

## Control del patógeno *Colletotrichum asianum* asilado de fruto de mango mediante la aplicación de agentes biológicos-orgánicos

Moreno-Hernández, C.L.<sup>1\*</sup>, Zambrano-Zaragoza, M.L.<sup>2</sup>, Velázquez-Estrada, R.M.<sup>1</sup> y Gutiérrez-Martínez, P.<sup>1</sup>

<sup>1\*</sup>Laboratorio Integral de Investigación en Alimentos, Instituto Tecnológico de Tepic, Av. Tecnológico # 2595 Col. Lagos del Country, C.P. 63175. Nayarit, México. <sup>2</sup>Laboratorio de Transformación y Tecnologías Emergentes en Alimentos, Km 2.5 Carretera Cuautitlán–Teoloyucan, San Sebastián Xhala, Cuautitlán Izcalli, Edo de México, C.P. 54714, México. Correo: [crlimorenohe@ittpic.edu.mx](mailto:crlimorenohe@ittpic.edu.mx).

**Palabras clave:** alternativa postcosecha, fruto tropical, GRAS, fitopatógeno, comercialización

### Introducción

El fruto de mango es uno de los cultivares más importantes a nivel internacional. México ocupa el 6to lugar en producción mundial y dentro de los estados a nivel nacional con mayor potencial productivo se encuentra Nayarit, que se posiciona como el tercer productor de mango nacional. Este cultivo es atacado severamente por la enfermedad antracnosis causada por el fitopatógeno *Colletotrichum* sp. que causa hasta un 30% de pérdidas en postcosecha. La incidencia de este patógeno aunado a un deficiente manejo postcosecha limita la comercialización nacional e internacional de frutos [1,2]. Para el control de esta enfermedad postcosecha se continúa con la aplicación de fungicidas. El mercado internacional ha optado por demandar y consumir frutos libres de residuos químicos y buscan que los métodos de conservación de los frutos sean tecnologías amigables con el medio ambiente. Compuestos categorizados como “Generalmente Reconocido como Seguro” (GRAS) se han comenzado a aplicar en postcosecha como una posible alternativa de control de origen biológico-orgánico. Dentro de este grupo de compuestos se encuentran el quitosano, ácido acético, ácido peracético y peróxido de hidrógeno [3-6]. El biopolímero de quitosano ha sido aplicado en la postcosecha de fruto de mango y se ha confirmado su efecto antifúngico contra diversos patógenos que lo atacan [5]. Con respecto al ácido acético, ácido peracético y peróxido de hidrógeno, poca información sobre su efecto antimicrobiano individual o combinado se ha reportado en este fruto. Debido a esto, en el presente trabajo se propuso como objetivo evaluar el efecto de control *in vitro* de estos agentes sobre el desarrollo del hongo *Colletotrichum* sp. y su posterior aplicación combinada en frutos de mango con la finalidad de reducir de la incidencia y severidad del hongo en el fruto durante su comercialización postcosecha.

### Metodología

#### ***Aislamiento e identificación morfológica y molecular del patógeno***

El hongo *Colletotrichum* sp. se aisló apartir de fruto de mango “Tommy Atkins”, adquiridos de mercados locales del municipio de Tepic, Nayarit. Los frutos se almacenaron a una temperatura de 25 °C temperatura y con una humedad relativa de 80%, en cámaras de almacenamiento hasta el desarrollo de los síntomas de la enfermedad antracnosis. El tejido infectado fue cortado y se cultivo en Agar Papa Dextrosa (PDA) a 25 °C por 5 días. El hongo desarrollado se purificó mediante resiembras constantes bajo las mismas condiciones de cultivo. La cepa aislada se consideró pura cuando presento características macroscópicas homogéneas. La identificación a nivel género se realizó identificando las características macroscópicas y microscópicas mediante los métodos establecidos por Weir *et al.* (2012). La identificación molecular se realizó mediante extracción de ADN del hongo *Colletotrichum* sp. con diez días de desarrollo. Posteriormente el ADN fue amplificado mediante la técnica PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) usando los cebadores de las regiones ITS (ITS1/ITS4) y GAPDH (GDF1/GDR2). Las secuencias de ADN obtenidas se compararon con las registradas en la base de datos del GenBank y mediante porcentaje de identidad se confirmó la especie del hongo.

### **Preparación de agentes de control biológicos-orgánicos**

Se emplearon cuatro diferentes agentes de control de origen biológico-orgánico y de grado comercial: quitosano comercial (QC), peróxido de hidrógeno (PH), ácido acético (AA) y ácido peracético (AP). Las concentraciones aplicadas fueron 0.1, 0.5, 1.0, 1.5%, en el caso de QC una concentración adicional al 2.0% fue aplicada, dado la eficiencia de control antifúngico reportada por otros autores.

### **Aplicación in vitro de agentes de control**

Para la evaluación del efecto individual de cada agente de control, se colocaron en cajas Petri la combinación el agente de control y PDA. Cada caja fue inoculada con un disco de micelio de 7 mm del hongo *Colletotrichum sp.* con 10 días de desarrollo. Las cajas Petri se incubaron a 25 °C por 10 días y se procedió a evaluar el crecimiento micelial, esporulación y germinación.

Una vez obtenidas las dos mejores concentraciones de cada agente de control se procedió a realizar combinaciones de los cuatro distintos agentes de control. Se preparó la solución de QC a las concentraciones correspondientes, se dejó agitar por 24 h y trascurrido el tiempo se ajustó el pH a 5.6 con NaOH 0.1N. La solución de quitosano sirvió como matriz de incorporación de los agentes oxidantes a las concentraciones correspondientes. Una vez realizadas las formulaciones se aplicaron en combinación con PDA, inocularon e incubaron bajo las mismas condiciones que los tratamientos individuales y posteriormente se realizaron las evaluaciones correspondientes. Para el análisis de los resultados se utilizó un diseño de bloques completamente aleatorizado. Las diferencias entre medias de tres réplicas por tratamiento, se analizaron mediante una prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ ) utilizando el sistema estadístico SAS System 9.0.

### **Crecimiento micelial**

El crecimiento micelial se determinó midiendo el diámetro radial del hongo *Colletotrichum sp.* cada 24 h por 10 días. El porcentaje de inhibición se calculó con los valores de crecimiento finales, se tomó como referencia el crecimiento del control con respecto al de cada agente de control.

### **Esporulación y germinación**

Las cajas con 10 días de desarrollo de cada tratamiento se emplearon para la determinación de esporulación. Se obtuvo una solución de esporas, al adicionar agua estéril sobre el micelio. Posteriormente 20  $\mu$ L de la solución de esporas se colocaron en un hemocitómetro para cuantificar en microscopio óptico el número de esporas y obtener la concentración. Para la determinación de germinación, se utilizaron alícuotas de la suspensión de esporas de *Colletotrichum sp.* se colocaron en tubos Eppendorf con caldo papa dextrosa para obtener una concentración final de  $1 \times 10^6$  esporas/ml. Los agentes de control fueron adicionados en una proporción del 20% con respecto al volumen de caldo papa dextrosa. Los Eppendorf se incubaron a 25 °C con agitación moderada por 9 h hasta la germinación de las esporas. Se confirmó la germinación de las esporas utilizando un microscopio óptico con una magnificación de 40 x. Se cuantificaron las esporas sin germinar en un campo visual (100 esporas) y se calculó el porcentaje de germinación [3].

### **Aplicación in vivo de agentes de control**

Frutos de mango en madurez fisiológica fueron lavados con agua corriente y con una solución de hipoclorito de sodio al 2% por dos min. Se evaluó el efecto preventivo de las formulaciones a base de los agentes de control, se realizaron cuatro distintas heridas al fruto con un punzón y se aplicaron por a inmersión con las formulaciones por inmersión durante 1 min, las aplicaciones se realizaron por unicapa y bicapa. En las diferentes heridas se inocularon diferentes concentraciones de inóculos ( $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^4$  y  $1 \times 10^3$  esporas/ml) y como control agua destilada. Los frutos se almacenaron a 25 °C bajo control de humedad relativa por 8

días. Se evaluó la incidencia de antracnosis y al finalizar el almanceamiento se evaluó el daño interno en el fruto [2].

## Resultados y discusión

### Aislamiento e identificación de patógeno

La cepa aislada obtuvo un crecimiento radial máximo al decimo día de almacenamiento a 25 °C en medio PDA. Mostró micelio algodonoso de coloración blanca-beige y acérvulos de color anaranjado. A nivel microscópico se identificaron esporas, con forma cilíndrica con extremos redondeados y contenido granular (Figura 1). Características macro y microscópicas semejantes a las del presente trabajo han sido reportadas por otros autores para el género *Colletotrichum* sp. [1,2]. De acuerdo a la identificación molecular se confirmó que el patógeno aislado de frutos de mango "Tommy Atkins" correspondía a la especie *Colletotrichum asianum* con un 100% de identidad. Mediante prueba de patogenicidad se confirmó que el hongo *C. asianum* genera los síntomas característicos de antracnosis en fruto de mango. Previamente se ha reportado la incidencia de esta especie a nivel regional y nacional siendo una de las más patógenicas en el fruto de mango [2].

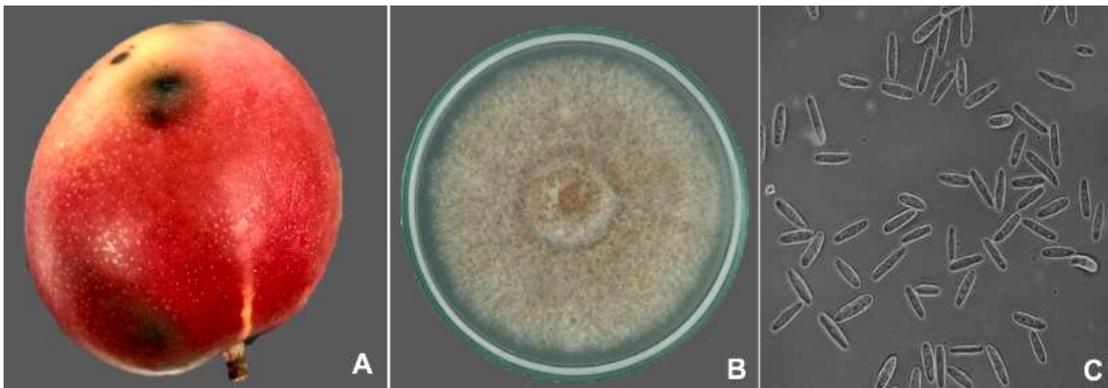


Figura 1. Desarrollo de *Colletotrichum asianum*. A. Fruto con síntomas de antracnosis. B) cepa desarrollada en medio PDA a 25 °C y C) esporas.

### Efecto de control *in vitro* agentes de control

#### *Crecimiento micelial, esporulación y germinación*

La aplicación individual *in vitro* de los métodos de control QC, PH, AA y AP lograron el control del hongo *C. asianum*. La aplicación de QC al 1.5% y QC al 2.0% inhibió el desarrollo del micelio del patógeno un 28.52% y 39.58%, respectivamente. En lo referente a la esporulación y germinación, se mostró que conforme aumentaban las concentraciones de QC ambos procesos se reducían. La esporulación se redujo entre un 75 y 85% con las concentraciones más elevadas de QC. Mientras que en el proceso de germinación se inhibió al 100% con la aplicación del 2.0% de QC. Este efecto antifúngico se debe al estado protonado del grupo amino ( $\text{NH}_3^+$ ) en la estructura del biopolímero, interactuado con los diferentes componentes que conforman la estructura del patógeno y generándole inestabilidad y daño [5]. Con respecto a la aplicación de PH (1.5%), AC (1.0 y 1.5%) y AP (0.5, 1.0 y 1.5%) a las concentraciones correspondientes mostraron un 100% de inhibición micelial del patógeno. Estos agentes de control se caracterizan por la formación de Especies Reactivas de Oxígeno (EROs) que resultan agresivas para el patógeno ocasionando oxidación en cadena a las moléculas que conforman su estructura [3,8].

Apartir de estos resultados se realizaron combinaciones entre los diferentes agentes de control, obteniéndose dos formulaciones distintas. Las fórmulas desarrolladas lograron la inhibición del patógeno del 76.87% y 87.65%, para F1 y F2, respectivamente. Los porcentajes de inhibición obtenidos sugirieron un posible efecto sinérgico entre los diferentes agentes de control, potencializando el efecto de control sobre el patógeno. Concentraciones bajas de esporas se encontraron y en el proceso de germinación no se detectó desarrollo del tubo germinativo en ninguna de las formulaciones. La aplicación de las formulaciones ocasionó daño a nivel micelio y esporas con respecto al tratamiento control. El micelio expuesto presentó amplia vacuolización a lo largo de estas estructuras y en las esporas un desorden citoplasmático (Figura 2).

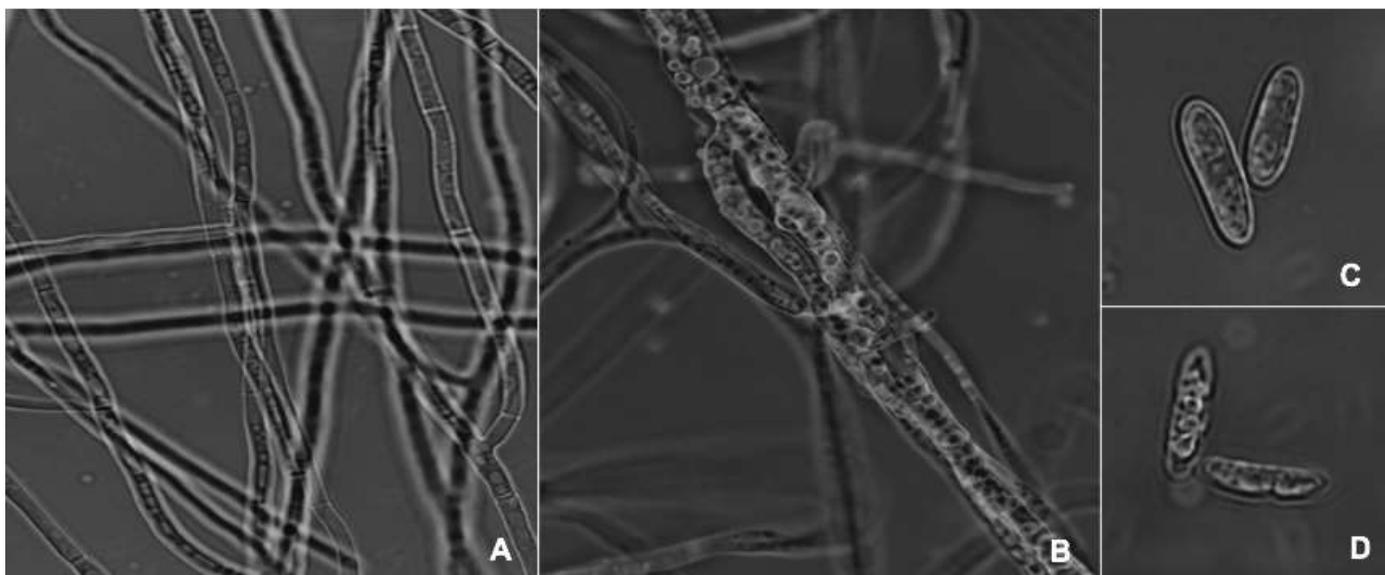


Figura 2. Efecto de la aplicación combinada de agentes de control sobre estructuras del patógeno *Colletotrichum asianum*. A) micelio control, B) micelio con tratamiento, C) esporas control y D) esporas con tratamiento.

### Efecto *in vivo* de agentes de control

La aplicación de las formulaciones redujo la incidencia de antracnosis durante el almacenamiento de fruto de mango (Figura 3). Los indicios de la enfermedad antracnosis comenzaron a partir del día 4 de almacenamiento, mostrándose manchas negras sobre la superficie de la cutícula del fruto. El tratamiento de bicapa resultó más eficiente que el unicapa para el control de inóculo de *C. asianum*. La aplicación por bicapa de ambas formulaciones no permitió el desarrollo del patógeno *C. asianum* a las concentraciones de inóculo  $1 \times 10^4$  y  $1 \times 10^3$  esporas/ml. A nivel de tejido interno no se mostró incidencia de antracnosis, es probable que las fórmulas formaran una barrera física que, aunado al posible efecto inductor, provocara que el daño no fuera severo o invasivo. Se ha reportado que la aplicación *in vivo* de los agentes de control aplicados en el presente trabajo, ejercen efecto inductor reforzando el mecanismo de defensa del fruto ante el ataque de patógenos. Este mecanismo promueve la síntesis de enzimas de patogenicidad como las enzimas peroxidasa (POD), polifenoloxidasas (PFO), fenilalanina amoniaco liasa (PAL), quitinasa y  $\beta$ -1,3-glucanasa, y síntesis de compuestos bioactivos como fenoles y flavonoides [7,8].

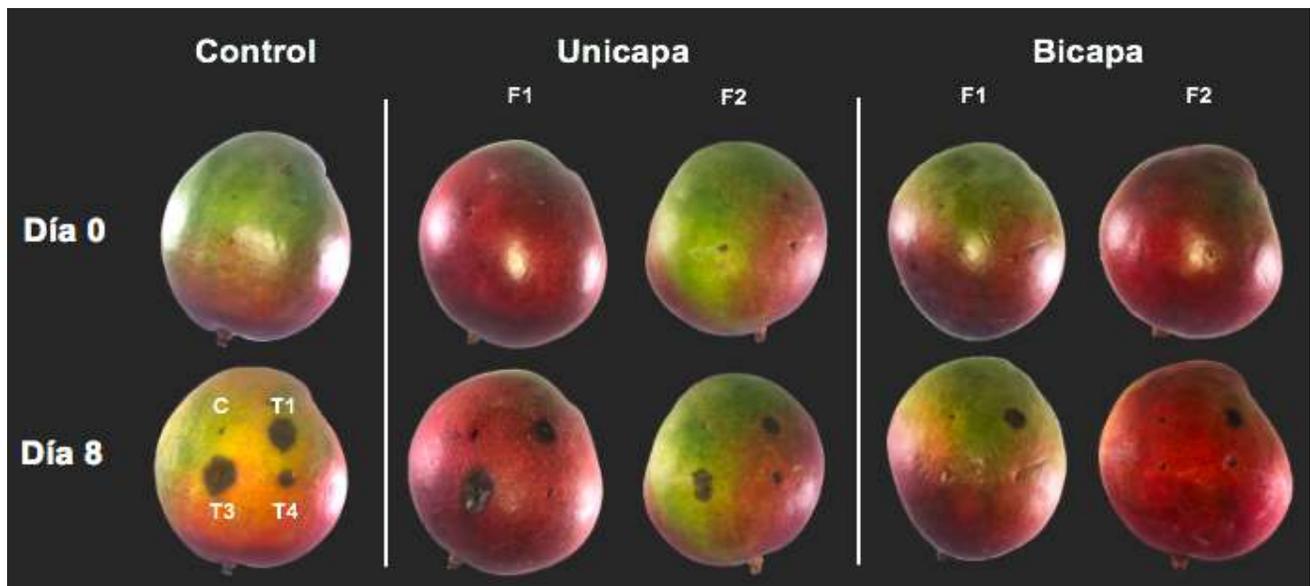


Figura 3. Aplicación de formulaciones F1 y F2 aplicadas por unicapa y bicapa para el control de postcosecha de *C. asianum* aplicado a diferentes concentraciones de inóculo e incubados a 25 °C por 8 días. C= agua; T1=  $1 \times 10^5$  esporas/ml; T2=  $1 \times 10^4$  esporas/ml y T3=  $1 \times 10^3$  esporas/ml.

## Conclusiones

El hongo *Colletotrichum asianum* aislado de mango mostró inhibición *in vitro* con la aplicación de los agentes de control de origen biológico-orgánico al ser aplicados de manera individual y en combinación. En frutos de mango las formulaciones obtenidas lograron reducir la incidencia de antracnosis durante el periodo de almacenamiento, prolongando su vida útil y calidad.

## Referencias

1. Weir B.S., Johnston P.R., Damm U. (2012). The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. *Stud. Mycol.* **73**: 115-180.
2. Tovar-Pedraza J.M., Mora-Aguilera J.A., Nava-Díaz C., Lima N.B., Michereff S.J., Sandoval-Islas J.S., Câmara M.P.S., Téliz-Ortiz D., Leyva-Mir S.G. (2020). Distribution and Pathogenicity of *Colletotrichum* species associated with mango anthracnose in Mexico. *Plant Dis.* **104**(1): 137-146.
3. Qin G., Liu J., Cao B., Li B., Tian S. (2011). Hydrogen peroxide acts on sensitive mitochondrial proteins to induce death of a fungal pathogen revealed by proteomic analysis. *PLoS One* **6**(7): 1-14.
4. Sisquella M., Casals C., Viñas I., Teixidó N., Usall J. (2013). Combination of peracetic acid and hot water treatment to control postharvest brown rot on peaches and nectarines. *Postharvest Biol. Technol.* **83**: 1-8.
5. Romanazzi G., Feliziani E., Sivakumar D. (2018). Chitosan, a biopolymer with triple action on postharvest decay of fruit and vegetables: Eliciting, antimicrobial and film-forming properties. *Front. Microbiol.* **9**: 1-9.
6. Alawlaqi M., Alharbi A. (2014). Impact of acetic acid on controlling tomato fruit decay. *Life Sci. J.* **11**: 114-119.
7. Ramos-Guerrero A., González-Estrada R.R., Montalvo-González E., Miranda-Castro S.P., Gutiérrez-Martínez P. (2018). Effect of the application of inducers on soursop fruit (*Annona muricata* L.): postharvest disease control, physiological behaviour and activation of defense systems. *Emirates J. Food Agric.* **30**: 1019-1025.
8. Vargas-Hernández M., Torres-Pacheco I., Gautier, F., Álvarez-Mayorga B., Cruz-Hernández A., García-Mier L., Jiménez-García S.N., Ocampo-Velázquez S.N., Feregrino-Perez A.A., Guevara-Gonzalez R.G. (2016). Influence of hydrogen peroxide foliar applications on *in vitro* antimicrobial activity in *Capsicum chinense* Jacq. *Plant Biosyst. An Int. J. Deal. with all Asp. Plant Biol.* **151**(2): 269-275.