

Efecto del quitosano en el desarrollo y morfología de *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl.

Delfino Sánchez-Domínguez¹, Silvia Bautista-Baños² & Patricia Castillo Ocampo³

1 Dirección General de Educación Tecnológica Agropecuaria, Centro de Bachillerato Tecnológico Agropecuario n° 8, Km. 8,5 Carretera Alpuyecá-Jojutla, Xoxocotla, Morelos, C.P. 62780, México.

2 Instituto Politécnico Nacional, Centro de Desarrollo de Productos Bióticos. Km. 8,5 Carr. Yautepec-Jojutla, Col. San Isidro, Yautepec, Morelos, C.P. 62731, México.

3 Universidad Autónoma Metropolitana- Iztapalapa. Laboratorio de Microscopía Electrónica. Av. San Rafael Atlixco # 186, Colonia Vicentina, Delegación Iztapalapa, C.P. 09340 México, D. F.

Resumen

Correspondencia

D. Sánchez Domínguez

Tel.: 01 735 3942020

Fax: 01 735 3941896

E-mail: delfy_33@hotmail.com

Recibido: 15 Marzo 2007

Aceptado: 10 Septiembre 2007

Se evaluó la capacidad *in vitro* del quitosano de bajo y medio peso molecular (QBPM, QMPM) a cinco concentraciones (0,5, 1,0, 1,5, 2,0 y 2,5% p/v) y alto peso molecular (QAPM) en cuatro concentraciones (0,5, 1,0, 1,5 y 2,0% p/v) para inhibir el hongo *Alternaria alternata*. El QMPM a la concentración de 2,5%, inhibió el crecimiento del micelio de *A. alternata* en un 50,6%, mientras que a las concentraciones de 0,5, 1,0 y 1,5% en sus tres pesos moleculares promovió el crecimiento del micelio. La esporulación fue afectada a concentración de 2,5% por el QBPM y el QMPM. El porcentaje de germinación de esporas no fue afectado por las concentraciones, pero sí por los pesos moleculares. Se observó una relación inversa entre la germinación y el peso molecular. El peso seco del micelio fue inhibido con todas las concentraciones y tipos de quitosano evaluados. La observación de hifas a través del Microscopio Electrónico de Barrido mostró diversos daños como hinchazón, depresiones, y distorsiones por efecto del quitosano.

Palabras clave: Crecimiento micelial, Esporulación, Germinación, Microscopía electrónica de barrido, Quitosano peso molecular

Abstract

The effect of chitosan in the development and morphology of Alternaria alternata (Fr.) Keissl.

The potential of low and medium molecular weight chitosan (LMWC, MMWC) at five concentrations (0.5, 1.0, 1.5, 2.0 and 2.5% w/v) and high molecular weight chitosan (HMWC) at four concentrations (0.5, 1.0, 1.5 and 2.0 w/v) to inhibit the fungus *Alternaria alternata* was evaluated. MMWC at 2.5% w/v inhibited mycelial growth of *A. alternata* up to 50.6%, whilst 0.5, 1.0 and 1.5% doses at the three molecular weight promoted mycelial growth. Sporulation was affected at 2.5% concentration by LMWC and MMWC. Percentage of spore germination was not affected by concentration but it was affected by molecular weight of chitosan. An inverse relationship was observed between germination and molecular weight. Mycelial dry weight was inhibited by all concentrations and type of chitosan evaluated. Observations at the scanning electron microscopy showed diverse alterations in hyphae such as swelling, depression, and distortion by effect of chitosan.

Key words: Chitosan molecular weight, Sporulation, Germination, Micelium growth, Scanning electronic microscopy.

Introducción

La principal enfermedad poscosecha del jitomate es el moho negro causada por *Alternaria alternata* (Fr.:Fr.) Keissl, siendo susceptibles todos los genotipos utilizados para la industria (Félix-Gastelum & Gálvez- Figueroa 2002). Cuando la incidencia de la enfermedad supera el 8% los productores reciben descuento en la cosecha o es rechazada por la industria. Esta enfermedad es endémica en el Norte de Sinaloa, México y su severidad varía de acuerdo a las condiciones prevalecientes durante la madurez de los frutos y el retraso de la cosecha. Cuando ocurren periodos prolongados de follaje mojado debido a rocíos, lluvia o alta humedad relativa, los conidios del hongo germinan en respuesta a nutrientes solubles presentes en la superficie de los frutos invadiendo hasta un 50% de ellos (Pearson & Hall 1975). El género *Alternaria* ataca un amplio número de plantas de importancia agrícola, se encuentra causando daños significativos en frutos y hortalizas en pre y poscosecha. Por otro lado, la presencia de hongos pertenecientes a este género en diversas variedades de frutos y vegetales bajo diversas condiciones de cultivo, manejo y almacenamiento sugiere que las pérdidas causadas por *Alternaria* son comparables con otros géneros como *Aspergillus* P. Minch ex Link, *Penicillium* Link y *Fusarium* Link (Stinson et al. 1980). *Alternaria* produce un gran número de toxinas como alternariol (AL) y alternariol monometil eter (AME) (Heisler et al. 1980). Adicionalmente, este hongo produce enzimas de maceración celular y ácidos orgánicos (El-Shareb & Malibari 1995, Hirsh et al. 1995). El control de este patógeno se ha realizado con fungicidas sintéticos que han provocado daños a la salud y al medio ambiente, además de generar resistencia en algunos hongos (Carson 1962, Bruton 1994). Una alternativa poco explorada es el uso de productos orgánicos como el quitosano derivado de la desacetilación de la quitina, comúnmente obtenida del exoesqueleto de crustáceos como camarón y cangrejo (Sandford 1989). El quitosano es un polímero biodegradable, no tóxico, bioactivo, que ha demostrado efectos fungicidas e induce mecanismos de defensa en tejidos vegetales (Wilson et al. 1994, Terry & Joyce 2004). Es considerado uno de los productos más prometedores para el control de varios hongos en poscosecha, como lo demuestran los trabajos de El Ghaouth et al. (1992a,b), Bhaskara Reddy et al. (1998) y Ben Shalom et al. (2003). El crecimiento de diversos hongos poscosecha como *A. alternata*, *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. y Sacc., *Fusarium oxysporum* Schlechtend.:Fr. f.sp. *radicis lycopersici* W.R. Jarvis y Shoemaker, *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb. Fr.) Lind y *Penicillium* spp se inhibió en medio nutritivo usando diferentes concentraciones de quitosano (Bhaskara Reddy et al.

1998; Benhamou 1992 y Bautista-Baños et al. 2003). Al estudiar el efecto del quitosano sobre los hongos *F. oxysporum*, *Penicillium digitatum* (Pers.:Fr.) Sacc. y *R. stolonifer*, Bautista-Baños et al. (2004) concluyeron que afectó varios estados de desarrollo de estos hongos al inhibir el crecimiento micelial y la esporulación. La inhibición del micelio se incrementó con la concentración de quitosano, a concentraciones \geq a 1.5% redujo en más del 50% el desarrollo de los tres hongos y afectó la morfología de los conidios. El crecimiento radial y el peso seco del micelio de *Botrytis cinerea* Pers.: Fr. se redujo después de 5 días de incubación en agar nutritivo adicionado con 5% y 10% de chitogel (una solución formulada de quitosano) respectivamente (Ait Barka et al. 2004). Song et al. (2002) concluyeron que factores como concentración, tipo de quitosano, grado de polimerización, grado de acetilación, naturaleza del hospedero, composición de los nutrientes, condiciones del medio ambiente y periodo de incubación influyen en la efectividad del quitosano. Respecto al peso molecular, Hirano & Nagao (1989) señalaron que mientras menor el grado de polimerización del quitosano menor el número de especies de hongos que inhibían su desarrollo. Estudios de Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) han demostrado que el quitosano puede provocar alteraciones morfológicas en las hifas de los hongos en contacto con este compuesto. El Ghaouth et al. (1992a) observaron que hifas de *R. stolonifer* en contacto con quitosano fueron de menor tamaño además de presentar cambios en su morfología como hinchazón, bifurcación, torceduras y distorsión. Los mismos efectos fueron observados por Benhamou (1992) en el hongo *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* Whether donde la hinchazón de las hifas en algunos casos ocasionó su ruptura cuando se sometieron a una concentración de quitosano de 1 mg ml⁻¹. El presente estudio tuvo como finalidad determinar la mejor concentración y peso molecular del quitosano para el control *in vitro* de *A. alternata* y observar los daños ocasionados en la morfología del micelio, a través de observaciones en MEB.

Material y Métodos

Obtención del inóculo

Se consiguieron frutos de jitomate con síntomas de la enfermedad, los cuales se colocaron en cámara húmeda para el desarrollo del micelio. Posteriormente se transfirió el micelio a cajas Petri con Papa-Dextrosa-Agar (PDA) y se incubaron a 24 \pm 2 °C durante 16 días. Se identificó el hongo utilizando las claves de Barnett & Hunter (1972), y se realizaron los postulados de Koch para confirmar la identidad de *A. alternata*.

Preparación de los medios de cultivo

Se prepararon tres medios de cultivo: 1) Agar nutritivo (PDA) para evaluar el crecimiento micelial, 2) Agar-Agua para evaluar la esporulación y germinación, ambos utilizados en cajas Petri, y 3) Papa- dextrosa (caldo) para evaluar peso seco del micelio en matraces Erlenmeyer de 125 ml.

Preparación y aplicación de tratamientos

Las soluciones stock de quitosano (Marca Fluka, de Laboratorios Sigma Aldrich) fueron preparadas pesando 2,5 g de QBPM y QMPM con viscosidades de <200 miliPascal por segundo (mPa-s) y 200-400 mPa-s respectivamente y 2,0 g de QAPM cuya viscosidad es >400 mPa-s. Cada uno se disolvió en 100 ml de agua destilada, se agregó 1 ml de ácido acético colocando la solución en agitación por 24 horas y se ajustó el pH a 5,6, agregando hidróxido de sodio 1N (El Ghaouth et al. 1991). Se esterilizaron las soluciones de quitosano y se hicieron las diluciones necesarias para ajustarlas a las concentraciones de 0,5, 1,0, 1,5, 2,0 y 2,5% p/v. Tres ml de quitosano se aplicaron en la superficie del medio de cultivo y se distribuyó uniformemente. Se hizo una solución de 10 ppm del fungicida azoxistrobín (testigo) y se aplicaron 3 ml sobre la superficie del medio dejándose secar. En todas las cajas Petri se colocó un disco de micelio del hongo *A. alternata* de 1 cm de diámetro. A los matraces conteniendo 30 ml de medio Papa-Dextrosa se les agregó 3 ml de quitosano y un disco de micelio de 1 cm poniéndose en agitación constante durante una semana.

Variables estimadas

Las cajas Petri se incubaron a 24 ± 2 °C. Cada 48 horas se midió el crecimiento micelial con un vernier electrónico (Caliper) durante 16 días. A los 14 días se hizo el raspado del micelio de las cajas con medio Agar-Agua, agregando 10 ml de agua destilada estéril, filtrándose a través de una gasa estéril, depositando la solución de esporas en frascos de vidrio de 40 ml. Con esta solución se estimó el número de esporas por ml de cada tratamiento con la ayuda de una cámara de Neubauer y un microscopio óptico a 40X de aumento. De la misma solución se tomó una gota de cada tratamiento que se depositó sobre discos de PDA, agregando una gota de lactofenol a las 2, 4, 6, 8 y 10 horas para detener la germinación de los conidios, realizándose posteriormente el conteo, utilizando un microscopio óptico con 40X de aumento y determinar el porcentaje de conidios germinados. El peso seco del micelio se obtuvo al filtrar el contenido de cada matraz utilizando un disco de papel filtro

con el auxilio de una bomba de vacío conectada a un matraz quitasato, registrando el peso del disco, y el peso seco del micelio más el disco, para estimar por diferencia el peso seco del micelio.

Estudio de Microscopía Electrónica de Barrido

Se diseñó un experimento con cuatro tratamientos que fueron: QBPM 2,5%, QMPM 2,5% y QAPM 2,0% y un testigo sin quitosano. Se tomó micelio del perímetro de las colonias de seis días de edad y se puso en tubos Eppendorf de 2 ml conteniendo glutaraldehído al 2,0% para su fijación. El micelio del hongo previamente desarrollado en PDA tratado con quitosano, se fijó con glutaraldehído por 24 horas a temperatura ambiente, enjuagándose tres veces con buffer de fosfato 0,02 M y a continuación se fijó con tetraóxido de osmio por 2 horas a 20 °C, se deshidrató por cinco minutos en cambios graduales de etanol, secándose en presencia de CO₂, con un equipo (SAMDR-780B Tousimis). Se cubrieron las muestras con oro y paladio con un equipo (BAL-TEC SDC 050). Las muestras se dejaron en un desecador hasta su observación en un microscopio Karl Zeiss DSM 940 operado a 30 Kv. Las microfotografías fueron tomadas con un equipo Polaroid para 52 fotos (Polaroid Corp.). Las muestras fueron procesadas en el Laboratorio de Microscopía Electrónica de La Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa ubicada en la ciudad de México, D.F.

Análisis Estadístico.

Se utilizó un diseño completamente aleatorio con seis repeticiones, cada unidad experimental estuvo representada por una caja o un matraz. Se realizó un análisis de varianza y la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$) para la comparación de medias, se calculó el coeficiente de correlación y la ecuación de regresión para las variables concentración de quitosano (%P/V) y crecimiento micelial (mm). El experimento se repitió dos veces.

Resultados y discusión

Crecimiento micelial

El crecimiento micelial a los 16 días disminuyó en relación al testigo (blanco) al aumentar la concentración de quitosano en sus dos mayores pesos moleculares (Tabla 1). A las concentraciones más altas (2,5 y 2%) la inhibición fue mayor en los tres pesos moleculares y fluctuó de 15% en el QBPM a 50,6% con el QMPM confirmando lo observado por Bautista-Baños et al. (2004), quienes reportaron que la inhibición del crecimiento micelial de *F. oxysporum*, *P. digitatum* y *R.*

| Tipo y concentración de quitosano (%) | Crecimiento micelial (mm) | Esporulación esporas/mL ⁻¹ | Peso seco del micelio (g) |
|---------------------------------------|---------------------------|---------------------------------------|---------------------------|
| Bajo peso molecular | | | |
| 0,5 | 67,3 abc | 3,0 x 10 ⁶ a | 0.0203 b |
| 1,0 | 68,7 abc | 1,7 x 10 ⁵ abcd | 0.0040 b |
| 1,5 | 60,9 abcde | 6,5 x 10 ⁴ cd | 0.0073 b |
| 2,0 | 62,6 abcd | 9,0x 10 ⁴ cd | 0.0070 b |
| 2,5 | 41,0 def | 0,0 d | 0.0095 b |
| Medio peso molecular | | | |
| 0,5 | 74,1 a | 1,6 x 10 ⁵ abcd | 0.2798 b |
| 1,0 | 70,9 abc | 2,8 x 10 ⁵ a | 0.0618 b |
| 1,5 | 63,6 abcd | 5,0 x 10 ⁴ cd | 0.0536 b |
| 2,0 | 50,4 bcde | 1,7 x 10 ⁵ abcd | 0.0221 b |
| 2,5 | 23,9 f | 0,0 d | 0.0228 b |
| Alto peso molecular | | | |
| 0,5 | 77,9 a | 2,7 x 10 ⁵ a | 0.0421 b |
| 1,0 | 72,8 a | 1,9 x 10 ⁵ abc | 0.0401 b |
| 1,5 | 60,0 abcde | 1,3 x 10 ⁵ bcd | 0.0203 b |
| 2,0 | 39,4 def | 2,6 x 10 ⁵ ab | 0.0121 b |
| Fungicida | 36,1 ef | 1,0 x 10 ⁴ d | 0.0346 b |
| Sin quitosano | 48,2 cdef | 8,5x 10 ⁴ cd | 1.3818 a |

Los valores seguidos por las mismas letras son estadísticamente iguales, Prueba de Tukey ($P \leq 0,05$).

Tabla 1. Efecto del quitosano en el crecimiento micelial, esporulación y peso seco del micelio de *Alternaria alternata* a los 16 días de incubación.

Table 1. Effect of chitosan on mycelial growth, sporulation and mycelial dry weight of *Alternaria alternata* after sixteen days of incubation.

stolonifer se incrementó a medida que la concentración aumentaba. Resultados similares fueron observados por El Ghaouth et al. (1992a) en los hongos *A. alternata*, *B. cinerea*, *C. gloeosporioides* y *R. stolonifer*. En ese estudio, el crecimiento de estos patógenos se redujo a medida que la concentración de quitosano aumentó de 0,75 a 6 mg. ml⁻¹. El mismo efecto fue reportado por Cheah et al. (1997) en el hongo *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary al incrementar las concentraciones de quitosano del 1% al 4%. En la presente investigación, el QAPM 2% inhibió el desarrollo micelial en 18.5% y fue estadísticamente igual ($P \leq 0.05$) al QBPM 2,5%. El fungicida utilizado como testigo indujo una inhibición del micelio ($P \leq 0.05$) inferior al QMPM 2,5%. El tratamiento sin quitosano (blanco) tuvo un crecimiento micelial menor que los tratamientos con quitosano a concentraciones \leq de 1,5% en los tres pesos moleculares lo que indica que el quitosano en concentraciones bajas, promovió el desarrollo micelial de *A. alternata*. Una explicación para este efecto puede relacionarse con condiciones de estrés, ya que incubar a este patógeno en un medio con presencia de quitosano, condujo a un desarrollo acelerado del micelio, considerado una estructura de propagación del hongo. Lo anterior coincide con lo observado por Hernández-López (2002) en *R. stolo-*

nifer, que estimuló su crecimiento micelial cuando fue tratado con quitosano al 0.5%.

Cinética del crecimiento micelial

En la cinética de crecimiento del hongo por concentración para cada peso molecular del quitosano se observaron curvas similares para el QBPM y QMPM (Figura 1, A y B), en las cuales se aprecia una mayor velocidad en el desarrollo del hongo a las concentraciones 0,5, 1,0 y 1,5% y una cinética más lenta en la concentración 2,5%. Esto se manifestó con un crecimiento final marcadamente inferior que en el caso del QMPM no llegó al 50% del observado con las tres concentraciones menores (Figura 1, B). El QAPM mostró similitud entre las concentraciones de 0,5 y 1%, que fueron las que manifestaron menor inhibición micelial, siendo la concentración de 2% la mejor ya que el desarrollo del micelio fue de aproximadamente la mitad respecto de las concentraciones menores y su cinética más lenta que el fungicida hasta el día 14 (Figura 1, C), lo que confirma lo observado por Félix-Gastelum y Gálvez-Figueroa (2002), quienes en su investigación llevada a cabo con el hongo en estudio concluyeron que la aplicación del fungicida no redujo el crecimiento micelial. Al comparar los mejores trata-

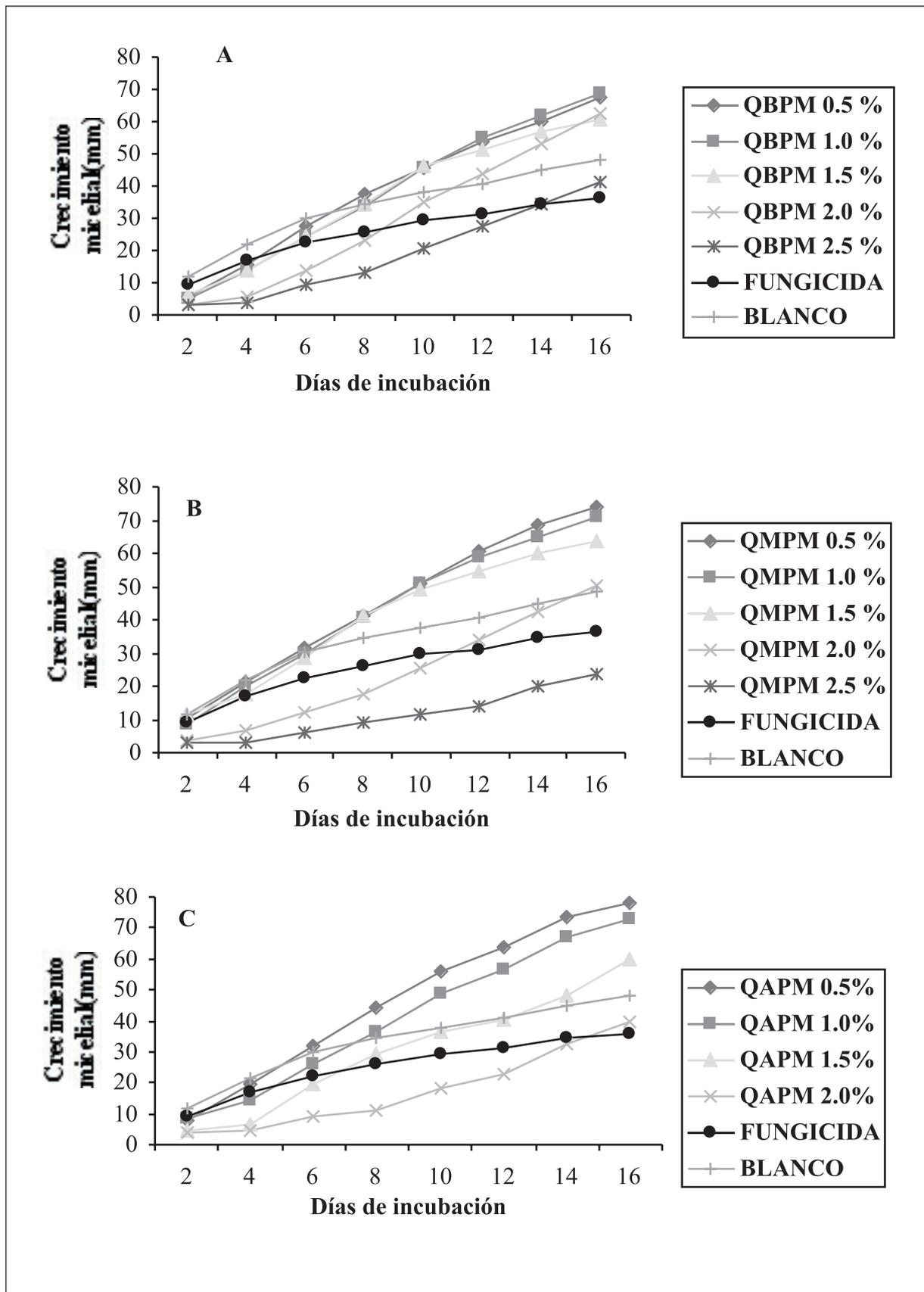


Figura 1. Cinética del crecimiento micelial de *Alternaria alternata* tratado con quitosano de: A) bajo, B) medio y C) alto peso molecular. Figure 1. Kinetic growth of *Alternaria alternata* treated with a) low b) medium and c) high molecular weight chitosan.

mientos con quitosano y los testigos aplicados (Figura 1, A, B y C), se observó que la cinética más activa fue con el testigo (blanco), coincidiendo con el mayor crecimiento micelial. En los tratamientos QBPM (2,5%), QMPM (2,5%) y QAPM (2%), se observó una cinética muy parecida hasta el octavo día, después del cual se empezaron a diferenciar siguiendo una cinética muy semejante los tratamientos con QBPM (2,5%) y QAPM (2,0%), que al final tuvieron un desarrollo similar (41,0 y 39,4 mm. respectivamente). El QMPM 2.5% mantuvo la lentitud de su cinética y finalmente alcanzó un desarrollo de 23,9 mm. que equivale a poco más de la mitad respecto de los otros dos tratamientos con quitosano. Se calculó el coeficiente de correlación existente entre las concentraciones de quitosano y el crecimiento micelial, siendo significativo ($P \leq 0,05$) a los 16 días, para el QMPM y QAPM, lo cual confirma lo reportado por otros investigadores en el sentido de que la concentración de quitosano está altamente correlacionada con una baja o alta inhibición fungosa (El Ghaouth et al., 1992b, Wade y Lamondia, 1994; Hernández-López, 2002; Cheah et al., 1997). Los coeficientes de correlación (r), de regresión (r^2) y las ecuaciones calculadas con los datos de crecimiento micelial a los 16 días fueron $r=-0.83$, $r^2=0.69$, $\hat{y}=77.67-11.71x$; $r=-0.93$, $r^2=0.87$, $\hat{y}=92.85-24.19x$; $r=-0.96$, $r^2=0.93$, $\hat{y}=94.61-25.67x$ para el QBPM, QMPM y QAPM respectivamente. Cuando se graficaron los efectos de los pesos moleculares (sin importar la concentración) sobre la cinética de *A. alternata* se

encontró que no hubo diferencia en la velocidad del crecimiento micelial entre los tres tipos de quitosano hasta el día 10 y solo los últimos seis días *A. alternata* inoculado en QMPM disminuyó su cinética, por lo cual a los 16 días este fue el quitosano con mayor efecto inhibitorio sobre el crecimiento micelial (3,5 y 5,9 mm.) con respecto a los otros.

Peso seco del micelio

No hubo diferencia estadística ($P \leq 0.05$) entre los tratamientos con quitosano ya que no se tuvo crecimiento micelial significativo, corroborando lo reportado por Ait Barka et al. (2004). Probablemente este efecto se debió a que la permanente agitación favoreció la total integración del quitosano con el inóculo inhibiendo el desarrollo de *A. alternata*. El testigo sin quitosano mostró un crecimiento abundante del micelio, siendo estadísticamente diferente a los demás.

Esporulación

Al analizar las medias de producción de esporas, se encontró que estas fueron afectadas con los dos menores pesos moleculares a la concentración de 2,5% ya que se observó una total inhibición en la esporulación (Tabla 1). Lo anterior coincide con lo reportado por El Ghaouth et al. (1992b) en *P. digitatum* y por Bhaskara Reddi et al. (1998) en *A. alternata* quienes indican que posiblemente la inhibición de la esporulación se debe

| Tratamientos | Tiempo de incubación (horas) | | | | |
|--------------|------------------------------|------|-------|-------|-------|
| | 2 | 4 | 6 | 8 | 10 |
| QBPM 0,5 % | 11,4 | 5 | 8,7 | 87,5 | 100,0 |
| QBPM 1,0 % | 21,2 | 33,8 | 52,1 | 94,0 | 100,0 |
| QBPM 1,5 % | 13,1 | 49,0 | 94,7 | 100,0 | 100,0 |
| QBPM 2,0 % | 12,9 | 46,9 | 100,0 | 100,0 | 100,0 |
| QBPM 2,5 % | 34,1 | 51,0 | 64,5 | 94,7 | 100,0 |
| QMPM 0,5 % | 26,5 | 55,5 | 70,4 | 100,0 | 100,0 |
| QMPM 1,0 % | 35,2 | 9,2 | 100,0 | 100,0 | 100,0 |
| QMPM 1,5 % | 38,9 | 58,9 | 79,4 | 100,0 | 100,0 |
| QMPM 2,0 % | 34,7 | 52,9 | 58,5 | 88,8 | 100,0 |
| QMPM 2,5 % | 18,3 | 37,3 | 52,5 | 87,1 | 100,0 |
| QAPM 0,5 % | 34,9 | 58,2 | 68,5 | 92,5 | 100,0 |
| QAPM 1,0 % | 39,4 | 42,3 | 53,8 | 96,7 | 100,0 |
| QAPM 1,5 % | 30,0 | 48,6 | 53,4 | 98,9 | 100,0 |
| QAPM 2,0 % | 23,4 | 33,6 | 54,3 | 89,7 | 100,0 |
| FUNGICIDA | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| BLANCO | 15,7 | 37,6 | 31,3 | 100,0 | 100,0 |

Tabla 2. Porcentaje de esporas germinadas de *Alternaria alternata* a diferentes tiempos de incubación.
Table 2. Percentage of spore germination of *Alternaria alternata* at different incubation periods.

al estrés del hongo causado por el quitosano en altas dosis. Respuesta análoga obtuvieron Bautista-Baños et al. (2004) quienes no observaron producción de esporas en los hongos *F. oxysporum*, *P. digitatum* y *R. stolonifer* al tratarlos con quitosano a las concentraciones de 2,5 y 3%. En general, la esporulación no mostró una tendencia clara entre los demás tratamientos aunque se observó que exceptuando la concentración más alta (2,5%) hubo mayor esporulación en los tratamientos con quitosano en comparación con el testigo sin quitosano. Lo anterior confirma que el quitosano no solo promueve el desarrollo del micelio de *A. alternata* en bajas dosis, sino también la producción de esporas como lo reportan Bautista-Baños et al. (2004) en el hongo *P. digitatum*, el cual

estimuló su esporulación en presencia del quitosano a concentraciones de 0,5 y 1,5%.

Porcentaje de germinación de esporas

Respecto al porcentaje de germinación de esporas de *A. alternata*, no se observó una respuesta consistente entre las concentraciones de quitosano (Tabla 2). A las 4 horas, el porcentaje promedio de germinación para los tres tipos de quitosano sin considerar las concentraciones fue inferior al 50%. A las seis horas el QAPM presentó el menor porcentaje de germinación de esporas (57,5%) seguido por el QMPM con el 72,1% y el QBPM con 79,7%. Se observó a este tiempo, que el porcentaje de germinación de esporas se redujo a

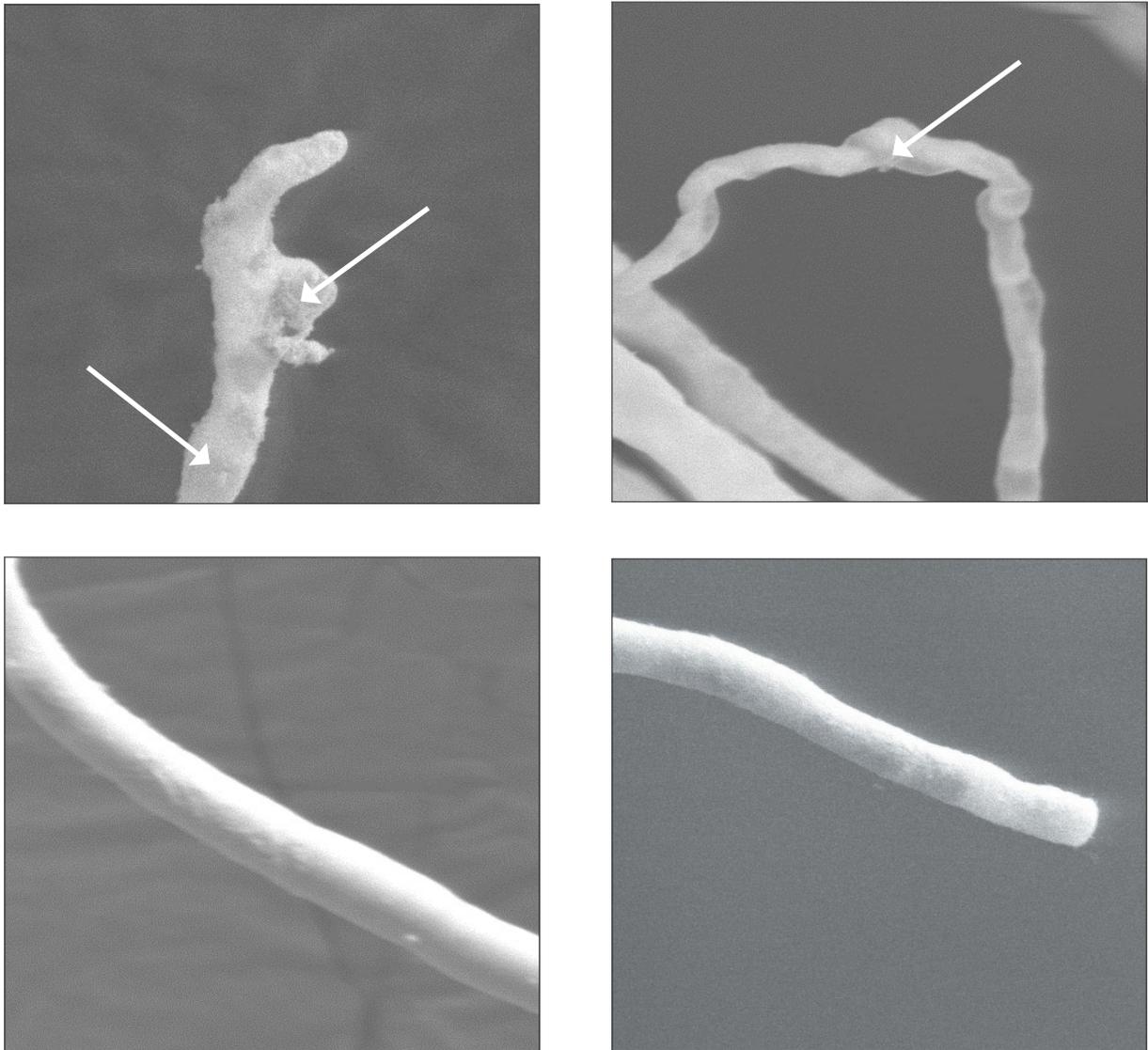


Figura 2. Microfotografías de hifas de *Alternaria alternata*. Arriba (5000X), mostrando hinchazón y nodulación (izquierda) y distorsión (derecha) causados por la aplicación de QMPM al 2,5%. Abajo (3000X), hifa normal.
Figure 2. Microphotography of hyphae of *Alternaria alternata*. Upper (5000X): showing swelling and nodulation (left) and distortion (right) caused by chitosan application. Lower (3000X), normal hyphae.

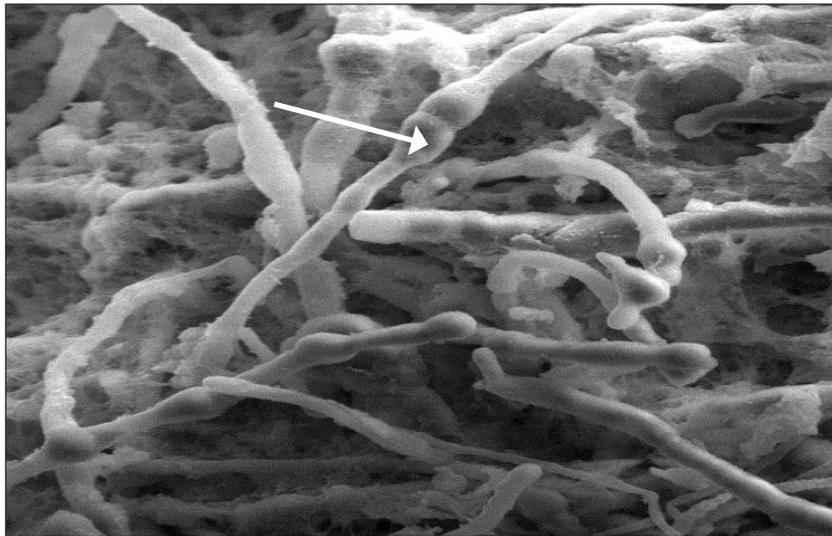


Figura 3. Microfotografía (1000X) de micelio de *Alternaria alternata* no tratado, mostrando una profusa formación de conidios.
Figure 3. Microphotography (1000X) of mycelium of *Alternaria alternata* non-chitosan treated showing profuse conidia formation.

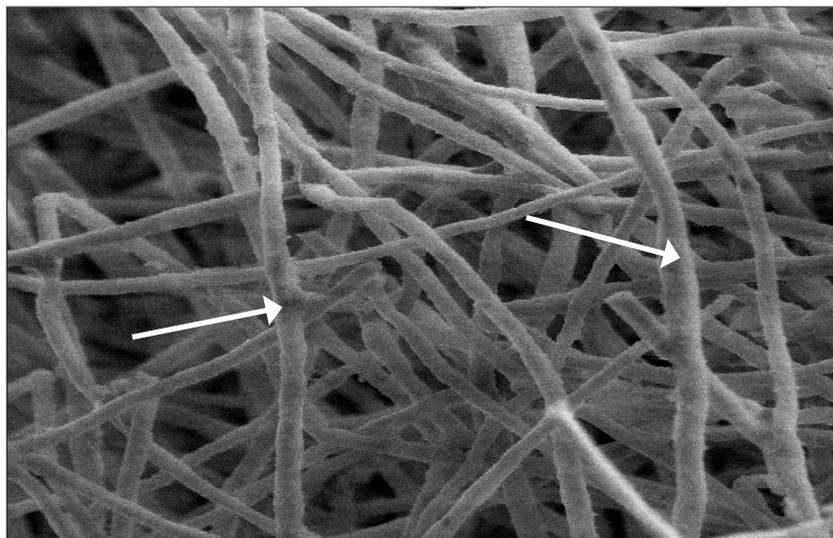


Figura 4. Microfotografía (1000X) de micelio de *Alternaria alternata* tratado con QPM 2,5 %. Nótese la ausencia de conidios y la hinchazón de algunas hifas.
Figure 4. Microphotography (1000X) of mycelium of *Alternaria alternata* treated with medium molecular weight chitosan (2.5%). Observe absence of conidia and swelling in some hyphae.

medida que aumentaba el grado de polimerización. A las ocho horas la mayoría de los tratamientos tuvieron un porcentaje de germinación superior al 85%, y del 100% a las 10 horas (Tabla 2).

Microscopía Electrónica de Barrido

El micelio del hongo *A. alternata* mostró cambios morfológicos sustanciales (Figura 2) al ser tratado con el QPM al 2.5%. Las hifas presentaron hinchazón, nodulación y distorsiones, similares a las reportados por El Ghaouth et al. (1992a,b) en *R. stolonifer* y por

Benhamou (1992) en *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*. El micelio desarrollado en un medio libre de quitosano presentó un aspecto saludable y una profusa formación de conidios (Figura 3), los cuales no se observaron en ningún tratamiento con quitosano (Figura 4).

El presente estudio aporta información relevante para el conocimiento de la actividad del quitosano contra el hongo *A. alternata*. Lo primero es que en concentraciones de 2.5% y 2.0% el QPM y QAPM respectivamente, ejercieron una inhibición del micelio mayor que el fungicida. También se observó que en concentraciones \leq a 1.5%, todos los tipos de quitosano

promovieron el crecimiento del micelio. La esporulación se inhibió totalmente con el QBPM y QMPM a la concentración 2.5%. Se confirmó mediante la MEB las malformaciones que el quitosano causa a nivel celular en las hifas del hongo, y que son esencialmente las mismas que se han reportado en otras especies. Explorar las propiedades fungicidas de los compuestos naturales es una prioridad tendiente a reducir, y en un futuro eliminar el uso indiscriminado de productos sintéticos que son una fuente de contaminación ambiental y un problema de salud pública.

Agradecimientos

Se agradece a la Dirección General de Educación Tecnológica Agropecuaria y al Consejo Nacional de Educación Tecnológica (COSNET), el apoyo económico brindado para la realización de esta investigación en el marco del proyecto "Evaluación del quitosano como agente inductor de fitoalexinas durante el proceso de infección de *Alternaria alternata* en frutos de jitomate".

Referencias

- Ait Barka E, Eullaffroy P, Clément C & Vernet G. 2004. Chitosan improves development and protects *Vitis vinifera* L. against *Botrytis cinerea*. *Plant Cell Report* 22:608-614.
- Barnett HL & Hunter BB. 1972. *Illustrated genera of Imperfect Fungi*. Burgess Publishing Co. Minneapolis, MN, USA. 241 p.
- Bautista-Baños S, Hernández-López M, Bosquez-Molina E & Wilson CL. 2003. Effects of chitosan and plant extracts on growth of *Colletotrichum gloeosporioides*, anthracnose levels and quality of papaya fruit. *Crop Protection* 22:1087-1092.
- Bautista-Baños S, Hernández-López M & Bosquez-Molina E. 2004. Growth inhibition of selected fungi by chitosan and plant extracts. *Revista Mexicana de Fitopatología* 22: 178-186.
- Benhamou N. 1992. Ultrastructural and cytochemical aspects of chitosan on *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis lycopersici*, agent of tomato crown and root rot. *Phytopathology* 82: 1185-1193.
- Ben-Shalom N, Ardi R, Pinto R, Aki C & Fallik E. 2003. Controlling gray mould caused by *Botrytis cinerea* in cucumber plants by means of chitosan. *Crop Protection* 22: 285-290.
- Bhaskara-Reddi MV, Essaid AB, Castaigne F & Arul J. 1998. Effect of chitosan on growth and toxin production by *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici*. *Biocontrol Science and Technology* 8:33-43.
- Bruton BD. 1994. Mechanical injury and latent infections leading to postharvest decay. *HortScience* 29: 747-749.
- Carson R. 1962. *Silent Spring*. Houghton . Mifflin, Boston, MA, p. 368
- Cheah LH., Page BBC & Sheperd R. 1997. Chitosan coating for inhibition of *Sclerotinia* carrots. *N. Z. J. Crop Horticultural Science* 25: 89-92.
- El Ghaouth A, Arul J, Asselin A & Benhamou N. 1992a. Antifungal activity of chitosan on postharvest pathogens. Induction of morphological and cytological alterations in *Rhizopus stolonifer*. *Mycological Research* 96: 769-779.
- El Ghaouth A, Arul J, Grenier J & Asselin A., 1992b. Antifungal activity of chitosan on two postharvest pathogens of strawberry fruits. *Phytopathology* 82: 398-402.
- El Ghaouth J, Ponnampalam R & Boulet M. 1991. Chitosan coating effect on storability and quality of fresh strawberries. *Journal of Food Science* 56: 1618-1620.
- El-Shareb MKZ & Malibari AA. 1995. Enzymatic activities of soft rot causal organisms affecting vegetables and fruits in Saudi Arabia. *Alexandria Journal of Agricultural Research* 40: 293-304.
- Félix-Gastelum R & Gálvez-Figueroa CA. 2002. Control del moho negro, *Alternaria alternata* (Fr.:Fr.) en el fruto del tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) considerando unidades de calor y variables ambientales para la aplicación de Azoxystrobin en Sinaloa, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 20:72-76.
- Heisler EG, Siciliano J, Stinson EE & Osman SF. 1980. High performance liquid chromatographic determination of major mycotoxins produced by *Alternaria* molds. *Journal of Chromatographia* 194:89-94.
- Hernández-López M. 2002. Uso potencial del quitosano y extractos vegetales en el control de *Colletotrichum gloeosporioides*, *Rhizopus stolonifer*, *Penicillium digitatum*, y *Fusarium oxysporum* de la papaya (*Carica papaya*). Tesis de Maestría. Instituto Politécnico Nacional, Centro de Desarrollo de Productos Bióticos. Yautepec Morelos, México.
- Hirano S & Nagao N. 1989. Effects of chitosan, Pectic Acid, Lysozyme, and Chitinase on the growth of several phytopathogens. *Agricultural and Biological Chemistry* 53: 3065-3066.
- Hirsh P, Eckhardt FFW & Palmer Jr RI. 1995. Fungi active in weathering of rock and stone monuments. *Canadian Journal of Botany* 73: 1384-1390.
- Pearson RC & Hall DH. 1975. Factors affecting the occurrence and severity of blackmold of ripe tomato fruit caused by *Alternaria alternata*. *Phytopathology* 57: 1352-1359.
- Sandford P, 1989. Chitosan : commercial uses and potential applications. In *Chitin and Chitosan. Sources, Chemistry, Biochemistry. Physical Properties and Applications* (Skjak-Braek G et al. (eds). London and New York: Elsevier Applied Science, pp. 51-69.

- Song Y, Babiker EE, Usui M, Saito A, & Kato A. 2002. Emulsifying properties and bactericidal action of chitosan-lysozyme conjugates. *Food Research International* 35:459-466.
- Stinson EE, Bills DD, Osman SF, Siciliano J, Ceponis MJ & Heisler EG. 1980. Mycotoxin production by *Alternaria* species grown on apples, tomatoes and blueberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 26: 960-963.
- Terry LA & Joyce DC. 2004. Elicitors of induced disease resistance in postharvest horticultural crops: a brief review. *Postharvest Biology and Technology* 32: 1-13.
- Wade HE & Lamondia JA. 1994. Chitosan inhibits *Rhizoctonia fragariae* but not strawberry black root rot. *Advances in Strawberry Research* 13: 26-31.
- Wilson CL, El Gahouth A, Chaluts E, Droby S, Stevens C, Lu JL, Khan V & Arul, J. 1994. Potential of induced resistance to control postharvest diseases of fruits and vegetables. *Plant Disease* 78: 837-844.