

Efecto del quitosano en la inducción de resistencia contra *Colletotrichum* sp. en mango (*Mangifera indica* L.) cv. Tommy Atkins

Effect of chitosan on the induction of disease resistance against *Colletotrichum* sp. in mango (*Mangifera indica* L.) cv. Tommy Atkins

Guillermo Berumen Varela¹, Leonardo Daniel Coronado Partida¹,
Verónica Alhelí Ochoa Jiménez¹, Martina Alejandra Chacón López¹,
Porfirio Gutiérrez Martínez^{1*}

Berumen Varela, G., Coronado Partida, L. D., Ochoa Jiménez, V. A., Chacón López, M. A., Gutiérrez Martínez, P. Efecto del quitosano en la inducción de resistencia contra *Colletotrichum* sp. en mango (*Mangifera indica* L.) cv. Tommy Atkins. *Investigación y Ciencia de la Universidad Autónoma de Aguascalientes*. Número 66: 16-21, septiembre-diciembre 2015.

RESUMEN

El mango es susceptible a una enfermedad postcosecha denominada antracnosis, causada por el patógeno *Colletotrichum* sp. Los fungicidas han sido utilizados para controlar las enfermedades ocasionadas por hongos; sin embargo, ocasionan daño al medio ambiente. El quitosano posee propiedades antimicrobianas e induce resistencia en las plantas, en esta resaltan algunas enzimas, como la peroxidasa (POD). El objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto del quitosano en la inducción de resistencia contra *Colletotrichum* sp. en frutos de mango. A nivel *in vitro* el quitosano inhibió la germinación de esporas, la elongación del tubo germinativo y el crecimiento micelial de *Colletotrichum* sp. Para los tratamientos aplicados a los frutos en postcosecha, el quitosano a concentraciones de 1.0 y 1.5% inhibió por completo a *Colletotrichum* sp. Comparado con el control, el quitosano al 1.0% aumentó la actividad enzimática y la expresión del gen que codifica para la peroxidasa, esta respuesta pudiera considerarse como un posible mecanismo de acción del quitosano en frutos de mango.

Palabras clave: mango, quitosano, inducción de resistencia, peroxidasa, *Colletotrichum* sp.

Keywords: mango, chitosan, induction of disease resistance, peroxidase, *Colletotrichum* sp.

Recibido: 21 de abril de 2014, aceptado: 29 de enero de 2015

¹ Laboratorio Integral de Investigación en Alimentos-Laboratorio de Biotecnología, Instituto Tecnológico de Tepic.

* Autor para correspondencia: pgutierrez@itfepic.edu.mx

ABSTRACT

Mango is susceptible to a postharvest disease called anthracnose, caused by pathogen *Colletotrichum* sp. Chemical fungicides have been used against postharvest fungal diseases, but they cause damage to the environment. Chitosan shows antimicrobial properties, and induces resistance in plants highlighting the activity of some enzymes like peroxidase. The objective of this research was to evaluate the chitosan effect in the induction of resistance mechanism against *Colletotrichum* sp., in mango fruits. Chitosan inhibited spore germination, germ tube elongation, and mycelial growth of *Colletotrichum* sp. *in vitro*. For postharvest fruits the chitosan at 1.0% and 1.5% *Colletotrichum* sp. was completely inhibited in fruits inoculated with the fungi. Compared with the control, chitosan at 1.0% induced a significant increase in the enzymatic activity and gene expression of POD during the incubation period, suggesting that an enhanced gene expression of POD plays an important role as one of the main action mechanisms of chitosan.

INTRODUCCIÓN

Los frutos de mango son afectados en la etapa de postcosecha por una enfermedad denominada antracnosis, su agente causal es *Colletotrichum gloeosporioides*, lo que reduce la calidad del fruto y ocasiona pérdidas significativas en la producción (Arauz, 2000). El quitosano (poly-β-(1→4) N-acetil-d-glucosamina) es un derivado de la quitina, el cual se extrae del exoesqueleto de los crustáceos y se ha convertido en un tratamiento alternativo al uso de fungicidas. Es un polisacárido natural, biodegrada-

ble y no tóxico, que ha demostrado efectos fungicidas contra determinados patógenos de plantas y además es un inductor de mecanismos de defensa en tejidos vegetales (Terry y Joyce, 2004); es por ello que se considera uno de los productos más prometedores para el control de varios hongos en postcosecha (El Ghaouth et al., 1992; Bhaskara et al., 2000; Ben Shalom et al., 2003).

Se ha reportado que aplicaciones de quitosano al 1.5% inhiben el crecimiento de *Colletotrichum gloeosporioides* en frutos de papaya (Bautista Baños et al., 2003). López Mora et al. (2013) observaron que el crecimiento micelial y la esporulación se redujeron más de 70% e inhibió completamente la germinación de los conidios de *A. alternata*, aislado de frutos de mango. Varios estudios han indicado que algunas enzimas de óxido-reducción participan en el proceso de defensa e hipersensibilidad contra el ataque de hongos (Mohammadi y Kazemi, 2002; Zhu y Ma, 2007). Las peroxidasas (POD) son enzimas de óxido-reducción que participan en los procesos de la pared celular, como la producción de fenoles, suberización y lignificación de las células hospederas durante la reacción de defensa contra agentes patógenos (Kolattukudy et al., 1992).

Ben Shalom et al. (2003) demostraron que esta enzima (POD) fue inducida por el quitosano en pepino. Sin embargo, actualmente son escasas las investigaciones que evalúen la respuesta bioquímica y molecular en la etapa postcosecha de los frutos ante la aplicación de este biopolímero. Por lo anteriormente mencionado, los objetivos de esta investigación fueron: evaluar el efecto del quitosano en el control del crecimiento de *Colletotrichum sp. in vitro* y en postcosecha, así como la inducción de proteínas de resistencia y su expresión genética en la interacción *Colletotrichum*-mango.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los frutos de mango cv. Tommy Atkins fueron recolectados de un huerto localizado en el estado de Nayarit, México, en madurez fisiológica. Se aisló e identificó a nivel de género a los hongos patógenos de frutos de mango, mediante claves taxonómicas y dicotómicas, y se cultivó en Agar-papa-dextrosa (PDA) a 28 °C por 8 d (Barnet y Hunter, 1998). Las esporas se obtuvieron mediante un raspado superficial, se filtraron a través de gasa estéril y se ajustaron mediante un hematocímetro a una concentración de 1×10^6 esporas ml^{-1} . Para la preparación de las diferentes concentraciones de quitosano (0.1, 0.5, 1.0, 1.5

y 2.0%) se utilizó quitosano de bajo peso molecular (QBPM) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA, con un grado de desacetilación del 75-85%), mediante el protocolo establecido por El Ghaouth et al. (1991).

Medición del crecimiento micelial y germinación de esporas de *Colletotrichum sp. in vitro*

Se utilizaron discos de micelio (5 mm de diámetro) de *Colletotrichum sp.*, fueron colocados en el centro de cajas Petri con PDA que contenían las diferentes concentraciones de quitosano y se incubaron a 25 °C por 9 d. El crecimiento micelial se determinó midiendo el diámetro de la colonia cada 24 h por 9 d. Para medir los efectos del quitosano en la germinación de esporas y elongación del tubo germinativo de *Colletotrichum sp.* se ajustó con ayuda de una cámara de Neubauer una suspensión de 1×10^6 esporas ml^{-1} y se colocaron en discos con los diferentes tratamientos de quitosano; se observaron cada 60 min por 8 h.

Efecto del quitosano en la antracnosis de mango en postcosecha

Los mangos fueron lavados con agua corriente y desinfectados con NaClO al 2% por 1 min. Una vez que los frutos se encontraban en madurez de consumo (a juzgar por su color y textura), se dividieron en dos lotes: sin y con inoculación de *Colletotrichum sp.* Los tratamientos sin la inoculación de *Colletotrichum sp.* se inocularon con agua destilada estéril. Los demás tratamientos fueron inoculados con 20 μl de la suspensión de esporas (1×10^6 esporas ml^{-1}). Todos los frutos de tratamientos fueron sumergidos en las concentraciones de quitosano durante 1 min y se almacenaron a temperatura ambiente (25 °C) en cámaras de almacenamiento del laboratorio de biotecnología. El porcentaje de incidencia de la enfermedad en los frutos inoculados con *Colletotrichum sp.* se determinó 3 d después de la inoculación y almacenamiento. De inmediato se cortaron las secciones de tejido de cada uno de los tratamientos a las 0, 24, 48 y 72 h posinoculación (hpi), los cortes se congelaron con nitrógeno líquido y finalmente se almacenaron a -80 °C hasta su uso.

Actividad enzimática de la peroxidasa (POD)

La obtención del extracto crudo se realizó de acuerdo con el método descrito por Chen et al. (2000) con algunas modificaciones, las cuales se mencionan a continuación. Se trituraron 2 g de tejido de mango de cada tratamiento en un mortero con nitrógeno líquido y se homogenizaron con 10 ml de 100 mM de solución amortiguadora de fosfato de sodio (pH 6.4) y 0.2 g de polivinilpolipirrolidona (PVPP)

a 4 °C. Se centrifugó a 6000 r.p.m. por 30 min a 4 °C en una centrífuga Hettich Zentrifugen EBA 21. Se tomó el sobrenadante y este se volvió a centrifugar bajo las mismas condiciones. Finalmente, la pastilla se descartó y se tomó el sobrenadante. La actividad de la POD se realizó de acuerdo a la descrita por Tian (2006) y se expresó en Umg^{-1} de proteína. Las concentraciones de esta se determinaron de acuerdo al método de Bradford (1976).

Extracción de ARN y amplificación por RT-PCR

De acuerdo con los resultados del efecto del quitosano sobre *Colletotrichum* sp. *in vitro* en frutos post-cosecha y actividad de la POD, se eligió la concentración de quitosano al 1.0% como la óptima para el análisis molecular. La extracción de ARN fue realizada por el método de López Gómez y Gómez Lim (1992). Para el análisis de la expresión del gen por RT-PCR, el ADNc fue sintetizado con el kit SuperScript III, de acuerdo al manual del fabricante. Los oligonucleótidos para POD fueron 5'-AgTCCACCTTgCTT-gATT-3' y 5'-gAAgACATggggAATTTTACTCg-3', lo que generó un fragmento de 338 bp. Las condiciones para la amplificación por PCR fueron 94 °C por 5 min de desnaturalización inicial y un total de 35 ciclos de 94 °C por 30 s, 51.4 °C por 30 s y 72 °C por 1 min, con una extensión final a 72 °C por 10 min. Se usó el gen 18s como control interno para verificar la reacción.

Diseño estadístico

Para los tratamientos *in vitro* y actividad enzimática se usó un diseño de bloques completamente aleatorizado en los cuales se bloqueó el factor tiempo para disminuir la variabilidad entre tratamientos. Los resultados fueron analizados estadísticamente por análisis de varianza (ANOVA). La comparación de medias se realizó con una prueba de LSD ($P < 0.05$), mediante el lenguaje estadístico SAS System 9.0. Para los tratamientos *in vitro* se hicieron tres repeticiones; para la evaluación de la antracnosis, la unidad experimental consistió en 15 frutos por tratamiento con tres repeticiones; la actividad enzimática y expresión genética se realizó en cinco frutos por tratamiento con tres repeticiones. El experimento se realizó por duplicado y los resultados se promediaron.

RESULTADOS

Efecto del quitosano en el crecimiento micelial, esporulación y germinación de esporas de *Colletotrichum* sp.

En la Figura 1 se muestran los resultados del crecimiento micelial de *Colletotrichum* sp. durante los 9 días de incubación a 25 °C. Se observó una relación inversa

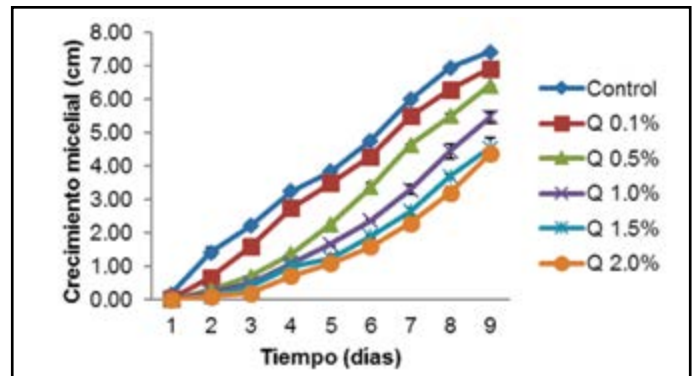


Figura 1. Cinética del crecimiento de *Colletotrichum* sp. aislado de frutos de mango (Tommy Atkins) durante 9 d a 25 °C en PDA, con y sin quitosano. Imagen elaborada por los autores.

entre el crecimiento y la concentración de quitosano aplicada. En relación con el control, todas las concentraciones evaluadas alteraron el crecimiento del hongo. El menor crecimiento de *Colletotrichum* sp. se obtuvo a las concentraciones de 1.5 y 2.0%.

En relación con la inhibición del crecimiento micelial, esporulación y germinación, se observaron diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los tratamientos de las tres variables analizadas (Tabla 1). El quitosano aplicado a 1.0, 1.5 y 2.0% inhibió completamente la germinación de los conidios del hongo.

Efecto del quitosano en el desarrollo de la antracnosis en mango

Cuando se infectó el fruto con el hongo, el control mostró los síntomas típicos de la antracnosis (manchas hundidas de color negro). El crecimiento de *Colletotrichum* sp. fue totalmente inhibido en los frutos que fueron tratados con quitosano a concentraciones de 1.0% y 1.5% durante un periodo de 3 d de incubación. En la concentración de 0.5% de quitosano el crecimiento del hongo comenzó hasta el día 3, lo que ocasionó lesiones de un diámetro de 1-2 cm. La efectividad del quitosano en el control de la enfermedad fue directamente proporcional a la concentración, no existió incidencia ni severidad de la enfermedad de antracnosis a 1.0 y 1.5% y se presentó una inhibición total del crecimiento del hongo (Figura 2).

Efecto del quitosano sobre la actividad de POD

La actividad de POD en frutos control (con y sin inoculación del hongo), mantuvo una actividad enzimática relativamente baja en comparación con la actividad de esta enzima en los frutos tratados con quitosano. En los frutos tratados con 1.0% de quitosano y no inoculados, la actividad de POD

Tabla 1. Efecto del quitosano a diferentes concentraciones en el crecimiento, esporulación y germinación de conidios de *Colletotrichum* sp.

Tratamiento	Inhibición del crecimiento micelial (%) *	Esporulación (esporas/ml) *	Germinación (%) *
Control	0 e	7.5 x 10 ⁵ a	100 a
0.1%	7.46 d	5 x 10 ⁵ b	30 b
0.5%	14.92 c	3.5 x 10 ⁵ c	13 c
1.0%	28.35 b	1.5 x 10 ⁵ d	0 d
1.5%	41.79 a	1.0x10 ⁵ e	0 d
2.0%	44.77 a	5 x10 ⁴ f	0 d

* Los valores seguidos por letras diferentes son significativamente diferentes de acuerdo a la prueba de LSD ($P < 0.05$.)

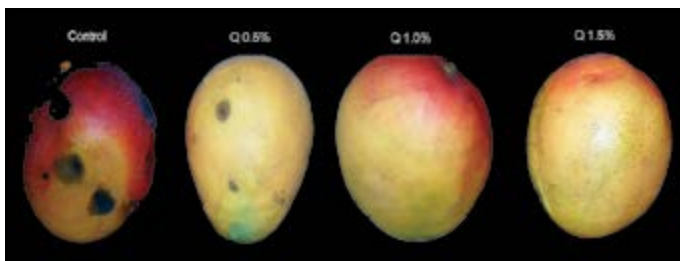


Figura 2. Efecto del quitosano a diferentes concentraciones en el desarrollo de antracnosis en frutos de mango después de 72 h de aplicados los tratamientos, almacenados a 25 °C. Imagen de los autores.

presentó el nivel más alto a las 24 hpi para después disminuir a su menor valor a las 72 hpi (Figura 3a), como se observa en la figura a esta concentración de 1.0% fue donde se indujo más la actividad de POD ($P < 0.005$). Resultados similares se presentaron cuando los mangos fueron tratados con quitosano e inoculados con *Colletotrichum* sp. (Figura 3b), en donde se observó que con la concentración de 1.0% la actividad de POD aumentó casi tres veces más a las 48 hpi y cuatro veces más a las 72 hpi en comparación con el control ($P < 0.05$) (Figura 3b).

Efecto del quitosano sobre la expresión genética de POD en mango

Debido a que la concentración de quitosano al 1.0% mostró un efecto significativo en los frutos en postcosecha así como en la evaluación de la actividad enzimática, se usó esta misma para analizar la expresión del gen que codifica para la POD en esta concentración. El gen POD presentó un nivel similar de expresión en los tratamientos no inoculados sin y con quitosano (Figura 4a-1 y 4a-2). Sin embargo, en los tratamientos inoculados la concentración de 1.0% de quitosano aumentó ligeramente la expresión genética de POD y mostró un incremento a las 0 y 24 hpi (Figura 4b-6 y 4b-8) en comparación con sus respectivos controles. Se presentó un aumento en la expresión del gen; lo que concuerda con los valores

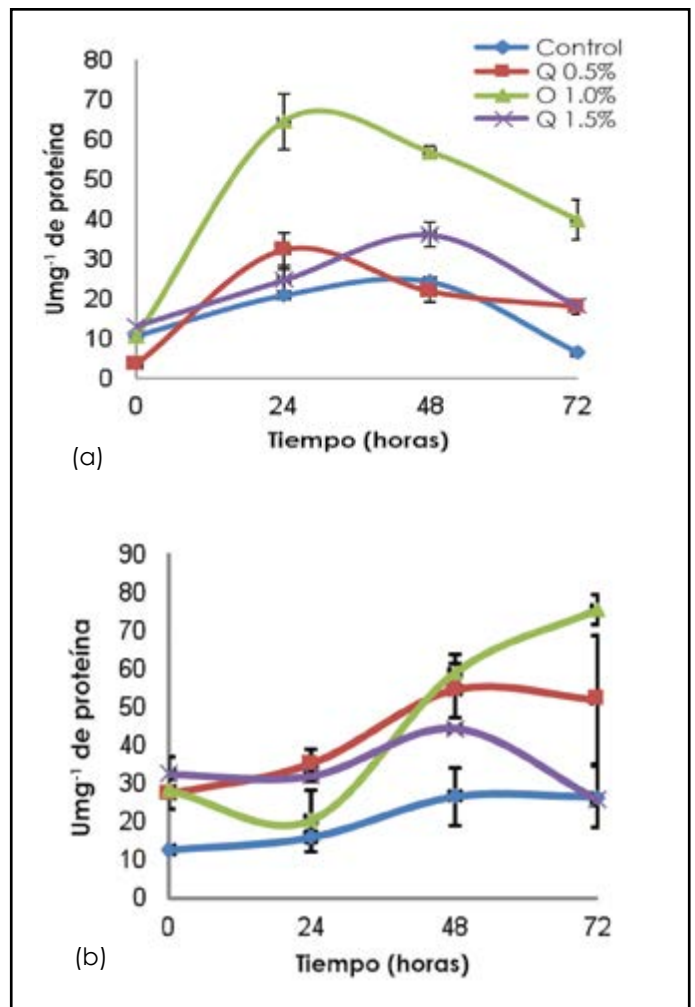


Figura 3. Efecto del quitosano sobre la actividad enzimática de la peroxidasa (POD) en mango cv. Tommy Atkins no inoculados (a) e inoculados con *Colletotrichum* sp. (b). Imagen elaborada por los autores.

previamente obtenidos en la actividad enzimática, con una tendencia muy similar en ambos casos.

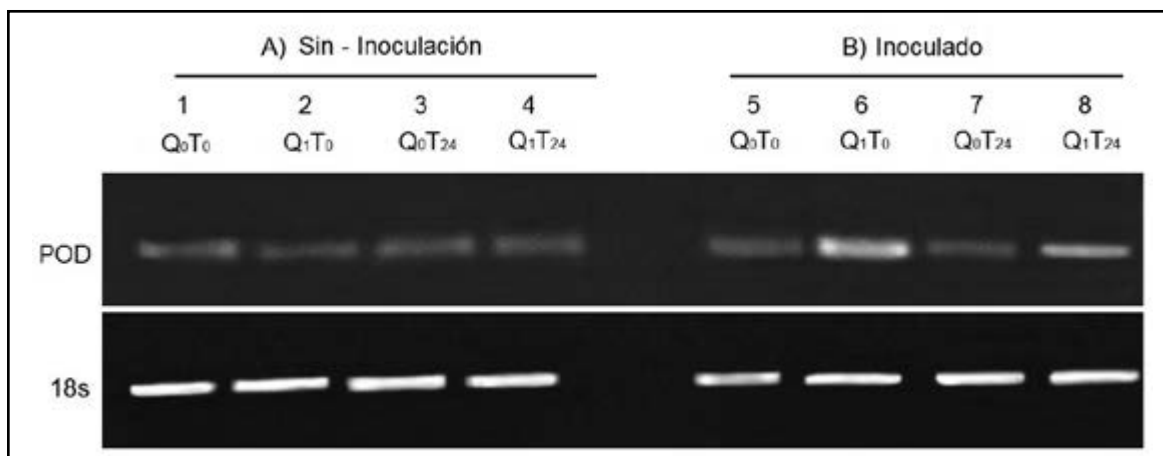


Figura 4. Gel de electroforesis del gen que codifica para la POD. **A)** Carriles 1-4 tratamientos sin inoculación. Carril 1, Q= 0%, T= 0 h, carril 2, Q= 1%, T= 0 h, carril 3, Q= 0%, T= 24 h, carril 4 Q= 1%, T= 24 h. **B)** Carriles 5-8 tratamientos con inoculación del patógeno Carril 5, Q= 0%, T= 0 h, carril 6, Q= 1%, T= 0 h, carril 7, Q= 0%, T= 24 h, carril 8 Q= 1%, T= 24 h. Imagen de los autores.

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos indican que el quitosano tiene un efecto muy importante en el control de *Colletotrichum* sp.; se observó que este hongo es sensible al mismo, ya que parámetros como crecimiento micelial, esporulación y germinación de esporas fueron afectados e influyeron en la inhibición del desarrollo del patógeno. El Ghaouth et al. (1992) reportaron que la presencia de quitosano modificó el tamaño y la forma de los conidios de *Rhizopus stolonifer* y *Botrytis cinerea*. Además, se han reportado serias alteraciones en la morfología del micelio de otros microorganismos patógenos cuando crecen en un medio que contiene quitosano (Benhamou et al., 1994). Resultados similares se observaron en el estudio realizado por López Mora et al. (2013), donde el crecimiento micelial, germinación y esporulación de *A. alternata* en frutos de mango, mostraron una inhibición de 70% en presencia del quitosano al 1.0%.

Análisis de microscopía electrónica de barrido y de transmisión indicaron alteraciones a nivel morfológico de conidios y micelio, externa e internamente. Se detectó vacuolización del citoplasma en micelio y esporas, así como degradación de estructuras tan importantes como la membrana plasmática y la pared celular. De acuerdo con los resultados obtenidos en el presente estudio, se pueden proponer algunos mecanismos por los cuales el quitosano estaría ejerciendo el efecto inhibitorio en el desarrollo del hongo. Es posible que el quitosano actúe como una barrera limitando la formación del tubo germinativo de *Colletotrichum* sp. y puede estar relacionado con el

grosor de la película del mismo, ya que al aumentar la concentración se observó un mayor efecto de inhibición del patógeno.

La concentración de 1.0% de quitosano indujo significativamente la actividad de POD y se observó que solo la densidad apropiada de quitosano puede inducir la actividad de dicha enzima. Estos datos concuerdan con los de Liu et al. (2007), quienes encontraron que a concentraciones de 1.0% de quitosano se logró el aumento de la actividad enzimática de POD en frutos de tomate. Además, Ben Shalom et al. (2003) demostraron que la actividad de la POD de pepino fue inducida por el quitosano, y se obtuvo un incremento en la resistencia contra *B. cinerea*. En la expresión genética de la POD los tratamientos no inoculados presentaron la misma expresión, lo que sugiere que según los tiempos evaluados se mantiene como un sistema de encendido, el cual le podría permitir al hospedero defenderse del patógeno. La POD cataliza la acumulación de H_2O_2 , induce una hipersensibilidad que ayuda en la fortificación de la pared celular y sirve como una señal de alerta para otras partes de la planta (El Hadrami et al., 2010), por lo que al inducirse la POD se podría activar una cascada de señalización a través del fruto, lo que impide el avance del patógeno.

En los tratamientos inoculados, el quitosano indujo la expresión de POD, esto se puede asociar a que el quitosano podría actuar de manera sinérgica con el patógeno, potencializar una señal desde el contacto con el hospedero y activar genes de defensa del fruto. En concordancia con los resultados

obtenidos, Lin et al. (2011) observaron que mediante la aplicación de 50 mg l⁻¹ de BTH (benzotiadizol) se incrementó la inducción de resistencia en la antracnosis de mango cv. Keitt y aumentó la expresión genética de PPO y POD, así como su actividad enzimática y compuestos fenólicos totales.

CONCLUSIONES

El quitosano inhibió a *Colletotrichum* sp. a niveles *in vitro* y en frutos en postcosecha e indujo la actividad enzimática y expresión genética de POD. Esto sugiere

que este elemento contribuye a la activación del sistema de defensa de los frutos de mango mediante la inducción de POD.

Agradecimientos

Los autores desean dar gracias al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada para estudios de Maestría en Ciencias en Alimentos y al Instituto Tecnológico de Tepic, por el apoyo a esta investigación.

LITERATURA CITADA

- ARAUZ, L. F. Mango anthracnose: Economic impact and current options for integrated management. *Plant Disease*, 84(6): 600-611, 2000.
- BARNET, H., y HUNTER, B. *Illustrated genera of imperfect fungi*. New York: MacMillan Publishing Co., 200-201, 1998.
- BAUTISTA BAÑOS S. et al. Effects of chitosan and plant extracts on growth of *Colletotrichum gloeosporioides*, anthracnose levels and quality of papaya fruit. *Crop protection*, 22(9): 1087-1092, 2003.
- BENHAMOU, N. et al. Induction of systemic resistance to *Fusarium* crown and root rot in tomato plants by seed treatment with chitosan. *Phytopathology*, 84, 1432-1444, 1994.
- BEN-SHALOM, N. et al. Controlling gray mould caused by *Botrytis cinerea* in cucumber plants by means of chitosan. *Crop Protection*, 22(2): 285-290, 2003.
- BHASKARA, R. M. et al. Effect of pre-harvest chitosan sprays on post-harvest infection by *Botrytis cinerea* and quality of strawberry fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 20(1): 39-51, 2000.
- BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2): 248-254, 1976.
- CHEN, C. et al. Defense enzymes induced in cucumber roots by treatment with plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) and *Pythium aphanidermatum*. *Physiology and Molecular Plant Pathology*, 56(1): 13-23, 2000.
- EL GHAOUTH, A. et al. Antifungal activity of chitosan on two postharvest pathogens of strawberry fruits. *Phytopathology*, 82, 398-402, 1992.
- EL GHAOUTH, J. et al. Chitosan coating effect on storability and quality of fresh strawberries. *Journal of Food Science*, 56(6): 1618-1620, 1991.
- EL HADRAMI, A. et al. Chitosan in Plant Protection. *Marine Drugs*, 8(4): 968-987, 2010.
- KOLATTUKUDY, P. E. et al. Plant peroxidase gene expression and function. *Biochemical Society Transactions*, 20(2): 333-337, 1992.
- LIU, J. et al. Effects of chitosan on control of postharvest diseases and physiological responses of tomato fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 44(3): 300-306, 2007.
- LIN, J. et al. Expression of PPO and POD genes and contents of polyphenolic compounds in harvested mango fruits in relation to Benzothiadiazole-induced defense against anthracnose. *Scientia Horticulturae*, 130(1): 85-89, 2011.
- LÓPEZ GÓMEZ, R. y GÓMEZ LIM, M. A. A method for extracting intact RNA from fruits rich in polysaccharides using ripe mango mesocarp. *Horticultural Science*, 27(5): 440-442, 1992.
- LÓPEZ MORA, L. I. et al. Evaluación de la actividad antifúngica del quitosano en *Alternaria alternata* y en la calidad del mango 'Tommy Atkins' durante el almacenamiento. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 19(3): 315-331, 2013.
- MOHAMMADI, M. y KAZEMI, H. Changes in peroxidase and polyphenol oxidase activities in susceptible and resistant wheat heads inoculated with *Fusarium graminearum* and induced resistance. *Plant Science*, 162(4): 491-498, 2002.
- TERRY, L. A. y JOYCE, D. C. Elicitors of induced disease resistance in postharvest horticultural crops: a brief review. *Postharvest Biology and Technology*, 32(1): 1-13, 2004.
- TIAN, S. et al. Induction of defense responses against *Alternaria* rot by different elicitors in harvested pear fruit. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 70(6): 729-734, 2006.
- ZHU, S. J. y MA, B. C. Benzothiadiazole or methyl jasmonate-induced resistance to *Colletotrichum musae* in harvested banana fruit is related to elevated defense enzyme activities. *Journal Horticultural Science and Biotechnology*, 82(4): 500-506, 2007.