

Efecto antifúngico de quitosano y ácido salicílico sobre *Botrytis cinerea* aislado de arándano (*Vaccinium corymbosum*)

Ramos-Bell, S.¹, Velázquez-Estrada, R.M.¹, Hernández-Montiel, L.G.², Gutiérrez-Martínez, P.¹

¹Tecnológico Nacional de México/Instituto Tecnológico de Tepic. Av. Tecnológico # 2595, Col. Lagos del Country. C.P. 63175. Tepic, Nayarit. México. Tel: (311) 211 94 00. ²Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C., La Paz, Baja California Sur, 23096, México. Correo: pgutierrez@ittepic.edu.mx

Palabras clave: Postcosecha, Fitopatógeno, Agente control

Introducción

El arándano (*Vaccinium corymbosum*) es un cultivo que en México tiene un gran potencial por ser utilizado para exportación y muy atractivo por sus propiedades antioxidantes. Dado el pequeño tamaño del fruto, este es susceptible a distintos factores de deterioro y ataque de fitopatógenos, siendo *Botrytis cinerea* el principal causante de pérdidas postcosecha de este cultivo. Este es un hongo necrotrófico causal de la enfermedad del moho gris que alcanza la mayor expresión de síntomas de la enfermedad durante la etapa postcosecha del arándano, por lo que es de suma importancia el control de este patógeno durante esta etapa, así como durante el almacenamiento del fruto. Como ya ha sido demostrado, los fungicidas sintéticos utilizados en el control de fitopatógenos representan un daño al medio ambiente y la salud, por ello, se estudian diversos sistemas alternativos al uso de estos fungicidas. El quitosano es un biopolímero biodegradable y no tóxico, es una de estas alternativas que ha demostrado buenos resultados para el control de distintos fitopatógenos presentes en frutos [1]. Así mismo, se ha evaluado como agente inhibidor del crecimiento de algunos patógenos, el ácido salicílico que es un compuesto fenólico presente en las plantas, como una de las alternativas al uso de fungicidas sintéticos. Al ser el mercado europeo uno de los principales consumidores de arándano es un desafío lograr que este llegue con buena calidad a su destino. Por ello, el objetivo de esta investigación fue determinar la eficiencia *in vitro* del quitosano y ácido salicílico como métodos alternativos al uso de fungicidas sintéticos para el control del moho gris causado por *Botrytis cinerea* en frutos de arándano (*Vaccinium corymbosum*).

Metodología

Aislamiento e identificación de *Botrytis cinerea*

Frutos de arándano en estado de madurez fisiológico se obtuvieron del estado de Nayarit y se sometieron a condiciones de temperatura y humedad establecidas (25 °C, 95 %) hasta el desarrollo de la enfermedad. El patógeno fue aislado cortando pequeñas secciones de tejido de 1x1 cm, las secciones de tejidos se colocaron en agar papa dextrosa (APD) y se incubaron a 25 °C por un periodo de 6 a 8 días bajo condiciones estériles. La identificación a nivel de género fue mediante análisis macroscópico y microscópico empleando claves taxonómicas [2]. Para la identificación a nivel especie se emplearon los primers ITS 1 y ITS 2 mediante análisis molecular.

Determinación actividad antifúngica

Se llevó a cabo la evaluación *in vitro* teniendo en cuenta la inhibición del crecimiento micelial, esporulación y porcentaje de germinación. Para ello se emplearon 3 concentraciones de quitosano de 90% desacetilación (0.5, 1, 1.5 % p/v) y 3 de ácido salicílico (Sigma Aldrich) (2, 3, 5 mM). El medio de cultivo APD conteniendo los distintos agentes de control se vertió en placas Petri de 9 cm de diámetro. Como control se inocularon placas con hongo sin tratamientos y el fungicida clorotalonil (Bravonil® 720 SC). Posteriormente se colocaron en las cajas Petri discos de 0.8 cm con micelio de *Botrytis cinerea* de 5 días de edad y fueron incubados a 25 °C durante 10 días bajo condiciones de oscuridad [3]. Se determinó el diámetro micelial cada 24 h por 10 días mediante el programa ImageJ®. A las placas de los tratamientos y el control con 10 días de incubación se agregaron 10 mL de agua destilada estéril, las soluciones obtenidas se filtraron mediante gasas esterilizadas. El conteo de esporas se realizó con la cámara de Neubauer, a través de un microscopio óptico utilizando el objetivo 40X (Motic BA 300, Canadá). El porcentaje de germinación de esporas se realizó

tomando 20 μL de la suspensión de esporas obtenida de cada tratamiento y se añadieron a disco de APD (20 mm de diámetro). Los discos fueron inoculados a 25 °C y cada hora durante 7 h a partir de la inoculación se realizó el conteo de la germinación de esporas empleando un microscopio óptico (Motic BA300, Canadá) utilizando el objetivo 40X. Se consideró germinada la espора cuando la longitud del tubo germinativo alcanzó el doble del diámetro de la misma [3].

Análisis estadístico

Se utilizó un diseño completamente al azar con 5 repeticiones por tratamiento. Los resultados fueron analizados estadísticamente mediante un análisis de varianza (ANOVA) y se utilizó la prueba LSD Fisher ($P < 0.05$) para determinar las comparaciones de medias empleando el programa estadístico Statistica v12.0 (StatSoft Inc., 2013).

Resultados y discusión

Identificación del patógeno

Tras 7 días de someter el fruto de arándano a condiciones de humedad y temperatura establecidas se observaron los síntomas correspondientes a la enfermedad del moho gris. Posterior al aislamiento del patógeno del fruto, se obtuvo una colonia con un crecimiento micelial concéntrico de color gris y con una textura algodonosa (Figura 1). El análisis microscópico reveló estructuras formadas por hifas septadas con ramificaciones y conidióforos con abundantes conidios de forma ovoides y lisos. De acuerdo a la identificación microscópica y molecular se determinó que el patógeno aislado del fruto de arándano pertenece a *Botrytis cinerea*, agente causal del moho gris, ya que se observaron las características morfológicas propias de este patógeno según las claves taxonómicas descritas [2].

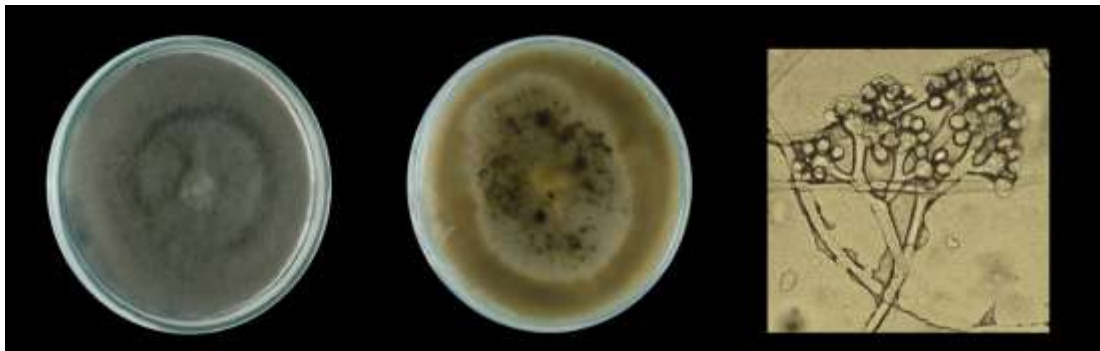


Figura 1. Crecimiento micelial de *Botrytis cinerea* a los 10 días de incubación a 25 °C. A: anverso de la placa, B: reverso de la placa, C: conidióforos observados al microscopio con objetivo 40X.

Evaluación de crecimiento micelial

El crecimiento micelial de las colonias de *Botrytis cinerea* incubadas a 25 °C posterior a los 10 días se vio afectado por los tratamientos aplicados con respecto al control (Figura 2).



Figura 2. Efecto de quitosano (CH) y ácido salicílico (AS) sobre el crecimiento micelial de *Botrytis cinerea* a 10 días de incubación.

El porcentaje de inhibición fue significativamente diferente ($P < 0.05$) para cada tratamiento (Tabla 1), siendo el quitosano a una concentración de 1.5 % el que mejor resultado mostró con un 93.38 % de inhibición de crecimiento micelial. En cuanto al tratamiento con ácido salicílico el crecimiento de *Botrytis cinerea* disminuyó significativamente siendo dependiente de la concentración. Se plantea que como posible mecanismo de acción del quitosano destaca su capacidad para interactuar electrostáticamente con la pared celular del hongo afectando su integridad provocando, por tanto, cambios morfológicos en sus hifas y estructuras reproductivas [1]. Por otro lado, el ácido salicílico puede activar péptidos antimicrobianos que afectan directamente el crecimiento del patógeno [4].

Tabla 1. Efecto del quitosano y ácido salicílico sobre el crecimiento micelial de *B. cinerea*.

Tratamientos	Concentración	Crecimiento micelial (mm)	Inhibición crecimiento (%)
Quitosano	0.5 %	30.91 ± 3.04 d	71.71 ± 4.15 d
	1.0 %	26.38 ± 2.28 d	77.57 ± 2.80 d
	1.5 %	13.42 ± 4.04 e	93.38 ± 4.68 e
Ácido salicílico	2 mM	86.00 ± 3.06 b	4.88 ± 3.73 b
	3 mM	85.63 ± 2.65 b	5.29 ± 3.24 b
	5 mM	49.88 ± 18.90 c	48.90 ± 23.06 c
Clorotalonil	0.3 %	0.0 ± 0 f	100 ± 0 f
Control	-	90 ± 0 a	0.0 ± 0 a

*Los valores se expresaron como media ± desviación estándar ($n = 5$). Letras distintas en cada columna indican diferencias significativas entre los tratamientos ($P < 0.05$).

Evaluación de la esporulación

El efecto de los distintos tratamientos sobre la esporulación de *Botrytis cinerea* se muestra en la **Tabla 2**, en la misma se observan diferencias significativas entre las concentraciones de quitosano y ácido salicílico. A mayor concentración de quitosano y ácido salicílico se obtuvo menor producción de esporas/mL. Este efecto provocado por el quitosano sobre la esporulación de *Botrytis cinerea* es similar al trabajo desarrollado por [5] en el cual el efecto de la aplicación de quitosano a 1% sobre la esporulación de *Botrytis cinerea* en uvas, se ve disminuido significativamente. Dentro de los posibles mecanismos de acción atribuidos al quitosano se plantea que este limita la formación y crecimiento de las estructuras reproductivas del fitopatógeno por la interacción que existe entre el compuesto y los fosfolípidos de la pared celular fúngica [6]. En cuanto al efecto que puede ejercer el ácido salicílico como agente inhibidor del crecimiento de esporas fúngicas existe un reporte similar, en el cual la aplicación de ácido salicílico a 5mM disminuye la esporulación/mL de *Colletotrichum* sp. También se infieren que el efecto del ácido salicílico exógeno se puede deber fundamentalmente a su producción de compuestos antimicrobianos que actúan sobre las estructuras reproductivas del patógeno [7].

Tabla 2. Efecto del quitosano y ácido salicílico sobre la esporulación de *Botrytis cinerea*.

Tratamientos (Concentración)	Esporulación (esporas/mL)
Control	$3.00 \times 10^7 \pm 2.00$ a
Clorotalonil (0.3 %)	0 ± 0 b
Quitosano (0.5 %)	$4.20 \times 10^6 \pm 1.83$ c
Quitosano (1.0 %)	$3.10 \times 10^6 \pm 1.22$ c
Quitosano (1.5 %)	$7.5 \times 10^5 \pm 0.00$ d
Ácido salicílico (2 mM)	$9.60 \times 10^6 \pm 6.18$ e
Ácido salicílico (3 mM)	$8.30 \times 10^6 \pm 5.69$ e
Ácido salicílico (5 mM)	$7.00 \times 10^5 \pm 1.29$ d

*Letras distintas en la tabla indican diferencias significativas entre los tratamientos a ($P < 0.05$).

Evaluación del porcentaje de germinación

La Figura 3 muestra como el quitosano y ácido salicílico con respecto al control, influyeron sobre la germinación de *Botrytis cinerea* con el aumento de su concentración. A excepción del fungicida clorotalonil, el ácido salicílico a 5 mM fue el que inhibió en un 90% la germinación de las esporas, seguido del quitosano a 1.5 % con el cual se alcanzó solo un 41 % de germinación. En este sentido se asevera que la diferencia en cómo actúa el quitosano sobre el crecimiento del micelio y la germinación puede estar condicionado por distintos factores como las propiedades físico-químicas de este compuesto de origen biológico y así como la naturaleza del fitopatógeno [4]. En cuanto al efecto antifúngico derivado de la aplicación de quitosano, se ha demostrado que este puede interferir con la síntesis de RNA y proteínas, lo que estaría provocando en las células fúngicas salida de material citoplasmático, nucleótidos y fosfatos [8].

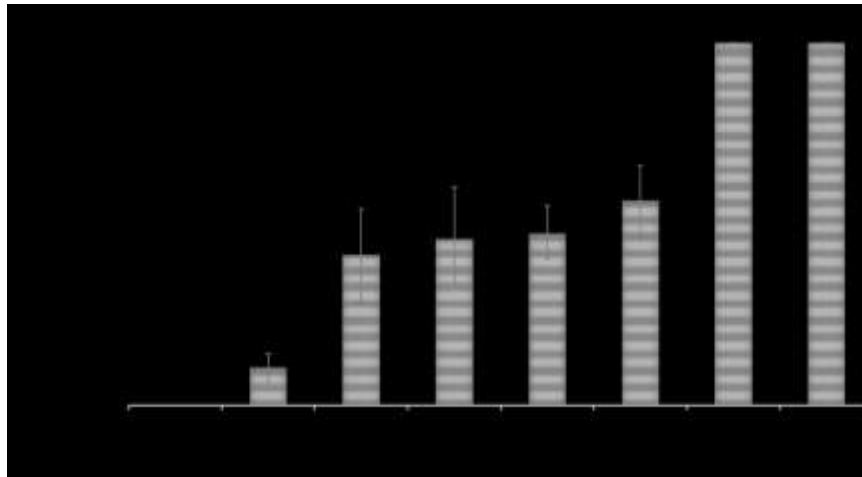


Figura 3. Efecto del quitosano y ácido salicílico sobre la germinación de *B. cinerea*.

Conclusiones

Se aisló e identificó mediante pruebas macro y microscópicas, de frutos de arándanos, el hongo *Botrytis cinerea*, causante de la enfermedad del moho gris. Se evaluó de forma *in vitro* la capacidad antagónica del quitosano y el ácido salicílico a distintas concentraciones, hacia *B. cinerea*. Como resultado de la evaluación de la inhibición del crecimiento micelial el quitosano a 1.5 % fue el que mejores resultados mostró con respecto al control y a los demás tratamientos con un 93 % de inhibición. En cuanto a la esporulación se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos, siendo más efectivo el quitosano a 1.5 % y el ácido salicílico a 5 mM. El proceso de germinación del hongo se vio afectado por los tratamientos a medida que aumentó su concentración, aunque este no fue inhibido completamente. En general el quitosano y ácido salicílico, propuestos como alternativa al control fúngico, intervienen en los procesos de crecimiento, esporulación y germinación de *Botrytis cinerea* agente causal de la enfermedad del moho gris en frutos de arándanos.

Referencias

1. Gutiérrez-Martínez P., Ledezma-Morales, A., Romero-Islas, L.C., Ramos-Guerrero, A., Romero-Islas, J., Rodríguez-Pereida, C., Casas-Junco, P., Coronado-Partida, L., González-Estrada, R. (2018). *Chitin-Chitosan - Myriad Funct in Sci and Technol.* 1: 321-327.
2. Barnett H. L., Hunter, B. B. (1998). Illustrated genera of imperfect fungi. St. Paul, Minnesota, USA: The American Phytopathological Society.
3. Jiang H., Sun Z., Jia R., Wang X., Huang J. (2016). Effect of Chitosan as an Antifungal and Preservative Agent on Postharvest Blueberry. *J Food Qual* **39**:516–523.
4. Berumen Varela G., Ochoa Jiménez V. A., Báez Sañudo R., Gutiérrez Martínez P. (2015). Efecto del ácido salicílico en la inducción de resistencia a *Colletotrichum* sp. en frutos de plátano durante postcosecha. *Rev Iber de Tecnol Postc* **16**(1): 27–34.
5. Peian Z., Haifeng J., Peijie G., Sadeghnezhad E., Qianqian P., Tianyu D., Teng L., Huanchun J., Jinggui F. (2020). Chitosan induces jasmonic acid production leading to resistance of ripened fruit against *Botrytis cinerea* infection. *Food Chem.* **337**, 127772.
6. Gutiérrez-Martínez P., Ramos-Guerrero A., Rodríguez-Pereida C., Coronado-Partida L., Angulo-Parra J., González-Estrada R. (2018). *Postharvest Disinfect. Fruits Veg.* 231–241. Elsevier.
7. Mekawi E. M., Khafagi E.Y., Abdel-Rahman F.A. (2019). Effect of Pre-Harvest Application with Some Organic Acids and Plant Oils on Antioxidant Properties and Resistance to *Botrytis Cinerea* in Pepper Fruits. *Scien Horti* **257**(April): 108736.
8. Bautista-Baños S., Ventura-Aguilar R.I., Correa-Pacheco Z., Corona-Rangel, M.L (2017). Chitosan: a versatile antimicrobial polysaccharide for fruit and vegetables in postharvest – a review. *Rev Chapingo Ser Horti*. **23**:103–121.