



REVISTA  
MEXICANA DE  
FITOSANIDAD

Sección  
Artículo científico.  
2(1): Pp: 1–5  
Fecha de publicación:  
30-abril-2018.

Recibido:  
26-12-2017  
Aceptado:  
27-03-2018

Correos electrónicos  
<sup>1,2</sup>[abraham.monteon@gmail.com](mailto:abraham.monteon@gmail.com)  
<sup>1,3</sup>[duranel5@gmail.com](mailto:duranel5@gmail.com)  
<sup>1,4</sup>[perez.moises@colpos.mx](mailto:perez.moises@colpos.mx)  
<sup>2,1</sup>[talavera@cucsur.udg.mx](mailto:talavera@cucsur.udg.mx)

ISSN: 2448-9093

Edita  
Sociedad Mexicana de  
Fitosanidad.  
Calle Amado Nervo  
s/n, Tepatepec.  
Francisco I. Madero,  
Hidalgo. C. P. 42660.

Índice, resúmenes,  
abstracts, vols. en:  
[www.revimexfito.com.mx](http://www.revimexfito.com.mx)

© 2018 - Revista  
Mexicana de Fitosanidad

## ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DEL QUITOSANO Y EL ACEITE ESENCIAL DE *Melaleuca alternifolia*<sup>1</sup> SOBRE *Rhizopus stolonifer*<sup>2</sup> (Ehrenb.: Fr.) Vuill., AGENTE CAUSAL DE PUDRICIÓN BLANDA EN GUANÁBANA

AMADO PÉREZ-RODRÍGUEZ<sup>1,\*</sup>, ABRAHAM MONTEÓN-OJEDA<sup>1,2</sup>, ELISA DURÁN-  
PERALTA<sup>1,3</sup>, MOISÉS PÉREZ-ROJAS<sup>1,4</sup> Y ANTONIO TALAVERA-VILLAREAL<sup>2,1</sup>.

<sup>1</sup>Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo.  
Carretera México-Texcoco, km 36.5. Montecillo, Texcoco, estado de México. C. P. 56230.

<sup>2</sup>Departamento de Producción Agrícola, Centro Universitario de la Costa sur, UdeG  
Av. Independencia Nacional, No.151. Autlán, Jalisco, México. C.P. 48900.

\*Autor de correspondencia: [perez.amado@colpos.mx](mailto:perez.amado@colpos.mx).

### RESUMEN:

*Rhizopus stolonifer* ocasiona pérdidas económicas importantes debido a que causa pudrición blanda en postcosecha. Algunos fungicidas sintéticos como el imazalil son usados para el control de este microorganismo. Sin embargo, es necesario buscar nuevas alternativas naturales que no representen un riesgo para la salud humana y el ambiente. En el presente trabajo se evaluó de forma in vitro el efecto antifúngico del Quitosano, aceite esencial de *Melaleuca alternifolia* e Imazalil sobre *Rhizopus stolonifer* a diferentes dosificaciones. La inhibición de *R. stolonifer* fue obtenida con Imazalil desde 100 ppm (100 %), seguido por el aceite esencial a 1000 ppm con 84 % de inhibición, mientras que quitosano a 1000 ppm presentó una efectividad de 68 %. Los tratamientos a base de aceite esencial y quitosano representan una alternativa natural para el control de la pudrición blanda en guanábana..

**Palabras clave:** Fungicida orgánico, hongos, control postcosecha.

### Antifungal activity of the chitosan and the essential oil of *Melaleuca alternifolia* about *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb. :Fr.) Vuill., causal agent of soft rot in soursop

### ABSTRACT:

*Rhizopus stolonifer* causes significant economic losses because it causes soft postharvest rot. Some synthetic fungicides such as imazalil are used to control this microorganism. However, it is necessary to look for new natural alternatives that do not represent a risk to human health and the environment. In this work, the antifungal effect of Chitosan, essential oil of *Melaleuca alternifolia* and Imazalil on *Rhizopus stolonifer* at different dosages was evaluated in vitro. Inhibition of *R. stolonifer* was obtained with Imazalil from 100 ppm (100 %), followed by the essential oil at 1000 ppm with 84 % inhibition, while chitosan at 1000 ppm showed a 68 % effectiveness. The treatments based on essential oil and Chitosan represent a natural alternative for the control of soft rot in soursop.

**Keys works:** Organic fungicide, fungus, postharvest control.

<sup>1</sup>(Magnoliophyta: Myrtaceae)

<sup>2</sup>(Mucorales: Mucoraceae)

## INTRODUCCIÓN

*Rhizopus stolonifer* causa la pudrición blanda en frutas y hortalizas, lo que ocasiona pérdidas económicas importantes en postcosecha, 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). El control de las pudriciones postcosecha ocasionadas por *R. stolonifer* ha sido objeto de estudio durante varios años mediante el uso de compuestos químicos. Sin embargo, en años recientes diversas investigaciones han sugerido que el efecto negativo de los fungicidas sintéticos sobre el medio ambiente tiene más peso que su beneficio social, por lo que es necesario buscar métodos alternativos naturales que incluyen el uso de compuestos inocuos (James *et al.*, 1993; Hahn, 2006). El Quitosano es un derivado desacetilado de la quitina que tiene propiedades policatiónicas y tiene un potencial para controlar pudriciones postcosecha (Bautista-Baños *et al.*, 2006). Este polímero se ha empleado como película para cubrir y conservar frutos con lo que 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 son terpenos y alcoholes fenólicos que han sido reportados como inhibidores de hongos postcosecha (*Botrytis cinerea* y *Monilinia fructicola*) en condiciones *in vitro* (Tripathi y Dubey, 2004). Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue determinar de forma *in vitro* la actividad antifúngica del Quitosano y del aceite esencial de *Melaleuca alternifolia* en comparación con Imazalil sobre *R. stolonifer*.

## MATERIALES Y MÉTODO

**Material vegetal.** Se utilizaron frutos de guanábana (*Annona muricata* L.) provenientes de Jalisco, México, con síntomas de pudrición blanda. Se desinfestaron con HCL al 0.05 % por 5 min, se lavaron dos veces con agua destilada estéril y se colocaron en cámara húmeda para

promover la esporulación y aislar el posible patógeno para su identificación y reproducción masiva del hongo *R. stolonifer*.

**Identificación.** El micelio aéreo que creció sobre los frutos se transfirió a cajas Petri con Agar Papa Dextrosa (PDA, Bioxon). La identificación morfológica del hongo se realizó con ayuda de las claves de Sutton (1980).

**Pruebas de patogenicidad.** Con una varilla de vidrio se raspó la superficie de las cajas con micelio del hongo para arrastrar las esporas, las cuáles se transfirieron a un tubo de ensaye con 5 ml de agua destilada estéril. La mezcla se agitó y se colocaron 20  $\mu$ l de la suspensión de las esporas en una cámara de Neubauer para cuantificar las esporas en un microscopio óptico (40X). Se utilizaron frutos sanos de guanábana que se desinfestaron como se mencionó anteriormente. La inoculación se realizó mediante dos técnicas: a) daño mecánico con tres punciones hechas con una aguja de disección colocando 20  $\mu$ l de una suspensión de esporas a una concentración de 1 x 10<sup>5</sup>; y b) deposición de tres discos miceliales (PDA) de 5 mm de diámetro con crecimiento del hongo de 48 horas de edad. Se utilizaron seis frutos para cada método de inoculación.

**Evaluación de tratamientos.** Los productos evaluados fueron Imazalil® (Compañía Bravo), Quitosano (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) y el aceite esencial de *Melaleuca alternifolia* (Timorex®). Las dosis evaluadas fueron de 0.1, 1, 10, 100, 500 y 1000 ppm. Los productos se diluyeron en agua destilada estéril y se tomaron las alícuotas correspondientes para adicionarse a los recipientes que contenían los medios de cultivo estériles de PDA y así obtener las concentraciones deseadas. Se utilizaron 15 cajas Petri con medio PDA por cada tratamiento (aceite esencial, imazalil, quitosano en las concentraciones señaladas y el control positivo). Se depositaron discos miceliales de 5 mm de diámetro de un cultivo de *R. stolonifer* en condiciones de crecimiento de 25  $\pm$  2 °C durante 72 h en PDA; estos se colocaron en el centro de las cajas con los tratamientos. Las cajas se incubaron a 25  $\pm$  2 °C durante 48 h. Se midió el diámetro de las colonias con un Vernier digital (Cienceware) cada dos horas hasta que el testigo llenó por completo la caja Petri. Con los datos obtenidos se calculó el

porcentaje de inhibición de crecimiento del hongo. Se realizaron cuatro repeticiones por tratamiento por duplicado.

El análisis estadístico se realizó con el programa SAS System versión 9.0 para Windows y para la comparación de medias se utilizó la prueba de Tukey ( $\alpha = 0.05$ ).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se identificó a *R. stolonifer* mediante características morfológicas de acuerdo con Sutton (1980). Con las pruebas de patogenicidad se comprobó que este patógeno es el agente causal de la pudrición blanda de la guanábana, ya que se observaron los mismos síntomas en los frutos. En el ensayo de patogenicidad no se encontró diferencia entre los

métodos de inoculación ya que la actividad enzimática de *R. stolonifer* es igual de eficaz que la penetración por heridas como reportaron Velázquez-del Valle *et al.*, 2008.

De acuerdo a los datos obtenidos, en el cuadro 1, se observó que imazalil a dosis desde 100 ppm inhibe completamente el crecimiento de *R. stolonifer* (Fig. 1). En un estudio realizado por Schirra *et al.* (1997), encontraron que la aplicación de imazalil con las dosis de 100, 200 y 1000 ppm sobre frutos de limón es muy efectiva para controlar hongos postcosecha. Sin embargo, al realizar el análisis de residuos encontraron que en todos los tratamientos se superaron los límites máximos de residuos permitidos por los Estados Unidos de América, por lo que sugieren utilizar productos alternativos.

Cuadro 1. Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de *Rhizopus stolonifer* de forma in vitro, en medio de cultivo con aceite esencial de *Melaleuca alternifolia*, imazalil y Quitosano a diferentes dosis.

Dosis (ppm)	% de inhibición					
	Aceite esencial	Imazalil	Quitosano			
0.1	0	A	23.2	A	10.07	A
1	15.9	AB	31.48	AB	30.31	B
10	24.23	AB	64.52	B	39.37	B
100	43.83	B	100	C	41.01	BC
500	78.6	C	100	C	45.85	C
1000	84.38	C	100	C	68.07	D

La adición de Quitosano a dosis de 1000 ppm logró un 68 % de inhibición del hongo, aunque se podría recomendar utilizar dosis más altas, debido a que en un estudio realizado por Hirano y Nagao (1989), donde evaluaron el efecto de distintos compuestos a base de Quitosano sobre el crecimiento micelial de *R. nigricans*, encontraron que dosis de 1 mg ml<sup>-1</sup> presentaron un 60 a 80 % de inhibición de crecimiento del patógeno en condiciones in vitro. Por otro lado, El Ghaouth *et al.* (1992), concluyeron que para obtener más del 50 % de inhibición de *R. stolonifer* en condiciones in vitro son necesarias dosis mayores de 3 mg ml<sup>-1</sup>, aunque los autores también mencionan que es necesario aplicar 10-15 mg ml<sup>-1</sup> de Quitosano sobre frutos de fresa para inhibir el crecimiento del patógeno.

Por otro lado, se observó que el aceite esencial presentó un 78.6 y 84.38 % de inhibición a dosis

de 500 y 1000 ppm, respectivamente. Es posible incrementar la eficacia de éste tratamiento, como mencionan Terzi *et al.* (2007), al utilizar concentraciones de 0.1 a 0.25 % de aceite esencial de *Melaleuca alternifolia*, inhibiendo por completo el crecimiento in vitro de *Fusarium culmorum*, *F. graminearum* y *Pyrenophora graminea*.

Con base a los resultados observados, los tratamientos de aceite esencial y Quitosano pueden ser potenciales fungicidas inocuos, pero es recomendable evaluar dosis más altas tanto en condiciones in vitro como in vivo, aunque también se puede optar por utilizar estos productos en mezcla, ya que se ha reportado 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). Además, en otro estudio se comprobó

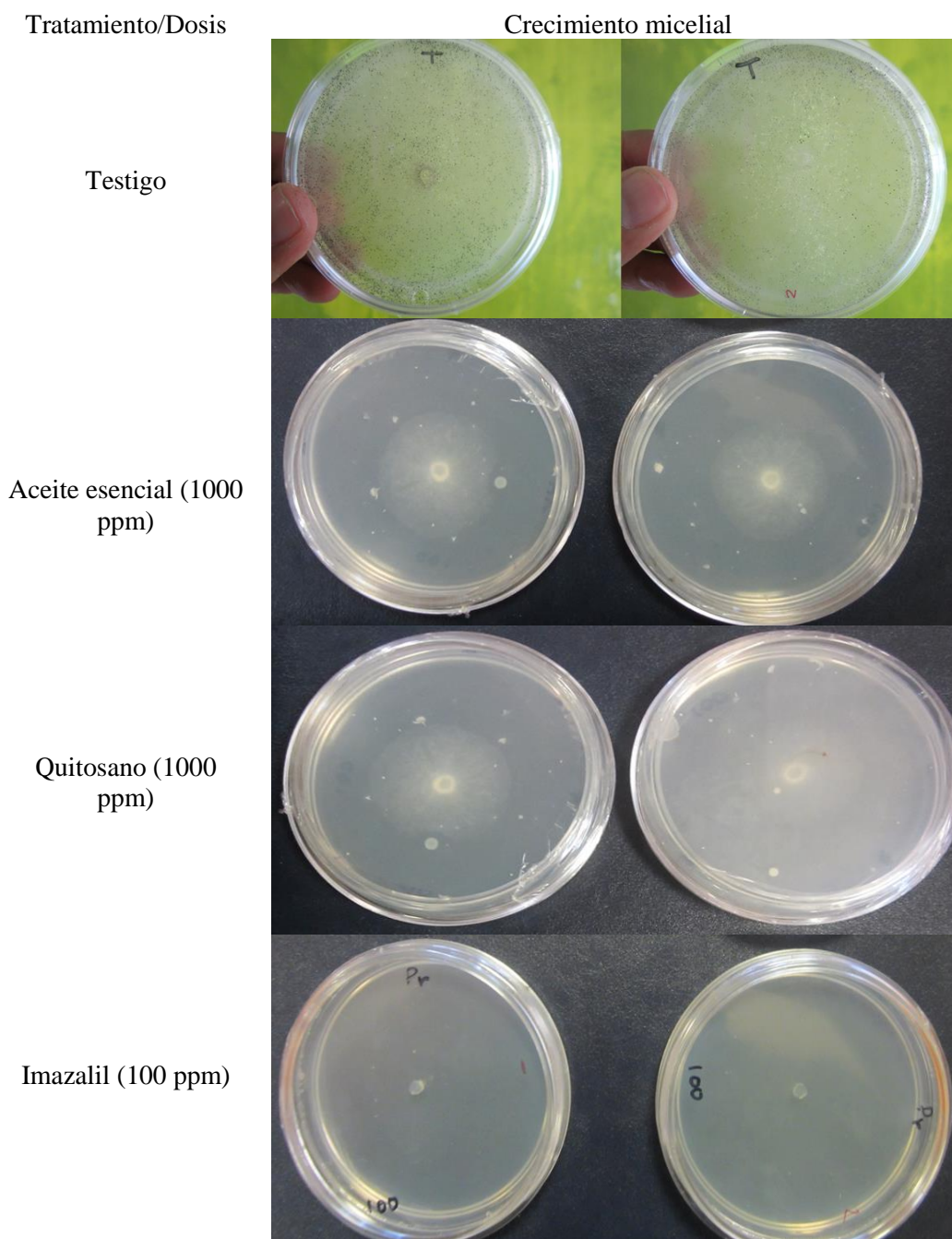


Figura 1. Comparación de los tratamientos más eficaces en la inhibición del crecimiento micelial de *Rhizopus stolonifer*.

que la combinación de Quitosano y aceite esencial de orégano *Origanum vulgare* L. tiene una excelente efectividad para controlar hongos postcosecha como *R. stolonifer* y *Aspergillus niger* en uvas (Dos Santos *et al.*, 2012).

### CONCLUSIONES

*Rhizopus stolonifer* causa la pudrición blanda en frutos de guanábana en postcosecha. Indistintamente

si los frutos tienen lesiones por la acción mecánica o por su actividad enzimática. Los tratamientos a base de aceite esencial y Quitosano representan una alternativa natural para el control de la pudrición blanda en guanábana en condiciones in vitro.

### LITERATURA CITADA

BAUTISTA, B. S., HERNÁNDEZ, L. N. A., VELÁZQUEZ DEL VALLE, G., HERNÁNDEZ, L. M., AIT, B. E.,

- BÓSQUEZ, M. E. AND C. L. WILSON. 2006. Chitosan as a potential natural compound to control pre and postharvest diseases of horticultural commodities. *Crop Protection*, 25(2): 108–118.
- HAHN, F. 2006. *Rhizopus stolonifer* detection by sensing the tomato peduncle scar. *Biosystems Engineering*, 95(2): 171–179.
- DEVLIEGHERE, F., VERMEULEN, A. AND J. DEBEVERE. 2004. Chitosan: antimicrobial activity, interactions with food components and applicability as a coating on fruit and vegetables. *Food Microbiology*, 21(6): 703–714.
- DOS SANTOS, N. S. T., ATHAYDE, A. A. J., VASCONCELOS, O. C. E., VERÍSIMO, C., SOUSA, S., MONTENARO, S. T. C. AND LLEITE, S. E. 2012. Efficacy of the application of a coating composed of chitosan and *Origanum vulgare* L. essential oil to control *Rhizopus stolonifer* and *Aspergillus niger* in grapes (*Vitis labrusca* L.). *Food Microbiology*, 32 (2): 345–353.
- EL GHAOUTH, A., ARUL, J. GRENIER, J. AND ASSELIN A. 1992. Antifungal activity of chitosan on two-harvest pathogen of strawberry fruit. *Phytopathology*, 82: 398–402.
- JAMES, J. R., TWEEDY, B. AND L.C. NEWBY. 1993. Efforts by industry to improve the environmental safety of pesticides. *Annual Review of Phytopathology*, 31(1): 423–439.
- JIANG, Y. M. AND Y. B. LI. 2001. Effect of chitosan coating on postharvest life and quality of longan fruit. *Food Chemistry*, 73(2): 139–143.
- Hirano S. and N. Nagano. 1989. Effects of chitosan, pectic acid, lysozyme, and chitinase on the growth of several phytopathogens. *Agricultural Biology and Chemistry*, 53: 3065–3066.
- HOSSEINI, M. H., RAZAVI, S. H., MOUSAVI, S. M., YASAGHI, S. S. AND A. G. HASANSARAEI. 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.
- NORTHOVER, J. AND T. ZHOU. 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.
- SCHIRRA, M., CABRAS, P., ANGIANI, A., D’HALLEWIN, C., RUGGIU, R. AND E. V. MINELLI. 1997. Effect of heated solutions on decay control and residues of imazalil in lemons. *Journal of Agricultural Food and Chemistry*, 45 (10): 4127–4130.
- SUTTON, B. C. 1980. The Coelomycetes fungi imperfecti with *Pycnidia*, *Acervuli* and *Stromata*. Commonwealth Mycological Institute Ed. Kew, Surrey, England.
- TERZI, V., MORCIA, C., FACCIOLI, P., VALÉ, G., TACCONI, G. AND M. MALNATI. 2007. In vitro antifungal activity of the tea tree (*Melaleuca alternifolia*) essential oil and its major components against plant pathogens. *Letters in Applied Microbiology*, 44 (6): 613–618.
- TRIPATHI, P. AND N. K. DUBEY. 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, B. S., HERNÁNDEZ, L. N. A., GUERRA, S. G. M. Y E. AMORA-LAZCANO. 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.