

REVISTA MEXICANA DE FITOPATOLOGÍA

MEXICAN JOURNAL OF PHYTOPATHOLOGY

Fully Bilingual

VOLUMEN 37, NÚMERO ESPECIAL 1, Agosto 2019



**Órgano Internacional de Difusión de la
Sociedad Mexicana de Fitopatología, A.C.**

XXI CONGRESO INTERNACIONAL & XLVI CONGRESO NACIONAL

Editor en Jefe * Editor in Chief

Dr. Gustavo Mora Aguilera, COLPOS

Editora Técnica * Technical Editor

Dra. Norma Ávila Alistac, UAM-Xochimilco

Composición Web y App Movil * Web and App Composition

M.C. Eduardo Guzmán Hernández, LANREF, COLPOS

Ing. Oscar Eder Flores Colorado, LANREF, COLPOS

Editoras(es) Adjuntos * Senior Editors

Dra. Sylvia Patricia Fernández Pavía, UMSNH

Dra. Graciela Dolores Ávila Quezada, UACH

Dra. Silvia Bautista Baños, IPN

Dra. Irasema del Carmen Vargas Arispuro, CIAD

Comité Editorial Internacional * International Editorial Advisory Board

Dr. Rodrigo Valverde, LSU, USA.

Dr. Sami Jorge Micheref, Universidad Federal Rural de Pernambuco, Br.

Dr. Miguel Dita Rodríguez, EMBRAPA, Br.

Dr. Vicente Febres, University of Florida, USA.

Editoras(es) Asociados * Associate Editors

Dra. Yuridia Mercado Flores, IPP

Dra. Alejandra Almaraz Sánchez, COLPOS

Dra. María Guadalupe Guerra Sánchez, IPN

Dra. Irasema del Carmen Vargas Arispuro, CIAD

Dra. María Liliana Flores López, Biocampo

S.A. de C.V.

Dr. Alfonso Vásquez López, CIIDIR

Dr. Misael Martínez Bolaños, INIFAP

Dr. Gabriel Rincón Enríquez, CIATEJ

Dr. Víctor J. Albores Flores, UNACH

Dr. Santo Ángel Ortega Acosta, UAGro.

Dr. Javier Hernández Morales, COLPOS

Dr. José Luciano Morales García, U.M.S.N.H.

Dr. Daniel Leobardo Ochoa Martínez, COLPOS

Portada: Fotos superiores: Planta de chile chilaca (*Capsicum annum*) con síntomas de marchitez y clorosis en campo. Raíz y corona con necrosis. Fotos inferiores: Planta de chile de 45 días edad inoculada con 1.2×10^6 conidios de *Fusarium solani* y planta control (izquierda). Macro y microconidios de *F. solani* (derecha).

Original: Reyes-Tena A, Rodríguez-Alvarado G, Santillán-Mendoza R, Díaz-Celaya M y Fernández-Pavía SP/ pág. 45.

NOTAS FITOPATOLÓGICAS * PHYTOPATHOLOGICAL NOTES

- Determination of chitin in postharvest fungi and chitinases in fruit of papaya “Maradol”** * Determinación de quitina en hongos postcosecha y de quitinasas en frutos de papaya “Maradol”. 1
Lucas-Bautista JA, Bautista-Baños S, Ventura-Aguilar RI y Gómez-Ramírez M.
- Effect of different culture media on the pathogenicity of *Aspergillus flavus* in fig fruits** * Efecto de diferentes medios de cultivo sobre la patogenicidad de *Aspergillus flavus* en frutos de higo. 8
Ramos-García ML, Aparicio-García PF, Bautista-Baños S y Hernández-López M.
- Site-specific fungicides combined with Mancozeb for the control of asian soybean rust** * Fungicidas sitio-específicos combinados con Mancozeb para el control de la roya asiática de la soya. 15
Enciso-Maldonado GA, Maidana-Ojeda M, Schlickmann-Tank JA, Montoya-García CO, Páez-Ranoni HJ, Fernández-Riquelme F y Domínguez-Sanabria JA.
- Effect of different the culture media in the production of biomass and ergosterol in *Rhizopus stolonifer*** * Efecto de los diferentes medios de cultivo en la producción de biomasa y ergosterol en *Rhizopus stolonifer*. 22
Hernández-López M, Bautista-Baños S, Ventura-Aguilar RI y Abarca-Franco AG.
- Effect of chitosan-thyme essential oil nanocoatings on postharvest quality of tomato fruit** * Efecto de nanorecubrimientos de quitosano-aceite esencial de tomillo sobre la calidad postcosecha en frutos de jitomate. 29
Correa-Pacheco ZN, García-Paniagua KD, Bautista-Baños S y Corona-Rangel ML.
- Effect of oleic acid and chitosan formulations on *in vitro* development of *Clavibacter michiganensis*** * Efecto de formulaciones de ácido oleico y quitosano sobre el desarrollo *in vitro* de *Clavibacter michiganensis*. 37
Castañón-Viveros SA, Salas-Marcial C, Ramos-García ML, Hernández-Romano J, Guillen Sánchez D.
- Fusarium* wilt caused by *Fusarium solani* in chili chilaca (*Capsicum annuum*) in Michoacan** * Marchitez causada por *Fusarium solani* en chile chilaca (*Capsicum annuum*) en Michoacán. 43
Reyes-Tena A, Rodríguez-Alvarado G, Santillán-Mendoza R, Díaz-Celaya M y Fernández-Pavía SP.

- Streptomyces* as *in vitro* biocontrol agents of *Exserohilum rostratum* and producers of plant growth promoting substances** * *Streptomyces* como biocontroladores *in vitro* de *Exserohilum rostratum* y productores de sustancias promotoras del crecimiento vegetal. 48
García-Rojas DE, Vázquez-Vázquez P, Pérez-Corral DA, Ruiz-Cisneros MF, Berlanga-Reyes DI, Ornelas-Paz JJ, Acosta-Muñiz CH, Rios-Velasco C, Salas-Marina MA y Osorio-Hernández E.
- In vitro* antifungal activity of antagonistic microorganisms against *Fusarium oxysporum* from avocado trees rhizosphere of Xalisco, Nayarit, Mexico** * Actividad antifúngica *in vitro* de microorganismos antagonistas contra *Fusarium oxysporum* de rizosfera de árboles de aguacate en Xalisco, Nayarit, México. 57
Vega-Torres MG, Ruiz-Cisneros MF, Pérez-Corral DA, Berlanga-Reyes DI, Ornelas-Paz JJ, Rios-Velasco C, Cambero-Campos OJ, Estrada-Virgen MO, Luna-Esquivel G y Denise-Revérchon FL.
- Morphological variability and sensitivity of *Phytophthora capsici* causing wilt in bell pepper in Chihuahua, Mexico** * Variabilidad morfológica y sensibilidad de *Phytophthora capsici* causando marchitez en chile pimiento morrón en Chihuahua, México. 65
Sánchez-Gurrola C, Gómez-Dorantes N, Rodríguez-Alvarado G, Fernández-Pavía SP y Ávila-Quezada G.
- Effect of ethanol extract of fig residue (*Ficus carica*) on growth of postharvest fungi** * Efecto de extracto etanólico de residuos de higo (*Ficus carica*) sobre el crecimiento de hongos postcosecha. 72
Istúriz-Zapata MA, Pérez-García M, Contreras-Saavedra S y Barrera-Necha LL.
- Effect of viral inhibitors in the control of *Papaya ringspot virus* and productivity in papaya (*Carica papaya*)** * Efecto de inhibidores en el control del *Papaya ringspot virus* y productividad en papaya (*Carica papaya*). 80
Magaña-López I, Guillén-Sánchez D, Alia-Tejacal I, López-Martínez V, Juárez-López P, Andrade-Rodríguez M y Hernández-Pérez R.

Determinación de quitina en hongos postcosecha y de quitinasas en frutos de papaya “Maradol”

Determination of chitin in postharvest fungi and chitinases in fruit of papaya “Maradol”

Jesús Armando Lucas-Bautista, Silvia Bautista-Baños*, Centro de Desarrollo de Productos Bióticos, Instituto Politécnico Nacional, Carretera Yautepec-Jojutla, Km 6, calle Ceprobi No. 8, CP 62731, Yautepec, Morelos, México. **Rosa Isela Ventura-Aguilar**, CONACYT-Centro de Desarrollo de Productos Bióticos, Instituto Politécnico Nacional, Carretera Yautepec-Jojutla, Km 6, calle Ceprobi No. 8, CP 62731, Yautepec, Morelos, México. **Marlenne Gómez-Ramírez**, Centro de Investigación de Ciencias Aplicadas y Tecnología Avanzada, Instituto Politécnico Nacional, Cerro Blanco No. 141 Colonia Colinas del Cimatario, C.P. 76090, Querétaro, México. *Autor de correspondencia: sbautis@ipn.mx

Recibido: 19 de Febrero, 2019.

Aceptado: 29 de Marzo, 2019.

Lucas-Bautista JA, Bautista-Baños S, Ventura-Aguilar RI y Gómez-Ramírez M. 2019. Determinación de quitina en hongos postcosecha y de quitinasas en frutos de papaya “Maradol”. *Revista Mexicana de Fitopatología* 37 (No. Esp. 1): 1-7.

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1902-3.

Resumen. La quitina es un biopolímero que conforma la pared celular de hongos filamentosos la cual se degrada por quitinasas mediante la hidrólisis de sus enlaces β -1,4. El fruto de papaya es afectado por hongos que ocasionan pérdidas en el almacenamiento. Para su control, la detección debe ser rápida y oportuna; en este sentido, los biosensores podrían ser una opción al reconocer el analito que esté involucrado con su presencia, por ejemplo, como quitina y quitinasas. En este trabajo se cuantificó la quitina presente en hongos fitopatógenos que afectan a la papaya obteniendo valores estadísticamente significativos ($p \leq 0.05$) entre 13%

(*Alternaria alternata*) y 37% (*Penicillium* sp.) de quitina de su biomasa total; asimismo, se determinó el contenido de quitinasas presentes en cáscara del fruto en cuatro estados de madurez. Los valores fueron significativamente diferentes ($p \leq 0.05$): entre 12473 (0-25% coloración amarilla) y 15514 (100% coloración amarilla) unidades de quitinasa g^{-1} en muestras congeladas y entre 21085 (0% coloración amarilla) y 29457 (25% coloración amarilla) unidades de unidades de quitinasa g^{-1} en muestras liofilizadas. Estos valores forman parte de una primera etapa de reconocimiento de indicadores biológicos para el diseño de un biosensor para su aplicación en papaya.

Palabras clave: *Carica papaya* L, madurez, biosensores, indicadores, enzimas.

Abstract. Chitin is a biopolymer synthesized that conforms the cell wall of filamentous fungi and it

is degraded by chitinases, which hydrolyze their β -1,4 bonds. The papaya fruit is affected by fungi that cause losses in storage. For their control, the detection must be fast and timely; in this sense, biosensors could be an option when recognizing the analyte that is involved with their presence, for example, as chitin and chitinases. In this work, the chitin obtained from phytopathogenic fungi that affects the papaya was quantified obtaining statistically significant values ($p \leq 0.05$) of 13 (*Alternaria alternata*) and 37% (*Penicillium* sp.) of chitin from its total biomass; likewise, the content of chitinases present in the fruit's peel was determined in four stages of maturity. The values were significantly different ($p \leq 0.05$) from 12473 (0-25% surface yellow color) to 15514 (100 % yellow color) units of chitinase g-1 in the frozen samples and from 21085 (0% yellow color) to 29457 (25% yellow color) units of chitinase g-1 in lyophilized samples. These values are part of a first stage of recognition of biological indicators for the design of a biosensor for application in papaya.

Key words: *Carica papaya* L, ripening, biosensors, indicators, enzyme.

La quitina es el segundo biopolímero más abundante en la naturaleza, después de la celulosa. Un gran número de organismos la sintetizan y se encuentra, entre otros, en la cutícula de insectos, huevos de nematodos, arácnidos y exoesqueleto de crustáceos e invertebrados. Es componente primordial en la pared celular de los hongos y está compuesto de moléculas de N-acetil-D-glucosamina unidas por enlaces β -1,4 (Hamid *et al.*, 2013). A pesar de su gran estabilidad química y térmica, la quitina es susceptible a la acción de enzimas quitinolíticas (Ramírez *et al.*, 2010). Las quitinasas (EC 3.2.1.14) son enzimas de tipo glucósido-hidrolasas

que catalizan la hidrólisis de los enlaces β -1,4 en quitina y quito-oligómeros de cadena corta (Seidl, 2008) y tienen diferentes funciones acorde al organismo de origen; en plantas forman parte de su mecanismos de defensa ante el ataque de fitopatógenos que, al entrar en contacto con la planta, generan una serie de señalizaciones que van hacia el núcleo de la célula donde se sintetizan quitinasas que degradan la quitina de la pared de los microorganismos y provocan su lisis (Kumar *et al.*, 2018). El fruto de papaya puede ser severamente afectado por complejos fúngicos, entre los que se han identificado a *Alternaria alternata*, *Aspergillus niger*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium solani*, *Penicillium digitatum* y *Rhizopus stolonifer*, entre otros (Bautista-Baños *et al.*, 2013) (Figura 1 a-d). Algunos de ellos mantienen sus esporas en estado latente durante la etapa de crecimiento del fruto y se desarrollan completamente cuando encuentran las condiciones adecuadas en la maduración, provocando pérdidas cuantiosas durante el almacenamiento y comercialización (Guédez *et al.*, 2014). Actualmente, el control de hongos fitopatógenos involucra que su detección sea rápida, eficaz y oportuna (Pinzón-Gutiérrez *et al.*, 2013); sin embargo, los métodos tradicionales para dicha acción no cumplen con las características para evitar pérdidas del producto. En este sentido, los biosensores son una opción para la predicción temprana de enfermedades ya que pueden ser capaces de detectar en tiempo real la presencia de microorganismos patógenos de manera eficaz. Los indicadores biológicos como enzimas, material genético y anticuerpos, entre otros, pueden asociarse a la presencia de patógenos que podrían ser de utilidad como biomarcadores del sensor, ya que éstos se componen de un analito biológico de reconocimiento asociado a un sistema de transducción que envía la señal obtenida de la interacción con el analito (Martinkova *et al.*, 2017). Ejemplo de ello, es el trabajo realizado

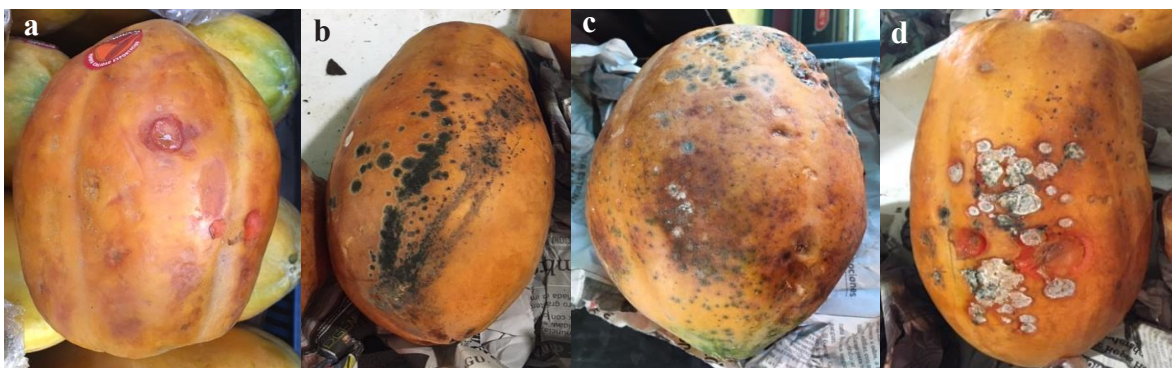


Figura 1. Principales microorganismos postcosecha de la papaya: a) *C. gloeosporioides*, b) *A. niger*, c) *Penicillium* sp., d) *A. alternata*.

por Wandermur *et al.* (2014) quienes fabricaron un biosensor de fibra óptica para detectar células de *Escherichia coli* en concentraciones de 10^4 y 10^8 UFC en menos de 10 min; asimismo, Khaledian *et al.* (2017) desarrollaron un biosensor a base de nanopartículas de oro para detectar el ADN genómico de *Ralstonia solanacearum* en suelo. Actualmente, no se conocen biosensores capaces de reconocer hongos fitopatógenos en frutos de papaya. El objetivo de este trabajo fue evaluar el contenido de quitina en los principales hongos postcosecha de la papaya y la presencia de quitinasas en frutos de diferentes estados de madurez, como parte de una primera etapa de reconocimiento de indicadores biológicos que permitan el diseño de un biosensor para su aplicación en papaya.

Obtención del inóculo. Los hongos evaluados fueron *Alternaria alternata*, *Aspergillus niger*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium solani*, *Penicillium* sp. y *Rhizopus stolonifer*; los cuales se obtuvieron del cepario del Laboratorio de Tecnología Postcosecha de Productos Agrícolas del Centro de Desarrollo de Productos Bióticos. Los hongos se incubaron en medio papa dextrosa agar (PDA) en cajas Petri de 10 cm a 20-25 °C de 4 a 12 días de crecimiento dependiendo del patógeno.

Cuantificación de quitina de hongos presentes en frutos de papaya. La cuantificación de quitina se realizó siguiendo las técnicas de Maghsoodi *et al.* (2009) y Kumaresapillai *et al.* (2011) con modificaciones, y consistió en los siguientes pasos:

1. Cultivo de hongos. Se obtuvo el micelio de 4 cajas de cada cepa de hongo previamente incubado, bajo condiciones estériles con un asa bacteriológica y se colocó en un tubo cónico Falcon™ con 40 mL de agua desionizada estéril. Cada solución se centrifugó a 4629 g (Eppendorf Centrifuge 5804 R, Eppendorf International, USA) durante 10 min. Se utilizó la pastilla de micelio al cuál se le agregó 12.5 mL de agua desionizada sometiéndolo a agitación en un agitador orbital (Vortex-Genie-2) y se empleó perlas de vidrio para fragmentar el micelio. Posteriormente, se agregó el contenido del tubo (4×10^4 a 2×10^5 células), en matraz Erlenmeyer de 1 L, conteniendo 450 mL de medio sacarosa (1 L de agua desionizada: 100 g de sacarosa, 1.5 g de NaNO_3 , 0.5 g de KH_2PO_4 , 0.025 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.025 g de KCl y 1.6 g de extracto de levadura) y se dejó en agitación a 140 rpm (labtron HZO 3:10, UK) durante 72 h a 32 °C.

2. Obtención de micelio. En cámara de flujo laminar, bajo condiciones estériles, se colectó el micelio

de cada hongo por filtración al vacío con ayuda de papel filtro Whatman No.1 y embudo de porcelana haciendo lavados continuos con agua desionizada hasta obtener un filtrado claro. La biomasa obtenida se colocó en una caja Petri y se dejó secar en estufa bacteriológica (Luzeren, modelo DHG9030A) a 63 °C hasta tener peso constante.

3. Extracción de quitina. Asépticamente, 0.1 g de micelio se transfirió a matraces con 5 mL de NaOH al 1M, llevándose a 110 °C durante 15 min en autoclave. El material alcalino resultante se colectó y centrifugó a 4629 g durante 10 min. Se lavó con agua desionizada hasta obtener un pH 7. Posteriormente, el material se enjuagó con etanol absoluto (marca CH, México) (1:20 p/v) y luego con acetona (Golden Bell, USA) (1:20). Finalmente, el material obtenido se secó en cajas Petri en estufa bacteriológica a 63 °C hasta obtener un peso constante. Los resultados obtenidos de la cuantificación de quitina de hongos en frutos de papaya se expresaron como el porcentaje de quitina presente en cada hongo.

Determinación de quitinasas en cáscaras de papaya. Material biológico. Se cosecharon frutos de papaya de la variedad Maradol en huertos de Teteman, Morelos, México, en 4 estados de madurez: 0% (ausencia de color amarillo), 25% (1/4 coloración amarillo), 50% (1/2 coloración amarillo) y 100% (totalmente amarillo) (Norma Mexicana NMX-FF-041-SCFI-2007). Se cosecharon 4 frutos por cada estado de madurez haciendo un total de 16 muestras. Se recuperó la cáscara de cada fruto y se cortó en porciones de 1-2 mm de espesor; la mitad se congeló a -72 °C y la restante se liofilizó almacenándose hasta su uso. La obtención del extracto enzimático se realizó siguiendo la técnica descrita por Glibota *et al.* (2000) con algunas modificaciones y la determinación de quitinasas por el método descrito por Gómez-Ramírez *et al.* (2001) y consistió en los siguientes pasos:

1. Obtención de extracto enzimático. Se maceraron en mortero 40 g de cáscara congelada agregándole 60 mL de buffer Na₂HPO₄-ácido cítrico (Fermont, México) 0.05 N a pH 7. La mezcla resultante se filtró con papel filtro Whatman No.1 y el sobrenadante se centrifugó a 1157 g durante 10 min. Adicionalmente, siguiendo el mismo protocolo de obtención de extracto enzimático y con el objetivo de determinar la diferencia entre el almacenamiento de muestras, 0.5 g de cáscara liofilizada se maceró con 20 mL de buffer fosfato-ácido cítrico.

2. Reacción enzimática. Se tomó como sustrato quitina coloidal comercial al 10% suspendida en buffer de fosfatos 0.2 M a pH 6.5. Se mezcló 1 mL del extracto enzimático con 1 mL de quitina coloidal en tubos cónicos Falcon™ para realizar la reacción dejándolos en incubación a 37 °C durante 1 h en estufa para después detener la reacción con 1 mL de NaOH al 1%. Posteriormente, la mezcla se centrifugó a 6300 g durante 10 min.

3. Medición de la actividad enzimática. De los sobrenadantes, se determinó el contenido de azúcares reductores tanto del extracto enzimático como de la reacción enzimática mezclando en tubo de ensayo 1 mL de muestra y 1 mL de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS, Sigma-Aldrich, USA) sometiéndose a baño María en ebullición durante 5 min para la reacción; transcurrido el tiempo, los tubos se colocaron en agua fría. Finalmente, se observó su absorbancia a 535 nm en espectrofotómetro (Thermo scientific Genesis 10S UV-VIS, USA). Las determinaciones de cada estado de madurez se hicieron por triplicado en cáscaras liofilizadas y congeladas. El valor de unidades quitinasa por gramo de muestra (UQ g⁻¹), correspondientes a peso fresco en cáscaras congeladas y a peso seco en cáscaras liofilizadas, se calculó como una diferencia entre el contenido de azúcares reductores de la reacción enzimática y el contenido de azúcares reductores del extracto

enzimático y se cuantificaron mediante una curva estándar de N-acetilglucosamina (NAG, Sigma-Aldrich, USA) de 0 a 8 mmol mL⁻¹. Una unidad de quitinasa se definió como la cantidad de enzima que catalizó la liberación de 1 mmol de NAG dentro de las condiciones experimentales usadas. Los datos se analizaron mediante un ANOVA y prueba de Tukey ($p \leq 0.05$).

En el Cuadro 1 se muestra el porcentaje de quitina de cada uno de los hongos estudiados. Se obtuvieron diferencias significativas ($p \leq 0.05$) en el contenido de la quitina entre los hongos. En general, el valor promedio de quitina estuvo en el rango de 13% a 37%. El valor mínimo correspondió a *A. alternata* y el máximo a *Penicillium* sp. Con relación a la cantidad de quitinasas, hubo diferencias significativas entre los estados de madurez ($p \leq 0.05$). En general, en promedio se observó mayor contenido en las cáscaras de los frutos que se liofilizaron (25632.82 UQ g⁻¹) que en las cáscaras que fueron congeladas (14,040 UQ g⁻¹). En la Figura 2a se muestra, a excepción del estado de madurez de 0% y 25%, aumento en el contenido de las quitinasas en los estados de mayor madurez del fruto (50 y 100%). Con relación a la Figura 2b, la mayor producción de quitinasas correspondió al estado de madurez de 25% (c.a 29,000 UQ g⁻¹).

Cuadro 1. Determinación de quitina en algunos hongos presentes en frutos de papaya durante el almacenamiento.

Hongo	Quitina (%) ^x
<i>Alternaria alternata</i>	13.0±3.6 ^c
<i>Aspergillus niger</i>	21.67±2.3 ^b
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	20.67±1 ^{bc}
<i>Fusarium solani</i>	24.0±3.4 ^b
<i>Penicillium</i> sp.	37.33±3 ^a
<i>Rhizopus stolonifer</i>	17.33±2.3 ^{bc}

^xLetras diferentes en las columnas indican diferencias significativas. Prueba de Tukey ($p \leq 0.05$); resultados expresados como media ± desviación estándar.

Existen pocas investigaciones asociadas con el contenido de quitina en hongos; sin embargo, los valores que se obtuvieron en este estudio concuerdan con los presentados por Blumenthal y Roseman (1957). Estos autores reportaron valores de 11.5% en el género *Alternaria* sp. y 22.4% en *Aspergillus flavus*. Por su parte, Arbia *et al.* (2013) reportaron en *Mucor rouxii* y *Lactarius vellereus* valores correspondientes a 44.5 y 19%, respectivamente.

Por otro lado, existe una diferencia de casi el doble en la cantidad de quitinasas presentes en la cáscara congelada respecto a la liofilizada. Esto puede deberse a que las muestras liofilizadas conservan mejor las propiedades fisicoquímicas de los alimentos (Ayala *et al.*, 2010); además, las muestras congeladas contienen más agua que las liofilizadas, presentando un menor contenido en materia seca, que es donde se localiza a la enzima y, en consecuencia, su cuantificación fue menor. Sobre este tema, Yabuki *et al.* (1986) reportaron actividad de quitinasas de 887 UI mg⁻¹ de proteína en la bacteria *Aeromonas hydrophila* cuando se incubó en caldo nutritivo y se analizó después de un proceso de congelación de la muestra, siendo este, un método favorable para mantener la actividad de esta enzima de acuerdo con los autores.

Por otra parte, en las muestras congeladas, el contenido de quitinasas aumentó de forma paralela al estado de madurez. Al respecto, Sánchez-García *et al.* (2012) reportaron que conforme el fruto madura, se promueve de igual forma el desarrollo de los hongos, los cuales pudieran encontrarse en estado latente y como un mecanismo de protección, se sintetizan quitinasas para protegerlo. A la fecha, no existen estudios asociados con la producción de quitinasas respecto a los dos métodos de obtención utilizados en este estudio. En las muestras liofilizadas, de las papayas con ¼ de coloración amarilla, se obtuvo el mayor contenido de quitinasas. Esto pudo deberse al mismo estado activo de crecimiento,

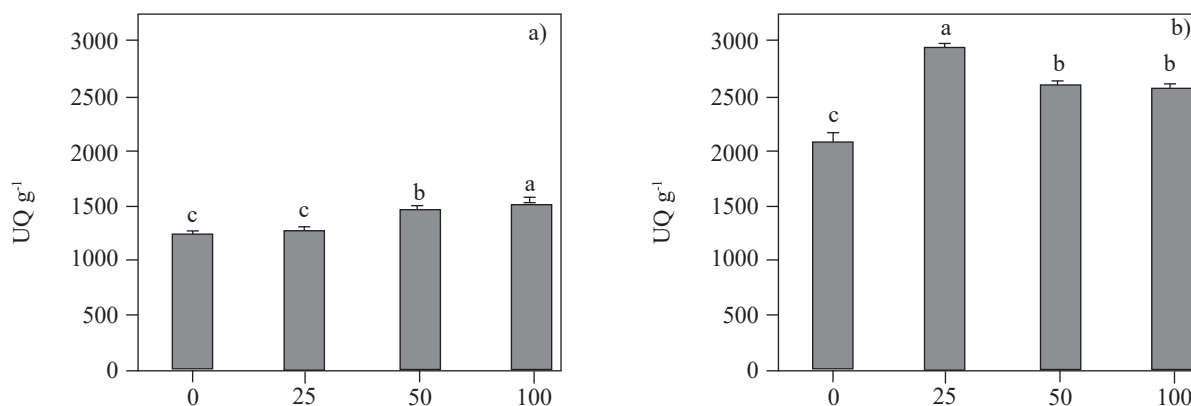


Figura 2. Contenido de quitinasas en cáscara de papaya variedad Maradol, a) congeladas y b) liofilizadas, de 4 estados de madurez: 0% = ausencia de color amarillo, 25% = 1/4 coloración amarillo, 50% = 1/2 coloración amarillo y 100% = totalmente amarillo. Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas. Prueba de Tukey ($p \leq 0.05$); resultados expresados como media \pm desviación estándar. UQ g^{-1} = Unidades de quitinasa por gramo de muestra.

desarrollo y maduración del fruto (Bryant y Julkunen-Tiitto, 1995), además, a un posible proceso de infección por microorganismos (Xu *et al.*, 2016). Sobre este tema, Yan *et al.* (2008) reportaron que la actividad de quitinasa se correlaciona directamente con la microestructura y proporción de quitina en la pared celular de los hongos con los que interactúa.

En conclusión, en este estudio, los valores que se obtuvieron tanto de la quitina presente en los hongos fitopatógenos y de las quitinasas en el fruto de papaya podrían servir como indicadores biológicos de la presencia de hongos en la papaya para su uso como marcadores para el diseño de un biosensor. Sin embargo, aún es necesario realizar estudios similares en diferentes patosistemas de la papaya cubriendo sus diferentes estados fenológicos.

LITERATURA CITADA

- Arbia W, Arbia L, Adour L and Amrane A. 2013. Chitin extraction from crustacean shells using biological methods—a review. *Food Technology and Biotechnology* 51: 12-25. <https://search.proquest.com/docview/1436089273?pq-origsite=gscholar>
- Ayala AA, Serna L y Mosquera E. 2010. Liofilización de pitahaya amarilla (*Selenicereus megalanthus*). *Vitae* 17: 121-127. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=169815396002>
- Bautista-Baños S, Sivakumar D, Bello-Pérez A, Villanueva-Arce R and Hernández-López M. 2013. A review of the management alternatives for controlling fungi on papaya fruit during the postharvest supply chain. *Crop Protection* 49: 8-20. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2013.02.011>
- Blumenthal HJ and Roseman S. 1957. Quantitative estimation of chitin in fungi. *Journal of Bacteriology* 74: 222-224. <https://jb.asm.org/content/jb/74/2/222.full.pdf>
- Bryant JP and Julkunen-Tiitto R. 1995. Ontogenic development of chemical defense by seedling resin birch: energy cost of defense production. *Journal of Chemical Ecology* 21: 883-896. <https://doi.org/10.1007/BF02033796>
- Glibota GS, Garro OA y Judis MA. 2000. Actividad proteolítica de restos del fruto de *Carica papaya*. *Comunicaciones Científicas y Tecnológicas-UNNE (Argentina)* 4p. http://www.revistacyt.unne.edu.ar/unnevieja/Web/cyt/cyt/2000/8_exactas/e_pdf/e_022.pdf
- Gómez-Ramírez M, Rojas-Avelizapa LI and Cruz-Camarillo R. 2001. The chitinase of *Bacillus thuringiensis*. Pp: 273-282. In: Muzzarelli RAA (ed.). *Chitin Enzymology*. Atec, Ed. Italy. 614p.
- Guédez C, Cañizalez L, Avendaño L, Scorza J, Castillo C, Olivar R, Méndez Y y Sánchez L. 2014. Actividad antifúngica del aceite esencial de naranja (*Citrus sinensis* L.) sobre hongos postcosecha en frutos de lechosa (*Carica papaya* L.). *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología* 34: 81-85. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=199437912007>
- Hamid R, Khan MA, Ahmad M, Ahmad MM, Abdin MZ, Munsarrat J and Javed S. 2013. Chitinases: an update. *Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences* 5: 21-29. <https://doi.org/10.4103/0975-7406.106559>
- Khaledian S, Nikkhab M, Shams-Bakhsh M and Hoseinzadeh S. 2017. A sensitive biosensor based on gold nanoparticles to detect *Ralstonia solanacearum* in soil. *Journal of General Plant Pathology* 83: 231-239. <https://doi.org/10.1007/s10327-017-0721-z>

- Kumar M, Brar A, Yadav M, Chawade A, Vivekanand V and Pareek N. 2018. Chitinases—Potential candidates for enhanced plant resistance towards fungal pathogens. *Agriculture* 8: 88. <https://doi.org/10.3390/agriculture8070088>
- Kumaresapillai N, Basha RA and Sathish R. 2011. Production and evaluation of chitosan from *Aspergillus niger* MTCC strains. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research* 10: 553-558. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3813029/>
- Maghsoodi V, Razavi J and Yaghmaei S. 2009. Production of chitosan by submerged fermentation from *Aspergillus niger*. *Scientia Iranica. Transaction C, Chemistry, Chemical Engineering* 16: 145-148. <https://www.sid.ir/en/journal/ViewPaper.aspx?ID=164842>
- Pinzón-Gutiérrez YA, Bustamante SL y Buitrago-Hurtado G. 2013. Diagnóstico molecular diferencial *Colletotrichum gloeosporioides* y *Fusarium oxysporum* en ñame (*Dioscorea* sp.). *Revista Colombiana de Biotecnología* 15: 52-60. <http://bdigital.unal.edu.co/37763/>
- Ramírez MÁ, Rodríguez AT, Alfonso L y Peniche C. 2010. La quitina y sus derivados, biopolímeros con potencialidades de aplicación agrícola. *Biotecnología Aplicada* 27: 270-276. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1027-28522010000400002
- Sánchez-García C, Cruz-Martín M, Alvarado-Capó Y, Rojas L, Leiva-Mora M, Acosta-Suarez M y Roque B. 2012. Detección y cuantificación de quitinasa en hojas de banano (*Musa* spp.) inoculadas con *Mycosphaerella fijiensis*. *Biotecnología Vegetal* 12: 119-124. <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/163>
- Seidl V. 2008. Chitinases of filamentous fungi: a large group of diverse proteins with multiple physiological functions. *Fungal Biology Reviews* 22: 36-42. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2008.03.002>
- Wandermur G, Rodrigues D, Allil R, Queiroz V, Peixoto R, Werneck M and Miguel M. 2014. Plastic optical fiber-based biosensor platform for rapid cell detection. *Biosensors and Bioelectronics* 54: 661-666. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2013.11.030>
- Xu J, Xu X, Tian L, Wang G, Zhang X, Wang X and Guo W. 2016. Discovery and identification of candidate genes from the chitinase gene family for *Verticillium dahliae* resistance in cotton. *Scientific Reports* 6: 1-12. <https://doi.org/10.1038/srep29022>
- Yabuki M, Mizushina K, Amatatsu T, Ando A, Jujii T, Shimada M and Yamashita M. 1986. Purification and characterization of chitinase and chitobiase produced by *Aeromonas hydrophila* subsp. *Anaerogene* A52. *The Journal of General and Applied Microbiology* 32: 25-38. <https://doi.org/10.2323/jgam.32.25>
- Yan R, Hou J, Ding D, Guan W, Wang C, Wu Z and Li M. 2008. *In vitro* antifungal activity and mechanism of action of chitinase against four plant pathogenic fungi. *Journal of Basic Microbiology* 48: 293-301. <https://doi.org/10.1002/jobm.200700392>

Efecto de diferentes medios de cultivo sobre la patogenicidad de *Aspergillus flavus* en frutos de higo

Effect of different culture media on the pathogenicity of *Aspergillus flavus* in fig fruits

Margarita de Lorena Ramos-García*, Pablo Fernando Aparicio-García, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Facultad de Nutrición. Calle Iztaccihuatl S/N, Colonia Los Volcanes, Cuernavaca, Morelos, C.P. 62350. México; Silvia Bautista-Baños, Mónica Hernández-López, Instituto Politécnico Nacional. Centro de Desarrollo de Productos Bióticos. Carretera Yautepec-Jojutla, Km 6.8, San Isidro, CEPROBI 8, Yautepec, C.P. 62731. Morelos México.*Autor para correspondencia: margarita.ramosg@uaem.edu.mx

Recibido: 20 de Marzo, 2019.

Aceptado: 23 de Mayo, 2019.

Ramos-García ML, Aparicio-García PF, Bautista-Baños S y Hernández-López M. 2019. Efecto de diferentes medios de cultivo sobre la patogenicidad de *Aspergillus flavus* en frutos de higo. Revista Mexicana de Fitopatología 37 (No. Esp. 1): 8-14.

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1903-2

Resumen. *Aspergillus flavus* es un hongo que infecta diversos alimentos, entre ellos el higo. Se han utilizado diferentes medios de cultivo para su aislamiento y crecimiento. El objetivo de esta investigación fue evaluar la patogenicidad de *A. flavus* crecido en diferentes medios de cultivo sobre higos. Se incubó *A. flavus* en 5 medios de cultivo (CZAPEK, agar V8, PDA, Dextrosa Sabouraud y agar de Malta) y de éstos, se realizaron dos suspensiones de esporas (1×10^4 y 1×10^5 Esp mL⁻¹). Los frutos se inocularon y se evaluó porcentaje de infección y severidad. La cepa desarrollada en medio CZAPEK (1×10^4 Esp mL⁻¹) fue la que generó mayor porcentaje de infección (64%), sin embargo, fue estadísticamente similar al PDA y Agar de Malta

(53 y 51%, respectivamente). La cepa del medio PDA (1×10^4 Esp mL⁻¹) mostró mayor severidad (2.4) y fue estadísticamente similar a los medios evaluados, con excepción del agar V8. Los frutos inoculados con la cepa del agar V8 (1×10^4 Esp mL⁻¹) tuvieron el menor porcentaje de infección (24%) y severidad (1.64), siendo estadísticamente diferente al resto de los tratamientos. Las cepas de *A. flavus* incubada en CZAPEK y PDA tuvieron mayor patogenicidad en los frutos de higo.

Palabras clave: *Ficus carica*, medios de cultivo, esporulación, infección.

Abstract. *Aspergillus flavus* is a fungus that infects various foods, including fig. Different culture media have been used for their isolation and growth. The objective of this research was to evaluate the pathogenicity of *A. flavus* grown in different culture media on fig fruit. *A. flavus* was incubated in 5 culture media (CZAPEK, V8 agar, PDA, Sabouraud Dextrose, and Malt Agar) and of these, two spore

suspensions were performed (1×10^4 and 1×10^5 Esp mL⁻¹). The figs were inoculated and the percentages of infection and severity were evaluated. The strain developed in CZAPEK medium (1×10^4 Esp mL⁻¹) was the one that generated the highest percentage of infection (64%), however, it was statistically similar to the PDA and Malt Agar (53 and 51%, respectively). The PDA medium strain (1×10^4 Esp mL⁻¹) showed greater severity (2.4) and was statistically similar to the evaluated means, with the exception of V8 agar. The figs inoculated with the V8 agar strain (1×10^4 Esp mL⁻¹) had the lowest percentage of infection (24%) and severity (1.64), being statistically different from the rest of the treatments. Strains of *A. flavus* incubated in CZAPEK and PDA had higher pathogenicity in the fig fruit.

Key words: *Ficus carica*, culture media, sporulation, infection

El higo (*Ficus carica*) es un fruto altamente perecedero que necesita de un cuidado especial durante su cultivo, cosecha y almacenamiento; la temperatura y la presencia de microorganismos fitopatógenos, son factores que pueden disminuir su calidad y periodo de vida útil (Kong *et al.*, 2013; Irfan *et al.*, 2013). Es un fruto propenso a sufrir contaminación por microorganismos, ya que posee un alto contenido de azúcar y agua, posee una piel delgada que muchas veces sufre heridas durante su cosecha y además presenta un orificio en su base denominado “ostiolo” por el cual pueden introducirse diversos microorganismos (Oliveira *et al.*, 2009; Souza *et al.*, 2013; Kong *et al.*, 2013; Irfan *et al.*, 2013). *Aspergillus flavus* es un hongo de importancia agronómica y nutricional, que infecta varios grupos de alimentos tanto en pre como postcosecha, generando pérdidas y ocasionando problemas

de salud en animales y humanos por la producción de toxinas (Accinelli *et al.*, 2018). En estudios recientes, se ha reportado la presencia de *A. flavus* en frutos de higo, lo cual es un problema latente para la población que consume esta fruta (Carvajal, 2013). En la actualidad, existe un creciente interés por evaluar métodos de control que reduzcan la aparición de este patógeno en los frutos, para ello es necesario desarrollar el hongo en condiciones controladas las cuales garanticen su patogenicidad así como su capacidad para infectar frutos, de este modo los nuevos tratamientos propuestos podrían ser más efectivos. Los medios nutritivos son una herramienta que nos permite cultivar a los hongos en un medio artificial y poder evaluar su desarrollo. Para desarrollar hongos del género *Aspergillus* se pueden utilizar concentraciones esporas de 1×10^4 y 1×10^5 Esp mL⁻¹ (Ramos-García *et al.*, 2012) para desarrollarse en diferentes medios de cultivo, entre los que podemos encontrar: CZAPEK, PDA, Dextrosa Sabouraud, Agar V8, y agar de malta, los cuales presentan composición variada (Cuadro 1). Estos medios de cultivo se han recomendado para el estudio de mohos y levaduras, incluso se ha reportado que los medios a base de extractos naturales (Agar V8) aumentan la velocidad de crecimiento y esporulación en comparación con los medios de cultivo utilizados convencionalmente (González-Peña *et al.*, 2014). El objetivo de esta investigación fue evaluar la patogenicidad de *A. flavus* proveniente de diferentes medios de cultivo sobre frutos de higo.

Se prepararon 5 medios nutritivos, CZAPEK DOX, PDA, dextrosa Sabouraud, agar de Malta, y agar V8 (jugo comercial) y agar bacteriológico, todos de la marca BD Bioxon, México y se colocaron en cajas Petri de 60 x 15 mm. Con la ayuda de un horador, se realizaron orificios (5mm) de la cepa *A. flavus* (donada por el CEPROBI-IPN), previamente activada (siete días antes), la cual se

Cuadro 1. Composición de diferentes medios de cultivo para inocular *A. flavus*

Medio de cultivo	Componentes	Cantidad (g L ⁻¹)	pH	Referencia
CZAPEK	Sacarosa	30	7.3	Liofilchem, 2015
	Nitrato de sodio	2		
	Fosfato dipotásico	1		
	Sulfato de magnesio	0.5		
	Sulfato ferroso	0.01		
	Agar	15		
PDA	Extracto de papa	4	5.6	Neogen, 2015
	Dextrosa	20		
	Agar	15		
Dextrosa Sabouraud	Digerido pancreático de caseína	5	5.6	BD, 2015
	Digerido péptico de tejido animal	5		
	Dextrosa	40		
	Agar	15		
Malta	Extracto de malta	30	5.5	Neogen, 2017
	Agar	15		
Agar V8	Jugo de verduras "V8"	160 (mL L ⁻¹)	5.7	González-Peña <i>et al.</i> , 2014
	Sodio	0.093		
	Potasio	0.6		
	Azúcar	4.66		
	Proteína	1.33		
	Carbonato de calcio	3		
	Agar	20		

sembró en cada medio de cultivo. Las cajas Petri se incubaron durante 7 días a 25 ± 2 °C. Una vez que se desarrolló el hongo en los diferentes medios de cultivo (8 días después), se prepararon dos soluciones dos esporas; 1×10^4 y 1×10^5 Esp mL⁻¹ de acuerdo a la metodología de Ramos-García *et al.* (2012). Para realizar la inoculación, los frutos se enjuagaron durante 10 s con una solución de cloro al 1% (v/v), y posteriormente con agua desionizada. Los frutos se secaron a temperatura ambiente (28 ± 2 °C) en bandejas con papel absorbente. Con ayuda de una aguja de disección se realizó una herida en la cara anterior y posterior de los frutos y se colocaron 10 µL de cada solución de esporas. Se evaluó la incidencia (% de infección) y la severidad de la infección, cuyo índice se determinó mediante una escala, donde, 1 = 0 %; 2 = 1-25 %; 3 = 26-50%; 4 = 51-75 % y 5 = 76-100% de síntomas de la

enfermedad en la superficie del fruto (Hernández *et al.*, 2018). Los frutos se almacenaron durante 4 días a temperatura ambiente a 27 ± 2 °C. Se utilizaron 90 frutos por cada medio de cultivo dividido en las 2 concentraciones (45 frutos por concentración) y se realizó un análisis de varianza con un método de comparación de medias de Tukey ($P \leq 0.05$) a través del paquete estadístico INFOSTAT (v. 2017).

Los resultados mostraron que en el segundo día de almacenamiento, los porcentajes de infección más altos en el higo se obtuvieron de las cepas provenientes de los medios CZAPEK (31 %) y PDA (24 %) a la concentración 1×10^4 Esp mL⁻¹, aunque no se observaron diferencias estadísticas ($p < 0.05$). En el tercer día, el medio CZAPEK fue estadísticamente diferente al resto de los medios al tener un 62 % de infección. En el cuarto día, los medios CZAPEK, PDA y Malta fueron estadísticamente

similares ($p < 0.05$), al mostrar los porcentajes de infección más altos al final del almacenamiento (64%, 53% y 51%, respectivamente) (Cuadro 2; Figura 1). La cepa proveniente del medio agar V8 fue la que mostró menor porcentaje de infección durante los días de almacenamiento (4%, 13% y 24%, respectivamente).

En los días dos, tres y cuatro de almacenamiento, se observó el mayor porcentaje de infección en las cepas de *A. flavus* a una concentración de 1×10^5 Esp mL⁻¹, proveniente de los medios Dextrosa Sabouraud (27, 47 y 51%, respectivamente), CZAPEK (20, 42 y 51%, respectivamente) y PDA (13, 38 y 47%, respectivamente), es importante mencionar que se observó similitud estadística ($p < 0.05$), en los medios mencionados. Una vez más el medio agar V8 fue estadísticamente diferente ($p < 0.05$) al resto de los medios evaluados, al inducir la menor incidencia durante el almacenamiento (4, 4 y 36%, respectivamente) (Cuadro 3). En los resultados de severidad, se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre los medios evaluados. En los días de almacenamiento dos y tres, la cepa de *A. flavus* a una concentración de 1×10^4 Esp mL⁻¹ del medio CZAPEK presentó mayor índice de severidad (1.5 y 2, respectivamente), seguida de la cepa del medio PDA (1.4 y 1.9, respectivamente) (Cuadro 4), ambos medios fueron estadísticamente similares. En el día cuatro de almacenamiento, la cepa del medio PDA fue la que

Cuadro 2. Efecto de la incubación en diferentes medios nutritivos y la concentración de 1×10^4 Esp mL⁻¹ en la incidencia de *A. flavus* en frutos de higo almacenados durante 4 días a 20 ± 2 °C.

Medio nutritivo	Incidencia (%)			
	Días de almacenamiento			
	1	2	3	4
PDA	0	24 ^{cd}	40 ^b	53 ^{bc}
Agar de Malta	0	16 ^{bc}	40 ^b	51 ^{bc}
Dextrosa Sabouraud	0	9 ^{ab}	27 ^{ab}	44 ^b
CZAPEK	0	31 ^d	62 ^c	64 ^c
V8	0	4 ^a	13 ^a	24 ^a

Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas (Tukey, $p < 0.05$).

mostró la mayor severidad (2.4); sin embargo, fue estadísticamente similar ($p < 0.05$) al resto de los medios, excepto el medio agar V8, el cual mostró menor severidad durante los días dos, tres y cuatro de almacenamiento (1, 1.1 y 1.6, respectivamente). En general no se observaron diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$) en la severidad de los frutos de higo inoculados con la concentración 1×10^5 Esp mL⁻¹ de los medio PDA, Agar de Malta, dextrosa Sabouraud y CZAPEK durante los cuatro días de almacenamiento. El agar V8 fue estadísticamente diferente al resto de los medios, durante los días dos y tres (0.2 y 0.4); sin embargo, en el día cuatro, no se observaron diferencias entre los medio evaluados (Cuadro 5).



Figura 1. Frutos de higo infectados con cepas de *A. flavus* a una concentración de 1×10^4 Esp mL⁻¹ al cuarto día de almacenamiento, provenientes de diferentes medios de cultivo: A) CZAPEK; B) PDA; C) agar de malta; D) dextrosa sabouraud y E) agar V8.

Cuadro 3. Efecto de la incubación en diferentes medios nutritivos y la concentración de 1×10^5 Esp mL⁻¹ en la incidencia de *A. flavus* en frutos de higo almacenados durante 4 días a 20 ± 2 °C.

Medio nutritivo	Incidencia (%)			
	Días de almacenamiento			
	1	2	3	4
PDA	0	13 ^{ab}	38 ^{bc}	47 ^{ab}
Agar de Malta	0	16 ^b	31 ^b	56 ^b
Dextrosa Sabouraud	0	27 ^c	47 ^c	51 ^{ab}
CZAPEK	0	20 ^{bc}	42 ^c	51 ^{ab}
V8	0	4 ^a	4 ^a	36 ^a

Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas (Tukey, $p < 0.05$).

En esta investigación el índice de severidad y el porcentaje de infección en los frutos, no se afectaron por la concentración de la solución de esporas de *A. flavus*, sino por el medio nutritivo utilizado. Las concentraciones de *A. flavus* (1×10^4 y 1×10^5 Esp mL⁻¹) proveniente del medio de cultivo CZAPEK, mostraron mayor incidencia sobre los frutos de higo durante todo el almacenamiento. Barajas-Ontiveros *et al.* (2009) reportan, que los medios de cultivo influyen en el crecimiento y en la germinación de esporas. Las esporas fúngicas contienen reservas de nutrientes que soportan el

crecimiento por un periodo determinado; sin embargo, esta composición se puede modificar por el medio donde se desarrolle y así afectar su proceso de germinación (Hassouni *et al.*, 2007). La cepa del medio CZAPEK mostró alta incidencia, seguido del medio PDA sobre los frutos inoculados con las concentraciones 1×10^4 Esp mL⁻¹ (64 y 53 %, respectivamente) y 1×10^5 Esp mL⁻¹ (51 y 47 %, respectivamente).

Varios autores (Liofilchem, 2015; Cota-Arriola *et al.*, 2017) han reportado que el medio CZAPEK favorece el desarrollo de este patógeno, incluso Luna *et al.* (2010) afirmaron que en las cepas de *Aspergillus* desarrolladas en este medio, se observaron diferencias macroscópicas (micelio blanco con pigmento amarillo difundido en el medio) al compararla con medio PDA (micelio blanco), lo cual podría garantizar su capacidad de infección en el fruto. Los resultados de la presente investigación concuerdan con lo reportado por Cota-Arriola *et al.* (2017) y Hassouni *et al.* (2007), los cuales mostraron que hongos del género *Aspergillus* desarrollados en medio CZAPEK tuvieron una mayor germinación de esporas (6.5 esporas h⁻¹) comparado con los desarrollados en Papa dextrosa y azúcar de bagazo de caña (5.6 esporas h⁻¹). La germinación

Cuadro 4. Efecto de la incubación en diferentes medios nutritivos y la concentración de 1×10^4 Esp mL⁻¹ en la severidad de *A. flavus* en frutos de higo almacenados durante 4 días a 20 ± 2 °C.

Medio nutritivo	Índice de severidad			
	Días de almacenamiento			
	1	2	3	4
PDA	1 ± 0.0	1.4 ± 0.8 ^{bc}	1.9 ± 1.2 ^{bc}	2.4 ± 1.5 ^b
Agar de Malta	1 ± 0.0	1.2 ± 0.6 ^{ab}	1.6 ± 0.9 ^{ab}	2.1 ± 1.3 ^{ab}
Dextrosa Sabouraud	1 ± 0.0	1.0 ± 0.2 ^{ab}	1.4 ± 0.7 ^{ab}	2.1 ± 1.4 ^{ab}
CZAPEK	1 ± 0.0	1.5 ± 0.8 ^c	2.0 ± 0.9 ^c	2.3 ± 1.1 ^{ab}
V8	1 ± 0.0	1.0 ± 0.2 ^a	1.1 ± 0.4 ^a	1.6 ± 1.3 ^a

Escala de severidad: 1= 0%, 2= 1-25%, 3= 26-50%, 4= 51-75%, 5= 76-100% de infección en los frutos de higo.

Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas (Tukey, $p < 0.05$).

Cuadro 5. Efecto de la incubación en diferentes medios nutritivos y la concentración de 1×10^5 Esp mL⁻¹ en la severidad de *A. flavus* en frutos de higo almacenados durante 4 días a 20 ± 2 °C.

Medio nutritivo	Índice de severidad Días de almacenamiento			
	1	2	3	4
PDA	1 ± 0.0	1.1 ± 0.4 ^{ab}	1.6 ± 0.9 ^b	2.0 ± 1.2 ^a
Agar de Malta	1 ± 0.0	1.2 ± 0.5 ^{ab}	1.5 ± 1.0 ^b	2.4 ± 1.4 ^a
Dextrosa Sabouraud	1 ± 0.0	1.4 ± 0.7 ^b	1.7 ± 0.8 ^b	1.9 ± 0.9 ^a
CZAPEK	1 ± 0.0	1.2 ± 0.4 ^{ab}	1.6 ± 0.8 ^b	1.9 ± 0.9 ^a
V8	1 ± 0.0	1.0 ± 0.2 ^a	1.0 ± 0.4 ^a	1.9 ± 1.3 ^a

Escala de severidad: 1= 0%, 2= 1-25%, 3= 26-50%, 4= 51-75%, 5= 76-100% de infección en los frutos de higo.

Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas (Tukey, $p < 0.05$).

de esporas es de vital importancia en la patogenicidad del hongo debido a que es la primera etapa del crecimiento y es indicativo para la adaptación en el fruto (Cota-Arriola *et al.*, 2017). El medio Agar V8, se ha utilizado cuando los medios tradicionales no desarrollan esporas en los hongos (Mogollón y Castaño, 2012). González-Peña (2014) reportó que la biomasa producida por el hongo *Phytophthora nicotianae* fue mayor en el medio V8, favoreciendo el crecimiento y la esporulación. Contrario a esto, en la presente investigación, el medio Agar V8 fue el que mostró el menor porcentaje de infección al compararlo con el resto de los medios evaluados. Esto concuerda con lo reportado McAlpin y Donald (2005), quienes reportaron que este medio produjo una baja cantidad de estromas (102) al compararlo con el medio CZAPEK (2672), PDA (2218) y Agar de Malta (657). El medio Agar V8 contiene en su formulación azúcar, carbonato de calcio y NaCl, componentes que podrían estar influyendo en su patogenicidad. Reyes-Ocampo *et al.* (2013), analizaron el metabolismo de *A. niger* en medio sólido y concluyeron que el metabolismo del hongo del género *Aspergillus* se afectó cuando hubo un incremento de glucosa en la formulación, ya que la alta concentración de glucosa en el medio se indica

como un factor de estrés osmótico en el microorganismo, lo que genera un mayor gasto energético y un menor desarrollo, además la presencia de otra fuente de carbono diferente a la glucosa perturba el metabolismo normal cuando se usa conjuntamente con ésta. En general los hongos muestran diversas respuestas metabólicas, patrones de crecimiento y estrategias reproductivas, por lo tanto el estrés osmótico puede reducir su crecimiento al incrementar la tasa de respiración. Tijerina-Ramírez *et al.* (2014) reportan que al utilizar NaCl, KCl y sacarosa en medios sólidos, se redujo el potencial osmótico y esto ocasionó la disminución del crecimiento y desarrollo de hongo *Macrophomina phaseolina*, del mismo modo, se observó que la cepa del hongo desarrollada en el medio que contenía NaCl, redujo significativamente su patogenicidad en frijol. Sin embargo, se ha reportado que el Agar V8 favorece la expresión de enzimas hidrolíticas (González-Peña, 2014), lo que explicaría su similitud estadística con el resto de los medios evaluados en la variable de severidad al término del almacenamiento.

En conclusión, la cepa de *A. flavus* incubada en los medios de cultivo CZAPEK y PDA, independientemente de la concentración utilizada, indujo la mayor patogenicidad en los frutos de higo, lo que

es de interés para futuras investigaciones que evalúen métodos de control efectivos contra la inhibición del crecimiento de *A. flavus*.

LITERATURA CITADA

- Accinelli C, Abbas H, Little N, Kotowicz and Shier T. 2018. Biological control of aflatoxin production in corn using non-aflatoxigenic *Aspergillus flavus* administered as a bio-plastic-based seed coating. *Crop Protection*, 107: 87-92. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2018.02.004>
- Barajas-Ontiveros C, Morales-Romano MD, Pozo-Nuñez EM, Rodríguez-Aguilar ML y Nuñez-López JJ. 2009. Condiciones para el desarrollo de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* para el control biológico de chapulín frijolero. *Tecnociencia Chihuahua*, 1: 33-38. <https://docplayer.es/19708552-Condiciones-para-el-desarrollo-de-beauveria-bassiana-y-metarhizium-anisopliae-para-el-control-biologico-de-chapulín-frijolero.html>
- BD. 2015. BBL Sabouraud Dextrose Agar. <https://www.bd.com/resource.aspx?IDX=22894>. (Consulta, febrero 2019).
- Carvajal M. 2013. Transformación de la aflatoxina B1 de alimentos, en el cancerígeno humano, aducto AFB1-ADN. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 16(2): 109-120. <http://www.scielo.org.mx/pdf/tip/v16n2/v16n2a4.pdf>
- Cota-Arriola O, Plascencia-Jatomea M, Lizardi-Mendoza J, Robles-Sánchez R, Ezquerro- Brauer J, Ruiz-García J, Vega-Acosta J and Cortez-Rocha M. 2017. Preparation of chitosan matrices with ferulic acid: physicochemical characterization and relationship on the growth of *Aspergillus parasiticus*. *CYTA Journal of Food* 15: 65-74. <https://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.1080/19476337.2016.1213317?needAccess=true>
- González-Peña D, Costales D y Falcón-Rodríguez AB. 2014. Efecto de diferentes medios de cultivo sobre el desarrollo de *Phytophthora nicotianae*. *Breda de Haan. Revista de Protección Vegetal*, 29(1): 33-41. <http://scielo.sld.cu/pdf/rpv/v29n1/rpv04114.pdf>
- Hassouni H, Ismaili A, Lamrani K, Gaime I, Augur C and Roussos S. 2007. Comparative spore germination of filamentous fungi on solid state fermentation under different culture conditions. *Micología Aplicada Internacional*, 19: 7-14. <https://www.redalyc.org/pdf/685/68519101.pdf>
- Hernández M, Guillén J, Bautista S y Guillén D. 2018. Evaluación de películas biodegradables en el control de hongos postcosecha de la papaya. *Cultivos Tropicales*, 39: 52-60. <http://scielo.sld.cu/pdf/ctr/v39n1/ctr06118.pdf>
- Irfan P, Vanjakshi V, Keshava M, Ravi, R and Kudachikar V. 2013. Calcium chloride extends the keeping quality of fig fruit (*Ficus carica* L.) during storage and shelf-life. *Postharvest Biology and Technology*, 82: 70-75. <http://dx.doi.org/10.1016/j.postharvbio.2013.02.008>
- Kong M, Lampinen B, Shackel K and Crososto C. 2013. Fruit skin side cracking and ostiole-end splitting shorten postharvest life in fresh figs (*Ficus carica* L.), but are reduced by deficit irrigation. *Postharvest Biology and Technology*, 85: 154-161. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2013.06.004>
- Liofilchem. 2015. Czapec Dox Agar. http://www.liofilchem.net/login/pd/ifu/10017_IFU.pdf (Consulta, febrero 2019).
- Luna M, Lozada Y y Trigos A. 2010. Aislamiento de cepas de *Aspergillus niger* productoras de ocratoxina A, en café verde (*Coffea arabica*) almacenado. *Revista Mexicana de Micología*, 32: 63-68. <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmm/v32/v32a8.pdf>
- McAlpin E and Donald T. 2005. Culture media and sources of nitrogen promoting the formation of stromata and ascocarps in *Petromyces alliceus* (*Aspergillus* section *flavi*). *Canadian Journal of Microbiology*, 51: 765-771. <https://www.nrcresearchpress.com/doi/pdf/10.1139/w05-057>
- Mogollón A y Castaño J. 2012. Evaluación *in vitro* de inductores de resistencia sobre *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. *Revista Facultad Nacional de Agronomía de Medellín*, 65: 6327-6336. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=179924340004>
- Neogen. 2015. Agar papa dextrosa – Potato Dextrose Agar (7149). https://foodsafety.neogen.com/pdf/acumedia_pi/7149_sp_pi.pdf (consulta, febrero 2019).
- Neogen. 2017. Malt agar (7456). https://foodsafety.neogen.com/pdf/acumedia_pi/7456_pi.pdf (consulta, febrero 2019).
- Oliveira A, Valentao P, Pereira J, Silva B, Tavares F and Andrade P. 2009. *Ficus carica* L: Metabolic and biological screening. *Food and Chemical Toxicology*, 47: 2841-2846. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2009.09.004>
- Ramos-García M, Bosquez-Molina E, Hernández-Romano J, Zavala-Padilla G, Terrés-Rojas E, Alia-Tejagal I, Barrera-Necha L, Hernández-López M and Bautista-Baños S. 2012. Use of chitosan-based edible coatings in combination with other natural compounds, to control *Rhizopus stolonifer* and *Escherichia coli* DH5a in fresh tomatoes. *Crop Protection* 38: 1-6. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2012.02.016>
- Reyes-Ocampo I, González-Brambila M y López- Isunza F. 2013. Un análisis del metabolismo de *Aspergillus niger* creciendo sobre un sustrato sólido. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 12: 41-56. <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmiq/v12n1/v12n1a5.pdf>
- Souza M, Jemni M, Otón M, Leonel S, Melgarejo P y Artés F. 2013. Caracterización morfológica, química y sensorial de cuatro variedades de brevas. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*, 14:48-52. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=81327871009>
- Tijerina-Ramírez N, Lira-Méndez K, Moreno-Medina V, González-Prieto J y Mayek-Pérez N. 2014. Efecto de estrés osmótico *in vitro* en el crecimiento, patogenicidad y producción de osmolitos en *Macrophomina phaseolina*. *Revista Mexicana de Micología* 39, 31-39. <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmm/v39/v39a5.pdf>

Fungicidas sitio-específicos combinados con Mancozeb para el control de la roya asiática de la soya

Site-specific fungicides combined with Mancozeb for the control of asian soybean rust

Guillermo Andrés Enciso-Maldonado*, Marco Maidana-Ojeda, José Arturo Schlickmann-Tank, Departamento de Protección Vegetal, Centro de Desarrollo e Innovación Tecnológica de Itapúa, Km 38 ruta 6 “Dr. Juan León Mallorquín”, Hohenau, Departamento de Itapúa, CP 6290, Paraguay; César Omar Montoya-García, Departamento de Edafología, Colegio de Posgraduados, Km 36.5 Carretera México-Texcoco, Montecillo, Texcoco, Estado de México, CP 56230, México; Héctor Jhon Páez-Ranoni, Francisco Fernández-Riquelme, Jorge Andrés Domínguez-Sanabria, Departamento de Investigación y Desarrollo, Centro Tecnológico Agropecuario del Paraguay, Km 281 ruta 7 “Dr. José Gaspar Rodríguez de Francia” Yguazú, Departamento de Alto Paraná, CP 7510, Paraguay. *Autor para correspondencia: gui77enciso@hotmail.com

Recibido: 20 de Marzo, 2019.

Aceptado: 09 de Mayo, 2019.

Enciso-Maldonado GA, Maidana-Ojeda M, Schlickmann-Tank JA, Montoya-García CO, Páez-Ranoni HJ, Fernández-Riquelme F y Domínguez-Sanabria JA. 2019. Fungicidas sitio-específicos combinados con Mancozeb para el control de la roya asiática de la soya. *Revista Mexicana de Fitopatología* 37 (No. Esp. 1) 15-21.

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1903-3

Resumen. La roya asiática de la soya causada por *Phakopsora pachyrhizi* reduce el rendimiento del cultivo hasta 90%. Se ha observado pérdida de eficacia de control con fungicidas sitio-específicos, se ha propuesto combinarlos con mancozeb como estrategia antirresistencia. El objetivo fue evaluar estos fungicidas en dos fechas de siembra. El estudio se realizó en condiciones de campo en Yguazú, Paraguay, con ocho tratamientos: sin aplicación (T_1), prothioconazole y trifloxistrobin (T_2),

mancozeb (T_3), azoxistrobin y bezonvindiflupyr (T_4), fluxapyroxad, epoxiconazole y pyraclostrobin (T_5), $T_2 + T_3$ (T_6), $T_4 + T_3$ (T_7), y $T_5 + T_3$ (T_8) y dos siembras (20 de septiembre y 20 de noviembre de 2017), en un diseño de bloques completos al azar con tres repeticiones. El rendimiento no se modificó por la aplicación de los tratamientos. Se observó diferencia significativa por la fecha de siembra en la severidad y peso de mil semillas (PMS). El T_6 presentó menor severidad y el T_5 mayor PMS en la primera fecha de siembra. Los fungicidas sitio-específicos más mancozeb presentaron mayor porcentaje de eficacia de control de la enfermedad. La combinación de mancozeb con mezclas de fungicidas sitio-específicos es efectiva para el control de la roya asiática de la soya.

Palabras claves: *Phakopsora pachyrhizi*, *Glycine max*, multisitio, biotrófico, resistencia.

Abstract. Asian soybean rust caused by *Phakopsora pachyrhizi* reduces crop yield up to 90%. It has been observed loss of control efficacy with site-specific fungicides, it has been proposed to combine them with mancozeb as anti-resistance strategy. The objective was to evaluate these fungicides on two sowing dates. The study was conducted under field conditions in Yguazú, Paraguay, with eight treatments: no application (T₁), prothioconazole and trifloxystrobin (T₂), mancozeb (T₃), azoxystrobin and bezonvindiflupyr (T₄), fluxapyroxad, epoxiconazole and pyraclostrobin (T₅), T₂ + T₃ (T₆), T₄ + T₃ (T₇), and T₅ + T₃ (T₈) and two late sowings (September 20 and November 20, 2017), in a randomized complete block design with three repetitions. The yield was not modified by the application of the treatments. Significant difference was observed by the sowing date in the severity and weight of one thousand seeds (PMS). T₆ showed lower severity and T₅ higher PMS on the first planting date. Site-specific fungicides plus mancozeb had a higher percentage of disease control efficacy. The combination of mancozeb with mixtures of site-specific fungicides is effective for the control of asian soybean rust.

Key words: *Phakopsora pachyrhizi*, *Glycine max*, multisite, biotrophic, resistance.

La roya asiática de la soya (RAS) causada por el hongo *Phakopsora pachyrhizi*, es una de las enfermedades más severas que ataca al cultivo de soya (*Glycine max*), con daños que varían entre el 10% al 90% (Yorinori *et al.*, 2005; Hartman *et al.*, 2015). La primera epidemia severa de RAS en Sudamérica fue reportada en Paraguay, durante el verano 2000/2001 en el distrito de Pirapó (Itapúa), de donde se propagó a los demás Departamentos del Paraguay en donde se cultiva soya (Morel,

2003). Posteriormente, la enfermedad fue reportada en Brasil durante la temporada de producción 2001/2002 al norte de Mato Grosso do Sul y en Rio Grande do Sul (Yorinori *et al.*, 2005).

En Paraguay, el control químico es el método más utilizado para el manejo de esta enfermedad, ya que las aplicaciones tempranas reducen la carga de esporas en las hojas inferiores protegiendo las medias y superiores. En siembras de septiembre/octubre, el número de aplicaciones es de 2 a 3 por ciclo, con 20 días de residualidad. En octubre/noviembre, la presión de inóculo aumenta, provocando la disminución de la eficacia de control, por lo que se realizan, en promedio 3 a 4 aplicaciones de fungicidas con 15 a 18 días de residualidad. En siembras de diciembre/enero, la presión de inóculo es muy alta, provocando una menor residualidad de los fungicidas, de unos 10 a 12 días, por lo que se deben realizar entre 5 a 6 aplicaciones, por ciclo de cultivo (Mesa de la Roya, 2018).

El Comité de Acción de Resistencia a Fungicidas (FRAC, 2012), señala que los principales grupos fungicidas utilizados para el control de RAS son los inhibidores de la síntesis de esteroides (DMI), los inhibidores de la quinona (QoI), y los inhibidores de la enzima succinato deshidrogenasa (SDHI). Los fungicidas DMI y QoI actúan solo en un sitio específico de reacciones bioquímicas en la célula fúngica. Por lo tanto, son vulnerables a la selección de cepas fúngicas para reducir la sensibilidad. Además, FRAC (2012), clasifica a los DMI y QoI como fungicidas de alto riesgo para el desarrollo de resistencia y, por esta razón, no recomiendan su uso de forma aislada.

Las poblaciones de *P. pachyrhizi* han perdido sensibilidad a ciertas estrobilurinas y triazoles, observándose una baja eficacia de control de la enfermedad en parcelas de producción (Reis *et al.*, 2014). La dificultad para controlar la RAS con fungicidas es cada vez más evidente, lo que demuestra

la alta adaptabilidad del hongo (Reis *et al.*, 2014; Godoy y Palaver, 2011). Como ejemplo, la eficacia del tebuconazole (DMI) se ha reducido gradualmente de 90% a 24% en diez temporadas (Godoy *et al.*, 2013). No obstante, Godoy *et al.* (2015) y Silva *et al.* (2015), reportan que el mancozeb mezclado con fungicidas sitio-específicos permite aumentar la eficiencia de control de la RAS y reducir el riesgo de resistencia por parte del patógeno.

En Paraguay existe poca información documentada sobre el efecto de la aplicación de fungicidas sitio-específicos y multisitio para el control de la roya asiática de la soya, la mayoría de las recomendaciones se obtienen a partir de las investigaciones realizadas en Brasil. El objetivo fue evaluar el efecto de la aplicación de fungicidas sitio-específicos (DMI, SDHI y QoI) y en combinación con mancozeb, sobre la severidad de RAS y la productividad de soya en dos épocas de producción.

El experimento se llevó a cabo en el campo experimental de la Fundación Nikkei – CETAPAR, Yguazú, Alto Paraná, Paraguay. En la Figura 1 se presentan los datos de las precipitaciones, temperaturas máximas, mínimas y medias diarias durante el desarrollo del cultivo de soya en los meses de septiembre de 2017 a abril de 2018

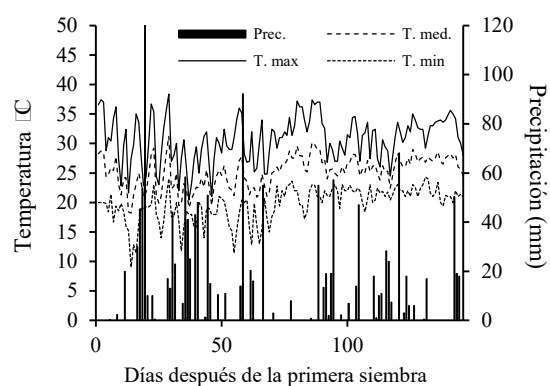


Figura 1. Condiciones meteorológicas registradas durante el periodo experimental.

provenientes de la estación meteorológica del Centro Tecnológico Agropecuario del Paraguay, Yguazú. Se registró una temperatura media de 24.9 °C, humedad relativa media de 68.7% y precipitación total de 830 mm, con mayor presencia de lluvias en noviembre, diciembre y enero con 189.2, 237.2 y 230 mm, respectivamente.

El material vegetal utilizado fue la variedad A5909 RR. Se evaluaron ocho tratamientos (Cuadro 1) y dos fechas de siembra (20 de septiembre y 20 de noviembre de 2017), en un diseño de bloques completos al azar con tres repeticiones, teniendo en total 48 unidades experimentales. Para ambas épocas de siembra, las aplicaciones se realizaron una vez confirmada la presencia del hongo en las parcelas. En la primera siembra se aplicaron los tratamientos a los 79, 100 y 119 días después de la siembra (dds), y en la segunda siembra a los 46, 59 y 77 dds. La unidad experimental estuvo conformada por una parcela de 5 m de largo por 2.25 m de ancho con 5 hileras distanciadas a 0.45 m (densidad 300000 plantas ha⁻¹). El espacio entre unidades experimentales fue de 0.5 m y entre bloques de 3 m.

Los tratamientos fueron aplicados con una pulverizadora manual con erogación de 100 L ha⁻¹ a presión constante (30 bar), accionada mediante

Cuadro 1. Dosis e ingrediente activo de los tratamientos estudiados.

Tratamiento	Ingrediente activo	Dosis ha ⁻¹
T ₁	SA	-
T ₂	Pr y Tr	400 cc
T ₃	M	1200 g
T ₄	Az y B	250 g
T ₅	Fl, Ep y Py	800 cc
T ₆	(Pr y T) + M	400 cc + 1200 g
T ₇	(Az y B) + M	250 g + 1200 g
T ₈	(Fl+Ep+Py) + M	800 cc + 1200 g

SA: sin aplicación, Pr: protriocanazole, Tr: trifloxistrobin, Az: azoxistrobin, B: benzovindiflupyr, Fl: fluxapyroxad, Ep: epoxiconazole, Py: pyraclostrobin, M: mancozeb.

tubo de gas carbónico (CO₂) a una velocidad de 5.04 km h⁻¹. Las aspersiones iniciaron cuando las plantas mostraron, en promedio, 0.14% de severidad en la primera época y 0.69% en la segunda época. La severidad se evaluó a los 5 días después de la aplicación (DDA) de cada tratamiento. En todas las fechas fueron colectadas 20 hojas al azar, en forma de zig zag, correspondiente al estrato medio en cada parcela. La severidad de la enfermedad fue cuantificada en el laboratorio con la ayuda de un estereoscopio y comparada con la escala diagramática de RAS propuesta por Godoy *et al.* (2006), la cual presenta seis niveles de severidad, los cuales son: 1=0.6%, 2=2%; 3=7%; 4=18%; 5=42%; 6=78.5%. A partir de la severidad se calcularon los porcentajes de eficacia de control (EC) con la siguiente fórmula: $EC = ((\text{Infección}_{\text{testigo}} - \text{Infección}_{\text{Tratamiento}}) / \text{Infección}_{\text{testigo}}) * 100$. Se determinó el rendimiento (kg ha⁻¹) y el peso de mil semillas (g), la humedad del grano fue corregida al 13%.

Se llevó a cabo análisis de varianza (ANOVA de dos vías ($\alpha=0.05$)) de las variables respuesta y pruebas de comparación de medias por LSD Fisher ($\alpha=0,05$), empleando el paquete estadístico de SAS 9.0.

El análisis de varianza de los datos con base al diseño experimental planteado, indicó diferencias significativas para la fecha de siembra, así como para los tratamientos en las variables de peso de mil semillas y severidad, no así para la interacción fecha de siembra tratamiento (Cuadro 2).

La RAS se manifestó a los 78 y 45 dds en la primera y segunda fecha de siembra, respectivamente, las condiciones ambientales fueron favorables para el desarrollo de la enfermedad, lo que permitió el incremento de la severidad y una mayor presión de inóculo (Figura 1 y 2). La severidad de RAS fue mayor en la segunda fecha de siembra con 58.7 % de severidad en comparación con la primera con 11.1 % (Cuadros 3 y 4).

Cuadro 2. Influencia del rendimiento, peso de mil semillas (PMS) y severidad de RAS en función de los tratamientos estudiados en las fechas de siembra.

Parámetros	Significación estadística		
	Tratamientos	Fecha de siembra	Interacción
Rendimiento	ns	*	ns
PMS	*	*	ns
Severidad	*	*	ns

Un asterisco indica significancia en * $p < 0.05$; ns: no significativo.

La infección de la RAS puede ocurrir en un rango de temperatura de 15 a 30 °C (Caldwell *et al.* 2005) y el mayor número de lesiones/cm² a temperaturas entre 21 a 24 °C con al menos un periodo de seis horas de mojado de la hoja (Nunkumar *et al.*, 2013). La mayor presencia de roya ha sido observada en áreas con temperaturas medias diarias menores a 28 °C, y periodos largos de mojado foliar ocurriendo durante la zafra (Sinclair y Backman 1989). Godoy *et al.* (2016), mencionan que en Brasil, la RAS es detectada en el mes de noviembre y a partir de entonces se incrementa en forma exponencial, obteniéndose una mayor presión de inóculo a medida que las siembras se retrasan. Maidana-Ojeda *et al.* (2019) observaron las primeras uredosporas del patógeno en el ambiente en la primera semana de noviembre en Paraguay.

Los tratamientos con aplicación de fungicidas redujeron el nivel de severidad del hongo con relación al testigo. La aplicación de mancozeb (T₈) de forma aislada dio como resultado la menor eficacia de control en ambas fechas de siembra, con 42.6 y 16.8 %, respectivamente, mientras que la mezcla de fungicidas sitio-específicos más mancozeb obtuvieron el 60 y 30 % más en la primera y segunda fecha de siembra (Cuadro 3 y 4).

Cerezolli *et al.* (2018), obtuvieron un porcentaje de severidad de 3 % con tres aplicaciones de

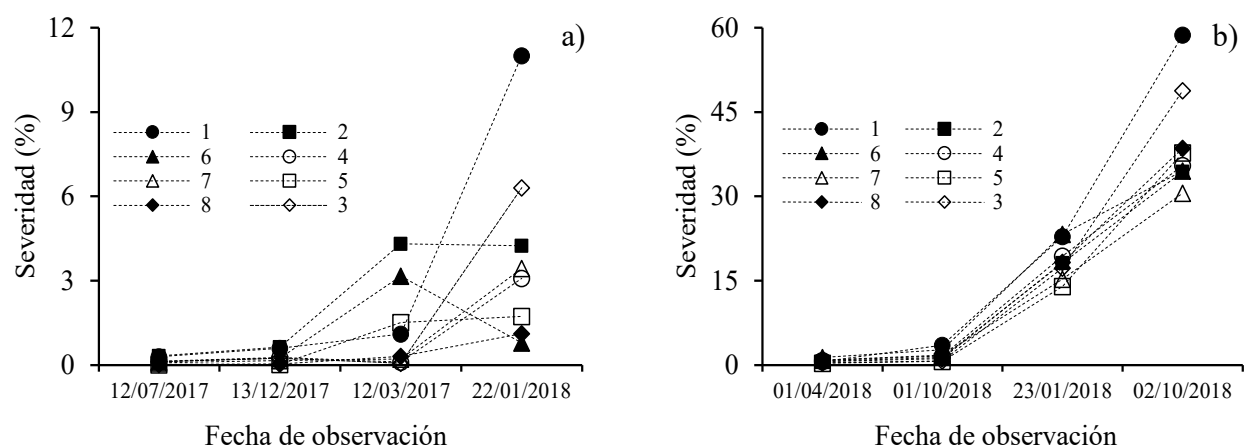


Figura 2. Desarrollo de la enfermedad en función de los tratamientos estudiados en la primera (a) y segunda (b) fecha de siembra en Yguazú, Paraguay.

mancozeb en todo el ciclo de cultivo, mientras que Godoy *et al.* (2018) encontraron valores similares a los reportados en este trabajo. La eficacia de control de un fungicida depende de varios factores como el tipo de fungicida y dosis, el momento de aplicación, la presión del inóculo, la forma de aplicación y las condiciones ambientales (Fleitas, 2015).

Se observó un incremento en la productividad en función de las mezclas de fungicidas, con incrementos entre 25 a 40 %, y 4 a 32 % en la primera y

segunda fecha de siembra. El peso de mil semillas varió de 154 a 183 y 112 a 129 g en la primera y segunda fecha de siembra, el peso de cada tratamiento fue mayor al testigo en ambas épocas de producción, sin mostrar diferencias significativas. El rendimiento obtenido en la primera fecha de siembra (4211 kg ha⁻¹) es superior a la media nacional de 2794 kg ha⁻¹ (CAPECO, 2018). Se ha reportado que al aplicar mancozeb el rendimiento de soya se incrementa con respecto a fungicidas sitio-

Cuadro 3. Rendimiento de granos, incremento del rendimiento en relación al testigo, peso de mil semillas (PMS), severidad y eficiencia de control (EC) de RAS en función de los tratamientos estudiados en la primera fecha de siembra.

Tratamiento	Rendimiento (kg ha ⁻¹)	Incremento (%)	PMS (g)	Severidad (%)	EC (%)
T ₁	3339 a	0	154.4 d	10.9 d	0.00
T ₂	4178 a	25	164.0 bcd	4.2 cd	61.5
T ₃	4444 a	38	161.0 cd	6.3 cd	92.8
T ₄	4299 a	29	177.4 ab	3.0 cd	72.0
T ₅	4021 a	40	183.3 a	1.7 b	68.7
T ₆	4614 a	20	168.8 bc	0.8 a	84.3
T ₇	4678 a	23	176.2 ab	3.4 cd	89.8
T ₈	4120 a	33	177.7 ab	1.1 b	42.6
DMSH	1649		13.9	3.2	
CV	22.6		4.7	47.6	

*Medias con misma letra en cada columna para cada tratamiento son estadísticamente similares (LSD, $\alpha=0,05$).

Cuadro 4. Rendimiento de granos, incremento del rendimiento en relación al testigo, peso de mil semillas (PMS), severidad y eficiencia de control (EC) de RAS en función de los tratamientos estudiados en la segunda fecha de siembra.

Tratamiento	Rendimiento (kg ha ⁻¹)	Incremento (%)	PMS (g)	Severidad (%)	EC (%)
T ₁	1406 a	0	112.8 a	58.7 c	0.00
T ₂	1723 a	23	116.9 a	34.4 a	37.9
T ₃	1467 a	1	116.7 a	48.8 b	41.1
T ₄	1630 a	16	129.5 a	35.4 a	39.5
T ₅	1861 a	13	124.9 a	37.7 a	47.9
T ₆	1422 a	32	115.0 a	34.5 a	35.7
T ₇	1594 a	15	119.9 a	30.5 a	34.3
T ₈	1620 a	4	116.3 a	38.5 a	16.8
DMSH	756		17.6	9.6	
CV	27.5		8.5	14.0	

*Medias con misma letra en cada columna para cada tratamiento son estadísticamente similares (LSD, $\alpha=0,05$).

específicos o sin aplicación de fungicida (Cerezolli *et al.*, 2018; Silva *et al.*, 2015). El efecto de la adición de los fungicidas multisitio a fungicidas sitio-específicos sobre la productividad varía en función de la interacción de las moléculas (Alves y Juliatti, 2018).

Con base a los resultados obtenidos se concluye que la adición del mancozeb junto a los fungicidas sitio-específicos disminuye el porcentaje de severidad de RAS en Paraguay, al mismo nivel que la aplicación aislada de los fungicidas sitio-específicos, incrementando el rendimiento de granos de soya, por lo que puede incluirse como una herramienta para el manejo antiresistencia.

LITERATURA CITADA

Alves VM and Juliatti FC. 2018. Fungicidas no manejo da ferrugem da soya, processos fisiológicos e produtividade da cultura. *Summa Phytopathologica*, 44 (3): 245-251. <http://www.scielo.br/pdf/sp/v44n3/0100-5405-sp-44-3-0245.pdf>
Backman PA and Sinclair JB. 1989. Compendium of soybean diseases. The American Phytopathological Society.
Caldwell PM, Nunkumar A, Pretorius ZA and Fernandes JMC. 2005. Development of *Phakopsora pachyrhizi* at different

temperatures, relative humidities and leaf wetness duration. In: International workshop on plant disease epidemiology, 9, Landerneau, Proceedings. Bordeaux: Société Française de Phytopathologie.

CAPECO (Cámara Paraguaya de Exportadores y Comercializadores de Cereales y Oleaginosas). 2018. Consultado el 21 de junio de 2018. Disponible en <http://capeco.org.py/area-de-siembra-produccion-y-rendimiento/>
Cerezolli L, Lajús C, Cericato A, and Sordi, A. 2018. Eficiência de fungicidas multisítios utilizados na cultura da soja visando o controle da ferrugem asiática. *Anuário Pesquisa E Extensão Unoesc São Miguel Do Oeste*, 3, e17419. <https://portalperiodicos.unoesc.edu.br/apeusmo/article/view/17419>
Fleitas MC, Gerard GS y Simón MR. 2015. Eficacia residual de fungicidas sobre la roya de la hoja del trigo y su efecto sobre componentes del rendimiento y porcentaje de proteínas en grano. *Fave. Sección Ciencias Agrarias*, 14(2). <https://doi.org/10.14409/fa.v14i2.5721>
FRAC (Fungicide Resistance Action Committee). 2012. Global Crop Protection Organization. Brussels. www.gcpt.org/frac
Godoy VC, Koga LJ and Canteri MG. 2006. Diagrammatic scale for assessment of soybean rust severity. *Fitopatologia Brasileira* 31:63-68. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-41582006000100011>
Godoy CV and Palaver L. 2011. Ensaio cooperativo para avaliação da eficiência de fungicida no controle da ferrugem da soja, em Londrina, PR, na safra 2010/11. In: Reunión de pesquisa de soja da região central do Brasil. 32. São Pedro. Resumos. São Pedro.
Godoy CV, Utiamada CM, Meyer MC, Campos HD, Roese AD, Forcelini, CA, Pimenta CB, Jaccoud-Filho DS, Borges EP, Siqueri FV, Juliatti FC, Feska HR, Grigolli JFJ, Nunes-Junior J, Carneiro LC, Silva LHCP da, Sato LN,

- Canteri MG, Madalosso M, Ito MF, Martins MC, Balardin RS, Furlan SH, Motecelli TDN, Carlin VJ, Barros VLNP de and Venancio WS. 2013. Eficiência de fungicidas para o controle da ferrugem-asiática da soja, *Phakopsora pachyrhizi*, na safra 2012/13: resultados sumarizados dos ensaios cooperativos. Embrapa Soja. Circular Técnica, 99. 7 p. <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/966125/1/CT99online.pdf>
- Godoy CV, Utiamada CM, Meyer MC, Campos HD, Forcelini, CA, Pimenta CB, Cassetari-Neto D, Jaccoud-Filho DS, Borges EP, Andrade-Junior ER, Siqueri FV, Juliatti FC, Nunes-Junior J, Silva LHCP da, Sato LN, Madalosso M, Martins MC, Balardin RS, Furlan SH, Carlin VJ and Venancio WS. 2015. Eficiência de fungicidas multissítios e fertilizantes no controle da ferrugem-asiática da soja, *Phakopsora pachyrhizi*, na safra 2014/15: resultados sumarizados dos ensaios cooperativos. Embrapa Soja. Circular Técnica, 113. 7p. <https://www.embrapa.br/>
- Godoy CV, Seixas CDS, Soares RM, Marcelino-Guimarães FC, Meyer MC and Costamilan LM. 2016. Asian soybean rust in Brazil: past, present, and future. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 51(5): 407-421. <https://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2016000500002>
- Godoy CV, Utiamada CM, Meyer MC, Campos HD, Lopes I de ON, Dias AR, Deuner CC, Pimenta CB, Borges EP, Siqueri FV, Juliatti FC, Favero F, Araújo-Júnior IP, Grigolli JF, Nunes-Junior J, Carregal LH, Sato LN, Debortoli MP, Martins MC, Balardin RS, Madalosso M, Carlin VJ and Venancio WS. 2018. Eficiência de fungicidas multissítios no controle da ferrugem-asiática da soja, *Phakopsora pachyrhizi*, na safra 2017/18: resultados sumarizados dos ensaios cooperativos. Embrapa Soja. Circular técnica, 144. 17 p. <https://www.embrapa.br/>
- Hartman GL, Sikora EJ and Rupe JC. 2005. Rust. In: Hartman GL, Rupe JC, Sikora EJ, Domier, LL, Davis JA, Steffey KL. (Ed.). *Compendium of soybean diseases and pests*. 5. ed. Saint Paul: APS Press. p. 56-59. <https://my.apsnet.org/ItemDetail?iProductCode=44730>
- Yorinori JT, Paiva WM, Frederick RD, Costamilan LM, Bertagnolli PF, Hartman GE, Godoy CV and Nunes-Junior J. 2005. Epidemics of soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*) in Brazil and Paraguay from 2001 to 2003. *Plant Disease* 89:675-677. <https://apsjournals.apsnet.org/doi/pdf/10.1094/PD-89-0675>
- Maidana-Ojeda M, Enciso-Maldonado G, Hauptenthal D, Kitner J, Schlickmann J. 2019. Relación entre la densidad de uredosporas y la severidad de la roya asiática en Itapúa, Paraguay. In: Altamirano-Cárdenas JR, Martínez-Solís J. and N Magaña-Lira. 2019. Memoria del VII Congreso Internacional y XXI Congreso Nacional de Ciencias Agronómicas. 23 al 26 de abril de 2019. Chapingo, Estado de México. México.
- Mesa de la Roya. 2018. Impacto Socioeconómico de la Roya Asiática en la Cadena de la Soja en Paraguay. Consultado el 18 de junio de 2018.
- Morel W. 2003. Current status of Soybean Rust in Paraguay. Primer Workshop Panamericano de la Roya de la Soja. BASF. Misiones, Argentina.
- Nunkumar A, Caldwell PM, and Pretorius ZA. 2013. Development of *Phakopsora pachyrhizi* on soybean at controlled temperature, relative humidity and moisture periods. *South African Journal of Plant and Soil*, 26(4): 225-230. <https://doi.org/10.1080/02571862.2009.10639959>
- Reis EM, Deuner E and Zanatta M. 2014. In vivo sensitivity of *Phakopsora pachyrhizi* to DMI and QoI fungicides. *Summa Phytopathologica*, 41(1), 21-24. <https://dx.doi.org/10.1590/0100-5405/1975>
- Silva LHCP, Campos HD, Silva JRC and Reis EM. 2015. Controle da ferrugem asiática da soja com mancozebe um fungicida multissítio. *Summa Phytopathologica*, 41 (1), 64-67. http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-54052015000100064&script=sci_arttext

Efecto de los diferentes medios de cultivo en la producción de biomasa y ergosterol en *Rhizopus stolonifer*

Effect of different the culture media in the production of biomass and ergosterol in *Rhizopus stolonifer*

Mónica Hernández-López*, **Silvia Bautista-Baños**, Instituto Politécnico Nacional. Centro de Desarrollo de Productos Bióticos. Carretera Yautepec-Jojutla, Km 6, calle CEPROBI, No. 8, San Isidro, Yautepec, Morelos, CP 62731, México; **Rosa Isela Ventura-Aguilar**, CONACYT-Instituto Politécnico Nacional. Centro de Desarrollo de Productos Bióticos. Carretera Yautepec-Jojutla, Km 6, calle CEPROBI, No. 8, San Isidro, Yautepec, Morelos, CP 62731, México; **Ana Guadalupe Abarca-Franco**, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Avenida Universidad No. 1001, Colonia Chamilpa, Cuernavaca, Morelos, CP 62209, México. *Autor para correspondencia: mohernandezl@ipn.mx.

Recibido: 22 de Marzo, 2019.

Aceptado: 02 de Agosto, 2019.

Hernández-López M, Bautista-Baños S, Ventura-Aguilar RI y Abarca-Franco AG. 2019. Efecto de los diferentes medios de cultivo en la producción de biomasa y ergosterol en *Rhizopus stolonifer*. Revista Mexicana de Fitopatología 37 (No. Esp. 1) 22-28.

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1903-4

Resumen. La utilidad de medios de cultivos sintéticos, es proporcionar una mezcla de nutrientes requeridos por los microorganismos que optimicen su crecimiento. *Rhizopus stolonifer*, es causante de la enfermedad llamada pudrición blanda. Se evaluó *in vitro* la producción de biomasa (mg) y ergosterol (%) de dos aislados de *R. stolonifer* de fresa (*Fragaria x ananassa*) y jitomate (*Solanum lycopersicum*) incubados en seis medios de cultivos con diferente composición de C/N, durante 25 días a 28 °C. Previamente, se caracterizaron (contenido de carbohidratos, proteínas y C/N) los medios evaluados. Los datos se analizaron a través de un diseño experimental completamente al azar

y una prueba de comparación de medias de Tukey ($p \leq 0.05$). Los resultados mostraron que los extractos de Malta y Sabouraud (SAB), presentaron de 3 a 50% más carbohidratos que los demás medios de cultivo. El medio SAB presentó de 50 a 100% mayor cantidad de proteínas, mientras que, en la relación C/N el medio mineralizado (MN) fue en el que se cuantificó el mayor valor (100.5). Respecto a la producción de biomasa, con el extracto de jugo V8, ambos aislados de *R. stolonifer* tuvieron la mayor producción (c.a 40 mg). La mayor cuantificación de ergosterol (0.00012%) fue en el medio MN.

Palabras clave: carbono, nitrógeno, C/N, peso seco, *in vitro*

Abstract. The utility of synthetic culture media is to provide a blend of nutrients required by microorganisms to optimize their growth. The disease called soft rot is caused by *Rhizopus stolonifer*. The biomass (mg) and ergosterol (%) production

of two isolates of *R. stolonifer* of strawberry (*Fragaria x ananassa*) and tomato (*Solanum lycopersicum*) incubated in six culture media with different C/N composition was evaluated *in vitro* for 25 days at 28 °C. Previously, the culture media evaluated were characterized (carbohydrate, protein and C / N content). The data were analyzed through a completely randomized experimental design and a Tukey means comparison test ($p \leq 0.05$). The results showed that the extracts of Malta and Sabouraud (SAB) had 3 to 50% more carbohydrates than the other culture media. The SAB medium showed 50 to 100% more proteins, while in the C/N ratio of the mineralized medium (MN) had the highest value (100.5). Regarding biomass production, with the V8 juice extract, both of *R. stolonifer* isolates had the highest production (c.a 40 mg). The highest quantification of ergosterol (0.00012%) was with the MN medium.

Key words: carbon, nitrogen, C/N, dry weight, *in vitro*

Para el crecimiento *in vitro* de los hongos se utilizan diferentes medios de cultivo, los cuales sustituyen parcialmente las propiedades nutricionales del hospedante o sustrato natural del hongo por cultivar. La finalidad del medio es proporcionar energía al microorganismo, para que se desarrolle de manera normal. Además, en la preparación y diseño de un medio de cultivo, se busca proporcionar una mezcla adecuada de nutrientes requeridos por los microorganismos a una concentración que optimice su crecimiento (Merck, 2004). No obstante, el crecimiento y composición de los microorganismos se puede modificar por efecto del medio de cultivo. Para el crecimiento *in vitro* de *Rhizopus stolonifer* se han reportado medios de cultivo sólidos como papa dextrosa agar, agar extracto de levadura,

peptona dextrosa, agar dextrosa Sabouraud y medio mínimo (Lennartsson y Taherzadeh, 2014). También, se reporta el uso de medios líquidos como el caldo papa dextrosa. La composición del medio de cultivo puede influir sobre diferentes aspectos en la fisiología del microorganismo, tales como, nutrición, multiplicación y producción de metabolitos primarios y secundarios (Bernal *et al.*, 2002). Dentro de los indicadores del crecimiento fúngico se considera la biomasa y producción de ergosterol. Este último es el componente mayoritario del hongo y se localiza en la membrana plasmática de la célula (Frey *et al.*, 1994).

Rhizopus stolonifer se considera como uno de los principales hongos fitopatógenos que provoca la enfermedad llamada ‘pudrición blanda’ (Bautista-Baños *et al.*, 2016). Este hongo crece en diversos hospedantes como el jitomate y la fresa, los cuales son productos agrícolas de importancia económica en México. Por ejemplo, se ha reportado que *R. stolonifer* causa pérdidas en poscosecha que ascienden hasta un 80%, las cuales se manifiestan principalmente durante el transporte y la comercialización de los productos agrícolas (Bautista-Baños *et al.*, 2008).

El objetivo de esta investigación fue caracterizar los medios nutritivos y evaluar el contenido de biomasa y ergosterol en dos aislados de *R. stolonifer* durante 25 días de incubación a 28 °C.

Obtención de *Rhizopus stolonifer*. El hongo utilizado fue proporcionado por el cepario del Laboratorio de Tecnología Poscosecha de Productos Agrícolas del CEPROBI y para su reactivación se re-inoculó en frutos de jitomate y fresa (pruebas de patogenicidad), de acuerdo con los postulados de Koch. Posteriormente, el hongo se aisló de cada fruto y se incubó en medio papa dextrosa agar (PDA) (Bioxon[®], Becton Dickinson de México) en cajas Petri

de 10 cm a 20 ± 2 °C durante 5 días. La caracterización molecular indicó que ambas cepas corresponden a *R. stolonifer*. Este análisis molecular se llevó a cabo en el Laboratorio de Diagnóstico Integral Fitosanitario del Colegio de Postgraduados (LADIFIT). Se utilizaron primers universales ITS4 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') e ITS5 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'). Para la amplificación de los genes se empleó un ciclo de 95 °C por 5 minutos, 30 ciclos de 95 °C por 45 segundos, 57 °C por 45 segundos, 72 °C por 1 minuto y una extensión final de 72 °C por 5 minutos (White *et al.*, 1990). Las secuencias de los nucleótidos obtenidos se analizaron con el programa Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) y se compararon con las secuencias reportadas en la base de datos del banco de genes del NCBI (National Center of Biotechnology Information) obteniéndose una homología del 96% y una similitud del 90.1%.

Preparación de la suspensión de esporas. Después del periodo de incubación, se adicionaron 20 mL de agua destilada estéril a la caja Petri, y con una aguja de disección se raspo el micelio con la finalidad de desprender las esporas (globosas, ovales y lisas), mismas que se recuperaron en un matraz Erlenmeyer. La cuantificación de esporas se llevó a cabo en una cámara de Neubauer y se ajustó a una concentración de 10^5 esporas mL^{-1} .

Preparación de los medios de cultivo. Se utilizaron seis diferentes medios de cultivo líquidos: caldo extracto de malta (EM) (Bioxon®, México), caldo dextrosa Sabouraud (EDS) (BD Difco™, USA), medio mineralizado (MN), jugo comercial V8 Splash (JV8) (Campbell's), jugo de jitomate (JJ) y jugo de fresa (JF). Los medios de cultivo se prepararon de manera distinta, de acuerdo con

las especificaciones del proveedor. El medio MN consistió en 10 g de glucosa, 2.5 g de NH_4 -tartrato, 0.015 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.06636 g de CaCl_2 , 16.78 g de FeCl_3 , 100 mL de tiamina, 0.25 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.5 g de KH_2PO_4 y 0.025 g de NaCl en 1000 mL de agua destilada. La mezcla se dejó en agitación en una parrilla de calentamiento Cimarrec (Thermo Scientific, China), hasta ebullición, y después se esterilizó. Los jugos de fresa y jitomate se obtuvieron a partir de frutos sanos, los cuales se lavaron con una solución de hipoclorito de sodio al 3%, durante 1 min y posteriormente con agua destilada. Con un extractor de jugos (EURO LINE modelo-ETW-9800) se obtuvo el producto a utilizar.

Siembra del hongo en los medios nutritivos Se colocaron 4 mL del medio de cultivo y/o jugo, en viales de vidrio de 20 mL, previamente esterilizados. Posteriormente, los viales se inocularon con 80 mL de la solución de esporas (10^5 esporas mL^{-1}) y no se utilizó un control negativo (medios sin inocular). Se emplearon tres repeticiones por cada medio de cultivo. Los viales se colocaron en una incubadora modelo Innova 40 (New Brunswick, USA) con agitación constante a 150 rpm y 28 ± 2 °C. Las evaluaciones se realizaron a los 5, 10, 15, 20 y 25 días, excepto el análisis de composición del medio de cultivo que se determinó al inicio del experimento.

Caracterización de los medios de cultivo

Cuantificación de carbohidratos por DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico). La metodología que se utilizó para la cuantificación de los carbohidratos fue la de Miller (1959). Se pesó 0.1 g de muestra

del medio de cultivo y se depositaron en tubos de ensayo a los cuales se les agregó 10 mL de agua destilada y 1 mL de DNS y la mezcla se homogenizó perfectamente con el uso de un vortex Genie 2 (Scientific Industries, USA). Todos los tubos se sometieron a ebullición durante 5 min, al término de este tiempo se enfriaron en baño de hielo y se les adicionaron 8 mL de agua destilada, se agitaron y se midió la absorbancia en un espectrofotómetro Genesis 10S UV-VIS (Thermo Scientific, USA) a una longitud de onda de $\lambda=575\text{nm}$. La cuantificación de los carbohidratos se reportó en gramos.

Contenido de proteínas. La determinación de proteína se realizó mediante el método de kjedhal (AOAC, 1990). Consistió en pesar 0.5 g de la muestra en un matraz kjeldhal, a la cual se agregó 1 g de mezcla digestora y 5 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) concentrado. Los matraces se colocaron en un digestor hasta la obtención de una coloración verde cristalina, el material digerido se transfirió a un matraz de destilación y se le agregaron 20 mL de agua y 20 mL de hidróxido de sodio; en el extremo del condensador se colocó un matraz Erlenmeyer de 125 mL el cual contenía 15 mL de ácido bórico al 4% y dos gotas de indicador. El extremo del condensador quedó sumergido dentro de la solución valorada de HCL 0.1 N. se siguió el mismo procedimiento para el blanco sin agregar la muestra. Se calculó primeramente el porcentaje (%) de nitrógeno total, y una vez obtenido se procedió a calcular el porcentaje (%) de proteína contenida en la muestra.

Relación carbono/nitrógeno. Se obtuvo la relación carbono/nitrógeno (C/N) mediante la división de estos valores.

Cuantificación de la biomasa. La biomasa fúngica se determinó por diferencia de peso seco, para ello se vertió el contenido total de cada vial de cristal a través de un papel filtro Whatman No.1. Posteriormente, el papel filtro y la muestra se secaron en un horno Binder No. 10-21821 (Alemania) a una temperatura de 90-100 °C, hasta obtener un peso constante. La biomasa fúngica se expresó en gramos de peso seco (Oshoma y Ikenebomeh, 2005).

Contenido de ergosterol. El contenido de ergosterol se determinó de acuerdo con la metodología propuesta por Tian *et al.* (2012). Este método consistió en adicionar 5 mL de una solución alcohólica de hidróxido de potasio al 25% (Sigma-Aldrich, USA) a 1 g de biomasa húmeda. La mezcla se homogenizó durante 5 min y después se incubó en baño maría a 85 °C durante 4 h. Posteriormente, se extrajeron los esteroides de cada muestra adicionando 2 mL de agua destilada y 5 mL de n-heptano (Fermont, México). La mezcla obtenida se agitó por 2 min en un vórtex y se dejó reposar durante 1 h a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo se recuperó la fase cristalina o sin color y se midió su absorbancia a 320 nm en un espectrofotómetro Genesis 10S UV-VIS (Thermo Scientific, USA). La cantidad de ergosterol se calculó como un porcentaje del peso húmedo de las células y se basó en la absorbancia y el peso húmedo del sedimento inicial. Los datos se reportaron como porcentaje de ergosterol.

Análisis estadístico. Los datos se analizaron mediante un ANOVA con un diseño experimental completamente al azar y una prueba de comparación de medias de Tukey ($p\leq 0.05$).

Caracterización de los medios de cultivo.

Contenido de carbohidratos y proteínas. Los medios de cultivo EM y EDS presentaron de 3 a 50% más cantidad de carbohidratos que el resto de los medios de cultivo. Por otra parte, el medio de cultivo EDS presentó de 50 a 100% mayor cantidad de proteínas con respecto al resto de los medios de cultivo, mientras que, en la relación C/N el medio de cultivo MN fue en el que se cuantificó el valor mayor (100.5) (Cuadro 1).

Contenido de biomasa. El contenido de biomasa de *R. stolonifer* se modificó significativamente ($p < 0.05$) por efecto del medio de cultivo con respecto al tiempo (Figura 1 A y B). En general, la biomasa en ambos aislados, se incrementó durante el tiempo de incubación e independientemente del medio de cultivo. Cuando el medio de incubación fue JV8, hubo una mayor producción de biomasa en comparación con el resto de los medios utilizados, obteniéndose de 4 a 5 veces mayor producción en comparación con los medios EM y MN. Los valores al término de la incubación con el JV8 fueron de 28.6 ± 0.4 mg y 36.2 ± 8.40 mg (fresa y jitomate, respectivamente).

Contenido de ergosterol. Los resultados mostraron un contenido sobresaliente de ergosterol de *R. stolonifer* incubado en el medio adicionado con minerales (EM), independientemente si el hongo se aisló del fruto de fresa o jitomate, mientras que, al utilizar los medios nutritivos restantes, se observó en su mayoría un comportamiento opuesto en ambos aislados (Figura 2 A, B).

En relación al contenido de biomasa, Taherzadeh *et al.* (2003) indicaron que la composición del medio de cultivo tuvo un efecto notable en el rendimiento de la biomasa producida por *R. oryzae*. Ellos reportaron valores de 0.18 y 0.43 g de biomasa g^{-1} después de 14 días a 30 °C, teniendo la glucosa como fuente de carbono. Adicionalmente, Millati *et al.* (2005) reportaron que el contenido de biomasa de 3 aislados de *R. oryzae* a partir de glucosa fue diferente, a pesar de haber sido incubadas en el mismo medio de cultivo. Los resultados de biomasa pudieran estar más bien relacionados por la diferencia de la composición nutricional en la que cada hongo se incubó. Al respecto, Cortés *et al.* (2002) indicaron que la relación C/N afectó el crecimiento de *R. nigricans* ya que en ese estudio se obtuvo la mayor producción de biomasa (3.8 mg mL^{-1}) en el medio de cultivo Melin-Norkrans con una relación C/N de 18.9, en comparación con 2.8 mg mL^{-1} de biomasa cuando la relación C/N

Cuadro 1. Contenido inicial de proteínas, carbohidratos y relación C/N de los medios de cultivo y jugos de frutas.

Medios de cultivo	Carbohidratos (g)	Proteínas (g)	C/N
Caldo extracto de malta	85.8	10.9	8.5
Caldo dextrosa Sabouraud	80	20.0	4.0
Medio mineralizado	33.1	0.33	100.5
Jugo comercial V8 Splash	32.0	0.0	-
Jugo de jitomate	3.5	0.8	4.3
Jugo de fresa	7.6	0.6	11.4

C/N= Relación carbono/nitrógeno.

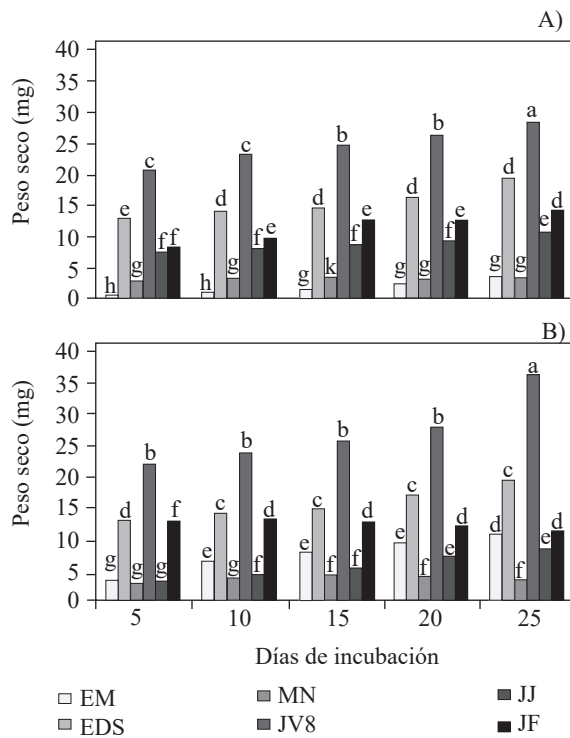


Figura 1. Contenido de biomasa en *R. stolonifer* aislado de fresa (A) y jitomate (B), incubado en diferentes medios nutritivos a temperatura ambiente de 5 a 25 días. EM = caldo extracto de malta, EDS = caldo dextrosa Sabouraud, MN = medio mineralizado, JV8 = jugo comercial V8 Splash, JJ = jugo de jitomate, JF = jugo de fresa. Medias marcadas con letras diferentes en cada medio de cultivo indican que son estadísticamente diferentes, usando la comparación de medias de Tukey ($p < 0.05$).

fue de 38.4. En esta investigación no hubo una relación directa entre la composición C/N y la producción de biomasa, ya que se observó que en el medio nutritivo MN donde se obtuvo el máximo valor de C/N (100.5) hubo una menor producción de biomasa (15 mg).

En relación al porcentaje de ergosterol, los resultados obtenidos en esta investigación difieren de lo reportado por Nout *et al.* (1987) quienes obtuvieron una mayor cantidad de este compuesto en *R. oligosporus* en un sustrato natural (habas de soja), en comparación con el crecimiento de *R. stolonifer*

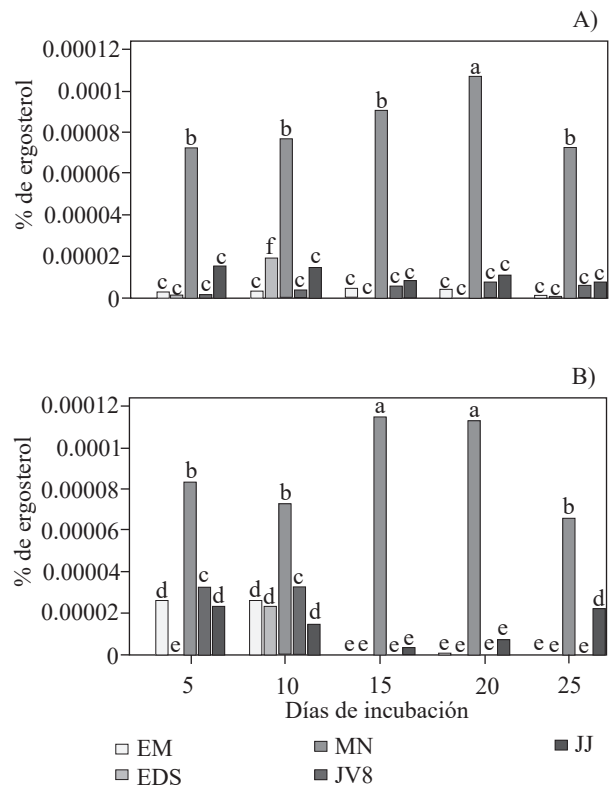


Figura 2. Contenido de ergosterol en *R. stolonifer* aislado de fresa (A) y jitomate (B), incubado en diferentes medios nutritivos a temperatura ambiente de 5 a 25 días. EM = caldo extracto de malta, EDS = caldo dextrosa Sabouraud, MN = medio mineralizado, JV8 = jugo comercial V8 Splash, JJ = jugo de jitomate, JF = jugo de fresa. Medias marcadas con letras diferentes en cada medio de cultivo indican que son estadísticamente diferentes, usando la comparación de medias de Tukey ($p < 0.05$).

cuando se incubó en los medios de cultivo sintéticos. Por otro lado, el contenido de ergosterol, además de estar influenciado por la especie fúngica, considera otras variables, como la edad del hongo, la disponibilidad de oxígeno, la temperatura y el método de análisis para su obtención (Trigos y Ortega, 2002; Valdés-Duque, 2008). Al parecer el contenido de carbohidratos de los sustratos evaluados no fue el componente que indujo la producción de este compuesto lipídico. Además, es importante

señalar que no hubo un patrón notorio en la síntesis del ergosterol durante el periodo de incubación de 25 días al que se sometió *R. stolonifer* de ambos aislados.

En conclusión, la distinta composición en carbohidratos y proteínas de los medios nutritivos que se evaluaron, influyó en el rendimiento de la biomasa y la concentración de ergosterol en ambos aislados de *R. stolonifer*. Por otro lado, el tiempo de incubación de 25 días en los medios nutritivos, no influyó en las variables de biomasa.

LITERATURA CITADA

- Association of Official Analytical Chemists (AOAC). 1990. Official Methods of Analysis: Changes in official Methods of Analysis Made at the Annual Meeting. Supplement 15th ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC.
- Bautista-Baños S, Barrera-Necha LL, Hernández-López M, and Rodríguez-González F. 2016. Morphological and ultrastructural modifications of chitosan-treated fungal phytopathogens. Pp. 251-275. In: Bautista-Baños S, Gianfranco Romanazi and Jiménez-Aparicio A (eds). Chitosan in the Preservation of Agricultural Commodities. Academic Press. USA. 352p. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802735-6.00009-4>
- Bautista-Baños S, Velázquez-del Valle MG, Hernández-Lauzardo AN and Barka EA. 2008. The *Rhizopus stolonifer*-tomato interaction. Pp. 269-289. In: Barka EA and Clement C (eds.). Plant Microbe Interaction. Research Signpost. Kerala, India. 406p. https://www.researchgate.net/profile/Silvia_Bautista-Banos/publication/234102268_The_rhizopus_stolonifer-tomato_interaction/links/00463535394fb7d5a5000000/The-rhizopus-stolonifer-tomato-interaction.pdf
- Bernal G, Illanes A, and Ciampi L. 2002. Isolation and partial purification of a metabolite from a mutant strain of *Bacillus* sp. with antibiotic activity against plant pathogenic agents. Electronic Journal of Biotechnology 5:7-8. <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-34582002000100008>
- Cortés D, Barrios-González J and Tomasini A. 2002. Pentachlorophenol tolerance and removal by *Rhizopus nigricans* in solid-state culture. Process Biochemistry 37: 881-884. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(01\)00295-3](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(01)00295-3)
- Frey B, Vilariño A, SchUepp H, and Arines J. 1994. Chitin and ergosterol content of extraradical and intraradical mycelium of the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. Soil Biology and Biochemistry 26:711-717. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(94\)90263-1](https://doi.org/10.1016/0038-0717(94)90263-1)
- Lennartsson PR, Erlandsson P and Taherzadeh MJ. 2014. Integration of the first and second generation bioethanol processes and the importance of by-products. Bioresource Technology 165:3-8. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.01.127>
- Millati R, Edebo L and Taherzadeh MJ. 2005. Performance of *Rhizopus*, *Rhizomucor*, and *Mucor* in ethanol production from glucose, xylose, and wood hydrolyzates. Enzyme and Microbial Technology 36:294-300. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2004.09.007>
- Miller GL. 1959. Modified DNS method for reducing sugars. Analytical Chemistry. 31:426-428.
- Nout MJR, Bonants-van Laarhoven TMG, De Jongh P and De Koster PG. 1987. Ergosterol content of *Rhizopus oligosporus* NRRL 5905 grown in liquid and solid substrates. Applied Microbiology and Biotechnology 26:456-461. <https://doi.org/10.1007/BF00253532>
- Oshoma CE, and Ikenebomeh MJ. 2005. Production of *Aspergillus niger* biomass from rice bran. Pakistan Journal of Nutrition 4:32-36. <http://dx.doi.org/10.3923/pjn.2005.32.36>
- Taherzadeh MJ, Fox M, Hjorth H and Edebo L. 2003. Production of mycelium biomass and ethanol from paper pulp sulfite liquor by *Rhizopus oryzae*. Bioresource Technology 88:167-177. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(03\)00010-5](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(03)00010-5)
- Tian J, Huang B, Luo X, Zeng H, Ban X, He J and Wang Y. 2012. The control of *Aspergillus flavus* with *Cinnamomum jensenianum* Hand. -Mazz essential oil and its potential use as a food preservative. Food Chemistry 130:520-527. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.07.061>
- Trigos A and Ortega-Regules A. 2002. Selective destruction of microscopic fungi through photo-oxidation of ergosterol. Mycologia 94:563-568. <https://doi.org/10.1080/15572536.2003.11833184>
- Valdés-Duque BE. 2008. Aplicación de diferentes técnicas analíticas para evaluar la contaminación fúngica de alimentos y superficies. Tesis para obtener el grado de Doctor en Ciencias. Universidad Autónoma de Barcelona. Bellaterra, Barcelona. 161p. <https://ddd.uab.cat/pub/tesis/2007/tdx-0229108-165736/bevd1de1.pdf>
- White TJ, Bruns T, Lee S and Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Pp:315-322. In: PCR Protocols: A guide to Methods and Applications. Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds.). Academic Press, San Diego, USA. 482p. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-372180-8.50042-1>

Efecto de nanorecubrimientos de quitosano-aceite esencial de tomillo sobre la calidad postcosecha en frutos de jitomate

Effect of chitosan-thyme essential oil nanocoatings on postharvest quality of tomato fruit

Zormy Nacary Correa-Pacheco*, CONACYT-Instituto Politécnico Nacional. Centro de Desarrollo de Productos Bióticos. Carretera Yautepec-Jojutla, Km 6, Calle CEPROBI, No. 8, San Isidro, Yautepec, C.P. 62731, Morelos. México; **Kárel Damari García-Paniagua**, UPEMOR. Boulevard. Paseo Cuauhnáhuac 566, Lomas del Texcal, Jiutepec, C.P. 62574, Morelos. México; **Silvia Bautista-Baños, María Luisa Corona-Rangel**, Instituto Politécnico Nacional. Centro de Desarrollo de Productos Bióticos. Carretera Yautepec-Jojutla, Km 6, Calle CEPROBI, No. 8, San Isidro, Yautepec, C.P. 62731, Morelos. México; *Autor para correspondencia: zncorreapa@conacyt.mx

Recibido: 23 de Marzo, 2019.

Aceptado: 19 de Junio, 2019.

Correa-Pacheco ZN, García-Paniagua KD, Bautista-Baños S y Corona-Rangel ML. 2019. Efecto de nanorecubrimientos de quitosano-aceite esencial de tomillo sobre la calidad postcosecha en frutos de jitomate. *Revista Mexicana de Fitopatología* 37 (No. Esp. 1) 29-36. DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1903-5

Resumen. En la actualidad, para prolongar el tiempo de vida útil de las frutas y vegetales, se están buscando alternativas naturales, tales como el quitosano y los aceites esenciales, con la finalidad de sustituir a los tradicionales pesticidas que contaminan el ambiente. En este trabajo, se presentan los resultados del efecto de nanorecubrimientos de quitosano-aceite esencial de tomillo sobre la calidad postcosecha en jitomate luego de 7 días de almacenamiento. Se evaluaron las variables: color, firmeza, pH, sólidos solubles totales (SST), carotenoides, pérdida de peso (PP), respiración y actividad antibacteriana. De los resultados, se obtuvo que todas las variables presentaron diferencias

estadísticas significativas para las formulaciones y los controles, excepto la PP. El recubrimiento con un 15 % de nanopartículas de quitosano QS+NPQs (15%) + G mantuvo una mayor firmeza durante el período de almacenamiento y además presentó la mayor inhibición contra *Pectobacterium carotovorum*. La aplicación de recubrimientos basados en compuestos naturales y bioactivos como el quitosano y los aceites esenciales, empleando una técnica innovadora como la nanotecnología, representa una alternativa viable y amigable con el ambiente, para la conservación de productos hortofrutícolas.

Palabras clave: nanopartículas, bacteria, maduración, UFC, *Solanum lycopersicum*.

Abstract. Currently, in order to prolong the shelf life of fruits and vegetables, new natural solutions, such as chitosan and essential oils have been used instead of synthetic pesticides that causes environmental pollution. In this work, the results of chitosan-thyme essential oil nanocoatings on the

postharvest quality in tomato after 7 days of storage are presented. The variables evaluated were: color, firmness, pH, total soluble solids (SST), carotenoids, weight loss (PP), respiration and antibacterial activity. From the results, all variables presented significant statistical differences for the different formulations and controls, except the PP. The coating with 15% of chitosan nanoparticles (QS + NPQs (15%) + G) maintained higher firmness during storage time and also showed the highest inhibition against *Pectobacterium carotovorum*. The application of coatings based on natural and bioactive compounds such as chitosan and essential oils, using an innovative technique such as nanotechnology, represents a viable and environmentally friendly alternative for the conservation of horticultural products.

Key words: nanoparticles, bacteria, ripening, CFU, *Solanum lycopersicum*.

Pectobacterium carotovorum es una bacteria Gram-negativa y patógena para las plantas que causa enfermedades en diversos productos hortofrutícolas como la berenjena y el tomate (Wang *et al.*, 2015), entre otros. Actualmente, productos químicos se utilizan para controlar esta bacteria, sin embargo, causan problemas de contaminación al medioambiente, resistencia y daños a la salud. Por lo tanto, se deben buscar nuevas alternativas como los polímeros naturales y los compuestos bioactivos para su control. Las películas y recubrimientos comestibles de polisacáridos, lípidos y proteínas se han aplicado en frutas y vegetales para controlar diferentes enfermedades y mejorar su calidad y vida de anaquel. Entre los polisacáridos más eficaces, se encuentra el quitosano, debido a sus conocidas propiedades antibacterianas y antifúngicas (Hassan *et al.*, 2018). Por otro lado, diversos compuestos

bioactivos poseen propiedades antimicrobianas, entre ellos, los aceites esenciales, que son altamente efectivos contra diversos microorganismos (Mari *et al.*, 2016). Sin embargo, los aceites esenciales poseen una alta volatilidad lo que disminuye su actividad antimicrobiana (Robledo *et al.*, 2018). De aquí surge el uso de la nanotecnología la cual permite el encapsulamiento de estos compuestos en nanoestructuras que los protegen del ambiente, disminuyendo su volatilidad (Lal *et al.*, 2015). Cubiertas de nanopartículas de quitosano con aceite de tomillo han sido probadas contra la antracnosis en aguacate (Correa-Pacheco *et al.*, 2017). Sin embargo, actualmente, pocos estudios se han llevado a cabo con la finalidad de estudiar el efecto de nanorecubrimientos de quitosano y aceites esenciales sobre la maduración y calidad postcosecha de hortalizas como el jitomate (*Solanum lycopersicum*) y su actividad antibacteriana. Por lo tanto, el objetivo del siguiente trabajo experimental, fue evaluar las variables de calidad y fisiológicas, así como la actividad antibacteriana sobre *P. carotovorum* de nanorecubrimientos de quitosano adicionados con aceite esencial de tomillo en el fruto de jitomate y determinar su efecto sobre la conservación del mismo.

Se empleó el método de nanoprecipitación para preparar las nanopartículas de quitosano con aceite esencial de tomillo (Sotelo-Boyás *et al.*, 2017). Inicialmente, se elaboró una solución acuosa de quitosano (0.05% p/v) (peso molecular medio, grado de desacetilación 75-85%, marca Sigma, Estados Unidos) en ácido acético glacial (2% v/v) (Fermont Chemicals, México), ajustándose el pH a 5.6. Por otra parte, se elaboró una solución de Tween 20 (Hycel, México), aceite esencial de tomillo (5%) (Essential Oils-Essenceflour) y alcohol de caña (96°) (Milab, México). Posteriormente, mediante el uso de una bomba peristáltica (MasterFlex®, Estados Unidos) con la técnica de goteo, se adicionaron

2.5 mL de quitosano en 40 mL de la solución conteniendo el aceite y el alcohol y se dejó en agitación durante 10 min. Finalmente, se concentró la solución a 2 mL, mediante el uso de un rotavapor (Buchi 300®, Suiza). La morfología de las nanopartículas obtenidas, se observó mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM, por sus siglas en inglés) mediante el uso de un microscopio marca JEOL-JEM 2010 con un voltaje de aceleración de 200 kV. El tamaño de las nanopartículas se calculó con el software ImageJ. Se realizaron 6 formulaciones con una solución base de quitosano (1% p/v), glicerol (J.T. Baker, Estados Unidos) y nanopartículas de quitosano y quitosano-aceite esencial de tomillo, variando su concentración en 15, 30 y 45%. Se seleccionaron 10 frutos de jitomate (variedad saladet, procedentes del Estado de Colima), con la finalidad de evaluar las diferentes formulaciones. Inicialmente, los frutos se lavaron con agua corriente y jabón para remover el exceso de tierra. Posteriormente se desinfectaron sumergiéndolos en una solución de hipoclorito de sodio al 3% durante 3 min y después se enjuagaron con agua destilada. En condiciones estériles, a cada fruto se le hicieron 8 perforaciones de aproximadamente 3 mm de profundidad aplicándose posteriormente la suspensión bacteriana (10^8). Posteriormente, se sumergieron durante 30 s en las formulaciones respectivas. Los controles consistieron en jitomates inoculados y no inoculados con la bacteria. La bacteria fue proporcionada por el Laboratorio de Bacterias Fitopatógenas de Fitopatología del Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas. Finalmente, los frutos se almacenaron en una cámara de refrigeración a 10 °C por un período de almacenamiento de 7 días a una humedad relativa de 70% para los cuales se evaluaron las variables de calidad: color, firmeza, pH, SST y carotenoides. En cuanto a las variables fisiológicas, se midió la PP y la respiración. Por otra parte, se evaluó la actividad antibacteriana de

los nanorecubrimientos a las 48 h, para la cual los frutos se lavaron después de la aplicación de los nanorecubrimientos e infestación a los 7 días. Para observar las diferencias en el número de UFC, se evaluó un control sin tratamiento y sin inóculo C (-) y un control sin tratamiento e inoculado C (+). Los valores de a, b y L de color se midieron con un colorímetro 9992-995® (Kónica Minolta, Japón) en dos zonas opuestas de la parte media del fruto. A partir de los valores a y b, se calculó el ángulo matiz (Hue°) mediante la fórmula $\tan^{-1}(b/a)$ y la pureza de color (Chroma) con la fórmula $(a^2+b^2)^{0.5}$. La firmeza se midió en ambas caras del fruto mediante el uso de un penetrómetro Fruit Firmness Tester® (Turoni®, Italia). El pH se midió usando un potenciómetro Navih® 51 (Horiba, Japón). La lectura se obtuvo colocando el electrodo en 4 g de jitomate triturado. Para la determinación de los SST se tomó una gota de jugo de jitomate de ambas caras del fruto utilizando una pipeta, colocándose posteriormente dicha gota sobre el sensor de un refractómetro (Atago, Japón). Los carotenoides se determinaron tomando 4 g de jitomate que se maceraron con 5 mL de una solución de hexano/acetona/etanol (50:25:25), la cual se centrifugó posteriormente en una microcentrífuga PRISM® (Labnet, USA) a 6500 rpm por 10 min. Finalmente, el sobrenadante se recuperó y se aforó a 10 mL con hexano. Las determinaciones se llevaron a cabo utilizando un espectrofotómetro Genesys 10S UV-Vis (Thermo scientific®, Estados Unidos) a 450 nm, tomando el coeficiente de extinción molar del β caroteno como $2505 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ con la siguiente ecuación: $\text{Carotenoides} = (\text{absorbancia} * \text{volumen de aforo} * 10^6) / (\text{Coeficiente de extinción molar} * \text{peso de la muestra} * 100)$. En cuanto a las variables fisiológicas, para determinar la PP, se utilizó una balanza digital portable scale® (OHAUS, Estados Unidos). Se etiquetaron 10 frutos por tratamiento. La producción de CO_2 (respiración) se cuantificó con la

técnica de espacio-cabeza mediante cromatografía. En un recipiente hermético se colocaron tres jitomates por formulación durante 2 h, posteriormente, se tomaron 5 mL del gas contenido en el espacio de cabeza, el cual se almacenó en tubos vacutainer para posteriormente inyectar 1 mL del gas en un cromatógrafo de gases 789B GC system (Agilent technologies®, Estados Unidos). Para la evaluación de la actividad antibacteriana, cada fruto se lavó con 10 mL de agua desionizada. Del volumen total de tomaron 500 μ L y se sembraron en cajas Petri con medio de cultivo MacConkey por duplicado. Las cajas se incubaron a temperatura ambiente (25 ± 1 °C) durante 24 h. Este procedimiento se realizó para 10 jitomates por formulación. Se contó el número de unidades formadoras de colonias (UFC). A los datos obtenidos, se les realizó un análisis de varianza (ANOVA) y una comparación de medias de Tukey ($p \leq 0.05$).

Las micrografías de microscopía electrónica de transmisión de las nanopartículas, se muestran en la Figura 1. Se observa una distribución homo-

génea de las mismas, con un tamaño promedio de partícula de 4.17 ± 0.62 nm para las (nanopartículas de quitosano) NPQs y de 6.32 ± 0.75 nm para las de NPTs (nanopartículas de tomillo). Tamaños similares de nanopartículas de quitosano y quitosano con aceite esencial de tomillo ya fueron reportaron por otros autores (Sotelo-Boyás *et al.*, 2017; Correa-Pacheco *et al.*, 2017). Por otra parte, los resultados de las variables de calidad y fisiológicas evaluadas después de 7 días de almacenamiento y de la actividad antibacteriana evaluada luego de 48 h, se presentan en el Cuadro 1. Se observaron diferencias significativas en los valores de luminosidad (L) para las formulaciones ($p < 0.05$). El menor valor (37.07) se observó para los frutos tratados con QS+NPTs (30%) + G y el mayor para los frutos del C (+) con un valor de 40.51. En cuanto al color Hue°, se obtuvieron valores entre 38.80° y 54.45° , para C (+) y QS+NPQs (45%) + G, respectivamente, mostrándose diferencias estadísticas significativas entre las formulaciones ($p < 0.05$). El desarrollo del color chroma varió entre 26.16 y 37.90, para QS+NPTs

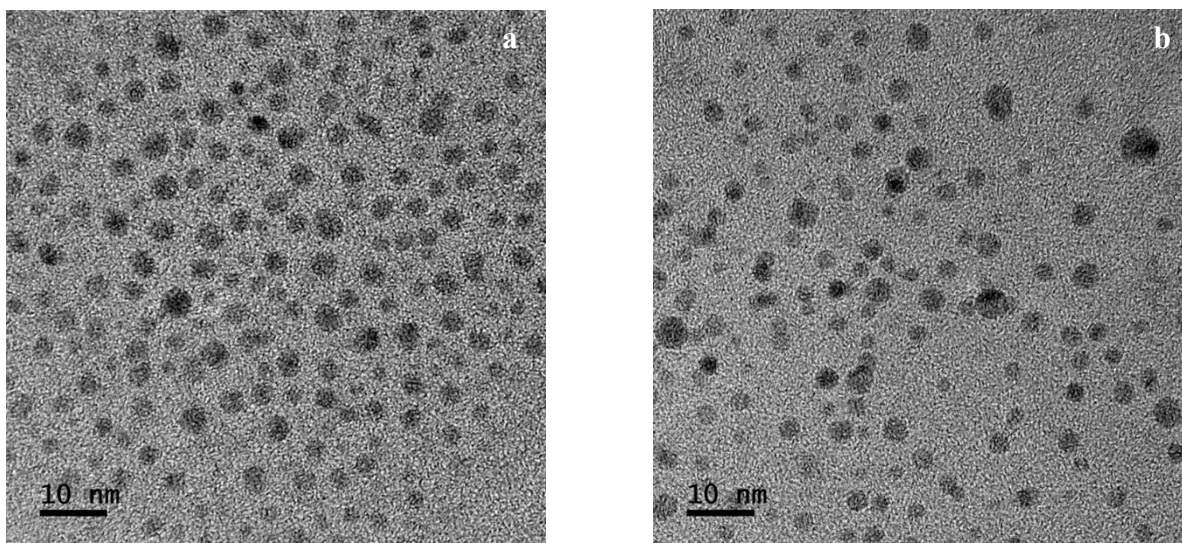


Figura 1. Micrografías de microscopía electrónica de transmisión (TEM) de: a) nanopartículas de quitosano (NPQs) y b) nanopartículas de tomillo (NPTs) (luego de la síntesis).

Cuadro 1. Resultado de la evaluación de las variables de calidad y fisiológicas y actividad antimicrobiana sobre jitomates tratados con los nanorecubrimientos por un periodo de almacenamiento de 7 días a una temperatura de 10 °C y humedad relativa de 70%.

Formulación	L	Hue ^o	Chroma	Firmeza (N)	pH	SST (%)	Carotenoides (μL g ⁻¹)	PP (%)	CO ₂ (mL kg ⁻¹ h ⁻¹)	UFC
QS+NPQs (15%) + G	38.90 ^{ab}	49.10 ^{bc}	31.59 ^{bc}	24.02 ^{ab}	4.8 ^d	3 ^a	6.37 ^c	0.7 ^a	7.1 ^{bc}	42.25 ^a
QS+NPTs (15%) + G	38.72 ^{ab}	47.99 ^{bc}	29.04 ^{ab}	20.73 ^{ab}	5.1 ^f	4 ^b	2.38 ^a	1.1 ^a	3.1 ^{abc}	69.00 ^a
QS+NPQs (30%) + G	39.38 ^{ab}	48.17 ^{bc}	35.28 ^{cd}	21.55 ^{ab}	4.7 ^c	3 ^a	3.85 ^{bc}	1.2 ^a	6.3 ^{bc}	627.25 ^d
QS+NPTs (30%) + G	37.07 ^a	47.46 ^{bc}	26.16 ^a	22.53 ^{ab}	4.7 ^c	4 ^b	4.13 ^{bc}	0.8 ^a	8.9 ^c	668.25 ^d
QS+NPQs (45%) + G	37.92 ^a	54.45 ^c	29.53 ^{ab}	17.06 ^a	4.4 ^b	4 ^b	5.45 ^d	1.2 ^a	3.8 ^{abc}	294.00 ^c
QS+NPTs (45%) + G	37.92 ^a	47.16 ^b	29.45 ^{ab}	22.24 ^{ab}	4.2 ^a	4 ^b	4.41 ^{bc}	1.0 ^a	7.9 ^{bc}	192.00 ^b
C (-)	38.96 ^{ab}	48.51 ^{bc}	29.55 ^{ab}	18.89 ^a	4.9 ^e	4 ^b	4.62 ^{cd}	1.0 ^a	1.7 ^a	17.75 ^a
C (+)	40.51 ^b	38.80 ^a	37.90 ^d	28.52 ^b	4.7 ^c	5 ^c	3.62 ^b	0.8 ^a	1.9 ^{ab}	NC

Letras diferentes dentro de las columnas indican que las formulaciones son estadísticamente diferentes, usando la comparación de medias de Tukey ($p < 0.05$).

QS = quitosano, NPQs = nanopartículas de quitosano; NPTs = nanopartículas de tomillo; G = glicerol; C (-) = control sin bacteria inoculada; C (+) = control con bacteria inoculada; L= luminosidad; SST = sólidos solubles totales; PP = pérdida de peso; UFC= Unidades Formadoras de Colonias; NC = no contables.

(30%) + G y C (+), respectivamente. Por otra parte, la menor pérdida de firmeza se registró con la formulación QS+NPQs (15%) + G con un valor de 24.02 N y para el control positivo, en contraste con la formulación QS+NPQs (45%) + G en el cual los jitomates presentaron un valor promedio final de 17.06 N. Tanto el pH como los SST, presentaron diferencias estadísticas significativas entre formulaciones. Para el pH, el valor menor (4.2) correspondió a los jitomates de la formulación QS+NPTs (45%) + G y el mayor (5.1) para los de la formulación QS+NPTs (15%) + G. Los valores de SST variaron entre 3-5%, obteniéndose un 3% en los frutos de las formulaciones QS+NPQs (15%) + G y QS+NPQs (30%) + G y un 5% para el C (+). De igual forma, se observaron diferencias significativas en el contenido de carotenoides ($p < 0.05$) durante el período de almacenamiento. El contenido menor de carotenoides correspondió a los frutos de la formulación QS+NPTs (15%) + G y el mayor para QS+NPQs (15%) + G, siendo 2.38 y 6.37 μL g⁻¹, respectivamente. En cuanto a la PP, no se observaron diferencias significativas entre las

formulaciones y el control durante el período de almacenamiento, evidenciándose un efecto protector del recubrimiento en la pérdida de peso. Finalmente, de los resultados obtenidos en la respiración (CO₂), se observa que todas las formulaciones tuvieron valores mayores de CO₂ con respecto a los controles C (-) y C (+). Para las formulaciones con NPQs, a medida que aumentó la concentración de nanopartículas (15, 30 y 45%), hubo una disminución de la respiración en el fruto (7.1, 6.3 y 3.8 mL kg⁻¹ h⁻¹), respectivamente.

Relativo a la actividad antibacteriana, se observó que la menor cantidad de UFC correspondió a los frutos del C (-) con 17.75 UFC y a las formulaciones QS+NPQs (15%) + G y QS+NPTs (15%) + G, con valores de 42.25 y 69.00 UFC. Los mayores valores de UFC se obtuvieron para las formulaciones con 30% de nanopartículas (NPQs y NPTs). Las formulaciones con 45% de nanopartículas (NPQs y NPTs) presentaron valores intermedios, encontrándose diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$) entre las formulaciones. En la Figura 2, se observa el efecto del recubrimiento en los controles y en las

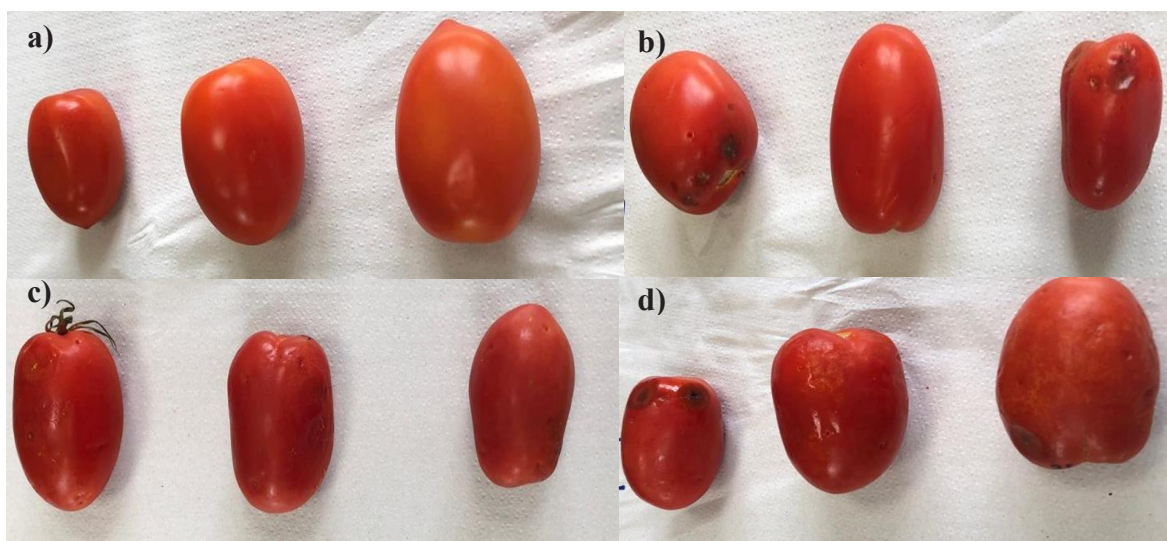


Figura 2. Daño observado en jitomate por la infección de *P. carotovorum* a los 7 días de almacenamiento a una temperatura de 10 °C y humedad relativa de 70% en: a) C (-), b) C (+), c) QS+NPQs (15%) + G y d) QS+NPTs (30%) + G (C = control; QS = quitosano; NPQs = nanopartículas de quitosano; G = glicerol; NPTs = nanopartículas de tomillo).

formulaciones QS+NPQs (15%) + G y QS+NPTs (30%) + G.

Entre las principales funciones de los recubrimientos comestibles, se encuentra la extensión de la vida de anaquel del fruto. Por ejemplo, la pérdida de peso está asociada con la evaporación de agua o deshidratación de la superficie del fruto, siendo el jitomate muy sensible debido a lo delgado de su cutícula. El uso de recubrimientos a base de quitosano ha permitido establecer una barrera al paso de los gases, reduciendo la transferencia de agua y consecuentemente, su evaporación (García *et al.*, 2014). Como se observó en los resultados, no hubo diferencias estadísticas significativas entre las diferentes formulaciones en cuanto a la pérdida de peso. Resultados similares se reportaron en la literatura (Divya *et al.* 2018), donde recubrimientos basados en nanopartículas de quitosano, evitaron la pérdida de peso en berenjena, jitomate y chile, ya que las nanopartículas disminuyeron la permeabilidad al vapor de agua, siendo efectivas como barrera a los gases. Por otra parte, relativo a la

firmeza, resultados similares reportaron García *et al.*, (2014), los cuales mencionan que la disminución de la firmeza se ha asociado a la degradación de la pectina, causando un reblandecimiento del fruto. De los resultados, se puede observar que los jitomates tratados con la mayoría de las formulaciones, tuvieron una firmeza mayor, comparados con C (-) y menor respecto a C (+). En el caso de los frutos de los nanorecubrimientos que sólo contenían NPQs, hubo una disminución de la firmeza con el incremento de la concentración de nanopartículas en la formulación, siendo de 24.02 N para QS+NPQs (15%) + G y de 17.06 N para QS+NPQs (45%) + G. Esta tendencia también la reportó por Gad *et al.*, (2017), obteniendo una firmeza mayor en guayaba, para concentraciones bajas de NPQs en goma Xantán en comparación con las concentraciones más altas de NPQs. En cuanto a los resultados asociados con la respiración para las NPQs, se puede observar, que a una concentración mayor de nanopartículas QS+NPQs (45%) + G, disminuyó la velocidad de respiración del jitomate (3.8 mL kg⁻¹

h^{-1}) en comparación con la menor concentración QS+NPQs (15%) + G ($7.1 \text{ mL kg}^{-1} h^{-1}$) (Ali *et al.*, 2010). Por otra parte, para las NPTs, tanto para la firmeza, como para la respiración, no se obtuvo una tendencia definida.

En trabajos previos (Sotelo-Boyás *et al.*, 2015), se evaluó la actividad antibacteriana *in vitro* de NPQs y NPTs en *P. carotovorum* midiéndose el halo de inhibición (mm), resultando más efectivas las NPTs que las NPQs. En esta investigación, se obtuvo que las concentraciones QS+NPQs (15%) + G y QS+NPQs (30%) + G, tuvieron un mayor efecto inhibitorio comparado con QS+NPTs (15%) + G y QS+NPTs (30%) + G. Por otra parte, para la concentración del 45%, se observó que las QS+NPTs (45%) + G tuvieron un mayor efecto inhibitorio en relación a las QS+NPQs (45%) + G. De la literatura, es bien conocido que tanto el quitosano como el aceite esencial de tomillo poseen actividad antibacteriana (Bautista-Baños *et al.*, 2017). En este estudio, para el tomillo, el mayor efecto inhibitorio se presentó para bajas concentraciones en la formulación QS+NPTs (15%) + G. En general, se observó que para las formulaciones con NPQs, los jitomates tratados con el recubrimiento QS+NPQs (15%) + G, mantuvieron una mayor firmeza y una mayor actividad antibacteriana contra *P. carotovorum*. De igual forma, para las formulaciones con NPTs, la formulación QS+NPTs (15%) + G, tuvo la menor tasa de respiración y presentó la mayor inhibición contra *P. carotovorum*.

LITERATURA CITADA

- Ali A, Maqbool M, Ramachandran S and Alderson P. 2010. Gum arabic as a novel edible coating for enhancing shelf-life and improving postharvest quality of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) fruit. *Postharvest Biology and Technology* 58: 42-47. <http://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2010.05.005>
- Bautista-Baños S, Ventura-Aguilar RI, Correa-Pacheco ZN and Corona-Rangel ML. 2017. Chitosan: a versatile antimicrobial polysaccharide for fruit and vegetables in postharvest – a review. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 23(2):103-121. <http://dx.doi.org/10.5154/r.rchsh.2016.11.030>
- Correa-Pacheco ZN, Bautista-Baños S, Valle-Marquina MA and Henández-López M. 2017. The effect of nanostructured chitosan and chitosan-thyme essential oil coatings on *Colletotrichum gloeosporioides* growth *in vitro* on cv Hass avocado and fruit quality. *Journal of Phytopathology* 165:297-305. <http://dx.doi.org/10.1111/jph.12562>
- Divya K, Smitha V and Jisha MS. 2018. Antifungal, antioxidant and cytotoxic activities of chitosan nanoparticles and its use as an edible coating on vegetables. *International Journal of Biological Macromolecules* 114:572-577. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.03.130>
- Gad M and Zag Zog O. 2017. Mixing xanthan gum and chitosan nano particles to form new coating for maintain storage life and quality of Elmamoura guava fruits. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 6(11):1582-1591. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2017.611.190>
- García M, Casariego A, Díaz R and Roblejo L. 2014. Effect of edible chitosan/zeolite coating on tomatoes quality during refrigerated storage. *Emirates Journal of Food and Agriculture* 26(3):238-246. <https://doi.org/10.9755/ejfa.v26i3.16620>
- Hassan B, Ali S, Ijaz A, Mahmood K and Akhtar N. 2018. Recent advances on polysaccharides, lipids and protein based edible films and coatings: A review. *International Journal of Biological Macromolecules* 109:1095-1107. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.11.097>
- Lal P, Xiang X, Heiden P. 2015. Chitosan nanoparticle based delivery systems for sustainable agriculture. *International Journal of Biological Macromolecules* 77:36-51. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.02.039>
- Mari M, Bautista-Baños S and Sivakumar D. 2016. Decay control in the postharvest system: Role of microbial and plant volatile organic compounds. *Postharvest Biology and Technology* 122:70-81. <http://dx.doi.org/10.1016/j.postharvbio.2016.04.014>
- Robledo N, Vera P, López L, Yazdani-Pedram M, Tapia Ca and Abugoch L. 2018. Thymol nanoemulsions incorporated in quinoa protein/chitosan edible films; antifungal effect in cherry tomatoes. *Food Chemistry* 246:211-219. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.11.032>
- Sotelo-Boyás ME, Correa-Pacheco ZN, Bautista-Baños S and Corona-Rangel ML. 2017. Physicochemical characterization of chitosan nanoparticles and nanocapsules incorporated with lime essential oil and their antibacterial activity against food-borne pathogens. *LWT - Food Science and Technology* 77:15-20. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2016.11.022>
- Sotelo-Boyás ME, Valverde-Aguilar G, Plascencia-Jatomea M, Correa-Pacheco ZN, Jiménez-Aparicio A, Solorza-Feria J, Barrera-Necha L and Bautista-Baños S. 2015. Caracterización de nanopartículas de quitosano adicionadas con aceites

esenciales. Efecto *in vitro* en *Pectobacterium carotovorum*. Revista Mexicana de Ingeniería Química 14(3):589-599. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_artext&pid=S1665-27382015000300003

Wang C, Deng Z, Xie Z, Chu X, Chang J, Kong D, Li B, Zhang H and Chen L. 2015. Construction of a genome-scale metabolic network of the plant pathogen *Pectobacterium carotovorum* provides new strategies for bactericide discovery. FEBS Letters 589:285-294. <http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2014.12.010>

Efecto de formulaciones de ácido oleico y quitosano sobre el desarrollo *in vitro* de *Clavibacter michiganensis*

Effect of oleic acid and chitosan formulations on *in vitro* development of *Clavibacter michiganensis*

Susana Alexa Castañón-Viveros, Cindy Salas-Marcial, Margarita de Lorena Ramos-García* Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Facultad de Nutrición. Calle Iztaccihuatl S/N, Colonia Los Volcanes, Cuernavaca, Morelos, C.P. 62350. México; Jesús Hernández-Romano Universidad Politécnica del Estado de Morelos, Boulevard Cuauhnahuac 556, Lomas del Texcal, Jiutepec, Morelos 62550, México; Dagoberto Guillén-Sánchez. Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Escuela de Estudios Superiores de Xalostoc. Avenida Nicolas Bravo s/n, Parque Industrial Cuautla, Ayala, Morelos, C.P. 62742. México. * Autor para correspondencia: margarita.ramosg@uaem.edu.mx

Recibido: 27 de Marzo, 2019.

Aceptado: 10 de Mayo, 2019.

Castañón-Viveros SA, Salas-Marcial C, Ramos-García ML, Hernández-Romano J, Guillen Sánchez D. 2019. Efecto de formulaciones de ácido oleico y quitosano sobre el desarrollo *in vitro* de *Clavibacter michiganensis*. Revista Mexicana de Fitopatología 37 (No. Esp. 1): 37-42.

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1903-6

Resumen. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, causa pérdidas económicas significativas en el cultivo de Solanáceas, debido a que al infectarse, el cultivo debe ser desechado. El objetivo de este estudio fue evaluar formulaciones de ácido oleico y quitosano sobre el desarrollo *in vitro* de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*. La bacteria se aisló en medio NYB. Se elaboraron formulaciones acuosas de ácido oleico (1, 2 y 3%) y quitosano al 1%. Las técnicas utilizadas para evaluar el efecto bactericida de las formulaciones, fueron de pozos, antibiograma disco-placa y envenenamiento del medio, en este último caso, previo y posterior a la

incubación de la bacteria. Se evaluó el crecimiento (cm) y peso (g). La temperatura de incubación fue de 28 °C durante 8 días. Los resultados mostraron que en la técnica de envenenamiento del medio, previo a la siembra del microorganismo, la solución de ácido oleico al 3% y quitosano 1%, controló el crecimiento de *C. michiganensis* (0.02g) al compararlo con el control (0.35 g). El ácido oleico y quitosano al aplicarlo de manera preventiva, disminuyeron el crecimiento de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis in vitro*.

Palabras clave: Fitopatógeno, cáncer bacteriano, NYB, antimicrobiano

Abstract. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, causes significant economic losses in the cultivation of Solanaceae, because when infected, the crop must be discarded. The objective of this study was to evaluate formulations of oleic acid

and chitosan on the *in vitro* development of *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*. The bacterium was isolated in NBY medium. Aqueous formulations of oleic acid (1, 2 and 3%) and 1% chitosan were prepared. The techniques used to evaluate the bactericidal effect of the formulations were wells, disk-plate antibiogram and medium poisoning, in the latter case, previous and after incubation of the bacteria. Growth (cm) and weight (g) were evaluated. The incubation temperature was 28 °C for 8 days. The results showed that in the technique of poisoning the medium, prior to seeding the microorganism, the solution of chitosan and 3% oleic acid controlled the development of *C. michiganensis* (0.02g) when compared to the control (0.35 g). Oleic acid and chitosan when applied in a preventive manner, decreased the development of *C. michiganensis* subsp. *michiganensis in vitro*.

Key words: Phytopathogen, bacterial canker, NYB, antimicrobial

Los problemas fitosanitarios limitan la producción de diversos cultivos, debido a que causan disminución en el rendimiento de las hortalizas y ocasionan pérdidas económicas importantes. El cáncer bacteriano es causado por *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, la cual causa la muerte prematura de la planta infectada; se ha reportado que este fitopatógeno causa pérdidas hasta del 100% del total de la producción, afectando principalmente al tomate. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* es una bacteria Gram positiva cuya característica hace que sea difícil de controlar; es más frecuente en lugares húmedos y puede diseminarse por semilla o tubérculos, ocasionando la pudrición de tallos y hojas de los cultivos. Además inhibe el crecimiento de la planta y con el paso del tiempo provoca que se marchite a consecuencia

del bloqueo de los vasos del xilema. Bajo condiciones adecuadas, la planta infectada puede seguir creciendo hasta producir frutos, los cuales contienen al agente causal de la enfermedad. Los frutos contaminados muestran como signo una mancha de color blanco y en el centro un punto de tono café, razón por la que denomina “ojo de pájaro” (Pizano *et al.*, 2016; Borboa *et al.*, 2009; Rueda, *et al.*, 2009).

Se han utilizado varios métodos para controlar el crecimiento de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*. Los productos a base de cobre (oxicloruro de cobre, óxido de cobre) han ayudado a reducir la velocidad de diseminación de la enfermedad, sin embargo se ha limitado su uso por el impacto en el ambiente. Los antibióticos han sido efectivos, pero sus elevados costos y baja disponibilidad limitan su utilización. Por tal motivo es necesario explorar nuevas alternativas que no provoquen daños ambientales y sean efectivos para controlar la enfermedad. Se ha observado que algunos lípidos obtenidos de materiales vegetales poseen características antibacterianas, antifúngicas y antivirales. El ácido oleico, por su consistencia aceitosa, puede llegar a afectar el medio de desarrollo de bacterias Gram positivas, haciéndolo hidrofóbico y con esto modificando la humedad externa de la planta o fruto, lo que provoca que las bacterias tengan dificultad para desarrollarse (Borboa-Flores *et al.*, 2010). El quitosano es un producto natural que se obtiene de la desacetilación de la quitina, forma parte del exoesqueleto de los artrópodos, insectos y algunos hongos. Diversas investigaciones han evidenciado su efectividad en el control de bacterias Gram positivas (Kim *et al.*, 2011; Hernández-Ochoa *et al.*, 2011). Además, se ha evidenciado que el quitosano muestra mayor actividad contra microorganismos cuando se aplica de manera preventiva (Oviedo *et al.*, 2011). Se ha reportado que la combinación de quitosano y ácido oleico reducen hasta el 80%

incidencia de microorganismos en productos vegetales (Ramos-García *et al.*, 2010). El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de formulaciones de ácido oleico y quitosano sobre el desarrollo *in vitro* de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*.

Se formuló una solución que contenía 50 mL de ácido acético glacial al 1%, 0.15 mL de glicerol, ácido oleico al 1% y 0.5 g de quitosano de bajo peso molecular. La solución se colocó en una parrilla de agitación (Hotplane Stirrer, LabTech, Corea) a 70 °C durante 10 min, y se homogenizó (13,500 rpm). Se repitió el mismo procedimiento para las concentraciones de ácido oleico al 2% y 3%. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* se incubó en cajas de Petri con medio NBY (caldo nutritivo 0.8%, extracto de levadura 0.2% fosfato ácido de potasio 0.2%, fosfato diácido de potasio 0.5%, agar 1.5%) y posteriormente se mantuvieron a 28 °C por 72 h antes de ser sometidas a experimentación. Se utilizó la técnica de pozos, la cual consistió en hacer cuatro perforaciones en la caja Petri en donde se colocaron las tres diferentes soluciones (1%, 2% y 3% de ácido oleico y quitosano 1%) y el control (ácido acético al 1%). La técnica de antibiograma disco-placa, consistió en colocar cuatro discos de papel filtro de celulosa con un diámetro de 0.7 cm a los cuales se les agregó 1 mL de las formulaciones antes mencionadas (Picazo y Prieto, 2016; Guerrero *et al.*, 2017). La técnica de envenenamiento del medio se realizó antes y después de la siembra de la bacteria en la caja Petri. En la aplicación preventiva se colocaron 20 µL de las formulaciones (ácido oleico al 1%, 2% o 3% y quitosano 1%), sobre la caja con medio NBY. Una vez colocada la formulación, se sembró la bacteria por medio de un estriado. Con respecto a la aplicación posterior del inóculo, se agregaron 20 µL de las formulaciones sobre la bacteria previamente inoculada. El control en las dos últimas metodologías fue únicamente la cepa en el medio de cultivo

NBY (Zárate *et al.*, 2018; Guerrero *et al.*, 2017). Las cajas Petri se incubaron (Thermo Scientific Heratherm, Alemania) a 28 °C durante 8 días. En las técnicas de pozos y antibiograma, se evaluó el crecimiento bacteriano (cm) y para las técnicas de envenenamiento del medio, se evaluó el peso seco (g). Esto se realizó pesando en una balanza analítica de precisión (Jinghai, Shanghai) la masa bacteriana sustraída de los medios de cultivo después del periodo de incubación de la bacteria evaluada en las diferentes formulaciones. Se utilizaron nueve repeticiones por tratamiento y se realizó un análisis de varianza con un método de comparación de medias de Fisher. Se utilizó el programa Infostat 2010.

No se observó control de la bacteria en los tratamientos evaluados mediante la técnica de pozos y antibiograma (Figura 1).

En el método envenenamiento del medio previo a la siembra del inóculo, se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los tratamientos y el control. Las formulaciones de ácido oleico en las tres concentraciones y quitosano fueron estadísticamente diferentes al control. A pesar que la solución de ácido oleico 3% y quitosano 1%, mostró un mayor efecto de inhibición, estadísticamente fue similar al resto de las formulaciones. El crecimiento de la bacteria fue inverso al aumento en la concentración del ácido oleico. Se observó que el crecimiento de la bacteria disminuyó conforme aumentó la concentración de ácido oleico (Cuadro 1, Figura 2).

En la técnica de envenenamiento del medio posterior a la siembra del inóculo, no se observaron diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$) entre los tratamientos evaluados; sin embargo, se mostraron los valores de peso más bajos al utilizar la formulación de ácido oleico 3% y quitosano (Cuadro 1, Figura 3).

En la condición posterior a la siembra del inóculo, las técnicas utilizadas para determinar la inhibición

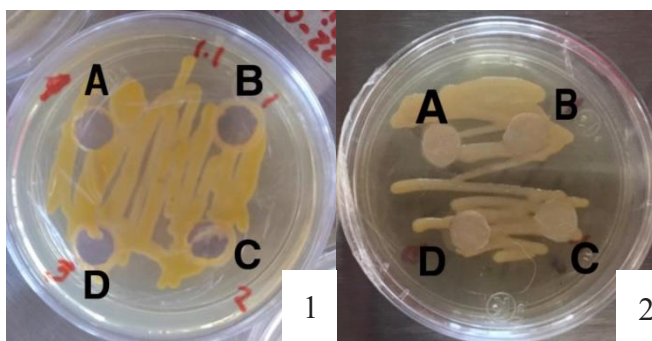


Figura 1. Efecto antimicrobiano de formulaciones de ácido oleico en diferentes concentraciones y quitosano sobre el crecimiento de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* incubado a 28 °C, mediante la técnica de pozos (1) y antibiograma (2): A) ácido acético; B) ácido oleico 1% y quitosano; C) ácido oleico 2% y quitosano; D) ácido oleico 3% y quitosano.

Cuadro 1. Efecto antimicrobiano de formulaciones de quitosano y ácido oleico en diferentes concentraciones sobre el crecimiento *in vitro* de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* incubada a 28 °C, durante 8 días, mediante la técnica de aplicación directa, previa y posterior a la siembra del inóculo.

Formulaciones	Aplicación de la formulación	
	Previa	Posterior
	Peso (g)	
Ac. oleico al 1% y quitosano	0.12y ± 0.04z a*	0.10 ^y ±0.09 ^z a*
Ac. oleico al 2% y quitosano	0.04 ± 0.02 a	0.12 ±0.14 a
Ac. oleico al 3% y quitosano	0.02 ± 0.01 a	0.08 ±0.02 a
Testigo	0.35 ± 0.1 b	0.13 ±0.11 a

^yMedias / ^zDesviación estándar / *Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas (LSD Fisher, $p < 0.05$).

del crecimiento bacteriano con los tratamientos evaluados no ejercieron inhibición. La explicación podría centrarse en que una vez establecido *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* produce exopolisacáridos los cuales favorecen la adhesión a superficies abióticas y biológicas. Además, este tipo de moléculas protegen a la bacteria contra componentes de defensa de la plantas y ayudan a la desintoxicación de fitoalexinas o compuestos tóxicos (Gartemann *et al.*, 2003; Rueda *et al.*, 2010).

En la técnica de envenenamiento del medio previo a la siembra del inóculo, el ácido oleico en sus

tres concentraciones con el quitosano 1%, mostró un efecto inhibitorio en el crecimiento de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*. Además, se observó que a medida que aumentó la concentración de ácido oleico, disminuyó el desarrollo de la bacteria, esto concuerda con lo reportado por Barboa *et al.* (2010), quienes demostraron que los lípidos, por su consistencia aceitosa, pueden afectar el desarrollo de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*, haciéndolo hidrofóbico, y con esto modificando la humedad externa del área donde se desarrolla la bacteria, por lo tanto se dificulta su establecimiento. Se ha

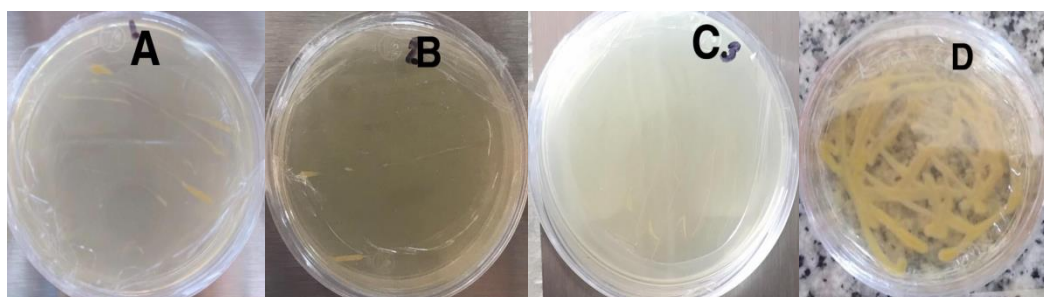


Figura 2. Efecto antimicrobiano de las formulaciones de ácido oleico en diferentes concentraciones y quitosano sobre el crecimiento de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* incubado a 28 °C durante 8 días, mediante la técnica de envenenamiento del medio previo a la siembra del inóculo; A) ácido oleico 1% y quitosano; B) ácido oleico 2% y quitosano; C) ácido oleico 3% y quitosano; D) Testigo.

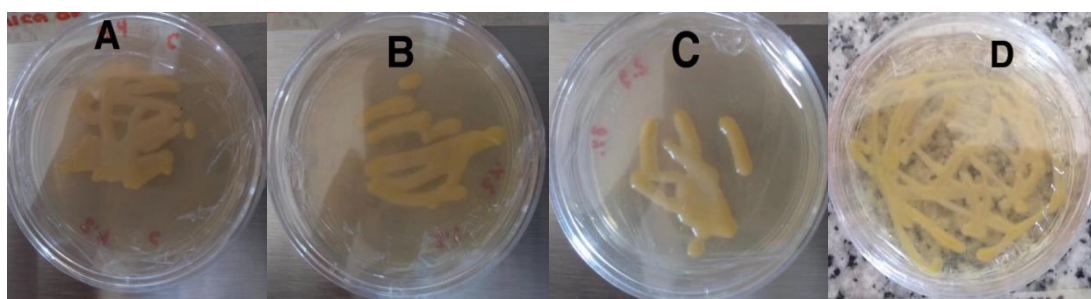


Figura 3. Efecto antimicrobiano de las formulaciones de quitosano y ácido oleico en diferentes concentraciones sobre el crecimiento de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* incubado a 28 °C durante 8 días, mediante la técnica de envenenamiento de medio posterior a la siembra del inóculo; A) ácido oleico 1% y quitosano; B) ácido oleico 2% y quitosano; C) ácido oleico 3% y quitosano; D) Testigo.

documentado que los ácidos grasos libres (entre ellos el ácido oleico) presentan efecto bactericida contra bacterias gram positivas. En un estudio realizado por Chao-Tsuan *et al.* (2011) mostraron que concentraciones de ácido oleico por arriba de $3.125 \mu\text{mL}^{-1}$ evitan el desarrollo de *Staphylococcus aureus* ($3.5 \log_{10} \text{CFU mL}^{-1}$); el ácido oleico reduce el desarrollo de la bacteria porque causa daño a la pared celular al separar los compartimentos citoplasmáticos.

En conclusión, se observó en esta investigación que las formulaciones de ácido oleico en las tres concentraciones (1, 2 y 3 %) evaluadas con el quitosano al 1%, disminuyeron el desarrollo de *C.*

michiganensis subsp. *michiganensis*, únicamente cuando se aplicó de manera previa a la inoculación de la bacteria.

LITERATURA CITADA

- Borboa-Flores J, Rueda-Puente O, Acedo-Felix E, Ponce J, M. Cruz-Villegas, García-Hernández J y Ortega-Nieblas M. 2010. Evaluación de la actividad antibacteriana *in vitro* de aceites esenciales contra *Clavibacter michiganensis*. Tropical and Subtropical Agroecosystems, 12: 539–547. <http://www.revista.cbba.uady.mx/ojs/index.php/TSA/article/view/466/427>
- Borboa F, Rueda P, Acedo F, Ponce F, Cruz M, Grimaldo J y García O. 2009. Detección de *Clavibacter michiganensis* subespecie *michiganensis* en el tomate del estado de Sonora, México. Revista Fitotecnia Mexicana, 32 (4): 319-

- 326 <http://www.revista.ccba.uady.mx/ojs/index.php/TSA/article/view/466/427>
- Chao-Hsuan C, Wang Y, Nakatsuji T, Yu-Tsueng L, Zoiboulis C, Gallo R, Zhang L, Ming-Fa H y Chun-Ming H. 2011. An innate bactericidal oleic acid effective against skin infection of methicillin-resistant staphylococcus aureus: A Therapy Concordant with Evolutionary Medicine. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21: 391-399. <http://nano.ucsd.edu/~17zhang/publications/45-J%20Microbiol%20Biotech.pdf>
- Gartemann KH, Kirchner O, Engemann J, Gräfen I, Eichenlaub R y Burger A. 2003. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*: first steps in the understanding of virulence of a Gram-positive phytopathogenic bacterium. *Journal of Biotechnology*, 106: 193-191. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2003.07.011>
- Guerrero R, Mónaco C, Stocco M, Rolleri J y Guerrero N. 2017. Selección de aislamientos de *Trichoderma spp.* para el control del cáncer bacteriano (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*) del tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Amazonica Ciencia y Tecnología*, 6: 9-20. <http://revistas.proeditio.com/REVISTAMAZONICA/article/view/1898>
- Hernández-Ochoa L, Gonzalez-Gonzalez A, Gutierrez-Mendez N, Muñoz-Castellanos L, Quintero-Ramos A. 2011. Estudio de la actividad antibacteriana de películas elaboradas con quitosano a diferentes pesos moleculares incorporando aceites esenciales y extractos de especies como agentes antimicrobianos. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 10: 455-463. <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmiq/v10n3/v10n3a11.pdf>
- Kim K, Min B, Kim Y, Kimmel R, Cooksey K y Park S. 2011. Antimicrobial activity against foodborne pathogens of chitosan biopolymer films of different molecular weights. *LWT-Food Science and Technology*, 44: 565-569. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643810002677>
- Oviedo M, Morales S y Ramírez-Navas J. 2016. Efecto fungicida del quitosano sobre la roya inoculada en café. *UGCiencia*, 22: 45-56. https://www.researchgate.net/profile/Juan_Ramirez-Navas/publication/312054030_Efecto_fungicida_del_quitosano_sobre_la_roya_inoculada_en_cafeto_Fungicidal_effect_of_chitosan_on_rust_inoculated_on_coffea/links/5878c44e08ae329d622a8b48/Efecto-fungicida-del-quitosano-sobre-la-roya-inoculada-en-cafeto-Fungicidal-effect-of-chitosan-on-rust-inoculated-on-coffee.pdf
- Picazo J y Prieto P. 2016. Compendio de microbiología. 2ª edición. Elsevier. Barcelona, España 714 p. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/libro?codigo=709724>
- Pizano F, Acosta G, Sánchez R, González C, Guevara G, Torres P y Guevara O. 2016. Detección de *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis* por PCR en plantas de jitomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Revista Mexicana De Ciencias Agrícolas*, 7(6): 1347-1357. <https://doi.org/10.29312/remexca.v7i6.182>
- Ramos-García M, Bautista-Baños S, Barrera-Necha L, Bosquez-Molina E, Alia-Tejacal I y Estrada-Carrillo M. 2010. Compuestos Antimicrobianos Adicionados en Recubrimientos Comestibles para Uso en Productos Hortofrutícolas. *Revista Mexicana de Fitopatología* 28: 44-57. <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmiq/v10n3/v10n3a11.pdf>
- Rueda P, Duarte M, Alvarado M, García O, Tarazón H, Holguín P, Amador B, García H, Flores H y Orona C. 2009. *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*: una enfermedad bacteriana en el cultivo de papa (*Solanum tuberosum* L.) en Sonora, México. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 10: 169-175. <http://www.revista.ccba.uady.mx/ojs/index.php/TSA/issue/view/6>
- Rueda P, Duarte M, Alvarado M, Holguín P, Borboa F, Tarazón H, Murillo A, García H y Barrón H. 2010. Agente causal de la necrosis bacteriana en cultivo de papa (*Solanum tuberosum*). *Revista Invurnus*, 5(1):34-39 <http://www.invurnus.uson.mx/revistas/articulos/4-art6.pdf>
- Zárate M, González M, Ramírez G, Robledo O y Juárez M. 2018. Efecto de los ácidos fenólicos en plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) inoculadas con *Clavibacter michiganensis*. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 20: 4367-4379. <https://doi.org/10.29312/remexca.v0i20.1005>

Marchitez causada por *Fusarium solani* en chile chilaca (*Capsicum annuum*) en Michoacán

Fusarium wilt caused by *Fusarium solani* in chili chilaca (*Capsicum annuum*) in Michoacán

Alfredo Reyes-Tena, Gerardo Rodríguez-Alvarado, Ricardo Santillán-Mendoza, Marlene Díaz-Celaya, Sylvia P. Fernández-Pavía*. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales (IIAF), 58880, km 9.5 carretera Morelia-Zinapécuaro, Tarímbaro, Michoacán, México. *Autor para correspondencia: fpavia@umich.mx.

Recibido: 04 de Abril, 2019.

Aceptado: 15 de Julio, 2019.

Reyes-Tena A, Rodríguez-Alvarado G, Santillán-Mendoza R, Díaz-Celaya M y Fernández-Pavía SP. 2019. Marchitez causada por *Fusarium solani* en chile chilaca (*Capsicum annuum*) en Michoacán. Revista Mexicana de Fitopatología 37 (No. Esp. 1): 43-47.

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1904-1

Resumen. En Queréndaro, Michoacán, México, el cultivo de chile chilaca (*Capsicum annuum*) es de importancia económica, social y cultural; sin embargo, los problemas fitosanitarios limitan su producción. En junio de 2017, se observaron plantas enfermas con síntomas de marchitez y necrosis. Con el objetivo de identificar el agente causal de la enfermedad se recolectaron secciones de 10-15 cm de tallo y raíz, se obtuvo consistentemente (30%) un aislado fúngico del género *Fusarium*. El aislado mostró abundantes clamidosporas terminales de pared lisa, macroconidios con tres a cinco septos y célula apical ligeramente curva, microconidios septados y aseptados, ovales, elipsoides y reniformes. Se realizaron pruebas de patogenicidad bajo condiciones de invernadero, se inocularon 1.2 x

10⁶ conidios/mL⁻¹ de *Fusarium* en plantas de chile chilaca de 45 días de edad. Veinte días posteriores a la inoculación, se observaron síntomas de marchitez, defoliación, clorosis, y necrosis en el tallo y la raíz. Se re-aisló al patógeno a partir de tejido vegetal enfermo y se amplificó el gen del factor de elongación 1- α . La secuencia obtenida se sometió a un análisis BLAST contra secuencias de las bases de datos de GenBank. De acuerdo con las características morfológicas y moleculares, el agente causal de la marchitez en chile chilaca de Queréndaro, Michoacán es *Fusarium solani*.

Palabras clave: necrosis del tallo, clorosis, filogenia, postulados de Koch.

Abstract. In Queréndaro, Michoacán, Mexico the chili chilaca crop (*Capsicum annuum*) has a great economic, social and culture importance, however, phytosanitary problems limit the production. In July 2017, diseased plants with wilt and necrosis symptoms were observed. With the aim to identify the causal agent of the disease, sections of 10-15

cm from stem and root were collected, and one fungal isolate from the *Fusarium* genre was consistent obtained (30%). The isolate showed abundant terminal chlamydospores with smooth wall, macroconidia with three to five septa and slightly bend apical cell, microconidia oval ellipsoids and reniform with and without septa. Pathogenicity tests carried out in a greenhouse conditions, 1.2×10^6 *Fusarium* conidia were inoculated on 45 day-old chili chilaca plants. Twenty days after the inoculation, chlorosis, wilt, necrosis on the stem and roots, were observed on the inoculated plants. The pathogen was re-isolated and the elongation factor 1- α gene was amplified. The sequence obtained was analyzed by BLAST against sequences from the GenBank. According to the morphologic and molecular characteristics, the causal agent of wilting in chili chilaca plants in Queréndaro, Mexico is *Fusarium solani*.

Key words: stem necrosis, chlorosis, phylogeny, Koch's postulates.

México produce anualmente un volumen mayor a tres millones de t de chile verde (*Capsicum annum*) lo que le permite ser el principal exportador a nivel mundial (SADER, 2019). En el estado de Michoacán, en el año 2018, se produjeron más de 116 000 t de chile, cifra que lo ubicó en el séptimo lugar de producción nacional. Queréndaro destaca entre los municipios productores de chile chilaca debido a su importancia cultural al ser la sede de la "Feria del chile" que se celebra anualmente. Sin embargo, las enfermedades que se presentan en el cultivo de esta hortaliza son una limitante para la producción. Dentro de estas, la marchitez del chile chilaca ocasiona mayores pérdidas en producción, al reducir hasta en 50% el rendimiento del cultivo, y está asociada con patógenos de los géneros *Phytophthora*, *Rhizoctonia* y *Fusarium* (Velarde-

Félix *et al.*, 2018). Sin embargo, se desconoce con exactitud la identidad del patógeno.

Con el objetivo de identificar al agente causal de la enfermedad, se recolectaron muestras de raíz primaria, raíces secundarias, corona y tallo de plantas sintomáticas de chile chilaca en parcelas del municipio de Queréndaro, Michoacán durante junio de 2017. Las muestras se lavaron con agua y detergente marca Roma[®], se cortaron segmentos de 0.5 cm de longitud en la zona intermedia entre el tejido sano y enfermo; éstos se desinfestaron en una solución de Cloralex[®] al 10% (0.6% de hipoclorito de sodio); se enjuagaron en agua destilada estéril y se secaron con papel estéril. Cinco segmentos de tejido de raíz y cinco de tallo se sembraron en cajas Petri con medio selectivo (NARPH) que contenía natamicina (0.02 g L⁻¹), ampicilina (0.27 g L⁻¹), rifampicina (0.01 g L⁻¹), pentacloronitrobenzeno (0.10 g L⁻¹) e himexazol (0.075 g L⁻¹) y se almacenaron a 24 °C (Soto-Plancarte *et al.*, 2017). El aislado fúngico obtenido se purificó por punta de hifa y se empleó para la caracterización morfológica y molecular. Se cultivó en medio Spezieller Nährstoffarmer Agar (SNA), se cortaron discos de agar con micelio de 6 mm de diámetro y se almacenaron en microtubos con agua destilada estéril a 15 °C en la Colección de Hongos del Laboratorio de Patología Vegetal de la UMSNH con el código MXMIC-798. Para la caracterización molecular, se extrajo ADN genómico utilizando un protocolo con base en bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB; Sigma-Aldrich) descrito por Leslie y Summerell (2016) con modificaciones. El micelio se incubó en buffer de lisis a 65 °C durante 1 h y se usó etanol absoluto en lugar de isopropanol (2-propanol). La concentración del ADN genómico fue calculada en un espectrofotómetro (Nanodrop; Thermo Scientific, Waltham, MA). Se amplificaron porciones parciales del gen factor de elongación de la traducción 1- α (EF).

La verificación de la patogenicidad se realizó en el invernadero del Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, el cual registró una temperatura de 30 ± 8 °C. El cultivar de chile chilaca CHL1 se empleó como material vegetal. Se obtuvieron plántulas en celdas de 100 cm² de volumen empleando el sustrato Mezcla 3 (Sunshine®). Se aplicaron 20 mL del fertilizante universal Miracle-Gro® (24N-8P-16K) a cada planta cada siete días hasta la inoculación del patógeno. Las plantas se colocaron de acuerdo a un diseño experimental completamente al azar. El aislado de *F. solani* se cultivó en medio SNA a 24 °C durante 10 días; luego se preparó una suspensión de conidios a una concentración de 1.2×10^6 conidios mL⁻¹. Doce

plantas sanas de chile chilaca de 45 días de edad fueron inoculadas con 1.0 mL de la suspensión de conidios aplicando directamente en la rizósfera. Seis plantas inoculadas con agua destilada estéril se emplearon como controles negativos. El patógeno se re-aisló a partir de tejido sintomático y se corroboró la identidad mediante la amplificación de EF. Para inferir las relaciones filogenéticas se realizó un análisis de máxima parsimonia utilizando secuencias de *F. solani* y de especies de *Fusarium* depositadas en la base de datos del GenBank.

Se registró una incidencia de la enfermedad del 10% en campo, los síntomas consistieron en pérdida de turgencia foliar, clorosis, necrosis de tejido de raíz, tallo y corona (Figuras 1 A y B). En las cajas de aislamiento, después de 48 h se observó

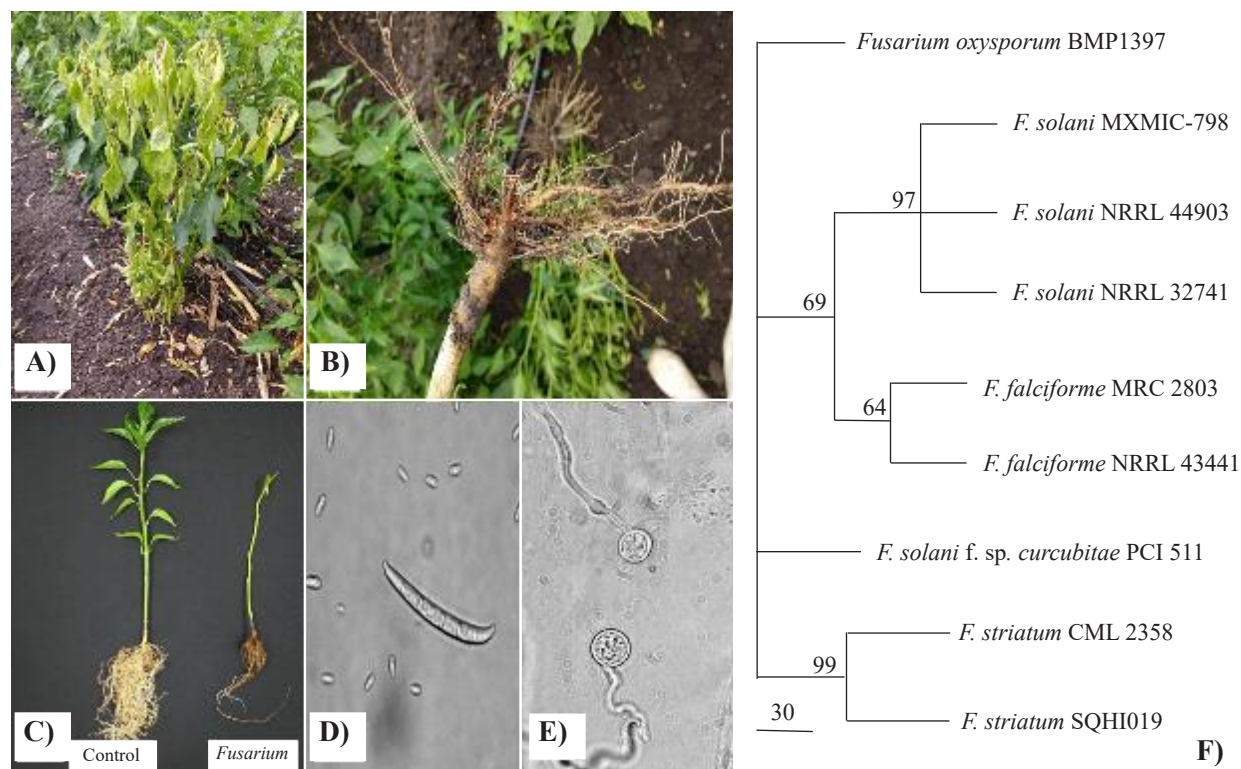


Figura 1. A) Planta de chile chilaca (*Capsicum annuum*) de tres meses de edad con síntomas de marchitez y clorosis en campo. B) Raíz y corona mostrando necrosis. C) Derecha: Planta de chile de 45 días edad inoculada con 1.2×10^6 conidios de *Fusarium solani*; izquierda: planta control. D) Macro y microconidios. E) Clamidosporas terminales. F) Relaciones filogenéticas del aislado MXMIC-798 de *Fusarium solani* y especies cercanas; *Fusarium oxysporum* se usó como grupo externo.

crecimiento micelial en tres de los segmentos de tallo y se seleccionó un aislado fúngico. En SNA el aislado mostró características morfológicas del género *Fusarium* tales como macroconidios de entre 22 y 33 µm de largo y 2.5 a 5.0 µm de ancho, con tres a cinco septos y célula apical ligeramente curva; microconidios de entre 6.0 y 9.5 µm de largo y 1.5 a 4.0 µm de ancho, ovales, reniformes, elipsoides, aseptados o con uno o dos septos (Figura 1D); abundantes clamidosporas de pared lisa de 6.0 a 8.0 µm de diámetro, terminales, solas o dispuestas en pares o en cadenas de tres (Figura 1E). Las características anteriores y las medidas de macro y microconidios coincidieron con la descripción de *Fusarium solani* (Leslie y Summerell, 2006; Ramdial y Rampersad, 2010; Wang *et al.*, 2014; Hans-Josef *et al.*, 2016).

La secuencia obtenida mostró 100% de identidad y cobertura con 20 cepas pertenecientes al complejo de especies de *F. solani*, y se almacenó en la base de datos del GenBank con el código de accesión MK532475. El análisis filogenético mostró que el aislado que se obtuvo en el presente estudio se agrupó con cepas de *F. solani* (Figura 1F). En la prueba de patogenicidad, las plantas inoculadas con *F. solani* mostraron clorosis, pérdida de turgencia foliar, defoliación y necrosis en raíces y tallo 20 días después de la inoculación (Figura 1C). A partir de tejido vegetal enfermo se re-aisló al patógeno. Las plantas control no mostraron síntomas y no se aisló a *Fusarium* a partir de éstas.

De acuerdo con las características morfológicas, la caracterización molecular, las pruebas de patogenicidad y el análisis filogenético, se estableció que *F. solani* es el agente causal de marchitez y necrosis en raíz y tallo de chile chilaca en Queréndaro, Michoacán, México. *Fusarium solani* se reportó como agente causal de pudrición de tallo y frutos de pimiento dulce (*C. annuum*) en Ontario, Canadá (Jarvis *et al.*, 1994) y pudrición de frutos en

Trinidad y Tobago (Ramdial y Rampersad, 2010). Recientemente se reportó a *F. solani* como agente causal de la marchitez en plantas maduras de chile poblano y damping-off en plántulas en Puebla, México (Rivera-Jiménez *et al.*, 2018); y a *Fusarium oxysporum* como agente causal de marchitez en plantas de pimiento en invernaderos en Sinaloa (Velarde-Félix *et al.*, 2018). Los resultados del presente trabajo confirman que *F. solani* es un patógeno de importancia económica, ya que limita la producción de chile en México. Este es el primer reporte de este patógeno como agente causal de la marchitez del chile chilaca en Michoacán. La información del presente estudio será de utilidad para los productores locales de chile chilaca, ya que permitirá desarrollar estrategias de manejo de esta enfermedad, y disminuir la incidencia y severidad de la marchitez inducida por *Fusarium*.

AGRADECIMIENTOS

El primer autor agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca de estudios de doctorado.

LITERATURA CITADA

- Jarvis WR, Khosla SK and Barrie SD. 1994. *Fusarium* stem and fruit rot of sweet pepper in Ontario greenhouses. Canadian Plant Diseases Survey 74: 131-134. http://phytopath.ca/wp-content/uploads/2014/10/cpds-archive/vol74/CPDS_Vol_74_No_2_1994_OCR.pdf#page=5.
- Hans-Josef S, Samuels GJ, Zhang N, Short DPG, Juba J and Geiser DM. 2016. Epitypification of *Fusisporium* (*Fusarium*) *solani* and its assignment to a common phylogenetic species in the *Fusarium solani* species complex. Mycologia 108: 806-819. <https://doi.org/10.3852/15-255>.
- Leslie JF and Summerell BA. 2006. The *Fusarium* laboratory manual. First Edition. Blackwell Publishing, Hoboken USA, 388 p. <https://www.wiley.com/en-ca/The+Fusarium+Laboratory+Manual-p-9780813819198>.
- Ramdial HA and Rampersad SN. 2010. First report of *Fusarium solani* causing fruit rot of sweet pepper in Trinidad. Plant Disease 94: 1375. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-06-10-0433>.
- Rivera-Jiménez MN, Zavaleta-Mancera HA, Rebollar-Alviter A, Aguilar-Rincón VH, García-de-los-Santos G, Vaquera-

- Huerta H and Silva-Rojas HV. 2018. Phylogenetics and histology provide insight into damping-off infections of 'Poblano' pepper seedlings caused by *Fusarium* wilt in greenhouses. *Mycological Progress* 17: 1237-1249. <https://doi.org/10.1007/s11557-018-1441-2>.
- SADER, Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. 2019. Servicio de información agroalimentaria y pesquera. www.gob.mx/siap (consulta, mayo 2019).
- Soto-Plancarte A, Rodríguez-Alvarado G, Fernández-Pavía YL, Pedraza-Santos ME, López-Pérez L, Díaz-Celaya M y Fernández-Pavía SP. 2017. Protocolos de aislamiento y diagnóstico de *Phytophthora* spp. enfoque aplicado a la investigación. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 8: 1867-1880. <https://dx.doi.org/10.29312/remexca.v8i8.708>.
- Velarde-Félix S, Garzón-Tiznado JA, Hernández-Verdugo S, López-Orona CA and Retes-Manjarrez JE. 2018. Occurrence of *Fusarium oxysporum* causing wilt on pepper in Mexico. *Canadian Journal of Plant Pathology* 40: 238-247. <https://doi.org/10.1080/07060661.2017.1420693>.
- Wang RY, Gao B, Li XH, Ma J and Chen SL. 2014. First report of *Fusarium solani* causing *Fusarium* root rot and stem canker on storage roots of sweet potato in China. *Plant Disease* 98: 160. <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-13-0651-PDN>.

***Streptomyces* como biocontroladores *in vitro* de *Exserohilum rostratum* y productores de sustancias promotoras del crecimiento vegetal**

***Streptomyces* as *in vitro* biocontrol agents of *Exserohilum rostratum* and producers of plant growth promoting substances**

Darío Enrique García-Rojas, Pedro Vázquez-Vázquez, Universidad Tecnológica de la Costa, C.P. 63313, Santiago Ixcuintla, Nayarit, México, **Daniel Alonso Pérez-Corral, María Fernanda Ruiz-Cisneros, David Ignacio Berlanga-Reyes, José de Jesús Ornelas-Paz, Carlos Horacio Acosta-Muñiz, Claudio Rios-Velasco***, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo-CIAD; A.C., C.P. 31570, Ciudad Cuauhtémoc, Chihuahua, México; **Miguel Ángel Salas-Marina**, Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas-UNICAH, Villacorzo, C.P. 29000, Chiapas, México, **Eduardo Osorio-Hernández**, Universidad Autónoma de Tamaulipas, Ciudad Victoria, Tamaulipas, C.P. 87000, México. *Autor de correspondencia: claudio.rios@ciad.mx.

Recibido: 04 de Abril, 2019.

Aceptado: 03 de Junio, 2019.

García-Rojas DE, Vázquez-Vázquez P, Pérez-Corral DA, Ruiz-Cisneros MF, Berlanga-Reyes DI, Ornelas-Paz JJ, Acosta-Muñiz CH, Rios-Velasco C, Salas-Marina MA y Osorio-Hernández E. 2019. *Streptomyces* como biocontroladores *in vitro* de *Exserohilum rostratum* y productores de sustancias promotoras del crecimiento vegetal. Revista Mexicana de Fitopatología 37 (No. Esp. 1) 48-56.

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1904-2

Resumen. El objetivo del estudio fue evaluar la actividad antifúngica de *Streptomyces* spp. contra *Exserohilum rostratum* cepa CIAD_CP01 (Sinónimo de *Setosphaeria rostrata*), así como su capacidad para producir sustancias promotoras del crecimiento vegetal. La actividad antagonista *in vitro* de seis cepas de *Streptomyces* se evaluó por confrontación directa y a través de volátiles contra *E. rostratum* aislado de follaje de maíz en el estado de Chihuahua, (siendo éste, el primer reporte de

ocurrencia en dicho estado), y se estimó mediante el porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR). Así mismo, se determinó la capacidad de *Streptomyces* spp., para producir ácido indol acético (AIA) y sideróforos, además de su potencial para fijar nitrógeno atmosférico y solubilizar fosfatos. Los valores de PICR obtenidos fluctuaron de 34.9 a 95.7% en confrontación directa y de 0.6 a 2.2% mediante volátiles. *Streptomyces cangkringensis* cepa CIAD-CA07 (A7) y *Streptomyces missionensis* cepa CIAD-CA27 (A27) produjeron 3 y 29 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de AIA, respectivamente. Todas las cepas fueron capaces de producir el sideróforo trihidroxamato (ferrioxamina) de 7.8 a 39.3% de unidades de sideróforos y de fijar nitrógeno atmosférico. Con base en los resultados, las cepas de *Streptomyces* podrían ser utilizadas como agentes de control biológico de *E. rostratum* y como biofertilizantes en cultivos hortofrutícolas.

Palabras clave: Actinomicetos, antagonistas, biocontrol, enfermedad, fitopatógeno, maíz.

Abstract. The aim of the study was to evaluate the antifungal activity of *Streptomyces* spp. against *Exserohilum rostratum* strain CIAD_CP01 (synonym *Setosphaeria rostrata*), as well as their ability to produce plant growth promoting substances. The antagonistic capacity *in vitro* of six *Streptomyces* strains was evaluated by direct confrontation and through volatiles against *E. rostratum*, isolated from maize leaves in the state of Chihuahua, (this being the first report of occurrence in this State) and was calculated by the percentage of inhibition of radial growth (PIRG). Likewise, the capacity of *Streptomyces* to produce indole acetic acid (IAA) and siderophores was determined, in addition to the fixation of atmospheric nitrogen and solubilize phosphates. The obtained PIRG ranged from 34.9 to 95.7% by direct confrontation and from 0.6 to 2.2% through volatiles. *Streptomyces cangkringensis* strain CIAD-CA07 (A7) and *Streptomyces misionensis* strain CIAD-CA27 (A27) were able to produce IAA, with 3 and 29 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectively. All strains were able to produce the siderophore trihydroxamate (ferrioxamine), ranging from 7.8 to 39.3 % siderophore units, and to fix atmospheric nitrogen. Based on these results, *Streptomyces* strains could be used as biological control agents for *E. rostratum* and as biofertilizers in horticultural crops.

Key words: Actinomycetes, antagonists, biocontrol, diseases, phytopathogen, corn.

El género *Streptomyces* es el más representativo de los actinomicetos y el más ampliamente distribuido en ecosistemas y agroecosistemas, del cual se ha obtenido más del 70% de los antibióticos conocidos y es fuente potencial de nuevos compuestos bioactivos (Muharram *et al.*, 2013). La mayoría de las cepas de este género son capaces de inhibir el crecimiento *in vitro* de bacterias y hongos fitopatógenos mediante la producción de metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana [antibióticos, antifúngicos, enzimas extracelulares (quitinasas, peroxidases, glucanasas), inhibidores enzimáticos, terpenoides, pigmentos y plaguicidas,

entre otros] (Franco-Correa *et al.*, 2010). Además, producen sustancias promotoras del crecimiento vegetal como el ácido indol acético (AIA), sideróforos y solubilizan fosfatos (Dertz *et al.*, 2006). Por otro lado, *Exserohilum rostratum* (sinónimo homotípico de *Setosphaeria rostrata*) se reporta por vez primera como agente causal de tizón foliar en maíz (*Zea mays*) con sintomatología similar a la causada por *Exserohilum turcicum* conocido por causar la enfermedad denominada “tizón norteño de la hoja del maíz” (Chung *et al.*, 2010). Esta enfermedad ha sido detectada recientemente en algunas zonas productoras de maíz en México. En el estado de Sinaloa, *E. turcicum* provocó pérdidas en la producción de grano de maíz del 50%, en el ciclo 2013-2014 (Nuñez *et al.*, 2019), sin embargo, en el estado de Chihuahua, México aún no se cuenta con el reporte oficial de la ocurrencia de *E. rostratum*, y por ende no se cuenta con datos de incidencia, severidad y pérdidas económicas que ocasiona. La incidencia de esta enfermedad se ha encontrado relacionada con maíces híbridos que no poseen genes de resistencia a la enfermedad, lo cual reduce los rendimientos (Dong *et al.*, 2008). Los microorganismos antagonistas son una alternativa en el manejo de esta enfermedad, destacando los actinomicetos (actinobacterias) por su actividad antimicrobiana, y su capacidad para promover el crecimiento vegetal. Por lo que, el objetivo fue evaluar la capacidad antifúngica *in vitro* de *Streptomyces* spp. contra *Exserohilum rostratum* y su potencial para producir sustancias promotoras del crecimiento vegetal.

Las cepas de *Streptomyces* se seleccionaron del cepario del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Unidad Cuauhtémoc, de acuerdo con su capacidad antifúngica probada previamente (Pérez-Corral *et al.*, 2015), y fueron las siguientes: *Streptomyces cangkringensis* cepa CIAD-CA07 (A7), *Streptomyces* sp. cepa CIAD-CA19 (A19), *Streptomyces misionensis* cepa CIAD-CA27 (A27), *Streptomyces kanamyceticus* cepa CIAD-CA45 (A45), *Streptomyces kanamyceticus* cepa CIAD-CA48 (A48) y *Streptomyces libani* cepa CIAD-CA86 (A86). El hongo fitopatógeno *Exserohilum rostratum* CIAD_CP01 fue aislado de hojas sintomáticas (tizones foliares) de plantas de

maíz en las etapas fenológicas VT (aparición de las panojas) y R1 (aparición de los estigmas) (Figura 1), de acuerdo con Centko *et al.* (2017), durante el ciclo agrícola 2018 en parcelas establecidas en Cuauhtémoc, Chihuahua, México (28° 33' 49" LN; 106° 54' 28" LO, 1,995 msnm).

Para la identificación morfológica del fitopatógeno, se creció en medio de cultivo PDA por 7 días a 28 ± 1 °C en ausencia de luz. Del micelio del hongo se realizaron montajes en porta y cubreobjetos y se tiñeron con azul de lactofenol para su observación en un microscopio compuesto (Carl Zeiss, Jena, Alemania) a 1000x magnificaciones y se identificó mediante claves taxonómicas (Watanabe, 2010). Para la identificación molecular, se extrajo el ADN genómico (ADNg) de acuerdo con Ruiz-Cisneros *et al.* (2017). El ADNg obtenido se visualizó por electroforesis en gel de agarosa al 1%, en un ChemiDoc™ XRS+ imaging system (Bio-Rad; CA, EUA) y subsecuentemente se usó para amplificar el espaciador transcrito interno (ITS, por sus siglas en inglés) del gen 18S del ARN ribosomal (ARNr), usando los iniciadores universales ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'). El producto de PCR se examinó por electroforesis en gel de agarosa al 1%, y fue secuenciado (ambas cadenas) por Macrogen EUA (Rockville, MD, EUA). Las secuencias obtenidas fueron superpuestas y ensambladas para obtener la secuencia consenso que

se comparó contra las bases de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI), usando el algoritmo de BLAST para verificar el porcentaje de identidad correspondiente a las especies identificadas. La secuencia de *E. rostratum* strain CIAD_CP01 fue depositada en el GenBank (número de acceso MK942343.1). Se realizó un análisis filogenético del aislado, comparándola con cepas de las especies *rostratum* y *turcicum* de otras regiones usando el modelo Kimura 2-parameter (K2) y el modelo de verosimilitud (ML) con 1000 réplicas de Bootstrap (Figura 2).

Las cepas de *Streptomyces* se evaluaron *in vitro* por confrontación directa y mediante volátiles contra *E. rostratum*. Para el primer estudio se colocaron cuatro explantes de 7 mm de diámetro de las colonias de *Streptomyces*, en cada punto cardinal del borde de una caja de Petri de 90 mm de diámetro con medio de cultivo Czapek Dox Agar (CDA) y se incubaron a 28 ± 1 °C por 10 días (Pérez-Corral *et al.*, 2015). Al décimo día, un explante de 7 mm de diámetro de una colonia del fitopatógeno se colocó en el centro de la caja de Petri. Los testigos consistieron en explantes del fitopatógeno crecidos en CDA en ausencia de *Streptomyces* (Evangelista-Martínez, 2014). En el segundo estudio, se evaluó la actividad antifúngica *in vitro* de las cepas de *Streptomyces* mediante volátiles, para lo cual se inocularon 4 mL de una suspensión ($\sim 1.5 \times 10^8$ esporas mL⁻¹) de las cepas de *Streptomyces* sobre

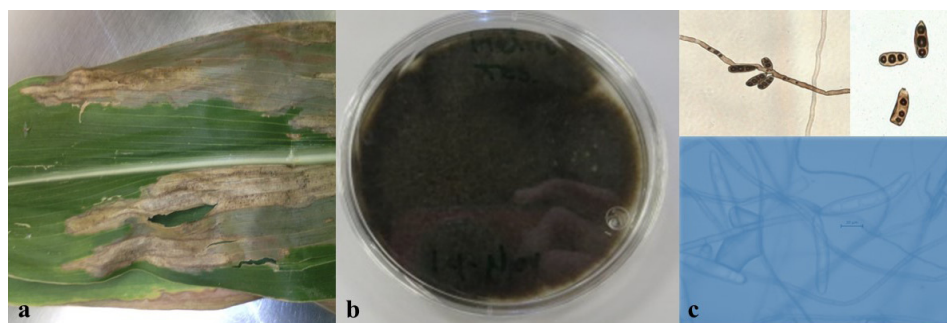


Figura 1. Características del agente causal *Exserohilum rostratum* a) tizón de la hoja en maíz y caracteres: b) macroscópicos (crecimiento del hongo en cajas de Petri de 90 mm de diámetro con PDA con 10 días de edad) y c) microscópicos (micelio filamentosos y conidios de color pardo oscuro tabicados y conidióforos laterales ovalados, vistos a 400X y 1000X aumentos) del fitopatógeno.

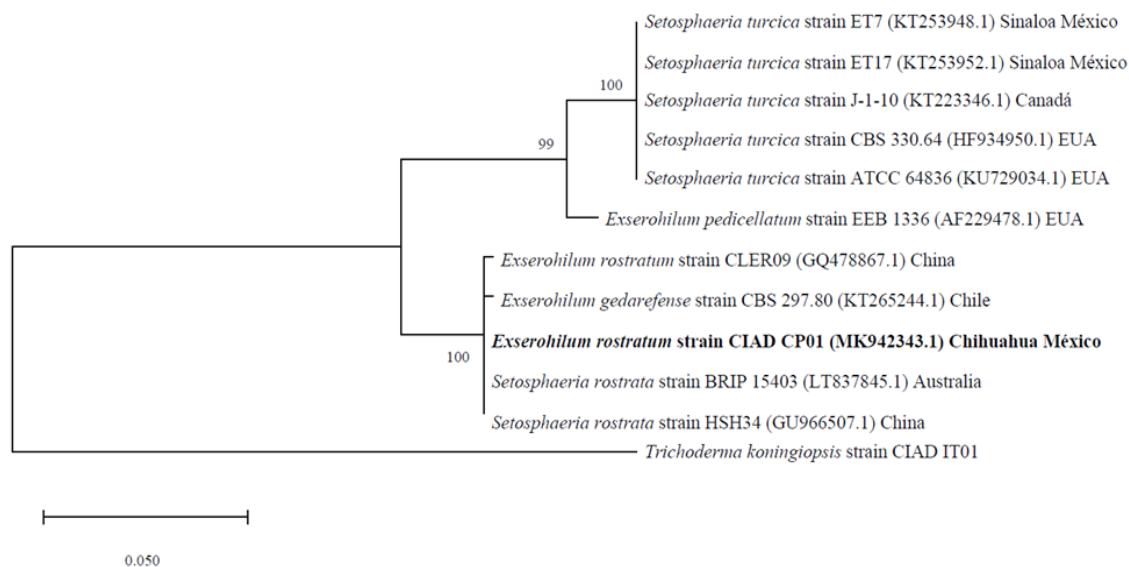


Figura 2. Árbol filogenético de máxima verosimilitud basado en el espaciador transcrito interno (ITS), construido con el programa Mega X (bootstrap = 1000), usando el modelo de sustitución Kimura 2-parameter (K2), los valores de bootstrap se muestran como porcentajes. El árbol se dibujó a escala, con longitudes de rama medidas en el número de sustituciones por sitio, la secuencia correspondiente a *Trichoderma koningiopsis* cepa CIAD_IT01 se tomó como grupo externo.

semillas de trigo (40 g) pre-cocidas y estériles, se incubaron a 28 ± 1 °C por 10 días. Veinte gramos de semillas con crecimiento de actinomicetos se colocaron en una caja de Petri de 60×15 mm, sin tapa, adicionalmente, se colocaron tres cajas de Petri de 60×15 mm sin tapa que contenían CDA, con un explante (7 mm de diámetro) del hongo patógeno en el centro de cada caja. Las cuatro cajas, se colocaron dentro de otra caja de Petri de tamaño mayor (140×25 mm). Las cajas se sellaron e incubaron a 28 ± 1 °C. Los testigos consistieron en cajas de Petri con semillas de trigo estériles sin inocular y las respectivas cajas con el fitopatógeno (Boukaew *et al.*, 2013). En ambos estudios se midió cada 24 h el crecimiento radial del fitopatógeno confrontado y los testigos. El día en que el hongo fitopatógeno (testigos) llenó la caja de Petri se tomó como referencia para estimar el antagonismo en la confrontación. El porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR) fue estimado de acuerdo con la fórmula propuesta por Yuan y Crawford (1995). Los datos obtenidos del PICR se sometieron

a un análisis de varianza (ANDEVA) y se usó la prueba de Tukey ($p=0.05$) para separar las medias. Los análisis se realizaron con el programa estadístico Statistical Analysis System versión 9.0. Todas las pruebas se realizaron por triplicado. Cada repetición constó de nueve unidades experimentales (cajas de Petri por confrontación) y como testigo se consideraron 10 cajas del patógeno (sin presencia de antagonista).

Para evaluar la capacidad de las cepas de *Streptomyces* para producir sustancias promotoras del crecimiento vegetal, se realizaron pruebas bioquímicas que consistieron en inducir la producción de ácido indol acético (AIA), además de evaluar su capacidad para producir sideróforos, solubilizar fosfatos y de fijar nitrógeno atmosférico (N_2). Estas pruebas se hicieron cualitativamente y las cepas que resultaron positivas a las pruebas bioquímicas se cuantificaron. Todas las pruebas cualitativas y cuantitativas se realizaron por triplicado. El AIA se determinó de acuerdo con Gopalakrishnan *et al.* (2011), usando un espectrofotómetro (Evolution™

300; Thermo Electron Scientific Instruments LLC, Madison) a una absorbancia de 530 nm y la concentración se determinó con una curva de calibración de un estándar de AIA. La cuantificación del AIA se hizo con base en los datos de absorbancia en función de la concentración mediante una regresión lineal para determinar la ecuación de la recta ($y = 32.943x - 0.0372$, $R^2 = 0.9896$). La producción de sideróforos se hizo mediante la solución de ensayo del Chrome azulol S (CAS) de acuerdo con Schwyn y Neilands (1987) y la cuantificación se expresó en % de unidades de sideróforos, utilizando la siguiente fórmula propuesta por Lee *et al.* (2012).

$$\% \text{ unidades de sideróforos} = \left[\frac{\text{Absorbancia de muestra} - \text{Absorbancia de referencia}}{\text{Absorbancia de referencia}} \right] \times 100$$

Para la estimación de AIA y sideróforos, las cepas de *Streptomyces* se crecieron en caldo ISP2 e ISP4 (Medios 2 y 4 del International Streptomyces Project, limitados en hierro), respectivamente y se mantuvieron a 28 ± 1 °C y 150 rpm de agitación por 7 días (Lee *et al.*, 2012). Los precultivos fueron centrifugados, el sobrenadante fue filtrado y se tomó un 1 mL de la muestra para cada determinación. En las cepas positivas a la producción de sideróforos (cambio de color azul a rosa o naranja), se les determinó el tipo de sideróforo producido (catecol o hidroxamato) de acuerdo con Arnow (1937). En la prueba de Arnow, la presencia del sideróforo catecol se indicó mediante un vire a color rosa. En la prueba de cloruro férrico (FeCl_3), la presencia de los sideróforos trihidroxamato y dihidroxamato se indicó mediante un vire de color naranja y rosa, respectivamente. Para la solubilización de fosfatos insolubles por las cepas de *Streptomyces*, se usó el medio National Botanical Research Institute Phosphorus (NBRIP) registrando el crecimiento y la presencia de halos en el medio, siendo la presencia de éstos, el indicativo de la capacidad de las cepas para solubilizar fosfatos (Walpola y Yoon, 2013). Para determinar la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico, se crecieron las cepas de *Streptomyces*

en cajas de Petri con medio libre de nitrógeno, donde el desarrollo de colonia indicó la capacidad de fijar N_2 atmosférico, como control positivo, se creció un aislado de *Bacillus* sp. (Peña y Reyes, 2007).

De acuerdo con sus caracteres morfológicos macro y microscópicos (Figuras 1 a, b y c), el hongo fitopatógeno fue identificado como *Exserohilum* sp. El aislado mostró colonias circulares de color oscuro superiormente y negro en la parte inferior, y conidios rectos a ligeramente curvos ovalados, tabicados y conidióforos simples (Watanabe, 2010) y confirmado molecularmente mediante la comparación de su secuencia en la base de datos del Banco de Genes del NCBI correspondiendo a *Exserohilum rostratum* CIAD_CP01 (número de acceso MK942343.1).

La inhibición *in vitro* de las cepas de *Streptomyces* por confrontación directa contra *E. rostratum* fue significativamente diferente. Se observó producción escasa de micelio y crecimiento aéreo atípico del hongo patógeno. Estos efectos pueden atribuirse a metabolitos secundarios extracelulares (antibióticos) secretados al medio de cultivo por algunas cepas de *Streptomyces* (Prashith *et al.*, 2010). Cabe resaltar que en algunas confrontaciones se observaron halos de inhibición menores, posiblemente debido a la escasa difusión de compuestos antifúngicos, a la naturaleza química de los mismos y/o a su comportamiento en medios acuosos (León *et al.*, 2011). El crecimiento *in vitro* de *E. rostratum* fue reducido significativamente por todas las cepas de *Streptomyces* evaluadas en confrontación directa, con PICR que fluctuaron de 34.9 a 95.7% (Figura 3), donde la cepa A27 (*Streptomyces misionensis* cepa CIAD-CA27) mostró la mayor actividad antifúngica, seguida por las cepas A19 (*Streptomyces* sp. cepa CIAD-CA19) y A45 (*Streptomyces kanamyceticus* cepa CIAD-CA45) con inhibiciones de 87.9% y 83.8%, respectivamente (Figura 3). Evangelista-Martínez (2014) reportó PICR de 44 a 71% para *Streptomyces*, al día cinco post-confrontación contra *Helminthosporium* sp. Dávila-Medina *et al.* (2013) al evaluar la actividad *in vitro* de actinomicetos contra hongos fitopatógenos reportaron PICR inferiores al 49.4%. En este estudio, cinco de los seis aislados de *Streptomyces* mostraron porcentajes

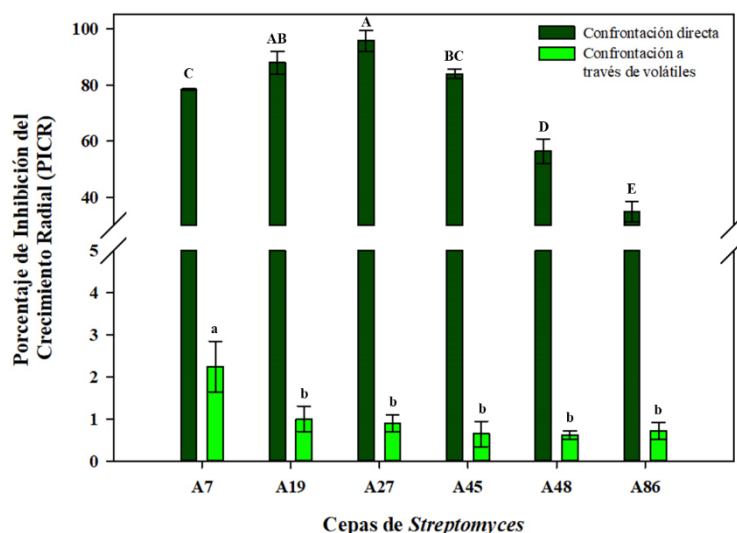


Figura 3. Capacidad antifúngica *in vitro* de cepas de *Streptomyces* spp., contra el hongo *Exserohilum rostratum* en confrontaciones directa y a través de volátiles. Los datos son presentados como medias \pm error estándar. Los valores sobre las barras con las mismas literales indican igualdad estadística, con un 95% de confianza ($\alpha=0.05$) de acuerdo con la prueba de Tukey.

superiores a este valor. En contraste, Pérez-Corral *et al.* (2015) reportaron aislados de actinomicetos que inhibieron por completo el crecimiento de *Fusarium equiseti* infiriendo la posible acción fungistática o fungicida debido a la producción de sustancias biocidas o antibióticos que se difunden a través del medio de cultivo. Este atributo podría ser el caso de la cepa A19 (*Streptomyces* sp. cepa CIAD-CA19), ya que se ha demostrado que cepas de esta especie producen tubercidina, un inhibidor de múltiples procesos metabólicos como la síntesis de ácidos nucleicos, proteínas y ascomicina (Kónya *et al.*, 2006). La antibiosis mostrada contra *E. rostratum* por las cepas de *Streptomyces* puede atribuirse a enzimas extracelulares como quitinasas, b-1,3-glucanasas y antibióticos (González-Franco *et al.*, 2003).

La inhibición *in vitro* de las cepas de *Streptomyces* contra *E. rostratum* en confrontación a través de volátiles fluctuó de 0.6% a 2.2% (Figura 3). La cepa A7 (*Streptomyces cangkringensis* cepa CIAD-CA07), ejerció la mayor actividad mediante volátiles pero menor al mostrado en la confrontación

directa (Figura 3). Los PICR mediante volátiles fueron significativamente menores en comparación con los valores obtenidos en confrontación directa, posiblemente debido a que en esta última hubo mayor producción de metabolitos secundarios (antibióticos) que actúan por medios difusibles en el medio o por competencia de espacio y/o nutrientes, impidiendo que *E. rostratum* creciera óptimamente. Por lo tanto, la mayor actividad antagonica de las cepas evaluadas fue mediante metabolitos difusibles en el medio de cultivo. Boukaew *et al.* (2013), mencionan que el efecto de los volátiles de *Streptomyces* contra hongos se atribuye a la destrucción de su pared celular.

Las seis cepas de *Streptomyces* produjeron al menos una sustancia responsable de la promoción del crecimiento vegetal (Cuadro 1). Las seis cepas produjeron sideróforos del tipo trihidroxamato y fueron capaces de fijar nitrógeno atmosférico. Mientras que solo las cepas A7 (*Streptomyces cangkringensis* cepa CIAD-CA07) y A27 (*Streptomyces misionensis* cepa CIAD-CA27) produjeron AIA. Ninguna cepa fue capaz de solubilizar fósforo inorgánico e insoluble.

Cuadro 1. Capacidad de las cepas de *Streptomyces* spp. en la producción de sustancias promotoras del crecimiento vegetal.

Cepa antagonista	Promotores de crecimiento vegetal			Sideróforos		
	Ácido indol acético	Fijación de Nitrógeno	Solubilización de fosforo inorgánico	Catecol	Trihidroxamato	Dihidroxamato
A7 <i>Streptomyces cangkringensis</i> cepa CIAD-CA07	+	+	-	-	+	-
A19 <i>Streptomyces</i> sp. cepa CIAD-CA19	-	+	-	-	+	-
A27 <i>Streptomyces misionensis</i> cepa CIAD-CA27	+	+	-	-	+	-
A45 <i>Streptomyces kanamyceticus</i> cepa CIAD-CA45	-	+	-	-	+	-
A48 <i>Streptomyces kanamyceticus</i> cepa CIAD-CA48	-	+	-	-	+	-
A86 <i>Streptomyces libani</i> cepa CIAD-CA86	-	+	-	-	+	-

(+) Positivo a la prueba
(-) Negativo a la prueba

Las cepas A7 (*Streptomyces cangkringensis* cepa CIAD-CA07) y A27 (*Streptomyces misionensis* cepa CIAD-CA27) produjeron 3 y 29 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de AIA, respectivamente. Franco-Correa *et al.* (2010) reportaron valores de AIA de 3.05 a 11.9 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para cepas de *Streptomyces*, similares a los obtenidos con las cepas reportadas en este estudio. Mientras que Matsukawa *et al.* (2007) reportaron valores de AIA de 21.8 a 51.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ por especies de *Streptomyces* como *S. purpurascens* NBRC 13077, *S. coelicolor* A3, *S. olivaceus* NBRC 12805 y *S. kasugaensis* NBRC 13851. Las seis cepas de *Streptomyces* spp. produjeron el sideróforo trihidroxamato, de 7.8 a 39.2 % de unidades de sideróforos, las mayores productoras fueron A86 (*Streptomyces libani* cepa CIAD-CA86) y A7 (*Streptomyces cangkringensis* cepa CIAD-CA07), ambas con 39.3 % de unidades de sideróforos (Figura 4).

Braun *et al.* (2009) mencionan que la mayoría de las cepas del género *Streptomyces* producen algún tipo de sideróforo trihidroxamato como ferrioxamina o albomicina una sideromicina (quelante de

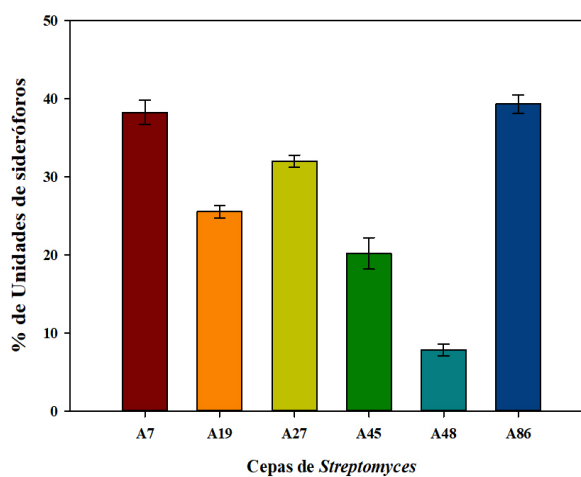


Figura 4. Porcentaje de unidades del sideróforo trihidroxamato producido por las cepas de *Streptomyces* spp. Los datos son presentados como medias \pm error estándar. Los valores sobre las barras con las mismas literales indican igualdad estadística, con un 95% de confianza ($\alpha = 0.05$) de acuerdo con la prueba de Tukey.

hierro) y se le atribuye la capacidad de eliminar a sus competidores biológicos uniendo sustancias tóxicas a sideróforos. Dertz *et al.* (2006) demostraron que algunas cepas de *Streptomyces* son capaces de producir enterobactina (enteroquelina) un sideróforo de alta afinidad que adquiere el hierro de los sistemas microbianos. Todas las cepas de *Streptomyces* spp. evaluadas, fijaron nitrógeno atmosférico. Si bien no presentaron características típicas de crecimiento como ocurre en medios de cultivo enriquecidos, si mostraron una tendencia similar. Todas las cepas de *Streptomyces* fueron incapaces de solubilizar el fósforo inorgánico. En contraste Franco-Correa *et al.* (2010) demostraron la capacidad de algunas cepas de actinomicetos para solubilizar fosfatos inorgánicos y reportan que la solubilización del fósforo ocurre por la formación de ácidos, que actúan como agentes quelantes para el calcio, aumentando la disponibilidad del fósforo para la planta (Nautiyal, 1999; Franco-Correa *et al.*, 2010). Nautiyal (1999) menciona que la solubilización de fosfatos por los microorganismos dependerá del tipo de fosfato que se utilice, dado que no todas las cepas de estos microorganismos tienen la capacidad de solubilizar el fósforo desde fuentes inorgánicas. El estudio demostró el potencial que tiene el género *Streptomyces* para ser usado como posible agente de control biológico de *Exserohilum rostratum*, siendo este el primer reporte del patógeno para el estado de Chihuahua, México. Además de la capacidad antagonista de las cepas, destaca su capacidad para producir sustancias promotoras del crecimiento vegetal, por lo que también podrían ser utilizadas como biofertilizantes.

AGRADECIMIENTOS

El trabajo fue apoyado por el Fondo Sectorial de Investigación para la Educación-Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (México) (Proyecto Ciencia Básica; Clave 286806).

LITERATURA CITADA

- Arnow LE. 1937. Colorimetric determination of the components of 3,4-dihydroxyphenylalanine tyrosine mixtures. The Journal of Biological Chemistry 118(2):531-537. <http://www.jbc.org/content/118/2/531.full.pdf>
- Boukaew S, Plubrukam A and Prasertsan P. 2013. Effect of volatile substances from *Streptomyces philanthi* RM-1-138 on growth of *Rhizoctonia solani* on rice leaf. Biocontrol 58(4): 471-482. <https://doi.org/10.1007/s10526-013-9510-6>
- Braun V, Pramanik A, Gwinner T, Köberle M and Bohn E. 2009. Sideromycins: tools and antibiotics. Biometals 22(1): 3. <https://doi.org/10.1007/s10534-008-9199-7>
- Centko RM, Ratnaweera PB, Tysoe C, Withers SG, Dilip de Silva E and Andersen RJ. 2017. Alpha-glucosidase and alpha-amylase inhibiting thiodiketopiperazines from the endophytic fungus *Setosphaeria rostrata* isolated from the medicinal plant *Costus speciosus* in Sri Lanka. Phytochemistry Letters 22: 76-80. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2017.09.004>
- Chung CL, Longfellow JM, Walsh EK, Kerdieh Z, Van Esbroeck G, Balint-Kurti P and Nelson, R. J. 2010. Resistance loci affecting distinct stages of fungal pathogenesis: Use of introgression lines for QTL mapping and characterization in the maize-*Setosphaeria turcica* pathosystem. BMC Plant Biology 10 (103): 1-25. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-10-103>
- Dávila-Medina MD, Gallegos-Morales G, Hernández-Castillo FD, Ochoa-Fuente YM y Flores-Olivas, A. 2013. Actinomicetos antagonistas contra hongos fitopatógenos de importancia agrícola. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas 4(8):1187-1196. <https://www.scielo.org.mx/pdf/remexca/v4n8/v4n8a6.pdf>
- Dertz EA, Xu J, Stintzi A and Raymond KN. 2006. Bacillibactin-Mediated Iron Transport in *Bacillus Subtilis*. Journal of the American Chemical Society 128 (1): 22-23. <https://doi.org/10.1021/ja055898c>
- Dong J, Fan Y, Gui X, An X, Ma J and Dong Z. 2008. Geographic distribution and genetic analysis of physiological races of *Setosphaeria turcica* in Northern China. American Journal of Agricultural and Biological Science 3(1): 389-398. <https://www.thescipub.com/pdf/10.3844/ajabssp.2008.389.398>
- Evangelista-Martínez Z. 2014. Isolation and characterization of soil *Streptomyces* species as potential biological control agents against fungal plant pathogens. World Journal of Microbiology and Biotechnology 30(5): 1639-1647. <https://doi.org/10.1007/s11274-013-1568-x>
- Franco-Correa M, Quintana A, Duque C, Suárez C, Rodríguez MX and Barea JM. 2010. Evaluation of actinomycete strains for key traits related with plant growth promotion and mycorrhiza helping activities. Applied Soil Ecology 45(3), 209-217. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2010.04.007>
- González-Franco A, Deobald L, Spiak A and Crawford D. 2003. Actinobacterial chitinase-like enzymes: profiles of rhizosphere versus non-rhizosphere isolates. Canadian Journal of Microbiology 49: 683-698. <https://doi.org/10.1139/w03-089>
- Gopalakrishnan S, Pande S, Sharma M, Humayun P, Kiran BK, Sandeep D and Rupela O. 2011. Evaluation of actinomycete isolates obtained from herbal vermicompost for the biological control of *Fusarium* wilt of chickpea. Crop Protection 30(8): 1070-1078. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2011.03.006>
- Kónya A, Szabó Z, Láng I, Barta I and Salát J. 2008. Production of FK520 by *Streptomyces tubercidicus*. Microbiological Research 163(6): 624-632. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2006.10.002>
- Lee J, Postmaster A, Soon HP, Keast D and Carson KC. 2012. Siderophore production by actinomycetes isolates from two soil sites in Western Australia. Biometals 25(2): 285-296. <https://doi.org/10.1007/s10534-011-9503-9>

- León J, Aponte JJ, Rojas R, Cuadra D, Ayala N, Tomás G y Guerrero M. 2011. Estudio de actinomicetos marinos aislados de la costa central del Perú y su actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus* meticilina resistentes y *Enterococcus faecalis* vancomicina resistentes. Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica 28: 237–246. <https://www.scielo.org.pe/pdf/rins/v28n2/a10v28n2>
- Matsukawa E, Nakagawa Y, Limura Y and Hayakawa M. 2007. Stimulatory effect of indole-3-acetic acid on aerial mycelium formation and antibiotic production in *Streptomyces* spp. Actinomycetologica 21(1): 32-39. <https://doi.org/10.3209/saj.SAJ210105>
- Muharram M, Abdelkader M and Alqasoumi S. 2013. Antimicrobial activity of soil actinomycetes isolated from Alkharj, KSA. International Research Journal of Microbiology 4(1): 12-20. <https://www.interestjournals.org/articles/antimicrobial-activity-of-soil-actinomycetes-isolated-from-alkharj-ksa.pdf>
- Nautiyal CS. 1999. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. FEMS Microbiology Letters 170(1): 265-270. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1999.tb13383.x>
- Núñez BM, Robledo MT, Calderón AE, Zavala JDJG, Rojas HVS, Rincón VH A and Colín SM. 2019. Rendimiento de grano y resistencia a tizón foliar ("*Exserohilum turcicum*") de híbridos fértiles y androestériles de maíz. Agrociencia 53(1), 73-88. <https://www.colpos.mx/agrocien/Bimestral/2019/ene-feb/art-7.pdf>
- Peña HB y Reyes I. 2007. Aislamiento y evaluación de bacterias fijadoras de nitrógeno y disolventes de fosfatos en la promoción del crecimiento de la lechuga (*Lactuca sativa* L.). Inter-ciencia 32(8): 560-565. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=33932811>
- Pérez-Corral DA, García-González NY, Gallegos-Morales G, Ruiz-Cisneros MF, Berlanga-Reyes DI and Rios-Velasco C. 2015. Isolation of actinomycetes associated to apple trees rhizosphere antagonistic to *Fusarium equiseti*. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas 6(7): 1629-1638. <http://www.scielo.org.mx/pdf/remexca/v6n7/v6n7a16.pdf>
- Prashith KTR, Vinayaka KS, Soumya KV, Ashwini SK and Kiran R. 2010. Antibacterial and antifungal activity of methanolic extract of *Abrus pulchellus* Wall and *Abrus precatorius* Linn: A comparative study. International Journal of Pharmacology and Toxicology 2: 26–29. https://scholar.google.com/scholar?hl=en&as_sdt=0,5&clust=er=2620410972000518423
- Ruiz-Cisneros MF, Rios-Velasco C, Berlanga-Reyes DI, Ornelas-Paz JJ, Acosta-Muñiz CH, Romo-Chacón A, Zamudio-Flores PB, Pérez-Corral DA, Salas-Marina MÁ, Ibarra-Rendón JE and Fernández-Pavía SP. 2017. Incidence and causal agents of root diseases and its antagonists in apple orchards of Chihuahua, México. Revista Mexicana de Fitopatología 35(3): 1-26. <https://dx.doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1704-3>
- Schwyn B and Neilands JB. 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. Analytical biochemistry 160(1): 47-56. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90612-9](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90612-9)
- Walpolá BC and Yoon MH. 2013. *In vitro* solubilization of inorganic phosphates by phosphate solubilizing microorganisms. African Journal of Microbiology Research 7(27): 3534-3541. <https://doi.org/10.5897/AJMR2013.5861>
- Watanabe T. 2010. Pictorial atlas of soil and seed fungi: Morphologies of cultured fungi and key to species. CRC press.
- Yuan WM and Crawford DL. 1995. Characterization of *Streptomyces lydicus* WYEC108 as a potential biocontrol agent against fungal root and seed rots. Applied and Environmental Microbiology 61(8): 3119-3128. <https://sci-hub.tw/10.0000/aem.asm.org/aem/61/8/3119>

Actividad antifúngica *in vitro* de microorganismos antagonistas contra *Fusarium oxysporum* de rizosfera de árboles de aguacate en Xalisco, Nayarit, México

In vitro antifungal activity of antagonistic microorganisms against *Fusarium oxysporum* from avocado trees rhizosphere of Xalisco, Nayarit, Mexico

María Guadalupe Vega-Torres, Universidad Tecnológica de la Costa, División de Ingenierías en Ciencias Agropecuarias, C.P. 63313, Santiago Ixcuintla, Nayarit, México, María Fernanda Ruiz-Cisneros, Daniel Alonso Pérez-Corral, David Ignacio Berlanga-Reyes, José de Jesús Ornelas-Paz, Claudio Rios-Velasco*, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo-CIAD; A.C., C.P. 31570, Ciudad Cuauhtémoc, Chihuahua, México. Octavio Jhonathan Cambero-Campos, Mario Orlando Estrada-Virgen, Gregorio Luna-Esquivel, Unidad Académica de Agricultura, Universidad Autónoma de Nayarit. C.P. 63155. Xalisco, Nayarit, México. Frédérique Lucciene Denise-Revérchon, Instituto de Ecología, A.C., C.P. 91070 Xalapa, Veracruz, México. *Autor para correspondencia: claudio.rios@ciad.mx

Recibido: 04 de Abril, 2019.

Aceptado: 23 de Mayo, 2019.

Vega-Torres MG, Ruiz-Cisneros MF, Pérez-Corral DA, Berlanga-Reyes DI, Ornelas-Paz JJ, Rios-Velasco C, Cambero-Campos OJ, Estrada-Virgen MO, Luna-Esquivel G y Denise-Revérchon FL. 2019. Actividad antifúngica *in vitro* de microorganismos antagonistas contra *Fusarium oxysporum* de rizosfera de árboles de aguacate en Xalisco, Nayarit, México. Revista Mexicana de Fitopatología 37 (No. Esp. 1): 57-64.

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1904-3

Resumen. El objetivo del estudio fue aislar y caracterizar hongos y bacterias antagonistas de la rizosfera de huertos de aguacate de Xalisco, Nayarit, México, capaces de inhibir el crecimiento *in vitro* de aislados de *Fusarium oxysporum*. En 2018, se recolectaron muestras de suelo asociado a la

rizosfera de árboles sanos de 10 huertos de aguacate cv. Hass en el municipio de Xalisco, Nayarit, México para el aislamiento de posibles antagonistas de *F. oxysporum*. Se aislaron e identificaron morfológicamente 117 actinomicetos (*Streptomyces* spp.), 83 bacterias (*Bacillus* spp.) y 43 hongos (*Trichoderma* spp.). De cada grupo de microorganismos se evaluaron 10 aislados (al azar) contra tres aislados de *F. oxysporum*, y se caracterizaron molecularmente 10 de estos aislados que mostraron la mayor inhibición. De los antagonistas evaluados *in vitro*, destacó el aislado A75 (*Streptomyces* sp.), con PICR que fluctuaron de 26.82 a 67.52%; los aislados B65 y B78 (*Bacillus amyloliquefaciens* y *B. velezensis*, respectivamente) con inhibiciones >50% y los 10 aislados de *Trichoderma*, que inhibieron el crecimiento radial (PICR) de *F. oxys-*

porum entre 35 a 75%. En huertos de aguacate de Xalisco, Nayarit, existen microorganismos antagonistas, especialmente cepas de los géneros *Streptomyces* spp., *Bacillus* spp. y *Trichoderma* spp., con posible potencial para ser usados en el manejo de *Fusarium* spp.

Palabras clave: Biocontrol, antagonista, hongo, actinomicetos, bacterias, enfermedades.

Abstract. The aim of the study was to isolate and characterize antagonistic fungi and bacteria from the rhizosphere of avocado orchards of Xalisco, Nayarit, Mexico, capable of inhibiting the *in vitro* growth of *Fusarium oxysporum* isolates. In 2018, soil samples associated with the rhizosphere of healthy trees from 10 cv. Hass avocado orchards were collected in the municipality of Xalisco, Nayarit, Mexico for the isolation of possible antagonists of *F. oxysporum*. One hundred and seventeen isolates of actinomycetes (*Streptomyces* spp.), 83 bacteria (*Bacillus* spp.), 43 fungi (*Trichoderma* spp.), were isolated and identified morphologically. Ten isolates (randomly) from each group of antagonistic microorganisms were evaluated against three isolates of *F. oxysporum* and 10 of these isolates that showed the greatest inhibition were molecularly characterized. Of the antagonists evaluated *in vitro*, the isolate A75 (*Streptomyces* sp.) highlighted with PIRG that ranged from 26.82 to 67.52%; the isolates B65 and B78 (*B. amyloliquefaciens* and *B. velezensis*, respectively), showed inhibitions >50% and the 10 *Trichoderma* isolates that inhibited the radial growth (PIRG) of *F. oxysporum* between 35 to 75%. In avocado orchards in Xalisco, Nayarit, there are antagonistic microorganisms, especially strains of the *Trichoderma* spp., *Bacillus* spp. and *Streptomyces* spp. genera with putative potential to be used in the management of *Fusarium* spp.

Key words: Biocontrol, antagonists, fungus, actinomycetes, bacteria, diseases.

El aguacate (*Persea americana* Mill; Laurales: Lauraceae), es la cuarta fruta más importante en el mundo con una producción global anual de 4.7 millones de toneladas. Este frutal se considera uno de los cultivos con mayor impacto comercial en México, ya que se cultiva en 26 de sus 32 estados, entre los que destacan Michoacán, Jalisco, Estado de México, Nayarit, Guerrero, Morelos, Chiapas, Puebla, Oaxaca y Durango, estados que aportan más del 97% de la producción (Macías-Macías, 2011). En México, la producción de este frutal se ve limitada y amenazada por el riesgo inminente de ingreso y permanencia de los complejos ambrosiales, los cuales están integrados por un insecto vector (escarabajo) y un hongo fitopatógeno (*Xyleborus glabratus*-*Raffaelea lauricola* y *Euwallacea kuroshio*-*Fusarium euwallaceae*) (Eskalen *et al.*, 2013). Estas asociaciones simbióticas fueron reportadas por Fraedrich *et al.* (2008) para *R. lauricola* y *X. glabratus* donde las hembras del escarabajo son las responsables del transporte de las esporas del hongo, por su parte Freeman *et al.* (2016) reportaron la asociación de *F. euwallaceae* y *Euwallacea nr. fornicatus*; en ambos casos el hongo se encuentra dentro de los micangios del insecto. Los ambrosiales dependen completamente de sus hongos simbióticos para su nutrición, a diferencia de otros escarabajos que se alimentan de la corteza de los árboles (Hughes *et al.*, 2017). En Tijuana, Baja California, México, García-Ávila *et al.* (2016) reportaron la presencia de *E. nr. fornicatus*, sin registro de daños o infestación, sin embargo, existe la preocupación de su diseminación por el territorio nacional, ya que se ha reportado que en regiones donde se han detectado estos complejos, han ocasionado daños e incluso la muerte de plantas hospederas (susceptibles), prin-

principalmente cultivos como cítricos (*Citrus* spp.), aguacate (*P. americana*) y cacao (*Theobroma cacao* L.) (Harrington *et al.*, 2008; Eskalen *et al.*, 2013; Freeman *et al.*, 2016; Hughes *et al.*, 2017). Por estas razones es necesario e imprescindible buscar alternativas para afrontar esta problemática, aunado al principio básico de prevención del control biológico. Una alternativa promisoriosa para el manejo de fitopatógenos en el cultivo de aguacate en México, es el uso de microorganismos antagonistas, entre los cuales destacan los hongos del género *Trichoderma* (Rios-Velasco *et al.*, 2016; Ruiz-Cisneros *et al.*, 2017), y las bacterias de los géneros *Bacillus* y *Streptomyces* (Pérez-Corral *et al.*, 2015). Estos microorganismos han mostrado capacidad antifúngica *in vitro* al ser evaluados contra hongos fitopatógenos (Dávila-Medina *et al.*, 2013; Ruiz-Cisneros *et al.*, 2017), mediante diversos mecanismos como parasitismo, competencia por nutrientes y espacio, producción de sustancias antimicrobianas y resistencia inducida en la planta hospedera, que en consecuencia, reducen tanto la incidencia como la severidad de la enfermedad (Ruiz-Cisneros *et al.*, 2017). En la rizosfera de huertos de aguacate del estado de Nayarit, México, podrían encontrarse microorganismos antagonistas con potencial para

ser usados en el manejo de los hongos *R. lauricola* y *F. euwallaceae*, asociados con los insectos ambrosiales *X. glabratus* y *E. kuroshio*, respectivamente. Por lo anterior, el objetivo del estudio fue, aislar, caracterizar y seleccionar cepas antagonistas de los géneros *Streptomyces*, *Trichoderma* y *Bacillus*, asociados a la rizosfera de árboles de aguacate de Xalisco, Nayarit, México y evaluar su capacidad antifúngica *in vitro* contra *Fusarium oxysporum*, con posible uso para el manejo de *Fusarium* spp.

En 2018, se eligieron 10 huertos de aguacate cv. Hass en el municipio de Xalisco, Nayarit, México. En cada huerto, se recolectaron muestras de suelo (~1 kg) asociado a la rizosfera (10-15 cm de profundidad) de árboles sanos (Cuadro 1). Las muestras, se procesaron en el Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD, Sede Chihuahua-Campus Cuauhtémoc). A partir de las cinco muestras de suelo recolectadas en cada huerto, se mezclaron, y se obtuvo una sub-muestra compuesta de 250 g por cada huerto.

El aislamiento de hongos antagonistas se efectuó a partir de diluciones seriadas de suelo en medios de cultivo generales Papa Dextrosa Agar (PDA), V8-agar (V8) y agar de malta (AM), y el aislamiento de bacterias y actinobacterias en Czapek

Cuadro 1. Localización geográfica de huertos de aguacate cv. Hass muestreados en el municipio de Xalisco, Nayarit, México, 2018.

Sitios de muestreo	Huerto	Coordenadas	Altitud (msnm)
La Curva	1 ^x	21° 22' 12" N, 104° 53' 38" O	1,030
Carrizal 1	1	21° 23' 01" N, 104° 05' 01" O	1,201
Carrizal 2	1	21° 22' 50" N, 104° 56' 01" O	1,194
Carrizal 3	1	21° 22' 09" N, 104° 55' 32" O	1,152
El Devisadero 1	1	21° 26' 30" N, 104° 54' 34" O	1,058
El Devisadero 2	1	21° 54' 16" N, 104° 54' 16" O	1,056
Xalisco	1	21° 26' 39" N, 104° 54' 06" O	984
El Cedro	1	21° 45' 40" N, 104° 44' 10" O	1,078
Camichín de Jauja	1	21° 28' 25" N, 104° 47' 45" O	1,008
Tintilagua de Arriba	1	21° 29' 18" N, 104° 46' 16" O	1,154

msnm: metros sobre el nivel del mar; ^x número asignado al huerto muestreado.

Dox Agar (CDA) y Luria Bertani agar (LB), respectivamente. Las colonias con morfología típica de los microorganismos de interés, se aislaron y se sembraron en los medios de cultivo arriba descritos (Watanabe, 2010; Pridham *et al.*, 1958; Shirling y Gottlieb, 1966).

De cada grupo de posibles antagonistas (hongos, bacterias y actinomicetos) se tomaron al azar, 10 aislados y se confrontaron contra tres aislados de *F. oxysporum*, [F1, F2 y F3 con claves de acceso (MK942348.1, MK942349.1 y MK942350.1, respectivamente) del GenBank] obtenidos de la rizosfera de árboles de aguacate cv. Hass en Xalisco, Nayarit, México. La identificación morfológica de los hongos, bacterias y actinomicetos, se hizo de acuerdo con sus caracteres morfológicos macroscópicos típicos, tales como producción de pigmentos y color del micelio aéreo y de sustrato, así como de sus caracteres microscópicos (forma, tamaño y arreglo de conidios/bacilos) para lo cual realizaron montajes en portaobjetos de los tres grupos de microorganismos y se observaron en un microscopio óptico (Carl Zeiss, Jena, Alemania) a 1000x magnificaciones y la ayuda de claves taxonómicas (Watanabe, 2010; Pridham *et al.*, 1958; Shirling y Gottlieb, 1966).

Las confrontaciones con *Streptomyces* spp., se realizaron de acuerdo con Pérez-Corral *et al.* (2015). Las confrontaciones de *Bacillus* spp., contra *Fusarium* fueron similares a las de *Streptomyces*, solo que los explantes de *Bacillus* (6 mm de diámetro) se colocaron en los puntos cardinales al mismo tiempo que el *Fusarium* (6 mm) (Rios-Velasco *et al.*, 2016). Las confrontaciones duales de *Trichoderma* contra los aislados de *Fusarium*, se realizaron de acuerdo con Rios-Velasco *et al.* (2016) y Ruiz-Cisneros *et al.* (2017). El crecimiento micelial de *F. oxysporum* se midió sistemáticamente cada 24 h para estimar el porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR) en los tres experimentos.

Los aislados que mostraron capacidad antifúngica *in vitro* a *F. oxysporum* se identificaron molecularmente. A los hongos, se les extrajo el ADN genómico (ADNg) de acuerdo con Ruiz-Cisneros *et al.* (2017). Subsecuentemente se amplificó el espaciador transcrito interno (ITS, por sus siglas en inglés) del ARN ribosomal (ARNr), usando los iniciadores universales ITS5 (5'-GGAAGTAAAGTCGTAACAAGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGTTATTGATATGC-3'). La identificación molecular de bacterias y actinomicetos se hizo mediante la extracción del ADNg de acuerdo con Pérez-Corral *et al.* (2015). Posteriormente, se utilizó para amplificar el gen del 16S del ARNr por PCR, usando los iniciadores universales EU(F) (5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3') y EU(R) (5'-TACCTTGTTACGACTTCACC-3'). Tanto el ADNg como los productos de PCR de los tres grupos de antagonistas, se examinaron por electroforesis en geles de agarosa a 1%, en un ChemiDoc™ XRS+ imaging system (Bio-Rad; CA, EUA). Estos productos fueron secuenciados en MacroGen EUA (Rockville, MD, EUA). Las secuencias obtenidas fueron comparadas contra las bases de datos del NCBI usando el algoritmo de BLAST para verificar el porcentaje de identidad correspondiente a cada especie y fueron depositadas en el GenBank del NCBI. Todas las pruebas se realizaron por triplicado. Como diseño experimental se usó un completamente al azar con tres repeticiones, cada antagonista fue un tratamiento, la unidad experimental fue una caja Petri y cada repetición constó de tres unidades experimentales (en total 9 cajas Petri por confrontación) y como testigo se consideraron 10 cajas de cada aislado de *F. oxysporum* (sin la presencia del antagonista). Los datos obtenidos del PICR se sometieron a un análisis de varianza (ANDEVA) y se usó la prueba Tukey ($p=0.05$) para separar las medias. Los análisis se realizaron con el programa estadístico Statistical Analysis System versión 9.0.

De las muestras de suelo asociado a la rizosfera de árboles de aguacate en Xalisco, Nayarit, México, se obtuvieron 247 microorganismos de los géneros *Streptomyces* spp. (117 aislados), *Bacillus* spp. (83 aislados), y *Trichoderma* spp. (47 aislados), algunos de estos al ser evaluados *in vitro* contra los aislados de *F. oxysporum*, mostraron acción antifúngica. De acuerdo con Buyer (1995) la eficiencia de los medios semi-selectivos, es debida a las diferencias en requerimientos nutricionales para el crecimiento de microorganismos y a la disponibilidad de nutrientes en el medio, lo cual tiene un efecto positivo en el aislamiento de microorganismos específicos.

De las pruebas de antagonismo, se obtuvieron algunos aislados de los géneros *Streptomyces* (2), *Bacillus* (4) y *Trichoderma* (4), con actividad antifúngica *in vitro* contra *F. oxysporum* (Figura 1).

La inhibición *in vitro* de *Streptomyces* spp. sobre los tres aislados de *F. oxysporum* fluctuó de 14.45 a 67.5%, siendo el aislado A75 (*Streptomyces* sp.) el que presentó la mayor actividad antifúngica al confrontarse contra *F. oxysporum* (aislado F1; Figura 1). El resto de los aislados de *Streptomyces* mostraron PICR <40%. La inhibición de los aislados de *Streptomyces* sobre *F. oxysporum* (aislado F3) no superó el 28%. Nuestros resultados son similares a los reportados por Dávila-Medina *et al.* (2013) que al evaluar la actividad *in vitro* de actinomicetos contra *Fusarium* sp., encontraron inhibiciones <49.36%. Pérez-Corral *et al.* (2015) reportaron diferencias en la capacidad antifúngica de sus cepas de *Streptomyces* al evaluarlos contra *F. equiseti*. De acuerdo con Koontz y Marcy (2003) la acción antifúngica de *Streptomyces* depende del tipo de enzimas producidas (amilasa, asparaginasa,

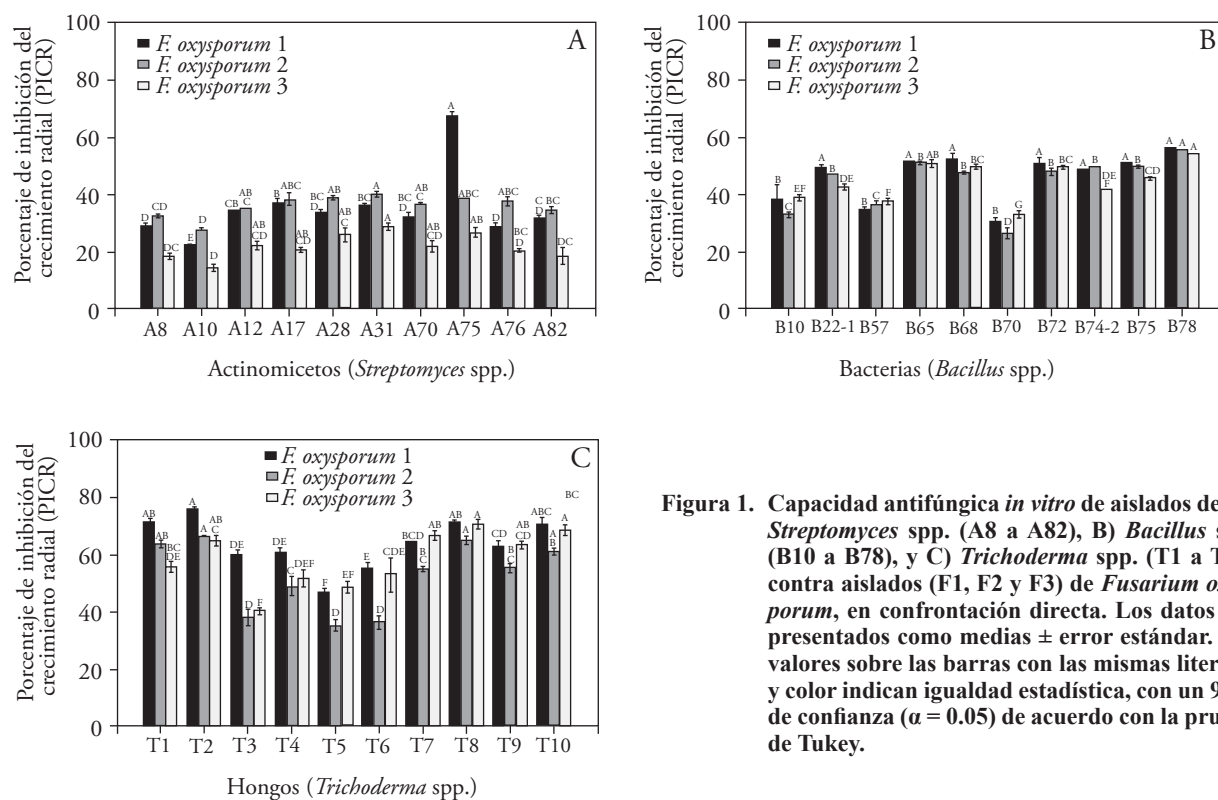


Figura 1. Capacidad antifúngica *in vitro* de aislados de: A) *Streptomyces* spp. (A8 a A82), B) *Bacillus* spp. (B10 a B78), y C) *Trichoderma* spp. (T1 a T10) contra aislados (F1, F2 y F3) de *Fusarium oxysporum*, en confrontación directa. Los datos son presentados como medias \pm error estándar. Los valores sobre las barras con las mismas literales y color indican igualdad estadística, con un 95% de confianza ($\alpha = 0.05$) de acuerdo con la prueba de Tukey.

atalasa) y compuestos antifúngicos que contaminan el medio y al mismo tiempo inhiben el crecimiento del hongo. Los aislados de *Bacillus* spp., mostraron inhibiciones *in vitro* >26%, pero <56% contra los tres aislados de *F. oxysporum*. Del género *Bacillus* destacaron los aislados B65 y B78 correspondientes a *B. amyloliquefaciens* y *B. velezensis* que mostraron PICR >50% contra los tres aislados de *F. oxysporum* (Figura 1b). Estos porcentajes se encuentran dentro de lo reportado por Ruiz-Cisneros *et al.* (2017), al evaluar las cepas *B. methylotrophicus* y *B. amyloliquefaciens* contra *Phytophthora cactorum* y *Pythium* sp., con 92.3 y 18.8 %, respectivamente. Korsten *et al.* (1997) demostraron el potencial de *Bacillus* spp., para el control de enfermedades fungosas en aguacate, en pre y poscosecha hasta en un 72%. La inhibición *in vitro* mostrada por *Bacillus* spp., depende de su capacidad para producir metabolitos antifúngicos como iturina A, surfactina, lipopéptidos cíclicos, y/o fengicina (Arguelles-Arias *et al.*, 2009).

De los tres grupos de antagonistas evaluados *in vitro*, destacaron los hongos del género *Trichoderma* spp., al inhibir el crecimiento de los tres aislados de *F. oxysporum* con los mayores porcentajes en comparación con los otros antagonistas evaluados. Esta habilidad se atribuye a la síntesis de sustancias antibióticas en algunas especies de este género (Ruiz-Cisneros *et al.*, 2017). El PICR ejercido por estos aislados sobre *Fusarium* spp., fluctuó de 35 a 75% (Figura 1c). El aislado F1 de *F. oxysporum* fue el más susceptible a los 10 aislados de *Trichoderma* spp., donde el PICR fue >47%. Mientras que el menos susceptible fue *F. oxysporum* (aislado F2). Ruiz-Cisneros *et al.* (2017) reportaron un comportamiento similar, al evaluar cuatro cepas de *Trichoderma* contra *P. cactorum* con inhibiciones >80%. Almaraz *et al.* (2012) demostraron que la

capacidad de cepas de *Trichoderma* para inhibir el crecimiento micelial de *P. cinnamomi*, se debe a la producción de compuestos volátiles y antibióticos. Algunas cepas de *Trichoderma*, en especial las de *T. harzianum* producen el antibiótico 6-pentil- α -pirona, el cual tiene un efecto en la inhibición del crecimiento del hongo, además de regular los genes responsables de la biosíntesis de trichotecenos, micotoxinas con actividad antimicrobial de amplio espectro (Almaraz *et al.*, 2012). Gajera y Vakharia (2010), mencionan que la acción antifúngica de algunas especies de *Trichoderma* se debe a la producción de enzimas extracelulares y compuestos antifúngicos.

Los aislados de *Streptomyces* (2), *Bacillus* (4) y *Trichoderma* (4) que mostraron capacidad antagónica *in vitro* contra *F. oxysporum* se identificaron molecularmente mediante la comparación de sus secuencias con las registradas en el NCBI, confirmando su identificación morfológica (Cuadro 2), donde destacaron, *S. olivicoloratus* (aislado A31) y *Streptomyces* sp. (aislado A75). Los aislados B65 y B72 del género *Bacillus* correspondieron a la especie *B. amyloliquefaciens*, mientras que los aislados B68 y B78 correspondieron a *B. subtilis* y *B. velezensis*, respectivamente. Del género *Trichoderma* se identificaron las especies *T. koningiopsis* (aislado T1), *T. parareesei* (aislado T8), *T. lixii* (aislado T10) y *T. harzianum* (aislado T2), destacando éste último por su gran potencial en el control biológico contra hongos fitopatógenos, que junto con *T. asperellum* son las especies con mayor distribución en México (Hernández-Castillo *et al.*, 2011).

En la rizosfera de huertos de aguacate cv. Hass de Xalisco, Nayarit, México, existe una gran diversidad de microorganismos de los géneros *Streptomyces*, *Bacillus* y *Trichoderma* antagónicos a *F. oxysporum* y que podrían ser antagónicos a otras especies de este hongo.

Cuadro 2. Identificación morfológica y molecular de aislados de *Streptomyces* spp., *Bacillus* spp. y *Trichoderma* con potencial antifúngico contra *Fusarium oxysporum* aislados de rizosfera de aguacate cv. Hass en Xalisco, Nayarit, México.

Clave del aislado	Procedencia	Morfológica	Identificación Molecular	Identidad (%)	Clave de acceso del GenBank
Actinomicetos					
A31	El Devisadero 1	<i>Streptomyces</i> sp.	<i>Streptomyces olivicoloratus</i>	99	MK941877.1
A75	Tintilagua de Arriba	<i>Streptomyces</i> sp.	<i>Streptomyces</i> sp.	98.8	MK941878.1
Bacterias					
B65	Xalisco 1	<i>Bacillus</i> sp.	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	100	MK941879.1
B68	Carrizal 1	<i>Bacillus</i> sp.	<i>Bacillus subtilis</i>	100	MK941880.1
B72	El Devisadero 2	<i>Bacillus</i> sp.	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	100	MK941881.1
B78	Tintilagua de Arriba	<i>Bacillus</i> sp.	<i>Bacillus velezensis</i>	99.02	MK941882.1
Hongos					
T1	Carrizal 2	<i>Trichoderma</i> sp.	<i>Trichoderma koningiopsis</i>	99	MK942345.1
T2	El Devisadero 2	<i>Trichoderma</i> sp.	<i>Trichoderma</i> cf. <i>harzianum</i>	98.7	MK942346.1
T8	Xalisco 1	<i>Trichoderma</i> sp.	<i>Trichoderma parareesei</i>	98	Sin clave
T10	Tintilagua de Arriba	<i>Trichoderma</i> sp.	<i>Trichoderma lixii</i>	99	MK942347.1

AGRADECIMIENTOS

El trabajo fue apoyado por el Fondo Institucional de Fomento Regional para el Desarrollo Científico y de Innovación-Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (México) (Proyecto FORDECYT; Clave 292399).

LITERATURA CITADA

- Almaraz SA, Alvarado RD, Tlapal BB y Espinoza VD. 2012. Identificación de hongos antagonistas a *Phytophthora cinnamomi* Rands en bosques de encino del Arrayanal, Colima y Tecoaapa, Guerrero. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestal y del Ambiente* 18 (3): 341-355. <https://dx.doi.org/10.5154/r.rchscfa.2011.09.061>
- Arguelles-Arias A, Ongena M, Halimi B, Lara Y, Brans A, Joris B and Fickers P. 2009. *Bacillus amyloliquefaciens* GA1 as a source of potent antibiotics and other secondary metabolites for biocontrol of plant pathogens. *Microbial Cell Factories* 8(1): 12-63. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-8-63>
- Buyer JS. 1995. A soil and rhizosphere microorganism isolation and enumeration medium that inhibits *Bacillus mycoides*. *Applied and Environmental Microbiology* 61(5): 1839-1842. <https://aem.asm.org/content/aem/61/5/1839.full.pdf>
- Dávila-Medina MD, Gallegos-Morales G, Hernández-Castillo FD, Ochoa-Fuente YM y Flores-Olivas A. 2013. Actinomicetos antagonísticos contra hongos fitopatógenos de importancia agrícola. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 4(8): 1187-1196. <http://www.scielo.org.mx/pdf/remexca/v4n8/v4n8a6.pdf>
- Eskaen A, Stouthamer R, Lynch SC, Rugman-Jones PF, Twizeyimana M, Gonzalez A, and Thibault T. 2013. Host range of *Fusarium dieback* and its ambrosia beetle (Coleoptera: Scolytinae) vector in southern California. *Plant Disease* 97(7): 938-951. <https://doi.org/10.1094/PDIS-11-12-1026-RE>
- Freeman S, Sharon M, Dori-Bachash M, Maymon M, Beausoy E, Maoz Y, Margalit O, Protasov A, and Mendel Z. 2016. Symbiotic association of three fungal species throughout the life cycle of the ambrosia beetle *Euwallacea* nr. *forficatus*. *Symbiosis* 68(1-3): 115-128. <https://doi.org/10.1007/s13199-015-0356-9>
- García-Ávila CDJ, Trujillo-Arriaga FJ, López-Buenfil JA, González-Gómez R, Carrillo D, Cruz LF, Ruiz-Galván I, Quezada-Salinas A and Acevedo-Reyes N. 2016. First report of *Euwallacea* nr. *forficatus* (Coleoptera: Curculionidae) in Mexico. *Florida Entomologist* 99(3): 555-557. <https://doi.org/10.1653/024.099.0335>
- Gajera HP and Vakharia DN. 2010. Molecular and biochemical characterization of *Trichoderma* isolates inhibiting a phytopathogenic fungi *Aspergillus niger* Van Tieghem. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 74: 274-282. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2010.04.005>
- Harrington TC, Fraedrich SW and Aghayeva DN. 2008. *Raffaelea lauricola*, a new ambrosia beetle symbiont and pathogen on the Lauraceae. *Mycotaxon* 104:399-404. https://www.srs.fs.usda.gov/pubs/ja/ja_harrington008.pdf
- Hernández-Castillo FD, Berlanga-Padilla AM, Gallegos-Morales G, Cepeda-Siller M, Rodríguez-Herrera R, Aguilar-González CN y Castillo RF. 2011. *In vitro* antagonist action of *Trichoderma* strains against *Sclerotinia sclerotiorum* and *Sclerotium cepivorum*. *American Journal of Agricultural and Biological Sciences* 6 (3): 410-

417. <https://pdfs.semanticscholar.org/4677/cd523afb-c6b90f4cbe36ed0da94e4b7f5493.pdf>
- Hughes MA, Martini X, Kuhns E, Colee J, Mafra-Neto A, Ste-linski LL, and Smith JA. 2017. Evaluation of repellents for the redbay ambrosia beetle, *Xyleborus glabratus*, vector of the laurel wilt pathogen. *Journal of Applied Entomology* 141(8): 653-664. <https://doi.org/10.1111/jen.12387>
- Koontz J and Marcy J. 2003. Formation of natamycin: cyclo-dextrin inclusion complexes and their characterization. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 51: 7106-7110. <https://doi.org/10.1021/jf030332y>
- Korsten L, De-Villiers EE, Wehner RC and Kotzet JM. 1997. Field spray of *Bacillus subtilis* and fungicides for control of preharvest fruit disease of avocado in South Africa. *Plant Disease* 81: 455-459. <https://dx.doi.org/10.1094/PDIS.1997.81.5.455>
- Macías-Macías A. 2011. México en el mercado internacional de aguacate. *Revista de Ciencias Sociales*. 17(3): 517-532. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=28022767011>
- Pérez-Corral D, García-González N, Gallegos-Morales G, Ruiz-Cisneros M, Berlanga-Reyes D and Rios-Velasco C. 2015. Isolation of actinomycetes associated to apple trees rhizosphere antagonistic to *Fusarium equiseti*. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 6(7): 1629-1638. <http://www.scielo.org.mx/pdf/remexca/v6n7/v6n7a16.pdf>
- Pridham TG, Hesseltine CW and Benedict RG. 1958. A guide for the classification of Streptomycetes according to selected groups. Placement of strains in morphological sections. *Applied Microbiology* 6(1): 52-79. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1057356/pdf/applmicro00315-0061.pdf>
- Rios-Velasco C, Caro CJ, Berlanga RD, Ruiz CM, Ornelas PJ, Salas MM, Villalobos PE and Guerrero PV. 2016. Identification and antagonistic activity *in vitro* of *Bacillus* spp. and *Trichoderma* spp. isolates against common phytopathogenic fungi. *Revista Mexicana de Fitopatología* 34(1): 84-99. <https://dx.doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1507-1>
- Ruiz-Cisneros M, Rios-Velasco C, Berlanga-Reyes D, Ornelas-Paz J, Acosta-Muñiz C, Romo-Chacón A, Zamudio-Flores P and Pérez-Corral DA. 2017. Incidence and causal agents of root diseases and its antagonists in apple orchards of Chihuahua, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 35(3): 437-462. <http://rmf.smf.org.mx/Vol3532017/RMF1704-3.pdf>
- Shirling EB and Gottlieb D. 1966. Method for characterization of Streptomycetes species. *International Journal of Systematic Bacteriology* 16(3): 313-340. doi: 10.1099/00207713-16-3-313.
- Watanabe T. 2010. Pictorial atlas of soil and seed fungi: morphologies of cultured fungi and key to species: CRC press. 426 p.

Variabilidad morfológica y sensibilidad de *Phytophthora capsici* causando marchitez en chile pimiento morrón en Chihuahua, México

Morphological variability and sensitivity of *Phytophthora capsici* causing wilt in bell pepper in Chihuahua, Mexico

Celina Sánchez-Gurrola, Nuria Gómez-Dorantes, Gerardo Rodríguez-Alvarado, Sylvia Patricia Fernández-Pavía*. Laboratorio de Patología Vegetal. Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Carretera Morelia-Zinapécuaro Km 9.5, Tarímbaro, Michoacán. C.P. 58880. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH). Graciela Ávila-Quezada. Facultad de Ciencias Agrotecnológicas, Universidad Autónoma de Chihuahua, Calle Escorza 900, Chihuahua, Chihuahua, México. CP. 31000. *Autor de Correspondencia: fpavia@umich.mx

Recibido: 10 de Abril, 2019.

Aceptado: 16 de Junio, 2019.

Sánchez-Gurrola C, Gómez-Dorantes N, Rodríguez-Alvarado G, Fernández-Pavía SP y Ávila-Quezada G. 2019. Variabilidad morfológica y sensibilidad de *Phytophthora capsici* causando marchitez en chile pimiento morrón en Chihuahua, México. Revista Mexicana de Fitopatología 37(No. Esp. 1): 65-71.

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1904-4

Resumen. A nivel mundial, México es el principal exportador del chile pimiento morrón (*Capsicum annuum*). El cultivo es afectado por diversas enfermedades, siendo la marchitez del chile ocasionada por *Phytophthora capsici* una de las más importantes. Este fitopatógeno posee alta variabilidad en virulencia y sensibilidad a fungicidas. No existen en México estudios sobre poblaciones de *P. capsici* para pimiento morrón. El objetivo de este trabajo fue determinar la diversidad de aislados de

P. capsici obtenidos de plantas de pimiento morrón con marchitez en Delicias, Chihuahua, México, mediante los marcadores fenotípicos: patrón de crecimiento de la colonia, tipo de compatibilidad, virulencia y sensibilidad a fungicidas. Los tipos de colonia fueron: estrellado (74%), ligeramente petaloide (14%) y radial (12%). Se detectaron aislados sensibles (53%), con sensibilidad intermedia (42%) e insensibles (5%) a mefenoxam. El 86.6% de los aislados inoculados fueron altamente virulentos, produjeron síntomas cuatro días después de la inoculación. Se detectaron los dos tipos de compatibilidad (TC) A1 y A2. Se formaron oosporas *in planta* al inocular los dos TC detectados en una misma planta. Los resultados sugieren que existe reproducción sexual en campo y como consecuencia variabilidad entre los aislados de *P. capsici*, responsables de la marchitez en cultivos de chile pimiento morrón en Delicias, Chihuahua, México.

Palabras clave: oomicetes, *Capsicum annuum*, reproducción sexual.

Abstract. Mexico is the main exporter of bell pepper (*Capsicum annuum*) worldwide. The crop is affected by several diseases being wilt caused by *Phytophthora capsici* one of the most important. This phytopathogen has high variability in virulence and sensitivity to fungicides. There are no studies on populations of *P. capsici* from bell pepper in Mexico. The objective of this study was to determine the diversity of isolates of *P. capsici* obtained from bell pepper plants with wilt from Delicias, Chihuahua, Mexico by phenotypic markers: colony pattern, compatibility type, virulence and sensitivity to fungicides. The types of colony observed were: stellate (74%), slightly petaloid (14%) and radial (12%). Sensitive isolates were detected (53%), with intermediate sensitivity (42%) and insensitive (5%) to mefenoxam. The 86.6% of the isolates inoculated were highly virulent, causing symptoms four days after inoculation. Both mating types (MT) A1 and A2 were detected. Oospore formation *in planta* was achieved inoculating both MT found in the same plant. The results suggest that there is sexual reproduction in the field and as a consequence diversity among the isolates of *P. capsici*, which cause wilt in bell pepper crops from Delicias, Chihuahua, Mexico.

Key words: oomycetes, *Capsicum annuum*, sexual reproduction.

El chile es un cultivo importante y es originario de México, una tercera parte de la producción nacional se exporta a países de Europa, Asia y América. El país tiene el primer lugar a nivel internacional en la exportación de pimientos y el tercero en chile verde (SAGARPA, 2018). Durante el año

2017, México se ubicó como el principal exportador de pimientos a nivel mundial, al comercializar un volumen de 150,304 ton, que significó ingresos por un total de 153.7 millones de dólares (SAGARPA, 2018). El cultivo es afectado por la incidencia de la marchitez del chile, una enfermedad ocasionada por el oomicete *Phytophthora capsici*. Este patógeno es considerado el factor limitante más importante en la producción de *Capsicum annuum* donde provoca cuantiosas pérdidas económicas (Silva-Rojas *et al.*, 2009). Su presencia ha propiciado que algunas regiones productoras importantes hayan disminuido la superficie de siembra o el desplazamiento de la producción a nuevas áreas (Guigón-López y González-González, 2001).

Actualmente, el control de *P. capsici* se basa en un programa de manejo integrado que incluye: prácticas culturales, la aplicación de fungicidas, fumigantes, agentes biológicos y el uso de variedades resistentes (Foster y Hausbeck, 2010). El Mefenoxam, enantiómero activo del metalaxil suele ser utilizado para controlar especies de *Phytophthora* (Parra y Ristaino, 1998). Sin embargo, el uso indiscriminado de este producto provoca un severo e irreversible impacto ambiental, es tóxico para el ser humano y promueve la resistencia del patógeno. El empleo de injertos en patrones resistentes representa un método alternativo para el control de *P. capsici*, debido a su eficacia e inocuidad para el ambiente. En un estudio realizado en Delicias, Chihuahua en el año 2012 se encontró que la variedad comercial Terrano tiene resistencia a la enfermedad provocada por *P. capsici* y favoreció el aumento de la producción en un 50%, mejorando los parámetros de calidad del fruto del pimiento morrón (Sánchez-Chávez *et al.*, 2015).

Entre mayor diversidad genética posea una especie mayor será su capacidad de adaptación a distintas condiciones (Piñero *et al.*, 2008). En especies del género *Phytophthora* las fuentes de variación

se presentan por flujo de genes en las poblaciones de manera local o a grandes distancias, recombinación sexual o asexual, recombinación mitótica, parasexualidad, migración y selección natural (Goodwin, 1997). Uno de los marcadores utilizados para detectar variabilidad es la compatibilidad sexual; *P. capsici* es una especie heterotálica y requiere de los dos tipos de compatibilidad (A1 y A2) para completar el ciclo sexual y formar oosporas. La recombinación es la forma más eficiente para desarrollar diversidad genética. Otro de los marcadores para determinar la diversidad de poblaciones, es la resistencia a fungicidas, como el metalaxil y el mefenoxam, que son los más utilizados para el control de oomicetes (Lamour y Hausbeck, 2003). Se ha reportado que la resistencia a fungicidas en especies de *Phytophthora* es el resultado de mutaciones estables y heredables (Hwang y Benson, 2005). En México no existen estudios sobre las poblaciones de este importante fitopatógeno en los cultivos de chile del tipo pimiento morrón.

El trabajo se realizó en el Laboratorio de Patología Vegetal del Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Se utilizaron 86 aislados previamente identificados como *P. capsici* en base a morfología (esporangios papilados y bipapilados, con formas variables y con pedicelo caído) obtenidos de plantas de pimiento morrón de la variedad Fascinato injertadas sobre patrón Terrano de cultivos con síntomas de marchitez en Delicias, Chihuahua, México. Para la determinación del tipo de compatibilidad de los aislados se utilizaron cepas de referencia de *P. capsici*: 2C (A1) y 3C (A2) del Laboratorio de Patología Vegetal-UMSNH, las cruces se realizaron en el medio de cultivo V8 (Campbell's®) agar y se incubaron a 25 °C durante diez días en oscuridad. Para describir el patrón de crecimiento de las colonias los aislados se sembraron en el medio de cultivo Papa- Dextrosa-

Agar (PDA) (Bioxon®) y se incubaron a 25 °C en oscuridad durante siete días y se compararon con los patrones descritos por Erwin y Ribeiro (1996).

Para evaluar la resistencia a fungicidas se utilizó el medio de cultivo harina de maíz (Sigma-Aldrich®) suplementado con 100 µg/ mL de mefenoxam (Ridomil Gold® 4E, 46.2 i.a.) y como control, el mismo medio sin fungicida. Se colocó un círculo de agar con micelio (9 mm) de cinco días de crecimiento en el centro de la caja Petri, las cajas se distribuyeron al azar con dos repeticiones para cada aislado y se incubó a 25 °C±1 durante cinco días. Las mediciones del crecimiento radial se hicieron en dos direcciones cada 24 h durante siete días. Para evaluar la sensibilidad de los aislados al mefenoxam se utilizó el rango propuesto por Lamour y Hausbeck (2003) con respecto al porcentaje de crecimiento del control: Sensible (S), cuando el crecimiento fue < 30%, Sensibilidad intermedia (SI) > 30% y < 90%; e Insensibles (I) > 90%.

Para la determinación de la severidad se utilizaron semillas de plantas de pimiento morrón variedad Dashen F-1, la cual fue susceptible en estudios previos. Estas se desinfestaron con alcohol al 70% durante 30 seg. Se sembraron en semilleros con sustrato del tipo Peat Moss y se mantuvieron en cámara húmeda por diez días. Cinco semanas después, las plántulas se transplantaron en charolas de germinación de seis compartimentos con un sustrato conformado por una mezcla de suelo-arena 1:1 (P: P) estéril y se adicionó una solución nutritiva. Para las pruebas se seleccionaron 15 aislados (CPV-161,CPV-163,CPV-166,CPV-174,CPV-179,CPV-190,CPV-191,CPV-197,CPV-201,CPV-203,CPV-210,CPV-217,CPV-226,CPV-229 y CPV-234) que incluían los dos tipos de compatibilidad. La producción de esporangios y zoosporas se realizó mediante el procedimiento de Ristaino (1990) con modificaciones. En la preparación del inóculo, cada aislado se sembró en el medio jugo V8-agar

durante 5-7 días a 25 °C en oscuridad. La producción de esporangios se indujo a través de cortes del medio con micelio de cada aislado que se cubrieron con agua desionizada estéril e incubaron a 25 °C en oscuridad hasta observar la formación de esporangios. Para la liberación de zoosporas, los aislados se sometieron a un choque térmico a 4 °C por 30-45 min. El conteo de zoosporas se realizó con una cámara de Neubauer. Las plantas con diez semanas de crecimiento se inocularon con 1 mL de una suspensión de zoosporas [1000 zoosporas mL⁻¹], con seis repeticiones por aislado. Las plantas testigo se inocularon con 1 mL de agua desionizada estéril. Tres aislados no produjeron suficientes esporangios y se inocularon mediante dos cuadros de agar (1 cm³) con micelio depositados sobre la raíz de cada planta y se cubrieron con la mezcla de suelo. Las plantas se mantuvieron inundadas durante 24 h para favorecer el establecimiento del patógeno. Una vez retirado el exceso de agua, se regaron cada tercer día. El avance de la necrosis de los tallos se midió 15 días después de la inoculación. Para evaluar el índice de severidad (IS) se elaboró la siguiente escala: 1: planta sana; 2: planta <10% de necrosis en tallo; 3: plantas con > 10 % y ≤ 30% de necrosis en tallo y 4: plantas con >30% y < 50% de necrosis en tallo. Las observaciones se realizaron cada 24 h durante 15 días. El reaislamiento del patógeno se realizó a partir de tejido con síntomas de necrosis

en tallo, en el medio de cultivo harina de maíz con antibióticos y fungicidas (pentacloronitrobenzeno 0.10 g L⁻¹; natamicina 0.02 g L⁻¹; ampicilina 0.27 g L⁻¹; rifampicina 0.01 g L⁻¹; himexazol 0.075 g L⁻¹). Para inducir la formación de esporangios se utilizó el medio de cultivo jugo V8 agar.

Debido a que se obtuvieron aislados con los dos tipos de compatibilidad procedentes de una misma planta, se indujo la formación de oosporas *in planta* inoculando seis plantas con 10000 zoosporas mL⁻¹, se colocó el TC A1 en la base del tallo y dos cuadros de agar con micelio del TC A2 en la raíz, cubriendo con suelo. Las plantas inoculadas se mantuvieron bajo condiciones de invernadero hasta la observación de síntomas. Cuatro días después, se extrajeron tres plantas con necrosis en el tallo y se desinfectaron con agua corriente y jabón comercial. Se cortaron fragmentos de 0.5 cm², se colocaron en un vaso de precipitado con 20 mL de etanol al 96% a 78°C y se dejaron reposar durante 2 h. Se removió la epidermis del tejido y se colocó en un portaobjetos con una gota azul de lactofenol (5%), y se observó en un microscopio compuesto (Leica®) con los aumentos 400x y 1000x. Se detectaron los dos tipos de compatibilidad. De los 86 aislados el TC A2 presentó la mayor frecuencia con 67% y el TC A1 el 33%. Se observaron oosporas pleróticas con anteridios anfíginos (Figura 1a). El hallazgo de los dos tipos de compatibilidad sugiere la presencia

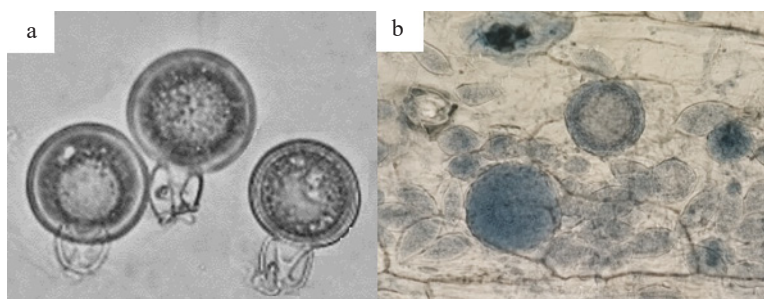


Figura 1. a) Oosporas *in vitro* (400x) observadas en las cruces realizadas para determinar el tipo de compatibilidad; b) Oospora *in planta* (1000X) obtenidas al inocular ambos tipos de compatibilidad en una misma planta.

de la reproducción sexual en cultivos de pimiento morrón muestreados. Esto puede contribuir a que la enfermedad de la marchitez sea recurrente, las oosporas representan la fuente de inóculo primario. La presencia de la reproducción sexual también sugiere la existencia de diversidad en *P. capsici* en estos campos de cultivo, como consecuencia del intercambio de material genético entre aislados. Estudios anteriores en otras variedades de chile (*C. annuum*) en México también han confirmado la presencia de ambos tipos de compatibilidad en zonas productoras de chile en los estados de Aguascalientes, Chihuahua, Guanajuato, Jalisco y Zacatecas (Pérez-Moreno *et al.*, 2003; Rodríguez-Moreno *et al.*, 2004; Silva-Rojas *et al.*, 2009; Castro-Rocha *et al.*, 2016). Se observaron tres patrones de crecimiento de las colonias (Figura 2): el 74% de los aislados presentaron el patrón estrellado, 14% ligeramente petaloide y el 12% radial. Silva-Rojas *et al.* (2009), reportan el tipo de crecimiento estrellado en los aislados de Chihuahua que analizaron. Algunos autores han señalado que la obtención de diferentes tipos de crecimiento de las colonias es la primera evidencia de la variabilidad entre aislados de *P. capsici* (Granke *et al.*, 2011), por tanto, de acuerdo con los diferentes patrones de crecimiento observados en el presente estudio, puede considerarse

esta característica como el primer indicio de diversidad en esta población de *P. capsici* aislados de pimiento morrón provenientes de Chihuahua.

Los aislados expuestos a 100 ppm, 53% presentaron sensibilidad (S), 42% sensibilidad intermedia (SI) y 5% insensibles (I). Los valores obtenidos contrastan con los registrados por Silva-Rojas *et al.* (2009), quienes, en zonas productoras de chile en el sur del estado de Chihuahua, encontraron que todos los aislados obtenidos presentaron sensibilidad. Los resultados para los aislados con RI y R de este estudio coinciden con otras investigaciones; Parra y Ristaino (1998) y Keinath *et al.*, (2007) reportaron que un gran número de aislados con SI e I se ubicaban en campos de cultivo con aplicaciones de mfenoxam y el metalaxil como único fungicida para el control de *P. capsici*. A partir de la combinación de las características: tipo de compatibilidad, sensibilidad al mfenoxam y crecimiento de colonia, se encontraron 13 genotipos de frecuencia variable. La mayor frecuencia correspondió al genotipo A2, sensible y con colonia estrellada. La presencia de los dos tipos de compatibilidad en el suelo e incluso en la misma planta, aunado a que algunos aislados presentan insensibilidad al mfenoxam, pueden dificultar el manejo de la enfermedad.

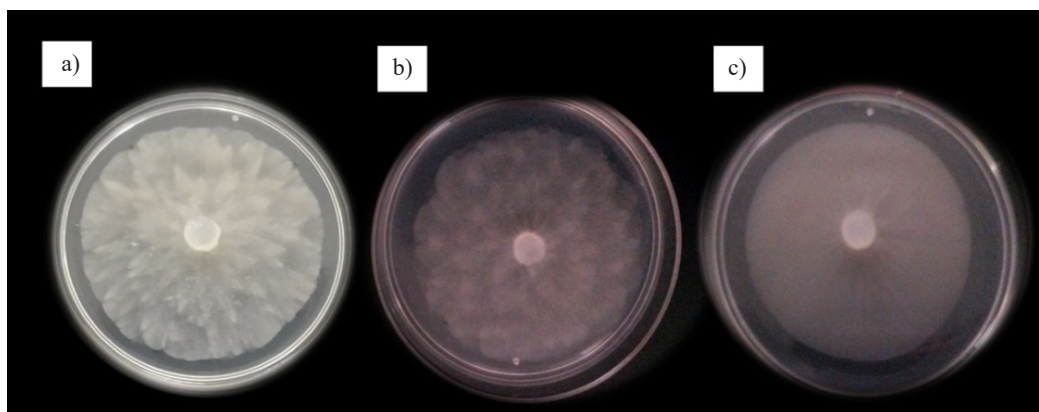


Figura 2. Tipo de colonias observadas en medio PDA: a) estrellada, b) ligeramente petaloide, c) radial.

Los síntomas en las plantas infectadas se observaron cuatro días posteriores a la inoculación (dpi) para el 86.6% de los aislados, principalmente necrosis en la base del tallo (>30%) y pérdida de hojas basales. El 6.67% mostró síntomas a partir del séptimo día y necrosis menor (<10%) el restante 6.67%, corresponde a un aislado asintomático (CPV-190). Existe la posibilidad de que el aislado haya perdido virulencia por las frecuentes transferencias en medios de cultivo en el laboratorio, este fenómeno ya se ha observado en otros aislados (Erwin y Ribeiro, 1996). A pesar de que catorce aislados fueron virulentos, se encontró variabilidad en dos de ellos (CPV-161 y CPV-197) que indujeron un menor porcentaje de necrosis en los tallos. Por su incapacidad para producir esporangios, el aislado CPV-161 se inoculó con micelio, esto pudo afectar el proceso de infección, el cual es influenciado por la cantidad de inóculo, ya que si existe una mayor concentración de inóculo la agresividad de la infección aumenta (Lee *et al.*, 2012). Se observó defoliación en todas las plantas inoculadas, estos resultados coinciden con lo observado por Goldberg (1995) que menciona a la defoliación como un síntoma observado en plantas afectadas por *P. capsici*. Este experimento confirma que es un patógeno muy agresivo, que representa un problema importante para los productores. El patrón o portainjerto Terrano que ha sido efectivo para controlar la marchitez de pimiento morrón en Italia (Gilardi *et al.*, 2013), en Chihuahua resultó más susceptible a la infección causada por *P. capsici*. Las plantas de pimiento morrón inoculadas con los aislados A1 y A2 formaron oosporas (Figura 1b) en dos plantas 4 dpi. Este hallazgo indica que la reproducción sexual se puede llevar a cabo en el tejido del hospedante. No se observaron anteridios, posiblemente se desintegraron después de haber cumplido su función. La pérdida del anteridio se ha observado en hojas colectadas en el campo infectadas

por *P. infestans*, con dobles lesiones y clarificadas. También se ha observado en condiciones *in vitro*, cuando en un medio de cultivo se cruzan los dos tipos de compatibilidad de *P. infestans*. En cucurbitáceas también se ha encontrado la producción de oosporas *in planta* (Kurt Lamour, comunicación personal) no obstante, este es el primer reporte en pimiento morrón.

La alta diversidad genética de este patógeno en conjunto con sus estrategias de infección y ciclo de vida, dificultan el manejo de la enfermedad y provocan un severo problema para los productores de Chile. Al detectarse en el presente estudio los dos tipos de compatibilidad en los aislados, sugiere que la reproducción sexual se está llevando a cabo en los campos de cultivo de pimiento morrón muestreados en Delicias, Chihuahua. Esto se ve reflejado en la diversidad encontrada ya que se observaron patrones de crecimiento variables, aislados con sensibilidad al mefenoxam, sensibilidad intermedia e insensibles, variación en la esporulación y virulencia. La información generada con este trabajo puede contribuir en la generación de las estrategias adecuadas para el manejo de la marchitez del Chile tipo pimiento morrón, enfermedad que se ha extendido en diversas regiones del país.

LITERATURA CITADA

- Castro-Rocha A, Shrestha S, Lyon B, Grimaldo-Pantoja GL, Flores-Marges JP, Valero-Galván J, Aguirre-Ramírez M, Osuna-Ávila P, Gómez-Dorantes N, Ávila-Quezada G, Luna-Ruiz JJ, Rodríguez-Alvarado G, Fernández-Pavía SP, and Lamour K. 2016. An initial assessment of genetic diversity for *Phytophthora capsici* in northern and central Mexico. *Mycological Progress* 15:15. <https://doi.org/10.1007/s11557-016-1157-0>
- Erwin DC and KO Ribeiro. 1996. *Phytophthora* Diseases Worldwide. The American Phytopathological Society. United States of America. Pp: 269-280. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.1998.0179a.x>
- Foster JM and MK Hausbeck. 2010. Managing *Phytophthora* crown and root rot in bell pepper using fungicides and host resistance. *Plant Disease* 94:697-702. <https://doi.org/10.1094/pdis-94-6-0697>.

- Gilardi GM, Baudino M, Moizio M, Pugliese M, Garibaldi A and Gullino ML. 2013. Integrated management of *Phytophthora capsici* on bell pepper by combining grafting and compost treatment. *Crop Protection* 53:13-19. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2013.06.008>
- Goldberg NP. 1995. Chile Pepper Diseases. Agricultural Experiment Station. New Mexico State University. New Mexico, USA. Circular 549. https://aces.nmsu.edu/pubs/_circulars/CR549/
- Goodwin, SB. 1997. The population genetics of *Phytophthora*. *Phytopathology* 87: 462-473. <https://doi.org/10.1094/PHTO.1997.87.4.462>
- Granke LL, Quesada-Campo LM, Lamour KH and Hausbeck MK. 2011. Variation in phenotypic characteristics of *Phytophthora capsici* isolates from a worldwide collection. *Plant Disease* 95:1080-1088. <https://doi.org/10.1094/pdis-03-11-0190>
- Guigón-López C y González-González P. 2001. Estudio regional de las enfermedades del chile (*Capsicum annum*, L.) y su comportamiento temporal en el sur de Chihuahua, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 19:49-56. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61219107>
- Hwang J and Benson DM. 2005. Identification, mefenoxam sensitivity, and compatibility type of *Phytophthora* spp. attacking floriculture crops in North Carolina. *Plant Disease* 89: 185-90. <https://doi.org/10.1094/pd-89-0185>
- Keinath AP. 2007. Sensitivity of populations of *Phytophthora capsici* from South Carolina to mefenoxam, dimethomorph, zoxamide, and cymoxanil. *Plant Disease* 91: 743-748. <https://doi.org/10.1094/pdis-91-6-0743>
- Lamour KH and Hausbeck MK. 2003. Susceptibility of mefenoxam-treated cucurbits to isolates of *Phytophthora capsici* sensitive and insensitive to mefenoxam. *Plant Disease* 87: 920-922. <https://doi.org/10.1094/pdis.2003.87.8.920>
- Lee J, Lee WP, Kang BC and Yoon JB. 2012. Inheritance of resistance to *Phytophthora* root rot in chili pepper depending on inoculum density and parental genotypes. *Korean Journal of Breeding Science* 44:503-509. <https://doi.org/10.9787/kjbs.2012.44.4.503>
- Parra G and Ristaino JB. 1998. Insensitivity to Ridomil Gold (Mefenoxam) found among field isolates of *Phytophthora capsici* causing Phytophthora blight on bell pepper in North Carolina and New Jersey. *Plant Disease* 82: 711. <https://doi.org/10.1094/pdis.1998.82.6.711d>
- Pérez-Moreno L, Durán-Ortiz L, Ramírez-Malagón R, Sánchez-Pale R y Olalde-Portugal V. 2003. Compatibilidad fisiológica y sensibilidad a fungicidas de aislamientos de *Phytophthora capsici* Leo. *Revista Mexicana de Fitopatología* 21: 19-25. https://www.researchgate.net/publication/238764464_Compatibilidad_Fisiologica_y_Sensibilidad_a_Fungicidas_de_Aislamientos_de_Phytophthora_capsici_Leo
- Piñero D. 2008. La diversidad genética como instrumento para la conservación y el aprovechamiento de la biodiversidad: estudios en especies mexicanas, en *Capital natural de México*, vol. I: Conocimiento actual de la biodiversidad. CONABIO, México, pp. 437-494. <https://doi.org/10.32800/abc.2019.42.0187>
- Ristaino JB. 1990. Intraspecific variation among isolates of *Phytophthora capsici* from pepper and curcubit fields in North Carolina. *Phytopathology* 80:1253-1259. <https://doi.org/10.1094/phyto-80-1253>
- Rodríguez-Moreno VM, Luna-Ruiz JJ, Valle-García P, Tiscareño-López M y Ruiz-Corral JA. 2004. Caracterización patogénica y sexual de *Phytophthora capsici* Leonian y análisis de su distribución espacial en el Centro-Norte de México mediante un sistema de información geográfica. *Revista Mexicana de Fitopatología* 22:72-81. <https://doi.org/10.29312/remexca.v8i8.703>
- Sánchez-Chávez E, Torres-González A, Flores-Córdova MA, Preciado-Rangel P y Márquez-Quiroz C. 2015. Uso de portainjerto sobre el rendimiento, calidad del fruto y resistencia a *Phytophthora capsici* Leonian en pimiento morrón. *Nova Scientia* 7:227-244. <https://doi.org/10.21640/ns.v7i15.302>
- Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural (SAGARPA). 2018. Planeación agrícola nacional 2017-2030: Chiles y pimientos mexicanos. https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/257072/Potencial-Chiles_y_Pimientosparte_uno.pdf
- Silva-Rojas HV, Fernández-Pavía SP, Góngora-Canul C, Macías-López BC y Ávila-Quezada GD. 2009. Distribución espacio temporal de la marchitez del chile (*Capsicum annum* L.) en Chihuahua e identificación del agente causal *Phytophthora capsici* Leo. *Revista Mexicana de Fitopatología* 27:134-147. <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmfi/v27n2/v27n2a6.pdf>

Efecto de extracto etanólico de residuos de higo (*Ficus carica*) sobre el crecimiento de hongos postcosecha

Effect of ethanol extract of fig residue (*Ficus carica*) on growth of postharvest fungi

María Alejandra Istúriz-Zapata, Mariana Pérez-García, Sergio Contreras-Saavedra, Laura Leticia Barrera-Necha*. Instituto Politécnico Nacional, Centro de Desarrollo de Productos Bióticos, Apartado Postal 24, Km 8.5 Carretera Yautepec-Jojutla San Isidro, Yautepec, Morelos, México CP 62731. *Autor para correspondencia: lbarrera@ipn.mx

Recibido: 14 de Abril, 2019.

Aceptado: 03 de Julio, 2019.

Istúriz-Zapata MA, Pérez-García M, Contreras-Saavedra S y Barrera-Necha LL. 2019. Efecto de extracto etanólico de residuos de higo (*Ficus carica*) sobre el crecimiento de hongos postcosecha. Revista Mexicana de Fitopatología 37 (No. Esp. 1): 72-79.

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1904-6

Resumen. Los residuos generados durante la producción del higo constituyen una alternativa novedosa para elaborar biofungicidas. Los polifenoles están presentes en la piel de los frutos de higo y poseen actividad antioxidante y antimicrobiana, por lo que este desecho fue utilizado para cuantificar fenoles, antocianinas y actividad antioxidante, además para determinar su efecto sobre la Tasa de Crecimiento (TC), la Inhibición del Crecimiento Micelial (ICM), la esporulación y la germinación de las esporas de los hongos fitopatógenos *Colletotrichum acutatum*, *Fusarium solani*, *Penicillium oxalicum* y *Rhizopus stolonifer*, a concentraciones de 2.5 a 50 mg mL⁻¹. Los resultados fueron analizados por ANOVA y prueba de Tukey. La concentración de los polifenoles totales y antocianinas

fueron mayores en la piel del higo, comparadas con las del extracto etanólico. En contraste la capacidad antioxidante del extracto fue mayor 32.9 $\mu\text{mol g}^{-1}$ comparada con la piel de higo 21.7 $\mu\text{mol g}^{-1}$. En general los hongos presentaron TC similares al control y baja ICM de 23 a 30%. No se observó esporulación en *F. solani* a concentraciones de 7.5 a 25 mg mL⁻¹. El porcentaje de germinación de esporas en *R. stolonifer* fue de 0 % a 50 mg mL⁻¹.

Palabras clave: higo, residuos, hongos, extractos, postcosecha.

Abstract. The residue generated during fig production is a novel alternative to elaborate biofungicides. Polyphenols are compounds that are present mainly in the skin of fig fruit and have antioxidant and antimicrobial activity and this waste was used to quantify phenols, anthocyanins and antioxidant activity. They were used to determine its effect on Mycelial Growth rate (TG), Mycelial Growth Inhibition (MGI), sporulation and germination of the spores of phytopathogenic fungi *Colletotrichum acutatum*, *Fusarium solani*,

Penicillium oxallicum and *Rhizopus stolonifer*, at concentrations of 2.5 to 50 mg mL⁻¹. An ANOVA and test of Tukey were applied. The concentration of total polyphenols and anthocyanins were higher in the skin of the fig, compared with those of the ethanolic extract. In contrast, the antioxidant capacity of the extract was higher at 32.9 µmol g⁻¹ compared with fig skin 21.7 µmol g⁻¹. In general, the fungi presented TC similar to the control and low MGI of 23 to 30%. The sporulation was not observed in *F. solani* at concentrations of 7.5 to 25 mg mL⁻¹. The percentage of germination of spores in *R. stolonifer* was from 0% at 50 mg mL⁻¹.

Key words: Fig, residue, fungi, extracts, postharvest.

El aprovechamiento de los residuos agroindustriales permite dar solución a diferentes problemas ambientales originados por la generación y acumulación en los vertederos de basura causando contaminación ambiental y focos de proliferación de plagas (Yepes *et al.*, 2008). La cantidad de compuestos bioactivos presentes en estos residuos es elevada; por lo que una alternativa para evitar su pérdida es generar estrategias para su aprovechamiento y manejo. Una oportunidad sería su uso en el control de hongos fitopatógenos postcosecha de importancia económica (Vargas-Corredor y Pérez, 2018), como una solución para evitar el uso de fungicidas sintéticos que causan contaminación ambiental (Villa-Martínez *et al.*, 2015).

El higo (*Ficus carica*) es un fruto que tiene importancia en la economía mexicana, ya que desde el 2015 se exporta a los Estados Unidos (APHIS-USDA, *Federal Register 2015-03-30*, SAGARPA 2015) y actualmente, se cultiva en 1456 hectáreas a nivel nacional. El Estado de Morelos es el principal productor con un 58% del total de la producción

nacional (Morgado-González *et al.*, 2018). La fruta fresca se usa para elaborar mermeladas y jugos. También puede ser deshidratada, y procesada en jarabes, pasteles, panes, entre otros. Los higos frescos completamente maduros son suaves, fácilmente magullables y altamente perecederos por lo que son muy sensibles al daño físico y susceptibles a las infecciones en postcosecha (Kader, 1992), lo que hace que su vida de anaquel sea corta y propicia que existan rápidos canales de comercialización que aseguren cuidados rigurosos en la manipulación del producto para disminuir al máximo las pérdidas. Sin embargo, de esta actividad se generan residuos constituidos por piel o fruta de baja calidad, que pueden ser empleados para darles valor agregado mediante la extracción de compuestos bioactivos (Cury *et al.*, 2017), ya que son una excelente fuente compuestos fenólicos que son los principales responsables de la actividad antioxidante de estos frutos (Veberic *et al.*, 2008) y representan una rica fuente de biocidas y conservantes que se han explorado durante mucho tiempo como medios alternativos de control postcosecha (Schena *et al.*, 2008). En particular, muchos estudios han señalado la eficacia antimicrobiana de ciertas clases de este tipo de sustancias como los presentes en extractos de *Ocimum basilicum* contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Isaac y Abu-Tahon, 2014), quercetina o la umbeliferona para el control de *Penicillium expansum* en manzana (Sanzani *et al.*, 2009), extractos de *Caesalpinia cacalaco* ricos en ácido gálico, hidroxibenzoico y taninos ácidos los cuales mostraron ser eficientes en el control *Colletotrichum lindemuthianum* (Vélez-García *et al.*, 2010). El ácido cumárico y derivados del ácido cafeico presentes en los extractos de hojas de *Olea europaea*, que inhiben el crecimiento de al menos diez hongos entre ellos *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus*, *Penicillium italicum*, *Fusarium oxysporum*, *Alternaria alternata* entre otros

(Korukluoglu *et al.*, 2008). Así como, la catequina, epicatequina, proantocianidinas y taninos (Yoshida *et al.*, 2009) contra fitopatógenos de importancia económica. Con base a lo anterior, el objetivo de esta investigación fue elaborar y caracterizar un extracto etanólico obtenido a partir de la piel de higo, para la evaluación de su efecto sobre el desarrollo de hongos fitopatógenos postcosecha de importancia económica.

Para la obtención del extracto etanólico se retiró la piel de los frutos de higo var. Mission de un día de cosechado. Se obtuvieron 598 g y se colocaron en etanol en proporción 1:5. La mezcla fue molida y se dejó en maceración durante 24 horas a 28 ± 2 °C en oscuridad, posteriormente se filtró en papel filtro del No. 2. El filtrado fue concentrado al vacío en un Rotavapor R-300 (BUCHI) bajo las siguientes condiciones: 120 psi, 40 rpm y 40 °C, hasta el 20% del volumen inicial. El extracto se almacenó en refrigeración en un frasco ámbar hasta su uso. La cantidad de fenoles totales fue determinada por el método de Singleton *et al.* (1965), mediante la reacción de Folin-Cicalteau, usando como estándar ácido gálico. Se determinó el contenido de antocianinas según la metodología propuesta por Aguilera-Ortiz *et al.* (2009). La capacidad antioxidante se determinó por la técnica de ABTS (radical ácido 2,2-azino-bis (3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico), y los resultados se expresan en CAET (Capacidad Antioxidante Equivalente a Trolox) en $\mu\text{mol g}^{-1}$ (Kuskoski *et al.*, 2005). Se evaluó el efecto del extracto sobre el crecimiento micelial, la esporulación y la germinación de las esporas de cuatro patógenos importantes en postcosecha: *F. solani* (pepino), *P. oxalicum* (pepino), *R. stolonifer* (tomate), *C. acutatum* (pimienta), cepas que forman parte de la colección de hongos del Laboratorio de Tecnologías Postcosecha de Productos Agrícolas, CEPROBI-IPN. Se prepararon medios de cultivo en placas con PDA Bioxon suplementados con 2.5,

5, 7.5, 10, 12.5, 15, 25 y 50 mg mL^{-1} del extracto etanólico de higo. Se inoculó un disco de micelio de 5 mm de diámetro de cada uno de los hongos antes mencionados. Se dejaron en incubación a 28 ± 2 °C durante ocho días, y se tomó registro del crecimiento micelial cada 24 horas. El hongo de *R. stolonifer* se incubó por 72 horas y se registró el crecimiento micelial cada seis horas. La tasa de crecimiento de los hongos se calculó por la ecuación de la recta, $y = bx + a$ en donde b es la pendiente de la curva de crecimiento y x el tiempo de incubación. El % de inhibición del crecimiento micelial (% I) fue calculado utilizando la siguiente fórmula: $\%I = [(C-T)/C] \times 100$, donde C representa el crecimiento en el control y T en el tratamiento. Para la determinación de efecto de cada tratamiento en la esporulación, a partir de una solución de esporas colectadas en agua destilada estéril con 0.01% v/v de Tween 20, se tomó una alícuota de 10 μL y se contabilizaron en una cámara de Newbauer. Para la evaluación de los extractos en el porcentaje de germinación, se colocaron discos de PDA en portaobjetos con 50 μL de cada solución de esporas y se incubaron de cuatro a ocho h. Posteriormente se detuvo el crecimiento con una gota de azul de lactofenol al 1% p/v y se evaluaron 100 esporas en un microscopio óptico (Nikon YS2-H, Japón) a 40X. El tratamiento control para todos los hongos fue medio PDA. Los datos se analizaron por un diseño completamente al azar con seis repeticiones, se aplicó un ANOVA y prueba de Tukey ($\alpha=0.05$), se usó el software SigmaPlot 12.5 2012.

El contenido de compuestos fenólicos totales en el extracto fue de 31.37 mg ácido gálico g^{-1} y en la piel fue de 42.63 mg de ácido gálico g^{-1} de tejido. El mayor contenido de fenoles en piel, es debido a la presencia de los compuestos fenólicos totales en estado natural y en el extracto sólo existe una fracción de éstos en función del método de obtención y el disolvente empleado. El contenido de antocianinas en

el extracto fue de $39.712 \pm 1.439 \mu\text{g g}^{-1}$ de cianidina-3-glucósido y en la piel fue de $57.141 \pm 52.939 \mu\text{g g}^{-1}$ de cianidina-3-glucósido. La piel presenta un mayor contenido de antocianinas, que son relativamente inestables y presentan reacciones degradativas en el proceso de extracción y almacenamiento de estas (Aguilera-Ortiz *et al.*, 2009). La capacidad antioxidante en el extracto fue de $32.92 \mu\text{mol g}^{-1}$ y en la piel fue de $21.72 \mu\text{mol g}^{-1}$. El fruto del higo tiene capacidad antioxidante elevada y puede estar relacionada con el color del fruto, por lo que es posible sugerir que esta actividad está asociada a la producción de polifenoles como sistema de defensa contra los herbívoros (Darren *et al.*, 2002), actividad antimicrobiana (Ehala *et al.*, 2004) o como lo reportan Wojciechowska *et al.* (2014), en plantas de tomate resistentes a *A. alternata*, presentan altas concentraciones de ácido clorogénico.

La tasa de crecimiento (TC) micelial de los hongos evaluados fue diferente en presencia de las diferentes concentraciones de extracto etanólico de piel de higo (Cuadro 1). *C. acutatum* ($P < 0.0203$), *F. solani* ($P < 0.4537$) y *R. stolonifer* ($P < 0.0001$) mostraron tasas de crecimiento similares al control. Por el contrario, *P. oxallicum* ($P < 0.0926$), mostró un efecto dosis respuesta a mayor concentración del extracto menor tasa de crecimiento, sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticas entre los tratamientos. Todos los hongos a la concentración de 5 mg mL^{-1} incrementaron la tasa de crecimiento. En cuanto al porcentaje de inhibición de crecimiento, la mayoría de las dosis evaluadas para *C. acutatum* no inhibieron el crecimiento micelial, a excepción de las concentraciones de 10 mg mL^{-1} (23.09%) y 15 mg mL^{-1} (9.13%) ($P < 0.0001$); el resto estimularon el crecimiento del micelio del hongo. Un comportamiento similar se encontró para *R. stolonifer* ($P < 0.0001$). Sólo para *F. solani* a una concentración de 50 mg mL^{-1} se alcanzó un porcentaje de inhibición del 23.28% ($P < 0.0001$) con

respecto al tratamiento control. En *P. oxallicum* no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones evaluadas y el tratamiento control ($P < 0.3882$). Las variaciones entre los diferentes géneros de hongos evaluados pueden ser causadas por las diferencias en la estructura o estado de desarrollo y características genéticas de cada hongo (Montes-Belmont *et al.*, 2006).

En la Figura 1, se observa que el extracto etanólico evaluado a diferentes concentraciones no presentó ningún efecto sobre la esporulación de *C. acutatum* ($P < 0.0006$) y *R. stolonifer* ($P < 0.013$). Por el contrario, en *F. solani*, las concentraciones de 7.5 a 25 mg mL^{-1} inhibieron este proceso ($P < 0.0001$). Para el caso de *P. oxallicum* a medida que las concentraciones del extracto aumentan, la cantidad de esporas también se incrementa con respecto al control ($P < 0.0001$) con excepción de la dosis de 15 mg mL^{-1} la cual causa una disminución. Es importante mencionar que en el caso de *F. solani* el efecto del extracto sobre este hongo fue más eficiente en la disminución de la producción de esporas que en la inhibición del crecimiento micelial. Por otro lado se observó una disminución de los porcentajes de germinación para *R. Stolonifer*, *C. acutatum* y *P. oxallicum* lo cual puede ser atribuido al efecto de los fenoles y antocianinas presentes en el extracto de piel de higo (Figura 2). El modo de acción de estos compuestos se postula que es debido a la inhibición de enzimas hidrolíticas como la beta-glucosidasa, pectinliasa y proteasas (Issac *et al.*, 2014), no siendo así para *F. solani*. Probablemente las esporas sean más sensibles por estar en contacto directo con los fenoles del extracto de higo en comparación con las hifas (Abou-Jawdah *et al.*, 2002). Se ha reportado que la acción de algunos compuestos derivados de plantas, causan lisis celular, inhibición y alteraciones en hifas y esporulación (Kubra *et al.*, 2013). Este es el primer reporte de la actividad antifúngica de extractos de residuos

Cuadro 1. Efecto del extracto etanólico de piel de higo sobre la tasa de crecimiento micelial y porcentaje de inhibición del crecimiento de cuatro hongos postcosecha.

Tratamiento (mg mL ⁻¹)	Tasa de crecimiento (mm/día)	^x Inhibición crecimiento micelial (%)
<i>Colletotrichum acutatum</i>		
PDA	5.17 ± 0.82a	0ab
2.5	6.23 ± 0.80b	-23.33a
5	6.19 ± 1.05b	-21.82a
7.5	6.9 ± 1.98ab	-2.18ab
10	5.62 ± 0.81ab	23.09b
12.5	4.62 ± 10.33ab	30.52ab
15	3.72 ± 11.16ab	26.40b
25	4.23 ± 2.03ab	11.48ab
50	4.05 ± 5.45ab	18.04ab
<i>Fusarium solani</i>		
PDA	7.18 ± 2.55a	0a
2.5	7.03 ± 1.21a	-2.46a
5	6.02 ± 2.94a	10.81a
7.5	6.83 ± 2.21a	5.33a
10	6.81 ± 20.21a	-11.31a
12.5	7.79 ± 3.48a	-5.87a
15	8.47 ± 5.92a	-10.98a
25	7.59 ± 6.44a	-12.86a
50	5.60 ± 6.13a	23.10b
<i>Penicillium oxallicum</i>		
PDA	5.2 ± 3.01a	0a
2.5	4.12 ± 0.84a	19.97a
5	5.61 ± 0.43a	-2.01a
7.5	3.97 ± 1.45a	22.16a
10	5.39 ± 0.85a	3.71a
12.5	3.92 ± 6.63a	24.52a
15	-	9.24a
25	3.08 ± 4.94a	26.21a
50	3.11 ± 10.03a	23.64a
<i>Rhizopus stolonifer</i>		
	(mm/h)	
PDA	1.75 ± 6.83e	0a
2.5	1.90 ± 3.66a	-5.69ab
5	1.84 ± 2.33cd	-14.29ab
7.5	1.72 ± 4.45e	3.29b
10	1.86 ± 1.04b	-22.19ab
12.5	1.83 ± 2.66e	-29.63ab
15	1.9 ± 1.28f	-31.98ab
25	1.66 ± 1.08bc	-23.63ab
50	1.87 ± 0.68de	-23.01ab

^x *Colletotrichum acutatum* (F = 4.85, gl = 8, 126, P < 0.0001); *Fusarium solani* (F = 7.64, gl = 8, 126, P < 0.0001); *Rhizopus stolonifer* (F = 2.84, gl = 8, 107, P = 0.01); *Penicillium oxallicum* (F = 1.07, gl = 8, 126, P = 0.3882). Los valores con la misma letra dentro de las filas son estadísticamente iguales.

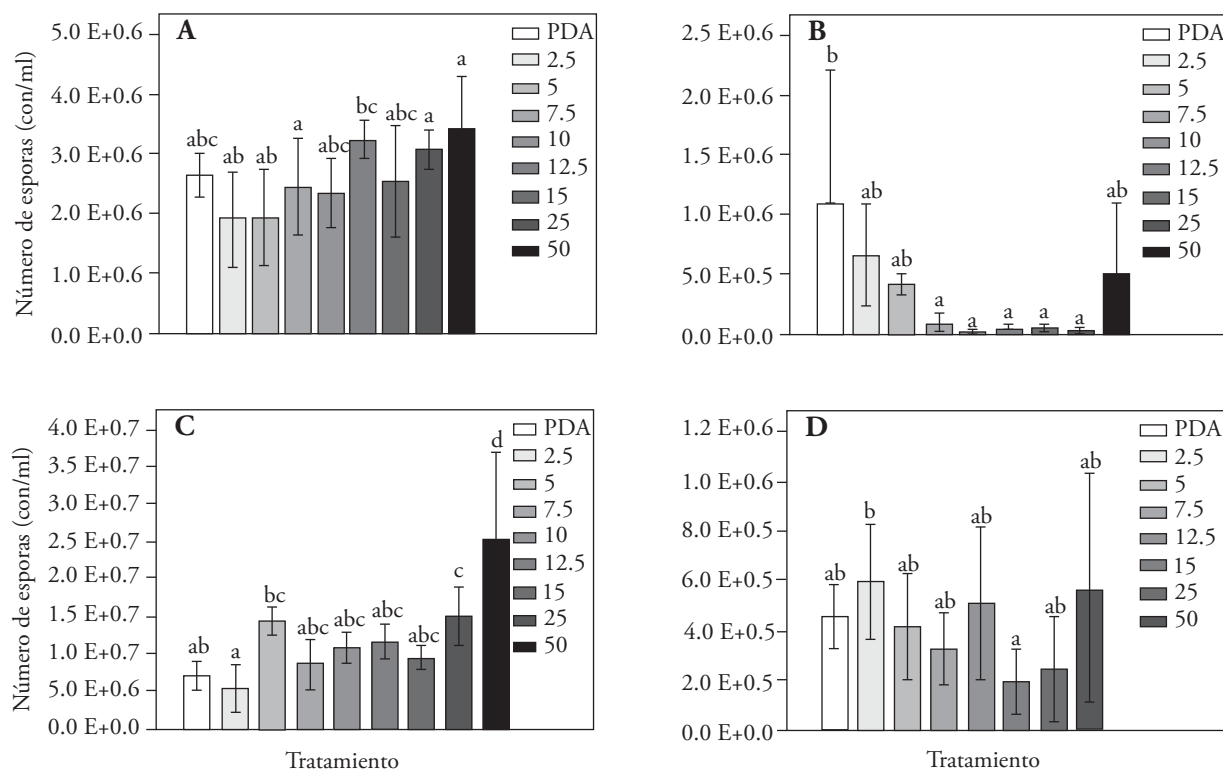


Figura 1. Efecto de los extractos etanólicos de piel de higo sobre la esporulación de: A) *Colletotrichum acutatum* ($F = 4.05$, $gl = 8,71$, $P = 0.0006$); B) *Fusarium solani* ($F = 5.89$, $gl = 8,71$, $P < 0.0001$); C) *Rhizopus stolonifer* ($F = 2.85$, $gl = 7,56$, $P = 0.013$); D) *Penicillium oxalicum* ($F = 14.21$, $gl = 8,71$, $P < 0.0001$). Los valores con la misma letra son estadísticamente iguales.

de higo sobre la germinación de tres hongos patógenos postcosecha y la esporulación de *F. solani*, este efecto puede ser mayor si se incrementan las concentraciones

LITERATURA CITADA

- Abou-Jawdah Y, Sobh H and Salameh A. 2002. Antimycotic activities of selected plant flora, growing wild in Lebanon, against 398 phytopathogenic fungi. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50 (11): 3208-3213. <https://doi.org/10.1021/jf0115490>
- Aguilera-Ortiz M, Alanis-Guzmán M, García-Díaz C y Hernández-Brenes C. 2009. Caracterización y estabilidad de antocianinas de higo, variedad *Mission*. *Revista Universidad y Ciencia, Trópico Húmedo*. 25 (2):151-158. www.ujat.mx/publicaciones/uciencia
- Cury RK, Aguas MY, Martínez M, Olivero VR y Chams ChL. 2017. Residuos agroindustriales su impacto, manejo y aprovechamiento. *Revista Colombiana Ciencia Animal*. 9(Supl): 122-132. <https://doi.org/10.24188/recia.v9.nS.2017.530>
- Darren J and Constabel P. 2002 Molecular Analysis of Herbivore-induced Condensed Tannin Synthesis: Cloning and Expression of Dihydroflavonol Reductase from Trembling Aspen (*Populus tremuloides*). *The Plant Journal*. 32: 701-12. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2002.01458.x>
- Ehala S, Vaher M and Kaljurand M. 2004. Separation of Polyphenols and L-ascorbic Acid and Investigation of their Antioxidant Activity by Capillary Electrophoresis. *Proceedings of the Estonian Academy of Sciences. Chemistry* 53: 21-35. <https://books.google.com.mx/books?id=tCYDq3WKbvkC>
- Isaac GS and Abu-Tahon MA. 2014. In vitro antifungal activity of medicinal plant extract against *Fusarium oxysporum* f. sp. 439 *lycopersici* race 3 the causal agent of tomato wilt. *Acta Biologica Hungarica*, 65(1): 107-18. <https://doi.org/10.1556/ABiol.65.2014.1.10>

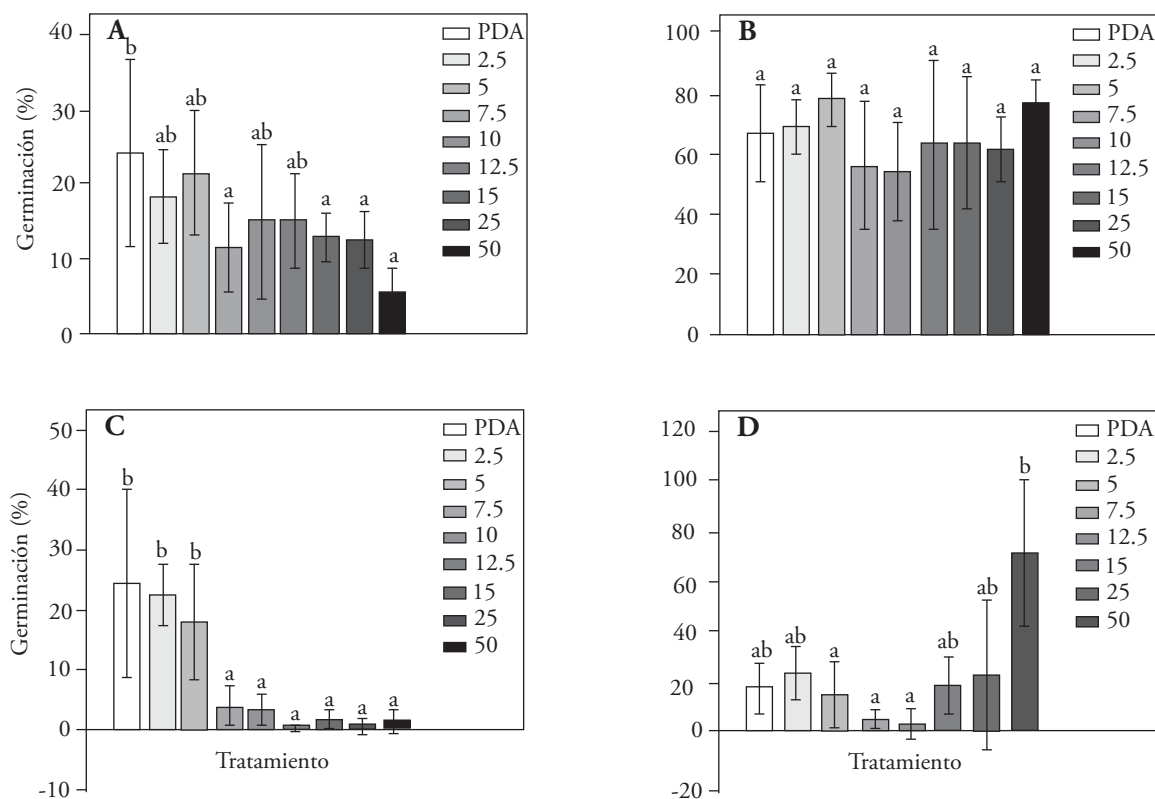


Figura 2. Efecto de los extractos etanólicos de piel de higo sobre el Porcentaje de Germinación de: A) *Colletotrichum acutatum* (F = 2.59, gl = 8,53, P = 0.0203); B) *Fusarium solani* (F = 1.58, gl = 8,53 , P = 0.1593); C) *Rhizopus stolonifer* (F = 3.86, gl = 7,47 , P = 0.0027); D) *Penicillium oxalicum* (F = 19.89 , gl = 8,53 , P<0.0001). Los valores con la misma letra son estadísticamente iguales.

Kader A. 1992. Postharvest Technology of horticultural crops. Second Edition. Oakland, California. United States. Division of Natural Resources. University of California. 535p.

Koruklu Oglu M, Sahan Y and Yigit A. 2008. Antifungal properties of olive leaf extracts and their phenolic compounds. Journal of Food Safety 28: 76-87. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4565.2007.00096.x>

Kubra IR, Murthy PS and Rao LJM. 2013. In vitro antifungal activity of Dehydrozingerone and its fungitoxic properties. Journal of Food Science, 78(1): M64-M69. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2012.03009.x>

Kuskoski EM, Asuero AG, Troncoso AM, Mancini-Filho J y Fett R. 2005. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. Food Science and Technology 25(4): 726-732. <http://www.scielo.br/pdf/cta/v25n4/27642.pdf>

Montes-Belmont R and Prados Ligero AM. 2006. Influence of plant extracts on *Sclerotium cepivorum* development. Plant Pathology Journal. 5:373-377. <https://doi.org/10.3923/ppj.2006.373.377>

Morgado-González A, Becerril-Román AE, Calderón-Zavala G, García-Villanueva E, Velasco-Cruz C y Alberto-Villa J. 2018. Bioestimulantes y nutrimentos foliares en la producción de higo (*Ficus carica* L.) 'café de Turquía'. Agroproductividad: Vol. 11 (9): 15-19. <https://doi.org/10.32854/agrop.v11i9.1209>

Sanzani SM, De Girolamo A, Schena L, Solfrizzo M, Ippolito A and Visconti A. 2009. Control of *Penicillium expansum* and patulin accumulation on apples by quercetin and umbelliferone European Food Research and Technology 228: 381-389. <https://doi.org/10.1007/s00217-008-0944-5>

Schena L, Nigro F and Ippolito A. 2008. Natural antimicrobials to improve storage and shelf life of fresh fruits, vegetables and cut flowers. Microbial Biotechnology in Horticulture 2: 259-302. <https://doi.org/10.1201/9780203508244.ch10>

Singleton VL, Rossi JA, 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. Am. J. Enol. Vitic. 16, 144-158.

Vargas-Corredor Y y Pérez-Pérez L. 2018. Aprovechamiento de residuos agroindustriales en el mejoramiento de la

- calidad del ambiente. Revista Facultad de Ciencias Básicas. Vol. 14 (1): 1-14. <http://dx.doi.org/10.18359/rfcb.3108>
- Veloz-García R, Marín-Martínez R, Veloz-Rodríguez R, Rodríguez-Guerra R, Torres-Pacheco I, González-Chavira MM, Anaya-López JL, Guevara-Olvera L, Feregrino-Pérez AA, Loarca-Piña G and Guevara-González RG. 2010. Antimicrobial activities of cascalote (*Caesalpinia cacalaco*) phenolics-containing extract against fungus *Colletotrichum lindemuthianum*. Industrial Crops and Products 31: 134-138. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2009.09.013>
- Veberic R, Colaric M and Stampar F. 2008. Phenolic acids and flavonoids of fig fruit (*Ficus carica* L.) in the northern Mediterranean region. Food Chemistry 106:153-157. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.05.061>
- Villa-Martínez A, Pérez-Leal R, Morales-Morales H, Basurto-Sotelo M, Soto-Parra J y Martínez-Escudero E. 2015. Situación actual en el control de *Fusarium* spp. y evaluación de la actividad antifúngica de extractos vegetales. *Acta Agronómica*. Vol 64 (2) 2015, p 194-205. <http://dx.doi.org/10.15446/acag.v64n2.43358>
- Wojciechowska E, Weinert C, Egert B, Trierweiler B, Schmidt-Heydt M, Horneburg B, Graeff-Hönninger S, Kulling S and Geisen R. 2014. Chlorogenic acid, a metabolite identified by untargeted metabolome analysis in resistant tomatoes, inhibits the colonization by *Alternaria alternata* by inhibiting alternariol biosynthesis. European Journal Plant Pathology. <https://doi.org/10.1007/s10658-014-0428-3>
- Yepes M, Montoya L y Orozco F. 2008. Valorización de residuos agroindustriales – frutas – en Medellín y el sur del valle del Aburrá, Colombia. Revista Facultad Nacional Agrícola de Medellín 61(1): 4422-4431. <http://www.scielo.org.co/pdf/rfnam/v61n1/a18v61n1.pdf>
- Yoshida T, Hatano T, Ito H and Okuda T. 2009. Chemistry and Biology of Ellagitannins: An Underestimated Class of Bioactive Plant Polyphenols: 55-93. <https://doi.org/10.17306/J.AFS.2014.3.7>

Efecto de inhibidores en el control del *Papaya ringspot virus* y productividad en papaya (*Carica papaya*)

Effect of viral inhibitors in the control of *Papaya ringspot virus* and productivity in papaya (*Carica papaya*)

Isaac Magaña-López, Estudiante de Posgrado, Facultad de Ciencias Agropecuarias. Avenida Universidad 1001. Colonia Chamilpa. Cuernavaca. Morelos. CP. 62209; **Dagoberto Guillén-Sánchez***, UAEM. Escuela de Estudios Superiores de Xalostoc. Avenida Nicolás Bravo s/n, Parque Industrial Cuautla, Xalostoc, Ciudad Ayala, Morelos, México. C.P. 62740; **Irán Alia-Tejacal, Víctor López-Martínez, Porfirio Juárez-López, María Andrade-Rodríguez**, UAEM. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Avenida Universidad 1001. Colonia Chamilpa. Cuernavaca. Morelos. CP. 62209; **Ricardo Hernández-Pérez**, Asesor Científico. Laboratorio de Agrobiagnóstico Fitolab S.A de C.V. Puxtla, Cuautla. Morelos. México. C.P. 62758. *Autor para correspondencia: dagoguillen@yahoo.com

Recibido: 17 de Abril, 2019.

Aceptado: 19 de Julio, 2019.

Magaña-López I, Guillén-Sánchez D, Alia-Tejacal I, López-Martínez V, Juárez-López P, Andrade-Rodríguez M y Hernández-Pérez R. 2019. Efecto de inhibidores en el control del *Papaya ringspot virus* y productividad en papaya (*Carica papaya*). Revista Mexicana de Fitopatología 37 (No. Esp. 1): 80-86.

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1904-8

Resumen. La papaya (*Carica papaya*) es un frutal muy aceptado en el mercado de exportación por generar alta rentabilidad, en México se cultiva en zonas tropicales y subtropicales. El *Papaya ring spot virus* (PRSV) ocasiona la enfermedad más restrictiva de la producción de este cultivo en México y el mundo, por lo cual se evaluó la eficacia de Inhibitovir® y Virus Stop® en campo a 3 mL L⁻¹ y 6 mL L⁻¹ sobre incidencia, intensidad y control de la virosis, altura de planta, diámetro de tallo, número de flores y frutos, peso del fruto y rendimiento.

El PRSV se detectó hasta el quinto mes después del trasplante, tiempo para que la plantación lograra un buen amarre de frutos, sin embargo, la eficacia de los inhibidores virales no tuvo diferencias significativas sobre plantas testigo infectadas con el PRSV, así como en altura de planta, diámetro de tallo, número de flores y frutos, peso del fruto y rendimiento.

Palabras clave: PRSV, afidos, inhibitovir®

Abstract. The papaya (*Carica papaya*) is a fruit tree very accepted in the export market for generating high profitability, growing in Mexico in tropical and subtropical areas. The *Papaya ringspot virus* (PRSV) causes the most restrictive diseases of production of this crop in Mexico and the world, therefore, the effectiveness of Inhibitovir® and Virus Stop® was evaluated on field to 3 mL L⁻¹

and 6 mL L⁻¹, on incidence, intensity and control of virosis, plant height, stem diameter, number of flowers and fruits, fruit weight and yield. The PRSV was detected until the fifth moth after the transplant, time for the plantation to achieve a good mooring of fruits, however, the efficacy of the viral inhibitors did not have significant differences on control plants infected with PRSV, as well as on plant height, stem diameter, number of flowers and fruits, fruit weight and yield.

Key words: PRSV, aphids, inhibitovir®.

La papaya (*Carica papaya*) es una planta originaria de zonas tropicales de México y Centroamérica, y es importante debido a su valor nutritivo y propiedades medicinales, características que han contribuido a incrementar su cultivo (Suarez *et al.*, 2013). En México se tiene una superficie cultivada de 18 mil hectáreas, de las cuales el 85 % se localizan en los estados de Oaxaca, Colima, Chiapas, Veracruz, Michoacán y Guerrero, con un rendimiento promedio nacional de 57 t ha⁻¹ (SIAP, 2017).

El cultivo presenta diferentes problemas fitosanitarios que afectan su producción y rendimiento (Guzmán *et al.*, 2008), entre los que destaca el virus de la mancha anular (PRSV), que es la limitante principal en México y el mundo, ocasionando una sola cosecha en plantaciones infectadas o bien la ausencia de frutos si la infección ocurre en la etapa inicial de crecimiento del cultivo (MINAG, 1982; Alarcón, 2013). Este virus se trasmite de forma no persistente por varias especies de áfidos como *Aphis gossypii*, *A. nerii*, *A. spiraecola*, *Myzus persicae* y *Macrosiphum euphorbiae* (Rabara *et al.*, 1996; Villanueva y Peña, 1991).

Para el manejo de esta enfermedad se realizan diversas prácticas culturales que combinan protección del vivero con malla de polipropileno,

densidades de 2,800 plantas ha⁻¹, eliminación de plantas con síntomas iniciales del PRSV, aplicación de citrolina al 1.5 %, y establecimiento de barreras de maíz y jamaica, entre otras (GIP, 1994; García *et al.*, 1995). También se han utilizado productos “antivirales” o “inhibidores virales” en plantas de papaya que disminuyen la incidencia y severidad (Hernández *et al.*, 2017). Es por ello que en esta investigación se evaluaron los efectos de Inhibitovir® y Virus Stop® sobre la incidencia, intensidad de daño y eficacia de control del PRSV, así como en el crecimiento y productividad de plantas de papaya.

El estudio se estableció en el campo experimental de la Escuela de Estudios Superiores de Xalostoc (EESuX), de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Se utilizaron plántulas de papaya (*Carica papaya*) cv. Maradol roja con una altura de 10 a 12 cm, producidas en vivero en charolas de plástico de 38 cavidades que contenían Peat Moss + vermicomposta (1:1). El diseño experimental fue bloques completamente al azar, con cinco tratamientos y cuatro repeticiones. Se establecieron camas a doble hilera con distancias de 3.0 x 2.0 x 1.5 m, entre camas, hileras y plantas, respectivamente (2,962 plantas ha⁻¹). La unidad experimental constó de una cama con dos hileras de 21 m de largo (112 m²). Se realizaron labores culturales de riego, control de plagas, enfermedades, malezas, fertilización (granular y foliar), deschupone y deshoje.

La presencia del PRSV se determinó por serología en las plántulas mediante ELISA-DAS (Clark y Adams, 1977), antes de ser trasplantadas a campo y posteriormente se analizaron cada 30 días durante cinco meses. Se utilizó el producto comercial PathoScreen kit con anticuerpos específicos a PRSV (AGDIA cod: PSA53500/0480) siguiendo las recomendaciones del fabricante y algunas modificaciones (Hernández, 1994). Para cada tratamiento se procesaron dos muestras con dos repeticiones y cada muestra se constituyó con fracciones apicales

de hojas del estrato superior de cinco plantas seleccionadas al azar.

Los tratamientos evaluados fueron: 1. Testigo, 2. Virus Stop® (0.5 mL L⁻¹), 3. Virus Stop® (1.5 mL L⁻¹), 4. Inhibitovir® (3 mL L⁻¹) y 5. Inhibitovir® (6 mL L⁻¹). Los tratamientos 2 y 4, se aplicaron cada 15 días a partir del trasplante hasta el quinto mes. Los tratamientos 3 y 5 se aplicaron cuando se observaron plantas con los primeros síntomas de la infección por PRSV (clase 1), según escala de daños propuesta por Hernández (1994). Después, las aplicaciones se realizaron cada 15 días hasta el octavo mes. En todas las aplicaciones el pH de la mezcla se ajustó de 6.0 a 7.0. En el tratamiento uno no se realizaron aplicaciones contra el virus. La intensidad del daño producido por el virus se evaluó usando la escala de cuatro clases aplicada por Hernández (1994), donde 0 es planta sin síntomas y 3 manchas en forma de anillos concéntricos en frutos, tallo y peciolo.

El porcentaje de incidencia del PRSV se determinó con la siguiente fórmula:

$$P = (n/N) (100) \quad \text{Tsiplenko (López et al, 2009)}$$

donde:

P= % de incidencia de la enfermedad por tratamiento.

n= Número de plantas enfermas.

N= Número de plantas observadas

La intensidad media del daño ocasionada por el PRSV en los diferentes tratamientos fue calculada por la fórmula de Townsend y Heuberger (Ciba-Geygi, 1981).

$$I = (\Sigma(p.a) \div A) (100)$$

donde:

I = Intensidad de la enfermedad en cada tratamiento

$\Sigma(p.a)$ = Sumatoria de plantas por el grado o daño hallado en esas plantas

A= (p x i *) Número de plantas evaluadas multiplicada por el valor de máximo índice de daño.

La eficacia del tratamiento se calculó con relación a las observaciones previas realizadas en campo cada mes con la fórmula descrita por Abbott (Ciba-Geygi, 1981):

$$E.B = (A-B) \div A \times 100$$

E.B=Eficacia biológica

A= Cantidad de plantas enfermas antes de aplicación

B= Cantidad de plantas enfermas después de aplicación

Así mismo desde el trasplante hasta el final del estudio, semanalmente se realizaron muestreos de áfidos alados en trampas amarillas con agua jabonosa (una trampa en cada punto cardinal sobre el dosel del cultivo para toda la superficie experimental). Los especímenes colectados fueron identificados mediante claves pictóricas (Rosales et al., 2013) y dicotómicas (Villegas, 2000).

Se realizaron mediciones mensuales, después de un mes del trasplante y hasta el octavo mes, de altura de planta (desde la base del tallo, hasta la altura máxima del dosel de las hojas), diámetro del tallo (a 15 cm del suelo), número de flores y frutos por planta (se considera fruto amarrado, después de que los restos del estigma caen), peso del fruto en madurez de consumo y rendimiento considerando el peso promedio de frutos y el promedio total de frutos/planta/tratamiento, por la densidad de plantación establecida. Los datos de las variables evaluadas fueron sometidos a un análisis de varianza y comparación de medias mediante Duncan ($P < 0.05$) con el paquete estadístico SAS.

El análisis serológico mostró que las plántulas al momento del trasplante estuvieron libres del PRSV. Así mismo de mayo a septiembre no se detectaron plantas positivas al virus en la prueba de ELISA. El % de plantas positivas en el mes de octubre (sexto mes) en los tratamientos con las dos dosis de Virus Stop® fue de 66.6, mientras que para ambas dosis de Inhibitovir® fue de 33.3% y en el testigo de 66.6%. En noviembre, todos los tratamientos con Inhibitovir® y Virus Stop® registraron 66.6% de plantas positivas, mientras que para el testigo fue de 100%.

Los primeros síntomas (Clase 1) del PRSV se observaron después del quinto mes (150 días) después del trasplante, con incidencia de 2.6 %, en ambas dosis con Virus Stop® (Figura 1a), lo cual difiere con lo reportado por Hernández *et al* (2010), quien reportó síntomas iniciales del PRSV a los 80 días después del trasplante en el estado de Veracruz.

A los 180 días (seis meses) después del trasplante se detectaron plantas con síntomas de clase 2 (Figura 1b) y Clase 3 (Figura 1c), en el tratamiento con la dosis baja de Virus Stop®. Al octavo mes la incidencia varió de 43 a 66 % pero sin diferencias estadísticas entre tratamientos (Cuadro 1).

Hernández *et al* (2010) reportó en el estado de Veracruz incidencias del 94% a los tres meses de

trasplante, dicha entidad es una de las principales productoras de papaya a nivel nacional (SIAP, 2017) y quizá la incidencia de plantas con síntomas de infección por PRSV es más alta poco después del trasplante. Por otra parte, Cabrera y colaboradores (2011) a los 90 días después del trasplante observaron plantas con síntomas ocasionados por PRSV, alcanzando 100% de incidencia a los 195 días después del trasplante. La intensidad de la enfermedad varió de 15.3 a 27.7% pero sin diferencias significativas entre tratamientos (Cuadro 1). Estos resultados fueron diferentes a los reportados por Hernández *et al*. (2017) al aplicar Inhibitovir® y Q-2000VI®, observaron una reducción del porcentaje de intensidad del PRSV hasta los 160 días con diferencias significativas.

La eficacia de los tratamientos a los 240 días después del trasplante fue menor al 30 %, sin diferencias significativas entre ellos (Cuadro 1). Hernández *et al* (2017) encontraron que la efectividad de Inhibitovir® y Q-2000VI® en aplicaciones de dosis bajas fue de 57.1 y 71.4 % respectivamente, valores que son muy altos comparados con los obtenidos en este estudio.

Durante todo el periodo del estudio hubo presencia de áfidos y las poblaciones más altas se

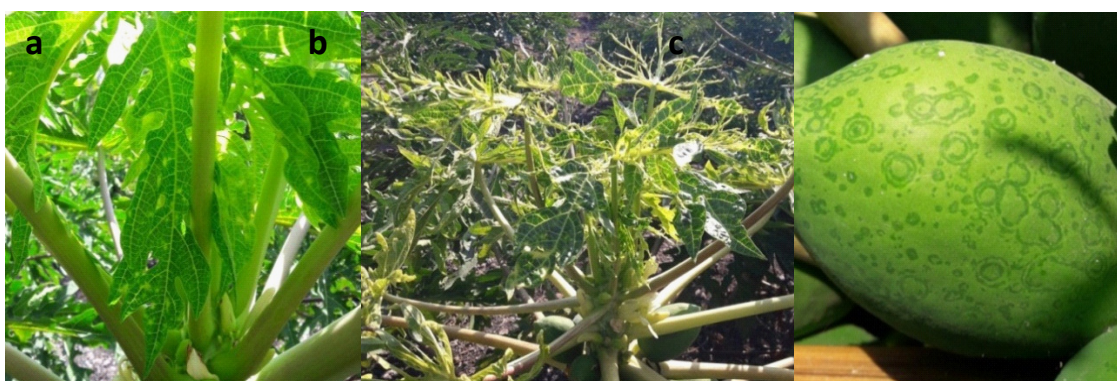


Figura 1. Síntomas de virosis en plantas de papayo, (a) mosaico tenue en brotes, (b) hojas filiformes y (c) manchas anulares en frutos.

Cuadro 1. Valores medios obtenidos de porcentaje de incidencia (PI), porcentaje de intensidad de la enfermedad (PIE) y Eficacia de Tratamientos (ET), a los 240 días de trasplante.

Tratamiento	PI	PIE	ET
Testigo	56.7a	22.2a	0
Virus stop P	56.6a	27.8a	19.7a
Virus stop C	66.7a	27.8a	13.4a
Inhibitovir P	43.4a	15.3a	27.6a
inhibitovir C	56.7a	22.2a	13.3a
R2	0.5828	0.724	0.64
CV	18.82	18.39	72.5

*valores con la misma letra en columnas, no son diferentes estadísticamente de acuerdo a la comparación de medias de la prueba de Duncan ($P \geq 0.05$)

determinaron en julio y agosto, donde se colectaron 220 ejemplares para cada mes, las cuales se relacionan con el inicio e incremento de plantas enfermas detectadas por serología y que correspondió posteriormente a la aparición de síntomas. Aunque faltó detectar el virus en los insectos vectores. Las especies encontradas y reportadas como vectores del PRSV fueron, la más abundante, *Aphis spiraecola* con 372 ejemplares y las menos abundantes fueron *Aphis gossypii* y *Myzuz persicae* con seis y siete ejemplares respectivamente, mientras que para *Aphis nerii* y *Macrosiphum euphorbiae* se capturaron 35 y 17 adultos respectivamente. Estas

especies también han sido encontradas en plantaciones de papayo en Michoacán (Rivas *et al.*, 2008) y Veracruz (Hernández *et al.*, 2010). Así mismo Rabara *et al.* (1996) reportó que en el mes de agosto registró incidencia del 91 % del PRSV, lo cual coincidió con el mes donde los áfidos fueron más abundantes.

En altura de planta el tratamiento Inhibitovir® a dosis alta registró el valor más alto (159 cm), pero sin diferencias significativas con los otros tratamientos (Cuadro 2). Estos resultados se asemejan a los señalados por Arrieta y Carrillo (2002) quienes reportaron alturas de planta de 161.06 cm, mientras que Alcántara *et al.* (2010) reportaron altura promedio menores en plantas de papayo variedad Maradol roja con 132.4 cm en la etapa de madurez.

El diámetro de tallo del tratamiento Testigo fue mayor con 12.9 cm, siendo estadísticamente diferente al tratamiento Inhibitovir® a dosis baja el cual presentó un diámetro promedio de 10.2 cm, sin diferencias de los otros tratamientos evaluados. Esto puede deberse a un efecto secundario de la aplicación del Inhibitovir® y a la densidad de plantación, debido a que los inhibidores virales reducen la producción de aminoácidos y por tanto de proteínas, que son indispensables para el crecimiento; estos resultados concuerdan con lo presentado por Alonso *et al.* (2008) quienes reportaron un diámetro

Cuadro 2. Valores promedio de variables morfoagronómicas evaluadas en plantas de papaya cv Maradol roja a los ocho meses después del trasplante en Xalostoc, Ayala, Morelos.

Tratamientos	Altura de la planta (cm)	Diámetro del tallo (cm)	Flores por planta	Frutos por planta	Masa de frutos (g)	Rendimiento (t ha ⁻¹)
Testigo	151.4 a	12.9 a	12.6 a	50.8 a	1368.1 a	216.64 a
Virus Stop P	141.2 a	11.7 a,b	12.6 a	41.2 a	1376.7 a	205.86 a
Virus Stop C	151.8 a	11.7 a,b	10.0 b	47.4 a	1379.2 a	193.64 a
Inhibitovir P	140.4 a	10.2 b	10.2 b	46.0 a	1280.5 a	174.47 a
Inhibitovir C	159.0 a	11.0 a,b	11.0 a, b	52.6 a	1390.5 a	168.00 a
CV %	8.51405	13.9273	14.1844	20.4414	15.07465	20.57125

* Valores con letras iguales en columnas no son diferentes estadísticamente ($p < 0.05$).

promedio para esta variedad de 10.2 cm, mientras que Alcántara *et al* (2010) reportaron para la variedad Maradol roja, un diámetro promedio de 10.7 cm a los 11 meses de trasplante.

En número de flores por planta, el tratamiento Virus Stop® a dosis baja y el Testigo tuvieron los valores mayores (12.6), siendo diferentes con los tratamientos Virus Stop® a dosis alta e Inhibitovir® a dosis baja, con 10 y 10.2 flores, respectivamente (Cuadro 2). Datos similares son reportados por Mora y Bogante (2004) quienes contabilizaron entre 9.5 a 12.2 flores por planta.

El número de frutos amarrados por planta fue homogéneo en todos los tratamientos sin encontrar diferencias significativas (Cuadro 2). Estos valores se asemejan a los reportados por Alonso *et al.* (2008), en dos híbridos derivados de Maradol, así como su progenitor Maradol Roja con 34, 36 y 40 frutos por planta, respectivamente. Mientras que Arrieta y Carrillo (2002) reportan una media de producción de 13.9 frutos por planta en papaya Maradol a tres espaciamientos de drenaje superficial, valores inferiores a los obtenidos en esta investigación. No se detectaron diferencias estadísticas en el número de frutos por plantas en los diferentes tratamientos estudiados (Cuadro 2); sin embargo, los tratamientos Testigo e Inhibitovir® a dosis alta, tuvieron los valores más altos (50.8 y 52.6 frutos por planta respectivamente), el tratamiento Virus Stop® a dosis menor, el valor más bajo. Estos valores difieren de los reportados por Alcántara *et al* (2010) en Maradol roja quienes registraron un promedio de 10.7 frutos por planta y a los valores reportados por Alonso *et al.* (2008) que reportan un promedio de 40 frutos por planta.

El peso de frutos en los tratamientos evaluados tuvo una media general de 1.4 kg y no se encontraron diferencias significativas entre ellos (Cuadro 2). Arrieta y Carrillo (2002) reportan un peso promedio de frutos del cultivar Maradol roja de 1.3 kg,

Alonso *et al* (2008) registraron un peso de 2.1 kg/fruto y Hernández *et al.* (2015) obtuvieron pesos de 2.2 a 2.7 kg/fruto; estos duplican a los obtenidos en esta investigación.

El rendimiento potencial no presentó diferencias significativas entre tratamientos, el cual fluctuó de 168.0 a 216.64 t ha⁻¹ (Cuadro 2), el cual es elevado considerando el rendimiento de 110 t ha⁻¹ reportado en el estado de Oaxaca (SIAP, 2017), así mismo los reportados por Arrieta y Carrillo (2002) y Hernández *et al* (2015) con 60 y 74 t ha⁻¹ respectivamente. Contrario a estos resultados Sánchez y Samaniego (1998) y Rivas *et al.* (2008), reportaron rendimientos de 195.9 y 153.3 t ha⁻¹ para Red Lady y Maradol respectivamente.

Las aplicaciones de Inhibitovir® y Virus Stop® no ejercieron efecto en la incidencia e intensidad del PRSV, de igual manera en la eficacia de control. Así mismo no se observó respuesta en altura de planta, diámetro de tallo, número de flores y frutos por planta, peso de fruto y rendimiento potencial.

LITERATURA CITADA

- Alarcón HLE. 2013. Reporte técnico preprofesional sobre el cultivo de papaya (*Carica papaya* L.) en la localidad de Candelaria, Campeche. Tesis profesional. Facultad de Ciencias Agrícolas, Campus Xalapa, Universidad Veracruzana. Veracruz, México. 41 p. [https://www.yumpu.com/es/document/read/14393167/reporte-tecnico-preprofesional-sobre-el-cultivo-de-papaya-carica-](https://www.yumpu.com/es/document/read/14393167/reporte-tecnico-preprofesional-sobre-el-cultivo-de-papaya-carica)
- Alcántara JJA, Hernández CE, Ayvar SS, Damián NA y Brieto GT. 2010. Características fenotípicas y agronómicas de seis genotipos de papaya (*Carica papaya* L.) de Tuxpan, Guerrero, México. Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos 1(1):035-046. <http://oaji.net/articulos/2017/4924-1495199597.pdf>.
- Alonso EM, Tornet QY, Ramos RR, Farrés AE, Aranguren GM, y Rodríguez MD. 2008. Caracterización y evaluación de dos híbridos de papaya en Cuba. Agricultura Técnica en México 34 (3):333-339. https://www.researchgate.net/publication/46297525_Caracterizacion_y_evaluacion_de_dos_hibridos_de_papaya_en_Cuba
- Arrieta RA y Carrillo AE. 2002. Respuesta del papayo variedad maradol, a tres espaciamientos de drenaje superficial. Terra Latinoamericana 20(4): 435-447. <https://www.chapingo.mx/terra/contenido/20/4/art435-447.pdf>

- Cabrera MD, García HD, Caballero ÁMA, García MPL y Portal VO. 2011. Manejo de la mancha anular de la papaya mediante el uso de malla antiáfidos en viveros de *Carica papaya* L. var. maradol roja. *Fitosanidad* 15(4):241-244.
- Ciba-Geigy. 1981. Manual para ensayos de campo en protección vegetal. Segunda Edición. Basilea Suiza. 205 p.
- Clark, MF & Adams, AN. 1977. Characteristics of the Microplate Method of ELISA for the detection of plant viruses. *Journal of General Virology* 34:475-483. [10.1099/0022-1317-34-3-475](https://doi.org/10.1099/0022-1317-34-3-475).
- García PE, López HAY, Teliz OD and Nieto AD. 1995. Fruit set and yield of papaya (*Carica papaya* L.) under integrated management to reduce ringspot viruses effects. *Acta Horticulturae* 370:145-150. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1995.370.24>
- GIP (Grupo Interdisciplinario del cultivo de Papayo. Andrade H, Avila C, García E, Mora A, Nieto D, Téliz D, Villanueva JJA. 1994. La mancha anular del papayo en Veracruz, México y su manejo integral. Memoria, VII Reunión Científica Sector Agropecuario y Forestal del Edo. Veracruz, Veracruz. México. 289 p.
- Guzmán E, Gómez R, Pohlan AJ, Álvarez J, Pat J y Geissen V. 2008. La producción de papaya en Tabasco y los retos del desarrollo sustentable. *El Cotidiano* 23(147):99-106. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=32514712>
- Hernández CE, Villanueva JJ, Mora AJ, y Nava DC. 2010. Barreras de maíz en una estrategia de manejo integral para controlar epidemias del virus mancha anular del papayo (PRSV-P). *Agrociencia* 44(3):339-349.
- Hernández PR, García HIA, Casanovas CE, y Guillen SD. 2015. Nuevo activador fisiológico potencializador de la fructificación en papaya (*Carica papaya* L.). *Revista Brasileira de Fruticultura* 37(4):1065-1073.
- Hernández PR, Guillen SD, Pérez LM y Casanova CE. 2017. Viral inhibitors to control the Papaya ringspot virus on *Carica papaya*. *Ciencia e Investigación Agraria* 44(3):312-319. <http://dx.doi.org/10.7764/rcia.v44i3.1750>.
- Hernández R. 1994. Estudio sobre el virus de la mancha anular de la fruta bomba (*Carica papaya* L.), señalización de vectores, control e integración con otras medidas fitosanitarias. Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas, 113 p., 1994. https://www.researchgate.net/publication/262804314_Estudio_sobre_el_virus_de_la_Mancha_Anular_de_la_Fruta_bomba_Carica_papaya_L_senalizacion_de_vectores_control_e_integracion_con_otras_medidas_fitosanitarias
- López M, Pérez R, Luís R, Hautrive M, Casio E, Dariel Y and Mederos C. 2009. Use of virals inhibitors to control of Papaya ringspot virus (PRSV) in *Carica papaya* L. https://www.researchgate.net/publication/235993063_Use_of_virals_inhibitors_to_control_of_Papaya_ringspot_virus_PRSV_in_Carica_papaya_L
- Ministerio de Agricultura (MINAG). 1982. Reunión de coordinación para analizar la problemática fitosanitaria del cultivo del papayo en la zona central de Perú. 2 p.
- Mora E, y Bogantes A. 2004. Evaluación de híbridos de papaya (*Carica papaya* L.) en pococí, limón, Costa Rica. *Agronomía Mesoamericana* 15(1):39-44. https://www.researchgate.net/publication/26507476_Evaluacion_de_hibridos_de_papaya_Carica_papaya_L_en_Pococi_Limon_Costa_Rica
- Rabara RC, Valencia LD, Sumalde AC, Bajet NB and Villegas VN. 1996. Correlation between aphid abundance and ringspot virus disease incidence in papaya. *The Philippine Journal of Crop Sciences* 21:58-60.
- Rivas VP, Mora AG, Téliz OD, Mora AA. 2008. Evaluación de barreras vegetales en el manejo integrado de la mancha anular del papayo en Michoacán, México. *Summa Phytopathologic* 34(4):307-312. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-54052008000400001>.
- Rosales LA, Flores DM, Aguirre UL, Gonzales VR, Villegas JN y Vega OH. 2013. Diversidad de áfidos (Hemiptera: Aphinidae) en el sureste de Coahuila. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 4(7):987-997. <http://www.scielo.org.mx/pdf/remexca/v4n7/v4n7a2.pdf>
- Sánchez SE y Samaniego RA 1998. Comportamiento fenológico de variedades de papayo en el sur de Sonora. Memoria del XVII Congreso de Fitogenética. Acapulco, Guerrero, México. p. 75.
- SIAP. 2017. Cierre de la producción agrícola. <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/>
- Suárez QM, Mendoza BI, Monroy RJ, De la Cruz MJ, Angulo GO y González RO. 2013. Aislamiento, identificación y sensibilidad a antifúngicos de hongos fitopatógenos de papaya cv. Maradol (*Carica papaya* L.). *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha* 14(2):115-124. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=81329290004>
- Villanueva JJA y Peña R. 1991. Áfidos (Homóptera: Aphididae) colectados en trampas amarillas de agua en la planicie costera de Veracruz, México. *Agrociencia Serie Protección Vegetal* 2:7-20.
- Villegas JN. 2000. Afidofauna alada (Homoptera: Aphinidae) de la región citrícola de General Teran, Nuevo Leon. 1996-1997. Tesis de Licenciatura. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN. 120 p.