

# Actividad antifúngica del quitosano y aceites esenciales sobre *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.:Fr.) Vuill., agente causal de la pudrición blanda del tomate

## Antifungal activity of chitosan and essential oils on *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.:Fr.) Vuill causal agent of soft rot of tomato

Alejandra María Alvarado Hernández\*, Laura Leticia Barrera Necha\*\*, Ana Niurka Hernández Lauzardo\*\*\* y Miguel Gerardo Velázquez del Valle\*\*\*\*

### Resumen

*Rhizopus stolonifer* es el agente causal de la pudrición blanda, enfermedad poscosecha que ocasiona pérdidas económicas importantes. Se han empleado fungicidas sintéticos como el dicloran para controlar a este microorganismo, sin embargo, se ha demostrado que los fungicidas representan un riesgo para el ambiente y la salud humana. Actualmente se buscan alternativas naturales para el control de las pudriciones poscosecha. Se evaluó *in vitro* e *in situ* el efecto antifúngico del quitosano y de los aceites esenciales de canela (*Cinnamomum zeylanicum*), clavo (*Syzygium aromaticum*) y tomillo (*Thymus vulgaris*) y dicloran sobre *Rhizopus stolonifer*. Los tratamientos más efectivos para inhibir *in vitro* a *Rhizopus stolonifer* fueron obtenidos con quitosano a 10 mg mL<sup>-1</sup>, con los tres aceites esenciales probados a la concentración de 0,3 mg mL<sup>-1</sup>, las mezclas de quitosano a 10 mg mL<sup>-1</sup> con los aceites a 0,3 mg mL<sup>-1</sup> y el dicloran a 1 mg mL<sup>-1</sup>. Los experimentos *in situ* mostraron que el tratamiento individual con quitosano fue el mejor para reducir el porcentaje de infección de los frutos de tomate (*Lycopersicon esculentum*) inoculados con *Rhizopus stolonifer* y que la mezcla de quitosano con aceites esenciales no mejora la actividad antifúngica. El quitosano y el dicloran fueron los mejores tratamientos para reducir la pérdida de peso de los frutos. Los tratamientos individuales con quitosano representan una alternativa natural para controlar la pudrición blanda en frutos de tomate.

**Palabras clave:** quitosano, aceites esenciales, *Rhizopus stolonifer*, podredumbre blanda.

### Abstract

*Rhizopus stolonifer* is the causal agent of soft rot, postharvest disease that causes important economic losses. Synthetic fungicides such as dichloran have been used to control this microorganism; however, it has been shown that fungicides represent a risk for the environment and human health. Actually, natural alternatives are looked for the control of postharvest rotting. *In vitro* and *in situ* experiments the antifungal effect of chitosan, essential oils of cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*), clove (*Syzygium aromaticum*), and thyme (*Thymus vulgaris*) and dichloran on *Rhizopus stolonifer* were evaluated. The most effective treatments for *in vitro* inhibition of *Rhizopus stolonifer* were obtained by chitosan to 10 mg mL<sup>-1</sup>, with the three essential oils proved to the concentration of 0.3 mg mL<sup>-1</sup>, the mixtures chitosan to 10 mg mL<sup>-1</sup> with the oils at 0.3 mg mL<sup>-1</sup> and dichloran at 1 mg mL<sup>-1</sup>. *In situ* experiments showed that the individual treatment with chitosan was the best to reduce the infection percentage of the tomato (*Lycopersicon esculentum*) fruits inoculated with *Rhizopus stolonifer* and chitosan mixture with essential oils did not improve its antifungal activity. Chitosan and dichloran were the best treatments

\* Maestra en Ciencias

\*\* \*\*\*, \*\*\*\* Doctor en Ciencias y Profesor-Investigador. Instituto Politécnico Nacional, Centro de Desarrollo de Productos Bióticos, Carretera Yauatepec-Jojutla, Km 6, calle CEPROBI No. 8, Col. San Isidro, Yauatepec, Morelos, México CP 62731. Correspondencia: mdlvall@ipn.mx

to reduce the weight loss of the fruits. Individual treatments with chitosan represent a natural alternative for the control of soft rot on tomato fruits.

**Key words:** Chitosan, essential oils, *Rhizopus stolonifer*, soft rot

**Recibido:** agosto 19 de 2010

**Aprobado:** noviembre 30 de 2011

## Introducción

*Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.:Fr.) Vuill causa la pudrición blanda en frutas y hortalizas, lo que ocasiona pérdidas económicas importantes durante la fase de poscosecha, debido a que este hongo tiene un crecimiento rápido y es de fácil transmisión por heridas producidas durante la manipulación de los frutos (Northover y Zhou, 2002; Velázquez-del Valle *et al.*, 2008). La producción y exportación de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) es muy importante en México, al igual que en otros países de América Latina como Brasil y Chile. No obstante, se han reportado pérdidas significativas ocasionadas por *Rhizopus stolonifer* (Hahn, 2006). Para controlar las pudriciones se han utilizado fungicidas químicos sintéticos, con los riesgos que implican su uso, aunque en algunos casos se ha buscado reducir los daños que ocasionan (Kanetis *et al.*, 2007). En particular, se ha reportado que el fungicida sintético dicloran es muy activo en contra de *Rhizopus stolonifer* (Adaskaveg *et al.*, 2002), sin embargo, este fungicida puede tener efectos carcinogénicos en el ser humano. Por ello es necesario buscar alternativas naturales que controlen las pudriciones y que no afecten al ambiente y a la salud humana, entre las alternativas se destaca el uso del quitosano y de aceites esenciales (Tripathi y Dubey, 2004).

El quitosano es un derivado desacetilado de la quitina, polímero constituido fundamentalmente por unidades de  $\beta$ - (1, 4)-2 acetamido-2-desoxi-D-glucosa y  $\beta$ - (1, 4)-amino-2-desoxi-D-glucosa, que tiene propiedades policatiónicas y potencial para controlar pudriciones poscosecha (Bautista-Baños *et al.*, 2006). Este polímero se ha empleado como película para cubrir y conservar algunos frutos (fresas, tomate, longan, etc.), y se ha conseguido controlar pudriciones y mejorar la calidad de los mismos (Jiang y Li, 2001; Devlieghere *et al.*, 2004; Hernández-Muñoz *et al.*, 2008).

Los aceites esenciales son líquidos oleosos, aromáticos y volátiles constituidos por una mezcla compleja de compuestos, principalmente terpenos y alcoholes fenólicos que han sido reportados como inhibidores de hongos poscosecha (*Botrytis cinerea* y *Monilinia fructi-*

*cola*) en condiciones *in vitro* (Tripathi y Dubey, 2004). Recientemente se informó que la actividad antimicrobiana de las películas de quitosano se mejora cuando se les incorpora aceites esenciales de clavo y tomillo ((Hosseini *et al.*, 2008) aunque no se ha reportado la eficacia *in situ* de estos aceites ni el potencial que pudieran tener las mezclas de los aceites con quitosano para controlar mas eficientemente la pudrición blanda en frutos. El objetivo de este trabajo fue determinar *in vitro* e *in situ* la actividad antifúngica del quitosano, de los aceites esenciales de clavo, canela y tomillo aplicados de manera individual y mezclados en comparación con dicloran sobre *Rhizopus stolonifer*.

## Materiales y métodos

**Material biológico.** Se empleó la cepa R3 de *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.:Fr.) Vuill aislada mediante cámara húmeda de frutos de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) "Saladette" provenientes de Yauatepec, en el estado de Morelos, en México (Hernández-Lauzardo *et al.*, 2006). La cepa R3 de *Rhizopus stolonifer* pertenece al Laboratorio de fitopatología del Centro de desarrollo de productos bióticos del Instituto Politécnico Nacional y se mantiene en refrigeración con resiembras periódicas.

En los ensayos *in situ* se utilizaron frutos de tomate "Saladette" de tamaño uniforme, estado rojo maduro y sin lesiones cosechados en Tlayacapan, en el estado de Morelos, en México.

**Soluciones de quitosano, aceites esenciales y dicloran.** Se preparó una solución concentrada de quitosano (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) de bajo peso molecular ( $20 \text{ mg mL}^{-1}$ ). Se pesaron 2 g de quitosano y se disolvieron en 2 ml de ácido acético glacial y 50 ml con agua destilada, se agitó durante 24 h y se ajustó el pH a 5,6 con NaOH 0.1 N (El Ghaouth *et al.*, 1991), la solución se aforó a 100 ml con agua destilada y se esterilizó por autoclave a 121 °C durante 15 min. Se tomaron las alícuotas correspondientes para adicionarse a los recipientes que contenían los medios de cultivo estériles de Agar Papa Dextrosa (PDA, Bioxon)

y Caldo de Papa Dextrosa (PDB, Bioxon) y obtener las concentraciones de 2 y 10 mg mL<sup>-1</sup>.

Se emplearon los aceites esenciales comerciales de clavo (*Syzygium aromaticum* L.), canela (*Cinnamomum zeylanicum* Brine) y tomillo (*Thymus vulgaris* L.) (Compañía de Aceites y Esencias S. A. de C. V., México D. F., México). Los aceites se pesaron, se diluyeron y dispersaron en agua destilada estéril y contenían tween 80 (0,06 mg mL<sup>-1</sup>), se agregaron a los recipientes que contenían el medio de cultivo las cantidades necesarias para tener las concentraciones finales de 0,1 y 0,3 mg mL<sup>-1</sup> (Barrera-Necha, et al., 2009).

Se utilizó el fungicida agrícola comercial dicloran, 2,6-dicloro-4-nitroanilina (Compañía Gowan de México), el cual se diluyó en agua destilada estéril para preparar una solución a concentración de 10 mg mL<sup>-1</sup> y se adicionó a los recipientes que contenían los medios de cultivo para obtener una concentración final de 1 mg mL<sup>-1</sup>.

**Evaluaciones *in vitro*.** Los tratamientos individuales consistieron en: cajas de Petri con PDA (testigo), cajas de Petri con PDA y quitosano en concentraciones de 2 y 10 mg mL<sup>-1</sup>, cajas con cada uno de los tres aceites esenciales en concentraciones de 0,1 y 0,3 mg mL<sup>-1</sup> y dicloran a 1 mg mL<sup>-1</sup>, tratamiento usado como control positivo. Los tratamientos combinados fueron: cajas con PDA con quitosano a 2 mg mL<sup>-1</sup> y cada uno de los tres aceites a 0,1 y 0,3 mg mL<sup>-1</sup>, cajas con el polímero a 10 mg mL<sup>-1</sup> y los tres aceites esenciales a 0,1 y 0,3 mg mL<sup>-1</sup>. Fragmentos de 5 mm de un cultivo de *Rhizopus stolonifer* en condiciones de crecimiento de 25 ± 2 °C durante 72 h en PDA, fueron utilizados como inóculo. Los ensayos se incubaron a 25 ± 2 °C durante 48 h. Se realizaron 6 repeticiones por tratamiento y el experimento se repitió tres veces.

**Crecimiento micelial.** Cuando el tratamiento testigo cubrió totalmente la caja de Petri (48 h), se midió el diámetro de las colonias con un Vernier digital (Cienware). Con los datos obtenidos se calculó el índice antifúngico para cada tratamiento (Guo et al., 2006).

$$IA=1-(Da/Db) \times 100$$

Da: diámetro de crecimiento de los tratamientos evaluados.

Db: diámetro de crecimiento del testigo.

**Esporulación.** La esporulación de *Rhizopus stolonifer* en los diferentes tratamientos se evaluó a las 72 h de incubación. Se adicionaron 10 ml de agua destilada estéril, con una varilla de vidrio se raspó la superficie de

las cajas para arrastrar las esporas y luego estas fueron transferidas a un frasco. Para inhibir la germinación a cada suspensión de esporas se le agregaron siete gotas de lactofenol, se agitaron y se tomaron 20 µl de las mismas y se colocaron en una cámara de Neubauer para cuantificar las esporas en un microscopio óptico (40X) (Nikon, Alphaphot-2YS2). Los datos se reportaron en número de esporas mL<sup>-1</sup> (Hernández-Lauzardo et al., 2008).

**Germinación de las esporas.** Alícuotas de 50 µl con los tratamientos descritos previamente se colocaron en tubos Eppendorf. Se incubaron durante 12 h a 25 °C. Se tomaron 10 µl de cada tubo Eppendorf, se colocaron en un portaobjetos, se les agregó una gota de lactofenol y se cubrieron con un cubreobjetos. El conteo de la germinación de 100 esporas por muestra se realizó en un microscopio óptico (40X) 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).

**Ensayo antifúngico *in situ*.** Se emplearon frutos de tomate de la variedad "Saladette", estado rojo maduro, sin daños mecánicos o síntomas de enfermedad. Se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 1% durante 15 min, se lavaron tres veces con agua destilada y se dejaron secar a temperatura ambiente (25 ± 2 °C) sobre papel absorbente. Se establecieron los siguientes tratamientos: testigo negativo (agua destilada estéril sin inoculación de esporas), testigo positivo (agua destilada estéril), quitosano a 10 mg mL<sup>-1</sup>, los aceites esenciales a 0,3 mg mL<sup>-1</sup>, las combinaciones de quitosano a 10 mg mL<sup>-1</sup> con cada aceite esencial a 0,3 mg mL<sup>-1</sup> y el dicloran a 1 mg mL<sup>-1</sup>. En condiciones de esterilidad a cada fruto se le realizó con un bisturí, heridas de 2 mm de profundidad por 2 mm de ancho. Posteriormente cada fruto se sumergió totalmente durante 5 segundos en un vaso de precipitado que contenía cada tratamiento. Luego se colocaron en la campana de flujo, se secaron durante 5 minutos y se asperjaron con la solución de esporas de *Rhizopus stolonifer* mencionada anteriormente (excepto el testigo negativo). Los frutos tratados se incubaron en charolas de plástico organizadas horizontal y verticalmente para que los tratamientos tuvieran condiciones similares de iluminación, y temperatura (25 ± 2 °C) durante las 96 h del ensayo. Se evaluó el porcentaje de infección y el índice de severidad.

**Porcentaje de infección e índice de severidad.** Al término del periodo de almacenamiento, se cuantificaron los frutos que presentaban síntomas de pudrición blanda en cada tratamiento, el número total de frutos se consideró como el 100%. El índice de severidad se

determinó sobre la superficie de los frutos con grados de daño según una escala establecida con las siguientes características; 0 = 0; 1 = 1-5%; 2 = 6-15%; 3 = 16-45%; 4 = 46-75% y 5 = 76-100% de daño visual por fruto y se calculó el índice de severidad mediante la ecuación descrita por Pérez *et al.*, (1995): Índice de severidad =  $X_i(0) + X_i(1) + X_i(2) + X_i(3) + X_i(4) + X_i(5) / N$  donde  $X_i$  = número de frutos enfermos por cada grado de daño; 0, 1, 2, 3, 4, 5 = grado de daño en la escala utilizada y N = número total de frutos por unidad experimental.

**Pérdida de peso.** Los frutos de cada tratamiento se pesaron individualmente al inicio y al final del experimento. La pérdida de peso se evaluó a partir de la siguiente fórmula: pérdida de peso = (peso inicial - peso final) x 100.

**Análisis estadísticos.** Los experimentos se desarrollaron mediante un diseño experimental completamente al azar en arreglo simple. En los ensayos *in vitro* los datos obtenidos de crecimiento micelial y esporulación se analizaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) de una vía y la comparación de medias se hizo con la prueba de Tukey utilizando el programa Sigma Stat 3.5. Los datos obtenidos en los ensayos *in situ* se analizaron de acuerdo a un ANOVA con el programa Sigma Stat 3.5.

## Resultados y discusión

**Efecto de los tratamientos sobre el crecimiento micelial de *Rhizopus stolonifer*.** En la tabla 1 se muestran los resultados del crecimiento micelial de *Rhizopus stolonifer* y del índice antifúngico obtenido con las dos concentraciones de quitosano (2 y 10 mg mL<sup>-1</sup>) y los aceites esenciales de canela, clavo o tomillo (0,1 y 0,3 mg mL<sup>-1</sup>) y con dicloran (1 mg mL<sup>-1</sup>). El crecimiento micelial se redujo significativamente en comparación con el testigo en todos los tratamientos probados excepto en el tratamiento con aceite de canela a 0,1 mg mL<sup>-1</sup>. Se observó la inhibición total del crecimiento micelial con los aceites de canela, clavo y tomillo a 0,3 mg mL<sup>-1</sup> y con el dicloran, resultados que coinciden con los reportados por Barrera-Necha *et al.*, (2009), quienes utilizaron los aceites esenciales de canela, clavo y tomillo (0,1 y 0,3 mg mL<sup>-1</sup>) y observaron una total inhibición del crecimiento de *Fusarium oxysporum* f. sp. *Gladioli*. También se ha reportado una elevada actividad del fungicida dicloran en contra de *Rhizopus stolonifer* (Adaskaveg *et al.*, 2002). De las dos concentraciones de quitosano evaluadas, la de 10 mg mL<sup>-1</sup> mostró mayor índice antifúngico (77,4 %). Los resultados obtenidos con el quitosano son acordes con los reportados previamente donde se ha señalado que a mayores

**Tabla 1.** Crecimiento micelial e índice antifúngico de *Rhizopus stolonifer* en presencia de quitosano, aceites esenciales de canela, clavo o tomillo y con dicloran

Tratamientos (mg mL <sup>-1</sup> )	Crecimiento micelial (mm)	Índice antifúngico (%)
Testigo	78,0 a	0,0
Quitosano 2	47,9 d	38,6
Quitosano 10	17,6 e	77,4
Canela 0,1	74,6 a	4,4
Canela 0,3	-	100
Clavo 0,1	69,7 b	10,6
Clavo 0,3	-	100
Tomillo 0,1	52,1 c	32,4
Tomillo 0,3	-	100
Dicloran 1	-	100

(-) = Sin crecimiento. Los valores representan la media de 3 réplicas (n=6). Las letras indican diferencias estadísticas significativas (Tukey, P<0,001).

concentraciones de este polímero (0,5 a 2 mg mL<sup>-1</sup>) se observan mayores inhibiciones en el crecimiento micelial de *Rhizopus stolonifer* (Hernández-Lauzardo *et al.*, 2007). En la tabla 2 se presentan los resultados del crecimiento micelial y el índice antifúngico obtenidos con las dos concentraciones de quitosano mezcladas con los aceites esenciales de canela, clavo o tomillo. El crecimiento de *Rhizopus stolonifer* se redujo significativamente en todos los tratamientos probados, observándose índices antifúngicos del 100% en la mezcla de quitosano (10 mg mL<sup>-1</sup>) con tomillo (0,1 mg mL<sup>-1</sup>) y en todas las mezclas de quitosano (2 y 10 mg mL<sup>-1</sup>) con los tres aceites esenciales a 0,3 mg mL<sup>-1</sup>. En general se observó un mayor efecto inhibitorio en el crecimiento micelial de *Rhizopus stolonifer* cuando se mezcló el quitosano con los aceites esenciales que cuando se utilizó este polímero de manera individual.

**Efecto sobre la esporulación y germinación de las esporas.** La esporulación fue cuantificada únicamente en los tratamientos con quitosano a 10 mg mL<sup>-1</sup> y con aceite de tomillo a 0,1 mg mL<sup>-1</sup>, en los demás no hubo crecimiento micelial (tabla 3). Los resultados obtenidos en este trabajo con respecto al quitosano son similares a los obtenidos por Hernández-Lauzardo *et al.*, (2008) donde se reportó una tendencia similar que re-

**Tabla 2.** Crecimiento micelial e índice antifúngico de *Rhizopus stolonifer* en presencia de quitosano (2 y 10 mg mL<sup>-1</sup>) mezclado con aceites esenciales de canela, clavo o tomillo (0,1 y 0,3 mg mL<sup>-1</sup>)

Tratamientos (mg mL <sup>-1</sup> )	Crecimiento micelial (mm)	Índice antifúngico (%)
Testigo	78,0 a	0
Quitosano 2 + Canela 0,1	23,2 b	70,3
Quitosano 2 + Canela 0,3	-	100
Quitosano 2 + Clavo 0,1	19,5 b	75,0
Quitosano 2 + Clavo 0,3	-	100
Quitosano 2 + Tomillo 0,1	23,7 b	69,7
Quitosano 2 + Tomillo 0,3	-	100
Quitosano 10 + Canela 0,1	2,9 d	96,5
Quitosano 10 + Canela 0,3	-	100
Quitosano 10 + Clavo 0,1	8,8 c	88,8
Quitosano 10 + Clavo 0,3	-	100
Quitosano 10 + Tomillo 0,1	-	100
Quitosano 10 + Tomillo 0,3	-	100

(-) = Sin crecimiento. Los valores representan la media de 3 réplicas (n=6). Las letras indican diferencias estadísticas significativas (Tukey, P<0,001).

fleja que las mayores concentraciones de quitosano de bajo peso molecular generaron mayores reducciones en la producción de esporas de *Rhizopus stolonifer*. En otro estudio se encontró que el quitosano a concentraciones menores del 1% afecta la esporulación de *Botritis cinerea* y *Penicillium expansum* al punto de disminuir considerablemente la cantidad de conidios (Liu et al., 2007). Por otra parte, un estudio reciente demostró que el aceite esencial de mandarina tiene la capacidad de inhibir la esporulación de los hongos fitopatógenos *Alternaria alternata*, *Rhizoctonia solani*, *Curvularia lunata*, *Fusarium oxysporum* y *Helminthosporium oryzae* (Chutia et al., 2009), sin embargo, no se encontraron reportes sobre posibles efectos de aceites esenciales sobre la esporulación de *Rhizopus stolonifer*. La germinación de las esporas de *Rhizopus stolonifer* (tabla 3) se inhibió significativamente en todos los tratamientos probados. Se observó una total inhibición de la germinación en los tratamientos con los tres aceites esenciales a 0,3 mg mL<sup>-1</sup> y con el dicloran a 1 mg

**Tabla 3.** Esporulación y porcentaje de germinación de las esporas de *Rhizopus stolonifer* en presencia de quitosano (2 y 10 mg mL<sup>-1</sup>), aceites esenciales de canela, clavo y tomillo (0,1 y 0,3 mg mL<sup>-1</sup>) y con dicloran (1 mg mL<sup>-1</sup>)

Tratamientos (mg mL <sup>-1</sup> )	Esporulación (No. esporas 10 <sup>4</sup> mL <sup>-1</sup> )	Germinación (%)
Testigo	300 a	87,5 a
Quitosano 2	29 b	22,0 c
Quitosano 10	3,8 c	0,8 d
Canela 0,1	240 ab	26,0 b
Canela 0,3	-	0,0 d
Clavo 0,1	230 ab	34,2 b
Clavo 0,3	-	0,0 d
Tomillo 0,1	3,3 c	22,5 c
Tomillo 0,3	-	0,0 d
Dicloran 1	-	0,0 d

(-) Sin esporulación. Las letras diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticas significativas (Tukey, P<0,001).

mL<sup>-1</sup>. La afectación inducida por el quitosano sobre la germinación de las esporas de *Rhizopus stolonifer* ha sido reportada previamente a diferentes concentraciones que oscilan desde 1 hasta 2 mg mL<sup>-1</sup> (Hernández-Lauzardo et al., 2007 y 2008) y presentan patrones semejantes a los reportados en este trabajo, donde una mayor concentración del polímero produce una mayor inhibición en la germinación de las esporas. Por otro lado, acorde con los resultados obtenidos en este trabajo, Barrera-Necha et al., (2008) reportaron que los aceites esenciales de clavo y canela (250 µg mL<sup>-1</sup>) inhibieron en un 98% la germinación de los conidios de *Colletotrichum gloeosporioides*, sin embargo, el aceite de tomillo no afectó la germinación de los conidios de este hongo.

En la tabla 4 se presentan los resultados de la esporulación y germinación de las esporas de *Rhizopus stolonifer* tratadas con mezclas de quitosano y los tres aceites esenciales. Todos los tratamientos inhibieron significativamente la esporulación con respecto al testigo. Las mezclas de quitosano (2 mg mL<sup>-1</sup>) con los tres aceites a 0,3 mg mL<sup>-1</sup> y las mezclas de quitosano (10 mg mL<sup>-1</sup>) con los tres aceites a 0,1 y 0,3 mg mL<sup>-1</sup> inhibieron totalmente la producción de esporas. Por otro lado, la germinación de las esporas se inhibió de manera significativa en todas las mezclas probadas, observándose una inhibición absoluta en los tratamientos con cualquiera de los tres aceites probados a la concentración de 0,3 mg mL<sup>-1</sup> mezclados con quitosano (2 y 10 mg mL<sup>-1</sup>). Este trabajo constituye el primer reporte

**Tabla 4.** Esporulaci3n y porcentaje de germinaci3n de las esporas de *Rhizopus stolonifer* en presencia de quitosano (2 y 10 mg mL<sup>-1</sup>) mezclado con aceites esenciales de canela, clavo y tomillo (0,1 y 0,3 mg mL<sup>-1</sup>)

Tratamientos (mg mL <sup>-1</sup> )	Esporulaci3n (No. de esporas x 10 <sup>4</sup> mL <sup>-1</sup> )	Germinaci3n (%)
Testigo	300 a	87,5 a
Quitosano 2 + Canela 0,1	0,3 c	21,8 b
Quitosano 2 + Canela 0,3	-	0,0 d
Quitosano 2 + Clavo 0,1	2,5 b	21,3 b
Quitosano 2 + Clavo 0,3	-	0,0 d
Quitosano 2 + Tomillo 0,1	0,2 c	6,8 c
Quitosano 2 + Tomillo 0,3	-	0,0 d
Quitosano 10 + Canela 0,1	-	2,0 d
Quitosano 10 + Canela 0,3	-	0,0 d
Quitosano 10 + Clavo 0,1	-	0,0 d
Quitosano 10 + Clavo 0,3	-	0,0 d
Quitosano 10 + Tomillo 0,1	-	0,0 d
Quitosano 10 + Tomillo 0,3	-	0,0 d

(-) Sin esporulaci3n. Las letras diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticas significativas (Tukey, P<0,001).

del efecto de combinaciones de quitosano con aceites esenciales sobre la esporulaci3n y germinaci3n de esporas de *Rhizopus stolonifer*.

**Evaluaci3n de la aplicaci3n de quitosano y de aceites esenciales en frutos de tomate.** El estudio *in situ* se realiz3 utilizando los tratamientos que mostraron mayor efectividad para inhibir el desarrollo *in vitro* de

*Rhizopus stolonifer* (quitosano a 10 mg mL<sup>-1</sup>, los aceites esenciales a 0,3 mg mL<sup>-1</sup>, las mezclas de quitosano a 10 mg mL<sup>-1</sup> con cada aceite esencial a 0,3 mg mL<sup>-1</sup> y el dicloran a 1 mg mL<sup>-1</sup>). En la tabla 5 se muestran los porcentajes de infecci3n, índices de severidad y p3rdidas de peso inducidas por *Rhizopus stolonifer* en frutos de tomate. El único tratamiento que logr3 inhibir significativamente la infecci3n de *Rhizopus stolonifer* en los frutos de tomate fue el quitosano a 10 mg mL<sup>-1</sup>, los frutos presentaron solamente un 23,3% de infecci3n, mientras que en el testigo sin tratamiento se observ3 un 80%, dato que es consistente con los resultados reportados recientemente por Badawy y Rabea (2009) quienes demostraron que el quitosano aplicado en concentraciones de 2 a 4 mg mL<sup>-1</sup> puede controlar infecciones de *Botrytis cinerea* en frutos de tomate. Los aceites esenciales no lograron disminuir significativamente el porcentaje de infecci3n de los frutos, resultado que podría atribuirse a la naturaleza quí mica de los aceites que contienen una amplia gama de compuestos volátiles, los cuales podrían disiparse de la superficie de los frutos y afectar la capacidad de inhibir la infecci3n de *Rhizopus stolonifer*. (Guynot *et al.*, 2003). Adicionalmente existen diversos factores tales como el pH y el contenido de azúcares y proteínas que pueden afectar la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales (Gutiérrez *et al.*, 2009). A pesar de los reportes previos que destacan la actividad antifúngica del dicloran contra *Rhizopus stolonifer* (Adaska-veg *et al.*, 2002) e inclusive de la capacidad de este quí mico para controlar la pudrici3n blanda en frutos de durazno (De Carvalho *et al.*, 2009), en el presente trabajo el dicloran no logr3 inhibir significativamente el porcentaje de infecci3n, comportamiento que po-

**Tabla 5.** Porcentajes de infecci3n, índices de severidad y p3rdidas de peso inducidas por *Rhizopus stolonifer* en frutos de tomate tratados con quitosano y aceites esenciales, solos y en combinaci3n.

Tratamientos (mg mL <sup>-1</sup> )	Porcentaje de infecci3n (%) <sup>y</sup>	Índice de severidad (%) <sup>z</sup>	P3rdida de peso (g) <sup>z</sup>
Testigo -	0,0 a	0,0 a	1,9 abc
Testigo +	80,0 c	3,5 c	3,6 c
Quitosano 10	23,3 ab	0,7 ab	1,3 a
Canela 0,3	43,3 abc	1,1 ab	2,0 abc
Clavo 0,3	60,0 bc	1,8 bc	2,1 abc
Tomillo 0,3	53,3 bc	1,8 bc	2,0 abc
Quitosano 10 + Canela 0,3	46,7 abc	1,3 ab	2,3 bc
Quitosano 10 + Clavo 0,3	33,3 abc	1,0 ab	2,2 abc
Quitosano 10 + Tomillo 0,3	50,0 bc	1,4 ab	2,1 abc
Dicloran 1	46,7 abc	1,3 ab	1,6 ab

Testigo - : frutos sin tratamiento y sin inoculaci3n. Testigo +: frutos sin tratamiento e inoculados. <sup>y</sup>: los valores representan la media de 3 r3plicas (n=10). <sup>z</sup>: los valores representan la media de 3 r3plicas (n=10). Las letras diferentes en cada columna indican diferencias estadísticas significativas (Tukey, P<0,050).

dría atribuirse a características intrínsecas de los frutos de tomate utilizados que interferirían con este compuesto.

Con relación al índice de severidad, se observó que todos los tratamientos redujeron significativamente este parámetro con excepción de los tratamientos individuales con aceites esenciales de clavo y tomillo. El quitosano y el dicloran fueron los únicos tratamientos que inhibieron en un buen porcentaje la pérdida de peso de los frutos, por encima de los aceites esenciales individuales y de las mezclas de estos con el quitosano. En investigaciones realizadas con *Colletotrichum gloeosporioides* en frutos de papaya, de manera análoga a estos resultados, se observó que el tratamiento individual con quitosano controló la antracnosis en los frutos, sin mejorar este efecto la adición de extractos vegetales (Bautista-Baños *et al.*, 2003). El quitosano puede presentar interacciones con algunos componentes del agente antimicrobiano adicional. Recientemente se sugirió que el quitosano podría interactuar mediante puentes de hidrógeno con los terpenos de los aceites esenciales afectando la actividad antifúngica de las mezclas (Mayachiew *et al.*, 2010).

## Conclusiones

El tratamiento individual con quitosano fue el mejor para reducir la infección de los frutos de tomate inoculados con *Rhizopus stolonifer*.

Las mezclas de quitosano con los aceites esenciales de canela, clavo o tomillo no mostraron una mejor actividad antifúngica que el quitosano individual en los ensayos *in situ*.

El tratamiento individual con quitosano representa una alternativa natural para controlar la pudrición blanda en frutos de tomate.

## Agradecimientos

Se agradece el apoyo financiero de la Secretaría de investigación y posgrado del Instituto Politécnico Nacional.

## Referencias bibliográficas

Adaskaveg, J. E., Förster, H. and Sommer, N. F. 2002. Principles of postharvest pathology and management of decays of edible horticultural crops. In: A. Kader (ed.). *Postharvest Technology of Horticultural Crops*. University of California. Oakland, USA. pp. 163-195.

Badawy, M. E. I. and Rabea, E. I. 2009. Potential of the biopolymer chitosan with different molecular weights to control posthar-

vest gray mold of tomato fruit. *Postharvest Biology and Technology* 51 (1): 110-117.

- Barrera-Necha, L. L., Bautista-Baños, S., Flores-Moctezuma, H. I. y Rojas-Estudillo, A. 2008. Efficacy of essential oils on the conidial germination, growth of *Colletotrichum gloeosporioides*(penz.) Penz. And Sacc. and control of postharvest diseases in papaya (*Carica papaya* L.). *Plant Pathology Journal* 7 (2): 174-178.
- Barrera-Necha, L. L., Garduño, C. y García-Barrera J. 2009. *In vitro* antifungal activity of essential oils and their compounds on mycelial growth of *Fusarium Oxysporum* f. sp. *gladioli* (Massey) Snyder and Hensen. *Plant Pathology Journal* 8 (1): 17-21.
- Bautista-Baños, S., Hernández-Lauzardo, A. N., Velázquez-del Valle, M. G., Ait Barka, E., Bósquez-Molina, E. y Wilson, C. L. 2006. Chitosan as a potential natural compound to control pre and postharvest diseases of horticultural commodities. *Crop Protection* 25 (2): 108-118.
- Bautista-Baños, S., Hernández-López, M., Bósquez-Molina, E. y Wilson, C. L. 2003. Effects of chitosan and plant extracts on growth of *Colletotrichum gloeosporioides*, anthracnose levels and quality of papaya fruit. *Crop Protection* 22 (9): 1087-1092.
- Chutia, M., Deka-Bhuyan, P., Pathak, M. G., Sarma, T. C. and Boruah, P. 2009. Antifungal activity and chemical composition of *Citrus reticulata* Blanco essential oil against phytopathogens from North East India. *LWT-Food Science and Technology* 42 (3): 777-780.
- De Carvalho, V. L., da Cunha, R. L., Clalfun, N. N. J. and Moura, P. H. A. 2009. Alternatives for post-tharvest control of brown rot and soft rot in peach fruits. *Revista Brasileira de Fruticultura* 31 (1): 78-83.
- Devlieghere, F., Vermeulen, A. and Debevere, J. 2004. Chitosan: antimicrobial activity, interactions with food components and applicability as a coating on fruit and vegetables. *Food Microbiology* 21 (6): 703-714.
- El Ghaouth, A., Arul, J., Ponnampalam, R. and Boulet, M. 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 (5): 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 (4): 398-402.
- Guo, Z., Chen, R., Xing, R., Liu, S., Yu, H., Wang, P., Li, C. and Li, P. 2006. Novel derivatives of chitosan and their antifungal activities *in vitro*. *Carbohydrate Research* 341 (3): 351-354.
- Gutiérrez, J., Barry-Ryan, C. and Bourke, P. 2009. Antimicrobial activity of plant essential oils using food model media: efficacy, synergistic potential and interactions with food components. *Food Microbiology* 26 (2): 142-150.
- Guynot, M. E., Ramos J., Seto, L., Purroy, P., Sanchis, V. and Marín, S. 2003. Antifungal activity of volatile compounds generated by essential oils against fungi commonly causing deterioration of bakery products. *Journal of Applied Microbiology* 94 (5): 893-899.
- Hahn, F. 2006. *Rhizopus stolonifer* detection by sensing the tomato peduncle scar. *Biosystems Engineering* 95 (2): 171-179.

- Hernández-Lauzardo, A. N., Bautista-Baños, S., Velázquez-del Valle, M. G. y Trejo-Espino, J. L. 2006. Identification of *Rhizopus stolonifer* Ehrenb. (Ex Fr.) Lind causal agent of *Rhizopus* rot disease of fruits and vegetables. *Revista Mexicana de Fitopatología* 24 (1): 65-69.
- Hernández-Lauzardo, A. N., Hernández-Martínez, M., Velázquez-del Valle, M. G., Guerra-Sánchez M. G. y Melo-Giorgana, G. E. 2007. Actividad antifúngica del quitosano en el control de *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.:Fr.) Vuill. y *Mucor* spp. *Revista Mexicana de Fitopatología* 25 (2): 109-113.
- Hernández-Lauzardo, A. N., Bautista-Baños, S., Velázquez-del Valle, M. G., Méndez-Montealvo, M. G., Sánchez-Rivera M. M. y 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 (4): 541-547.
- Hernández-Muñoz, P., Almenar, E., Del Valle, V., Vélez, D. y Gavara, R. 2008. Effect of chitosan coating combined with postharvest calcium treatment on strawberry (*Fragaria x ananassa*) quality during refrigerated storage. *Food Chemistry* 110 (2): 428-435.
- Hosseini, M. H., Razavi, S. H., Mousavi, S. M. A., Yasaghi, S. A. S. and Hasansaraei, A. G. 2008. Improving antibacterial activity of edible films based on chitosan by incorporating thyme and clove essential oils and EDTA. *Journal of Applied Sciences* 8 (16): 2895-2900.
- Jiang, Y. M. and Li, Y. B. 2001. Effect of chitosan coating on postharvest life and quality of longan fruit. *Food Chemistry* 73 (2): 139-143.
- Kanetis, L., Förster, H. and Adaskaveg, J. E. 2007. Comparative efficacy of the new postharvest fungicides azoxystrobin, fludioxonil and pyrimethanil for managing citrus mold. *Plant Disease* 91 (11): 1502-1511.
- 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 (3): 300-306.
- Mayachiew, P., Devahastin, S., Mackey, B. M. and Niranjana, K. 2010. Effects of drying methods and conditions on antimicrobial activity of edible chitosan films enriched with galangal extract. *Food Research International* 43 (1): 125-132.
- Northover, J. and Zhou, T. 2002. Control of *Rhizopus* rot of peaches with postharvest treatments of tebuconazole, fludioxonil and *Pseudomonas syringae*. *Canadian Journal of Plant Pathology* 24 (2): 144-153.
- Pérez, M. N., Flores, P. J., García, V. L. y Lozano V. C. 1995. Factores genéticos y ambientales relacionados con la dinámica temporal y efecto de las enfermedades en fríjol (*Phaseolus vulgaris* L.) en Marín, Nuevo León, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 13 (1): 1-9.
- Tripathi, P. and Dubey, N. K. 2004. Exploitation of natural products as an alternative strategy to control postharvest fungal rotting of fruit and vegetables. *Postharvest Biology and Technology* 32 (3): 235-245.
- Velázquez-del Valle, M. G., Bautista-Baños, S., Hernández-Lauzardo A. N., Guerra-Sánchez M. G. y Amora-Lazcano, E. 2008. Estrategias de control de *Rhizopus stolonifer* Ehrenb. (Ex Fr.) Vuill., agente causal de pudriciones postcosecha en productos agrícolas. *Revista Mexicana de Fitopatología* 26 (1): 49-55.