

## Efecto del quitosano en el desarrollo *in vitro* de *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.:Fr.) Vuill. en dos medios de cultivo

### Effect of chitosan on the *in vitro* development of *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.:Fr.) Vuill. on two culture medium

María Guadalupe Guerra-Sánchez<sup>1</sup>, Luis Armando Sandoval-Escobar<sup>1</sup>,  
Enriqueta Amora-Lazcano<sup>1</sup>, Luis Vásquez-Méndez<sup>1</sup>,  
Miguel Gerardo Velázquez-del Valle<sup>2</sup>, Ana Niurka Hernández-Lauzardo<sup>3</sup>

#### Resumen

En este trabajo se evaluó el efecto antifúngico del quitosano (0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 mg mL<sup>-1</sup>) en el desarrollo *in vitro* (crecimiento micelial, formación de cuerpos fructíferos, esporulación, germinación y liberación de proteínas) de *Rhizopus stolonifer* en dos medios de cultivo (papa dextrosa agar y medio mínimo). Los resultados obtenidos demostraron que el quitosano inhibió el crecimiento micelial de *R. stolonifer* en ambos medios de cultivo. El mayor índice antifúngico se observó en el medio papa dextrosa agar. El quitosano no afectó la formación de los cuerpos fructíferos de *R. stolonifer* en los medios estudiados. La esporulación y la germinación de las esporas se afectaron en ambos medios de cultivo por efecto de quitosano, siendo más notable en el medio medio mínimo. Se demostró la liberación de proteínas por efecto del quitosano en medio mínimo y caldo papa dextrosa. En general, en este estudio se evidenció el efecto antifúngico del quitosano en el desarrollo *in vitro* de *Rhizopus stolonifer* con independencia del medio de cultivo empleado. Sin embargo, en medio medio mínimo podrían observarse mejor los efectos antifúngicos del quitosano.

**Palabras clave:** pudriciones poscosecha, quitosano, hongos fitopatógenos.

#### Abstract

This work evaluated chitosan's antifungal effect (0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 mg mL<sup>-1</sup>) on *in vitro* *Rhizopus stolonifer* development (mycelial growth, fruit body formation, sporulation, germination and protein release) in potato dextrose agar (PDA) medium and minimal medium. The results showed that chitosan inhibited *R. stolonifer* mycelial growth in both culture mediums. The highest antifungal effect was observed on PDA medium. Chi-

1 Profesor-Investigador, Departamento de Microbiología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, México, D.F.

2 Estudiante de Licenciatura, Departamento de Microbiología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, México, D.F.

3 Profesor-Investigador, Instituto Politécnico Nacional, Centro de Desarrollo de Productos Bióticos, México D.F. anhernandez@ipn.mx

tosan did not affect *R. stolonifer* fruit body formation in the medium being studied. Chitosan affected sporulation and spore germination in both culture mediums; however, it was more noticeable in minimal medium. Chitosan did affect protein release in both minimal medium and PDA medium. This study thus showed the antifungal effect of chitosan on *Rhizopus stolonifer* *in vitro* development regardless of the culture medium used; however, chitosan's best antifungal effects could be observed in minimal medium.

**Key words:** Postharvest rots, chitosan, phytopathogen fungi.

**Recibido:** marzo 2 de 2010

**Aprobado:** noviembre 3 de 2010

## Introducción

Las pudriciones de frutas y hortalizas causadas por microorganismos son comunes durante los procesos de almacenamiento y transporte de los productos agrícolas en la etapa poscosecha. *Rhizopus stolonifer* es considerado uno de los principales fitopatógenos que provocan enfermedades como la pudrición blanda que conlleva la maceración celular de los tejidos y causa importantes pérdidas económicas. Recientemente, se ha buscado implementar alternativas naturales como el uso del quitosano para controlar diversas enfermedades poscosecha (Liu *et al.*, 2007; Badawy y Rabea, 2009). El quitosano está constituido fundamentalmente por unidades de glucosamina con uniones  $\beta$  (1-4), se obtiene a partir de los residuos de crustáceos entre los que se destacan el camarón, el cangrejo y la langosta (Du *et al.*, 2009; Al Sagheer *et al.*, 2009; Falcón *et al.*, 2008) y tiene la ventaja de ser biodegradable, no tóxico y con amplias propiedades antifúngicas.

Algunos autores han encontrado que el quitosano afecta el crecimiento micelial y causa severos daños en las hifas provocando afectaciones morfológicas en las mismas (Xu *et al.*, 2007; Singh *et al.*, 2008). De forma similar, otras etapas importantes del desarrollo fúngico han resultado afectadas por la aplicación de este polímero; recientemente se demostró que el quitosano, mediante un proceso dependiente de energía, permeabilizó y penetró la membrana plasmática de diferentes células fúngicas (hifas, esporas y tubos germinales) sugiriéndose que el polímero interac-

tuó con componentes externos de la membrana provocando cambios conformacionales que implicaron la formación de poros (Palma-Guerrero *et al.*, 2008, 2009). Otras investigaciones demostraron la salida de proteínas y otros constituyentes intracelulares (Guo *et al.*, 2008).

Los efectos antifúngicos del quitosano sobre diferentes fitopatógenos se han relacionado con el nivel de desacetilación de la molécula, la concentración aplicada y la masa molecular del compuesto, entre otros factores (Falcón *et al.*, 2008; Bautista-Baños *et al.*, 2006; Hernández-Lauzardo *et al.*, 2008). Por otra parte, se conoce que las características del polímero pueden influir en las propiedades funcionales de los sistemas donde se adicione, interviniendo de manera significativa en el efecto fisiológico de los microorganismos (Rabea *et al.*, 2003). Sin embargo, es importante seleccionar adecuadamente un medio de cultivo *in vitro* que permita obtener mayor información acerca del efecto antifúngico del quitosano sobre el microorganismo estudiado, y conocer si dicho efecto se mantiene con independencia del medio empleado. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto antifúngico del quitosano en el crecimiento micelial, la formación de cuerpos fructíferos, la esporulación, la germinación y la liberación de proteínas en *R. stolonifer* cultivado en un medio rico en nutrientes y en un medio mínimo.

## Materiales y métodos

**Material biológico.** Se empleó la cepa R3 de *Rhizopus stolonifer* obtenida de frutos de

jitomate en Yautepec, Morelos, México (Hernández-Lauzardo *et al.*, 2006).

**Soluciones de quitosano.** Para elaborar la solución patrón de quitosano (PM=17,4 KDa; 75-85% grado de desacetilación, Sigma-Aldrich) con una concentración de 10 mg mL<sup>-1</sup> se pesaron 2 g de quitosano en una balanza analítica, se disolvieron en 100 mL de agua destilada con 2 mL de ácido acético y se agitaron durante 24 h. Posteriormente, se ajustó el pH a 5,6 adicionando NaOH 1 N, y se aforó a 200 mL con agua destilada (El Ghaouth *et al.*, 1991). Se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 15 min. Se tomaron las alícuotas correspondientes para obtener las concentraciones de quitosano estudiadas (0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 mg mL<sup>-1</sup>).

**Determinación del índice antifúngico del quitosano sobre el crecimiento micelial.** Se colocaron discos de micelio de la cepa R3 (5 mm) en el centro de cajas de Petri con medio papa dextrosa agar (PDA) (Bioxon) o medio mínimo agar (MMA) (Guerra-Sánchez *et al.*, 2009) (Glucosa 1%, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 0,3%, solución de sales y elementos trazas 62,5 mL L<sup>-1</sup>, Agar 1,5%) conteniendo las concentraciones de quitosano referidas anteriormente (pH 5,6). Se incubaron durante 48 h a 25 °C. El diámetro del crecimiento micelial se midió con un vernier digital cuando el micelio del tratamiento sin quitosano alcanzó el borde de la caja de Petri (48 h). Se calculó el promedio de tres repeticiones y se expresó como diámetro de crecimiento en mm. A partir de esos valores se calculó el índice antifúngico de acuerdo con la siguiente fórmula (Guo *et al.*, 2006):

$$\text{Índice antifúngico (\%)} = 1 - (D_a/D_b) \times 100$$

Donde:

D<sub>a</sub> = diámetro de la zona de crecimiento en las cajas con quitosano.

D<sub>b</sub> = diámetro de la zona de crecimiento en las cajas testigo.

**Establecimiento del microcultivo para la descripción morfológica de *R. stolonifer*.** Se adicionó medio de cultivo (MMA y PDA con 0;

0,5; 1,0; 1,5; 2,0 mg mL<sup>-1</sup> de quitosano) aún sin solidificar sobre la superficie de un portaobjetos estéril, se agregaron 50 µL de una suspensión de esporas de *R. stolonifer* sobre este medio. Los tratamientos se incubaron durante 72 horas a 25 °C en cámara húmeda y en condiciones asépticas. Posteriormente, se realizaron tinciones con azul de lactofenol (0,1% p/v). Las muestras se observaron al microscopio óptico y se describieron de acuerdo con Schipper (1984).

**Efecto antifúngico del quitosano en la esporulación.** Se adicionaron 10 mL de agua destilada estéril a las cajas de Petri con los medios MMA y PDA (48 h) que contenían las concentraciones de quitosano evaluadas (0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 mg mL<sup>-1</sup>). Se raspó el micelio con una varilla de vidrio y se añadieron otros 10 mL de agua, se colectaron las esporas y se procedió a contarlas en cámara de Neubauer en un microscopio óptico (40 X). Los datos se expresaron como número de esporas mL<sup>-1</sup>.

**Germinación.** Se tomaron alícuotas de 50 µL de la suspensión de esporas previamente mencionada, y se agregaron en tubos con 500 µL de los medios CPD y medio mínimo (MM) (Glucosa 1%, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 0,3%, solución de sales y elementos trazas 62,5 mL L<sup>-1</sup>). El conteo del número de esporas germinadas se realizó a las 6 h de incubación a 25 °C (100 esporas por muestra) en un microscopio óptico (40 x) con un contador manual. Las esporas se consideraron germinadas cuando el largo del tubo germinal fue igual o excedió la longitud de la espora (El Ghaouth *et al.*, 1992).

**Cuantificación de proteínas en el sobrenadante del medio de cultivo.** Para obtener los sobrenadantes se preparó una suspensión de esporas de la cepa R3 (1x10<sup>6</sup> esporas mL<sup>-1</sup>) y se inoculó en matraces con 100 mL de CPD y MM con las concentraciones de quitosano de 0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 mg mL<sup>-1</sup>. Se incubaron a 25 °C en agitación (100 rpm) durante 24 h. Las muestras se centrifugaron a 5000 rpm durante 5 min (4 °C), los sobrenadantes se colectaron en tubos Falcon y se congelaron a -70 °C hasta su posterior uso. Las proteínas se cuantificaron

por el método de Lowry siguiendo las especificaciones del Kit comercial 500-0114 (BioRad) (Lowry *et al.*, 1951) utilizando albúmina sérica bovina (BSA) como proteína estándar; se elaboró una curva tipo con el patrón de BSA (0,5 mg mL<sup>-1</sup>). Las lecturas se realizaron en un espectrofotómetro a 655 nm. La concentración de proteínas se expresó en µg mL<sup>-1</sup>.

**Diseño de experimentos y análisis estadísticos.** Los experimentos se realizaron empleando un diseño completamente al azar en arreglo simple. Los datos se procesaron mediante un análisis de varianza de una vía y la diferencia de las medias de tres repeticiones se determinó con la prueba de Tukey. Se utilizó el paquete estadístico Sigma Stat versión 2.0.

## Resultados

**Efecto antifúngico del quitosano sobre el crecimiento micelial de *R. stolonifer*.** El índice antifúngico del quitosano en los medios de cultivo PDA y MMA se muestra en el cuadro 1. En el medio PDA se observa que el quitosano causó un efecto inhibitorio sobre el crecimiento micelial cuando se aplicó a las concentraciones de 1,0; 1,5; 2,0 mg mL<sup>-1</sup> (41,21; 46,86 y 56,06%, respectivamente) se observaron diferencias significativas entre las concentraciones evaluadas. La concentración de 0,5 mg mL<sup>-1</sup> (4,14%) no causó inhibición significativa del crecimiento

micelial de *R. stolonifer* cultivado en medio PDA con respecto al testigo. Los resultados obtenidos al crecer la cepa de *R. stolonifer* en MMA se muestran en el cuadro 1. Para el caso del MMA se observa que sólo la concentración de 2,0 mg mL<sup>-1</sup> produjo una inhibición significativa del crecimiento micelial, presentándose un índice antifúngico de 49,55%. Las concentraciones de 0,5; 1,0 y 1,5 mg mL<sup>-1</sup>, aunque causaron inhibición del crecimiento micelial, no fueron estadísticamente significativas con relación al testigo durante el tiempo de incubación en las condiciones empleadas.

**Descripción morfológica de los cuerpos fructíferos de *R. stolonifer* cultivado en dos medios de cultivo.** En los medios PDA y MMA se observó que *R. stolonifer* formó hifas cenocíticas aéreas y también se apreció la formación de los cuerpos fructíferos típicos de esta especie fúngica caracterizados por la formación de esporangióforos y esporangios en el interior de los cuales se observó una coloración oscura típica de las esporangiosporas (imágenes no mostradas). La aplicación de quitosano a los medios referidos anteriormente no afectó la formación de los cuerpos fructíferos ni implicó variaciones en los mismos, por lo que en las condiciones en las que se desarrollaron los experimentos no se demostró que el polímero causara algún efecto sobre los cuerpos fructíferos de *R. stolonifer*.

**Cuadro 1.** Índice antifúngico del quitosano en *Rhizopus stolonifer* crecido en dos medios de cultivo durante 48 h.

Índice antifúngico del quitosano (%)*		
Concentración de quitosano (mg mL <sup>-1</sup> )	Papa Dextrosa Agar	Medio Mínimo Agar
0	0 ± 0 a	0 ± 0 a
0.5	4.14 ± 4.15 ab	11.46 ± 15.29 ab
1.0	41.21 ± 18.10 bc	32.81 ± 14.41 ab
1.5	46.86 ± 16.07 c	43.29 ± 18.63 ab
2.0	56.06 ± 23.44 c	49.55 ± 22.63 b

\*Valores seguidos por la desviación estándar de la media. Letras diferentes dentro de las columnas indican diferencias estadísticas significativas de acuerdo al test de Rangos Múltiples de Tukey ( $p < 0.05$ )

**Efecto del quitosano sobre la esporulación de *Rhizopus stolonifer*.** En el cuadro 2 se observan los resultados del efecto del quitosano sobre la esporulación de *R. stolonifer*. El tratamiento testigo presentó  $18,9 \times 10^5$  esporas  $\text{mL}^{-1}$  en el medio PDA. El efecto del quitosano en la disminución de la esporulación se manifestó solamente en la concentración de  $2,0 \text{ mg mL}^{-1}$ , observándose un valor de  $2,8 \times 10^5$  esporas  $\text{mL}^{-1}$ , encontrándose diferencias significati-

vas. En el medio MMA se pone en evidencia la disminución de la esporulación en presencia del polímero. En este medio, con las concentraciones de  $1,0$ ;  $1,5$ ;  $2,0 \text{ mg mL}^{-1}$  se observó una disminución significativa en el número de esporas obtenidas ( $12,3$ ;  $8,1$  y  $0,5 \times 10^5$  esporas  $\text{mL}^{-1}$  respectivamente). El mayor efecto inhibitorio del quitosano sobre la esporulación de *R. stolonifer* se obtuvo con las concentraciones de  $1,5$  y  $2,0 \text{ mg mL}^{-1}$ .

**Cuadro 2.** Efecto del quitosano en la esporulación de *Rhizopus stolonifer* crecido en dos medios de cultivo (48 h).

No. de esporas $10^5 \text{ mL}^{-1}$ *		
Concentración de quitosano ( $\text{mg mL}^{-1}$ )	Papa Dextrosa Agar	Medio Mínimo Agar
0	$18.9 \pm 0.55$ a	$23.7 \pm 0.24$ a
0.5	$13.5 \pm 0.47$ ab	$18.6 \pm 0.62$ ab
1.0	$10.4 \pm 0.62$ ab	$12.3 \pm 0.26$ b
1.5	$6.2 \pm 0.76$ ab	$8.1 \pm 0.56$ bc
2.0	$2.8 \pm 0.29$ b	$0.5 \pm 0.06$ c

\* Valores seguidos por la desviación estándar de la media. Letras diferentes dentro de las columnas indican diferencias estadísticas significativas de acuerdo al test de Rangos Múltiples de Tukey ( $p < 0.05$ ).

**Cuadro 3:** Efecto del quitosano en la germinación de las esporas de *Rhizopus stolonifer* crecido en dos medios de cultivo (6 h).

Esporas germinadas (%)*		
Concentración de quitosano ( $\text{mg mL}^{-1}$ )	Caldo Papa Dextrosa	Medio Mínimo
0	$95.66 \pm 3.21$ a	$89.00 \pm 3.60$ a
0.5	$60.00 \pm 9.53$ b	$22.33 \pm 2.51$ b
1.0	$25.33 \pm 5.68$ c	$15.66 \pm 3.05$ c
1.5	$19.00 \pm 6.24$ c	$9.00 \pm 1.00$ d
2.0	$13.33 \pm 4.93$ c	$6.00 \pm 1.00$ d

\* Valores seguidos por la desviación estándar de la media. Letras diferentes dentro de las columnas indican diferencias estadísticas significativas de acuerdo al test de Rangos Múltiples de Tukey ( $p < 0.05$ ).



**Efecto del quitosano sobre la germinación de *Rhizopus stolonifer*.** En el cuadro 3 se presentan los valores del porcentaje de germinación obtenidos al final del periodo de incubación (6 h) de las muestras en medio CPD y MM en presencia de diferentes concentraciones de quitosano (0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 mg mL<sup>-1</sup>). En los dos medios de cultivo se observa que el porcentaje de germinación de las esporas de *R. stolonifer* presenta diferencias significativas entre el testigo y los tratamientos con quitosano. En el medio CPD los valores obtenidos en las concentraciones de 1,0; 1,5; 2,0 mg mL<sup>-1</sup> no presentan diferencias significativas entre ellos. En el caso del MM, las concentraciones de 1,5 y 2,0 mg mL<sup>-1</sup> causan una inhibición de la germinación de las esporas que no difiere significativamente entre ellas.

**Liberación de proteínas por efecto de quitosano.** En el cuadro 4 se muestran los resultados de la cuantificación de proteínas en los sobrenadantes de los cultivos de *R. stolonifer* crecidos durante 24 h en los medios CPD y MM en presencia de diferentes concentraciones de quitosano (0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 mg mL<sup>-1</sup>). Se observa que en los dos medios, por efecto del quitosano, se liberan proteínas al exterior celular. En el caso del medio CPD se presentan diferencias significativas entre el testigo y los tratamientos con quitosano. Sin embargo, no se manifiesta un efecto diferencial entre las diferentes concentraciones del polímero. Por otra parte, en MM también se observan diferencias significativas cuando se cultivó *R. stolonifer* en presencia de concentraciones diferentes de quitosano. En este caso es evidente que a medida que se incrementa la concentración se obtiene una mayor liberación de proteínas, presentándose valores que difieren significativamente entre sí.

## Discusión

En este trabajo, el efecto antifúngico del quitosano en el crecimiento micelial de *R. stolonifer* quedó demostrado en los dos medios de cultivo estudiados. En el medio PDA se des-

tacan las concentraciones de 1,0; 1,5; 2,0 mg mL<sup>-1</sup> por causar el mayor efecto en la inhibición del crecimiento micelial, y en el medio MMA la concentración de 2,0 mg mL<sup>-1</sup> resultó la más efectiva para inhibir el desarrollo del micelio. Este hecho podría atribuirse a que el medio PDA contiene mayor cantidad de nutrientes que permiten que el hongo desarrolle mayor actividad metabólica, y probablemente el polímero cause mayor afectación celular que se refleja desde concentraciones menores de quitosano. No obstante, la concentración no tuvo un efecto significativo en ninguno de los medios analizados. Estos resultados coinciden con los obtenidos previamente en *Aspergillus niger* tratado con diferentes concentraciones de quitosano (0,5-10 mg mL<sup>-1</sup>), donde no se pudo establecer una correlación proporcional entre la concentración del polímero y la inhibición del crecimiento micelial (Xiao-Fang *et al.*, 2008). Sin embargo, otras investigaciones revelaron que al incrementarse la concentración de quitosano se observó una disminución del crecimiento micelial de *Botrytis cinerea* y *Penicillium expansum* (Liu *et al.*, 2007). Considerando los resultados previos y los obtenidos en este trabajo, se podría afirmar que las respuestas son variables y dependen no sólo de la concentración del polímero sino también de la especie fúngica y del medio de cultivo empleado en el estudio. La formación de micelio cenocítico y de los cuerpos fructíferos constituidos por esporangióforos, esporangios y esporangiosporas, característicos de *R. stolonifer*, se apreció en medio PDA y MMA en presencia y ausencia de quitosano. La aplicación del polímero no afectó que se produjeran estas estructuras básicas que, de acuerdo con la clave de identificación, permiten distinguir las especies fúngicas que se encuentran dentro de *R. stolonifer*, demostrándose que estas estructuras distintivas concuerdan con las reportadas por Schipper (1984). La esporulación constituye otra fase importante del desarrollo fúngico, en este trabajo se afectó en los medios PDA y MMA por efecto del quitosano, no obstante el comportamiento fue variable. En el medio PDA sólo la concentración de 2 mg mL<sup>-1</sup> causó una disminución en el nú-

**Cuadro 4.** Efecto del quitosano en la liberación de proteínas a las 24 h de cultivo.

Liberación de proteínas ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )*		
Concentración de quitosano ( $\text{mg mL}^{-1}$ )	Caldo Papa Dextrosa	Medio Mínimo
0	593 $\pm$ 34.7 a	17 $\pm$ 4.9 a
0.5	810 $\pm$ 14.2 b	99 $\pm$ 5.9 b
1.0	747 $\pm$ 55.4 b	131 $\pm$ 7.9 c
1.5	730 $\pm$ 62.2 b	170 $\pm$ 5.1 d
2.0	816 $\pm$ 42.7 b	230 $\pm$ 18.9 e

\* Valores seguidos por la desviación estándar de la media. Letras diferentes dentro de las columnas indican diferencias estadísticas significativas de acuerdo a la prueba de Tukey ( $p < 0.05$ ).

mero de esporas obtenidas; de forma diferente, en el medio MMA se obtuvieron resultados inhibitorios con concentraciones desde 1,0 hasta 2,0  $\text{mg mL}^{-1}$ . En ninguno de los medios estudiados se encontró que la disminución de la esporulación se relacione con un incremento en la concentración. En el medio PDA, que contiene mayor cantidad de nutrientes, la esporulación se manifestó normalmente sin diferencias significativas entre el testigo y los tratamientos con quitosano hasta la concentración de 1,5  $\text{mg mL}^{-1}$ , sólo una concentración más elevada de quitosano logró afectar este proceso biológico. Por el contrario, en medio MMA la respuesta al quitosano fue mayor. Recientemente, se reportó que el fenómeno de la esporulación está mediado por señales, específicamente, la vía de la proteína cinasa A participó en la regulación de la esporulación asexual del hongo *Mucor circine-lloides*, proceso que se afectó en mutantes carentes de la subunidad reguladora de esta proteína (Ocampo *et al.*, 2009). Al respecto, proponemos que el quitosano afecta el desarrollo de la cepa deteriorando tanto la estructura del hongo como sus funciones fisiológicas y reproductivas y, en el caso particular de la esporulación, las vías de señales podrían activarse o no de forma diferencial por la presencia del quitosano y dependiendo del medio de cultivo empleado. Por otra parte, la germinación es un proceso del de-

sarrollo natural del hongo que se ve disminuida por efecto del polímero utilizado. De forma general, se observa que en todas las concentraciones de quitosano utilizadas se presenta una inhibición en el fenómeno de germinación independientemente del medio de cultivo donde se desarrolle el bioensayo. No obstante, en el MM se observa el fenómeno de inhibición de manera más notoria, mostrándose el menor porcentaje de germinación (6,0%). Este trabajo refleja que la germinación de las esporas es un proceso muy sensible a la aplicación del quitosano, lo que coincide con lo reportado por Palma-Guerrero *et al.* (2008), estos autores encontraron que las esporas de *Neurospora crassa* fueron más sensibles que las hifas ante la aplicación de quitosano. Este fenómeno también se ha demostrado en otros trabajos utilizando diferentes hongos fitopatógenos como modelo de estudio, como es el caso de *Botrytis cinerea* (Xu *et al.*, 2007). En investigaciones previas se señaló que la naturaleza policatiónica del quitosano favorece su interacción con las superficies microbianas, en particular con la membrana celular de los hongos, aspecto que podría afectar la integridad de la misma y causar la salida de material intracelular (Zakrzewska *et al.*, 2005; Guo *et al.*, 2008). En este estudio se demostró la liberación de proteínas por efecto del quitosano en los dos medios de cultivo estudiados.

La concentración influyó de forma significativa en el medio MM donde fue posible observar un efecto más claro de la salida de material proteico. La propia constitución nutritiva del CPD podría interferir en la adecuada medición de las proteínas. Sin embargo, en medio MM se facilitó la liberación de proteínas por efecto del quitosano; son escasos los trabajos que demuestran salida de material proteico por efecto del mismo. Considerando los resultados obtenidos en este trabajo, es evidente que el quitosano afecta el desarrollo *in vitro* de *R. stolonifer* en los dos medios de cultivo estudiados. No obstante, la utilización del medio MM facilitará identificar con mayor precisión los efectos antifúngicos del quitosano, obteniéndose mejores resultados que podrían contribuir a mejorar las estrategias de control de hongos fitopatógenos para disminuir las pudriciones poscosecha.

## Conclusiones

En este estudio se evidenció el efecto antifúngico del quitosano en el desarrollo *in vitro* de *Rhizopus stolonifer* con independencia del medio de cultivo empleado. Sin embargo, en medio mínimo se demostraron mejor los efectos antifúngicos del quitosano.

## Agradecimientos

Los autores agradecen el apoyo financiero del Instituto Politécnico Nacional brindado a través de la Secretaría de Investigación y Posgrado.

## Referencias bibliográficas

- Al Sagheer, F. A., Al-Sughayer, M. A., Muslim, S., Elsabee, M. Z. 2009. Extraction and characterization of chiton and chitosan from marine sources in Arabian Gulf. *Carbohydrate Polymers* 77:410-419.
- Badawy, M. E. I. and Rabea, E. I. 2009. Potential of the biopolymer chitosan with different molecular weights to control postharvest gray mold of tomato fruit. *Postharvest Biology and Technology* 51 (1):110-117.
- Bautista-Baños, S., Hernández-Lauzardo, A. N., Velázquez-del Valle, M. G., Hernández-López, M., Ait Barka, E., Bósquez-Molina, E., and Wilson, C. L. 2006. Chitosan as a potential natural compound to control pre and postharvest diseases of horticultural commodities. *Crop Protection* 25: 108-118.
- Du, J. Zhao, Y., Dai, S., Yang, B. 2009. Preparation of water-soluble chitosan from shirmp shell and its antibacterial activity. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 10:103-107.
- El Ghaouth, A., Arul, J. and Ponnampalam, R. 1991. Use of chitosan coating to reduce water loss and maintain quality of cucumbers and bell pepper fruits. *Journal of Food Processing and Preservation* 15:359-368.
- El Ghaouth, A., Arul, J., Grenier, J., and Asselin, A. 1992. Antifungal activity of chitosan on two postharvest pathogens of Strawberry fruits. *Phytopathology* 82: 398-402.
- Falcón, A. B., Cabrera, J. C., Costales, D., Ramírez, M. A., Cabrera, G., Toledo, V. and Martínez-Téllez, M. A. 2008. The effect of size and acetylation degree of chitosan derivatives on tobacco plant protection against *Phytophthora parasitica nicotianae*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 24:103-112.
- Guerra-Sánchez, M. G., Vega-Pérez, J., Velázquez-del Valle, M. G. and Hernández-Lauzardo, A. N. 2009. Antifungal activity and release of compounds on *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.:Fr.) Vuill. by effect of chitosan with different molecular weights. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 93:18-22.
- Guo, Z., Chen, R., Xing, R., Liu, S., Yu, H., Wang, P., Li, C., Li, P. 2006. Novel derivatives of chitosan and their antifungal activities *in vitro*. *Carbohydrate Research* 341: 351-354.
- Guo, Z., Xing, R., Liu, S., Zhong, Z., Ji, X., Wang, L. and Li, P. 2008. The influence of molecular weight of quaternized chitosan on antifungal activity. *Carbohydrate Polymers* 71: 694-697.
- Hernández-Lauzardo, A. N. Bautista-Baños, S., Velázquez-del Valle, M. G., Méndez-Montealvo, M. G., Sánchez-Rivera, M. M., and Bello-Pérez, L. A. 2008. Antifungal effects of chitosan with different molecular weights on *in vitro* development of *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.:Fr.) Vuill. *Carbohydrate Polymers* 73: 541-547.
- Hernández-Lauzardo, A. N., Bautista-Baños, S., Velázquez-del Valle, M. G. y Trejo-Espino, J. L. 2006. Identification of *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.: Fr.) Vuill., causal agent of Rhizopus rot disease of fruits and vegetables. *Revista Mexicana de Fitopatología* 24:65-69.



- Liu, J., Tian, S., Meng, X. and Xu, Y. 2007. Effects of chitosan on control of postharvest diseases and physiological responses of tomato fruit. *Postharvest Biology and Technology* 44: 300-306.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193: 265-275.
- Ocampo, J., Fernández-Núñez, L., Silva, F., Pereyra, E., Moreno, S., Garre, V. and Rossi, S. 2009. A subunit of protein kinase A regulates growth and differentiation in the fungus *Mucor circinelloides*. *Eukaryotic Cell* 8:933-944.
- Palma-Guerrero, J., Jansson, H., Salinas, J. and Lopez-Llorca, J. V. 2008. Effect of chitosan on hyphal growth and spore germination of plant pathogenic and biocontrol fungi. *Journal of Applied Microbiology* 104: 541-553.
- Palma-Guerrero, J., Huang, I.-C., Jansson, H.-B., Salinas, J., Llorca-López, L. V. and Read, N. D. 2009. Chitosan permeabilizes the plasma membrane and kills cells of *Neurospora crassa* in an energy dependent manner. *Fungal Genetics and Biology* 46: 585-594.
- Rabea, E. I., Badawy, M. E. I., Stevens, C. V., Smagghe and G., Steurbaut, E. 2003. Chitosan as an Antimicrobial Agent: Applications and Mode of Actions. *Biomacromolecules* 4: 1457-1465.
- Schipper, M. A. 1984. A revision of the genus *Rhizopus*. *Studies in Mycology Serie No. 25*. Baarn: Centraalbureau voor Schimmelcultures (eds). p. 34.
- Singh, T., Vesentini, D., Singh, A. P. and G. Daniel. 2008. Effect of chitosan on physiological, morphological, and ultrastructural characteristics of wood-degrading fungi. *International Biodeterioration and Biodegradation* 62:116-124.
- Xiao-Fang, L., Xiao-Qiang, F., Sheng, Y., Ting-Pu, W. and Zhong-Xing, S. 2008. Effects of Molecular Weight and Concentration of Chitosan on Antifungal Activity against *Aspergillus Niger*. *Iranian Polymer Journal* 17: 843-852.
- Xu, J., Zhao, X., Han, X. and Du, Y. 2007a. Antifungal activity of oligochitosan against *Phytophthora capsici* and other pathogenic fungi *in vitro*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 87: 220-228.
- Zakrzewska, A., Boorsma, A., Brul, S., Hellingwerf, K. J. and Klis, F. M. 2005. Transcriptional response of *Saccharomyces cerevisiae* to the plasma membrane-perturbing compound chitosan. *Eukaryotic Cell* 4: 703-715.