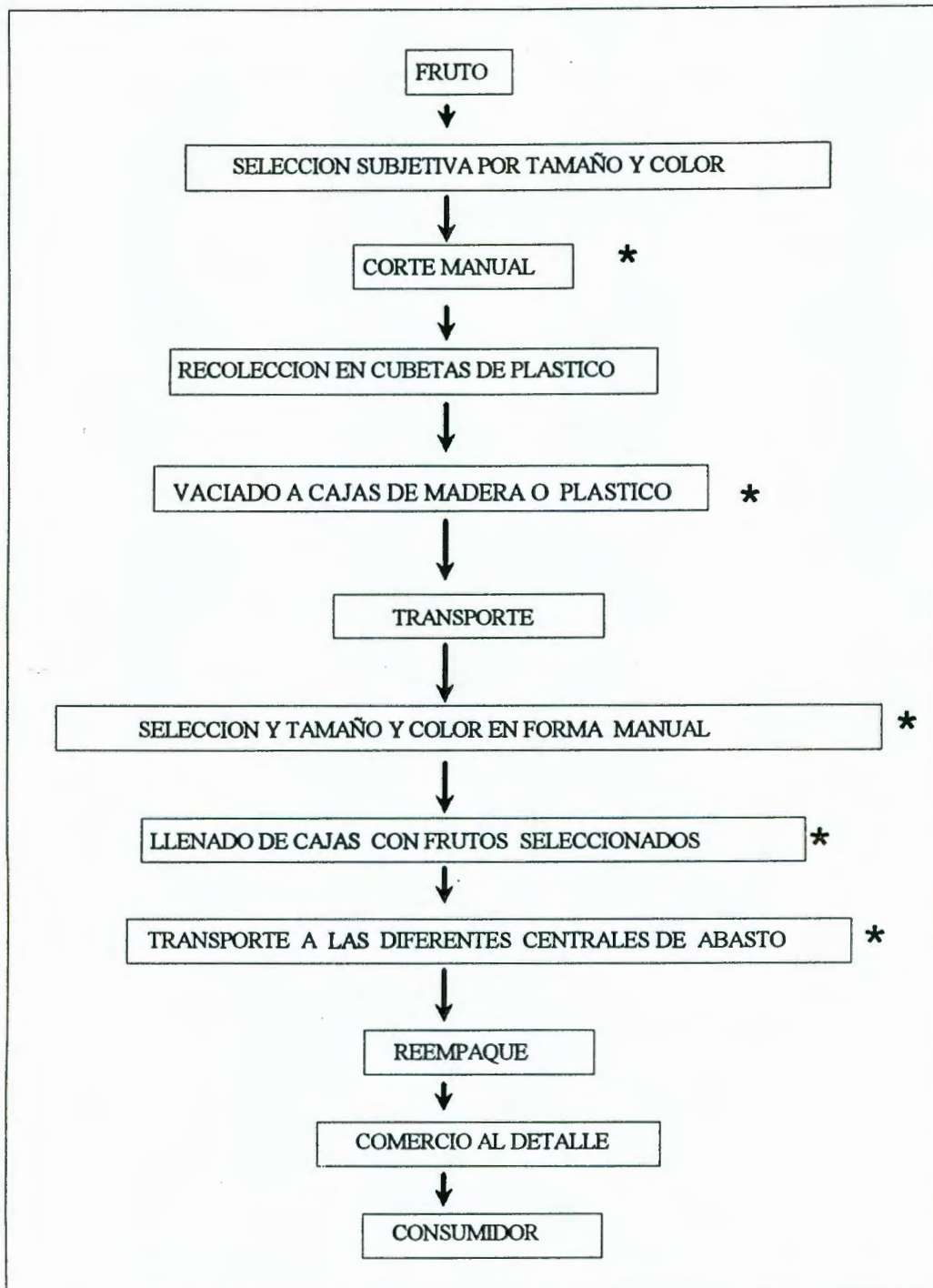


Fig. 2. Proceso de selección y empaque de los frutos de guayaba en forma manual y (*) los puntos de riesgo de problemas fitopatológicos

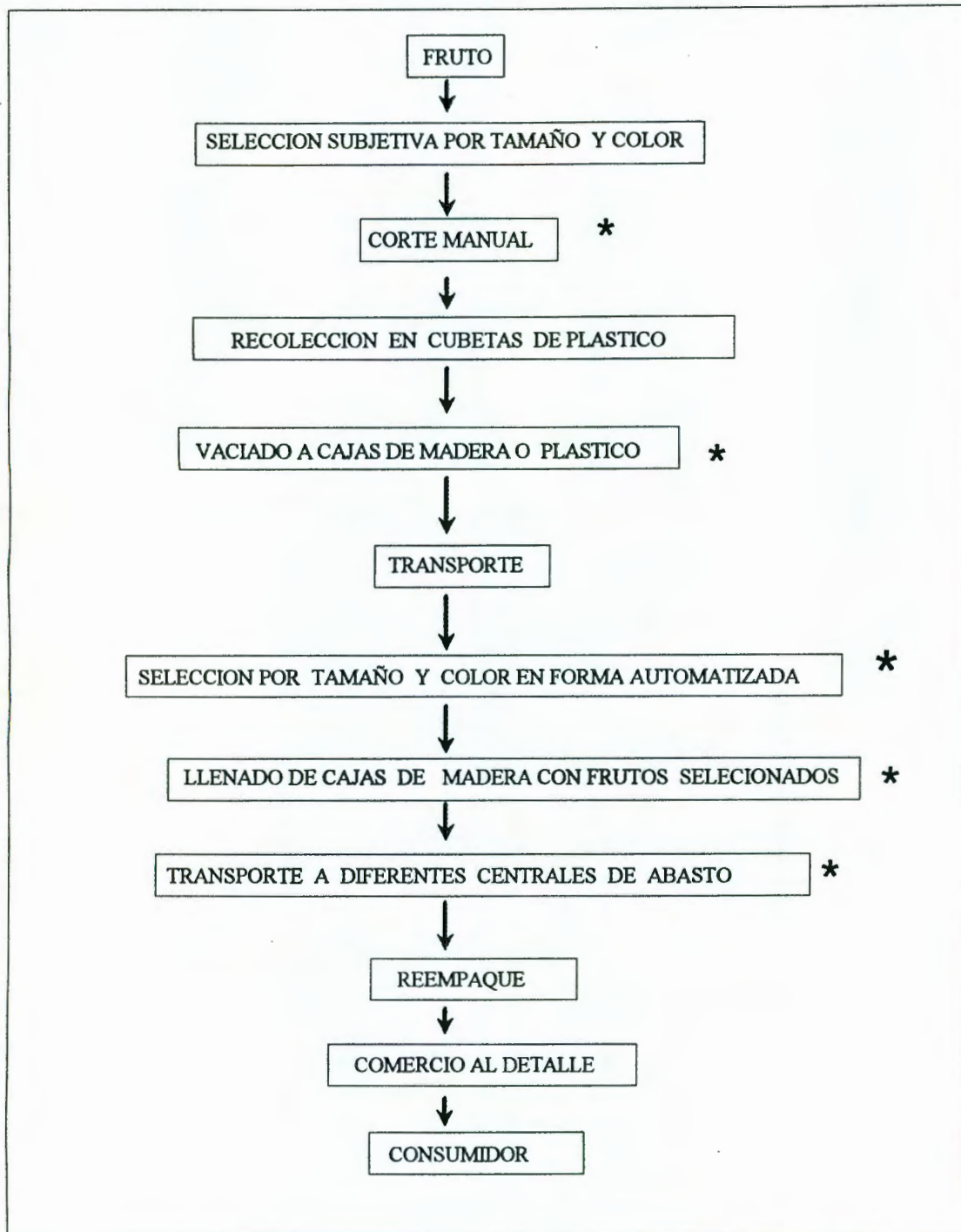


Fig. 3. Proceso de selección y empaque de los frutos de guayaba en forma automatizada y (*) los puntos de riesgo de problemas fitopatológicos

7.2 AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE HONGOS FITOPATÓGENOS CAUSANTES DE ENFERMEDADES POSCOSECHA DEL FRUTO DE LA GUAYABA.

En México no existe un estudio detallado del grado de incidencia que las enfermedades poscosecha tienen en los frutos de guayaba así como el nivel de pérdidas que estas ocasionan.

Madhukar y Reddy (1991) mencionan que en la India, la guayaba como cualquier otro fruto sufre de enfermedades en su etapa de comercialización arrojando pérdidas hasta de un 7.23 %. Las características típicas de cada una de las enfermedades producidas por estos hongos. De acuerdo con lo expresado en la metodología se realizaron un total de 120 observaciones cada una de las cuales procedía de diferentes secciones de frutos infectados.

El aislamiento de los microorganismos se hizo a partir de un conjunto de 50 frutos muestreados, mediante el procedimiento metodológico mencionado, se aislaron e identificaron los siguientes géneros y especie: *Pestalotia* sp., *Rhizopus* sp. y *Colletotrichum gloeosporioides*.

Las características taxonómicas que definen al género *Pestalotia* sp. son:

Reino: **Fungi**

División: **Eumycotina**

Clase: **Deuteromycotina**

Orden: **Melanconiales**

Familia: **Melanconiaceae**

Género: *Pestalotia* sp.

Pestalotia sp., forma un acérvulo oscuro de forma discoide, subepidérmico, con conidióforos cortos y simples, los conidios son oscuros, septados, con extremos hialinos y en uno de estos presenta tres apéndices hialinos tal como se muestra en la figura 4 (Barnet y Hunter 1972). Las esporas de este género se muestra en la (figura 5).

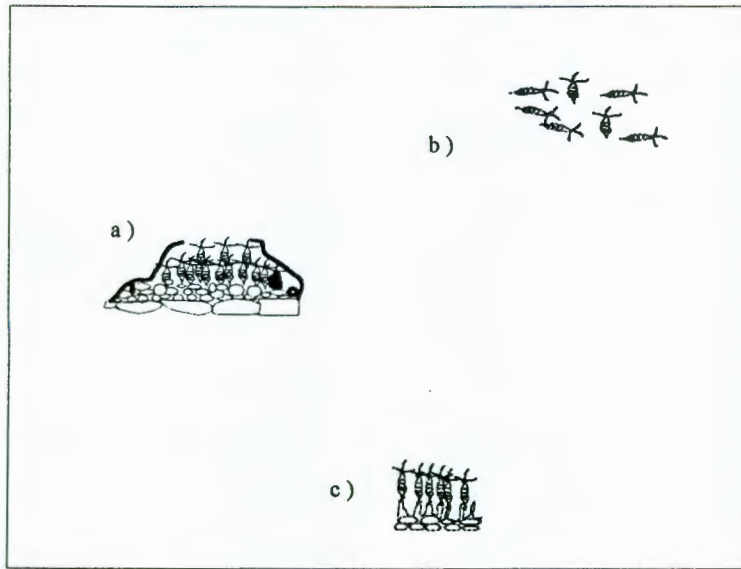


Fig. 4. Esquema del acérvulo (a), conidios (b) y conidióforos(c) de *Pestalotia* sp..



Fig 5. Esporas de *Pestalotia* sp.

Colletotrichum gloeosporioides pertenece a:

Reino: **Fungi**

Subdivisión: **Eumycotina**

Clase: **Deuteromycetes**

Orden: **Melanconiales**

Familia: **Melanconiaceae**

Género: ***Colletotrichum***

Especie: ***gloeosporioides***

Colletotrichum gloeosporioides presenta un acérvulo en forma de disco, de aspecto ceroso, subepidérmico y oscuro, tiene espinas en los extremos de los conidióforos, estos son simples y elongados, los conidios son hialinos, sencillos, ovoides (figura 6). Este hongo corresponde al estado imperfecto de *Glomerella cingulata*, (Barnet y Hunter, 1972). En la (figura 7) se muestra las esporas de este género.

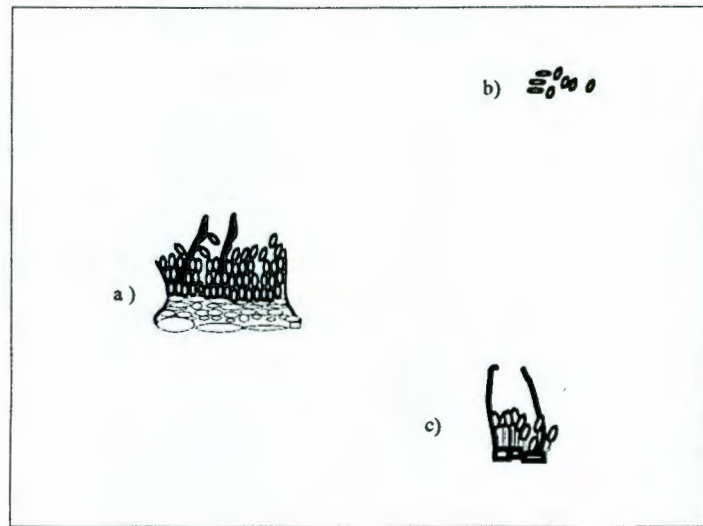


Fig. 6. Esquema del acérvulo (a), conidios (b) y conidióforos (c) de *Colletotrichum gloeosporioides*.



Fig. 7. Conidios de *Colletotrichum gloeosporioides*

Rhizopus sp. pertenece a:

Reino: **Fungi**

División: **Zygomycotina**

Subdivisión: **Zygomycetes**

Orden: **Mucorales**

Familia: **Melanconiaceae**

Género: *Rhizopus* sp.

Rhizopus sp. es un hongo que tiene un micelio blanco, cenocítico, algodonoso y produce esporas asexuales no móviles en esporangios, no presenta zoosporas. Cuando se unen dos cepas diferentes puede ocurrir la reproducción sexual dando como resultado la formación de esporas sexuales en estructuras llamadas zigosporas (figura 8). En la (figura 9) se pueden observar las esporas del hongo,

El estadio de reposo de esta puede ser de 1 a 3 meses. Después de la germinación ocurre meiosis; la zigospora se rompe y cada esporangióforo soporta al esporangio germinal en su punta de donde emergen las esporas.

El esporangio germinal es similar a los esporangios que se forman en la etapa asexual. Los esporangios pueden contener esporas de un solo tipo (+ ó -) o de los dos (+ y -) (Alexopoulos y Mims, 1979).

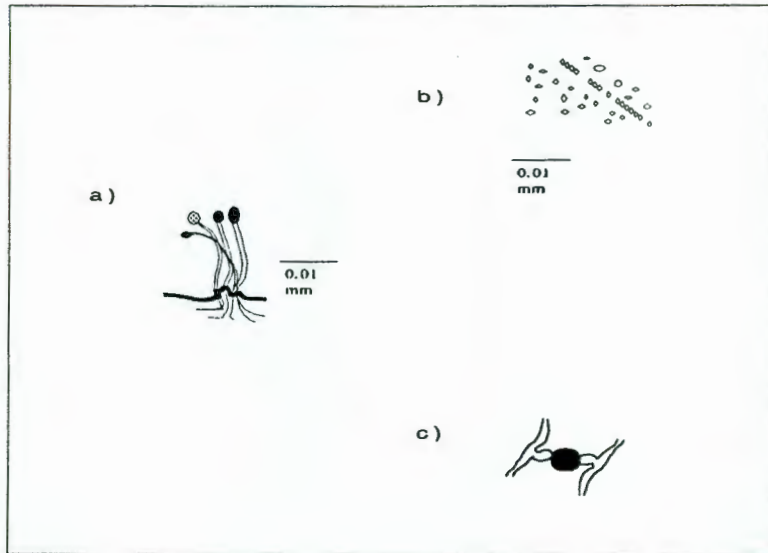


Fig. 8. Esquema del esporangi6foro (a), esporas (b) y zigospora (c) de *Rhizopus* sp..

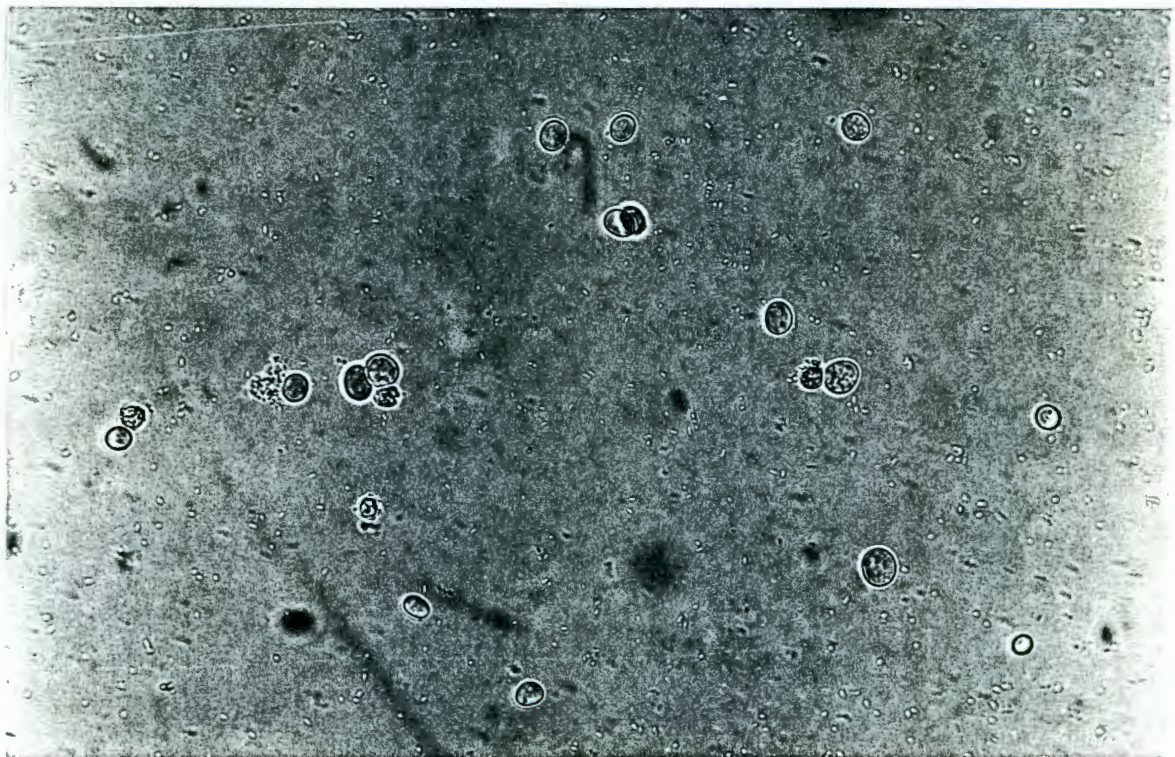


Fig. 9. Esporas de *Rhizopus* sp.

Laksminarayana y Moreno, (1978) trabajando con frutos de guayaba procedentes de la zona de Calvillo Ags., reportaron los siguientes géneros:

Pestalotia sp.

Colletotrichum sp.

Dothiorella sp.

Cytosporina sp.

Mucor sp.

Penicillium sp.

Botryodiplodia sp.

Phomopsis sp.

En este estudio se lograron aislar *Pestalotia* sp. y *Colletotrichum gloeosporioides* los cuales también fueron reportados por estos investigadores, por otro lado, se identificó al género *Rhizopus* sp. hongo no aislado por los investigadores antes mencionados. Sin embargo, este género se considera como un patógeno de poscosecha. Estos resultados también coinciden con algunos agentes aislados por Majumdar y Pathak (1989) trabajando con frutos de guayaba procedente del mercado de Jaipur, India; aislaron e identificaron los siguientes géneros y especies de hongos:

Colletotrichum gloeosporioides

Rhizopus sp.

Fusarium solani.

Phomopsis psidii.

Botryodiplodia theobromae.

Pestalotiopsis versicolor.

Phytophthora nicotianae var *parisitica*.

También Mata y Rodríguez (1985), reportan que el fruto de guayaba se encuentran los siguientes géneros y especies:

Mucor sp.

Aspergillus sp.

Penicillium sp.

Rhizopus sp.

Physalospora psidii

Thielaviopsis sp.

Gliocladium sp.

Cylindrocarpon sp.

Geotrichum sp.

Pestalotia psidii

Colletotrichum gloeosporioides

Las diferencias en los resultados pueden explicarse en función de las épocas de muestreo, lo que probablemente afecte la presencia o ausencia de microorganismos en un determinado hábitat tal como lo reportan Madhukar y Reddy (1991) quienes encontraron variaciones estacionales de los patógenos de la guayaba cultivada en la India. La aplicación de fungicidas en los cultivos y durante su manejo poscosecha son factores que pueden influir en la presencia o ausencia de los microorganismos fitopatógenos.

Es importante hacer notar que la presencia de *Colletotrichum gloeosporioides* es reportada en todos los trabajos mencionados anteriormente.

Madhukar y Reddy (1991) encuentran que *Colletotrichum gloeosporioides* es el hongo que se manifiesta en un mayor porcentaje durante todos los muestreos realizados. Durante el desarrollo de este trabajo, se pudo observar que este hongo y *Pestalotia* sp. se mostraron en forma persistente en las muestras.

7.2.1 Manifestaciones macroscópicas de las enfermedades

PUDRICION CAUSADA POR *Pestalotia* sp.



Fig. 10. Sintomatología de *Pestalotia* sp.

PUDRICION CAUSADA POR
Rhizopus sp.



Fig. 11. Sintomatología de *Rhizopus sp.*

PUDRICION CAUSADA POR
Colletotrichum gloeosporioides



Fig. 12. Sintomatología de *Colletotrichum gloeosporioides*.

Las lesiones causadas por *Pestalotia* sp. y *Colletotrichum gloeosporioides*, tienen una sintomatología parecida: Empiezan en el extremo distal del fruto, con una mancha de color café, la cual va creciendo conforme transcurre el tiempo, al final de 4 o 5 días, todo el fruto tiene esa coloración dando un aspecto desagradable. La enfermedad causada por *Rhizopus* sp. puede iniciar sobre heridas provocadas por los daños mecánicos o bien en el extremo distal del fruto. La enfermedad se presenta como una mancha incolora de consistencia acuosa, al pasar el tiempo, sobre la mancha comienza a crecer el micelio de color blanco, el cual cambia a negro por la formación de cuerpos fructíferos típicos del hongo.

La descripción de la sintomatología referente a *Colletotrichum gloeosporioides* y *Pestalotia* sp coincide con la hecha por Mata y Rodriguez (1985), y la de Lakshminarayana y Moreno, (1978).

7.3 REPRODUCCION DE LA SINTOMATOLOGÍA

7.3.1 Inoculaciones en campo

Se inocularon un total de 75 frutos para cada hongo estudiado; después de diez días se llevaron a cabo los registros de los frutos infectados, así como, de su recolección para llevar a cabo su reaislamiento en el laboratorio. En la Tabla 12 se muestran los porcentajes de los frutos infectados para cada uno de estos microorganismos.

Tabla 12. Porcentajes de los frutos infectados en el campo.

Hongo	<i>Pestalotia</i> sp.	<i>Rhizopus</i> sp.	<i>C. gloeosporioides</i>
No. muestra	75	75	75
infectadas	50	38	51
%	66,7	50.6	68

Se puede observar que los hongos *Pestalotia* sp y *Colletotrichum gloeosporioides* fueron los géneros de mayor incidencia, esto puede dar una idea de la capacidad infectiva de los hongos antes mencionados. A partir de muestras representativas de los frutos infectados se reaislaron los distintos hongos y se tuvieron evidencias plenas que las enfermedades observadas fueron causadas por cada uno de los hongos inoculados. El trabajo del aislamiento de los hongos no se hizo más extensivo para encontrar un mayor número de microorganismos porque el objetivo central del estudio fue conocer los efectos de los compuestos volátiles sobre algunos de los patógenos más persistentes causantes de enfermedades poscosecha de guayaba.

7.3.2 Inoculaciones en el laboratorio

En este trabajo se reprodujeron los síntomas típicos de las enfermedades bajo condiciones controladas, se inocularon 50 frutos por cada género y especie, en la Tabla 13 se resumen los porcentajes de los frutos infectados.

Tabla 13. Porcentaje de frutos infectados en el laboratorio.

Hongo	<i>Pestalotia</i> sp.	<i>Rhizopus</i> sp.	<i>C. gloeosporioides</i>
No. muestra	50	50	50
Infectadas	35	30	39
%	70	60	78

Nuevamente se observó una mayor capacidad infectiva de *Colletotrichum gloeosporioides* en el fruto, esto coincide con los resultados de Madhukar y Reddy (1991). A partir de las muestras de frutos infectados los hongos fueron reaislados y se comprobó la evidencia de que estos fueron los responsables de las sintomatologías de cada una de las enfermedades.

7.3.3 Esporulaci3n de los hongos

Entre los g3neros de hongos estudiados la producci3n de esporas en los medios elegidos fue diferente, en la Tabla 14 se muestran las concentraciones de esporas/ml obtenidas en las distintas suspensiones de cada uno de los siete medios .

Tabla 14. Concentraciones de las suspensiones de esporas obtenidas en diferentes medios de cultivo.

Hongo Medio	<i>Pestalotia</i> sp.	<i>Rhizopus</i> sp.	<i>C. gloeosporioides</i>
Agar Harina Maíz	1 a 2 x 10 ²	2 a 3 x 10 ³	1 a 2 x 10 ²
Agar Ejotes	1 a 2 x 10 ³	3 a 4 x 10 ³	3 a 4 x 10 ⁴
PDA	1 a 3 x 10 ⁴	8 a 9 x 10 ⁵	3 a 4 x 10 ²
Agar V-8	5 a 6 x 10 ⁵	3 a 4 x 10 ³	3 a 4 x 10 ³
Agar Nutritivo	5 a 6 x 10 ²	4 a 5 x 10 ⁴	3 a 4 x 10 ²
Agar Agua Acidulado	1 a 2 x 10 ²	2 a 3 x 10 ³	1 a 2 x 10 ²
Czapek-Dox	2 a 3 x 10 ²	3 a 4 x 10 ²	1 a 2 x 10 ²

Se puede observar que los medios de cultivo que dieron los mejores resultados en cuanto a la producci3n de esporas fueron:

Agar V-8, para *Pestalotia* sp.

Agar de ejotes para *Colletotrichum gloeosporioides*.

Estos son medios naturales que favorecen la esporulaci3n, porque son deficientes en sus fuentes de carbono y nitr3geno debido a esto, los hongos suprimen su crecimiento vegetativo e inducen su

esporulación (Dhingra y Sinclair 1985). Cabe señalar que *Rhizopus* sp. esporuló en medio PDA a una temperatura de 10°C.

7.4 ENSAYOS "in vitro"

7.4.1 Pruebas exploratorias

En las Tablas 15, 16, 17, 18, 19 y 20 se muestran las concentraciones a las cuales hubo inhibición de la germinación de las esporas de *Pestalotia* sp., *Rhizopus* sp. y *Colletotrichum gloeosporioides* respectivamente. Se emplearon distintas concentraciones de los compuestos volátiles presentándose diferencias en la inhibición de la germinación para cada uno de los géneros, es decir, la sensibilidad de cada hongo es distinta, siendo los más sensibles *Pestalotia* sp. y *Colletotrichum gloeosporioides* mientras, *Rhizopus* sp. fue el más resistente a los tratamientos.

Tabla 15. Efecto de la concentración de etanol (a), acetona (b) y β -ionona (c) sobre la germinación de las esporas de *Pestalotia* sp. en las pruebas exploratorias de los ensayos " *in vitro* ". Los datos son el promedio de 27 determinaciones.

a)

μ /L de ETANOL	% GERMINACION <i>Pestalotia</i> sp.
100	90
1000	90
10000	70
20000	60
30000	0
40000	0

b)

μ /L de ACETONA	% GERMINACION <i>Pestalotia</i> sp.
100	90
1000	90
10000	70
20000	60
30000	0
40000	0

c)

μ /L de β -IONONA	% GERMINACION <i>Pestalotia</i> sp.
10	100
100	90
500	70
1000	60
1500	0
2000	0

Tabla 16. Efecto de la concentración de 2-nonanona (d), hexanal (e) y hexanol (f) sobre la germinación de las esporas de *Pestalotia* sp. en las pruebas exploratorias de los ensayos " *in vitro* ". Los datos son el promedio de 27 determinaciones.

d)

μL de 2-NONANONA	% GERMINACION <i>Pestalotia</i> sp.
10	100
100	100
1000	90
10000	80
15000	0
20000	0

e)

μL de HEXANAL	% GERMINACION <i>Pestalotia</i> sp.
10	100
100	100
1000	30
1500	0
2000	0
2500	0

f)

μL de HEXANOL	% GERMINACION <i>Pestalotia</i> sp.
10	100
100	100
1000	30
1500	0
2000	0
2500	0

Tabla 17. Efecto de la concentración de etanol (a), acetona (b) y β -ionona (c) sobre la germinación de las esporas de *Rhizopus* sp. en las pruebas exploratorias de los ensayos " *in vitro*". Los datos son el promedio de 27 determinaciones.

a)

μ /L de ETANOL	% GERMINACION <i>Rhizopus sp.</i>
1000	100
10000	90
20000	70
40000	50
50000	0
60000	0

b)

μ /L de ACETONA	% GERMINACION <i>Rhizopus sp.</i>
1000	100
10000	90
20000	70
40000	50
50000	0
60000	0

c)

μ /L de β -IONONA	% GERMINACION <i>Rhizopus sp.</i>
100	100
1000	100
10000	90
20000	30
40000	0
50000	0

Tabla 18. Efecto de la concentración de 2-nonanona (d), hexanal (e) y hexanol (f) sobre la germinación de las esporas de *Rhizopus sp.* en las pruebas exploratorias de los ensayos " *in vitro*". Los datos son el promedio de 27 determinaciones.

d)

μL de 2-NONANONA	% GERMINACION <i>Rhizopus sp.</i>
100	100
1000	90
10000	90
15000	70
30000	0
40000	0

e)

μL de HEXANAL	% GERMINACION <i>Rhizopus sp.</i>
10	100
100	90
1000	60
1500	0
2000	0
2500	0

f)

μL de HEXANOL	% GERMINACION <i>Rhizopus sp.</i>
10	100
100	90
1000	60
1500	0
2000	0
2500	0

Tabla 19. Efecto de la concentración de etanol (a), acetona (b) y β -ionona (c) sobre la germinación de las esporas de *Colletotrichum gloeosporioides* en las pruebas exploratorias de los ensayos "in vitro". Los datos son el promedio de 27 determinaciones.

a)

μ /L de ETANOL	% GERMINACION <i>C. gloeosporioides</i>
100	100
1000	90
10000	80
20000	60
30000	0
40000	0

b)

μ /L de ACETONA	% GERMINACION
100	100
1000	90
10000	80
20000	60
30000	0
40000	0

c)

μ /L de β -IONONA	% GERMINACION <i>C. gloeosporioides</i>
10	100
100	90
500	80
1000	60
1500	0
2000	0

Tabla 20. Efecto de la concentración de 2-nonanona (d), hexanal (e) y hexanol (f) sobre la germinación de las esporas de *Colletotrichum gloeosporioides* en las pruebas exploratorias de los ensayos " *in vitro* ". Los datos son el promedio de 27 determinaciones.

d)

μL de 2-NONANONA	% GERMINACION <i>C. gloeosporioides</i>
100	100
1000	90
10000	80
20000	60
30000	0
40000	0

e)

μL de HEXANAL	% GERMINACION <i>C. gloeosporioides</i>
100	100
1000	90
10000	80
20000	60
30000	0
40000	0

f)

μL de HEXANOL	% GERMINACION <i>C. gloeosporioides</i>
10	100
100	90
500	80
1000	60
1500	0
2000	0

7.4.2 Pruebas definitivas

De acuerdo con los resultados obtenidos en los ensayos exploratorios se procedió a realizar los ensayos definitivos en los cuales se probaron concentraciones inferiores a las máximas observadas en los ensayos antes mencionados. En las figuras 13, 14, 15, 16, 17 y 18 se observa que al ir aumentando la concentración de los compuestos volátiles la germinación de las esporas disminuye en forma lineal presentándose el mismo comportamiento en los tres géneros de hongos estudiados.

En la Tabla 21 se presentan las concentraciones efectivas para inhibir la germinación de las esporas de *Pestalotia* sp., *Rhizopus* sp. y *Colletotrichum gloeosporioides*, estas concentraciones que inhibieron la germinación de las esporas en los ensayos "in vitro" es muy alta con respecto a las encontradas en el aroma del fruto de la guayaba (Chyau y col., 1992; Cherg-Cherg y Chung-May 1989; Nishimura y col., 1989; Askar y Bassiouny 1986; Idstein y Schreier 1985; McLeod y Gonzalez de Troconis 1982), no obstante, estos resultados sirven de punto de referencia para la evaluación del efecto de los compuestos volátiles en la guayaba.

En la literatura existen pocos trabajos "in vitro" sobre el efecto de compuestos volátiles sobre la germinación de esporas de hongos fitopatógenos aislados de frutos, sin embargo, Song y col., (1996) evaluaron el efecto de los vapores de hexanal sobre el crecimiento de *Penicillium expansum* y *Botrytis cinerea* propagados en medio PDA encontrando que una concentración de 450 ppm aplicada durante 48 horas fue efectiva para inhibir el crecimiento de los estos hongos.

En nuestro trabajo se usó una concentración mayor que el doble de hexanal que la usada por Song y col., (1996) lo cual es de esperarse ya que la sensibilidad de los hongos es distinta. No obstante, las concentraciones de esporas utilizadas por estos investigadores fueron de 3×10^5 , mientras que las utilizadas en este trabajo fueron de 4×10^4 y 4×10^5 . Con respecto al volumen de inóculo empleado en ambos trabajos fue distinto, siendo cuatro veces mayor el utilizado en el presente trabajo.

La diferencia en sensibilidad a los volátiles en distintos microorganismos no ha sido estudiada y de

igual forma el mecanismo por el cual estos compuestos actúan como inhibidores del crecimiento de los fitopatógenos. Este es un campo que debe investigarse para proporcionar un mayor conocimiento que permita plantear mejores estrategias en el control de las enfermedades.

French (1992) expresó algunos posibles mecanismos de la acción de los volátiles para estimular y/o inhibir la germinación de las esporas de microorganismos, entre los posibles mecanismos que menciona es la presencia de inhibidores de la germinación los cuales son eliminados por la presencia del volátil, por otro lado, menciona la presencia de receptores específicos para cada volátil en cada especie que activan el proceso de germinación, finalmente este investigador solo expresa que altas concentraciones de volátiles (250 a 1000 $\mu\text{L/L}$) pueden inhibir la germinación causando daños físicos a las esporas.

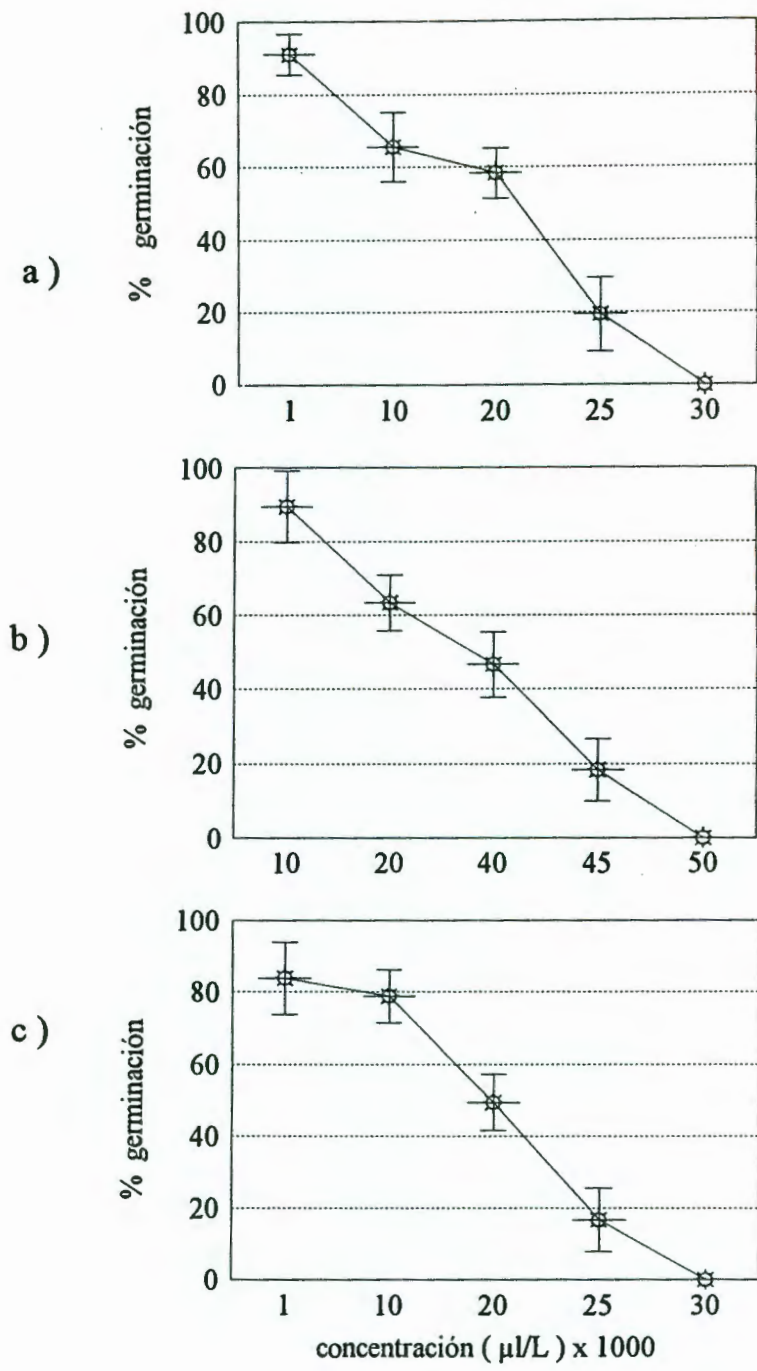
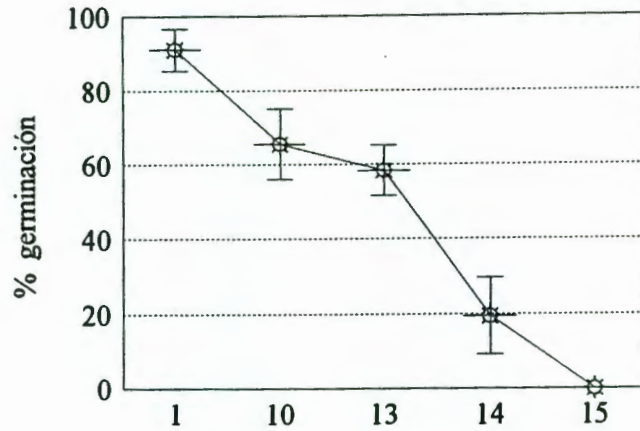
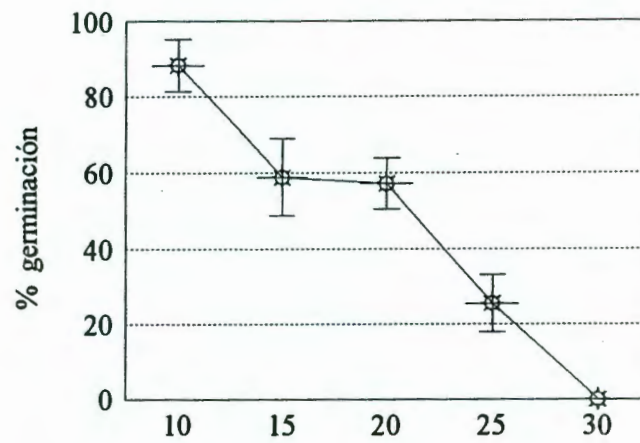


Fig. 13. Efecto de la concentración de etanol sobre la germinación de esporas de *Pestalotia* sp. (a), *Rhizopus* sp. (b) y *Colletotrichum gloeosporioides* en medio PDA. Cada datos es el promedio de 27 determinaciones.

a)



b)



c)

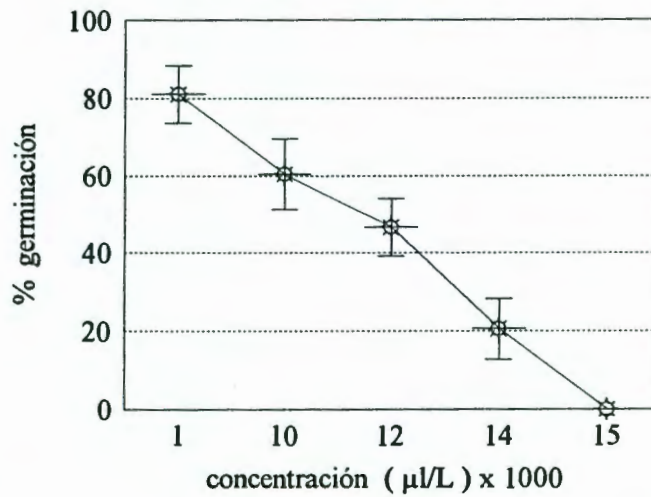
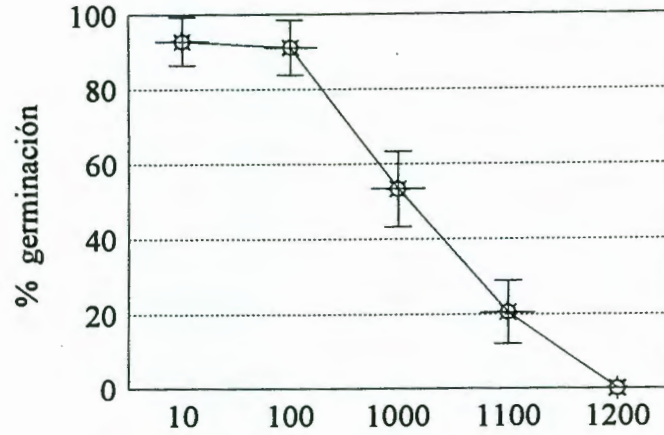
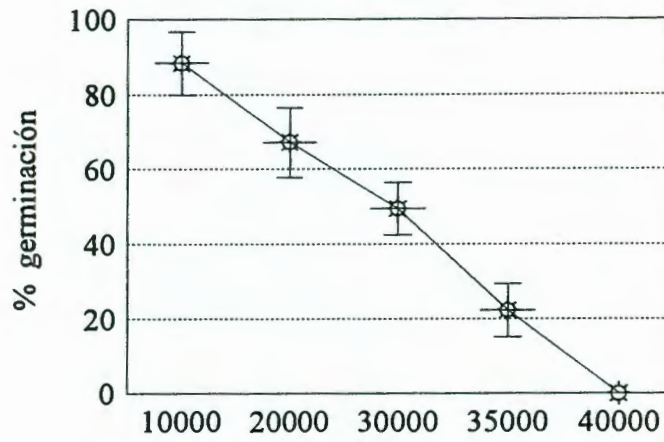


Fig. 14. Efecto de la concentración de acetona sobre la germinación de esporas de *Pestalotia* sp. (a), *Rhizopus* sp. (b) y *Colletotrichum gloeosporioides* en medio PDA. Cada datos es el promedio de 27 determinaciones.

a)



b)



c)

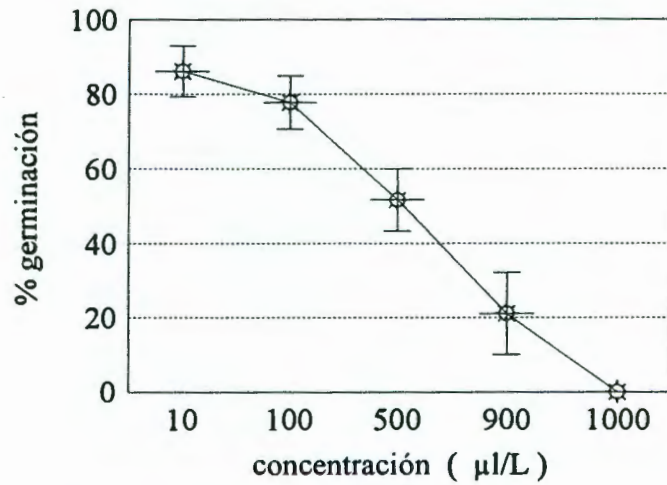


Fig. 15. Efecto de la concentración de β -ionona sobre la germinación de esporas de *Pestalotia* sp. (a), *Rhizopus* sp. (b) y *Colletotrichum gloeosporioides* en medio PDA. Cada datos es el promedio de 27 determinaciones.

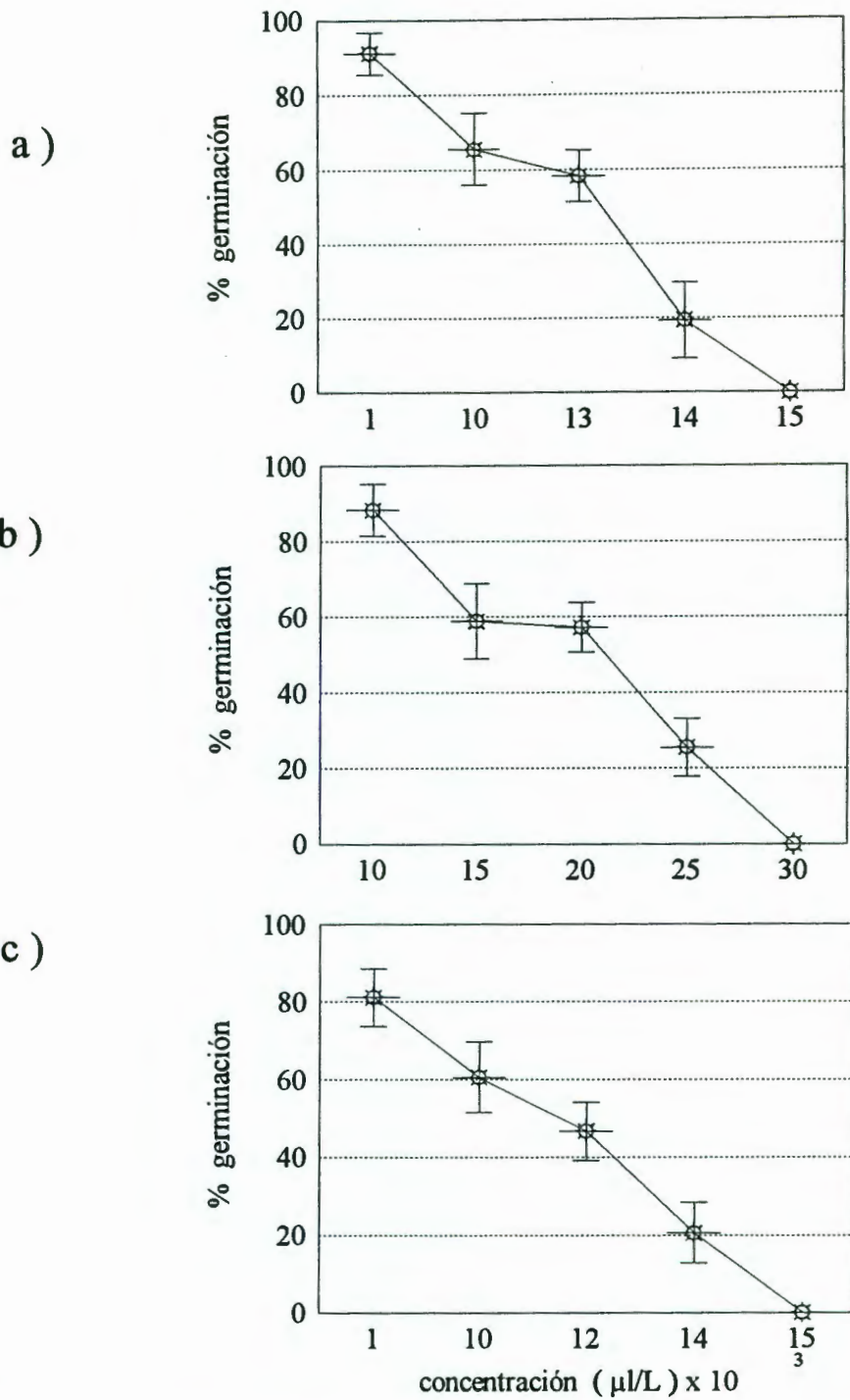


Fig. 16. Efecto de la concentración de 2-nonanona sobre la germinación de esporas de *Pestalotia* sp. (a), *Rhizopus* sp. (b) y *Colletotrichum gloeosporioides* en medio PDA. Cada datos es el promedio de 27 determinaciones.

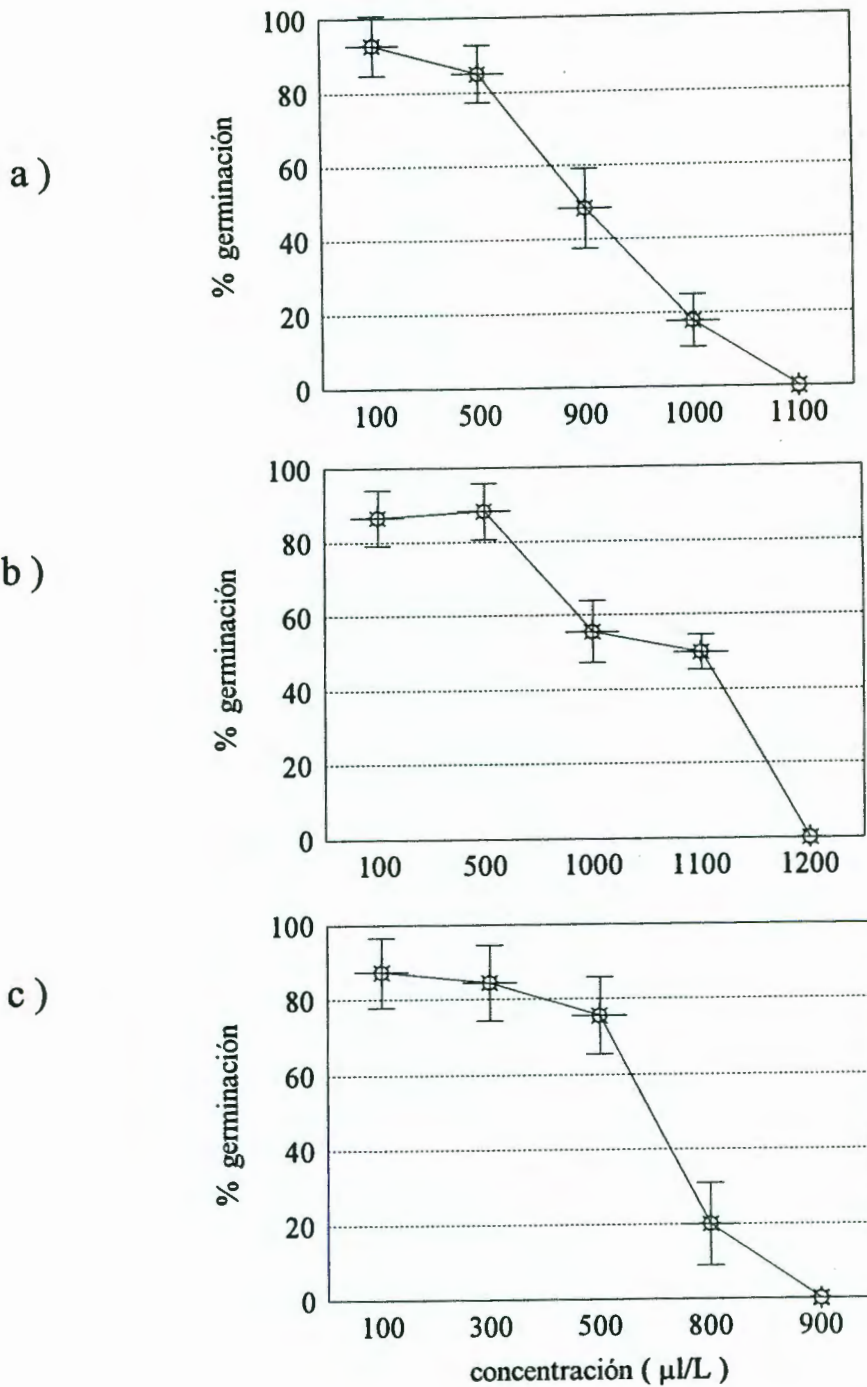


Fig. 17. Efecto de la concentración de hexanal sobre la germinación de esporas de *Pestalotia* sp. (a), *Rhizopus* sp. (b) y *Colletotrichum gloeosporioides* en medio PDA. Cada datos es el promedio de 27 determinaciones.

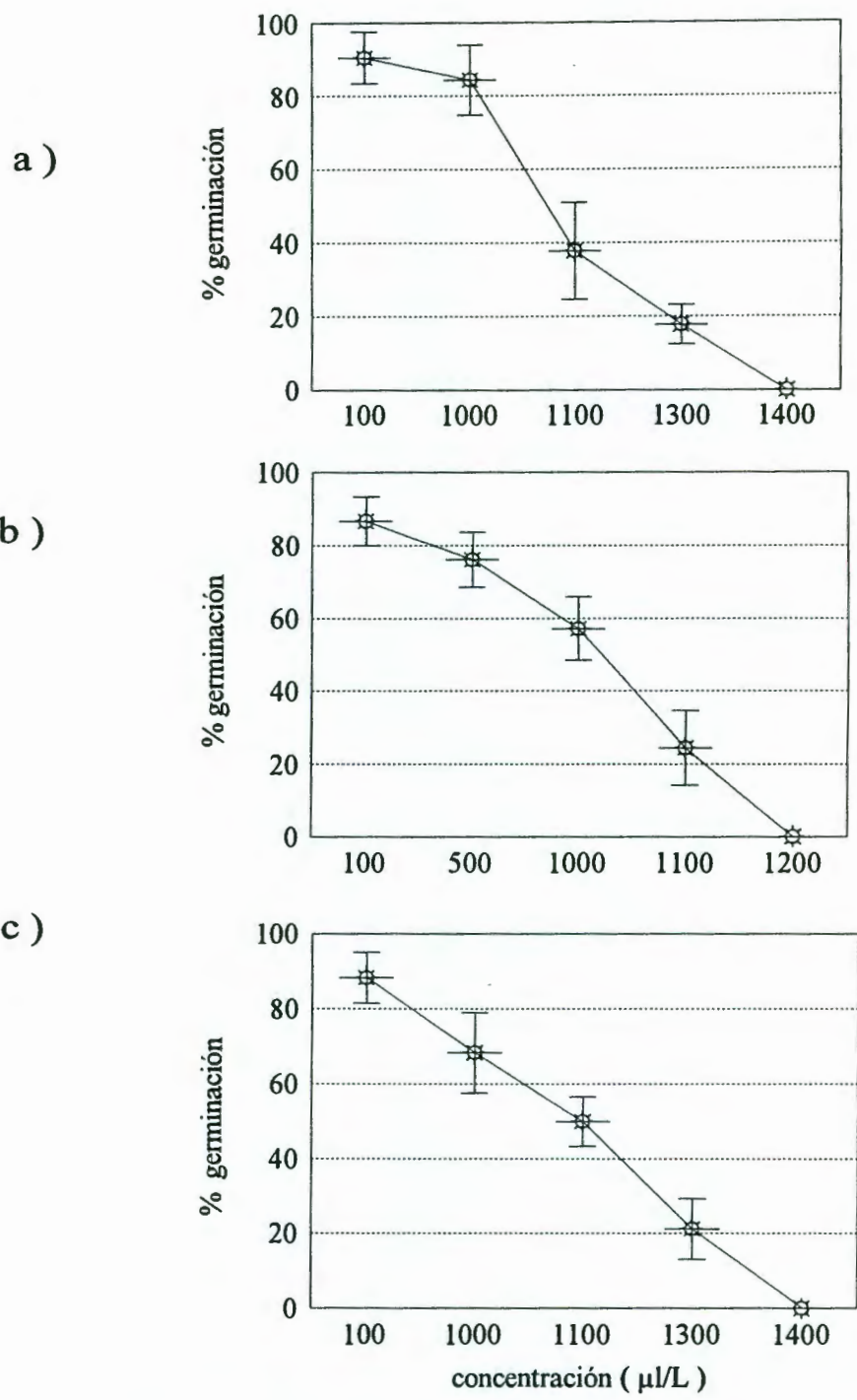


Fig. 18. Efecto de la concentración de hexanol sobre la germinación de esporas de *Pestalotia* sp. (a), *Rhizopus* sp. (b) y *Colletotrichum gloeosporioides* en medio PDA. Cada datos es el promedio de 27 determinaciones.

Tabla 21. Concentraciones con efecto fungicida de compuestos volátiles adheridos directamente en medio PDA.

volátiles hongos	CONCENTRACION ($\mu\text{l} / \text{L}$)		
	<i>Pestalotia sp.</i>	<i>Rhizopus sp.</i>	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>
etanol	30,000	50,000	30,000
acetona	30,000	50,000	30,000
β -ionona	1,200	40,000	1,000
2-nonanona	15,000	30,000	15,000
hexanal	1100	1,200	900
hexanol	1,400	1,200	1,400

7.4.3 Análisis del "espacio de cabeza"

En la figura 19 se muestra el comportamiento de la concentración de los compuestos volátiles usados en el estudio observamos que las concentraciones fue disminuyendo conforme pasó el tiempo.

La observación importante que surge de estos análisis es que dentro de los tubos de cultivo las concentraciones de los volátiles no se mantienen constantes durante el tiempo. Esto no concuerda con los resultados de crecimiento mostrado en el estudio de las distintas concentraciones. Sin embargo, dado que estos estudios muestran la evidencia experimental de que el fenómeno así ocurre; surge la interrogante del por qué si la concentración del volátil se ve disminuida con el tiempo, existe un efecto inhibitorio de la germinación de las esporas a concentraciones iniciales altas y por qué cuando hay concentraciones iniciales bajas no se muestra este efecto. Para tratar de explicar este fenómeno debe pensarse que los compuestos volátiles actúan en tiempos cortos, quizá dañando físicamente a las esporas.

French (1992) menciona que los compuestos volátiles aplicados en altas concentraciones causan daño físico a las esporas y a concentraciones bajas estimula la germinación. La presencia del volátil requiere de tiempos muy cortos para estimular la germinación de esporas, probablemente también sea el caso para la inhibición de este proceso.

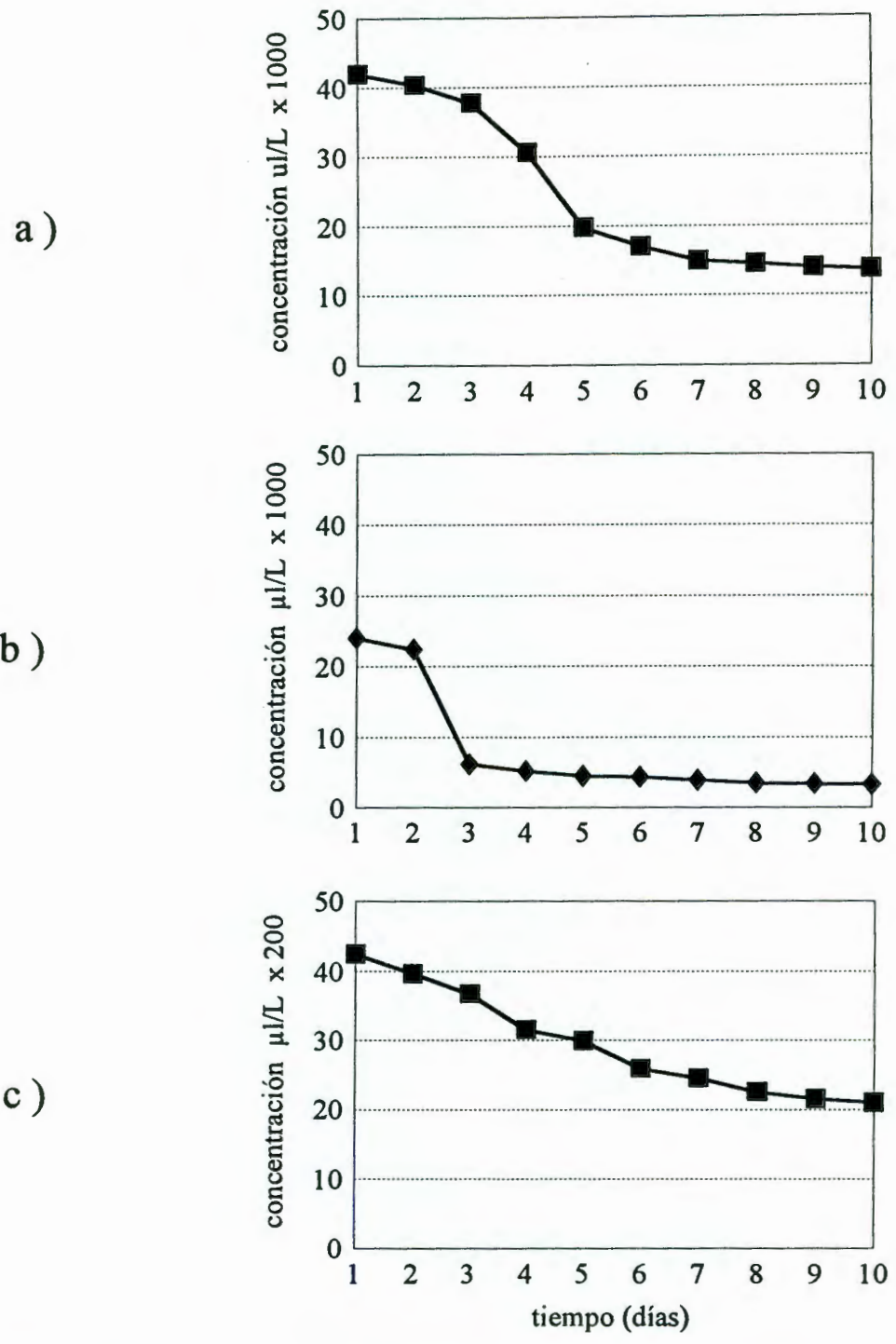


Fig. 19. Análisis con cromatografía de gases del contenido de etanol (a), 2-nonanona (b) y hexanal (c) en el "espacio de cabeza" de los recipientes en los ensayos "in vitro".

7.5 ENSAYOS "in vivo"

Se realizaron estudios preliminares que consistieron en evaluar diferentes concentraciones y tiempos de exposición de los frutos de guayaba a los compuestos volátiles. Se aplicaron soluciones de etanol al 20, 40 y 60 % por medio de un flujo de aire durante períodos de tiempo de 2, 4, 6, 24 y 48 horas sobre los frutos de guayaba inoculados con las suspensiones de esporas, cuando se aplicó etanol al 20 % durante los períodos antes mencionados, las esporas germinaban y se observó un crecimiento vegetativo abundante de los hongos sobre los frutos. Con la solución de etanol al 60% durante períodos de 2 horas los frutos sufrieron daños físicos que se manifestaron como oscurecimiento de piel y pulpa.

7.5.1 Estudios de los efectos de los compuestos volátiles sobre la germinación de las espore de los hongos.

7.5.1.1 Efectos del Etanol

La figura 20 muestra el diámetro de las lesiones provocadas por el desarrollo de los microorganismos inoculados en los frutos sometidos a diferentes tiempos de exposición a vapores de etanol. En todos los casos la lesión fue mayor para los frutos que no fueron tratados con el etanol y esta alcanzó alrededor de los 20 mm. *Pestalotia* sp. (figura 20a) el diámetro de la lesión fue muy cercana a los 5 mm y esta no avanzó aún cuando la exposición a los vapores del volátil continuo hasta las 48 horas. Puede decirse que para este hongo se observó un efecto fungistático del volátil. Para el caso de *Rhizopus* sp. (figura 20b) el diámetro de la lesión no rebaso los límites de la zona de inoculación (5 mm) por lo que puede decirse que este hongo no creció con tratamientos mínimos de 2 horas, por lo que puede decirse que hubo un efecto fungicida. En el caso de *Colletotrichum gloeosporioides* (figura 20c) se encontró un crecimiento del microorganismo de aproximadamente de 12 mm en los frutos tratados durante 2 horas mientras que a partir de las 4 horas de tratamiento el hongo creció en forma muy leve. Por ello se puede decir que también se encontró un efecto fungistático en el tratamiento de 2 horas y a partir de las 4 horas de tratamiento probablemente se manifieste un efecto fungicida.

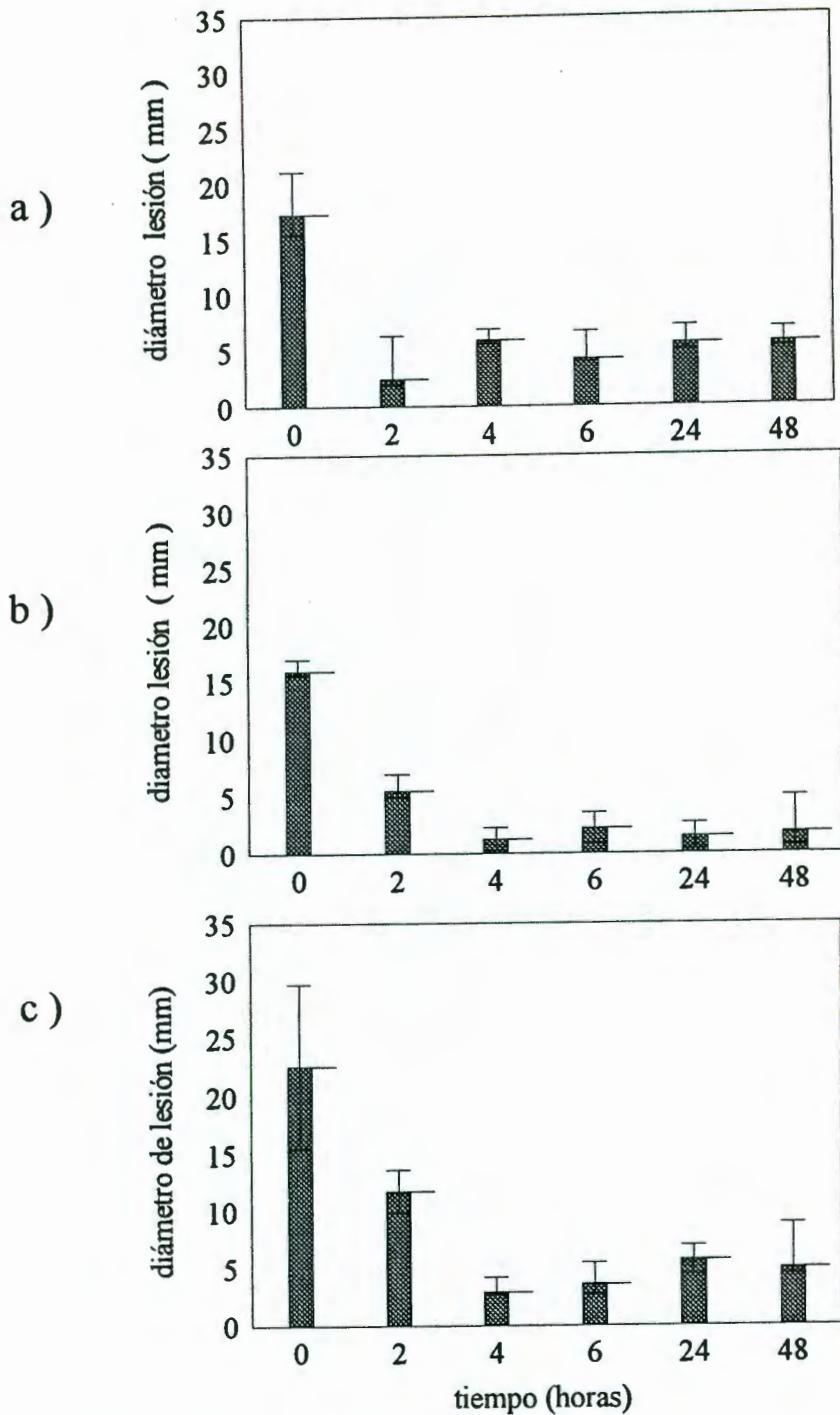


Fig. 20 . Efecto del tiempo de exposición a vapores de etanol sobre la germinación de las esporas de *Pestalotia* sp. (a), *Rhizopus* sp. (b) y *Colletotrichum gloeosporioides* (c) inoculadas en frutas de guayaba. Después del tratamiento los frutos fueron almacenados a 20°C/ 10 días.

7.5.1.2 Efectos de la 2-nonanona

También se encontraron efectos diferentes en los tratamientos. Los frutos control presentaron crecimiento del microorganismo que cubrió área de 15 a 20 mm . Para el caso de *Pestalotia* sp. (figura 21a) un tratamiento de 2 horas mostró un crecimiento de 10 mm de diámetro; pero a partir de las cuatro horas el crecimiento prácticamente fue despreciable.

Para el caso de *Rhizopus* sp (figura 21b) el diámetro de la lesión fue mayor que el mostrado por el tratamiento con etanol. En este caso la zona infectada cubrió un diámetro de 12 mm aún en tratamientos de 48 horas. Puede decirse que hubo un efecto fungistático.

En el caso de *Colletotrichum gloeosporioides* (figura 21c) se encontró un ligero crecimiento del microorganismo de aproximadamente 4 mm en los frutos tratados durante 2 horas; a partir de las 4 horas de tratamiento el hongo creció en forma muy leve. Por ello se puede decir que también se encontró un efecto fungistático en el tratamiento de 2 horas y a partir de las 4 horas nuevamente se manifestó un efecto fungicida.

7.5.1.3 Efecto del hexanal

Se encontraron efectos diferenciales en los tratamientos con hexanal. Los frutos control presentaron crecimiento del microorganismo que cubrió áreas de 15 a 20 mm.

Para el caso de *Pestalotia* sp. (figura 22a) el diámetro de la lesión fue mayor que el mostrado por el tratamiento de hexanal. En este caso la zona infectada cubrió un diámetro de 12 mm aún en los tratamientos de 48 horas. Puede decirse que hubo un efecto fungistático. Para el caso de *Rhizopus* sp. (figura 22b) un tratamiento de 2 horas mostró crecimiento muy despreciable, por lo que puede decir que hubo un efecto fungicida. En el caso de *Colletotrichum gloeosporioides* (figura 22c) podemos decir que el efecto fungicida se presentó a las 4 horas de exposición de los frutos a este compuesto volátil.

De los resultados anteriores se observó que las respuestas de los microorganismos fue diferente a cada uno de los compuestos estudiados. Esto es de esperarse ya que consideramos que los tres hongos tienen sensibilidades diferentes.

Pestalotia sp. mostró en forma general una mayor resistencia a los tres volátiles analizados y *Colletotrichum gloeosporioides* fue el más sensible. *Rhizopus* sp. fue el más resistente al tratamiento con 2-nonanona pero fue controlado con los tratamientos de etanol y hexanal. Vaughn y col., (1993) utilizando concentraciones menores a las empleadas en el presente trabajo, encontraron un efecto fungicida de 15 diferentes compuestos entre los cuales se encontraban 2-nonanona y hexanal (en concentraciones de 20 a 400 $\mu\text{L/L}$) sobre *Botrytis cinerea*, *Alternaria alternata* y *Colletotrichum gloeosporioides*. Las concentraciones usadas por estos investigadores fueron de 20 a 400 $\mu\text{L/L}$. Sin embargo, el sistema utilizado por ellos fue un ambiente cerrado y temperatura de 10°C, en donde se confunde el efecto de atmósfera modificada y la baja temperatura, por ello no se puede establecer una comparación general entre los dos trabajos.

No obstante lo anterior, es importante hacer notar que este trabajo coincide con el de Vaughn y col., (1993) en el sentido que *Colletotrichum gloeosporioides* fue el hongo más sensible a los tratamientos.

El hexanal y otros aldehídos han demostrado ser fungicidas eficientes Davis y Smoot (1972) reportan la utilización de hexanal al 0.05 M y otros compuestos para controlar enfermedades poscosecha de cítricos causadas por *Penicillium digitatum*, en el cual observaron que el hexanal, entre otros compuestos, fue de los más efectivos para controlar a este microorganismo.

En estudios hechos por Gardner y col., (1990) se reporta la utilización del hexanal al 9.5% en aire para inhibir la germinación de semillas de soya, ellos observaron que las semillas tratadas con este compuesto no presentaban desarrollo de *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp, *Fusarium* sp. y *Alternaria* sp., mientras que el control, mostró un gran desarrollo de estos géneros. Por otro lado, en estudios más reciente Song y col., (1996) mencionan la utilización de hexanal para controlar el crecimiento

de *Penicillium expansum* y *Botrytis cinerea* en PDA (agar papa dextrosa) y en rebanadas de manzana (*Malus domestica* Borkh), observaron que las pruebas en medio PDA y frutos inoculados los tratamientos de 250 μL tenían un efecto fungistático ya que a 120 horas de este los hongos mostraban un crecimiento micelial, sin embargo, en el tratamiento de 450 μL se observó un efecto fungicida.

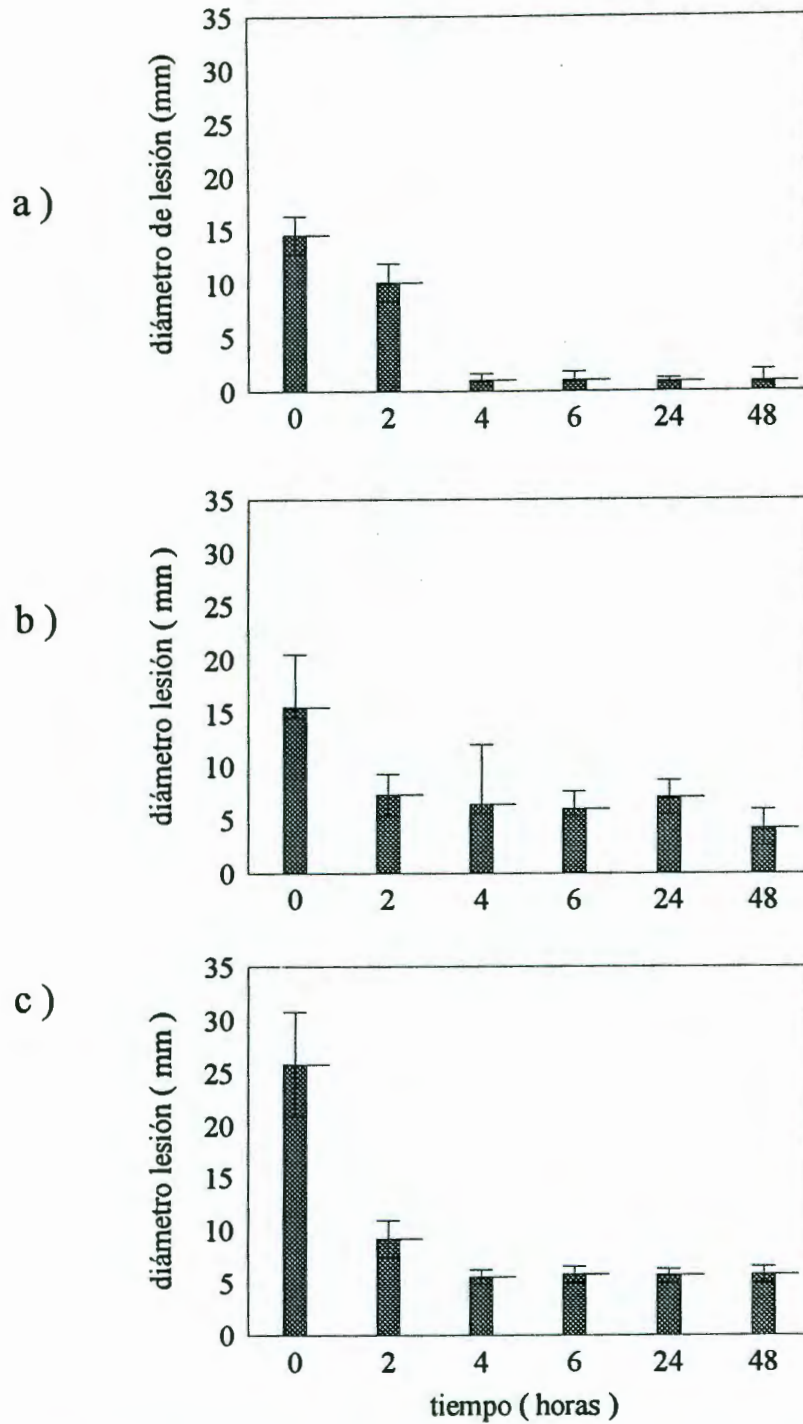
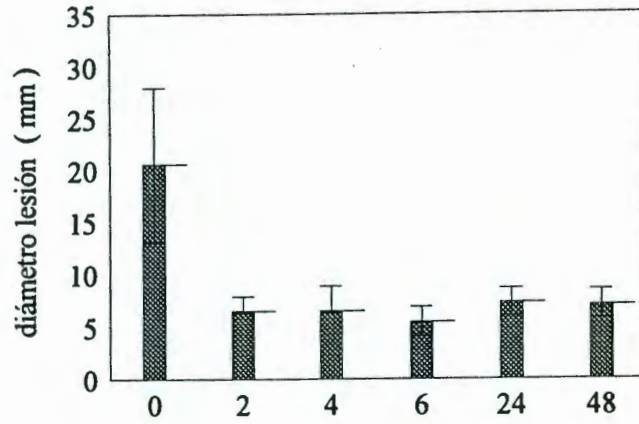
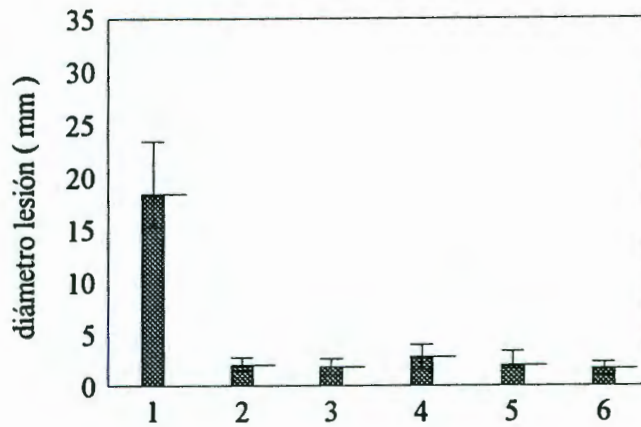


Fig. 21. Efecto del tiempo de exposición a vapores de 2-nonanona sobre la germinación de las esporas de *Pestalotia* sp. (a), *Rhizopus* sp. (b) y *Colletotrichum gloeosporioides* (c) inoculadas en frutas de guayaba. Después del tratamiento los frutos fueron almacenados a 20°C/ 10 días.

a)



b)



c)

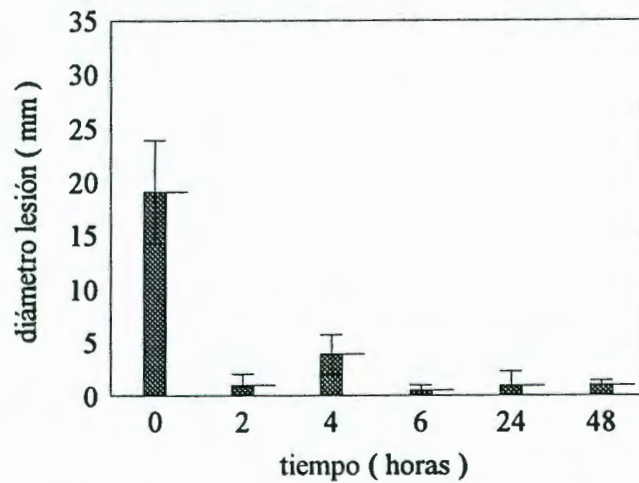


Fig. 22. Efecto del tiempo de exposición a vapores de hexanal sobre la germinación de las esporas de *Pestalotia* sp. (a), *Rhizopus* sp. (b) y *Colletotrichum gloeosporioides* (c) inoculadas en frutas de guayaba. Después del tratamiento los frutos fueron almacenados a 20°C/ 10 días.

7.5.2 Efectos de los compuestos volátiles sobre los frutos

Cuando los volátiles se aplicaron durante un lapso de 2 a 4 horas se observó un efecto fungicida, no hubo germinación de las esporas de los hongos en los frutos inoculados durante un espacio de 8-10 días/ 20°C. Los frutos no presentaban daños físicos en su apariencia, aunque presentaron un ligero sabor al volátil en cuestión.

En los tratamientos a partir de las 6 horas, el fruto mostró daños que físicamente se manifestaron como obscurecimiento de la piel y pulpa en los tratamientos de 24 a 48 horas los daños se presentaron como pequeños hundimientos en la piel, los cuales en un lapso de 2 a 3 días cambiaron de color amarillo a café.

El aroma y el sabor del fruto fueron penetrantes al volátil en cuestión aún después de haberse mantenido en aire fresco durante 10 días a 20°C. En la Tabla 22 se observan los tiempos de exposición a los volátiles requeridos para controlar a los hongos causantes de enfermedades poscosecha de guayaba.

Tabla 22. Tiempos de exposición a compuestos volátiles para controlar hongos fitopatógenos causantes de enfermedades poscosecha.

Hongo Volátil	<i>Pestalotia</i> sp.	<i>Rhizopus</i> sp	<i>C. gloeosporioides</i>
etanol 40% conc. aire 39000 µl/L	4 horas	4 horas	4 horas
2-nonanona 3% conc. aire 34000 µl/L	4 horas	4 horas	2 horas
hexanal 0.01% conc. aire 1100 µl/L	4 horas	4 horas	2 horas

7.5.3 Análisis de "espacio de cabeza"

La figura 23 muestra el comportamiento de la concentración en el "espacio de cabeza" de los 3 compuestos volátiles etanol, 2-nonanona y hexanal. Se observó que la concentración de etanol disminuye en forma lineal, mientras que la concentración de 2-nonanona presenta una meseta entre 4-6 horas cayendo drásticamente después de este tiempo. El hexanal presenta un máximo de concentración en un período de 4 horas y después cae drásticamente. Es posible que por este comportamiento, los mejores efectos fungicida y/o fungistáticos de los compuestos se presentarán en estos períodos de tiempo.

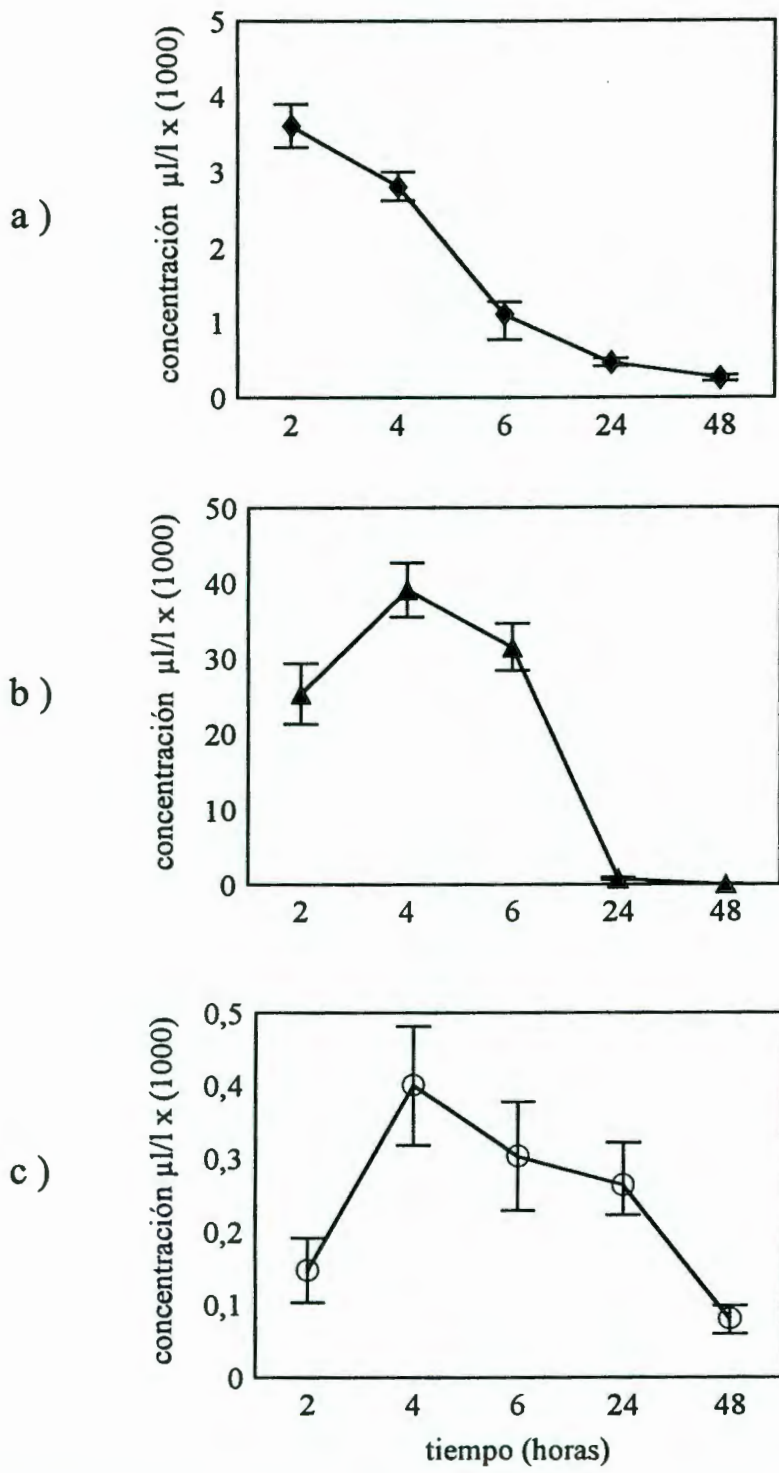


Fig. 23. Análisis con cromatografía de gases del contenido de etanol (a), 2-nonanona (b) y hexanal (c) en el "espacio de cabeza" de los recipientes en los ensayos "in vivo".

VIII. CONCLUSIONES

- 1.- El manejo poscosecha de guayaba es deficiente porque los frutos sufren de daños mecánicos en las distintas etapas de los sistemas de manejo poscosecha. Estos daños pueden ser vías de entrada a los hongos fitopatógenos causantes de enfermedades poscosecha.
- 2.- Se aislaron e identificaron 3 géneros de hongos causantes de enfermedades poscosecha en guayaba: *Pestalotia* sp., *Rhizopus* sp. y *Colletotrichum gloeosporioides*.
- 3.- La esporulación de los géneros *Pestalotia* sp., *Rhizopus* sp. y *Colletotrichum gloeosporioides* se logró en los medios Agar V-8, PDA y Agar de Ejotes respectivamente.
- 4.- La germinación de las esporas de *Pestalotia* sp., *Rhizopus* sp. y *Colletotrichum gloeosporioides* se inhibió con distintas concentraciones de los compuestos volátiles. Lo cual significa que la sensibilidad a estos compuestos es diferente para cada microorganismo.
- 5.- En los ensayos " *in vitro* " fue posible reducir la esporulación de *Pestalotia* sp. con: 30,000 μ /L de etanol y acetona, 1,200 μ /L de β -ionona, 15,000 μ /L de 2-nonanona, 1100 μ /L de hexanal y 1,400 μ /L de hexanol. *Rhizopus* sp. con: 50,000 μ /L de etanol y acetona, 40,000 μ /L de β -ionona, 30,000 μ /L de 2-nonanona, 1,200 μ /L de hexanal y hexanol. *Colletotrichum gloeosporioides* con: 30,000 μ /L de etanol y acetona, 1,000 μ /L de β -ionona, 15,000 μ /L de 2-nonanona, 900 μ /L de hexanal y 1,400 μ /L de hexanol.
- 6.- El efecto inhibitorio de los volátiles sobre la germinación ocurre en tiempos muy cortos.
- 7.- El género *Pestalotia* sp. presentó mayor resistencia a los tratamientos con los tres volátiles analizados, mientras que *Colletotrichum gloeosporioides* fue el más sensible, *Rhizopus* sp. fue resistente a la 2-nonanona y sensible a etanol y hexanal.

8.- Los tratamientos de 2 horas fueron los mejores para controlar a *Pestalotia* sp. y *Colletotrichum gloeosporioides*, inoculados en los frutos maduros, por otro lado, el de 4 horas lo fue para *Rhizopus* sp., con estos tratamientos se obtuvo un efecto fungicida y el fruto no presentaba daños físicos, mientras que en los tratamientos 24-48 horas el fruto de guayaba presento obscurecimiento en la piel y pulpa además de mal aroma.

9.- Los géneros *Pestalotia* sp., *Rhizopus* sp. y *Colletotrichum gloeosporioides* fueron controlados con 2-nonanona al 3 % aplicado durante 2-48 horas. Se observó que el tratamiento de 2 horas fue el mejor ya que se inhibió el desarrollo de los 3 géneros y el fruto no presento daños físicos, mientras que en los tratamientos 24-48 el fruto presentaba ligero obscurecimiento en la piel y pulpa además de mal aroma.

10.- Los géneros *Pestalotia* sp, *Rhizopus* sp. y *Colletotrichum gloeosporioides* fueron controlados con hexanal al 0.01 %, aplicado durante períodos de tiempo entre 2-48 horas. Resultando más eficaz el tratamiento de 2 horas ya que el desarrollo de los 3 géneros fue inhibido y el fruto no sufrió daños severos causados por el hexanal. Mientras en los tratamientos de 24-48 horas hubo un efecto fungicida pero los frutos sufrió daños físicos, manifestándose como hundimientos pequeños en la piel los cuales se obscurecieron en 48-72 horas.

11.- La aplicación de etanol al 40 %, 2-nonanona al 3 % y hexanal al 0.01 % aplicados durante 24-48 horas en los ensayos "*in vivo*" causaron daños físicos a los frutos de guayaba, los daños por etanol y 2-nonanona se observaron como obscurecimiento de piel y pulpa mientras los daños por hexanal se manifestaron como hundimientos pequeños en la piel.

12.- Es posible que la resistencia a las enfermedades del fruto de guayaba se deba a la acción conjunta y sinérgica de varios volátiles y otro compuesto que el fruto produce.

IX. LITERATURA CITADA

Adsule, P.G. y D.K Tandom. 1983. The assessment of LDPE bags for enhancing shelf life of guava. *Indian Food Packer*. 82:104 y 105.

Alexopoulos C.J. y C.W Mims. 1979. *Introductory Mycology*. John Wiley & Sons. Third Edition. EUA. pp. 191-207 y 534-572.

Akedo, M., Sinnskey, A.J. y R. Gomez. 1977. Antimicrobial action of aliphatic and their esters. *J. Food Sci* 42: 699-706

Arya, A. 1988. Control of *Phomopsis* fruit rots of grapes and guava. *Indian Phytopath* 41(2); 214-219.

Askar, A.; S.E El Nemr y S.S Bassiouny. 1986. Aroma constituents in white and pink guava fruit. *Alimenta* 6:162-167.

Badyal, K. y G. Sumbali. 1992. Some new diseases of guava fruits. *Indian Phytopath* 45(2): 277-278.

Barnet, H.L. y B.B. Hunter. 1972. *Illustrated genera of imperfecti fungi*. Burgess Publishing Company. Minnesota, EUA.

Bidwell, R.G. 1979. *Fisiología vegetal*. AGT Editor. Primera edición en español. México, D.F.

Brecht, E. Patrick. 1980. Use of controlled atmosphere to retard deterioration of produce. *Food Technol.* 34 (3): 45-50

Charg-Cherm, C. y W. Chung-May. 1989. Differences in volatile constituents between inner and outer flesh-peel of guava (*Psidium guajava* L.) fruit. *Lebensm. Wiss. Technol.* 22: 104-106.

Chyau, C.C.; S, Y Chen y C.M Wu. 1992. Differences of volatile and nonvolatile constituents between mature and ripe guava (*Psidium guajava* L.) fruits. J. Agric. Food Chem. 40: 846-849.

Davis, P.L. y J.J Smoot. 1972. Germination of *Penicillium digitatum* spores as affected by solutions of volatile components of citrus fruits. Phytopath. 62: 488-489.

Delp, C.J. 1980. Coping with resistance to plant disease control agents. Plant Dis. 64: 652-657.

Dhingra, O.D y J.B Sinclair. 1985. Basic plant pathology methods. CRC Press. Boca Raton, Florida. EUA.

Dirección General de Información Agropecuario, Forestal y Fauna Silvestre. SAGAR. 1994.

Eckert, J.W. y N. Sommer. 1967. Control of diseases of fruits and vegetables by postharvest treatments. Ann. Rev. Phytopathol. 16: 391-432.

Farm Chemicals. 1979. Pesticide dictionary. Meister Publishing Company. Ohio, EUA.

French, R.C. 1992. Volatile chemical germination stimulators of rust and other fungal spores. Mycologia 84: 227-288.

French, E.R y T.T Hebert. 1980. Métodos de investigación Fitopatológica. Editorial IICA. Primera edición. San José, Costa Rica.

Funder, S. 1968. Practical Mycology; Hafner Publishing Company, Inc. Kingston-upon-Thames, Surrey, Inglaterra. 39-123.

Gardner, H.W. D.L. Dornbos y A.E Desjardins. 1990. Hexenal, trans-2-nonenal inhibit soybean, *Glycine max*, seed germination. *J. Agric. Food Chem.* 38: 1316-1320.

Gupta, V.K y D. Mukherjee. 1980. Effect of morphactin on the storage behavior of guava fruits. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 105 (1): 115-119.

Heath, B.H. y B. Pharm. 1979. Flavor technology: profiles, products, applications. The Avi Publishing Company, Inc. Connecticut, EUA.

Hulme, C.A. 1970. The Biochemistry of Fruits and Their Products. Academic Press. Volume I. Londres, Inglaterra. 239-304.

Idstein, H. y P. Schreier. 1985. Volatile constituents from guava (*Psidium guajava*, Linn.) fruit. *J. Agric. Food. Chem.* 33(1): 138-143

Jeffries, P. y M.J. Jeger. 1990. The biological control of postharvest disease of fruit. *Postharvest News and Info.* 5: 365-368.

Khanna K.K y S. Chandra. 1975. Studies on storage diseases of fruits and vegetables. *Current Science* 45:70.

Khanna K.K y S. Chandra. 1989. Further investigations on the control of storage rot of mango, guava and tomato fruits with homoeopathic drugs. *Indian Phytopath.* 42 (3): 436-440.

Khedkar, D.L., K.W. Ansarwardkar. R.S. Dabhade y A.L Ballal. 1982. Extension of storage life of guava (var L-49). *Indian Food Packer* 36 (2): 49.

Kelman, A. 1989. Introduction: The importance of research on the control of disease of perishable food crops. *Phytopath.* 79: 1374.

Lakshminarayana, S. y M.A Moreno Rivera. Enfermedades y desordenes en la producción y mercadeo de la guayaba mexicana. Chapingo, Nueva Epoca. 9: 27-33.

MacLeod, A. J. y N. Gonzalez de Troconis. 1981. Volatile flavour components of guava. *Phytochem.* 21 (6): 1339-1342.

Madhukar, J. y S.M. Reddy. 1991. Control of fruit-rot of guava by hot water treatment. *Indian Phytopath.* 43: 234-236.

Majumdar, V.L. y V.N. Pathak. 1989. Changes in nutritional value of guava fruits infected by major postharvest pathogens. *Plant Foods for Human Nutrition* 39: 311-315.

Mata, I. y M. Rodríguez. 1984. El guayabo. Editorial Limusa. Primera edición. México, DF.

Nishimura, O., K. Yamaguchi, S. Miahara, y T. Shibamoto. 1989. Volatile constituents of guava fruit (*Psidium guajava* L.) and canned puree. *J. Agric. Food Chem.* 37: 139-142

Pal, R.K., y R.W, Buescher. 1993. Respiration and ethylene evolution of certain fruits and vegetables in response to carbon dioxide in controlled atmosphere storage. *J. Food Sci Technol.* 30(1): 29-32.

Pandey, R.R y R.S Dwivedi. 1987. Mycoflora associated with seeds from healthy and rotten fruits of guava. *Indian Phytopath.* 40: 248-250.

Pandey, R.R. 1988. Effect of foliar applications of fungicides on the phylloplane mycoflora and fungal pathogens of guava. *Phytopath.* 123: 52-62.

Pandey R.R, D.K. Arora y R.C. Dubey. 1993. Antagonistic interactions between fungal pathogens and phylloplane fungi of guava. *Mycopatho.* 124: 31-39.

Paster, N.; U. Zisman, y M. Calderon. 1988. Studies of fungicidal activity of allyl alcohol in wheat grain. *J. Sci. Food Agric.* 45: 301-305.

Pesis, E. y H. Avissar. 1990. Effect of postharvest application of acetaldehyde on strawberry decay, taste, and certain volatiles. *J. Sci Food Agric.* 52: 377-385.

Picón, A., J.M Martínez-Jávega, J. Cuquerella, M.A. Del Río y P. Navarro. 1993. Effect of precooling packaging film, modified atmosphere and ethylene. *Food Chem.* 48: 189-193.

Prasad, K. y G.J. Stadelbacher. 1973. Control of postharvest decay of fresh raspberry by acetaldehyde vapor. *Plant Dis.* 57: 795-797.

Pusey, P.L. y C.L. Wilson. 1984. Postharvest biological control of stone fruit brown rot by *Bacillus subtilis*. *Plant Dis.* 68: 753-756.

Salunke, D.K. y B.B. Desai. 1984. Postharvest Biotechnology of fruit Vol. II. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida. EUA. pp 39-45

SARH. 1994. Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos. Subsecretaría de Agricultura. Dirección General de Política Agrícola. Sistema Producto Guayaba.

Sholberg, P.L. y A.P. Gaunce. 1995. Fumigation of fruit with acetic acid to prevent postharvest decay. *HortScience* 30: 1271-1275.

Snowdon, A.L. 1990. A color atlas of postharvest diseases and disorders of fruits and vegetables. CRC Press, Inc. Primera edición. Boca Raton, Florida. EUA.

Singh, A.P y S.N. Bhargava. 1977. Storage and Transit studies in apple guavas. *Indian J. HortScience* 34: 309-310.

Singh, A.P y S.N. Bhargava. 1977. Benalate as an effective postharvest fungicide for guava fruit. *Indian J. Horticulture* 34 (3) 311-312.

Singh, J.P. y S.K. Sharma. 1982. Controlling anthracnose of guava caused by *Glomerella cingulata* by fumigation. *Indian Phytopath.* 35(2): 273-276.

Song, J., R. Leepipattanawit, W. Deng, y R.M. Beaundry. 1996. Hexanal vapor is a natural, metabolizable fungicide: Inhibition of fungal activity and enhancement of aroma biosynthesis in apple slices. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 121 (5): 937-942.

Statgraphics Software. 1992. Statistical Graphics Corporation. Maryland, EUA.

Vaughn, S.F, G.F Spencer, y B.S. Sasha. 1993. Volatile compounds from raspberry and strawberry fruit inhibit postharvest decay fungi. *J. Food Sci.* 58: 793-796.

Vazquez-Ochoa, R.I. 1985. Efecto de la temperatura y humedad relativa en el almacenamiento de frutos de la guayaba (*Psidium guajava* L.) para consumo en fresco. Tesis de Licenciatura, Universidad Autónoma de Chapingo, México.

Vazquez-Ochoa, R.I. y M.T Colinas-León. 1990. Changes in Guavas of three Maturity Stages in Response to Temperature and Relative Humidity. *HortScience* 25 (1): 86-87

Unión Regional de Productores del Estado de Zacatecas. 1996. Comunicación personal.

Wilson, C.L y P.L. Pusey. 1985. Potential for biological control of postharvest plant diseases. *Plant Dis.* 69 375-378

Wilson, C.L. y M.E. Wisniewski. 1989. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables: An emerging technology. *Annu. Rev. Phytopathol.* 27: 425-441.

Wisniewski, M. y C.L. Wilson. 1992. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables: Recent advances. HortScience 27: 94-98.

Yadava, L.U. 1996. Guava (*Psidium guajava* L.): An exotic tree fruit with potential in the southeastern United States. HortScience 31(5): 789-794

Zagory, D. y A.A. Kader. 1988. Modified atmosphere packaging of fresh produce. Food Technol. 42(9): 70-77.

No Adq. M56337
No. Título _____
Clas. 634.4216
C813U

BIBLIOTECA CENTRAL