

EFFECTO DEL QUITOSANO PARA EL BIOCONTROL DE HONGOS FITOPATOGENOS IDENTIFICADOS MOLECULARMENTE DE FRUTAS Y HORTALIZAS EN GUANAJUATO

Castañeda-Ramírez JC^{a*}, Laurel-Ángeles V^a, Espinoza-Zamora J^a, Salcedo-Hernández R^c, López-Ramírez ME^a, De la Fuente-Salcido NM^b

^aUniversidad Tecnológica del Suroeste de Guanajuato, Procesos Alimentarios. Carr. Valle-Huanímaro Km. 1.2, C.P. 38400, Valle de Santiago, Guanajuato, México.

^bUniversidad Autónoma de Coahuila. Dpto. de Posgrado. Escuela de Ciencias Biológicas, Ciudad Universitaria, Campus Torreón, Coahuila, México.

^cUniversidad de Guanajuato Campus Irapuato-Salamanca, División de Ciencias de la Vida, Dpto. Alimentos. Irapuato, Guanajuato, México. *jccastanedar@utsoe.edu.mx

RESUMEN:

La quitosana es un derivado desacetilado de la quitina con capacidad antifúngica y antibacteriana. Los objetivos de la investigación fueron el aislar e identificar molecularmente hongos fitopatógenos y evaluar el efecto antifúngico de la quitosana de medio y bajo peso molecular. Los hongos aislados de frutas y hortalizas se identificaron por características macro y microscópicas. Además se identificaron molecularmente por PCR amplificando y secuenciando la región ITS. El efecto antifúngico de la quitosana se evaluó en fresa, zanahoria baby y tomate cherry, previamente desinfectados con etanol al 70% (v/v), hipoclorito de sodio 1% (v/v) y agua destilada. Los 3 productos se recubrieron con quitosana de medio y bajo peso molecular (0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 y 3.0 % p/v) y se inocularon con esporas de *Fusarium oxysporum*, *Rhizopus oryzae*, *R. stolonifer*, *Collectotrichum gloesporoides*, se incubaron en cámara húmeda a temperatura ambiente de 5 a 7 días. Se aislaron e identificaron los géneros *Rhizopus* y *Fusarium*. El quitosano de bajo peso molecular al 2.5 y 3.0% (p/v) mostró el mayor efecto antifúngico para la protección postcosecha de fresa, tomate y zanahoria contra los hongos ensayados, durante 6 días a temperatura ambiente, considerándose un agente idóneo para el biocontrol de fitopatógenos.

ABSTRACT:

Chitosan is a deacetylated derivative of chitin, has a great antibacterial and antifungal capacity. The objective of this work was the isolation and identification of fungi and evaluating the antifungal effect of chitosan of medium and low molecular weight. For identifying fungi were isolated from fruits and vegetables contaminated analyzing macro and microscopic characteristics and subsequent amplification and sequencing of ITS; for evaluating antifungal effect strawberry, baby carrots and cherry tomato was used, which were disinfected with 70% ethanol (v / v) for 1 min, then with a 1% (v / v) sodium hypochlorite and rinse with distilled water; finally coated with chitosan solutions of medium and low molecular weight (0.5, 1, 1.5, 2.0, 2.5 and 3.0% w / v) and inoculate with spores of *Fusarium oxysporum*, *Rhizopus oryzae*, *Rhizopus stolonifer*, *Collectotrichum gloesporoides*, leaving temperature environment 5 to 7 days. It was possible to isolate and identify the fungi of the genera *Rhizopus* and *Fusarium*. The low molecular weight chitosan to 2.5 and 3.0% (w / v) antifungal effect showed the greatest protection for postharvest strawberry, tomato and carrot against the fungi tested, for 6 days at room temperature, considered an ideal agent for biocontrol phytopathogenic.

Palabras clave:

Quitosana, Fitopatógenos, Antifungico

Keyword:

Chitosan, Phytopathogen, Antifungic

Área: Frutas y Hortalizas; Microbiología y biotecnología

INTRODUCCIÓN

La contaminación causada por hongos en frutas y vegetales durante la época de cultivo, el almacenaje, después de la cosecha y durante el transporte si este es por tiempos prolongados, provoca grandes pérdidas económicas; para evitar el daño ocasionado en frutas y hortalizas se manejan temperaturas de $-0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante el almacenamiento (Karabulut *et al.*, 2004), y en ocasiones acompañado de un tratamiento con fungicidas químicos, los cuales pueden contener residuos que afecten a la salud de los humanos y daño al ambiente (Rosslénbroinch and Stuebler, 2000), y con el riesgo de que los patógenos desarrollen resistencia a los fungicidas (Holmes *et al.*, 1999).

La tendencia actual en el manejo postcosecha de frutas y hortalizas es la de controlar las infecciones ocasionadas por diferentes patógenos, con compuestos amigables con el ambiente, que no generen residuos tóxicos, no causen resistencia en los patógenos, sean de origen natural y sobre todo que sean eficaces para evitar o retardar el crecimiento de hongos y bacterias que son los causantes de pudriciones y por ende de las pérdidas económicas causadas por ello.

Existen muchas alternativas para el control del crecimiento de estos microorganismos patógenos como son compuestos bioactivos, tratamientos térmicos, almacenamiento en refrigeración, empaquetado en atmósferas modificadas (Sharma *et al.*, 2009; Mari *et al.*, 2007). Uno de los compuestos bioactivos que toma mucha relevancia para el control de patógenos en el manejo postcosecha de frutas y hortalizas es la quitina y sus derivados.

La quitosana es una forma desacetilada de la quitina de naturaleza policatiónica con capacidad antifúngica demostrada en diferentes estudios. Por ejemplo, Mohamed *et al.*, 2008, usando tomate como modelo, demostraron que una concentración de 2000 y 4000 mg/L de quitosana inhibe por completo el crecimiento de hongo *Botrytis cinera* (moho gris). La quitosana al 1% demostró ser efectiva para disminuir el crecimiento de *Botrytis cinera*, *Rhizopus rot*, en uvas, fresas y moras (Romanazzi, 2010). Asimismo la quitosana de bajo peso molecular redujo significativamente las infecciones en frutos cítricos, causadas por *Penicillium digitatum*, *Penicillium italicum*, *Botrydiplozia lecanidion* y *Botrytis cinerea* después de 14 días de almacenamiento $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Chien *et al.*, 2007), Bhaskara Reddy *et al.* (2000) trataron fresas con quitosana antes de la cosecha y observaron que no hubo daño causado *Botrytis cinera* a temperaturas de $3\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $13\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante el almacenamiento.

En este trabajo los objetivos fueron el aislar e identificar molecularmente hongos fitopatógenos y evaluar el efecto antifúngico de la quitosana de medio y bajo peso molecular en el control del daño postcosecha de frutas y hortalizas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamiento e identificación morfológica de hongos

Se recolectaron frutas y hortalizas que presentaban daño por hongos de los mercados de las ciudades de Salamanca y Valle de Santiago, Guanajuato. Procediendo a cortar trozos de la zona de avance de la lesión, colocarlos sobre la superficie de medio sólido de papa-dextrosa-

agar (PDA), previamente acidificando y esperar que crezca el hongo. Una vez que el hongo está creciendo, se pasó a nuevo PDA para que crezca en cultivo puro y posteriormente, se espera a que produzcan esporas para poder identificarlo. Para la identificación microscópica, se hicieron diferentes preparaciones y se tiñeron con azul de algodón para observar diferentes estructuras como conidios y esporas de los hongos previamente aislados; las imágenes microscópicas fueron tomadas en un microscopio Imager A1 Carl Zeiss.

Identificación molecular de los hongos aislados.

Para la identificación molecular se utilizaron oligonucleótidos específicos para las secuencias de las regiones del espaciador transcrito interno (ITS) entre las regiones 18s rDNA y 28s rDNA, buscando principalmente hongos pertenecientes al género *Fusarium*, *Rhizopus*. El DNA genómico fue obtenido a partir de muestras de micelio de cepas crecidas en caldo dextrosa-saboraud durante 5 días/30 °C, siguiendo el protocolo de extracción a partir de buffer de sarcosina (Lafuente-Rincón DF, 2014). Las secuencias ITS fueron amplificadas mediante PCR en un termociclador (C1000 Touch Thermal Cycler Bio-Rad) usando oligonucleótidos específicos (Tabla I). Las condiciones de amplificación fueron: una desnaturalización inicial de 94 °C/5 min, 30 ciclos (94 °C/1 min, 55 °C/1 min, 72 °C/3 min) y una extensión de 72 °C/3 min, posterior almacenamiento a 4 °C/∞. Finalmente la obtención de los amplicones fue corroborada mediante electroforesis en geles de agarosa al 1 %, teñidos con bromuro de etidio. Los amplicones fueron purificados (QIAquick PCR Purification Kit-QIAGEN) y enviados a secuenciar en el Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad (LANGEBIO).

Tabla I. Secuencias de los oligonucleótidos empleados para la amplificación por PCR de los ITS

| Oligonucleótido | Secuencia | Tamaño | Referencia |
|-----------------|-------------------------------|--------|--|
| FolTS1 | 5'- TCCGTAGGTGAACCTGCGGAG -3' | 544 | Gurjar <i>et al.</i> , 2009 |
| FolTS4 | 5'- TCCTCCGCTTATTGATATGCT -3' | | |
| RslITSf | 5'- GAACCTGTTTGGCCTAGCTAA -3' | 563 | Castañeda-Ramírez <i>et al.</i> , 2014 |
| RslITSr | 5'- TTGTGAACAATGCCACAGTCT -3' | | |

Efecto del quitosano en el control del daño poscosecha de frutas y hortalizas

Inicialmente se prepararon soluciones stock al 4 % (p/v) de quitosana de Medio y Bajo peso molecular (75-85 % de desacetilación, SIGMA ALDRICH), en solución de ácido acético (1% v/v); posteriormente se hicieron diluciones al 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5 y 3% (p/v).

Se emplearon como modelo de estudio las fresa, zanahoria baby y jitomate cherry. Inicialmente las muestras fueron sanitizadas con etanol al 70% (v/v) durante 1 minuto y posteriormente con solución de hipoclorito de sodio al 1 % (v/v) durante 3 minutos (La Fuente-Rincón, 2014), por último fueron enjuagadas con agua destilada estéril. La fresa, zanahoria y jitomate fueron sumergidas en las diferentes soluciones de quitosana (0.5, 1, 1.5, 2, 2.5 y 3% p/v) para la formación de una película, dejándolas secar durante 30 minutos a temperatura ambiente; posteriormente fueron colocadas en una cámara húmeda donde fueron inoculadas con 5 µL de soluciones de esporas (aproximadamente 1.22×10^5 esporas/mL) de diferentes hongos como *Rhizopus oryzae*, *Rhizopus stolonifer*, *Fusarium oxysporum* y *Colletotrichum gloeosporioides*; por último las muestras se dejaron a temperatura ambiente durante 5 a 7 días, monitoreando a diferentes tiempos para detectar síntomas de daño fúngico.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aislamiento e identificación

Se aislaron hongos de diferentes frutas y hortalizas (fresa, zanahoria, chile serrano, chirimoya, entre otras), los cuales fueron identificados por características macro y microscópicas determinándose que pertenecen a los géneros *Fusarium*, *Rhizopus*, *Penicillium*, *Aspergillus* y *Mucor* (Castañeda-Ramírez *et al.* 2014) (Figura 2 y 3). De los diferentes géneros aislado se realizó la identificación molecular de *Fusarium* y *Rhizopus*; primeramente amplificando por PCR las regiones del espaciador transcrito interno (ITS), obteniéndose dos amplicones de 500-600 bp para los hongos identificados como *Rhizopus* y un amplicón para los de *Fusarium* (Figura 1). Una vez obtenidas las secuencias se analizaron en el BLAST resultando que los amplicones corresponden a los géneros *R. oryzae*, *R. stolonifer* y *F. oxysporum*.

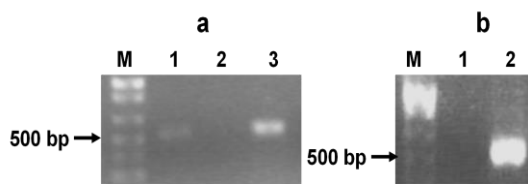


Figura 1. Amplificación de los ITS de hongos aislados. M marcador de peso molecular 1 kb Plus (Invitrogen), a) carriles 1 al 3 reacción con oligonucleótidos para *Rhizopus*; b) carriles 1 y 2 reacción con oligonucleótidos para *Fusarium*.



Figura 2. Micrografías de hongos empleados 5x. a) *C. gloeosporioides*, b) *F. oxysporum*, c) *R. oryzae*, d) *R. stolonifer*

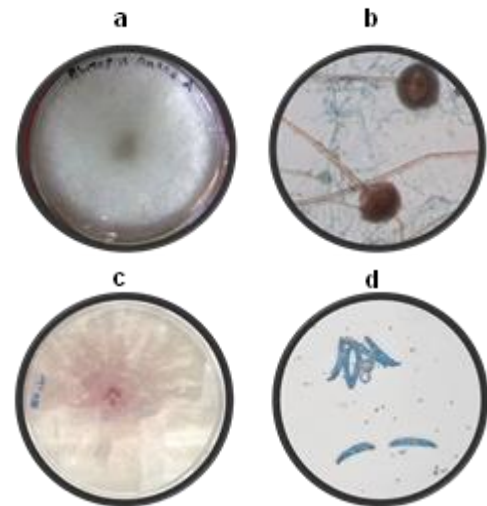


Figura 3. Imágenes macro y microscópicas. a) *R. oryzae* en PDA, b) *R. oryzae* 40x; c) *F. oxysporum* en PDA, d) *F. oxysporum* 40x.

Efecto del quitosano de bajo peso molecular en el control del daño poscosecha de frutas y hortalizas

Las tablas 2 y 3 muestran el efecto *in vivo* de la quitosana de bajo peso molecular en el control del daño poscosecha en fresa, zanahoria baby y jitomate cherry causada por *Rhizopus oryzae*, *R. stolonifer*, *F. oxysporum* y *C. gloeosporioides* (datos no mostrados), reportando el crecimiento micelial y necrosis a diferentes tiempos después del tratamiento e inoculación de las muestras y almacenadas a temperatura ambiente durante 6 días. A las 24 h después de la inoculación de la fresa con *R. oryzae* y *R. stolonifer* se observó crecimiento micelial y a las 72 h necrosis; mientras que con la inoculación de *F. oxysporum* y *C. gloeosporioides* el crecimiento micelial se observó a las 48 h con ausencia de necrosis. Al recubrir la fresa, zanahoria y jitomate con soluciones de quitosano bajo peso molecular a diferentes concentraciones (0.5, 1, 1.5, 2, 2.5 y 3% p/v), se observó en general que las concentraciones de 2.5 y 3 % (p/v) son efectivas para inhibir el crecimiento de *R. oryzae*, *R. stolonifer* y *F. oxysporum* en zanahoria y jitomate durante 6 días a temperatura ambiente; mientras que en fresa solo retardo el crecimiento de *R. oryzae* y *R. stolonifer* durante 48 h y el crecimiento de *F. oxysporum* y *C. gloeosporioides* 72h. Cabe mencionar que las pruebas también se realizaron con quitosana de medio peso molecular

(datos no publicados) pero de manera general muestra menor actividad antifúngica que la quitosana de bajo peso molecular; determinando al igual que el de bajo peso molecular no es capaz de inhibir en crecimiento de *Rhizopus* y en concentraciones de 2.5 y 3 % solo retarda el crecimiento de *F. oxysporum* y *C. gloeosporioides*; ya que a las 144 h de incubación se presenta el crecimiento micelial de los hongos en la zanahoria y el jitomate; los efectos de la quitosana se muestran en la figura 4.

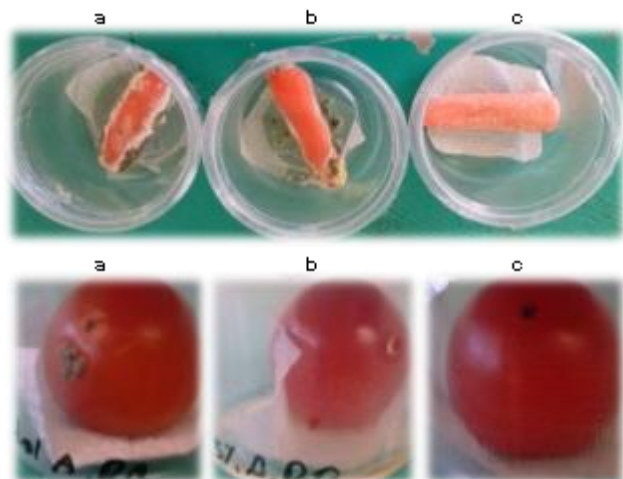
Tabla II. Efecto de la película de quitosana de bajo peso molecular sobre *Rhizopus oryzae* y *Rhizopus stolonifer* inoculados en fresa, zanahoria baby y jitomate cherry.

| Muestra | T (h) | <i>Rhizopus oryzae</i> | | | | | | | | | | | | <i>Rhizopus stolonifer</i> | | | | | | | | | | | | | | |
|-----------|-------|------------------------|---|-----|---|---|---|-----|---|---|---|-----|---|----------------------------|---|---|---|-----|---|---|---|-----|---|---|---|-----|---|---|
| | | % p/v quitosana LMW | | | | | | | | | | | | % p/v quitosana MMW | | | | | | | | | | | | | | |
| | | 0 | | 0.5 | | 1 | | 1.5 | | 2 | | 2.5 | | 3 | | 0 | | 0.5 | | 1 | | 1.5 | | 2 | | 2.5 | | 3 |
| C | N | C | N | C | N | C | N | C | N | C | N | C | N | C | N | C | N | C | N | C | N | C | N | C | N | C | N | |
| Fresa | 24 | + | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - | + | - | + | - | - | - | - | - | - | - | |
| | 48 | + | - | + | - | + | - | + | - | - | - | - | - | - | - | + | - | + | - | + | - | + | - | - | - | - | - | |
| | 72 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - |
| | 144 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - |
| Zanahoria | 24 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| | 48 | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| | 72 | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | |
| | 144 | + | - | + | - | + | - | + | - | + | - | + | - | + | - | + | - | + | - | + | - | + | - | + | - | + | - | - |
| Jitomate | 24 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| | 48 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| | 72 | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | |
| | 144 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - |

Crecimiento micelial (C), necrosis (N), presencia de síntoma (+), ausencia de síntoma (-)

| Muestra | T (h) | <i>Fusarium oxysporum</i> | | | | | | | | | | | | |
|-----------|-------|---------------------------|---|-----|---|---|---|-----|---|---|---|-----|---|---|
| | | % p/v quitosana LMW | | | | | | | | | | | | |
| | | 0 | | 0.5 | | 1 | | 1.5 | | 2 | | 2.5 | | 3 |
| C | N | C | N | C | N | C | N | C | N | C | N | C | N | |
| Fresa | 24 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| | 48 | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| | 72 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | |
| | 144 | + | - | + | - | + | - | + | - | + | - | + | - | + |
| Zanahoria | 24 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| | 48 | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| | 72 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | |
| | 144 | + | - | + | - | + | - | + | - | + | - | + | - | + |
| Jitomate | 24 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| | 48 | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| | 72 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | |
| | 144 | + | - | + | - | + | - | + | - | + | - | + | - | + |

Tabla III. Efecto de la película de quitosana de bajo peso molecular sobre *Fusarium oxysporum* inoculados en fresa, zanahoria baby y jitomate cherry,



Crecimiento micelial (C), necrosis (N), presencia de síntoma (+), ausencia de síntoma (-)

Figura 4. Efecto *in vivo* de la quitosana. A) hortaliza control inoculadas con *R. oryzae*; b) película de quitosana de medio peso molecular al 3.0 %; c) película de quitosana de bajo peso molecular al 3.0 %.

Como se observa en las tablas II y III la película de quitosana de bajo peso molecular, a concentraciones de 2.5 y 3.0% protege a las frutas y hortalizas del ataque por hongos e incluso de deshidratación.

CONCLUSIONES

En el presente estudio se logró la identificación molecular de hongos pertenecientes a los géneros *Rhizopus* y *Fusarium*, hongos fitopatógenos que deterioran los productos hortofrutícolas. Además se demostró *in vivo* el efecto antifúngico de la quitosana de bajo peso molecular, determinando que en concentraciones de 2.5 y 3 % (p/v) es capaz de inhibir en desarrollo de hongos fitopatógenos durante 6 días en zanahoria y jitomate, y 2 días en fresa. Este estudio sirve de base para la elaboración de películas a base de quitosana las cuales pueden sustituir el uso de fungicidas para el manejo poscosecha de frutas y hortalizas

BIBLIOGRAFÍA

- Bhaskara RM, Belkacemi K, Corcuff R, Castaigne F, Arul J. 2000. Effect of pre-harvest chitosan sprays on post-harvest infection by *Botrytis cinerea* and quality of strawberry fruit. *Postharvest Biol. Technol.*, 20, 39–51
- Castañeda-Ramírez JC, Núñez-Flores KI, Ledesma-Gutiérrez V, Morales-Félix VJ. 2014. Aislamiento e Identificación Hongos que Causan el Deterioro de Frutas y Hortalizas. En *Memorias de congreso AcademiaJournals Celaya*.
- Chien PJ, Sheu F, Lin HR. 2007. Coating citrus (*Murcott tangor*) fruit with low molecular weight chitosan increases postharvest quality and shelf life. *Food Chem.*, 100, 1160–1164
- Gurjar G, Barve M, Vidya-Gupta AG. 2009. Identification of Indian pathogenic races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* with the specific, ITS and random markers. *Mycology*. 101(4): 484-495.
- Holmes GJ, Eckert JW. 1999. Sensitivity of *Penicillium digitatum* and *P. italicum* to postharvest citrus fungicides in California. *Phytopathology*, 89, 716–721

- Karabulut OA, Gabler FM, Mansour M, Smilanick JL. 2004. Postharvest ethanol and hot water treatments of table grapes to control gray mold. *Postharvest Biol. Technol.* 34, 169–177.
- Lafuente-Rincón D.F. 2014. Determinación del espectro antimicrobiano de bacteriocinas de *Bacillus thuringiensis* contra hongos fitopatógenos aislados e identificados molecularmente de suelo dedicado al cultivo de fresa. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Coahuila. Pág. 70
- Mari M, Neri F, Bertolini P. 2007. Novel approaches to prevent and control postharvest diseases of fruits. *Stewart Postharvest Rev.*, 3, 1–7
- Mohamed EIB, Entsar IR. 2009. Potential of the biopolymer chitosan with different molecular weights to control postharvest gray mold of tomato fruit. *Postharvest Biol. Technol.*, 51, 110–117
- Romanazzi G. 2010. Chitosan Treatment for the Control of Postharvest Decay of Table Grapes, Strawberries, and Sweet Cherries. *Fresh Produce Global Science and Books.* 4(1) 111-115
- Rosslénbroich HJ, Stuebler D. 2000. *Botrytis cinerea*—history of chemical control and novel fungicides for its management. *Crop Protect.* 19, 557–561
- Sharma RR, Singh D, Singh R. 2009. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: A review. *Biol. Control*, 50, 205–221.