

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DEL QUITOSANO EN *Alternaria alternata* Y EN LA CALIDAD DEL MANGO ‘TOMMY ATKINS’ DURANTE EL ALMACENAMIENTO

Laura Ibeth López-Mora¹; Porfirio Gutiérrez-Martínez^{1*}; Silvia Bautista-Baños²;
Luis Felipe Jiménez-García³; Hilda Araceli Zavaleta-Mancera⁴

¹Instituto Tecnológico de Tepic, LIIA-Lab. de Biotecnología. Av. Tecnológico # 2595, Lagos de Country. Tepic, Nayarit, MÉXICO. C. P. 63175.

Correo-e: gutierrez1960@prodigy.net.mx (*Autor para correspondencia)

²Instituto Politécnico Nacional, Centro de Desarrollo de Productos Bióticos. Carretera Yautepec-Jojutla km 6. San Isidro, Yautepec, Morelos, MÉXICO. C. P. 62731.

³Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Ciencias, Departamento de Biología Celular. Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, Coyoacán, Distrito Federal, MÉXICO. C. P. 04510.

⁴Colegio de Postgraduados, Instituto de Recursos Naturales, Programa de Botánica. km 36.5 Carretera México-Texcoco, Montecillo, Texcoco, Estado de México, MÉXICO. C. P. 56230.

RESUMEN

Esta investigación tuvo los siguientes objetivos: a) determinar la mejor concentración de quitosano que reduzca el desarrollo de *Alternaria alternata* en relación a su crecimiento micelial, germinación y esporulación, b) observar a través de las microscopías de barrido y transmisión el efecto del quitosano a nivel morfológico y celular, y c) evaluar la efectividad de este compuesto en el control de *A. alternata* en frutos de mango cv. ‘Tommy Atkins’ y su efecto sobre la maduración del fruto durante su almacenamiento. Los resultados demostraron que la concentración de quitosano más efectiva fue 1.0 %, ya que redujo el crecimiento micelial y la esporulación hasta 70 % e inhibió completamente la germinación de sus conidios. En las micrografías de transmisión se observó una intensa y amplia vacuolización a lo largo del micelio y conidios, salida del material citoplásmico y presencia de material fibrilar. No hubo efecto fungicida del quitosano cuando se aplicó directamente en los frutos de mango, aunque sí redujo la extensión de la enfermedad más de 50 %. La maduración de los frutos tratados fue muy similar a aquellos del tratamiento control.

PALABRAS CLAVE ADICIONALES: *Mangifera indica* L.; mancha negra del mango, compuesto natural.

EVALUATION OF ANTIFUNGAL ACTIVITY OF CHITOSAN IN *Alternaria alternata* AND IN THE QUALITY OF ‘TOMMY ATKINS’ MANGO DURING STORAGE

ABSTRACT

The objectives of this investigation were a) to determine the best concentration of chitosan to reduce *Alternaria alternata* development in relation to mycelial growth, germination and sporulation, b) to observe through scanning and electron microscopy the effect of chitosan level at the morphological and cellular level and c) to evaluate the efficiency of this compound to control *A. alternata* in mango cv. ‘Tommy Atkins’ fruits and its effect on fruit ripening during storage. Results demonstrated that the most effective concentration of chitosan was 1.0 %, because it reduced mycelial growth and sporulation by as much as 70 % and completely inhibited the germination of its conidia. In the scan and transmission micrographs an intense and ample vacuolization is observed along the mycelia and conidia, leakage of cytoplasmic material and presence of fibrillar material. There was no fungicidal effect of the chitosan when it was applied directly to mango fruits, although it reduced the extension of the disease by more than 50 %. Ripening of treated fruit was very similar to that of the control treatment.

ADDITIONAL KEYWORDS: *Mangifera indica* L.; mango black spot, natural compound.

INTRODUCCIÓN

México es considerado uno de los principales países productores de mango; en el año 2005 ocupó el quinto lugar (Anónimo, 2005). Los estados de Sinaloa, Veracruz, Chiapas, Michoacán, Guerrero, Nayarit y Oaxaca aportan gran parte de la producción nacional (92 %) (Anónimo, 2010). En Nayarit predomina la producción de mango 'Tommy Atkins', considerado como el de mayor mercado mundial.

Pese a los grandes adelantos que se han realizado en los últimos años dentro del campo de la tecnología postcosecha en la producción de mango, se mantiene un alto índice de pérdidas. Si bien es difícil su cuantificación, se calcula que puede alcanzar, dependiendo del país, hasta un 50 %, en el cual tienen un rol muy importante los daños causados por microorganismos, especialmente por hongos (Bautista-Baños *et al.*, 1998).

La susceptibilidad de los frutos de mango a las enfermedades se incrementa después de la cosecha y durante el periodo de almacenamiento, debido a los cambios fisiológicos ocurridos bajo estas condiciones, que facilitan el desarrollo de los patógenos. Las condiciones climáticas del estado de Nayarit (alta humedad relativa y altas temperaturas) favorecen el desarrollo de patógenos, lo que causa pérdidas considerables. *Alternaria alternata* es uno de los principales hongos fitopatógenos que afectan a los frutos de mango en el estado de Nayarit.

Alternaria alternata es un hongo que puede ser encontrado en muchos tipos de plantas, frutos y otros sustratos, incluyendo alimentos, aceites y textiles (Simmons, 1992). La enfermedad causada por *A. alternata* en los frutos de mango se nombra mancha negra del fruto y se caracteriza por depresiones, de ovales a circulares, y lesiones que eventualmente llegan a tornarse de color negro (como resultado de la esporulación masiva del patógeno). La pulpa se oscurece y ablanda a medida que las manchas penetran. El control de la mancha negra del fruto de exportación se realiza principalmente con la aplicación precosecha de fungicidas (Ploetz *et al.*, 1998) y se refuerza durante el manejo postcosecha con hidrotatamientos y la aplicación del fungicida procloraz (*N*-propil-*N*-[2-(2,4,6-tricloro fenoxi) etil]imidazol-1-carboxamida).

El uso del quitosano en la protección de frutos ha sido estudiado durante más de 15 años. Se resaltan sus propiedades fungicidas y bactericidas, su capacidad para formar películas y su baja toxicidad para el ser humano. Sin embargo, ha sido una alternativa poco explorada en el control de *A. alternata* en frutos de mango.

El quitosano es un polímero biodegradable, no tóxico, bioactivo, que ha demostrado efectos fungicidas e induce mecanismos de defensa en tejidos vegetales (Wilson

INTRODUCTION

Mexico is considered one of the principal mango producing countries; in 2005 it occupied fifth place (Anonymous, 2005). The states of Sinaloa, Veracruz, Chiapas, Michoacán, Guerrero, Nayarit and Oaxaca contribute a large part of the national production (92 %) (Anonymous, 2010). In Nayarit, production of "Tommy Atkins" mango predominates, variety that is considered to have the largest market worldwide.

Despite the great advances that have been made in recent years within the field of postharvest technology in mango production, there is a high index of losses. Although precise quantification is difficult, it is calculated that losses may be as high as 50 %, depending on the country, in which damage caused by microorganisms has a major role, especially by fungus (Bautista-Baños *et al.*, 1998).

The susceptibility of mango fruit to disease increases after harvest and during the storage period, due to the physiological changes that occur under these conditions that facilitate the development of the pathogens. The climatic conditions of the state of Nayarit (high relative humidity and high temperatures) favor the development of pathogens, which causes considerable losses. *Alternaria alternata* is one of the principal phytopathogenic fungi that affect mango fruit in the state of Nayarit.

Alternaria alternata is a fungus that can be found in many types of plants, fruits and other substrates, including foods, oils and textiles (Simmons, 1992). The disease caused by *A. alternata* in mango fruit is called black spot and is characterized by ovoid or circular depressions, and lesions that eventually turn black (result of the massive sporulation of the pathogen). The pulp darkens and softens as the spots penetrate. Control of black spot of the exportation fruit is carried out principally with the postharvest application of fungicides (Ploetz *et al.*, 1998) and is reinforced during the postharvest management with hydrotreatments and the application of the fungicide prochloraz (*N*-PROPI-*N*-[2-(2,4,6-trichloro fenoxi) ethyl]imidazol-1-carboxamide).

The use of chitosan in the protection of the fruit has been studied for over 15 years. Its fungicidal and bactericidal properties are outstanding, along with its capacity to form films, and its low toxicity for humans. However, few studies have been made on its use as an alternative in the control of *A. alternata* in mango fruit.

Chitosan is a biodegradable polymer, non-toxic, bioactive, that has demonstrated fungicidal effects and induces defense mechanisms in plant tissue (Wilson *et al.*, 1994; Terry & Joyce, 2004). It is considered one of the most promising products for the control of various fungi in postharvest, as is demonstrated in the work of Ghaouth *et al.* (1992a,

et al., 1994; Terry & Joyce, 2004). Es considerado uno de los productos más prometedores para el control de varios hongos en postcosecha, como lo demuestran los trabajos de Ghaouth *et al.* (1992a, 1992b), Reddy *et al.* (1998), Ben-Shalom *et al.* (2003) y Bautista-Baños *et al.* (2003). El crecimiento de diversos hongos postcosecha como *A. alternata*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizopus stolonifer* y *Penicillium* spp se inhibió en medio nutritivo usando diferentes concentraciones de quitosano. Al estudiar su efecto sobre los hongos *F. oxysporum*, *P. digitatum* y *R. stolonifer*, Bautista-Baños *et al.* (2004) concluyeron que éste afectó varios estados de desarrollo de dichos hongos, al inhibir el crecimiento micelial y la esporulación. En otros estudios, el hongo *A. alternata* aislado de jitomate se inhibió con una concentración de quitosano al 2.5 % (Sánchez-Domínguez *et al.*, 2007).

Además, numerosos autores, utilizando distintas concentraciones de quitosano, han reportado su efecto fungicida en el control de pudriciones postcosecha sobre un importante número de frutas y hortalizas (Ghaouth *et al.*, 1991a; Du *et al.*, 1997; Ghaouth *et al.*, 1994; Zhang y Quantick, 1998; Eryani-Raqeeb *et al.*, 2009; Ramos-García *et al.*, 2010).

El presente trabajo tuvo como primer objetivo obtener la concentración de quitosano adecuada para inhibir el crecimiento micelial, germinación y esporulación de *A. alternata* aislado de frutos de mango. Como segundo objetivo se observaron las posibles alteraciones a nivel morfológico y celular por efecto de la aplicación de este compuesto y como tercer objetivo se evaluó su efecto fungicida sobre el desarrollo de la enfermedad en mango 'Tommy Atkins' y su influencia sobre algunas propiedades físico-químicas asociadas con la calidad del fruto después de un periodo de almacenamiento de 12 días.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamiento del hongo

La cepa del hongo *A. alternata* que se utilizó en el trabajo se aisló de frutos de mango 'Tommy Atkins' y se almacenó a 2 °C en el cepario del Instituto Tecnológico de Tepic. Posteriormente se activó en papa dextrosa agar (PDA) y en frutos de mango de esta variedad.

Preparación del quitosano y siembra de *A. alternata* en las cajas Petri

La preparación de las diferentes concentraciones de quitosano (Q) se llevó a cabo siguiendo la metodología de Ghaouth *et al.* (1991b). Se elaboró una solución stock de 1.0 g de quitosano bajo peso molecular ($M_w = 1.74 \times 10^4$ Da, 75 – 85 % grado de desacetilación; FW = 161 20,000 cps) (Sigma-Aldrich), la cual se disolvió en 100 ml de agua

(1992b), Reddy *et al.* (1998), Ben-Shalom *et al.* (2003) and Bautista-Baños *et al.* (2003). The growth of diverse postharvest fungi such as *A. alternata*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizopus stolonifer* and *Penicillium* spp. was inhibited in nutritive medium using different concentrations of chitosan. After studying its effect on the fungi *F. oxysporum*, *P. digitatum* and *R. stolonifer*, Bautista-Baños *et al.* (2004) concluded that it affects various development stages of these fungi, by inhibiting mycelial growth and sporulation. In other studies, the fungus *A. alternata* isolated from tomato was inhibited with a concentration of chitosan at 2.5 % (Sánchez-Domínguez *et al.*, 2007).

Furthermore, numerous authors, utilizing different concentrations of chitosan, have reported its fungicidal effect in the control of postharvest rot in an important number of fruits and vegetables (Ghaouth *et al.*, 1991a; Du *et al.*, 1997; Ghaouth *et al.*, 1994; Zhang and Quantick, 1998; Eryani-Raqeeb *et al.*, 2009; Ramos-García *et al.*, 2010).

The objective of the present study was to obtain the adequate concentration of chitosan for inhibiting mycelial growth, germination and sporulation of *A. alternata* isolated from mango fruit. As second objective, the possible alterations at the morphological and cellular level resulting from the application of this compound were observed. The third objective was to evaluate the fungicidal effect on the development of the disease in mango 'Tommy Atkins' and its influence on some physio-chemical properties associated with fruit quality after a storage period of 12 days.

MATERIALS AND METHODS

Isolation of the fungus

The strain of the fungus *A. alternata* that was used in the study was isolated in 'Tommy Atkins' mango fruits and was stored at 2 °C in the strain collection of the Technological Institute of Tepic. Afterwards it was activated in potato dextrose agar (PDA) and in mango fruits of this variety.

Preparation of the chitosan and sowing of *A. alternata* in Petri dishes

The preparation of the different concentrations of chitosan (Q) was carried out following the methodology of Ghaouth *et al.* (1991b). A stock solution was made of 1.0 g of chitosan under molecular weight ($M_w = 1.74 \times 10^4$ Da, 75 – 85 % degree of desacetilation; FW = 161 20,000cps) (Sigma-Aldrich), which was dissolved in 100 ml of distilled water with 2 ml of acetic acid and constant agitation for 24 h at room temperature. The necessary dilutions were made to adjust the concentrations to 0.05, 0.1, 0.5 and 1 %. The solutions were adjusted to pH 5.5 with a solution of NaOH at 1N. 0.1 ml of Tween 80 was added. Next, the chitosan

destilada con 2 ml de ácido acético y agitación constante por 24 h a temperatura ambiente. Se hicieron las diluciones necesarias para ajustar las concentraciones a 0.05, 0.1, 0.5 y 1 %. Las soluciones se ajustaron a pH 5.5 con una solución de NaOH al 1N. Se añadió 0.1 ml de Tween 80. Posteriormente, el quitosano y el PDA se esterizaron en forma separada para después vaciarse en cajas Petri de 85 mm de diámetro. La inoculación de *A. alternata* se realizó en el centro de las cajas Petri tomando pequeños círculos de aproximadamente 5 mm de diámetro de PDA que contenía el hongo de aproximadamente ocho días de desarrollo. Para los tratamientos testigo o control se utilizaron cajas Petri únicamente con PDA. Para cada tratamiento (concentración) y el control se hicieron cinco repeticiones. Las cajas se incubaron a 25 ± 1 °C durante 12 días.

Variables evaluadas *in vitro*

Crecimiento e inhibición micelial

El crecimiento micelial de los hongos se midió cada 24 h durante 12 días utilizando un vernier marca Truper, en cinco cajas Petri por tratamiento. El promedio de los valores obtenidos (mm) se graficó en una cinética de crecimiento. El porcentaje de inhibición correspondió a los valores finales que se obtuvieron del crecimiento micelial.

Esporulación

Para determinar la esporulación final se utilizaron las mismas cajas Petri donde se midió el crecimiento micelial. A cuatro cajas Petri por tratamiento se les agregaron 10 ml de agua estéril. Con una varilla de vidrio estéril se raspó la superficie de la caja, y posteriormente se filtró la solución resultante dos veces a través de una gasa estéril, para eliminar el micelio presente. Se tomaron 50 µl de la solución filtrada, se colocaron en un hemacitómetro y se midió la concentración final de esporas. Se llevaron a cabo 100 observaciones por tratamiento en un microscopio óptico Nikon Eclipse E600.

Germinación

Para la evaluación de la germinación de las esporas se tomaron alícuotas de 50 µl de una suspensión conidial de esporas provenientes de cultivos de *A. alternata* sin tratar de ocho días de desarrollo. La concentración utilizada fue $10^6 \cdot \text{ml}^{-1}$, la cual se pipeteó sobre tres discos por tratamiento con medio PDA que contenía las diferentes concentraciones de quitosano arriba mencionadas y el control. Los discos se observaron al microscopio óptico (Nikon Eclipse E600) cada hora durante ocho h. La germinación se detuvo agregando una gota de lactofenol-safranina. Los valores se expresaron en número de esporas por ml.

and the PDA were sterilized separately to later be emptied into Petri dishes of 85 mm of diameter. The inoculation of *A. alternata* was made in the center of the Petri dishes taking small circles of approximately 5 mm diameter of PDA that contained the fungus of approximately 8 days of development. For the control treatments Petri dishes with only PDA were used. For each treatment (concentration) and the control five replicates were made. The dishes were incubated at 25 ± 1 °C during 12 days.

Variables evaluated *in vitro*

Mycelial growth and inhibition

Mycelial growth of the fungi was measured every 24 h during 12 days using a Truper vernier, in five Petri dishes per treatment. The average of the values obtained (mm) was graphed in a growth kinetic. The percentage of inhibition corresponded to the final values that were obtained of mycelial growth.

Sporulation

To determine the final sporulation the same Petri dishes were used where the mycelial growth was measured. To four Petri dishes per treatment, 10 ml of sterile water were added. The surface of the dish was scraped with a sterile glass rod, and then the resulting solution was filtered twice through a sterile gauze to eliminate the mycelia present. 50 µL of the filtered solution were taken and placed in a hemacytometer and the final spore concentration was measured. 100 observations were made per treatment in an optical Nikon Eclipse E600 microscope.

Germination

For the evaluation of germination of the spores, aliquots of 50 µL were taken from a conidial suspension of spores from cultures of *A. alternata* without treatment, of eight days of development. The concentration used was $10^6 \cdot \text{ml}^{-1}$, which was applied with a pipette over three discs per treatment with PDA medium that contained the abovementioned different concentrations of chitosan and the control. The discs were observed through the optical microscope (Nikon Eclipse E600) every hour during eight h. Germination was detained by adding a drop of lactofenol-safranin. The values were expressed in number of spores per ml.

Processing of the samples for observations in electronic scan (ESM) and transmission microscope (ETM)

For the observations in both microscopes cultures of *A. alternata* of 12 days were used from the treatments with the chitosan concentration at 1 % and the control.

Procesamiento de las muestras para observaciones en microscopía electrónica de barrido (MEB) y de transmisión (MET)

Para las observaciones en ambas microscopías se utilizaron cultivos de *A. alternata* de 12 días de desarrollo provenientes de los tratamientos con la concentración de quitosano al 1 % y el control.

MEB

Las muestras de *A. alternata* se fijaron en soluciones de glutaraldehído al 2.5 %, las cuales se colocaron en vacío para eliminar cualquier burbuja de aire presente en las muestras. Se lavaron con buffer de fosfato sorenson (pH 7.1 1 M) tres veces por 20 min. Se realizaron lavados con etanol a concentraciones graduales (30, 40, 50, 60, 70, 80 y 90 %) por 50 min cada uno y al 100 % tres veces por 20 min. Las muestras se secaron en presencia de CO₂ por 40 min (Sandri-780A), se montaron en portamuestras de platón y se recubrieron con oro en una ionizadora de metales (Ion Sputter JFC-1100, Jeol, Fine Coat) por 15 min. Se observaron en un microscopio electrónico de barrido (JEOL- JSM 6390) operando a 10 Kv.

MET

Las muestras de *A. alternata* se fijaron en 1 mm cúbico de glutaraldehído al 2.5 %. Se enjuagaron en PBS (solución buffer de fosfatos) durante media hora y posteriormente se fijaron en tetraóxido de osmio al 1 % por una hora y se les hicieron cuatro lavados con PBS de cinco minutos cada uno. Después, las muestras fueron deshidratadas con etanol en concentraciones graduales (70, 80, 90 y 96 %) por 10 min cada vez y se lavaron tres veces por cinco minutos con etanol al 100 %. Las muestras se colocaron en tres cambios de óxido de propileno por cinco minutos cada una y en resina epóxica durante 16 h a temperatura ambiente. Las muestras se incluyeron en resina a 60 °C por 15 h. Se obtuvieron cortes ultrafinos de 70 µm que se colocaron en rejillas de cobre para ser contrastados con acetato de uranilo por 20 min y citrato de plomo por 10 min. Las rejillas se observaron en un microscopio electrónico de transmisión de electrones (Joel modelo 1010).

Pruebas *in vivo*

Material vegetal

Los frutos de mangos 'Tommy Atkins' se recolectaron de una huerta localizada en el poblado de Atonalisco, Tepic, Nayarit, en estado de madurez de consumo (coloración del fruto verde oscuro). Los frutos fueron desinfectados con una solución al 2 % de hipoclorito de sodio y agua estéril durante un minuto para eliminar impurezas y se dejaron secar a temperatura ambiente.

ESM

The samples of *A. alternata* were fixed in solutions of glutaraldehyde at 2.5 %, which were placed in a vacuum to eliminate any air bubbles present in the samples. They were washed with Sorensen phosphate buffer (pH 7.1 1M) three times for 20 min. Washings were made with ethanol at gradual concentrations (30, 40, 50, 60, 70, 80 and 90 %) for 50 min each one and at 100 % three times for 20 min. The samples were dried in the presence of CO₂ for 40 min (Sandri-780A), were mounted on plate slides and covered with gold in a metals ionizer (Ion Sputter JFC-1100, Jeol, Fine Coat) for 15 min. They were observed in an electronic scan microscope (JEOL- JSM 6390) operating at 10 Kv.

ETM

The samples of *A. alternata* were fixed in 1 cubic mm of glutaraldehyde at 2.5 %. They were rinsed in PBS (phosphate buffer solution) during half an hour and then they were fixed in osmium tetroxide at 1 % for one hour and four washings were made with PBS of five minutes each one. Then, the samples were dehydrated with ethanol in gradual concentrations (70, 80, 90 and 96 %) for 10 min each time and they were washed three times for five minutes with ethanol at 100 %. The samples were placed in three changes of propylene oxide for five minutes each one and in epoxy resin during 16 h at room temperature. The samples were included in resin at 60 °C for 15 h. Ultrafine cuts of 70 µm were obtained and placed in copper screens to be contrasted with uranyl acetate for 20 min and lead citrate for 10 min. The screens were observed in an electronic microscope of electron transmission (Joel model 1010).

In vivo assays

Plant material

The fruits of "Tommy Atkins" mango were collected in an orchard located in the town of Atonalisco, Tepic, Nayarit, in a state of consumption ripeness (dark green fruit coloration). The fruits were disinfected with a solution at 2 % of sodium hypochlorite and sterile water during one minute to eliminate impurities and left to dry at room temperature.

Inoculation of *A. alternata* in mango fruits

The harvested fruits were inoculated by means of a system of lesions of 1 cm depth made with a sterile probe. 150 µl of the suspension of spores at a concentration of 10⁶ were placed in the wound. The mangos were left to air during 24 h before making the application of the chitosan treatments.

Inoculación de *A. alternata* en los frutos de mango

Se procedió a inocular los frutos cosechados mediante un sistema de herida de 1 cm de profundidad realizada con un punzón estéril. Se colocaron en la herida en ambas caras del fruto 150 µl de la suspensión de esporas de una concentración de 10^6 . Los mangos se dejaron al aire libre durante 24 h antes de llevar a cabo la aplicación de los tratamientos con quitosano.

Tratamiento de los frutos con quitosano

Se preparó una solución de quitosano al 1 % siguiendo la metodología antes descrita, cuya concentración fue el mejor tratamiento en las pruebas *in vitro*. Esta solución se aplicó por inmersión de los frutos de mango por 40 seg. Después se dejaron al aire libre por cinco horas y se almacenaron a 12 ± 1 °C y 25 ± 1 °C por 15 días. Para las evaluaciones fitopatológicas, la unidad experimental consistió en 25 frutos por tratamiento con cuatro repeticiones. Las evaluaciones fisicoquímicas se realizaron en cinco frutos por tratamiento con cuatro repeticiones. El experimento se repitió en su totalidad dos veces. Los resultados se promediaron.

Variables evaluadas *in situ*

Evaluación fitopatológica

La incidencia de la enfermedad se evaluó como porcentaje de infección al término de los 12 días de almacenamiento en ambas temperaturas de almacenamiento.

Diariamente se midió el crecimiento del desarrollo micelial en las heridas artificialmente inoculadas. La severidad se calculó utilizando la ecuación propuesta por Vero y Mondino (1999).

$$\% \text{ Severidad} = \frac{\text{DLA}}{\text{DLC}} \times 100$$

Donde:

DLA = Diámetro promedio de las lesiones de las heridas tratadas

DLC = Diámetro promedio de las lesiones de las heridas control

Evaluaciones fisicoquímicas

Pérdida fisiológica de peso

Cinco frutos por tratamiento se pesaron diariamente en una báscula digital marca Sartorius modelo BL 3100. Los resultados se reportaron en porcentaje de acuerdo a la siguiente ecuación:

Treatment of the fruits with chitosan

A solution of chitosan at 1 % was prepared following the abovementioned methodology, whose concentration was the best treatment in the *in vitro* assays. This solution was applied by immersion of the mango fruits for 40 sec. Later they were left out to air for five hours and stored at 12 ± 1 °C and 25 ± 1 °C for 15 days. For the phytopathology evaluations, the experimental unit consisted of 25 fruits per treatment with four replicates. The physiochemical evaluations were made in five fruits per treatment with four replicates. The experiment was repeated in its totality twice. The results were averaged.

Variables evaluated *in situ*

Phytopathological evaluation

The incidence of the disease was evaluated as percentage of infection at the end of the 12 days of storage at both temperatures of storage.

Growth of mycelia development was measured in the artificially inoculated wounds. Severity was calculated using the equation proposed by Vero and Mondino (1999).

$$\% \text{ Severity} = \frac{\text{DLA}}{\text{DLC}} \times 100$$

Where:

DLA = Average diameter of the treated lesions

DLC = Average diameter of the control lesions

Physiochemical evaluations

Physiological weight loss

Five fruits per treatment were weighed daily in a Sartorius model BL 3100 digital scale. Results were reported in percentage according to the following equation:

$$\% \text{ Loss} = \frac{\text{Initial weight} - \text{Actual weight}}{\text{Initial weight}} \times 100$$

Firmness

For the determination of firmness five fruits per treatment were taken. The penetration (6 mm) test was used in both sides of the fruit (three penetrations per side) with a Shimpo model FGE-50 universal texturometer. The results were the average of the values obtained and were expressed in Newtons (N).

$$\% \text{ Pérdida} = \frac{\text{Peso inicial} - \text{Peso actual}}{\text{Peso inicial}} \times 100$$

Firmeza

Para la determinación de la firmeza se tomaron cinco frutos por tratamiento. Se empleó la prueba de penetración (6 mm) en ambas caras del fruto (tres penetraciones por cara) con un texturómetro universal marca Shimpo modelo FGE-50. Los resultados fueron el promedio de los valores obtenidos y se expresaron en Newtons (N).

Sólidos solubles totales (SST)

En los frutos empleados para evaluar la firmeza se determinaron también los SST con un refractómetro Abbé. Los resultados obtenidos se reportaron en °Brix, con corrección por temperatura para los datos correspondientes a 20 °C.

pH

El pH se determinó con la ayuda de un potenciómetro marca Hanna Instrument pH 300 en los frutos previamente utilizados para evaluar la firmeza y los SST.

Acidez titulable

La acidez titulable se determinó empleando muestras homogenizadas de 5 g provenientes de 10 frutos por tratamiento, las cuales se titularon con NaOH 0.044 N valorado usando fenolftaleína como indicador. Los cálculos se reportaron en % de ácido cítrico aplicando la siguiente ecuación:

$$A = \frac{N \times V \times \text{Meq}}{P} \times 100$$

Donde:

A = Acidez en % de ácido cítrico

N = Normalidad de NaOH V = Volumen de NaOH gastados (cm³)

Meq = miliequivalentes de ácido cítrico (0.064)

P = Cantidad de muestra (g)

Para la firmeza, SST, pH y acidez titulable también se obtuvieron valores de ambas caras del fruto, y se calculó un promedio final.

Análisis estadístico

Todos los experimentos se llevaron a cabo bajo un diseño completamente al azar. Se realizó un análisis de

Total soluble solids (TSS)

To evaluate firmness, the TSS were also determined in the fruits with an Abbé refractometer. The obtained results were reported in °Brix, with correction for temperature for the data corresponding to 20 °C.

pH

The pH was determined with the aid of a Hanna Instrument potentiometer pH 300 in the fruits that were previously used to evaluate firmness and the TSS.

Titrateable acidity

Titrateable acidity was determined using homogenized samples of 5 g from 10 fruits per treatment, which were titrated with NaOH 0.044 N valued by using phenolphthalein as indicator. The calculations were reported in % of citric acid applying the following equation:

$$A = \frac{N \times V \times \text{Meq}}{P} \times 100$$

Where:

A = Acidity in % of citric acid

N = Normality of NaOH V = Volume of NaOH spent (cm³)

Meq = milequivalents of citric acid (0.064)

P = Quantity of sample (g)

For firmness, TSS, pH and titrateable acidity, values were obtained from both sides of the fruit, and a final average was calculated.

Statistical analysis

All of the experiments were carried out under a completely randomized design. An analysis of variance was made along with comparison of means of Tukey ($P \leq 0.05$).

RESULTS AND DISCUSSION

Figure 1 shows the results of mycelia growth of *A. alternata* during the 12 days of incubation at 25 °C. An inverse relationship was observed between mycelia growth and the concentration of chitosan applied. With respect to the control, all of the treatments with chitosan influenced the growth of this fungus. The lowest growth of *A. alternata* was registered in the concentration of 1.0 %. With respect to mycelial inhibition, germination and sporulation, significant differences were observed ($P \leq 0.05$) among the treatments of the three variables analyzed (Table 1).

varianza y se hicieron pruebas de comparación de medias de Tukey ($P \leq 0.05$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Figura 1 se muestran los resultados del crecimiento micelial de *A. alternata* durante los 12 días de incubación a 25 °C. Se observó una relación inversa entre el crecimiento micelial y la concentración de quitosano aplicada. En comparación con el control, todos los tratamientos con quitosano influyeron en el crecimiento de este

Inhibition of mycelia growth and of germination of *A. alternata* was not determined in the treatment with PDA alone. However, in the concentration of 1.0 %, there was no germination of the fungus, and lower sporulation was registered (1.4×10^6 spores·ml⁻¹) compared with the other treatments and the control.

In agreement with these results, other investigations have also reported the same behavior in a diversity of microorganisms, such as *C. gloeosporioides*, *Fusarium* sp. and *P. digitatum*, among others. Bautista-Baños *et al.*

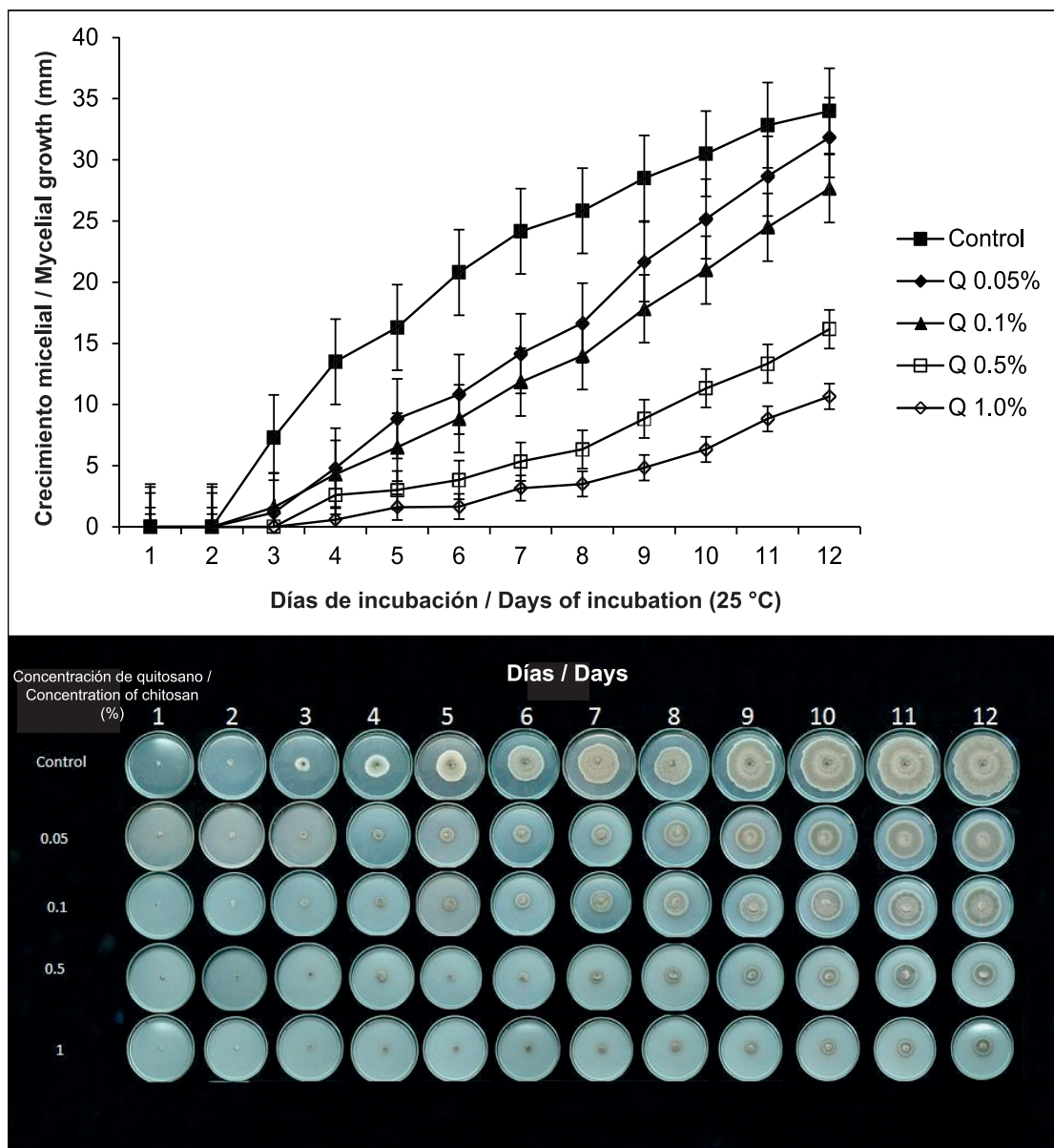


FIGURA 1. Cinética del crecimiento del hongo *Alternaria alternata* aislado de mango 'Tommy Atkins', durante 12 días de incubación a 25 °C en medio PDA solo o con diferentes concentraciones de quitosano.

FIGURE 1. Growth kinetic of the fungus *Alternaria alternata* isolated from 'Tommy Atkins' mango, during 12 days of incubation at 20 °C in PDA medium, alone or with different concentrations of chitosan.

hongo. El menor crecimiento de *A. alternata* se registró en la concentración de 1.0 %. En relación a la inhibición micelial, germinación y esporulación se observaron diferencias significativas ($P \leq 0.05$) entre los tratamientos de las tres variables analizadas (Cuadro 1). No se determinó inhibición del crecimiento micelial y de la germinación de *A. alternata* en el tratamiento con PDA solo. Sin embargo, en la concentración de 1.0 % no hubo germinación del hongo, y se registró la menor esporulación (1.4×10^6 esporas·ml⁻¹) en comparación con los tratamientos restantes y el control.

En concordancia con estos resultados, en otras investigaciones también se ha reportado el mismo comportamiento en una diversidad de microorganismos, tales como *C. gloeosporioides*, *Fusarium* sp y *P. digitatum* entre otros. Bautista-Baños *et al.* (2004) mencionan que en general, las concentraciones superiores al 1.5 % inhibieron el desarrollo de estos hongos, aunque la concentración inhibitoria dependió del microorganismo evaluado. Estudios previos con *A. alternata* aislado de jitomate demostraron similitud con los resultados del presente trabajo, pues se reportó que el crecimiento micelial disminuyó a medida que se aumentó la concentración de quitosano. La inhibición completa se encontró a la concentración de 2.5 %. Asimismo, el quitosano de medio peso molecular tuvo un mayor efecto inhibitorio en comparación con el de bajo o alto peso molecular (Sánchez-Domínguez *et al.*, 2011). En el presente estudio el quitosano de bajo peso molecular mostró una inhibición significativa de *A. alternata*.

Se ha mencionado en numerosas investigaciones (Hirano y Nagao, 1989; Song *et al.*, 2002; Bautista-Baños *et al.*, 2006), que la respuesta inhibitoria de los hongos y bacterias tratadas con quitosano puede deberse al carácter catiónico de este compuesto (Sandford, 1989). Se indica que la interacción de los grupos amino libres, cargados positivamente en medio ácido, con los residuos negativos de las macromoléculas expuestas en la pared de los hongos,

(2004) mention that in general, the concentrations higher than 1.5 % inhibited the development of these fungi, although the inhibitory concentration depended on the microorganism being evaluated. Previous studies with *A. alternata* isolated from tomato demonstrated similarity with the results of the present study, given that it was reported that mycelia growth decreased as the concentration of chitosan was increased. Complete inhibition was found at a concentration of 2.5 %. Similarly, the chitosan of medium molecular weight had a higher inhibitory effect compared with that of low or high molecular weight (Sánchez-Domínguez *et al.*, 2011). In the present study the chitosan of low molecular weight presented a significant inhibition of *A. alternata*.

It has been mentioned in numerous investigations (Hirano and Nagao, 1989; Song *et al.*, 2002; Bautista-Baños *et al.*, 2006) that the inhibitory response of the fungi and bacteria treated with chitosan may be due to the cationic character of this compound (Sandford, 1989). It is indicated that the interaction of the free amino groups, positively charged in acid medium, with the negative residues of the exposed macromolecules in the wall of the fungi, change the permeability of the plasmatic membrane, with the resulting alteration of its principal functions, such as the output of wastes and intake of nutrients (Benjamou, 1992). In recent studies made by Palma-Guerrero *et al.* (2009; 2010), it was reported that chitosan affects the permeability of the membrane and its composition in the fungus *Neurospora crassa*. In other studies it was demonstrated that chitosan influences the output of potassium, the pH of the medium and the activity of the ATPase in the cell membrane of the fungus *R. stolonifer* (García-Rincón *et al.*, 2010).

Figures 2 and 3 present the micrographs made of the mycelia and conidia of *A. alternata* treated with chitosan at 1.0 % and without treatment. In general, in the micrographs in MEB no differences were observed in the morphology of the mycelia and the conidia treated and untreated with

CUADRO 1. Efecto del quitosano a diferentes concentraciones en el crecimiento micelial, germinación y esporulación del hongo *Alternaria alternata*.

TABLE 1. Effect of chitosan at different concentrations on mycelial growth, germination and sporulation of the fungus *Alternaria alternata*.

Quitosano / Chitosan (%)	Inhibición del crecimiento micelial / Inhibition of mycelial growth (%) ⁺	Germinación / Germination (%) [*]	Esporulación (esporas ml ⁻¹) ⁺ / Sporulation(spores ml ⁻¹) ⁺
0.05	11.5d [*]	6.4c	2.2 x 10 ⁶ c
0.1	23.1c	17.6b	2.4 x 10 ⁶ c
0.5	55.0b	1.7d	2.1 x 10 ⁶ c
1.0	70.0a	0.0e	1.0 x 10 ⁶ b
Control (PDA)	0.0e	100a	1.4 x 10 ⁶ a

^{*}Letras similares en columnas son iguales de acuerdo a la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$). + 12 días y *8 h de incubación, respectivamente.

^{*}Similar letters in columns are equal according to the Tukey test ($P \leq 0.05$). + 12 days and *8 h of incubation, respectively.

cambian la permeabilidad de la membrana plasmática, con la consecuente alteración de sus principales funciones, como la salida de desechos y entrada de nutrientes (Benhamou, 1992). En recientes estudios realizados por Palma-Guerrero *et al.* (2009; 2010), se reportó que el quitosano afecta la permeabilidad de la membrana y su composición en el hongo *Neurospora crassa*. En otros estudios se demostró que el quitosano influye la salida de potasio, el pH del medio y la actividad de la ATPasa en la membrana celular del hongo *R. stolonifer* (García-Rincón *et al.*, 2010).

En las Figuras 2 y 3 se muestran las micrografías realizadas al micelio y conidios de *A. alternata* tratado con quitosano al 1.0 % y sin él. En general, en las micrografías en MEB no se observaron diferencias en la morfología del micelio y los conidios tratados y no tratados con el quitosano (Figura 2). Sin embargo, en las micrografías en MET se observó en el micelio y conidio tratados con quitosano una intensa y amplia vacuolización a lo largo de estas estructuras (Figura 3). Además, también se observó ruptura de la membrana celular del micelio que origina la salida del material citoplásmico (Figura 3B). Alrededor de la pared celular del micelio y conidios tratados con quitosano se desarrolló material mucilaginoso. Contrario a este efecto, en *A. alternata* del tratamiento control se observaron algunos organelos bien delimitados como el núcleo y vacuolas (Figura 3D y E), pared y membrana celular.

Sánchez-Domínguez *et al.* (2011) reportaron alteraciones similares a nivel celular en un aislamiento de *A. alternata* de jitomate, debidas a la aplicación de quitosano en concentración de 1.5 %. Observaron desintegración de la pared celular, contracción de la membrana citoplásmica y la eventual salida del material citoplásmico. En otros hongos fitopatógenos como *Phythium aphanidermatum*, *R. stolonifer*, *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopercisi* y *Pochonia chlamidosporia* se observaron alteraciones en la pared y membrana celular de estos fitopatógenos y desorganización celular no sólo en micelio sino en los conidios cuando fueron incubados con quitosano en diferentes concentraciones de 100 a 400 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, 3.0 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$, y 1.0 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$, respectivamente (Ghaouth *et al.*, 1992a; Ghaouth *et al.*, 1994; Benhamou, 1992; Palma-Guerrero *et al.*, 2008).

Contrario a lo reportado en otras investigaciones, la aplicación del quitosano en frutos de mango no controló la infección causada por *A. alternata* (Cuadro 2). La incidencia de la enfermedad fue de 100 % en ambas temperaturas de almacenamiento. Sin embargo, el desarrollo de la enfermedad sobre los frutos tratados con el quitosano al 1 % fue menor (58 %) en comparación con los no tratados y almacenados a 25 °C (90 %) y los frutos del tratamiento control (100 %). Como se ha mencionado anteriormente, similares resultados fueron reportados por Sánchez-Domínguez *et al.* (2011), quienes obtuvieron notables efectos fungicidas sobre *A. alternata* en estudios *in vitro*,

chitosan (Figure 2). However, in the micrographs in MET an intense and ample vacuolization along these structures was observed in the mycelia and conidia treated with chitosan (Figure 3). Furthermore, rupture of the cell membrane of the mycelia was also observed, which caused the output of the cytoplasmic material (Figure 3B). Mucilaginous material developed around the cell wall of the mycelia and conidia treated with chitosan. Contrary to this effect, in *A. alternata* of the control treatment some well delimited organelles were observed such as the nucleus and vacuoles (Figure 3D and E), wall and cellular membrane.

Sánchez-Domínguez *et al.* (2011) reported similar alterations at the cell level in an isolate of *A. alternata* of tomato, due to the application of chitosan at a concentration of 1.5 %. They observed disintegration of the cell wall, contraction of the cytoplasmic membrane and the eventual output of the cytoplasmic material. In other phytopathogenic fungi such as *Phythium aphanidermatum*, *R. stolonifer*, *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopercisi* and *Pochonia chlamidosporia* alterations were observed in the cell membrane and wall of these phytopathogens and cell disorganization, not only in the mycelia, but also in the conidia when they were incubated with chitosan in different concentrations of 100 to 400 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, 3.0 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ and 1.0 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$, respectively (Ghaouth *et al.*, 1992a; Ghaouth *et al.*, 1994; Benhamou, 1992; Palma-Guerrero *et al.*, 2008).

Contrary to what was reported in other investigations, the application of chitosan in mango fruits did not control the infection caused by *A. alternata* (Table 2). The incidence of the disease was of 100 % in both storage temperatures. However, the development of the disease on fruits treated with chitosan at 1 % was lower (58 %) with respect to the untreated fruit and stored at 25 °C (90 %) and those of the control treatment (100 %). As has been previously mentioned, similar results were reported by Sánchez-Domínguez *et al.* (2011), who obtained notable fungicidal effects over *A. alternata* in studies *in vitro*, but with no outstanding effect when the chitosan was applied in tomatoes artificially inoculated with this phytopathogen and later stored at room temperature.

Figures 4 and 5 present the development of maturation of the mangos treated with and without chitosan, and then stored at 12 to 25 °C. With respect to weight loss, it was observed that the lowest percentage (approximately 3 % at the end of 15 days of storage) corresponded to the fruits treated with chitosan and stored at 12 °C (Figure 4A). The mangos treated with chitosan and stored at 25 °C had the highest weight loss (approximately 16 %) with respect to the other treatments. Fruit firmness fell in a range of 30 to 10 N in the fruits with chitosan and without treatment, respectively, independently of the storage temperature (Figure 4B). The values of °Brix and pH varied from 14 to 18 %, and from 4 to 5.5, respectively (Figures 5A and B). The highest content

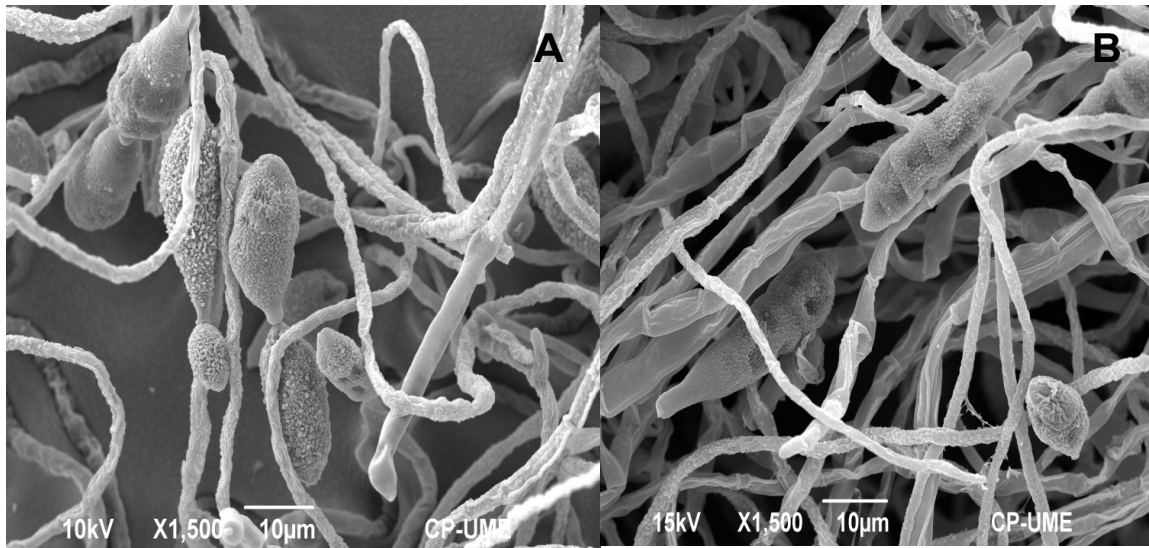


FIGURA 2. Micrografías electrónicas de barrido del hongo *Alternaria alternata* aislado de mango cv. 'Tommy Atkins'. A) Tratamiento control y B) tratamiento con quitosano al 1.0 %.

FIGURE 2. Electronic scan micrographs of the fungus *Alternaria alternata* isolated from cv. 'Tommy Atkins' mango. A) Control treatment and B) treatment with chitosan at 1.0 %.

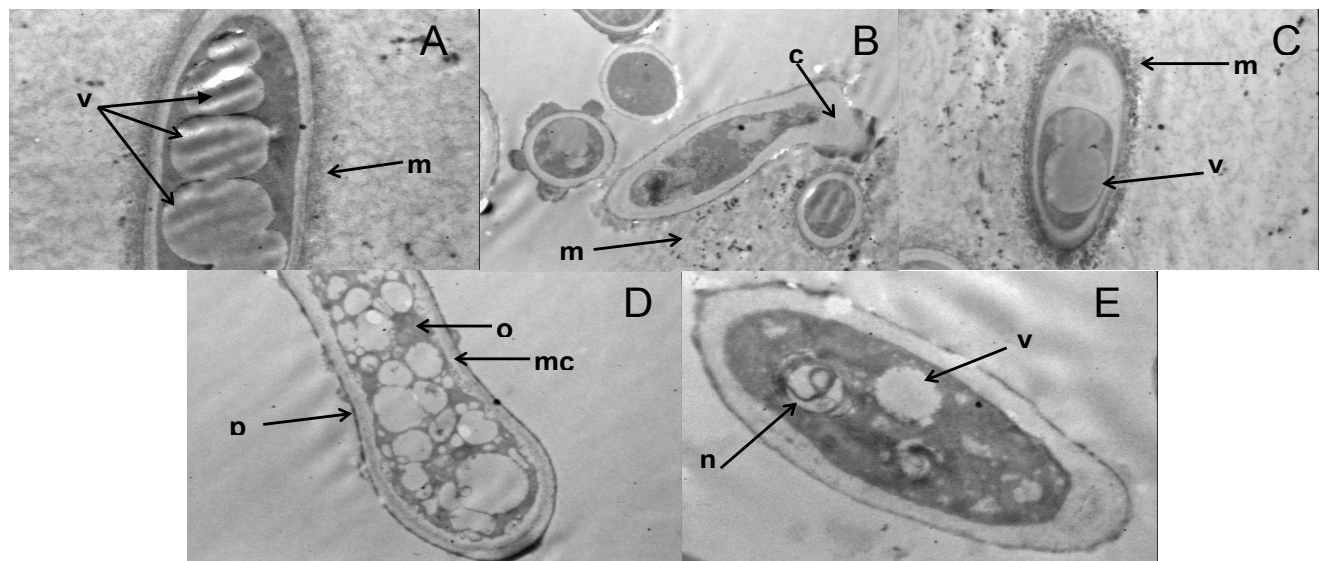


FIGURA 3. Micrografías electrónicas de transmisión del hongo *Alternaria alternata* aislado de mango cv. 'Tommy Atkins'. A y B) micelio y C) conidio tratado con quitosano al 1.0 %. D y E) micelio y conidio incubado solo en PDA. v = vacuola, m = mucílago o material fibrilar, c = contenido citoplásmico, pc = pared celular, mc = membrana celular, o = organelos y n = núcleo.

FIGURE 3. Electronic transmission micrographs of the fungus *Alternaria alternata* isolated from cv. 'Tommy Atkins' mango. A and B) mycelia and C) conidia treated with chitosan at 1.0 %. D and E) mycelia and conidia incubated only in PDA. v = vacuole, m = mucilage or fibrillar material, c = cytoplasmic content, pc = cell wall, mc = cell membrane, o = organelles and n = nucleus.

CUADRO 2. Efecto del quitosano y temperatura de almacenamiento en la incidencia y severidad de *Alternaria alternata* en frutos de mango cv. 'Tommy Atkins'.

TABLE 2. Effect of chitosan and storage temperature on the incidence and severity of *Alternaria alternata* in 'Tommy Atkins' cv. mango fruits.

Tratamientos / Treatments	Incidencia / Incidence	Severidad / Severity
	(%)*	(%)*
Quitosano / Chitosan 1 %	100	58
Temperatura / Temperature 12 °C		
Quitosano / Chitosan 1 %	100	90
Temperatura / Temperature 25 °C		
Control	100	100

*12 días de almacenamiento.

*12 days of storage.

pero ningún efecto sobresaliente cuando el quitosano fue aplicado en jitomates inoculados artificialmente con este fitopatógeno y posteriormente almacenados a temperatura ambiente.

En las Figuras 4 y 5 se muestra el desarrollo de la maduración de los mangos tratados con quitosano y sin este, y posteriormente almacenados a 12 y 25 °C. En relación con la pérdida de peso, se observó que el menor porcentaje (aproximadamente de 3 % al término de 15 días de almacenamiento) correspondió a los frutos tratados con quitosano y almacenados a 12 °C (Figura 4A). Los mangos tratados con quitosano y almacenados a 25 °C tuvieron la mayor pérdida de peso (aproximadamente 16 %) en comparación con los tratamientos restantes. La firmeza de los frutos cayó en un rango de 30 a 10 N en los frutos con quitosano y sin este, respectivamente, independientemente de la temperatura de almacenamiento (Figura 4B). Los valores de °Brix y pH variaron de 14 a 18 %, y de 4 a 5.5 respectivamente (Figuras 5A y B). El contenido de SST más alto correspondió a los frutos provenientes del control, almacenados a 25 °C, en tanto que el pH mayor fue en los frutos tratados con quitosano y almacenados a esta temperatura. En relación con el contenido de ácido cítrico (Figura 5C), el porcentaje mayor (0.8 %) correspondió a los mangos tratados y sin tratar con quitosano cuando se almacenaron a 12 °C.

La respuesta fisiológica de los frutos tratados con quitosano en este trabajo concuerda con investigaciones previas en varios productos hortofrutícolas donde se reporta sobre su acción como una cubierta semipermeable, que regula el intercambio gaseoso y por lo tanto disminuye la transpiración (Bautista-Baños *et al.*, 2006). En general, en estudios llevados a cabo sobre el efecto de la aplicación de quitosano en frutos como el litchi, el plátano y el pimiento morrón, se observó menor pérdida de peso que en productos no tratados, al ser almacenados a temperaturas menores de los 15 °C (Kittur *et al.*, 1998; Du *et al.*, 1997; Ghaouth *et al.*, 1991b). En relación a las otras variables analizadas, no se encontró un efecto significativo por la aplicación del quitosano, y se observó que durante el almacenamiento los jitomates tratados con quitosano y sin él siguieron una maduración normal

of TSS corresponded to the fruits from the control, stored at 25 °C, while the highest pH was in the fruits treated with chitosan and stored at this temperature. With respect to the content of citric acid (Figure 5C), the highest percentage (0.8 %) corresponded to the mangos treated and untreated with chitosan when they were stored at 12 °C.

The physiological response of the fruits treated with chitosan in this work agrees with previous investigations in various fruit products where its action as a semi-permeable coating is reported, which regulates the gas exchange and therefore diminished transpiration (Bautista-Baños *et al.*, 2006). In general, in studies made on the effect of the application of chitosan on fruits such as litchi, banana and red bell pepper, lower weight loss was observed than in untreated products, when stored at temperatures lower than 15 °C (Kittur *et al.*, 1998; Du *et al.*, 1997; Ghaouth *et al.*, 1991b). With respect to the other variables analyzed, no significant effect was found from the application of chitosan, and it was observed that during storage the tomatoes treated with chitosan and without treatment followed a normal maturation (Sánchez-Domínguez *et al.*, 2011). However, different authors demonstrate that temperature was the factor that most influenced the final values of most of the physio-chemical variables evaluated (Zhang and Quantick, 1998; Ramos-García *et al.*, 2010; Zhu *et al.*, 2008).

Chitosan is a compound that presents bio-functional characteristics, given that it can also be used without problems to elaborate edible coatings. Although in this investigation the fungicidal activity of chitosan was not demonstrated when it was applied *in situ*, it is considered convenient to experiment in future investigations with this compound as an edible coating added with other natural compounds such as botanical extracts and essential oils.

CONCLUSIONS

Mycelial growth, germination and sporulation of *A. alternata* showed significant inhibition in the presence of chitosan at 1.0 %.

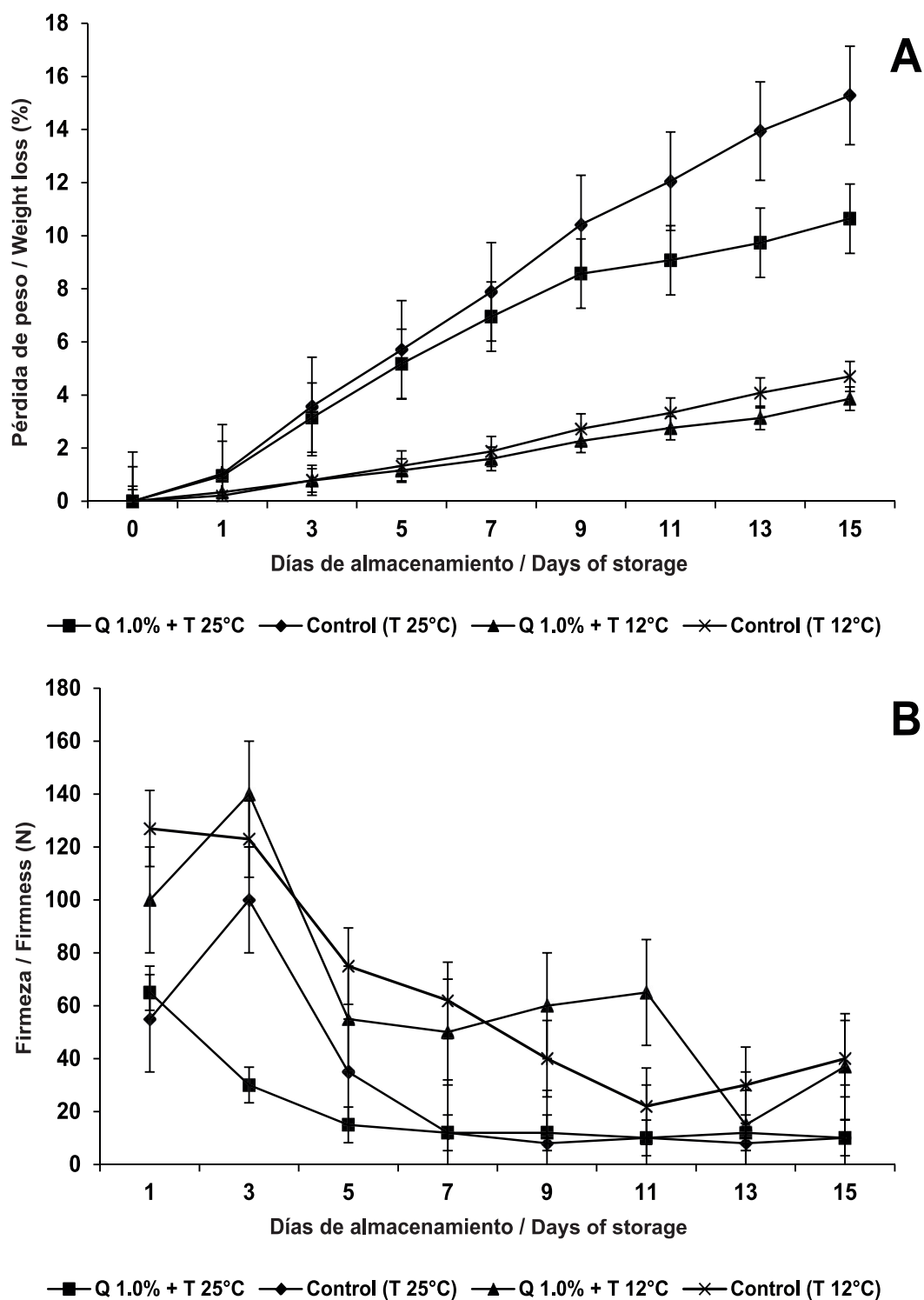


FIGURA 4. Evolución de la pérdida de peso y firmeza en frutos de mango cv. 'Tommy Atkins', tratados con y sin quitosano al 1.0 % y almacenados a 12 y 25 °C durante 15 días.

FIGURE 4. Evolution of weight loss and firmness in mango fruits cv. 'Tommy Atkins', treated with and without chitosan at 1.0 % and stored at 12 and 25 °C during 15 days.

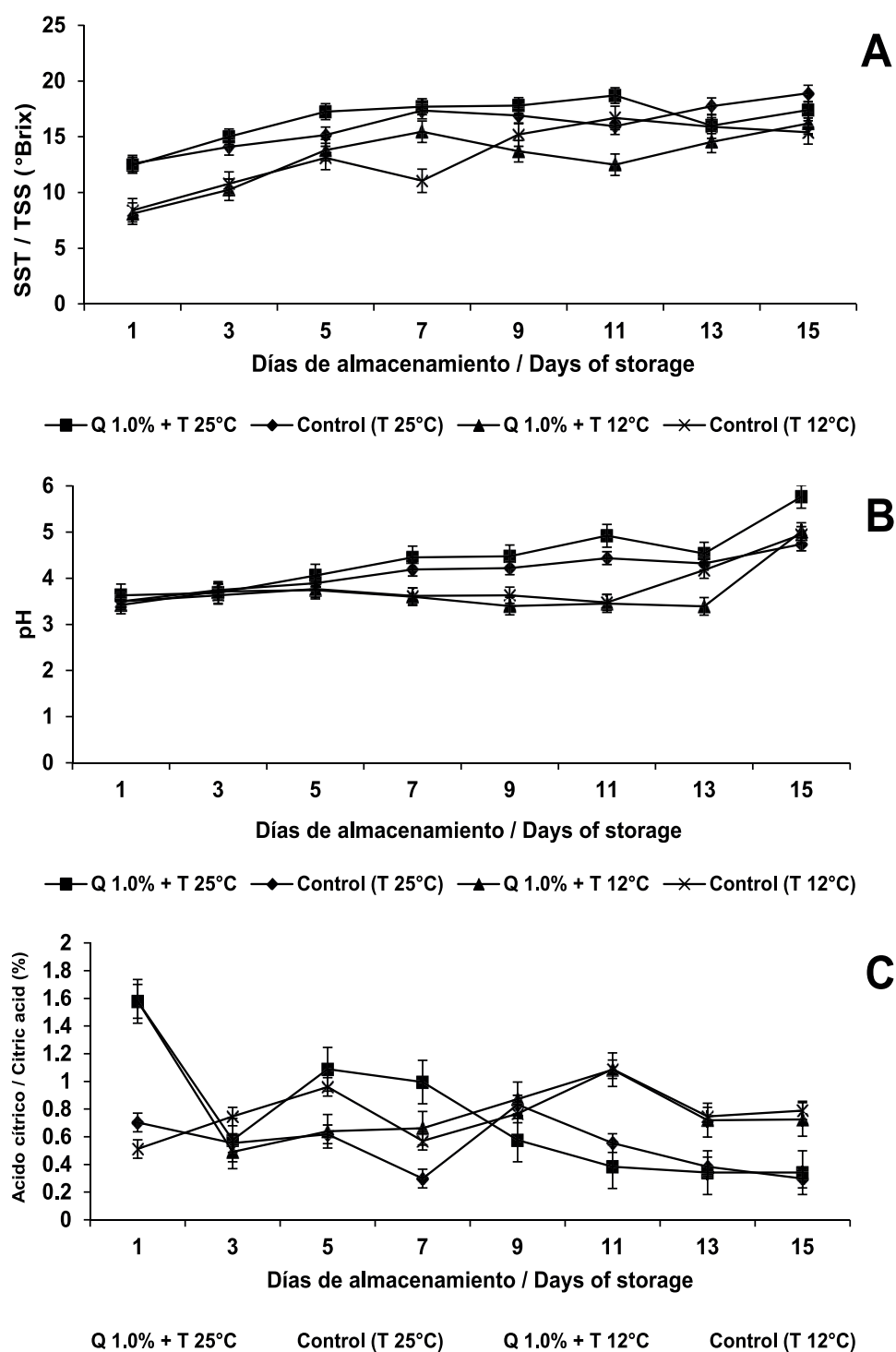


FIGURA 5. Evolución del contenido de sólidos solubles, pH y contenido de ácido cítrico en frutos de mango cv. 'Tommy Atkins', tratados con y sin quitosano al 1.0 % y almacenados a 12 y 25 °C durante 15 días.

FIGURE 5. Evolution of the content of soluble solids, pH and citric acid content in mango fruits cv. 'Tommy Atkins', treated with and without chitosan at 1.0 % and stored at 12 and 25 °C during 15 days.

(Sánchez-Domínguez *et al.*, 2011). Sin embargo, distintos autores evidenciaron que la temperatura fue el factor que más influyó en los valores finales de la mayoría de las variables físico-químicas evaluadas (Zhang y Quantick, 1998; Ramos-García *et al.*, 2010; Zhu *et al.*, 2008).

El quitosano es un compuesto que presenta características biofuncionales, ya que puede utilizarse también sin problemas para elaborar recubrimientos comestibles. Aunque en esta investigación no se demostró la actividad fungicida del quitosano cuando se aplicó *in situ*, se considera conveniente experimentar en futuras investigaciones con este compuesto como un recubrimiento comestible adicionado con otros compuestos naturales tales como extractos botánicos y aceites esenciales.

CONCLUSIONES

El crecimiento micelial, germinación y esporulación de *A. alternata* mostraron una inhibición significativa en presencia del quitosano al 1.0 %.

La incubación de *A. alternata* en presencia del quitosano al 1 % ocasionó una intensa y amplia vacuolización del micelio y esporas, la salida de material citoplásmico y la formación de material fibrilar alrededor de las células.

El quitosano aplicado en los frutos de mango no controló la mancha negra del fruto pero sí inhibió la extensión de la enfermedad.

El proceso de maduración no se vio afectado por la combinación del quitosano y la temperatura.

La temperatura fue el principal factor que afectó los cambios en el contenido de SST (°Brix), la firmeza y el contenido de ácido cítrico en los frutos de mango.

LITERATURA CITADA

- ANÓNIMO. 2005. Pérdidas en la manipulación después de la cosecha. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Guayaquil, Ecuador. 8 p. <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/meeting/009/j5778s.pdf>
- ANÓNIMO. 2010. La imagen agropecuaria. Secretaría de Agricultura, Gadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Boletín Agropecuario 1: 1-3.
- BAUTISTA-BAÑOS, S.; DÍAZ-PÉREZ, J. C.; VILLANUEVA-ARCE, R.; EVANGELISTA-LOZANO, S. 1998. Enfermedades postcosecha en frutas y hortalizas. Alternativas de control, pp. 60-63. In: Calidad y Manejo en Postcosecha de Frutas y Hortalizas. DÍAZ-PÉREZ, J. C.; LÓPEZ-GÓMEZ, R.; RODRÍGUEZ-AMBRÍZ, S.L.; ARAU-ROFFIELY, L. A.; CANO-OCHOA, C. F. (eds.). Centro de Desarrollo de Productos Bióticos-Instituto Politécnico Nacional, Instituto Tecnológico de Zacatepec. Morelos, México.

The incubation of *A. alternata* in the presence of chitosan at 1 % caused an intense and ample vacuolization of mycelia and spores, the output of cytoplasmic material and the formation of fibrillar material around the cells.

Chitosan applied to mango fruits did not control black spot of the fruit, but it did inhibit the extension of the disease.

The ripening process was not affected by the combination of chitosan and temperature.

Temperature was the principal factor that affected the changes in the content of TSS (°Brix) firmness and the citric acid content in the mango fruits.

End of English Version

- BAUTISTA-BAÑOS, S.; HERNÁNDEZ-LÓPEZ, M.; BOSQUEZ-MOLINA, E.; WILSON, C. L. 2003. Effects of chitosan and plant extracts on growth of *Colletotrichum gloeosporioides*, anthracnose levels and quality of papaya fruit. Crop Protection 22(9): 1087-1092. doi: 10.1016/S0261-2194(03)00117-0
- BAUTISTA-BAÑOS, S.; HERNÁNDEZ-LÓPEZ, M.; BOSQUEZ-MOLINA, E. 2004. Growth inhibition of selected fungi by chitosan and plant extracts. Revista Mexicana de Fitopatología 22(2): 178-186. <http://sociedadmexicanadefitopatologia.org/archives/61222204.pdf>
- BAUTISTA-BAÑOS, S.; HERNÁNDEZ-LAUZARDO, A. N.; VELÁZQUEZ-VALLE, M. G.; HERNÁNDEZ-LÓPEZ, M.; AIT-BARKA, E.; BOSQUEZ-MOLINA, E.; WILSON, C. L. 2006. Chitosan as a potential natural compound to control pre- and postharvest diseases of horticultural commodities. Crop Protection 25(2): 108-118. doi: 10.1016/j.cropro.2005.03.010
- BENHAMOU, N. 1992. Ultrastructural and cytochemical aspects of chitosan on *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis lycopersici*, agent of tomato crown and root rot. Phytopathology 82(10):1185-1193. http://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1992Articles/phyto82n10_1185.pdf
- BEN-SHALOM, N.; ARDI, R.; PINTO, R.; AKI, C.; FALLIK, E. 2003. Controlling gray mould caused by *Botrytis cinerea* in cucumber plants by means of chitosan. Crop Protection 22(2): 285-290. doi: 10.1016/S0261-2194(02)00149-7
- DU, J.; GEMMA, H.; IWAHORI, S. 1997. Effects of chitosan coating on the storage of peach, Japanese pear, and kiwifruit. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science 66(1): 15-22. https://www.jstage.jst.go.jp/article/jjshs1925/66/1/66_1_15/_pdf
- ERYANI-RAQEEB, A. A.; MAHMUD, T. M. M.; SYED O., S. R.; MOHAMED Z., A. R.; ERYANI, A. R. 2009. Effects of

- calcium and chitosan treatments on controlling anthracnose and postharvest quality of papaya (*Carica papaya* L.). International Journal of Agricultural Research 4(2): 53-68. doi: 10.3923/ijar.2009.53.68
- GARCÍA-RINCÓN, J., VEGA-PÉREZ, J., GUERRA-SÁNCHEZ, M.G., HERNÁNDEZ-LAUZARDO, A.N., PEÑA-DÍAZ, A., VELÁZQUEZ-DEL VALLE, M.G. 2010. Effect of chitosan on growth and plasma membrane properties of *Rhizopus stolonifer* (Ehrh.:Fr.) Vuill. Pesticide Biochemistry and Physiology 97(3): 275-278. doi: 10.1016/j.pestbp.2010.03.008
- GHAOUTH, A.; ARUL, J.; PONNAMPALAM, R.; BOULET, M. 1991a. Chitosan coating effect on storability and quality of fresh strawberries. Journal of Food Science 56(6): 1618-1620. doi: 10.1111/j.1365-2621.1991.tb08655.x
- GHAOUTH, A.; ARUL, J.; PONNAMPALAM, R.; BOULET, M. 1991b. Use of chitosan coating to reduce water loss and maintain quality of cucumber and bell pepper fruits. Journal of Food Processing and Preservation 15(5): 359-368. doi: 10.1111/j.1745-4549.1991.tb00178.x
- GHAOUTH, A.; ARUL, J.; ASSELIN, A.; BENHAMOU, N. 1992a. Antifungal activity of chitosan on postharvest pathogens: Induction of morphological and cytological alterations in *Rhizopus stolonifer*. Mycological Research 96(9): 769-779. doi: 10.1016/S0953-7562(09)80447-4
- GHAOUTH, A.; ARUL, J.; GRENIER, J.; ASSELIN, A. 1992b. Antifungal activity of chitosan on two postharvest pathogens of strawberry fruits. Phytopathology 82(4): 398-402. doi: 10.1094/Phyto-82-398
- GHAOUTH, A.; ARUL, J.; GRENIER, J.; BENHAMOU, N.; ASSELIN, A.; BÉLANGER, R. 1994. Effect of chitosan on cucumber plants: Suppression of *Phythium aphanidermatum* and induction of defence reactions. Phytopathology 84(3): 313-320. doi: 10.1094/Phyto-84-313
- HIRANO, A.; NAGAO, N. 1989. Effects of chitosan, pectic acid, lysozyme, and chitinase on the growth of several phytopathogens. Agricultural and Biological Chemistry 53(11): 3065-3066. <http://ci.nii.ac.jp/lognavi?name=nels&lang=en&type=pdf&id=ART0008331431>
- KITTUR, F. S.; KUMAR, K. R.; THARANATHAN, R. N. 1998. Functional packaging properties of chitosan films. Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und-forshung A. 206(1): 44-47. doi: 10.1007/s002170050211
- PALMA-GUERRERO, J.; JANSSEN, H.-B.; SALINA, J.; LÓPEZ-LLORCA, L. V. 2008. Effect of chitosan on hyphal growth and spore germination of plant pathogenic and biocontrol fungi. Journal of Applied Microbiology 104(2): 541-553. doi: 10.1111/j.1365-2672.2007.03567.x
- PALMA-GUERRERO, J.; HUANG, I.-C.; JANSSEN, H.-B.; SALINAS, J.; LOPEZ-LLORCA, L. V.; READ, N. D. 2009. Chitosan permeabilizes the plasma membrane and kills cells of *Neurospora crassa* in an energy dependent manner. Fungal Genetics and Biology 46(8): 585-594. doi:10.1016/j.fgb.2009.02.010
- PALMA-GUERRERO, J.; LÓPEZ-JIMÉNEZ, J. A.; PÉREZ-BERNÁ, A. J.; HUANG, C.-I.; JANSSEN, H.-B.; SALINAS, J.; VILLALÁIN, J.; READ, N. D.; LÓPEZ-LORCA, L. V. 2010. Membrane fluidity determines sensitivity of filamentous fungi to chitosan. Molecular Microbiology 75(4): 1021-1032. doi: 10.1111/j.1365-2958.2009.07039.x
- PLOETZ, R. C.; ZENTMYER, G. A.; NISHIJIMA, W. T.; ROHRBACH, K. G.; OHR, H. D. 1998. Compendium of Tropical Fruit Diseases. The American Phytopathological Society. St. Paul Minnesota, USA. 88 p.
- RAMOS-GARCÍA, M.; BAUTISTA-BAÑOS, S.; TRONCOSO-ROJAS, R.; BOSQUEZ-MOLINA, E.; ALÍ-TEJACAL, I.; GUILLÉN-SÁNCHEZ, D.; GUTIÉRREZ-MARTÍNEZ, P. 2010. Papaya postharvest handling in México: use of chitosan and isothiocyanates to control postharvest diseases. Fresh Produce 4(ESP1): 21-28. http://www.researchgate.net/publication/244992191_Papaya_Postharvest_Handling_in_Mexico_Use_of_Chitosan_and_Isothiocyanates_to_Control_Postharvest_Diseases/file/9c96051d50caf9f395.pdf
- REDDY, M. V. B.; ARAUL, J.; AIT-BARKA, E.; ANGERS, P.; RICHARD, C.; CASTAIGNE, F. 1998. Effect of chitosan on growth and toxin production by *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici*. Biocontrol Science and Technology 8(1): 33-43. doi: 10.1080/09583159830414
- SÁNCHEZ-DOMÍNGUEZ, D.; BAUTISTA-BAÑOS, S.; CASTILLO O., P. 2007. Efecto del quitosano en el desarrollo y morfología de *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl. Anales de Biología 29: 23-32. <https://www.um.es/analesdebiologia/numeros/29/PDF/03-EFECTO.pdf>
- SÁNCHEZ-DOMÍNGUEZ, D.; RÍOS, M. Y.; CASTILLO-OCAMPO, P.; ZAVALA-PADILLA, G.; RAMOS-GARCÍA, M.; BAUTISTA-BAÑOS, S. 2011. Cytological and biochemical changes induced by chitosan in the pathosystem *Alternaria alternata*-tomato. Pesticide Biochemistry and Physiology 99(3): 250-255. doi: 10.1016/j.pestbp.2011.01.003
- SANDFORD, P. 1989. Chitosan: commercial uses and potential applications, pp. 51-69. In: Chitin and Chitosan: Sources, Chemistry, Biochemistry. Physical Properties and Applications. SKJAK-BRAEK, G.; ANTHOSEN, T.; STANDFORD, P. (eds). Elsevier Applied Science. New York, USA.
- SIMMONS, E. G. 1992. *Alternaria* taxonomy: current status, viewpoint, challenge, pp. 1-35. In: *Alternaria* biology, plant diseases and metabolites. CHELKOWSKI, J.; VISCONTI, A. (eds). Elsevier Science Publishers. Amsterdam.
- SONG, Y.; BABIKER, E.E.; USUI, M.; SAITO, A.; KATO, A. 2002. Emulsifying properties and bactericidal action of chitosan-lysozyme conjugates. Food Research International 35(5): 459-466. doi: 10.1016/S0963-9969(01)00144-2
- TERRY, L. A.; JOYCE, D. C. 2004. Elicitors of induced disease resistance in postharvest horticultural crops: a brief review. Postharvest Biology and Technology 32(1): 1-13. doi: 10.1016/j.postharvbio.2003.09.016
- VERO M., S.; MONDINO, P. 1999. Medidas para conservar frutas y hortalizas. Control biológico postcosecha. Horticultura Internacional 7: 29-36. http://www.magrama.gob.es/ministerio/pags/biblioteca/revistas/pdf_hortint/hortint_1999_26_29_36.pdf
- WILSON, C. L.; GHAOUTH, A.; CHALUTS, E.; DROBY, S.;

- STEVENS, C.; LU, J. L.; KHAN, V.; ARUL, J. 1994. Potential of induced resistance to control postharvest diseases of fruits and vegetables. *Plant Disease* 78: 837-844. doi: 10.1094/PD-78-0837
- ZHANG, D.; QUANTICK, P. C. 1998. Antifungal effects of chitosan coating on fresh strawberries and raspberries during storage. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology* 73(6): 763-767. http://www.jhortscib.org/Vol73/73_6/7.htm
- ZHU, X.; WANG, Q.; CAO, J.; JIANG, W. 2008. Effects of chitosan coating on postharvest quality of mango (*Mangifera indica* L. cv. Tainong) fruits. *Journal of Food Processing and Preservation* 32(5): 770-784. doi: 10.1111/j.1745-4549.2008.00213.x