

**Universidad Autónoma de Sinaloa**  
Colegio en Ciencias Agropecuarias  
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia  
**Doctorado en Ciencias Agropecuarias**



**TESIS:**

*“Estrés abiótico causado por quitosano a especies de Colletotrichum aislados de Mango (Mangifera indica L.)”*

**Que para obtener el grado de  
Doctora en Ciencias Agropecuarias**

**PRESENTA:**

**Griselda Valenzuela Ortiz**

**DIRECTORA DE TESIS:**

**Dra. Soila Maribel Gaxiola Camacho**

**CO-DIRECTOR DE TESIS:**

**Dr. Eber Addí Quintana Obregón**

**ASESORES:**

Dr. Jesús José Portillo Loera  
Dr. Cesar San Martín Hernández

**Culiacán, Sinaloa, México; Mayo 2024**



Dirección General de Bibliotecas  
Ciudad Universitaria  
Av. de las Américas y Blvd. Universitarios  
C. P. 80010 Culiacán, Sinaloa, México.  
Tel. (667) 713 78 32 y 712 50 57  
dgbuas@uas.edu.mx

## UAS-Dirección General de Bibliotecas

### Repositorio Institucional Buelna

#### Restricciones de uso

Todo el material contenido en la presente tesis está protegido por la Ley Federal de Derechos de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

Queda prohibido la reproducción parcial o total de esta tesis. El uso de imágenes, tablas, gráficas, texto y demás material que sea objeto de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente correctamente mencionando al o los autores del presente estudio empírico. Cualquier uso distinto, como el lucro, reproducción, edición o modificación sin autorización expresa de quienes gozan de la propiedad intelectual, será perseguido y sancionado por el Instituto Nacional de Derechos de Autor.

Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Atribución-No Comercial  
Compartir Igual, 4.0 Internacional



## **FINACIAMIENTO**

Este trabajo de tesis fue financiado con el proyecto: “Respuestas transcriptómicas de complejos de *Colletotrichum* expuestos a nanopartículas de quitosano en un modelo *in vitro*” número A1-S-34064 del fondo FOSEC-SEP-INVESTIGACIÓN BÁSICA, 2018-2 del CONAHCYT

## DEDICATORIA

Me dedico este trabajo por seguir adelante. Por ser valiente, esas veces que quise dejar todo y salir corriendo. Por seguir intentando sin rendirme. Por soñar y seguir a pesar de las circunstancias. Me felicito por llegar hasta aquí.

*Si quiero tener éxito tengo que salir y conseguirlo yo mismo, es por eso que estoy aquí...*

*Lily-Rose M. Depp*

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma de Sinaloa por permitirme realizar el posgrado en Doctorado en Ciencias Agropecuarias de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

Al Consejo Nacional de Humanidades Ciencia y Tecnología (CONAHCYT) por la beca otorgada que me ayudó a realizar mis estudios y concluir mi trabajo de tesis. Este estudio formó parte del proyecto A1-S-34064-"Respuestas transcriptómicas de complejos de *Colletotrichum* expuestos a nanopartículas de quitosano en un modelo *in vitro*" del Fondo sectorial SEP-CONACYT de investigación 2017-2018.

A mi directora de tesis, Dra. Soila Maribel Gaxiola Camacho agradezco por haberme dado la posibilidad de integrarme a su grupo de investigación. Por brindarme su apoyo durante el desarrollo del presente.

A mi codirector de tesis, Dr. Eber Addí Quintana Obregón agradezco infinitamente por haberme dado la oportunidad de formar parte de su grupo de investigación. Por brindarme su constante y paciente seguimiento durante el desarrollo del presente trabajo. Además, agradecerle por transmitir su conocimiento en el tema, por brindarme su experiencia y por su tiempo invertido en la corrección de este trabajo.

A mi asesor de tesis, Dr. Cesar San Martín-Hernández con especial cariño y respeto le agradezco por todo el apoyo brindado a larga distancia, pero siempre presente, durante el desarrollo del presente trabajo. Gracias infinitas.

Al técnico titular C, M.C. Emmanuel Aispuro Hernández le agradezco por brindarme su experiencia y conocimiento en el tema y por guiarme en todas las técnicas, que sin su apoyo hubiese resultado difícil su implementación. Además de agradecerle por transmitirme todo su conocimiento y amor a este arte de la investigación, así pues, por su tiempo invertido en este trabajo.

Al Profesor Investigador Titular E, Dr. Miguel Ángel Martínez Téllez le agradezco el haberme recibido en la estancia Doctoral en su laboratorio Tecnología de Alimentos de Origen Vegetal, en CIAD Hermosillo.

A la Dra. Josefina León Félix y la Dra. Dra. María Claudia Villicaña Torres les agradezco el haberme recibido en la estancia Doctoral en el laboratorio BIMOGEN, en CIAD Culiacán.

A mi asesor de tesis, Dr. Jesús José Portillo Loera por el apoyo brindado durante el desarrollo del presente trabajo.

A mis compañeros de laboratorio, Oneyda, Frida, Eileen, Laura, Edgar, Panchito y Jessica por su apoyo incondicional y toda la ayuda brindada durante la parte experimental, pero principalmente por todas las pláticas compartidas que hacían más amena la estancia. Los extrañó.

A las chicas del laboratorio de nutrición, Ariadna, Fernanda, Yaritza, Briceida y laboratorios alrededores cada uno fue de gran importancia en realizar esta investigación.

A mis amigas de toda la vida, Sandra, Cinthia, Mónica, Karina, Blanquita y Thalía gracias por cada momento y risas compartidas, las amo con todo mi corazón.

Al creador de todas las cosas, el que me da fortaleza para continuar cuando he estado a punto de caer.

A mis padres, hermanos, hermanas y sobrinos quienes me impulsaron a continuar con mis estudios y es gracias a ellos que he podido salir adelante ya que sin su apoyo no hubiera podido llegar hasta aquí.

Y por último quiero brindar mi máximo agradecimiento a mi hija Layla Paulina pues sabe que sin ella nada de esto tuviera sentido, más allá de brindarme paciencia me brindaste amor y mucha comprensión los cuales fueron motivo necesario para seguir adelante, agradezco a Dios por tenerte conmigo. ¡TE AMO INFINITAMENTE!

# ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL .....	i
ÍNDICE DE CUADRO .....	iii
ÍNDICE DE FIGURAS .....	iv
ABSTRACT .....	viii
<b>CAPÍTULO 1 INTRODUCCIÓN Y REVISIÓN DE LITERATURA.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2. REVISIÓN DE LITERATURA.....</b>	<b>2</b>
1.2.1. Mango .....	2
1.2.1.1. Origen del mango .....	2
1.2.1.2. Taxonomía del mango .....	3
1.2.1.3. Morfología del mango.....	4
1.2.1.4. Producción del mango .....	5
1.2.2. <i>Colletotrichum</i> .....	8
1.2.2.1. Taxonomía de <i>Colletotrichum</i> .....	9
1.2.2.2. Identificación de <i>Colletotrichum</i> .....	10
1.2.2.3. Control de enfermedades producidas por <i>Colletotrichum</i> .....	14
1.2.3. Quitosano.....	16
1.2.3.1. Propiedades fisicoquímicas del quitosano .....	19
1.2.3.2. Propiedades biológicas del quitosano .....	22
1.2.3.3. Aplicaciones del quitosano .....	26
<b>CAPÍTULO 2 SUSCEPTIBILIDAD DE <i>COLLETOTRICHUM SPP.</i> A QUITOSANO DE</b>	
<b>BAJO PESO MOLECULAR .....</b>	<b>31</b>
<b>1.3. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>32</b>
1.3.1. Teoría .....	33
1.3.1.1. <i>Colletotrichum</i> .....	33
1.3.1.2. Quitosano .....	34
<b>1.4. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>35</b>
1.4.1. Cepas .....	35
1.4.2. Susceptibilidad .....	35
1.4.3. Densidad micelial máxima en placa .....	36
1.4.4. Análisis estadístico.....	36

1.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	36
1.6. CONCLUSIONES .....	42
1.7. AGRADECIMIENTOS .....	42
<b>CAPÍTULO 3 SENSIBILIDAD AL QUITOSANO DE HONGOS AISLADOS DE MANGO (MANGIFERA INDICA L.) CON ANTRACNOSIS .....</b>	<b>43</b>
3.1 INTRODUCCIÓN .....	44
3.2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	46
3.2.1. Identificación de aislamientos fúngicos.....	46
3.2.2. Caracterización del quitosano y sensibilidad de hongos aislados .....	48
3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	50
3.3.1. Identificación de aislamientos fúngicos.....	50
3.3.2. Caracterización del quitosano y sensibilidad de hongos aislados .....	53
3.4. CONTRIBUCIONES DE AUTOR .....	65
3.5. FONDOS .....	65
<b>CAPÍTULO 4 CONCLUSIONES GENERALES.....</b>	<b>66</b>
<b>CAPÍTULO 5 LITERATURA CITADA .....</b>	<b>66</b>

## ÍNDICE DE CUADRO

<b>Cuadro</b>	<b>Descripción</b>	<b>Página</b>
Cuadro 1-1	Taxonomía del mango ( <i>Mangifera indica</i> L.)	3
Cuadro 1-2	La producción mundial de mango en México (toneladas) por año	7
Cuadro 1-3	Clasificación de los principales clados del género <i>Colletotrichum</i>	10
Cuadro 2-1	Información de las cepas de <i>Colletotrichum</i>	35
Cuadro 2-2	Densidad micelial máxima en placa y velocidad de crecimiento radia de la fase log de especie de <i>Colletotrichum</i>	42
Cuadro 3-1	Secuencias de Secuencia de nucleótidos para la identificación de los aislados	47
Cuadro 3-2	Ecuaciones para determinar el grado de desacetilación y el peso molecular del quitosano	48
Cuadro 3-3	Quitosano contra especies del complejo <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> aisladas de antracnosis de mango. Tasa de crecimiento durante la fase logarítmica e inhibición radial del crecimiento en medio PDA, PDA-ácido láctico (0,05 M) y PDA-ácido láctico (0,05 M) con 1 g L-1 de quitosano a 25 °C	57
Cuadro 3-4	Inhibición del crecimiento radial de aislados del complejo <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> y otros géneros aislados de mango (PDA-ácido láctico-quitosano) a 25 °C	59
Cuadro 3-5	Sensibilidad al quitosano de otras especies de hongos aislados de antracnosis en mango. Crecimiento radial en medio PDA, PDA-ácido láctico (0.05 M) y PDA-ácido láctico (0.05 M) con 1 g L-1 de quitosano a 25 °C	64

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Descripción</b>	<b>Página</b>
Figura <b>1-1</b>	Distribución de la producción de mango a nivel mundial por regiones. (Gráfica elaborada con datos de la FAO (2018))	6
Figura <b>1-2</b>	Características morfológicas de especies de <i>Colletotrichum</i> en México. A) Conidios asexuales; B) conidios asexuales ( <i>C. gloeosporioides</i> ); C) Morfología de colonias de <i>C. truncatum</i> ; D) Morfología de colonias de <i>C. gloeosporioides</i> ; E) Morfología de la colonia de <i>Colletotrichum sp.</i> aislado de naranja. Fuente: Rojo-Báez <i>et al.</i> (2017)	11
Figura <b>1-3</b>	Representación de la N-desacetilación de la quitina y su producto el quitosano	17
Figura <b>1-4</b>	Representación de una cadena de quitosano que contiene residuos de monosacáridos 2-amino-2-desoxi- $\beta$ -D-glucopiranososa (unidades D) y 2-acetamida-2-desoxi- $\beta$ -D-glucopiranososa (unidades A) unidos por enlaces $\beta$ (1 $\rightarrow$ 4)	18
Figura <b>1-5</b>	Estructura química de la celulosa, quitina y quitosano	18
Figura <b>2-1</b>	Ln (radio (mm)) con respecto al tiempo (h) para controles PDA y ácido láctico para las cepas 334, 316 y 310 indicando la fase log con líneas punteadas	38
Figura <b>2-2</b>	Crecimiento radial (mm): cepa 334 (A); cepa 316 (B); cepa 310 (C)	41
Figura <b>3-1</b>	Relación filogenética entre hongos aislados de <i>Mangifera indica</i> L. con síntomas similares a los de la antracnosis. Árbol de máxima probabilidad basado en datos combinados de secuencia ITS y $\beta$ -Tub2. Los puntos negros muestran aislamientos caracterizados presente trabajo. Los valores de soporte de Bootstrap se muestran en los nodos del árbol y las	51

longitudes de las ramas y la barra de escala representan el número de sustituciones por sitio

Figura <b>3-2</b>	Identificación de especies de <i>Colletotrichum</i> aisladas de <i>Mangifera indica</i> L. Árbol de consenso Bootstrap inferido por el método de máxima verosimilitud y modelo general reversible en el tiempo basado en las secuencias de ITS, Act, $\beta$ -Tub2, GAPDH, CHS-1, CaM y ApMat. Los valores de Bootstrap junto a las ramas representan el porcentaje de árboles replicados en los que los taxones asociados se agruparon (1000 réplicas). Los puntos negros muestran aislamientos caracterizados en el presente trabajo	52
Figura <b>3-3</b>	Espectro FT-IR correspondiente a la muestra de quitosano	54
Figura <b>3-4</b>	Especies de <i>Colletotrichum fructicola</i> aisladas de antracnosis de mango (H4-1, H1-3 y 003). Cinética de crecimiento radial (mm) en medio PDA, PDA-ácido láctico (0.05 M) y PDA-ácido láctico (0.05 M) con 1 g L <sup>-1</sup> de quitosano a 25 °C	55
Figura <b>3-5</b>	<i>Colletotrichum siamense</i> aislado (H6-1) de antracnosis de mango. Cinética de crecimiento radial (mm) en medio PDA, PDA-ácido láctico (0.05 M) y PDA-ácido láctico (0.05 M) con 1 g L <sup>-1</sup> de quitosano a 25 °C	55
Figura <b>3-6</b>	Aislamientos de <i>Colletotrichum chrysophilum</i> de antracnosis de mango (H1-2 y H1-1). Cinética de crecimiento radial (mm) en medio PDA, PDA-ácido láctico (0.05 M) y PDA-ácido láctico (0.05 M) con 1 g L <sup>-1</sup> de quitosano a 25 °C	56
Figura <b>3-7</b>	<i>Colletotrichum musae</i> aislado de antracnosis de mango. Cinética de crecimiento radial (mm) en medio PDA, PDA-ácido láctico (0.05 M) y PDA-ácido láctico (0.05 M) con 1 g L <sup>-1</sup> de quitosano a 25 °C	56
Figura <b>3-8</b>	<i>Alternaria sp.</i> aislado de antracnosis de mango. Cinética de crecimiento radial (mm) en medio PDA, PDA-ácido láctico	61

	(0.05 M) y PDA-ácido láctico (0.05 M) con 1 g L-1 de quitosano a 25 °C	
Figura <b>3-9</b>	<i>Fusarium sp.</i> aislados de antracnosis de mango. Cinética de crecimiento radial (mm) en medio PDA, PDA-ácido láctico (0.05 M) y PDA-ácido láctico (0.05 M) con 1 g L-1 de quitosano a 25 °C	62
Figura <b>3-10</b>	<i>Pestalotiopsis sp.</i> aislados de antracnosis de mango. Cinética de crecimiento radial (mm) en medio PDA, PDA-ácido láctico (0.05 M) y PDA-ácido láctico (0.05 M) con 1 g L-1 de quitosano a 25 °C	62
Figura <b>3-11</b>	<i>Curvularia lunata</i> aislada de antracnosis de mango. Cinética de crecimiento radial (mm) en medio PDA, PDA-ácido láctico (0.05 M) y PDA-ácido láctico (0.05 M) con 1 g L-1 de quitosano a 25 °C	63
Figura <b>3-12</b>	<i>Diaporthe pseudomangiferae</i> aislada de antracnosis de mango. Cinética de crecimiento radial (mm) en medio PDA, PDA-ácido (0.05 M) y PDA-ácido láctico (0.05 M) con 1 g L-1 de quitosano a 25 °C	63
Figura <b>3-13</b>	<i>Epicoccum nigrum</i> aislado de antracnosis de mango. Cinética de crecimiento radial (mm) en medio PDA, PDA-ácido láctico (0.05 M) y PDA-ácido láctico (0.05 M) con 1 g L-1 de quitosano a 25 °C	64

## RESUMEN

El cultivo del mango en México se ve afectado principalmente por la enfermedad antracnosis provocada por el género *Colletotrichum*. Actualmente, existe la necesidad de buscar fungicidas amigables con el medio ambiente para el control de la antracnosis y el quitosano, un aminopolisacárido natural que ha demostrado actividad antifúngica y puede ser una alternativa viable. Por consiguiente, el objetivo de la presente investigación fue evaluar el impacto del estrés abiótico causado por quitosano sobre especies del género *Colletotrichum* aisladas de mango cultivado en Guerrero. La metodología consistió en dos etapas. En la primera etapa de la presente investigación se obtuvieron aislados de hongos de tejido vegetal con síntomas de antracnosis del estado de Guerrero en México, posteriormente se caracterizaron culturalmente con una posterior identificación molecular utilizando los marcadores genéticos ITS y  $\beta$ -Tub<sub>2</sub> de los aislados con el fin de identificar complejos del género *Colletotrichum*. Luego, se realizó una nueva identificación con los marcadores moleculares ITS, Act,  $\beta$ -Tub<sub>2</sub>, GADPH, CHS-1, CaM y ApMat, con la finalidad de identificar las especies dentro del complejo identificado. En la segunda etapa, se caracterizó fisicoquímicamente el quitosano y se evaluó su actividad antifúngica sobre el crecimiento radial en las especies identificadas. Se logró identificar el complejo *Colletotrichum gloeosporioides* y dentro de este complejo se identificaron las especies causantes de la antracnosis como son *C. chrysophilum*, *C. fructicola*, *C. siamense* y *C. musae*, los. Otros hongos encontrados e identificados fueron *Alternaria* sp., *Alternaria tenuissima*, *Fusarium* sp., *Pestalotiopsis* sp., *Curvularia lunata*, *Diaporthe pseudomangiferae* y *Epicoccum nigrum*, los cuales también están relacionados con la antracnosis. En relación al quitosano, mostró un grado de desacetilación del 78% y un peso molecular de 32 kDa. La mayoría de las especies del complejo *Colletotrichum gloeosporioides* fueron susceptibles a 1 g L<sup>-1</sup> de quitosano. Sin embargo, los aislados de *C. fructicola* tuvieron menor susceptibilidad al quitosano. Aunque el quitosano tiene actividad antifúngica, las interacciones entre especies del complejo *Colletotrichum*

*gloeosporioides* y su efecto sobre la susceptibilidad al quitosano deben estudiarse a profundidad, principalmente cambios genómicos, debido a que la sensibilidad de *Colletotrichum* hacia el quitosano depende de las diferentes etapas de su desarrollo.

Palabras clave: ***Colletotrichum*; complejo, quitosano; antifúngico**

## **ABSTRACT**

Anthracnose, caused by the *Colletotrichum* genus, significantly impacts mango farming in Mexico. It is necessary to search for eco-friendly fungicides, such as chitosan, a natural aminopolysaccharide known for its antifungal properties. The current study aimed to assess the effect of chitosan-induced abiotic stress on *Colletotrichum* species. The process comprised two parts. Fungal isolates were collected from plant tissue showing anthracnose symptoms in Guerrero, Mexico. The isolates were then characterized culturally and identified molecularly using genetic markers ITS and  $\beta$ -Tub2 to identify *Colletotrichum* genus complexes. To identify the species inside the complex, a fresh identification was conducted using the markers ITS, Act,  $\beta$ -Tub2, GADPH, CHS-1, CaM, and ApMat. Chitosan was characterized in the second stage, and its antifungal action on radial growth in the identified species was assessed. The results revealed the identification of the *Colletotrichum gloeosporioides* complex, specifically identifying species responsible for anthracnose like *C. chrysophilum*, *C. fructicola*, *C. siamense*, and *C. musae*, which had comparable cultural traits. Additional fungi discovered and recognized include *Alternaria* sp., *Alternaria tenuissima*, *Fusarium* sp., *Pestalotiopsis* sp., *Curvularia lunata*, *Diaporthe pseudomangiferae*, and *Epicoccum nigrum*. The degree of deacetylation of chitosan was around 78%, with a molecular weight of 32 kDa. The majority of *Colletotrichum gloeosporioides* complex species were vulnerable to 1 g L<sup>-1</sup> of chitosan. *C. fructicola* isolates exhibited reduced susceptibility to chitosan. Further research is needed to study the interactions between different species of the *Colletotrichum gloeosporioides* complex and their susceptibility to chitosan, particularly focusing on genomic changes. The sensitivity of *Colletotrichum* to chitosan varies depending on its developmental stages.

Keywords: ***Colletotrichum*; chitosan; antifun**

# CAPÍTULO 1 INTRODUCCIÓN Y REVISIÓN DE LITERATURA

## 1.1. INTRODUCCIÓN

El mango es un fruto importante en el mundo, se caracteriza por tener un sabor dulce, un buen aroma, textura y alto valor nutricional. Este fruto se cultiva en diferentes países, principalmente, en países cálidos como México. Actualmente existen más de 1000 variedades de mango cultivadas en todo el mundo; la producción sobrepasa las 28.8 millones de toneladas (FAO, 2018). India destaca como líder productor mundial del mango (SIAP, 2018). A nivel nacional, en el año 2021, México obtuvo una producción de 2,156,040 toneladas, posicionándolo en el tercer productor de mango a nivel mundial, los principales productores de mango son el estado de Guerrero y Sinaloa (SIAP, 2022). La pérdida de este fruto en pre y poscosecha es un problema significativo a nivel mundial. Estas pérdidas son causadas principalmente por enfermedades generadas por hongos. *Colletotrichum* es un hongo fitopatógeno que causan enfermedades como la antracnosis afectando la producción del mango, provocando perdidas hasta del 100% de la producción (Uddin *et al.*, 2018). Diferentes investigaciones han buscado algunas opciones para enfrentar a los hongos fitopatógenos en pre y poscosecha por los riesgos asociados al uso de fungicidas, los cuales dañan el medio ambiente y son nocivos para el consumidor. Una opción comprometedoras es el quitosano, el cual presente actividad antifúngica. Se han utilizado algunos polisacáridos como agentes biológicos para el control de enfermedades causados por *Colletotrichum*, debido a su menor impacto ambiental y su compatibilidad con prácticas agrícolas sostenibles, entre los que destaca el quitosano (Coronado-Partida *et al.*, 2017). Este polisacárido natural es biodegradable, no es tóxico con actividad biológica importante, como es la actividad antifúngica. La actividad antifúngica del quitosano está relacionada directamente con su carácter catiónico. Existe una interacción entre los grupos amino libres (carga positiva) del quitosano y los componentes fosfolípidos (carga negativa) de la capa resistente exterior (pared celular) de la membrana plasmática de los hongos, esta interacción cambia la permeabilidad de la membrana plasmática y altera sus

funciones (Rodríguez-Pedroso *et al.*, 2009). El objetivo de la presente investigación fue evaluar el impacto del estrés abiótico causado por quitosano a especies de *Colletotrichum* aisladas de mango.

## **1.2. REVISIÓN DE LITERATURA**

### **1.2.1. Mango**

El mango (*Mangifera indica* L.) es un fruto de clima cálido (tropical) importante en el mundo, por tener un sabor dulce que se caracteriza, textura, aroma y de gran valor nutrimental. El fruto de mango cuando alcanza un alto grado de maduración presenta un pico en la respiración y reproducción de etileno, clasificándolo como un fruto climatérico. Este fruto se cultiva en diferentes países, principalmente en países cálidos como México, Colombia, Ecuador, entre otros.

#### **1.2.1.1. Origen del mango**

Existen más de 1000 variedades de mango, se tiene reportes que se utiliza desde hace más de 4000 años y existen indicios que es originario de la India y del Sureste Asiático. Entre las variedades de mango más comunes y de mayor consumo en México, está el Ataulfo. La denominación del mango Ataulfo la posee México, producida en la región del Soconusco, Chiapas. El nombre del mango Ataulfo se atribuye a su creador Ataulfo Morales Gordillo, productor chapaneco que experimento con árboles de mango diferentes injertos en 1963 (SADR, 2020). La primera introducción del mango en México fue a finales del siglo XVIII, los españoles trajeron desde china al puerto de Acapulco la especie del mango Manila; esta especie se estableció y comenzó a distribuirse en la costa del Golfo de México, principalmente en Veracruz. A principios del siglo XIX comenzó la segunda introducción del mango a México, la cual inició en las Antillas hasta llegar a la costa del Golfo de México. La especie introducida fueron mangos monoembriónicos que se esparcieron por la región tropical de México, esta especie se propago por semilla, originando los mangos criollos. La tercera introducción fue en 1950, utilizando germoplasma de mango. Se esparcieron cultivares de mango por injerto, dispersadas en el Pacífico, Centro y Norte de México, después por la región tropical de México. A partir de los cultivares introducidos surgieron especies como el Kent,

Irwin, Haden, Keitt, Sensation y Zill conocidos comúnmente como “mangos petacones” aquí comenzó la producción del mango en México (CONASPROMANGO, 2012).

#### 1.2.1.2. Taxonomía del mango

El mango pertenece a la familia taxonómica Anacardiaceae, la cual tiene alrededor de 73 géneros de mango y aproximadamente 850 especies. Se ha podido reconocer cerca de 69 especies que pertenecen al género *Mangifera*, de las cuales solo 15 producen frutos comestibles, maderas, gomas, taninos y resinas (Bompard, 2009). El género *Mangifera* se puede clasificar en dos subgéneros (Kostermans and Bompard, 1993):

- El subgénero *Limus* el cual agrupa once especies y dentro de él se encuentran las especies de *Mangifera*, con una lejana afinidad con el mango común.
- El subgénero *Mangifera* contiene alrededor de 47 especies y está dividido en cuatro secciones: *Rawa*, *Euantherae*, *Mangifera* y *Marchandora*. *Mangifera* tiene más de 30 especies y dentro de esta sección podemos encontrar el *M. laurina* y el mango común (Bompard, 2009).

La clasificación taxonómica del mango se muestra en la Cuadro 1-1.

Cuadro 1-1 Taxonomía del mango (*Mangifera indica* L.)

Taxonomía	
Clase	<i>Dicotiledóneas</i>
Subclass	<i>Rosidae</i>
Orden	<i>Sapindales</i>
Suborden	<i>Anacardineae</i>
Familia	<i>Anacardiaceae</i>
Género	<i>Mangifera</i>
Especie	<i>M. indica</i>

(Arcila-Cardona *et al.*, 2022)

### 1.2.1.3. Morfología del mango

#### 1.2.1.3.1. Árbol

El árbol adulto de mango que fue cultivado presenta aproximadamente una altura de 3 a 10 metros, esta característica dependerá de la poda y la variedad del árbol de mango. Un árbol de mango que no fue cultivado o es silvestre puede llegar a medir 15 metros. Por otro lado, un árbol maduro de mango puede superar los 40 metros en condiciones favorables de crecimiento y puede llegar a vivir aprox. 100 años (Mukherjee and Litz, 2009). Los árboles de mango pueden variar en la forma de la copa y su apertura, esto dependerá de la variedad y la competencia (Bally, 2006). *Mangifera indica* L. es un árbol de hojas sencillas, flores pequeñas en inflorescencia apical o panícula, las cuales presentan cáliz y corola con cinco pétalos, y cada flor de cinco estambres. Este árbol que tiene un crecimiento medio, una sombra densa y follaje que permanece verde o foliación perene. Su tronco es recto con un diámetro aproximado de 75 a 100 cm (INFOCOMM, 2011).

#### 1.2.1.3.2. Fruto

El fruto del mango es carnoso con forma ovoide-oblonga aplanada, redondeada y obtuso en los extremos. El tamaño del fruto depende de la variedad del mango. La cascara es lisa y uniforme con lenticelas escasas o numerosas; el color del fruto maduro es variable de color verde y tonalidades que varían de amarillo, rojo y hasta morado, la coloración del fruto puede ser homogénea o parcial y depende de su estado de madurez; el mesocarpio o conocido comúnmente como pulpa es de color amarillo-naranja, jugosa y aromática semilla plana y grande con fibras que se adhieren a la pulpa y puede variar el contenido de fibra (García *et al.*, 2010).

#### 1.2.1.3.3. Flor

Las flores están en la panícula piramidal muy ramificada, terminal o axilar de aproximadamente 25 cm de largo y 3.25 cm de diámetro. El raquis es de color rosado o morado en ocasiones de color verde-amarillo, redondeado y densamente

pubescentes, son susceptibles a marchitarse y caerse pronto las cuales pueden medir de 0.3 a 0.5 cm de largo (Bally, 2006).

#### 1.2.1.3.4. Hojas

Las hojas de mango son simples de textura coriácea y lisas, alternas, sin estipulas y con peciolo, son color verde oscuro por el haz y verde amarillento por el envés, las hojas jóvenes presentan un color violeta a rojizo. La forma y tamaño de las hojas varía entre cultivos, pero tiende a ser igual dentro de la misma variedad, generalmente son oblongas con extremidades redondeadas a acuminadas y su largo oscila entre 8 y 45 cm y aproximadamente de 2 a 12 cm de ancho (Bally, 2006, Mukherjee and Litz, 2009).

#### 1.2.1.4. Producción del mango

##### 1.2.1.4.1. Producción a nivel mundial

El mango es un fruto tropical cultivado en todo el mundo, es el tercer fruto con mayor producción e importación a nivel mundial después de la piña tropical y el plátano. Se cultiva en alrededor de 100 países, distribuido ampliamente en países asiáticos y latinoamericanos, principalmente en regiones con clima cálido. La producción del mango sobrepasa las 28.8 millones de toneladas (FAO, 2018). En los últimos años India sea posicionado como el líder productor del fruto del mango, aportando dos de cada cinco kilogramos a la cosecha mundial en el año 2017 (SIAP, 2018), obteniendo una producción de más de 19.5 millones de toneladas en el año 2018 (SIAP, 2019), esta producción es favorecida porque el árbol del mango es endémico del sureste de Asia, condición que aprovecha India para el establecimiento de mayor extensión de mangales con 2.2 millones de hectáreas sembradas (SIAP, 2020). En la cosecha mundial del 2020 se registró que cuatro de cada diez mangos eran de origen indio (SIAP, 2021). En el año 2021 India destaco como líder productor generando 45.1% de la producción mundial del mango (SIAP, 2022) y en el año 2022 generó 44 de cada 100 toneladas de la cosecha mundial del fruto, siendo el mayor aporte del mundo (SIAP, 2023). Por otro lado, México genera cinco de cada 100 toneladas de mango que se cultivan en el mundo (SIAP, 2018). En el año 2018 México fue la sexta nación con la superficie más extensa destinada

para cultivar mango, aportando 3.9% a la producción mundial (SIAP, 2019), por este motivo, México se ha consolidado como excelente productor de mango con atributos para su exportación (SIAP, 2020). Entre los años 2015 al 2020 se registró un acelerado incremento en la cosecha anual del fruto que se ha suscitado en los países con el fruto, situación a la que México contribuye (SIAP, 2021) (SIAP, 2021). En el año 2021 México se posiciono entre los cuatro principales países productores del mango, lo que permitió tener vocación exportadora con una producción mundial de 2,156,040 toneladas, posicionando a México en el tercer productor de mango mundial (SIAP, 2022). Así mismo, México dedica más de 200 mil hectáreas para la producción de mango, lo que representa el 3.6% de la cosecha a nivel mundial (SIAP, 2023). En la Figura 1-1 se muestra la distribución del mango a nivel mundial.

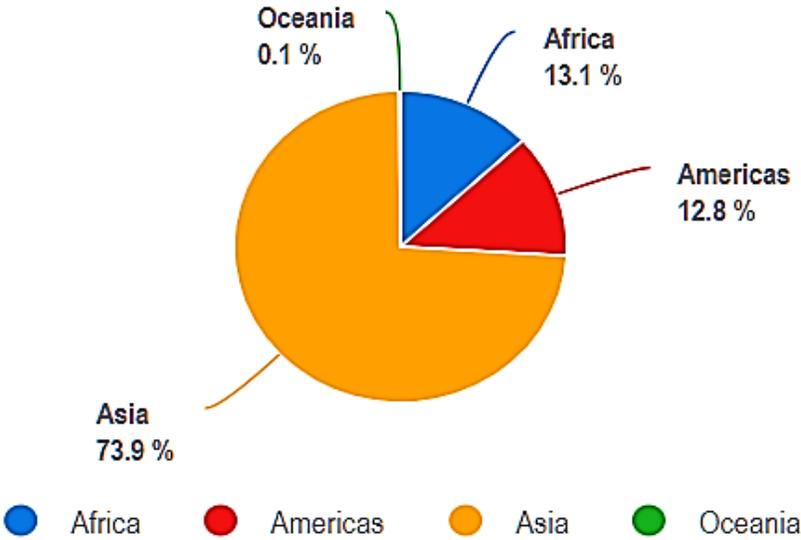


Figura 1-1 Distribución de la producción de mango a nivel mundial por regiones. (Gráfica elaborada con datos de la FAO (2018))

1.2.1.4.2. Producción de mango en México

México es una potencia mundial productora de mango, con alta capacidad de movilización; el 80% de los cortes de mango se logra de abril a agosto, de modo que, también realiza los mayores envíos al extranjero en dichos meses. La producción mensual nacional (%) del 2022 en abril fue de 10.4%, en mayo 15.6%,

junio del 20.9%, julio 18.9% y en agosto 12.3%. En el año 2022 México se posiciono en el quinto lugar como productor mundial con 2,176,046 toneladas, los principales productores de mango en toneladas que favorecieron esta producción fueron Guerrero con 411,173, seguido por Sinaloa con 407,831, Nayarit con 338,754, Chiapas 273,660, Oaxaca 215,934, Michoacán 191,357, Jalisco 127,900, Veracruz 99,153, Colima 59,803, Campeche 13,338 y el resto de las entidades apporto 37,144 toneladas. El destino comercial del mango que se cosecha en México es principalmente Estados Unidos considerándose como líder de las compras de mango mexicano, 62.3% del volumen que el país norteamericano importo durante 2022 fue suministrado por México. El fruto fresco y orgánico fueron los que más se vendieron en el año 2022, aunque también se realizaron envíos del fruto seco (SIAP, 2023). En la Cuadro 1-2 se muestra la producción mundial del mango en toneladas por año y la entidad federativa con mayor producción en los últimos años.

Cuadro 1-2 La producción mundial de mango en México (toneladas) por año

<b>Producción mundial (toneladas)</b>	<b>Año</b>	<b>Entidad federativa con Mayor producción (toneladas)</b>	<b>Referencia</b>
1,958,491	2017	Guerrero 375,328	SIAP, 2018
1,867,298	2018	Guerrero 385,125	SIAP, 2019
2,089,041	2019	Sinaloa 397,780	SIAP, 2020
2,085,751	2020	Sinaloa 410,147	SIAP, 2021
2,156,040	2021	Sinaloa 423,518	SIAP, 2022
2,176,046	2022	Guerrero 411,173	SIAP, 2023

#### 1.2.1.5. Pérdidas de mango en pre y poscosecha

La pérdida del fruto del mango en pre y poscosecha es un problema significativo en la industria agrícola a nivel mundial. La pérdida de mango hace referencia a la disminución de calidad y cantidad de mango durante su ciclo de producción y comercialización. Incluye todas las etapas de pre y poscosecha, desde la caída prematura de los frutos hasta su deterioro durante el almacenamiento y la

distribución. Esto incluye pérdidas causadas por daños físicos, enfermedades, plagas y manejo inadecuado. Un estudio realizado en la India encontró que las pérdidas poscosecha de mango pueden variar entre el 20% y el 35% de la producción total (Thokchom and Mandal, 2019). En Nigeria, se estima que las pérdidas poscosecha de mango pueden oscilar entre el 15% y el 40% de la producción total, debido principalmente a la falta de infraestructura adecuada para el almacenamiento y transporte (Balana *et al.*, 2022). En Tailandia, se informa que las pérdidas poscosecha de mango pueden alcanzar hasta el 25% de la producción total, con problemas como la manipulación inadecuada durante la cosecha y el transporte, así como la falta de tecnologías de almacenamiento adecuadas (Kanchanapiboon, 2017). Dentro de las enfermedades importantes del mango se encuentra la antracnosis, enfermedad causada por hongos fitopatógenos, principalmente especies de *Colletotrichum* que afectan la producción del fruto del mango, provocando pérdidas del 50% al 100% de la producción (Uddin *et al.*, 2018). Esta enfermedad se identifica en el fruto por lesiones necróticas hundidas, con bordes irregulares que se pueden observar en la epidermis, con el paso del tiempo estas lesiones pueden unirse y cubren más del 50% de la superficie del fruto; en algunos casos forman acérvulos de color salmón o naranja los cuales presentan conidios (Tovar-Pedraza *et al.*, 2020).

### 1.2.2. *Colletotrichum*

*Colletotrichum* es un hongo fitopatógeno que causa enfermedades como la antracnosis en una variedad de huéspedes. Aparece como una lesión en la epidermis del fruto de forma semicircular e irregular con depresiones concéntricas en forma de anillo. Estas características dependen de la madurez del fruto y los síntomas varían entre ramas, panículas y hojas (Hyde *et al.*, 2009).

Existen alrededor de 100 especies de hongos fitopatógenos que pertenecen al género *Colletotrichum*, las cuales causan antracnosis en la mayoría de los cultivares, incluidas *C. boninense*, *C. truncatum*, *C. gloeosporioides*, *C. arásitica*, entre otras (Crouch *et al.*, 2014). En la clasificación mundial de patógenos en plantas, *Colletotrichum* se posiciona en el octavo lugar por su importancia científica

y económica (Dean *et al.*, 2012). La antracnosis se ha estudiado en todo el mundo en frutas, verduras, cereales, plantas ornamentales, entre otras; especialmente en zonas templadas y tropicales (Udayanga *et al.*, 2013).

La antracnosis causa importantes pérdidas antes y después de la cosecha, ya que conduce a una disminución de calidad y cantidad de diversos cultivos. Dependiendo del tipo del patógeno y las condiciones climáticas las pérdidas pueden ser hasta del 100% (Landeró-Valenzuela *et al.*, 2016a). Un ejemplo de esta situación, es en el cultivo de papaya, donde el manejo de fungicidas fue bajo, resultando en pérdidas de más de 50% debido a la propagación de antracnosis en campo y en poscosecha (Torres-Calzada *et al.*, 2013).

Investigaciones previas sobre la diversidad de las poblaciones de *Colletotrichum* se complican por las limitaciones de los métodos de identificación de especies, dado que los métodos convencionales se basaban en diferenciar características morfológicas que ahora se consideran deficientes e inexactas (Hyde *et al.*, 2009).

#### 1.2.2.1. Taxonomía de *Colletotrichum*

*Colletotrichum* incluye el estado asexual (anamorfo) de *Glomerella* (telemorfo) perteneciente al filo Ascomycota, este tipo de hongos con micelio tabicado presentan una asca donde se producen ascosporas endógenas; pertenece a la clase Hypocreomycetidae, estos hongos presentan peritecio sobre las estromas; *Colletotrichum* pertenece al orden *Glomerellales* donde se encuentran los hongos fitopatógenos; la familia a la que pertenece es *Glomerellaceae* destacando el género *Glomerella* anamorfo (*Colletotrichum*) formando acervulos y relacionado principalmente con antracnosis (Réblová *et al.*, 2016). *Glomerellaceae* es una familia monotípica que exhiben ascocarpos (peritecio) de color oscuro no estromáticos, ostiolo perifisado desarrollado y una gran cantidad de paráfisis de pared delgada. *Glomerella* originalmente se clasificó en el orden *Phyllacorales*. Sin embargo, sus características son diferentes a las de otras especies. Un ejemplo de estas características es la capa estromática que se encuentra ausente y sus anamorfos solo se encuentran en *Colletotrichum* (Zhang *et al.*, 2006).

Taxonómicamente, *Colletotrichum* se considera un género confuso, por causa de modificaciones del nombre según a la naturaleza sexual de este. El uso del término *Glomerella* se sustituyó por el de *Colletotrichum* por el uso en la ciencia aplicada. Esto llevo a la expectativa de que habría menor variación taxonómica entre las especies de este género (Damm *et al.*, 2009, Zhang *et al.*, 2013).

Análisis filogenéticos han logrado distinguir complejos dentro del género *Colletotrichum*, clasificándose en nueve complejos o clados principales, esta información se puede observar en la Cuadro 1-3.

Cuadro 1-3. Clasificación de los principales clados del género *Colletotrichum*

Complejos (clados)	Cantidad de especies	Referencias
<i>Acutatum</i>	29 especies	(Damm <i>et al.</i> , 2012)
<i>Boninense</i>	27 especies	(Damm <i>et al.</i> , 2012)
<i>Destructivum</i>	13 especies	(Damm <i>et al.</i> , 2014)
<i>Gloeosporioides</i>	22 especies	(Weir <i>et al.</i> , 2012)
<i>Orbiculare</i>	8 especies	(Damm <i>et al.</i> , 2013)
<i>Graminicola</i>	13 especies	
<i>Dematium</i>	6 especies	(Cannon <i>et al.</i> , 2012,
<i>Spaethianum</i>	5 especies	Udayanga <i>et al.</i> , 2013)
<i>Truncatum</i>	3 especies	

#### 1.2.2.2. Identificación de *Colletotrichum*

La identificación de las especies de *Colletotrichum* aún necesita exploración y a pesar de que las técnicas moleculares y filogenéticas continúan mejorando la especificidad de los métodos bioquímicos y morfológicos convencionales, se necesita un diagnóstico más sólido.

##### 1.2.2.2.1. Identificación morfológica de *Colletotrichum*

El género *Colletotrichum* se ha identificado por las siguientes características morfológicas: forma y tamaño de esporas asexuales e hifas achatadas; algunas especies pueden presentar o carecer de acérvulos, setas, esclerocio y estado teleomorfo; al igual que las características culturales pueden diferenciar en los pigmentos de la colonia, variar la velocidad de crecimiento y tener diferentes texturas (Hyde *et al.*, 2009). Investigaciones han demostrado que *C. truncatum*

posee conidios unicelulares translúcidos con tamaño de 22,8 a 23,8 x 3 a 3,02  $\mu\text{m}$ , traslucidos con paredes uniformes (lisas) y sin hifas septadas. *C. truncatum* tiene una parte central poco curvada, paredes semejantes y acaba abruptamente con base truncada y redonda, el cual tiene materia granular. A diferencia de *C. gloeosporioides* que exhibe conidios ovoides con una medida de 13.56 a 14.24 x 4 a 4.02  $\mu\text{m}$ . Otro ejemplo de estas características morfológicas es en *C. truncatum*, las colonias de esta especie son de forma regular o irregular, borde entero, son de color blanco a salmón o de gris a negro y presentan masas conidiales formadas en anillos concéntricos; las colonias de *C. gloeosporioides* exhiben un crecimiento radial con bordes enteros u ondulados y suelen ser blancos con conidios naranjas en el centro de la colonia. Por otro lado, *Colletotrichum* exhibe diferentes morfotipos como borde circular y entero, micelio gris con masas de conidios de color naranja (Rojo-Báez *et al.*, 2017, Torres-Calzada *et al.*, 2013). En la Figura 1-2 se pueden apreciar la morfología de especies de *Colletotrichum* en México en medio Agar de Dextrosa de Patata (PDA).

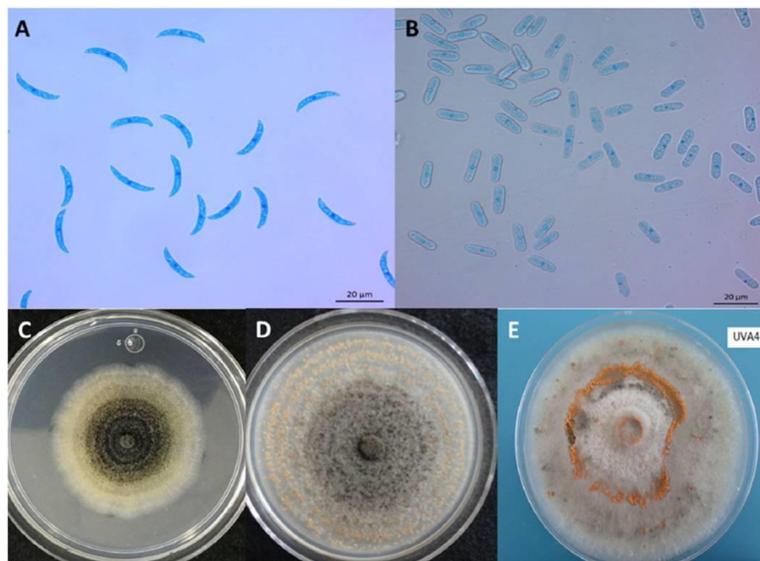


Figura 1-2. Características morfológicas de especies de *Colletotrichum* en México. A) Conidios asexuales; B) conidios asexuales (*C. gloeosporioides*); C) Morfología de colonias de *C. truncatum*; D) Morfología de colonias de *C. gloeosporioides*; E) Morfología de la colonia de *Colletotrichum* sp. aislado de naranja. Fuente: Rojo-Báez *et al.* (2017)

Diferentes investigaciones han demostrado que *Colletotrichum* exhibe una estructura reproductiva asexual conocida como acérvulos, los cuales se encuentran separados con aspecto de disco, cerosos, se encuentran debajo de la epidermis que salen del hospedante; contienen setas que típicamente se observan como espinas negras entre los márgenes o conidióforos, las cuales, son sencillos y oblongo; las esporas asexuales (conidios) son transparentes, ovoides y elongados (Barnett and Hunter, 1998). Los conidios ovoides u oblongos o elongados no se encuentran en todas las especies de *Colletotrichum*. Por ejemplo, *C. dematium* y *C. lineola* presentan conidios curvados (Damm *et al.*, 2009).

Algunos estudios han reportado que el aspecto y tamaño de los apresorios y conidios, no son de interés para clasificar y caracterizar las especies de *C. graminícola*, principal especie de *Colletotrichum* que provoca antracnosis en el maíz (Crouch *et al.*, 2009). Especies con características morfológicas similares pueden presentar variaciones en el aspecto fisiológico y patógeno, dependiendo de las condiciones de incubación y ambientales, entre otras. De igual forma, los caracteres morfológicos no son suficientes para un diagnóstico preciso, ya que existen grandes diferencias entre la morfología fenotípica entre las especies en diferentes condiciones ambientales (Cai *et al.*, 2009). Para evitar la caracterización deficiente de la identificación convencional, el empleo combinado de la identificación molecular y el diagnóstico convencional se han convertido ahora en una única técnica apropiada para el estudio de complejos de especies de *Colletotrichum* (Hyde *et al.*, 2009).

#### 1.2.2.2.2. Identificación molecular de *Colletotrichum*

A diferencia de la identificación convencional, el estudio de ácidos nucleicos es fiable para la identificación de especies del género *Colletotrichum*. Sin embargo, depender de una porción muy pequeña de secuencias de nucleótidos para establecer las relaciones filogenéticas entre las especies del género *Colletotrichum* es un inconveniente y un riesgo de construir esquemas (árboles filogenéticos) que muestran las relaciones de los genes en lugar de crear esquemas que muestren la relación entre especies. Por tal razón, se recomienda el uso de la filogenia de

diversos genes para establecer las correlaciones entre las especies del género *Colletotrichum*. Esto permite utilizarlo de apoyo para identificar complejos de *Colletotrichum* (Cai *et al.*, 2009).

Existen diferentes códigos genéticos, o comúnmente las llamadas regiones génicas conservadas, para identificar especies fúngicas. El espaciador interno transcrito (ITS) del ADNr es la región más empleada para identificar especies fúngicas (Schoch *et al.*, 2012). Se utilizan diferentes regiones para estudiar especies estrechamente relacionadas entre sí para identificar *Colletotrichum spp.* Además de la región ITS, también se utilizan la región de actina parcial (Uddin *et al.*),  $\beta$ -tubulina 2 ( $\beta$ -Tub<sub>2</sub>), calmodulina (CAL) (Jiang *et al.*, 2014), glutamina sintetasa (Gan and Wickings), quitina sintasa (CHS-1) (Villafana *et al.*, 2020), histamina (HIS3), región Inter génica de *apn2*, liasa (APN2) y MATI-2-1 (ApMat) (Fuentes-Aragón *et al.*, 2020) y gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) (Cai *et al.*, 2009, Hyde *et al.*, 2014). La filogenia de diversos genes se ha aplicado para dilucidar las relaciones que existe entre especies con conidios curvos en huéspedes plantas. Ejemplos de esto incluyen el nuevo taxón *C. hanau*, *C. nicholsonii*, *C. paspali*, entre otras (Crouch *et al.*, 2009).

La filogenia de múltiples genes se considera confiable y exacta para identificar y caracterizar las especies de *Colletotrichum*. Sin embargo, se considera un método deficiente y de altos costos. En la actualidad, no es práctico utilizar la filogenia de múltiples genes para identificar todas las especies, por lo que diferentes investigadores han utilizado regiones génicas diferentes. El espaciador interno transcrito es el más utilizado para la identificar de hongos. Sin embargo, secuenciar la región ITS no es completamente fiable para identificar especies de *Colletotrichum* (Cai *et al.*, 2009). Crouch *et al.*, en el 2009 informaron una alta tasa de error de identificación del 86% basándose en la semejanza de secuencia de nucleótidos dentro del complejo *C. lineola*. Además, las secuencias que se encuentran en Genbank de la región ITS, pueden causar confusión, al introducir secuencias con nombres incorrectos o contener especies crípticas (Rojo-Báez *et al.*, 2017). Por ende, los estudios deben desarrollarse en un sentido polifásico que involucre

caracterización morfológica, cultural, fisiológica, patogénica, proceso de infección y metabolitos secundarios, mientras que el estudio de un locus involucra secuenciación génica para ejecutar una combinación de caracteres filogenéticos (Cai *et al.*, 2009). Por lo tanto, la identificación de las especies de *Colletotrichum* debe incluir ambos estudios para realizar un estudio eficaz y confiable.

#### 1.2.2.3. Control de enfermedades producidas por *Colletotrichum*

El manejo de enfermedades originadas por el género *Colletotrichum* es de importancia crítica en la agricultura, ya que el género incluye diversas especies de hongos fitopatógenos que causan enfermedades en una amplia gama de cultivos.

Prácticas culturales adecuadas pueden reducir la incidencia y severidad de las enfermedades causadas por *Colletotrichum*. Estas prácticas incluyen la rotación de cultivos, la eliminación de residuos de plantas y frutos infectados, la selección de variedades resistentes, el uso de semillas libre de enfermedades; tratamientos físicos como atmósferas modificadas y el ozono en el fruto; manejo químico, específicamente fungicidas y control biológico, macroorganismos, entre otros (Landeró-Valenzuela *et al.*, 2016a, Phoulivong, 2011)

Como parte del control químico, a menudo se utilizan fungicidas como benzimidazol y estrobilurina que inhiben la división nuclear y la respiración mitocondrial, respectivamente (Torres-Calzada *et al.*, 2015). Además, para controlar la antracnosis se han utilizado fungicidas como azoxistrobina, clorotalonil, entre otros (Santamaría-Basulto *et al.*, 2011). Diferentes investigaciones confirman que la aplicación de diferentes fungicidas sintéticos ha provocado resistencia en especies de *Colletotrichum*. Torres-Calzada *et al.* (2015) encontraron que los aislados de *C. truncatum* eran susceptibles a cyprodinil-fludioxonil y mancozeb, y resistentes a tiabendazol y azoxystrobin, fungicidas químicos. Esto confirma que la resistencia al fungicida tiabendazol es provocada por la alteración en el gen de la  $\beta$ -tubulina a causa de la sustitución del ácido glutámico por alanina. Por este motivo, se ha incrementado el interés por alternativas efectivas y que sean inocuas para el ser humano y el medio ambiente, como el control biológico.

El uso de agentes de control biológico para manejar enfermedades causadas por *Colletotrichum* está ganando atención debido a su menor impacto ambiental y su compatibilidad con prácticas agrícolas sostenibles. Hongos antagonistas, bacterias, extractos de plantas y algunos polisacáridos son ejemplos de agentes biológicos que han mostrado potencial para el control de *Colletotrichum*. *Bacillus subtilis* es utilizado para el manejo de antracnosis por su potencial para combatir enfermedades provocadas por patógenos, antibiosis y competencia. Se ha evaluado el potencial de *B. subtilis*, *Rhodotorula minuta* y la mezcla de estos microorganismos en precosecha para el manejo de antracnosis provocada por *C. gloeosporioides* en mango en poscosecha. La composición fue  $10^6+10^4$  ufc mL<sup>-1</sup>, superando al benomil utilizado como control químico (Carrillo-Fasio *et al.*, 2005). Por otra parte, se han utilizado indicadores de resistencia para el control de *Colletotrichum*. Un ejemplo de ello son el ácido jasmónico y el ácido salicílico, entre otros (Landeró-Valenzuela *et al.*, 2016a).

Para reducir daños por antracnosis generados por *C. gloeosporides* se han propuesto tratamientos naturales externos o superficiales utilizando hidrodispersiones que mezclan proteínas, lípidos y/o polisacáridos, sin lograr eliminar por completo los daños poscosecha, por lo que aún resulta importante investigar el uso de biomateriales que sean efectivos para el control de *Colletotrichum* (Solano-Doblado, 2014). Coronado-Partida *et al.* (2017) evaluaron el impacto del quitosano en el manejo *in vitro* de la especie *Colletotrichum* aislada del fruto de mango (*M. indica* L.) cv. Tommy Atkins. Donde, utilizaron concentraciones de quitosano (bajo y medio peso molecular) de 0.1, 0.5, 1.0, 1.5 y 2 % para las pruebas *in vitro*. Evaluaron el crecimiento radial micelial, el porcentaje de germinación y la esporulación final para cada tratamiento. Obteniendo como resultado que la mejor concentración de quitosano es la de 1.5 y 2 % confiriéndole un efecto antifúngico.

En los últimos años se han desarrollado nuevas opciones para el control de microorganismos fitopatógenos en antes y después de la cosecha, principalmente hongos, ya que el uso de fungicidas químicos es perjudicial para el consumidor y el

medio ambiente. Una posibilidad es el uso del quitosano, que tiene propiedades antifúngicas.

### 1.2.3. Quitosano

El procesado de mariscos principalmente camarón y cangrejo, genera desechos aproximadamente del 80% del peso vivo de los mariscos, son residuos como cabezas, conchas, patas, etc. que provocan contaminación (Gildberg and Stenberg, 2001). Los residuos del procesamiento de mariscos contienen un 14-35% de quitina (Pastrana, 2010). La quitina se obtiene principalmente de exoesqueletos de crustáceos procesados (camarón, cangrejos y langostas). El creciente uso de quitina, así como sus derivados (quitosano), se debe a que, a diferencia de los productos procesados a partir del petróleo, la quitina se produce de los derivados de la industria pesquera, es obtenida de una fuente natural renovable, no tóxica ni alérgica; además, antimicrobiana y biodegradable (Pillai *et al.*, 2009).

La quitina es un biopolímero lineal, es el componente orgánico más copioso en la naturaleza después de la celulosa. Una característica que distingue a la quitina es su insolubilidad en agua; sin embargo, su estructura porosa favorece a una elevada absorción de agua y presenta poca radioactividad. Es altamente soluble en ácidos concentrados, soluciones de cloruro de litio al 5% y algunos fluoroalcoholes; algunas de estas propiedades limitan sus aplicaciones (Ramírez *et al.*, 2010). La reacción por la cual se obtiene el quitosano se conoce como N-Deacetilación. En la cual, se genera una reacción de la quitina con un medio básico. La molécula obtenida es producto de la deacetilación de los grupos aminos de la quitina, aproximadamente el 60%, por tanto, aumentan los grupos amino ( $-NH_2$ ). Este compuesto químico es conocido como poli  $[\beta\text{-}2\text{-amino-}2\text{-desoxi-D-glucopiranos}]$  y contiene aproximadamente del 6-9% de nitrógeno, diferentes PM, características fisicoquímicas y purezas (Mati-Baouche *et al.*, 2014).

La desacetilación de la quitina produce quitosano, un aminopolisacárido natural con mejores características de solubilidad y reactividad. La modificación termo alcalina de la quitina conocida como N-desacetilación, en la cual, se obtiene quitosano (Figura 1-3); al sustituir los grupos acetamida de la quitina por grupos -

NH<sub>2</sub> se obtiene quitosano, al realizar tratamientos a la quitina con álcalis fuertes (Romero Serrano and Pereira, 2020).

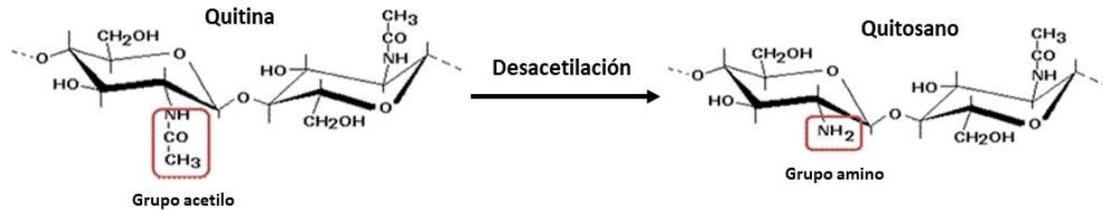


Figura 1-3. Representación de la N-desacetilación de la quitina y su producto el quitosano

El quitosano es un heteropolisacárido lineal formado por 2-amino-2-desoxi- $\beta$ -D-glucopiranososa (unidades D) y 2-acetamida-2-desoxi- $\beta$ -D-glucopiranososa (unidades A) unidos por enlaces glicosídicos ( $\beta$  1 $\rightarrow$ 4) (Figura 1-4) (Lárez-Velásquez, 2003). Las unidades D están en mayor proporción que las unidades A. El grado de acetilación (GA) es la relación molar entre las unidades A frente al total (A+D). las características biológicas y fisicoquímicas del quitosano están determinadas por el grado de acetilación. El quitosano es un copolímero catiónico que se caracteriza por su cantidad de grupos -NH<sub>2</sub> (Prashanth and Tharanathan, 2007).

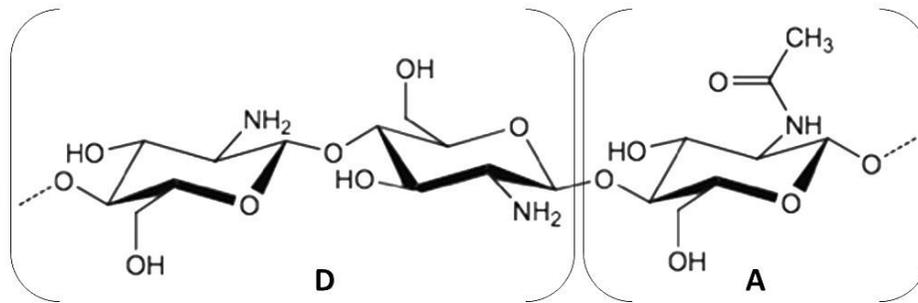


Figura 1-4. Representación de una cadena de quitosano que contiene residuos de monosacáridos 2-amino-2-desoxi- $\beta$ -D-glucopiranosos (unidades D) y 2-acetamido-2-desoxi- $\beta$ -D-glucopiranosos (unidades A) unidos por enlaces  $\beta(1\rightarrow4)$

Durante la N-desacetilación de la quitina, se eliminan aproximadamente un 50% de sus grupos acetilos, teniendo como producto al quitosano. Cuando se alcanza el 100% en el grado de desacetilación, el polímero se clasifica como quitano. La diferencia entre el quitosano y el quitano es la solubilidad en el medio acuoso (Lárez-Velásquez, 2006). La estructura química de la quitina y del quitosano es similares a la estructura química de la celulosa, lo que permite que tengan propiedades similares a la celulosa. (Figura 1-5). El enlace  $\beta(1\rightarrow4)$  provoca la estructura rígida y sin ramificaciones de estas moléculas.

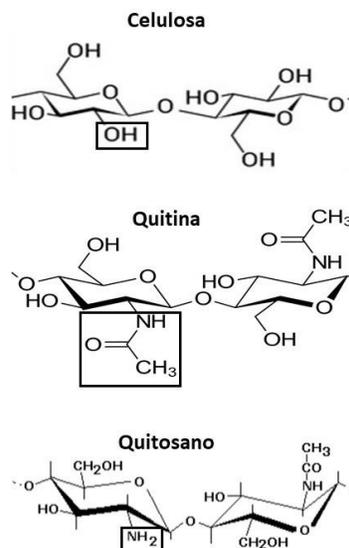


Figura 1-5. Estructura química de la celulosa, quitina y quitosano

### 1.2.3.1. Propiedades fisicoquímicas del quitosano

Las propiedades fisicoquímicas del quitosano lo hacen una de las macromoléculas naturales con más interés en el mundo. Su configuración molecular permite diferentes cambios en su estructura, tanto mecánicas como químicas, a partir de estos cambios, se pueden obtener características que revelan un potencial para nuevas aplicaciones, especialmente en el campo de los biomateriales. El quitosano tiene una pKa de 6.5 y es considerado un polielectrolito catiónico. Las propiedades del quitosano son atribuidas a los grupos amino con carga positiva que posee. Los grupos amino e hidroxilo en la estructura química del quitosano facilita la modificación química de esta molécula (Yadav *et al.*, 2019).

Las propiedades fisicoquímicas le confieren el comportamiento al quitosano, y puede diferir de acuerdo al método y la fuente de extracción, así como, condiciones y el método de desacetilación (Romero Serrano and Pereira, 2020). Las características fisicoquímicas más importantes de este copolímero catiónico son el grado de desacetilación, peso molecular, solubilidad y viscosidad, estas propiedades están relacionadas entre sí.

#### 1.2.3.1.1. Grado de desacetilación

El grado de desacetilación (DA) se define como la proporción de grupos  $-NH_2$  libres en una molécula de quitosano, es decir, la proporción que existe entre las unidades de glucosamina y las unidades N-acetil glucosamina presentes en esta molécula, esta característica influye directamente sobre las propiedades fisicoquímicas del quitosano como la solubilidad, viscosidad, porosidad, conductividad, entre otras, así como en las propiedades biológicas como su bioactividad, biocompatibilidad, biodegradabilidad, etc., e influye en las distintas aplicaciones del polímero (Yadav *et al.*, 2019). El quitosano es la quitina que ha sido desacetilada en un 60-75% o más, lo cual, le confiere la solubilidad en ácidos orgánicos, esta solubilidad es la diferencia entre la quitina y el quitosano. La reactividad química de los grupos amino en la molécula del quitosano le confiere cierta versatilidad. Por lo tanto, es importante determinar el DA del quitosano antes

de su uso en cualquier aplicación. El método más utilizado para determinar el DA es la espectroscopia de infrarrojo transformada de Fourier (Barragán *et al.*, 2016), debido a que es un método rápido, flexible y no se necesita la disolución de la muestra en un solvente acuoso. Existen otros métodos para determinar el DA del quitosano como es la espectrofotometría UV – primera derivada, la titulación potenciométrica, la titulación conductimétrica, la resonancia magnética nuclear <sup>1</sup>H RMN y <sup>13</sup>C RMN y la calorimetría diferencial de barrido (DSC) (Romero Serrano and Pereira, 2020, Lotmar and Picken, 1950, Kurita, 2006, Ehrlich *et al.*, 2007, Barragán *et al.*, 2016).

#### 1.2.3.1.2. Peso molecular

En los polímeros, al cambiar el peso molecular repercute directamente en la viscosidad y solubilidad del polímero. Por ende, estas propiedades dependen directamente del peso molecular (Ehrlich *et al.*, 2007), en el caso del quitosano se extiende hasta sus propiedades biológicas. Por lo tanto, determinar su PM es de gran interés (Yamakawa, 1971). Si se conoce el PM y la conformación de las moléculas del copolímero, se puede estimar propiedades reológicas y mecánicas. Existen diferentes métodos para determinar el PM en el quitosano, entre ellos se puede mencionar la viscosimetría, dispersión de luz, la cromatografía de permeabilidad en gel, etc. (Kasaai, 2007, Romero Serrano and Pereira, 2020). El procedimiento más usado para determinar el PM de este biopolímero es el método indirecto de viscosimetría, porque es más rápido y sencillo y no es costoso en comparación con otros métodos. El principio del método de la viscosimetría está basado en determinar la viscosidad intrínseca del polímero (Wang *et al.*, 1991).

#### 1.2.3.1.3. Solubilidad

El quitosano resulta soluble en soluciones de ácidos orgánicos y minerales en condiciones determinadas. El quitosano es soluble en medio ácido a pH < 6 (Yadav *et al.*, 2019). Sin embargo, es insoluble en agua pura y solventes orgánicos. Se han realizado infinidad de investigaciones científicas por mejorar la solubilidad del quitosano en solventes orgánicos convencionales (Dutta *et al.*, 2002,

Desbrieres, 2004). La solubilidad del quitosano se la confiere los grupos aminos libres en toda la cadena del polisacárido, formando la sal de quitosano en solución. Por lo tanto, la funcionalidad del quitosano en una solución depende de las cargas positivas del grupo amino presentes a lo largo de la cadena del polisacárido. A pesar de, la solubilidad del quitosano no solo es atribuida al grado de desacetilación, sino también de la distribución de los grupos amino en conjunto con el peso molecular, clase de solvente, pH, la pKa, la temperatura y la fuerza de ionización del ácido, así como la concentración de iones (Rinaudo, 2006). El quitosano de bajo peso molecular tiene una mayor solubilidad en agua y son requeridos para la biomedicina y la agricultura por la actividad antimicrobiana que presenta (Jung and Zhao, 2011). El quitosano es insoluble en ácido sulfúrico y fosfórico, pero soluble en ácido clorhídrico, nítrico y cítrico. El ácido fórmico es el mejor solvente para solubilizar el quitosano, el ácido más empleado es el ácido acético (De la Paz et al., 2013).

#### 1.2.3.1.4. Viscosidad

El quitosano forma soluciones viscosas con diferentes tipos de ácidos orgánicos. La viscosidad de estas disoluciones depende de ciertos factores como el peso molecular, el grado de desacetilación, pH, concentración, temperatura, fuerza iónica y el ácido utilizado. La viscosidad está directamente relacionada con el peso molecular. Por lo tanto, calcular la viscosidad permite una aproximación al PM del quitosano (Romero Serrano and Pereira, 2020). La viscosidad intrínseca  $[\eta]$  es la capacidad que tienen las macromoléculas para incrementar la viscosidad de una solución sin presencia de interacciones intramoleculares, tiene una relación con el PM por medio de la ecuación Mark-Houwink-Sakurada (Kasaai, 2007), permite obtener el valor de la viscosidad intrínseca, así como el peso molecular del quitosano (Kasaai, 2007, Rinaudo, 2006, Yamakawa, 1971). El cálculo de la viscosidad intrínseca se realiza extrapolando a una concentración cero, debido a que esta viscosidad determina el volumen específico de un polímero. La viscosidad intrínseca depende de la magnitud y apariencia de la molécula del polímero (solute), la interacción con el disolvente y la temperatura. La rigidez de los enlaces  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4)

en la estructura del quitosano, le confieren una mayor viscosidad intrínseca a la que presentan otros polisacáridos de peso molecular similar (Hwang and Shin, 2000).

#### 1.2.3.2. Propiedades biológicas del quitosano

El utilizar productos bioactivos es uno de los mayores desafíos de la agricultura. En este sentido, el quitosano representa una alternativa prometedora debido a sus propiedades naturales, importante actividad biológica y facilidad de extracción. Diferentes investigaciones científicas se han realizado con el propósito de demostrar los mecanismos de acción y la eficiencia de este principio bioactivo, principalmente para prácticas agrícolas. El quitosano tiene actividad biológica contra una diversidad de patógenos, esta actividad se presenta de dos formas: al inhibir el crecimiento del patógeno e inducir la resistencia sistemática a infección del patógeno (Rodríguez-Pedroso *et al.*, 2009).

El grado de desacetilación del quitosano influye notablemente sobre sus propiedades fisicoquímicas y propiedades o actividad biológica, siendo este clave en diversas aplicaciones como en la adsorción de iones metálicos, en películas donde es responsable la fuerza de tensión de estas, para su actividad inmunológica, acción enzimática, etc. (Struszczyk, 2002).

##### 1.2.3.2.1. Actividad antifúngica

La actividad antifúngica del quitosano ha sido estudiada y demostrada. Se ha demostrado que inhibe el crecimiento de numerosas especies de hongos al reducir o inhibir completamente el crecimiento radial. El quitosano logra su efecto antifúngico por diferentes vías en las que el grado de polimerización de la molécula del quitosano desempeña un papel importante. La disminución del grado de polimerización de la molécula de quitosano acorta el número de especies de hongos inhibidos. El quitosano suprime la esporulación e impide la reproducción del hongo. Esta propiedad es favorecida por valores bajos de pH. La inhibición del crecimiento es provocada por los grupos amino protonados a pH 5.6 de la molécula del quitosano causando la formación de complejos polielectrolitos con grupos ácidos

y básicos de la membrana citoplasmática creando un caos (Rodríguez-Pedroso *et al.*, 2009). Asimismo, se ha descubierto una conexión entre la actividad antifúngica *in vitro* y el PM del quitosano (Bautista-Baños *et al.*, 2005).

Como se mencionó anteriormente, el quitosano inhibe una diversidad de especies de hongos. Sin embargo, aquellos hongos que poseen en su pared celular quitosano, no se obtiene el mismo efecto antifúngico. Los hongos que poseen quitosano en la pared celular son menos sensibles a la dosis adquirida de quitosano debido a que la existencia del quitosano en la pared celular no produce daño para el microorganismo y las interacciones electrostáticas del quitosano agregado (exógeno), cargado positivamente, no son favorecidas con la pared celular que posee el quitosano que ya se encuentra presente (endógeno), debido a que estas tienen material con carga negativa (Li *et al.*, 2007, Lárez-Velásquez, 2008). Estas observaciones dejan claros los principales requerimientos para una mayor efectividad de la actividad antifúngica del quitosano. Los siguientes requerimientos son importantes para obtener una mayor efectividad fungicida del polímero:

1. La relación entre la inhibición fúngica y la concentración de quitosano agregado es importante. Por lo tanto, para lograr una eficiencia alta, se deben encontrar dosis adecuadas para cada especie de hongo patógeno (Chien and Chou, 2006, Lárez-Velásquez, 2008).
2. La susceptibilidad de los hongos patógenos al quitosano también depende de la fase de crecimiento y las diferentes etapas de su desarrollo. Las investigaciones han demostrado que el quitosano inhib la germinación de las esporas de *Penicillium expansum* más que *Botrytis cinérea*. Sin embargo, sucede lo contrario en el desarrollo micelial de estas especies (Liu *et al.*, 2007). De igual forma, se observó el mismo comportamiento para las especies de *Colletotrichum gloeosporioides* y *Botryosphaeria parva* con la aplicación del agente fluazinam (Everett *et al.*, 2005). Así mismo, los conidios son más sensibles al quitosano que las hifas de algunos hongos fitopatógenos (Palma-Guerrero *et al.*, 2008).

3. La relación directa entre el peso molecular del quitosano y la actividad fungicida, es importante. Investigaciones con *Alternaria alternata* demostraron que el quitosano de medio peso molecular tuvo un mayor efecto inhibitorio en comparación con quitosano de bajo y alto peso molecular (Sánchez-Domínguez *et al.*, 2011). Otras investigaciones reportan que se obtuvo una inhibición significativa con quitosano de bajo peso molecular en esta misma especie (López-Mora *et al.*, 2013). En el hongo *Mycosphaerella Fijiensis Morelet* que genera la *Sigatoka negra* que infecta al plátano, se ha observado que el quitosano de bajo PM y alto grado de desacetilación tiene un efecto inhibitorio significativo sobre la germinación de las esporas, lo cual concuerda con investigaciones de diversos autores (Ayala *et al.*, 2014).

La actividad antifúngica del quitosano está relacionada con sus propiedades catiónicas. La interacción que existe entre los NH<sub>2</sub> libres del quitosano, cargados positivamente en medio ácido y los componentes fosfolípidos con carga negativa de la pared celular, alteran la permeabilidad de la membrana plasmática, provocando alteraciones en sus funciones. Por ejemplo, retracción y alteración de la membrana plasmática, así como el espesamiento de la pared celular. También, forma quelatos con metales de transmisión e inhibir algunas enzimas (Ayala *et al.*, 2014, Benavides-López, 2019, Sánchez-Domínguez *et al.*, 2007).

#### 1.2.3.2.2. Actividad antibacterial

La actividad antibacterial o biocida del quitosano es atribuida a la protonación del grupo amino presentes en las unidades de glucosamina en pH<5.5 (medio ácido), esta característica lo hace soluble en medio acuoso (Devlieghere *et al.*, 2004). Existen mecanismos de acción por el cual el quitosano ejerce dicha actividad antimicrobiana:

1. La interacción electrostática que existe entre los grupos NH<sub>2</sub> del quitosano, cargados positivamente, y los lipopolisacáridos cargados negativamente de la membrana externa de las bacterias Gram negativas, desestabilizándola, alterando su permeabilidad, tanto en la pared celular como en la membrana

exterior. El complejo polielectrolito cierra la membrana citoplasmática, obstruyendo el flujo de nutrientes y desechos, provocando la muerte de la bacteria (Ganan *et al.*, 2009, Kong *et al.*, 2010).

2. La interacción de los grupos  $\text{NH}_3^+$  de los policationes con los grupos  $\text{P}^+\text{O}_3^{2-}$  (grupos fosforilo) de los fosfolípidos de la membrana plasmática de las bacterias Gram-negativas provoca daño en estas bacterias, principalmente la pérdida de sustancias intracelulares y el desequilibrio osmótico desestabilizando la célula. La expulsión del material intracelular se ve favorecida por el quitosano por el grado de acetilación más altos, tanto en bacterias Gram negativas como en Gram positivas (Raafat *et al.*, 2008, Verlee *et al.*, 2017).
3. El quitosano puede penetrar la membrana celular de las bacterias Gram positivas y lograr entrar hasta el interior de la célula interaccionar con el ADN e inhibir la replicación del ARNm y la síntesis de proteínas (Li *et al.*, 2007). Sin embargo, el tamaño de la molécula del quitosano cargado positivamente puede ser demasiado grande para penetrar la célula (Chung *et al.*, 2003).

Con estos mecanismos podemos deducir que la actividad antibacteriana del quitosano depende de los factores que ayudan a resaltar las cargas positivas en la cadena del polímero. Podemos destacar factores como el DA, distribución de los grupos aminos a lo largo de la cadena, tamaño o longitud de la cadena, el peso molecular, el pH, la fuerza iónica del medio y la temperatura (Lárez-Velásquez, 2008).

#### 1.2.3.2.3. Actividad antiviral

El grado de polimerización, el grado de desacetilación, las cargas positivas y el carácter de la modificación química de la molécula del quitosano le confieren el efecto antiviral a esta molécula. Los mecanismos de supresión por el cual el quitosano ejerce la actividad antiviral aún son discutidos (Wiśniewska-Wrona *et al.*, 2007). La inactivación de la partícula del fago y la inhibición de reproducción del bacteriófago a nivel celular son los principales factores de supresión de infecciones

del fago por quitosano. La habilidad del quitosano para inducir resistencia a las enfermedades virales en plantas y para prevenir la reproducción del bacteriófago en cultivos infectados por microorganismos le confieren la actividad antiviral (Chirkov, 2002). La capacidad del quitosano para suprimir las infecciones virales en las plantas no depende del tipo de virus. El quitosano afecta a las plantas al inducir su propia resistencia a las infecciones virales. El quitosano imita el contacto entre plantas y fitopatógenos, induce una amplia gama de respuestas de defensa en las plantas, limita la propagación sistémica de virus en las plantas y conduce al desarrollo de resistencia sistémica adquirida (Rabea *et al.*, 2003).

#### 1.2.3.2.4. Efectos del quitosano sobre la fisiología de las plantas.

En las últimas décadas se ha estudiado la capacidad que tiene el quitosano para inducir respuestas de defensa en las plantas. Cuando el quitosano entra en contacto con las plantas ocurren cambios fisiológicos y bioquímicos dentro de la planta inducidos por el quitosano. Cuando la planta desarrolla un mecanismo de resistencia al ser atacada por un patógeno, ocurre la muerte celular o una respuesta en el sitio de infección y por consiguiente una serie de respuestas de defensa en la célula dañada. Generando especies reactivas de oxígeno, cambios en la pared celular, principalmente cambios estructurales, acumulación de proteínas directamente relacionadas con la defensa y la biosíntesis de fitoalexinas (Rodríguez-Pedroso *et al.*, 2009).

#### 1.2.3.3. Aplicaciones del quitosano

La pureza del quitosano, se relaciona directamente con el contenido de ceniza. Así mismo, la ausencia de bacteria está relacionado con las unidades que están repetidas en un polímero (grado de polimerización), la presencia de metales pesados, humedad, el orden estructural de la molécula y la variación. Estas son propiedades importantes para determinar las interacciones con sistemas biológicos. Estas características deben ser reportadas, principalmente si el quitosano está destinado al consumo humano, biofarmacéutica, biomédicas y agrícolas. En el caso

de las aplicaciones industriales, el reporte de estas características, depende de la petición del consumidor directo (Aranaz *et al.*, 2009).

A continuación, se describen las aplicaciones científicas e industriales del quitosano, las cuales describen su versatilidad. Las aplicaciones que se describen son solo algunas de la amplia gama posible, mostrando la utilidad que tiene en el desarrollo de áreas vitales como es la agricultura, alimentos y bebidas, tratamiento de aguas residuales, en la industria papelera y adhesivos, en el área cosmética, oftalmología, medicina y biosensores.

#### 1.2.3.3.1. Aplicaciones científicas

##### 1.2.3.3.1.1. Agricultura

Existe una diversidad de aplicaciones en el área de la agricultura, se han desarrollado recubrimientos de semillas, frutos, hojas y vegetales frescos con películas de quitosano, con la finalidad de ampliar la conservación durante su almacenamiento También se ha utilizado como agente bactericida y fungicida al inicio de las plantaciones para la protección de plántulas (Lárez-Velásquez, 2006). Así mismo, se ha utilizado en sistemas liberadores de fertilizante. Se ha utilizado para retener sustancias nutritivas en el suelo, mejorar la calidad y productividad de los cultivos y en alimentos para animales (Philibert *et al.*, 2017).

##### 1.2.3.3.1.2. Industria alimentaria

Las aplicaciones del quitosano en la industria alimentaria principalmente son para la preservación natural de los alimentos, producción de películas protectoras para envases de alimentos y clarificación y des acidificación de frutas y bebidas. Así como, agentes espesantes y estabilizadores de alimentos y bebidas. El quitosano también es utilizado como ingrediente nutricional, agente antioxidante y extensor de vida útil de alimentos (De la Caba *et al.*, 2019). En los últimos años sean realizado investigaciones en donde se utiliza el quitosano para la fabricación de películas y recubrimientos comestibles. Se ha demostrado que las películas y recubrimientos comestibles a base de quitosano tienen buenas propiedades mecánicas y de

barrera extendiendo la vida útil y mejorando la calidad nutricional de los alimentos poco procesados (Cardona and Fernández, 2020).

#### 1.2.3.3.1.3. Industria papelera y adhesivos

El quitosano se utiliza en la adsorción de partículas metálicas cargadas negativamente, recubrimientos de barrera en el papel y cartón. Se utiliza como agregado en la fabricación de papel, adhesivo para papel y cartón, y se utiliza como agente deodorizante para quitar o reducir olores (Boeriu and van den Broek, 2019). El papel de quitosano se considera demasiado resistente y es parecido al papel de celulosa, esta característica se debe a que las moléculas de ambos polímeros solo se diferencian en dos grupos funcionales (Huertaa *et al.*, 2012).

#### 1.2.3.3.1.4. Tratamiento de aguas

El quitosano se considera una sustancia amigable con el medio ambiente, por este motivo, el tratamiento de aguas es el área de aplicación más importante del quitosano, ya que se considera un material respetuoso con el medio ambiente. Principalmente, es utilizado como aglutinante para aguas residuales con demasiadas partículas en suspensión y alta capacidad para neutralizar algunos ácidos (Caldera *et al.*, 2009, Díaz *et al.*, 2015). Así mismo, como floculante para la eliminar partículas coloidales y aceite de pez. En soluciones acuosas el quitosano tiene la capacidad de capturar metales pesados y pesticidas. Algunos derivados del quitosano tienen la capacidad de eliminar metales pesados como los derivados del ácido alqueno dioico (Gutierrez, 2022). En el tratamiento de aguas de la industria textil, el quitosano tiene la capacidad de adsorben algunas tintas, remover mercurio en solución y es selectivo a la hora de eliminar materiales con densidad alta como los metales pesados por adsorción (Diaz Ponceca *et al.*, 2018).

### 1.2.3.3.2. Aplicaciones industriales

#### 1.2.3.3.2.1. Medicina

En la actualidad, entre las aplicaciones en la medicina del quitosano podemos mencionar la producción de materiales de curación y cremas para quemaduras. El quitosano también es utilizado en la terapia contra el cáncer, transporte de material genético y medicamento a través de la membrana. También es utilizado en la elaboración de microcápsulas y microesferas. El quitosano se puede utilizar como excipiente en la formulación de medicamentos, en la preparación de nanobio-dispositivos como nanocápsulas de carbono, grafito, tungsteno, etc. (Jayakumar *et al.*, 2010, Alves and Mano, 2008). En el área de la medicina, el quitosano tiene una amplia gama de aplicaciones como se mencionó anteriormente. Además, el quitosano es utilizado en la fabricación de lentes de contacto y bandas oculares (Andueza and Hochhaus, 2013). También, se utiliza en la odontología en la fabricación de nanomateriales de uso dental, perno metálico dental, pasta de dientes, etc. (Armijos Briones *et al.*, 2022).

#### 1.2.3.3.2.2. Cosmética

En el área cosmética existe una amplia gama de aplicaciones de este biopolímero. Por ejemplo, la fabricación de cápsulas para adelgazar, conocidas comúnmente como “atrapa-grasa”, es la aplicación que más aprovecha al quitosano (Ramos-Cruz, 2015). En la elaboración de jabones, shampoos, cremas de afeitar, crema para la piel, pasta de dientes, entre otros, se utiliza el quitosano como aditivo bactericida. También es utilizado como agente hidratante para la piel, el cual suministra agua y evita la resequeidad (Lárez-Velásquez, 2006).

#### 1.2.3.3.2.3. Biosensores

En este campo existe una diversidad de aplicaciones del quitosano, principalmente como soporte para inmovilizar enzimas sensibles a sustratos específicos. El quitosano se puede utilizar como sensor para determinar glucosa en sangre, basándose en inmovilizar la enzima glucosa oxidasa sobre el quitosano,

utilizando como adición el Azul de Prusia. Así mismo, se utiliza como sensor para la detección de fenoles en el tratamiento de aguas de la industria, basándose en inmovilizar la enzima tirosina. El quitosano se puede utilizar como sensor en la inmovilización de nanopartículas especialmente ordenadas (Zhu *et al.*, 2002, Wu *et al.*, 2005).

## CAPÍTULO 2 SUSCEPTIBILIDAD DE *COLLETOTRICHUM SPP.* A QUITOSANO DE BAJO PESO MOLECULAR

Griselda Valenzuela Ortiz<sup>1</sup>, Soila Gaxiola Camacho<sup>1</sup>, Miguel Ángel Martínez Téllez<sup>2</sup>, Eber Addi Quintana Obregón<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Universidad Autónoma de Sinaloa/Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, <sup>2</sup>Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C.,

**Publicado:** Libro Trabajos Científicos en México, Tomo II

[griseval1993@gmail.com](mailto:griseval1993@gmail.com)

### RESUMEN

El género *Colletotrichum* es el causante de un grupo de enfermedades conocidas como antracnosis, las cuales pueden manifestarse tanto en la planta como en los frutos. El fruto sufre daños desde su formación y desarrollo (pre cosecha) y hasta la poscosecha por este fitopatógeno. La principal forma de reducir las pérdidas en pre y poscosecha causadas por este fitopatógeno es el uso de fungicidas. Sin embargo, los productores usan indiscriminadamente los fungicidas teniendo como consecuencias contaminación ambiental, altos costos, abandono total del cultivo, la resistencia de microorganismos patógenos, riesgos a la salud ocasionados por residuos tóxicos, etc. Por ello, existe la necesidad del control de este tipo de fitopatógeno con alternativas amigables con el medio ambiente, entre ellas el quitosano. El quitosano es un aminopolisacárido de origen natural, no tóxico y biodegradable. El cual, posee propiedades biológicas importantes, entre ellas su actividad como fungicida. El objetivo de esta investigación fue evaluar la susceptibilidad de especies de *Colletotrichum* a quitosano de bajo peso molecular. Las cepas utilizadas en esta investigación son *C. siamense* aislado del cultivar Tommy Atkins en Tepic, Nayarit (334), *C. siamense* aislado del cultivar Tommy Atkins en Nueva Italia, Michoacán (Dowling *et al.*, 2020) y *C. asianum* aislado del cultivar Manila en Tierra Blanca Veracruz (310). La susceptibilidad del quitosano sobre el crecimiento radial del hongo se evaluó en

medio PDA y quitosano al 1%, como controles se utilizaron PDA y ácido láctico, se determinó la biomasa en el último día de crecimiento radial de cada especie. El análisis de resultados se llevó a cabo mediante un Análisis de Varianza (ANDEVA) y la prueba de Tukey con el software JMP versión 2005; las cepas mostraron inhibición al quitosano al 1%. La cepa 334 y 310 mostraron diferencias mínimas significativas entre el PDA ( $0.034 \pm 0.002$  y  $0.01 \pm 0.00$ ) y quitosano al 1% ( $0.008 \pm 0.000$  y  $0.008 \pm 0.000$ ) en biomasa ( $\text{mg}/\text{mm}^2$ ), en el tiempo (h) 120 y 216, respectivamente, mientras la cepa 316 no mostró diferencias mínimas significativas entre el ácido láctico ( $0.01 \pm 0.00$ ) y el quitosano al 1% ( $0.020200 \pm 0.004529$ ), pero sí mostró diferencias mínimas significativas con respecto al PDA ( $0.044 \pm 0.004$ ) en biomasa ( $\text{mg}/\text{mm}^2$ ), en el tiempo (h) 168. En base a los resultados obtenidos mediante el análisis estadístico se concluyó que el quitosano inhibe el crecimiento de *Colletotrichum* spp. por lo tanto, existen cepas susceptibles al quitosano, el cual puede ser considerado para evaluarse como una alternativa amigable con el medio ambiente en el control de antracnosis.

### 1.3. INTRODUCCIÓN

*Colletotrichum* es un fitopatógeno que comprende más de 100 especies responsables de causar antracnosis en regiones tropicales y subtropicales (Bautista-Baños *et al.*, 2003). Actualmente existen diferentes alternativas para el control de *Colletotrichum* spp. entre las más comunes encontramos los plaguicidas, los cuales, causan resistencia en los hongos patógenos, por este motivo existen diferentes métodos para el control de este tipo de fitopatógenos en pre y poscosecha. Entre los métodos de control se encuentra ozono, luz ultravioleta (Cia *et al.*, 2009), tratamientos hidrotérmicos, atmósferas modificadas, aire caliente (Ragazzo *et al.*, 2015, Karabulut and Baykal, 2004, Gutiérrez-Alonso *et al.*, 2004), agentes de control biológico (Vos *et al.*, 2014) y extractos de plantas (Bautista-Baños *et al.*, 2003). En los últimos años, se ha extendido el uso y aceptación de productos naturales para reemplazar materiales que se generan artificial o sintéticamente. Por este motivo ha surgido el interés en la investigación por utilizar polisacáridos, extractos de plantas, aceites esenciales, etc. Como respuesta, una

alternativa a la aplicación de productos químicos sintéticos para el control de microorganismos que perjudican al sector agrícola es la aplicación de biorracionales. Los biorracionales son definidos como productos o sustancias generados por plantas, minerales o microorganismos, que son biodegradables y pueden ser específicos para el control del microorganismo de interés (O’Farrill-Nieves, 2024). Respecto al uso de polisacáridos con propiedades antifúngico, Bautista-Baños *et al.* (2003) encontraron que los extractos de semilla de papaya, solo y mezclado con quitosano para el control de *Colletotrichum* en papaya en poscosecha, el quitosano inhibió el crecimiento micelial a concentraciones entre 2.5 y 3%. Demostrando que a una concentración de 1.5% de quitosano, la severidad fue de 1%. Lo cual demuestra que el quitosano tiene propiedades antifúngicas en contra de fitopatógenos que pertenecen al reino fúngico, esta actividad antifúngica es atribuida a las cargas policatiónicas del quitosano las cuales interactúan con las cargas negativas que poseen las paredes celulares de los hongos inhibiendo o desactivando la germinación de esporas (Everett *et al.*, 2005). La necesidad de controlar las enfermedades pre y poscosecha es lo que ha permitido desarrollar nuevas investigaciones que contribuyan al éxito de la agricultura sustentable. El desarrollo de nuevas alternativas tiene como objetivo disminuir la aplicación de productos químicos para el control de fitopatógenos. Además, tiene como finalidad de desarrollar un sistema de producción, que beneficie al productor y obtener productos de calidad para el consumidor, sin impactar de forma perjudicial al medio ambiente (Landeró-Valenzuela *et al.*, 2016b). El objetivo de esta investigación fue “evaluar la susceptibilidad de especies de *Colletotrichum* a quitosano de bajo peso molecular”.

### 1.3.1. Teoría

#### 1.3.1.1. *Colletotrichum*

*Colletotrichum* es un género de hongos patógenos que ocasiona enfermedades como antracnosis en diferentes hospedantes; se manifiesta en lesiones semicirculares con hundimientos en forma de anillos concéntricos (Hyde *et al.*, 2009). A nivel mundial se reporta la antracnosis en frutas, hortalizas, cereales,

plantas herbáceas, maderables y ornamentales, entre otras; sobre todo en zonas templadas y tropicales (Udayanga *et al.*, 2013). *Colletotrichum* incluye más de 100 especies responsables de antracnosis en casi todos los cultivos, como por ejemplo *C. gloeosporioides*, *C. truncatum*, *C. graminicola*, *C. boninense*, entre otras (Crouch *et al.*, 2014). Debido a su importancia científica y económica, las especies de *Colletotrichum* ocuparon el octavo lugar en la clasificación mundial de patógenos de plantas (Damm *et al.*, 2012).

La antracnosis genera pérdidas importantes en pre y poscosecha ya que ocasionan una reducción en la calidad y cantidad de diversos cultivos. Las pérdidas pueden llegar hasta el 100 % dependiendo del patógeno y las condiciones climáticas (Landeró-Valenzuela *et al.*, 2017); por ejemplo, en el cultivo intensivo de papaya bajo manejo de fungicidas, la prevalencia de antracnosis en campo y en poscosecha ha provocado pérdidas superiores al 50 % (Rojo-Báez *et al.*, 2017).

#### 1.3.1.2. Quitosano

El quitosano es un amino-polisacárido natural, producto de la N-desacetilación termo alcalina de la quitina aislada principalmente de desechos de crustáceos. El quitosano define a una familia de heteropolisacáridos lineales que están formados por 2-amino-2-desoxi- $\beta$ -D-glucopiranosas (unidades D) y 2-acetamida-2-desoxi- $\beta$ -D-glucopiranosas (unidades A) unidos por enlaces  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4). Las unidades A están en menor proporción que las del tipo D. la relación molar que existe entre las unidades A frente al total (A+B), se le conoce como el grado de acetilación (GA), o como una fracción (FA) (Hernández-Lauzardo *et al.*, 2005). El GA determina las propiedades fisicoquímicas y biológicas del quitosano. Este copolímero catiónico se caracteriza por su elevado número de grupos aminos (Bautista-Baños *et al.*, 2004).

El quitosano es polielectrolito catiónico con una pKa de 6.5, debido a que este polisacárido tiene en su estructura grupos amino con carga positiva, esto le confiere propiedades particulares. La modificación química del quitosano es facilitada a la presencia de grupos amino e hidroxilo en la estructura de la molécula. La

funcionalidad del quitosano depende de sus propiedades fisicoquímicas, y varían dependiendo de la fuente y el método de obtención de la quitina, del método y las condiciones de desacetilación, etc. (Bautista-Baños *et al.*, 2005). Las propiedades fisicoquímicas del quitosano son el grado de desacetilación, viscosidad, peso molecular y solubilidad, estas propiedades fisicoquímicas están estrechamente relacionadas entre ellas (Bautista-Baños *et al.*, 2017).

## 1.4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 1.4.1. Cepas

Las cepas utilizadas en esta investigación (Cuadro 2-1) fueron proporcionadas por el Dr. J. M. Tovar Pedraza del Laboratorio de Fitopatología, Coordinación Culiacán, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, Culiacán, 80110 Sinaloa, México. Para la reactivación de los aislados, se preparó una siembra por picadura en el centro de la placa Petri con agar papa dextrosa (PDA) y se incubó durante 10 días a 25°C.

Cuadro 2-1 Información de las cepas de *Colletotrichum*

Clave del aislado	Especie	Origen	Cultivar
310	<i>C. asianum</i>	Tierra Blanca, Veracruz	Manila
316	<i>C. siamense</i>	Nueva Italia, Michoacán	Tommy Atkins
334	<i>C. siamense</i>	Cuajinicuilapa, Guerrero	Tommy Atkins

### 1.4.2. Susceptibilidad

Se preparó una solución de quitosano (Fluka BioChemika, Japón) de bajo peso molecular (Ehrlich *et al.*) en ácido láctico 0,05 M con pH 5,6, con agitación a 25°C hasta disolver completamente y se esterilizaron a 121°C durante 15 minutos. Posteriormente, se prepararon medios de cultivo con agar papa dextrosa (PDA) acidificado con ácido láctico 0,05 M estéril mezclado con quitosano y se obtuvo una solución de 1 g/L de quitosano de bajo PM y control acidificado con ácido láctico

0,05 M (medio PDA sin quitosano) y PDA. Se vaciaron 20 mL de medio de cultivo en caja Petri. Con un asa de argolla se realizó una siembra por picadura en el centro de la placa Petri. Se incubó a 25°C y se midió manualmente dos diámetros de la colonia cada 24 horas por placa. Se calculó velocidad de crecimiento radial ( $\mu\text{h}^{-1}$ ) de la fase log. El ensayo se realizó por triplicado (Plascencia-Jatomea *et al.*, 2003).

#### 1.4.3. Densidad micelial máxima en placa

En vaso de precipitado de vidrio con capacidad de 300 mL, se adicionó 100 mL de agua destilada, la cual se puso en ebullición, posteriormente se adiciono el medio de cultivo con el inculo, el cual fue incubado con anterioridad hasta alcanzar un crecimiento máximo del 85 al 90% de la caja Petri. Se dejó en ebullición por 3 min y se repitió el primer paso tres veces hasta disolver por completo el medio de cultivo, posteriormente se colocó el micelio obtenido en tubos de centrifuga de 50 mL a peso constante previamente pesados. Se centrifugo a 5000 rpm por 5 min, se desechó el sobrenadante, se secó en una estufa a 70°C durante 24 horas posteriormente se registró el peso. Una vez obtenidos estos datos, se estimó la densidad micelial máxima en placa (DMP) ( $\mu\text{g}/\text{mm}^2$ ) para cada uno de los tratamientos utilizando la fórmula:

$$\text{DMP} = ((\text{peso del tubo con el micelio} - \text{peso del tubo sin micelio}) / (\text{Xiao et al.}, 2004))$$

El área se determinó a partir de la última medición que alcanzo la cepa (crecimiento máximo del 85 al 90% de la caja Petri).

#### 1.4.4. Análisis estadístico

Los datos obtenidos se analizaron a través de un Análisis de Varianza (ANDEVA) y la prueba de Tukey en el software JMP versión 2005.

### 1.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Figura 2-1 se puede observar la fase log señalada con líneas punteadas, para poder identificar la fase log se aplicó el  $\text{Ln}(\text{radio (mm)})$ , esta fase se utilizó para

determinar la velocidad de crecimiento radial ( $\mu h^{-1}$ ), tomando los valores que comprenden esta fase logarítmica en un determinado tiempo. También se puede observar que la fase log es diferente para cada cepa (334, 316 y 310) y para cada control (PDA y ácido láctico) de cada cepa.

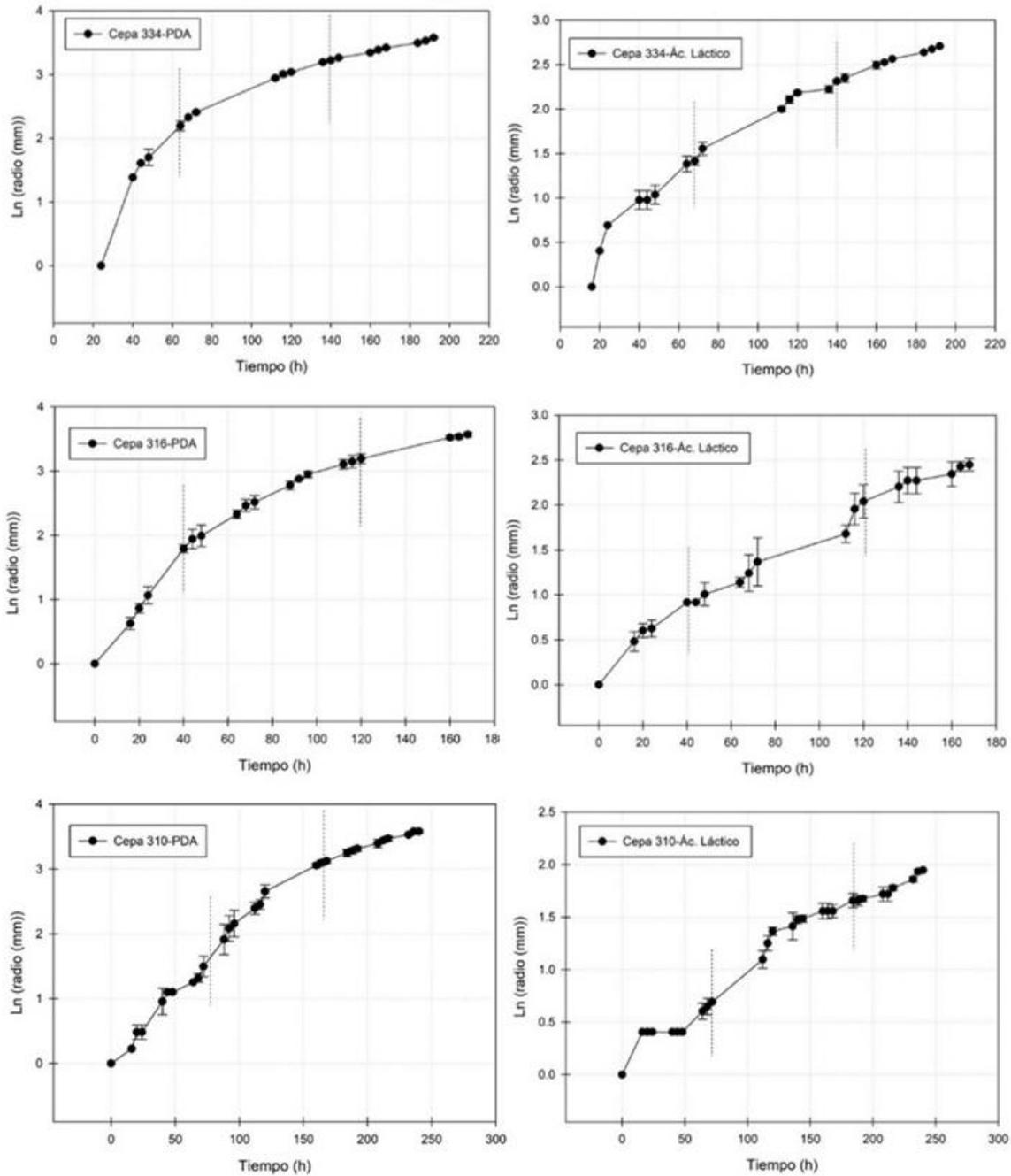


Figura 2-1. Ln (radio (mm)) con respecto al tiempo (h) para controles PDA y ácido láctico para las cepas 334, 316 y 310 indicando la fase log con líneas punteadas

El crecimiento radial (mm) de las cepas 334, 316 y 310 se puede observar en la Figura 2-2. En la Figura 2-2A se muestran los resultados del crecimiento radial de la cepa de *C. siamense* (334) para quitosano (1 g/L) y sus respectivos controles

(PDA y ácido láctico). Se puede observar que el quitosano reduce el crecimiento radial para esta especie (*C. siamense*), comparándolo con el control PDA y ácido láctico. El efecto inhibitorio en el crecimiento radial de la cepa 334 fue mayor en el quitosano que el del ácido láctico, por lo tanto, se puede descartar que el efecto inhibitorio fuese causado por el ácido láctico. Este comportamiento se puede observar en las cepas 310 (Figura 2-2C) (*C. asianum*). La actividad antifúngica del quitosano es atribuida a su carácter policatiónicas que le permite unirse a moléculas cargadas negativamente tales como ácidos nucleicos, proteínas o fosfolípidos, etc. afectando el crecimiento micelial y provocando daño a nivel de la membrana plasmática afectando principalmente la germinación de esporas (Rodríguez-Pedroso *et al.*, 2016, Ragazzo *et al.*, 2015, Pérez-Legaspi *et al.*, 2015). La actividad antifúngica y el mecanismo de acción del quitosano están relacionados con la interacción de sus grupos amino libres que están cargados positivamente en medio ácido, con las macromoléculas expuestas en la pared celular del hongo. Este carácter inhibitorio también se relaciona con la inhibición de algunas síntesis enzimáticas (peroxidasa, quitinasa, poligalacturonasa, etc.), las cuales están presentes en los hongos (Rincón *et al.*, 2006, Varela *et al.*, 2015a). Algunos autores reportan que el quitosano inhibe el crecimiento micelial en diferentes aislados de *Colletotrichum* obtenidas de diferentes fuentes, pero esto dependerá de la concentración del quitosano (Gutiérrez-Martínez *et al.*, 2017) En la Figura 2-2A y 2-2B que muestran el crecimiento radial de las cepas 334 (*C. siamense*) y 316 (*C. siamense*) se puede observar con claridad que el ácido láctico favorece el crecimiento de *C. siamense* con respecto al PDA. Autores reportan el uso de ácido láctico para inhibir la germinación de esporas durante la incubación *C. gloeosporioides* (Ferreira *et al.*, 2009). En la Figura 2-2B se puede observar el comportamiento de la cepa 316 (*C. siamense*), el crecimiento radial para esta cepa tiene el mismo comportamiento tanto para el control PDA, así como para el quitosano (1 g/L), esto indica que la cepa tiene una capacidad de adaptación de crecimiento mayor con respecto a las otras cepas (334 y 310), siendo más resistente al estrés por compuestos como el quitosano. En estudios previos se ha comprobado que algunas especies como *C. fragariae* y *C. acutatum* han mostrado resistencia a

compuestos químicos sintéticos como el benomilo y tiabendazol. Esta resistencia ha sido provocada por el uso continuo de fungicidas para el control de fitopatógenos (Tanaka *et al.*, 2007). Los resultados de la densidad micelial máxima en placa (microgramos/mm<sup>2</sup>) y velocidad de crecimiento radial ( $\mu\text{h}^{-1}$ ) de la fase log se pueden observar en la Cuadro 2-2. Se puede observar que el quitosano inhibió significativamente la velocidad de crecimiento radial para las tres cepas (334, 316 y 310), esta reducción de la velocidad de crecimiento radial en la fase log nos indica que está reduciendo la tasa de crecimiento como un efecto fungistático (inhibe o impide la actividad del hongo). Por lo tanto, no se observa una defensa del microorganismo. se puede observar que existe una reducción significativa de la densidad micelial máxima en placa para la cepa 334 en el quitosano (1 g/L), de manera que, el quitosano está generando un efecto fungistático en donde está inhibiendo el desarrollo radial que correspondería al micelio vegetativo, así como, también inhibe el micelio aéreo que representa la estructura reproductora del hongo, este efecto es más evidente en la cepa 334 comparada con las cepas 316 y 310, en las cuales, no hay diferencia mínimas significativas entre el control PDA-láctico y el quitosano. Sin embargo, si hay un efecto mínimo significativo entre los controles. De forma que, está produciendo más micelio vegetativo con respecto al control PDA-láctico.

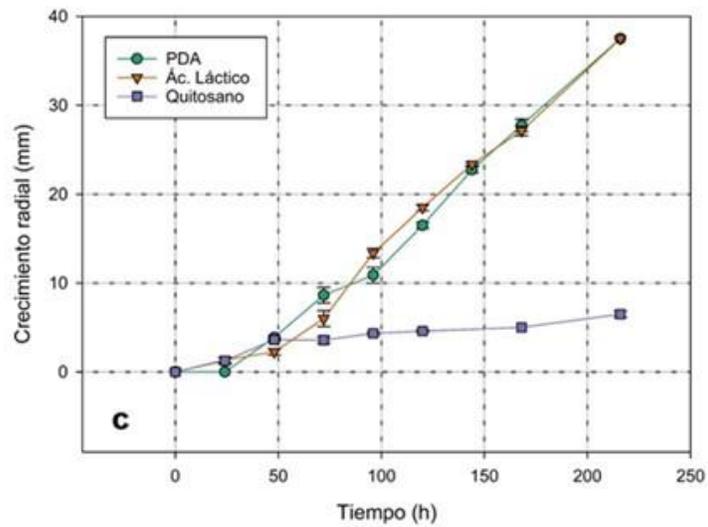
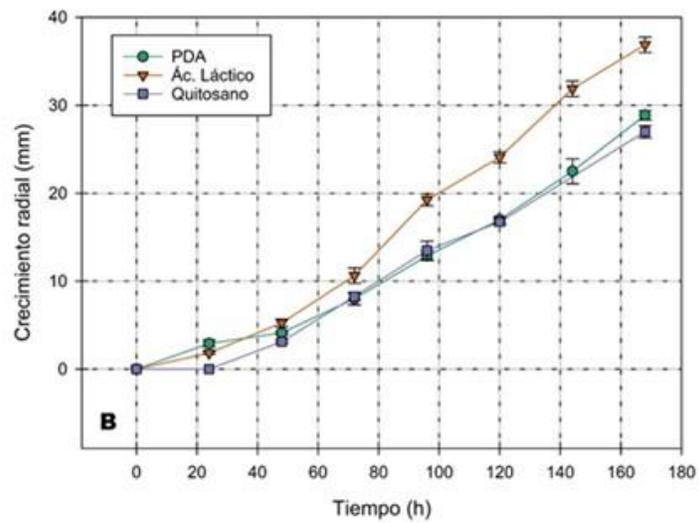
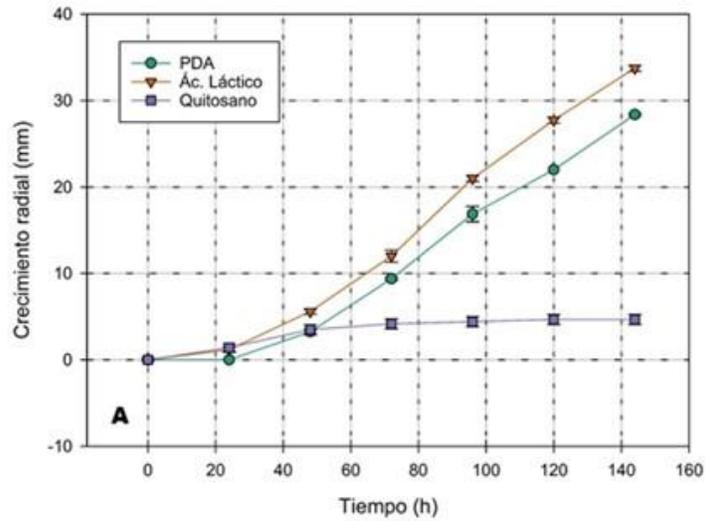


Figura 2-2 Crecimiento radial (mm): cepa 334 (A); cepa 316 (B); cepa 310 (C)

Cuadro 2-2 Densidad micelial máxima en placa y velocidad de crecimiento radial de la fase log de especie de *Colletotrichum*

Cepa/Tiempo* (h)	Tratamiento	Densidad micelial máxima en placa (microgramos/mm <sup>2</sup> )	Velocidad de crecimiento radial ( $\mu\text{h}^{-1}$ ) de la fase log
334/120	PDA	34.98±2.38 <sup>A</sup>	236.13±12 <sup>A</sup>
	PDA-LÁCTICO	25.90±1.88 <sup>B</sup>	255±18 <sup>A</sup>
	QUITOSANO	8.28±0.90 <sup>C</sup>	10.4±0 <sup>B</sup>
316/168	PDA	44.08±4.62 <sup>A</sup>	223±4 <sup>A</sup>
	PDA-LÁCTICO	16.15±0.46 <sup>B</sup>	234±25 <sup>A</sup>
	QUITOSANO	20.20±4.53 <sup>B</sup>	14±0 <sup>B</sup>
310/216	PDA	16.61±0.85 <sup>A</sup>	222±5 <sup>A</sup>
	PDA-LÁCTICO	13.97±3.15 <sup>B</sup>	198±2 <sup>B</sup>
	QUITOSANO	10.22±1.99 <sup>B</sup>	14±1 <sup>C</sup>

Tiempo de cobertura micelial del 90% de la superficie de la placa de Petri. Letras superíndices indican grupos estadísticos por Cepa/Tiempo. Cepa *C. siamense* (334); *C. siamense* (Dowling et al., 2020); *C. asianum* (310). Concentración de quitosano 1g/L

## 1.6. CONCLUSIONES

El quitosano inhibió el crecimiento radial, la velocidad de crecimiento radial y densidad micelial máxima en placa que corresponden o se pueden relacionarse con el micelio vegetativo y aéreo de *C. siamense* y *C. asianum* sin observar una respuesta o defensa del microorganismo, por consiguiente, esta inhibición puede atribuirse al efecto fungistático provocado por el quitosano. De forma que, el quitosano puede ser estudiado para el control de fitopatógeno en el control de antracnosis.

## 1.7. AGRADECIMIENTOS

Se agradece al CONACYT por la beca otorgada al primer autor MC Griselda Valenzuela Ortiz. Este estudio forma parte del proyecto A1-S-34064-"Respuestas transcriptómicas de complejos de *Colletotrichum* expuestos a nanopartículas de quitosano en un modelo in vitro" del Fondo sectorial SEP-CONACYT de investigación 2017-2018.

# CAPÍTULO 3 SENSIBILIDAD AL QUITOSANO DE HONGOS AISLADOS DE MANGO (*MANGIFERA INDICA* L.) CON ANTRACNOSIS

Griselda Valenzuela-Ortiz<sup>1</sup>, Soila Maribel Gaxiola-Camacho<sup>1</sup>, Cesar San-Martín-Hernández<sup>2</sup>, Miguel Ángel Martínez-Téllez<sup>3\*</sup>, Emmanuel Aispuro-Hernández<sup>3</sup>, Jaime Lizardi-Mendoza<sup>4</sup>, Eber Addí Quintana-Obregón<sup>5\*</sup>

<sup>1</sup>Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Sinaloa, Culiacán 80260, México

<sup>2</sup>Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Texcoco 56230, México

<sup>3</sup>Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Coordinación de Tecnología de Alimentos de Origen Vegetal, Hermosillo 83304, México

<sup>4</sup>Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Coordinación de Tecnología de Alimentos de Origen Animal, Hermosillo 83304, México

<sup>5</sup>Programa de Investigadoras e Investigadores por México del CONACYT-Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD), Coordinación de Tecnología de Alimentos de Origen Vegetal, Hermosillo 83304, México

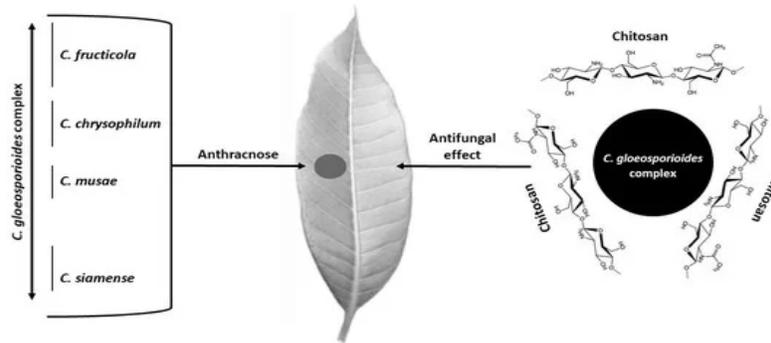
## Abstract

In Mexico, the mango crop is affected by anthracnose caused by *Colletotrichum* species. In the search for environmentally friendly fungicides, chitosan has shown antifungal activity. Therefore, fungal isolates were obtained from plant tissue with anthracnose symptoms from the state of Guerrero in Mexico and identified with the ITS and  $\beta$ -Tub2 genetic markers. Isolates of the *Colletotrichum gloeosporioides* complex were again identified with the markers ITS, Act,  $\beta$ -Tub2, GADPH, CHS-1, CaM, and ApMat. Commercial chitosan (Aldrich, lot # STBF3282V) was characterized, and its antifungal activity was evaluated on the radial growth of the fungal isolates. The isolated anthracnose-causing species were *C. chrysophilum*, *C. fructicola*, *C. siamense*, and *C. musae*. Other fungi found were *Alternaria* sp., *Alternaria tenuissima*, *Fusarium* sp., *Pestalotiopsis* sp., *Curvularia lunata*, *Diaporthe pseudomangiferae*, and *Epicoccum nigrum*. Chitosan showed 78% deacetylation degree and a molecular weight of 32 kDa. Most of the

*Colletotrichum* species and the other identified fungi were susceptible to 1 g L<sup>-1</sup> chitosan. However, two *C. fructicola* isolates were less susceptible to chitosan. Although chitosan has antifungal activity, the interactions between species of the *Colletotrichum gloeosporioides* complex and their effect on chitosan susceptibility should be studied based on genomic changes with molecular evidence.

Keywords: phytopathogen; *Colletotrichum* complex; antifungal; chitosan

Abstrac grafico



### 3.1 INTRODUCCIÓN

Las enfermedades causadas por hongos fitopatógenos durante el almacenamiento previo y posterior a la cosecha generan pérdidas significativas para los agricultores y generan condiciones de inseguridad alimentaria (Herrera-González et al., 2020). Los agricultores han logrado minimizar las pérdidas en la producción de productos hortofrutícolas con el uso de agroquímicos, por ejemplo, fungicidas como azoxistrobina, fludioxonil, captan, merivon, imazalil, propiconazol, fosetil-Al, ortofenilfenol, procloraz, pirimetanil, metiltiofanato, tiabendazol, y fludioxonil, entre otros (García-Mateos et al., 2021, González-Álvarez et al., 2015, Herrera-González et al., 2020, Palou and Montesinos-Herrero, 2015). Sin embargo, algunas de las desventajas del uso de estos productos son la resiliencia que pueden desarrollar los hongos (Shahid et al., 2017), el daño a la salud y al medio ambiente (Gan and Wickings, 2017). Esto resalta la necesidad de controlar las enfermedades en poscosecha y precosecha, causadas por fitopatógenos con compuestos que contribuyan al éxito de la agricultura sostenible y reduzcan el uso de agroquímicos nocivos (Mesa et al., 2019). El desarrollo de alternativas a los fungicidas

tradicionales tiene como objetivo reducir los productos nocivos para el medio ambiente para controlar los hongos fitopatógenos (Landerro-Valenzuela *et al.*, 2017). En este sentido, algunos compuestos de origen natural, como aceites esenciales, extractos metanólicos, extractos de plantas, lipoproteínas y quitosano, han mostrado efectos antifúngicos (Maia *et al.*, 2015, Mesa *et al.*, 2019, Ramírez-Navas *et al.*, 2016).

El quitosano es el derivado directo de la quitina; es un compuesto natural, biodegradable, no tóxico, con efectos fungicidas que inducen mecanismos de defensa en los tejidos vegetales (Rios-Ruiz *et al.*, 2020). Asimismo, el quitosano ha sido evaluado en hongos fitopatógenos demostrando su actividad antifúngica frente a *Fusarium*, *Rhizopus*, *Aspergillus*, *Alternaria* y *Colletotrichum* (Castañeda-Ramírez *et al.*, 2016, Hernández-Téllez *et al.*, 2018, Rodríguez-Romero *et al.*, 2019, Varela *et al.*, 2015b). Los beneficios del quitosano en la agricultura fomentan su uso para el control pre y poscosecha de frutos hortícolas (Bautista-Baños *et al.*, 2017). Sin embargo, la sensibilidad de las diferentes cepas fúngicas al quitosano a menudo varía según las características intrínsecas propias de cada especie, por ejemplo, particularidades en la composición de la pared celular y la membrana.

Una de las frutas más importantes de México es el mango (*Mangifera indica* L.), la producción del año 2019 de 2,089,041 t posicionó a México como el sexto productor de mango a nivel mundial, donde el estado de Guerrero es uno de los principales productores a nivel nacional (SIAP, 2020). Sin embargo, los agricultores en

México aún reportan pérdidas relacionadas con diversas enfermedades fúngicas, una de ellas es la antracnosis causada por hongos del género *Colletotrichum* (Mendoza-Herrera *et al.*, 2020, Valdés *et al.*, 2017). Estudios anteriores han demostrado el efecto antifúngico del quitosano en aislados de *Colletotrichum* (Oliveira *et al.*, 2018), la mayoría de ellos identificados como parte del complejo de *Colletotrichum*; sin embargo, aún existe poca información sobre la sensibilidad al quitosano a nivel de la especie *Colletotrichum*. Un complejo de *Colletotrichum* requiere identificación con la alineación genómica de al menos un

gen, mientras que la identificación de especies requiere al menos tres genes (Dowling *et al.*, 2020). Esta investigación tuvo como objetivo evaluar la sensibilidad al quitosano *in vitro* de aislamientos fúngicos obtenidos de lesiones por antracnosis en mango de Guerrero, México. Las especies se identificaron con siete genes utilizando un enfoque de alineación genómica.

## **3.2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **3.2.1. Identificación de aislamientos fúngicos**

Los aislados de *Colletotrichum* se obtuvieron en el ciclo agrícola 2019 de Cuajinicuilapa, Guerrero, México. Las hojas de mango con síntomas de antracnosis del follaje inferior del árbol se cortaron del pecíolo y se almacenaron individualmente en toallas de papel. Una hoja con enfermedad de antracnosis contiene manchas necróticas negras de forma irregular en ambos lados de la hoja. Las hojas infectadas se trasladaron al laboratorio a temperatura ambiente para obtener aislamientos fúngicos. Asimismo, se realizaron muestreos en frutos de mango en madurez comercial con antracnosis de Guerrero. Un mango con antracnosis muestra manchas profundas, prominentes y generalmente redondeadas de color marrón oscuro a negro (Oliveira *et al.*, 2018, Sarkar, 2016). De las hojas y frutos infectados se obtuvieron cortes de secciones de tejido de 0,5 × 0,5 cm y se desinfectaron con hipoclorito de sodio (NaOCl) al 0,5% (v/v) durante 2 min; luego se lavaron con agua destilada estéril y se secaron con papel filtro estéril. Cada fragmento fue depositado individualmente en el centro de una placa de Petri con medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA) y se incubó a 25 °C en ausencia de luz hasta el progreso del micelio durante 8-10 días.

Se realizó la extracción de ADN del micelio de cada colonia, se utilizó un bisturí estéril para obtener 100 mg de micelio, y se colocó en tubos Eppendorf (Fuentes-Aragón *et al.*, 2020). La ruptura del micelio se realizó a través de tres métodos; molienda con nitrógeno líquido utilizando un mortero; molienda con perlas de vidrio y vórtice por 1 min, y el tercer método utilizado fue un molinillo con mano de mortero. Siendo este último, con el que se obtuvieron los mejores rendimientos de extracción de ADN. Los aislados fúngicos se identificaron mediante un esquema

de análisis de secuencias multilocus basado en cinco genes (actina parcial, Act;  $\beta$ -tubulina 2,  $\beta$ -Tub<sub>2</sub>; gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, GAPDH; quitina sintasa 1, CHS-1; calmodulina, CaM) y el espaciador transcrito interno ribosomal (ITS) y las regiones espaciadoras intergénicas Apn2-Mat1-2 (ApMat)). El ADN genómico se extrajo con el Plant/Fungi DNA Isolation Kit (Norgen Biotek Corporation, Canadá) siguiendo las instrucciones del fabricante y se usó como plantilla para las reacciones de PCR utilizando GoTaq® Flexi DNA Polymerase (Promega, EE. UU.) y cebadores específicos para cada gen (Cuadro 3-1).

Cuadro 3-1 Secuencias de Secuencia de nucleótidos para la identificación de los aislados

Marcador genético	Directo (5'-3')	Inverso (5'-3')	Referencia
ITS	ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG)	ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC)	(Li <i>et al.</i> , 2011, Wang and Wang, 2011)
$\beta$ -Tub <sub>2</sub>	Bt2a (GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC)	Bt2b (ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGCC)	(Li <i>et al.</i> , 2011)
GAPDH	GDF1 (GCCGTCAACGACCCCTTCATTGA)	GDR1 (GGGTGGAGTCGTACTIONTGGAGCATGT)	(Li <i>et al.</i> , 2011)
Act	ACT-512F (ATGTGCAAGGCCGTTTCGC)	ACT-783R (TACGAGTCCTTCTGGCCCAT)	(Li <i>et al.</i> , 2011, Wang and Wang, 2011)
CaM	CL1C (GAATTCAAGGAGGCCTTCTC)	CL2C (CTTCTGCATCATGAGCT GAC)	(Li <i>et al.</i> , 2011)
CHS-1	CHS1-79F (TGGGGCAAGGATGCTTGGGAAGAAG)	CHS-1-354R (TGGAAGAACCATCTGTGAGAGTTG)	(Li <i>et al.</i> , 2011, Wang and Wang, 2011)
(ApMat)	AMF1 (TCATTCTACGTATGTGCCCG)	AMR1 (CCAGAAATACACCGAACTTGC)	(Hosseinnejad and Jafari, 2016)

Espaciador transcrito interno ribosomal (ITS).  $\beta$ -tubulina 2 ( $\beta$ -Tub<sub>2</sub>). Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH). Actina (Uddin *et al.*). Calmodulina (CaM). Quitina sintasa 1 (CHS-1). Regiones espaciadoras intergénicas Apn2-Mat1-2 (ApMat).

Los productos de PCR se purificaron con columnas GFX (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, EE. UU.) y se secuenciaron en Macrogen Inc. (Seúl, Corea). Las secuencias se analizaron en la base de datos GenBank con la herramienta Blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), y las secuencias de ADN de las coincidencias más exitosas se usaron como organismos de referencia para

el análisis filogenético. Los alineamientos de secuencias de ADN se realizaron con la función Clustal W. Se construyeron dos árboles filogenéticos concatenados con el software MEGA-X v. 10.2.6. utilizando el método de máxima verosimilitud y el modelo general reversible en el tiempo con distribución gamma y proporción de sitios invariables (GTR + G + I) para estimar las distancias evolutivas (1000 réplicas de arranque) (Villafana *et al.*, 2020, Nei and Kumar, 2000). Para el primero, se utilizaron las secuencias combinadas de ITS y  $\beta$ -Tub<sub>2</sub> para determinar el género de los aislamientos fúngicos. En contraste, el segundo árbol se construyó usando secuencias ITS, Act,  $\beta$ -Tub 2, GAPDH, CHS-1, CaM y ApMat que fueron dirigidas para caracterizar los miembros de los complejos de *Colletotrichum*, que están asociados con la enfermedad de antracnosis en *Mangifera indica*.

### 3.2.2. Caracterización del quitosano y sensibilidad de hongos aislados

Quitosano de bajo peso molecular (Aldrich, lote # STBF3282V, Saint Louis, MO, EE. UU.) se mezcló y trituró con 120 mg de KBr durante 10 min. La mezcla se compactó con una prensa hidráulica (8 toneladas de presión durante 16 h), y la tableta formada se analizó utilizando un espectrómetro de resonancia de infrarrojo transformado de Fourier (FT-IR) (Spectrum GX FT-IR System, Perkin Elmer™, Shelton, CT, EE. UU.). El espectro obtenido estaba dentro del rango de frecuencia de 4000-400 cm<sup>-1</sup> (Khan *et al.*, 2002). El DD se calculó por el método propuesto por Brugnerotto *et al.* (2001) usando líneas base de referencia en el espectro FT-IR a 1320 y 1420 cm<sup>-1</sup> con las ecuaciones 1 y 2 de la Cuadro 3-2.

Cuadro 3-2 Ecuaciones para determinar el grado de desacetilación y el peso molecular del quitosano

Número o nombre de la ecuación	Ecuación
1 (DA: Grado de acetilación)	$\frac{A_{1320}}{A_{1420}} = 0.3822 + 0.03133 DA$
2 (DD: Grado de desacetilación)	$DD = 100 - DA$
Viscosidad relativa	$\eta_{rel} = \frac{\text{flujo de la solución de quitosano}}{\text{flujo del solvente}}$
Viscosidad específica	$\eta_{sp} = \eta_{rel} - 1$
Huggins	$[\eta] = \eta_{sp}/C$
Kramer	$[\eta] = (\ln \eta_{rel})/C$
Mark-Houwink Sakurada	$[\eta] = k (Mv)^{\alpha}$

El peso molecular (kDa) se obtuvo usando Mark-Houwink-Sakurada (Tabla 5) donde  $[\eta]$  es la viscosidad intrínseca del polímero,  $M_v$  peso molecular promedio en Da ( $\text{g mol}^{-1}$ ),  $k = 0.070 \text{ g ml}^{-1}$ , y  $\alpha = 0,81$  según la DD de quitosano (Badawy and Rabea, 2011, Seo *et al.*, 2007). La viscosidad intrínseca se calculó extrapolando a concentración cero las ecuaciones de Huggins y Kraemer (Tabla 3-2) (Seuvre and Mathlouthi, 2010, Solomon and Ciută, 1962), utilizando un viscosímetro Ubbelohde (0B-L123, CANNON) sumergido en un sistema de recirculación de baño de agua a una temperatura constante de 25 °C. Se prepararon soluciones de quitosano con concentraciones de 0,003–0,002  $\text{g L}^{-1}$  (Seo *et al.*, 2007), utilizando una solución de ácido acético 0,3 M y acetato de sodio 0,2 M como disolvente (Rinaudo, 2006). Se evaluó la actividad del quitosano en el crecimiento micelial sobre los aislamientos fúngicos obtenidos. Se preparó una solución de quitosano en ácido láctico (0,05 M); el pH se ajustó con NaOH (1 N) a 5.6 y se esterilizó por 15 min a 121 °C. Asimismo, se preparó y esterilizó un medio de cultivo con papa dextrosa agar (PDA). A 45 °C, se mezclaron la solución de quitosano y el medio de cultivo PDA, y se vertieron 20 mL en cajas de Petri estériles y se enfriaron hasta solidificar. Los tratamientos obtenidos fueron medio de cultivo PDA, medio de cultivo PDA acidificado (ácido láctico 0,05 M) y medio de cultivo PDA acidificado (ácido láctico 0,05 M) con quitosano (0,1–1  $\text{g L}^{-1}$ ). Las esporas de colonias de 10 días de crecimiento se extrajeron con asa microbiológica estéril y se inocularon al centro del medio de cultivo dentro de la caja Petri. Se incubó a 25 °C y se midieron manualmente los diámetros de las colonias cada 24 h hasta que la colonia cubrió el 80-90% de la superficie de la placa. Posteriormente, se obtuvo la cinética de crecimiento logarítmico (logaritmo del radio de la colonia frente al tiempo), y luego se utilizó la fase logarítmica (crecimiento exponencial) para calcular la velocidad de crecimiento radial de esta etapa de crecimiento (Quintana-Obregón *et al.*, 2011). La fase de registro es la etapa más adecuada para probar la susceptibilidad de los hongos filamentosos a los compuestos antifúngicos (Meletiadis *et al.*, 2001). Asimismo, el porcentaje de inhibición del crecimiento radial del PDA acidificado tratado con quitosano (0.1–1  $\text{g L}^{-1}$ ) se calculó con respecto al medio de cultivo PDA acidificado. Finalmente, se puntuaron las cepas que mostraron sensibilidad y resistencia al

quitosano. El diseño del estudio experimental fue completamente al azar; el factor de estudio fueron los hongos aislados y la composición de los medios de cultivo. Los análisis de varianza (ANOVA) y las pruebas de Tukey, con el nivel de significación establecido en  $p < 0,05$ , se realizaron utilizando JMP versión 5.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC, EE. UU.).

### **3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

#### **3.3.1. Identificación de aislamientos fúngicos**

Las secuencias de ITS y  $\beta$ -Tub<sub>2</sub> (primer alineamiento genómico) permitieron clasificar los aislamientos fúngicos obtenidos de hojas y frutos en siete clados principales consistentes de diferentes géneros fúngicos, de los cuales siete aislados pertenecen al complejo *C. gloeosporioides*, el causal agente de la antracnosis en mango (Figura 3-1). Asimismo, los aislamientos fúngicos que no pertenecen a *Colletotrichum* encontrados en el presente trabajo son especies asociadas a infecciones de mango (Figura 3-1). El segundo alineamiento genómico usando secuencias ITS, Act,  $\beta$ -Tub 2, GAPDH, CHS-1, CaM y ApMat de los aislados del género *Colletotrichum*, permitió identificar cuatro especies del *Colletotrichum* (Figura 3-2).

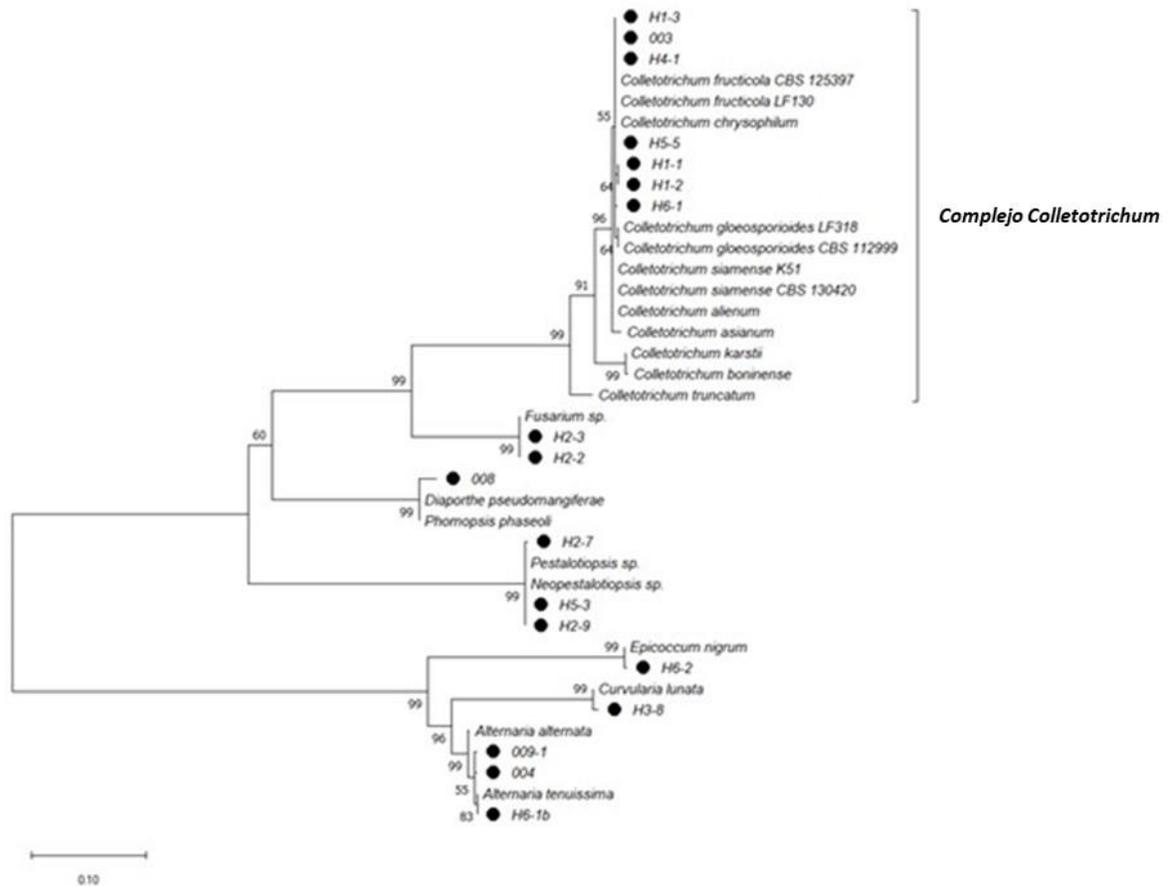


Figura 3-1 Relación filogenética entre hongos aislados de *Mangifera indica* L. con síntomas similares a los de la antracnosis. Árbol de máxima probabilidad basado en datos combinados de secuencia ITS y  $\beta$ -Tub2. Los puntos negros muestran aislamientos caracterizados presente trabajo. Los valores de soporte de Bootstrap se muestran en los nodos del árbol y las longitudes de las ramas y la barra de escala representan el número de sustituciones por sitio

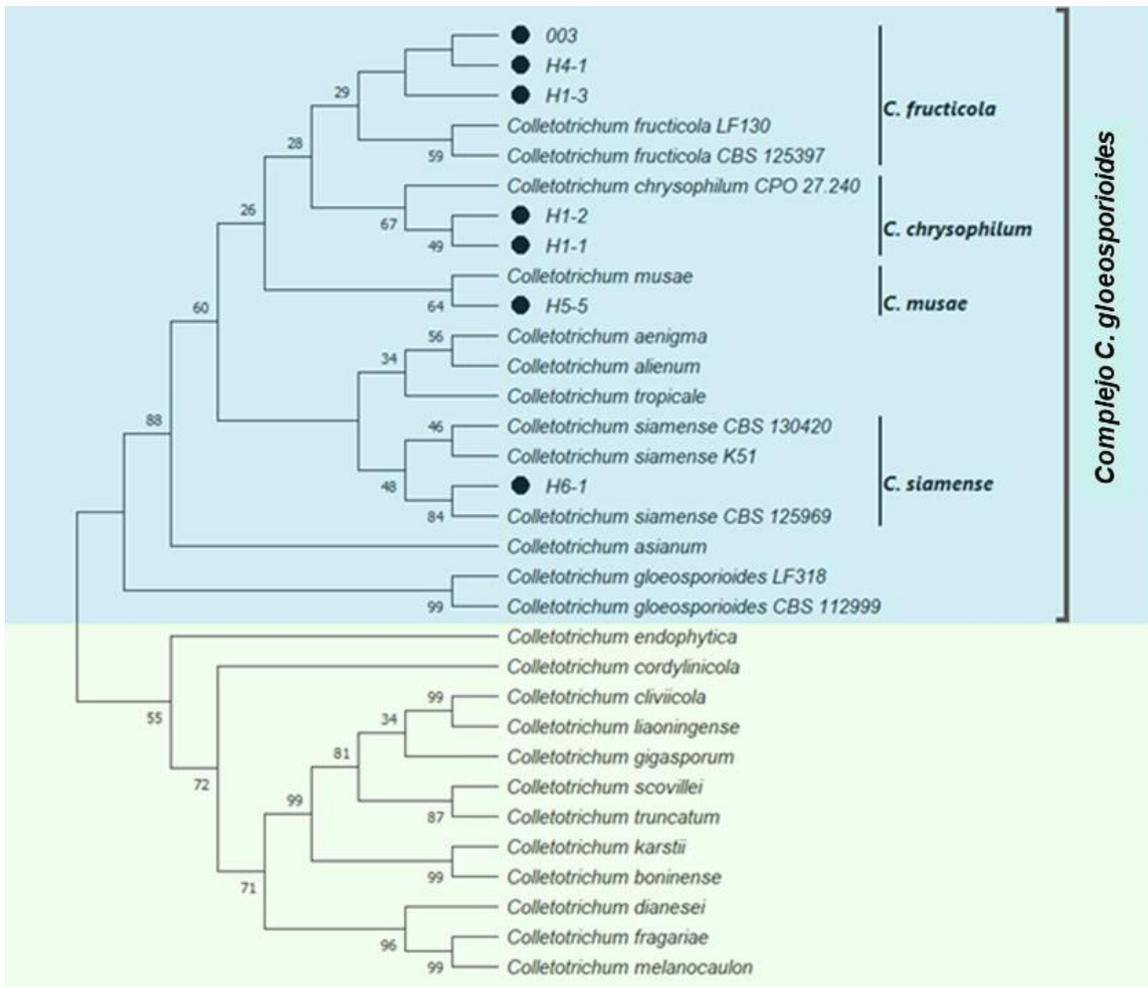


Figura 3-2 Identificación de especies de *Colletotrichum* aisladas de *Mangifera indica* L. Árbol de consenso Bootstrap inferido por el método de máxima verosimilitud y modelo general reversible en el tiempo basado en las secuencias de ITS, Act,  $\beta$ -Tub2, GAPDH, CHS-1, CaM y ApMat. Los valores de Bootstrap junto a las ramas representan el porcentaje de árboles replicados en los que los taxones asociados se agruparon (1000 réplicas). Los puntos negros muestran aislamientos caracterizados en el presente trabajo

Entre los aislamientos pertenecientes a las especies del complejo *Colletotrichum*, solo uno se aisló de frutos, mientras que el resto se encontró en hojas infectadas. Los complejos de *C. gloeosporioides* están más adaptados para infectar tejidos vegetativos que frutos, en contraste, por ejemplo, con el complejo *C. acutatum*, que está más adaptado a la infección de frutos (Li *et al.*, 2019). Con respecto a la identificación fúngica de aislamientos de mango, anteriormente Tovar-Pedraza *et al.* (2020), obtuvieron aislamientos del complejo *C. gloeosporioides* y

encontraron las especies *C. alienum*, *C. asianum*, *C. siamense* y *C. tropicale* utilizando secuencias espaciadoras intergénicas Apn2/MAT. En contraste, nuestros resultados sugieren a las especies *C. fructicola*, *C. chrysophilum*, *C. musae* y *C. siamense* como agentes causales de antracnosis en mango. Estas diferencias pueden estar relacionadas con el tamaño de la muestra y los objetivos de cada estudio. Tovar-Pedraza *et al.* (2020) obtuvieron muestras de ocho estados mexicanos (Sinaloa, Nayarit, Colima, Michoacán, Guerrero, Oaxaca, Chiapas y Veracruz); su objetivo fue encontrar la distribución de especies de *Colletotrichum* en mango, mientras el presente estudio consideró muestras de un estado mexicano (Guerrero) para obtener aislados de *Colletotrichum* de mango para evaluar la sensibilidad al quitosano. Además, Li *et al.* (2019) informaron *C. asianum*, *C. fructicola* y *C. siamense* están presentes en mango. Los estudios sobre la enfermedad de la antracnosis en el mango han demostrado que las especies de *Colletotrichum* pertenecen al complejo *C. gloeosporioides*, y se necesitan múltiples marcadores genéticos para la identificación adecuada de las especies (Zakaria, 2021).

Además de las especies de *Colletotrichum* relacionadas con la antracnosis en el mango, los otros hongos aislados identificados pertenecen a seis géneros diferentes, incluidos *Alternaria*, *Fusarium*, *Pestalotiopsis*, *Curvularia*, *Diaporthe* y *Epicoccum* (Figura 3-1). Estos hongos pueden actuar como saprofitos y se ha informado que ocasionalmente causan enfermedades en el mango, con algunos síntomas como la antracnosis (Arauz, 2000, Garg *et al.*, 2021, Lim *et al.*, 2019, Majumdar and Mandal, 2019, Husna *et al.*, 2018, Rakesh *et al.*, 2020).

### 3.3.2. Caracterización del quitosano y sensibilidad de hongos aislados

El espectro FT-IR correspondiente a la muestra de quitosano (Figura 3-3) permitió calcular un grado de desacetilación de  $78,5 \pm 0,1\%$  y el peso molecular fue de  $32,0 \pm 6,4$  kDa. Por lo general, los quitosanos en el rango de 10 a 200 kDa se consideran de bajo peso molecular (Verlee *et al.*, 2017). El grado de desacetilación y el peso molecular está relacionado con el tipo de actividad biológica del quitosano con el hongo y está totalmente documentado; Grande-Tovar *et al.* (2018) resumen

los tres mecanismos principales propuestos en los últimos años: 1) interacción entre grupos amino del quitosano con grupos aniónicos en la superficie de la pared celular; 2) interacción de los grupos amino positivos del quitosano con las cargas negativas de los fosfolípidos; y 3) unión de ADN.

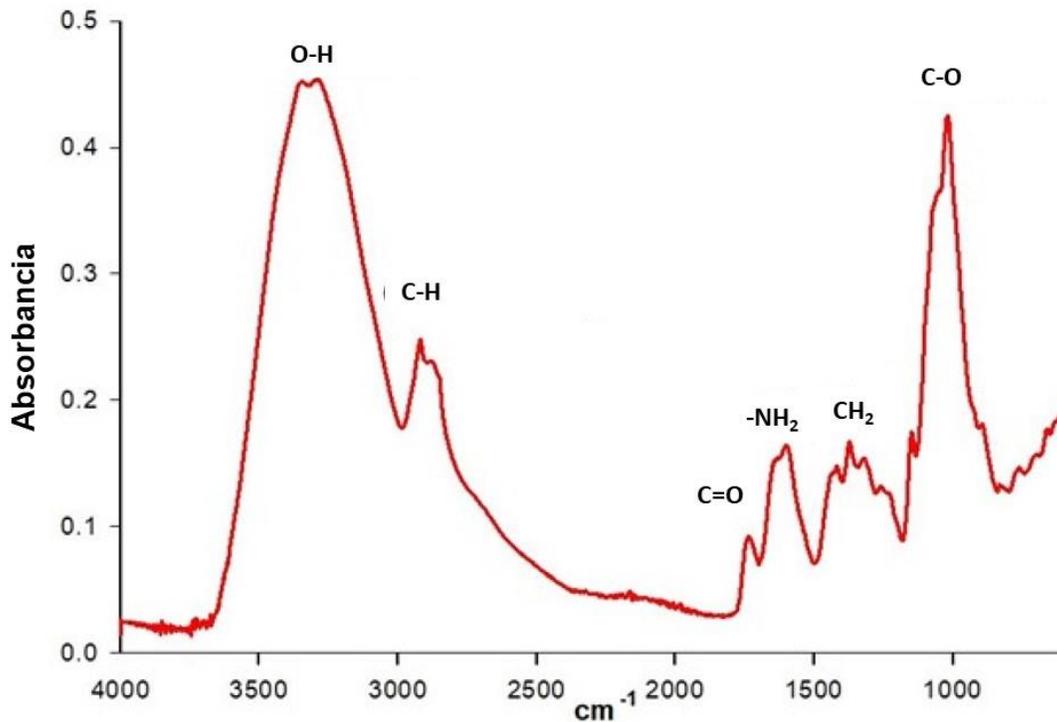


Figura 3-3 Espectro FT-IR correspondiente a la muestra de quitosano

La Figura 3-4, Figura 3-5, Figura 3-6 y Figura 3-7 muestran la cinética de crecimiento radial de aislados de *Colletotrichum* en medio PDA, PDA-ácido láctico (0.05 M) y PDA-ácido láctico (0.05 M) con 1 g L<sup>-1</sup> de quitosano a 25 °C.

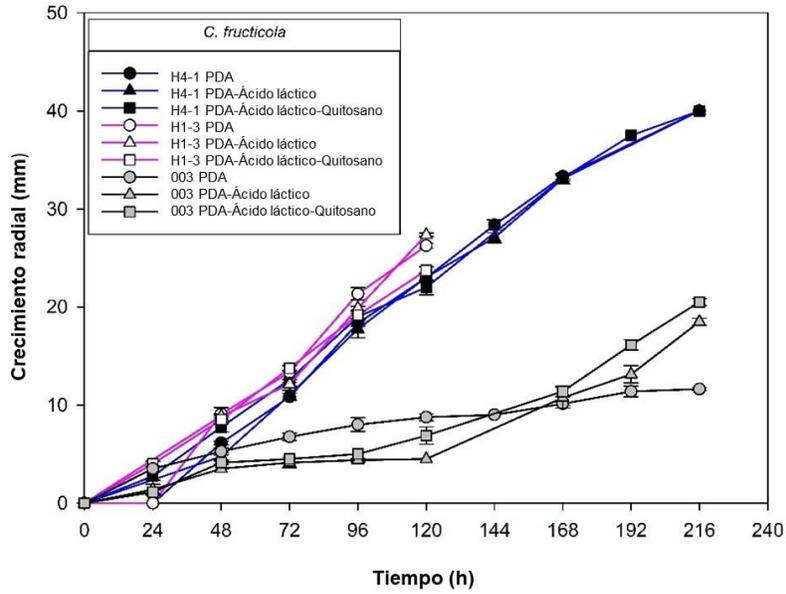


Figura 3-4 Especies de *Colletotrichum fructicola* aisladas de antracnosis de mango (H4-1, H1-3 y 003). Cinética de crecimiento radial (mm) en medio PDA, PDA-ácido láctico (0.05 M) y PDA-ácido láctico (0.05 M) con 1 g L<sup>-1</sup> de quitosano a 25 °C

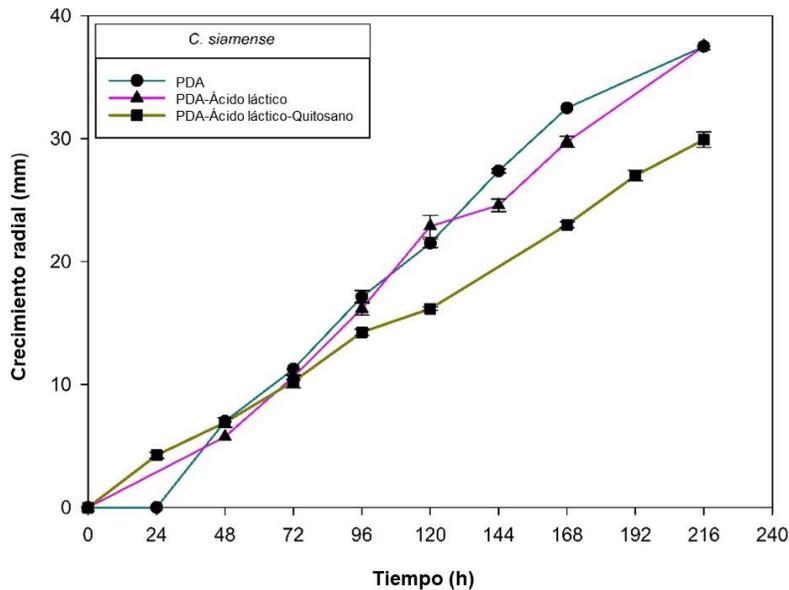


Figura 3-5 *Colletotrichum siamense* aislado (H6-1) de antracnosis de mango. Cinética de crecimiento radial (mm) en medio PDA, PDA-ácido láctico (0.05 M) y PDA-ácido láctico (0.05 M) con 1 g L<sup>-1</sup> de quitosano a 25 °C

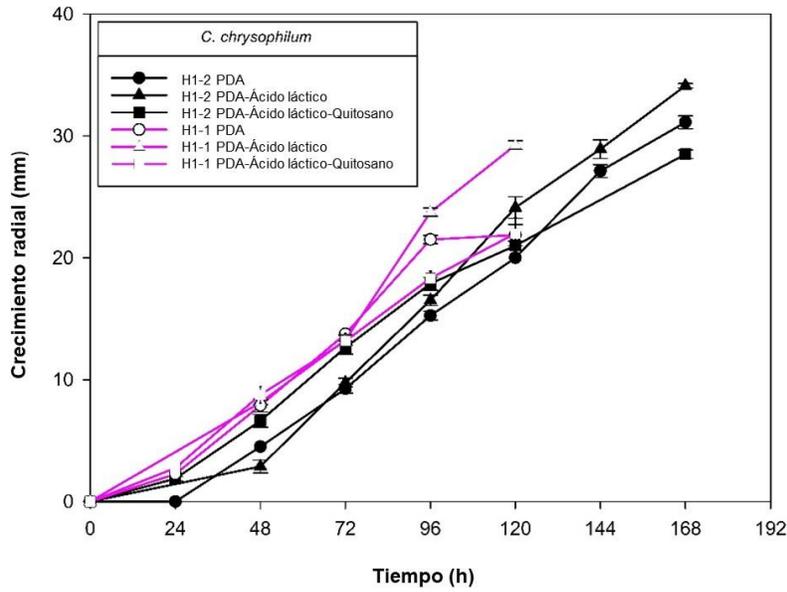


Figura 3-6 Aislamientos de *Colletotrichum chrysophilum* de antracnosis de mango (H1-2 y H1-1). Cinética de crecimiento radial (mm) en medio PDA, PDA-ácido láctico (0.05 M) y PDA-ácido láctico (0.05 M) con 1 g L<sup>-1</sup> de quitosano a 25 °C

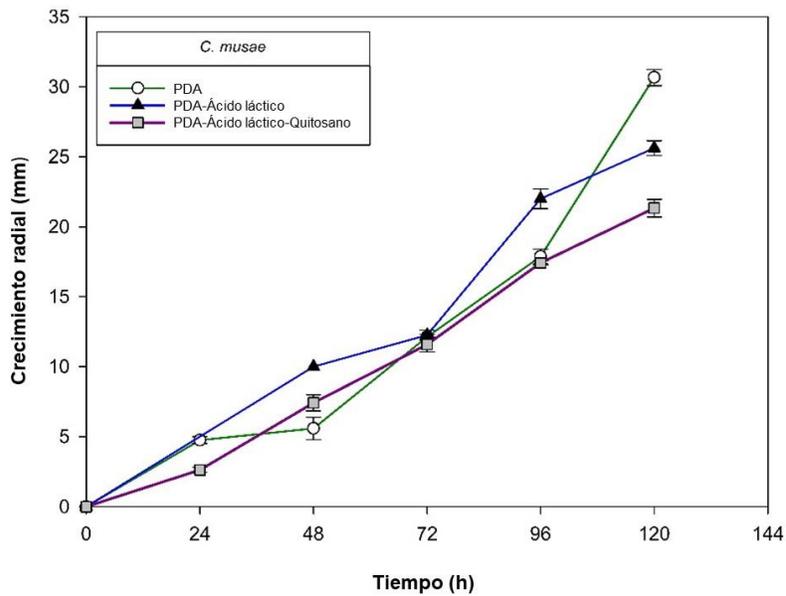


Figura 3-7 *Colletotrichum musae* aislado de antracnosis de mango. Cinética de crecimiento radial (mm) en medio PDA, PDA-ácido láctico (0.05 M) y PDA-ácido láctico (0.05 M) con 1 g L<sup>-1</sup> de quitosano a 25 °C

El aislado H1-3 fue sensible, pero los aislados de *C. fructicola* H4-1 y 003 fueron menos sensibles a 1 g L<sup>-1</sup> de quitosano (Figura 3-4, Cuadro 3-3).

Cuadro 3-3 Quitosano contra especies del complejo *Colletotrichum gloeosporioides* aisladas de antracnosis de mango. Tasa de crecimiento durante la fase logarítmica e inhibición radial del crecimiento en medio PDA, PDA-ácido láctico (0,05 M) y PDA-ácido láctico (0,05 M) con 1 g L<sup>-1</sup> de quitosano a 25 °C

Aislado/especie	Tasa de crecimiento radial en fase Log (µm·h <sup>-1</sup> )			Inhibición del crecimiento radial <sup>1</sup> (%) por quitosano a las 120 h
	PDA	PDA-Ácido láctico	PDA-Ácido láctico-Quitosano	
H4-1/ <i>C. fructicola</i>	212 ± 3 <sup>CDa</sup>	208 ± 3 <sup>Da</sup>	202 ± 4 <sup>ABa</sup>	2.84 ± 2.30 <sup>D</sup>
H1-3/ <i>C. fructicola</i>	248 ± 2 <sup>Bb</sup>	268 ± 3 <sup>Ba</sup>	217 ± 2 <sup>Ac</sup>	13.38 ± 1.28 <sup>C</sup>
003/ <i>C. fructicola</i> <sup>2</sup>	30 ± 4 <sup>Fb</sup>	117 ± 5 <sup>Fa</sup>	126 ± 0 <sup>Da</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>D</sup>
H6-1/ <i>C. siamense</i>	175 ± 4 <sup>Ea</sup>	173 ± 3 <sup>Ea</sup>	135 ± 4 <sup>CDb</sup>	29.95 ± 0.62 <sup>A</sup>
H1-2/ <i>C. chrysophilum</i>	228 ± 0 <sup>Cb</sup>	242 ± 0 <sup>Ca</sup>	149 ± 2 <sup>Cc</sup>	12.95 ± 1.46 <sup>C</sup>
H1-1/ <i>C. chrysophilum</i>	207 ± 6 <sup>Db</sup>	307 ± 1 <sup>Aa</sup>	187 ± 7 <sup>Bc</sup>	22.43 ± 1.20 <sup>B</sup>
H5-5/ <i>C. musae</i>	341 ± 5 <sup>Aa</sup>	236 ± 5 <sup>Cb</sup>	198 ± 4 <sup>Bc</sup>	18.44 ± 1.37 <sup>B</sup>

PDA: agar patata dextrosa. <sup>1</sup>Con respecto al PDA-ácido láctico (0,05 M). <sup>2</sup>Medias ± desviación estándar (n = 3). Los valores seguidos de diferentes letras mayúsculas en las columnas y minúsculas en las filas son estadísticamente diferentes (Tukey p ≤ 0,05).

El aislado de *C. fructicola* 003 fue el único obtenido del fruto. Su alto crecimiento en PDA-ácido láctico contrasta con el crecimiento en PDA porque puede estar adaptado para desarrollarse en tejidos con ácidos orgánicos presentes (como los presentes en la fruta). El ácido láctico puede disimular los ácidos orgánicos presentes en la fruta. La ausencia de estos en el medio PDA artificial sin adición de ácido láctico puede ser un factor que afecte el desarrollo micelial. Sin embargo, no hay suficientes datos para hipotetizar qué sucede con este aislado ya que es el único que se obtiene del fruto.

En la Cuadro 3-3 se muestran las tasas de crecimiento radial en fase logarítmica y el porcentaje de inhibición radial a las 120 h de la especie *Colletotrichum* causante de antracnosis en mango de México a quitosano a una concentración de 1 g L<sup>-1</sup>. La mayoría de los aislamientos fueron susceptibles al quitosano excepto dos especímenes de *C. fructicola*.

El efecto del quitosano sobre los sistemas biológicos fúngicos relacionados con el peso molecular (bajo, medio o alto) es bien conocido. El quitosano de bajo

peso molecular puede ser más efectivo contra el crecimiento del micelio (Verlee *et al.*, 2017). Adicionalmente, otros estudios han sugerido que la concentración también puede ser un factor que genera diversas respuestas de defensa en los hongos. En general, más de 1 g L<sup>-1</sup> de quitosano inhibe del 80 al 100 % del crecimiento fúngico (Algam and Elwagia, 2015, Zhou *et al.*, 2016), y tiene una inhibición completa in vitro a partir de 10 g L<sup>-1</sup> (Dibona-Villanueva and Fuentealba, 2021). Sin embargo, después de varias horas, el crecimiento se recupera (Peña *et al.*, 2013). En cambio, bajas concentraciones de quitosano (1 g L<sup>-1</sup> y menos) inhiben el crecimiento de hongos (Ai *et al.*, 2012, Li *et al.*, 2011, Wang and Wang, 2011), pero existen otros efectos sobre la célula a bajas concentraciones. El quitosano se une a la superficie celular cargada negativamente, altera la membrana celular, lo que induce la fuga de componentes intracelulares (Hosseinnejad and Jafari, 2016), estimula la respiración y produce la salida de cantidades significativas de cationes (Peña *et al.*, 2013). En especies de *Colletotrichum*, inhibiciones del 25% a concentraciones de 1 g L<sup>-1</sup> tienen un efecto fungistático (Jinasena *et al.*, 2011). En este estudio se evaluó la capacidad antifúngica sobre el crecimiento micelial a concentraciones de 0,1 a 1 g L<sup>-1</sup> para provocar un ataque moderado de quitosano sobre las células fúngicas o actividad fungistática (no inhibición total ni actividad fungicida). El quitosano inhibió a la mayoría de los aislados expuestos a 0.75 y 1 g L<sup>-1</sup> de quitosano (Cuadro 3-4). Los resultados de las otras concentraciones ensayadas se han incluido en la Cuadro 3-4. El rango de concentraciones e inhibiciones de quitosano fue insuficiente para poder estimar la CIM frente a *Colletotrichum* aislado. El ajuste de las concentraciones finales de quitosano a 10,0, 5,0, 2,5, 1,25, 0,625, 0,312 y 0,0 g L<sup>-1</sup> puede estimar la CIM de *Colletotrichum gloeosporioides* (Nascimento *et al.*, 2020).

Cuadro 3-4 Inhibición del crecimiento radial de aislados del complejo *Colletotrichum gloeosporioides* y otros géneros aislados de mango (PDA-ácido láctico-quitosano) a 25 °C

Aislado/especie	Inhibición del crecimiento radial <sup>1</sup> (%) por quitosano (g/L <sup>-1</sup> ) a las 120 h			
	0.1	0.5	0.75	1
<b>H4-1/<i>C. fructicola</i></b>	13.85 ± 0.93 <sup>2</sup>	12.27 ± 1.08	0.00 ± 0.00	2.84 ± 2.30
<b>H1-3/<i>C. fructicola</i></b>	0.00 ± 0.00	10.09 ± 0.70	12.84 ± 1.29	13.38 ± 1.28
<b>003/<i>C. fructicola</i></b>	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
<b>H6-1/<i>C. siamense</i></b>	6.00 ± 0.54	12.56 ± 0.28	23.44 ± 2.95	29.95 ± 0.62
<b>H1-2/<i>C. chrysophilum</i></b>	40.89 ± 2.16	26.40 ± 1.23	42.99 ± 0.62	12.95 ± 1.46
<b>H1-1/<i>C. chrysophilum</i></b>	0.00 ± 0.00	20.08 ± 0.36	19.22 ± 0.371	22.43 ± 1.20
<b>H5-5/<i>C. musae</i></b>	0.00 ± 0.00	13.16 ± 0.41	11.69 ± 1.13	18.44 ± 1.37
<b>004/<i>Alternaria sp.</i></b>	0.00 ± 0.00	18.67 ± 2.84	19.31 ± 0.97	20.28 ± 2.40
<b>009-1/<i>Alternaria sp.</i></b>	0.00 ± 0.00	37.08 ± 1.94	33.37 ± 1.74	24.07 ± 2.62
<b>H6-1b/<i>Alternaria tenuissima</i></b>	0.00 ± 0.00	68.83 ± 0.00	68.18 ± 2.75	72.72 ± 1.84
<b>H2-2/<i>Fusarium sp.</i></b>	0.00 ± 0.00	53.46 ± 0.54	39.61 ± 0.54	71.54 ± 0.00
<b>H2-3/<i>Fusarium sp.</i></b>	38.39 ± 0.92	77.25 ± 0.15	81.51 ± 0.54	87.62 ± 0.00
<b>H2-7/<i>Pestalotiopsis sp.</i></b>	0.00 ± 0.00	54.68 ± 0.44	67.81 ± 1.32	67.18 ± 0.44
<b>H2-9/<i>Pestalotiopsis sp.</i></b>	0.00 ± 0.00	62.23 ± 2.54	59.71 ± 2.03	74.87 ± 0.00
<b>H5-3/<i>Pestalotiopsis sp.</i></b>	16.28 ± 0.53	49.63 ± 0.62	54.49 ± 0.07	43.33 ± 1.57
<b>H3-8/<i>Curvalaria lunata</i></b>	0.00 ± 0.00	50.53 ± 0.75	59.33 ± 0.34	65.22 ± 1.88
<b>008/<i>Diaporthe pseudomangiferae</i></b>	0.00 ± 0.00	45.66 ± 0.30	60.72 ± 2.30	53.75 ± 0.0
<b>H6-2/<i>Epicoccum nigrum</i></b>	10.26 ± 0.37	44.42 ± 0.80	59.82 ± 0.24	69.22 ± 1.71

PDA: agar patata dextrosa. <sup>1</sup>Respecto al PDA-ácido láctico (0,05 M). <sup>2</sup>Medias ± desviación estándar (n = 3).

En los aislados de *Colletotrichum*, agente causal de la antracnosis, fue posible diferenciar cepas menos susceptibles de la misma especie a bajas concentraciones (H4-1 y 003). Este hecho es relevante para futuros estudios en nuestro grupo de investigación para dilucidar los mecanismos de susceptibilidad o la posible resistencia de los aislados de *Colletotrichum* al quitosano y debe ser estudiado en base a cambios genómicos con evidencia molecular.

El porcentaje de inhibición del crecimiento radial a una concentración de quitosano de 1 g L<sup>-1</sup> fue superior al 10%, y las tasas de crecimiento radial de la fase logarítmica con respecto al ácido PDA se redujeron excepto para los aislados H4-1 y 003 (Cuadro 3-3). Estudios anteriores han demostrado el efecto del quitosano en el crecimiento radial de especies de *Colletotrichum*. Ramos *et al.* (2018) informaron inhibición del crecimiento radial en concentraciones superiores a 5 g L<sup>-1</sup> de

quitosano con un peso molecular de 40 kDa y un 85 % de DD en las especies *C. asianum*, *C. fructicola*, *C. tropicale* y *C. siamense*.

La tasa de extensión radial disminuyó en la mayoría de las especies de *Colletotrichum* cultivadas in vitro con quitosano. El crecimiento de los hongos incluye cuatro fases distintivas: la fase de retraso (I), la fase de registro (Struszczyk, 2002), la fase de desaceleración (III) y la fase de crecimiento constante (IV) (Quintana-Obregón *et al.*, 2011). Durante la fase logarítmica de crecimiento equilibrado, el micelio de los hongos sufre un metabolismo primario (Walker and White, 2017), por lo que una disminución en la tasa es indicativa de actividad fungistática por inhibición del metabolismo primario. Sin embargo, el crecimiento radial del aislado H4-1 de *C. fructicola* de las hojas fue menos inhibido, mientras que el 003 del fruto no fue inhibido con 1 g L<sup>-1</sup> quitosano a las 120 h; sus tasas de extensión radial de fase logarítmica no se vieron afectadas por el quitosano de bajo peso molecular. No se encontraron estudios anteriores en los que se evaluara el efecto del quitosano sobre *C. fructicola* identificados a nivel de especie utilizando más de tres marcadores genéticos, lo cual es necesario para asegurar una adecuada identificación a nivel de especie en el género *Colletotrichum*. Ramos *et al.* (2018) informó inhibición de *C. fructicola* a 5 g L<sup>-1</sup> concentración de quitosano; sin embargo, esta especie fue una de las menos inhibidas por el quitosano, aunque mostró hifas con superficie granular y corrugada cuando se expuso al quitosano. La menor inhibición que ejerció el quitosano sobre los aislados H4-1 y 003 también puede estar relacionada con la virulencia del hongo; por ejemplo, *C. fructicola* fue más agresiva que *C. siamense* en durazno (Hu *et al.*, 2015), pero en mango de México, se ha informado que *C. siamense* y *C. asianum* tienen mayor virulencia que *C. fructicola* (Tovar-Pedraza *et al.*, 2020). Estas variaciones en el grado de virulencia del hongo con su hospedero también pueden verse reflejadas en la sensibilidad a los fungicidas que se aplican, por lo que uno de los aspectos a considerar para el control de especies del complejo *Colletotrichum* es la realización de pruebas de sensibilidad a fungicidas (Dowling *et al.*, 2020) con una identificación a nivel de especie utilizando más de tres marcadores genéticos. En nuestro estudio, dos cepas de *C. fructicola* fueron menos susceptibles. Por lo tanto, sería interesante evaluar si

existe una relación entre el grado de virulencia (alta o baja) en mango y la sensibilidad al quitosano como hipótesis a probar en futuros estudios.

En cuanto a los hongos que no pertenecen al género *Colletotrichum*, todos los aislados encontrados fueron susceptibles al quitosano (Cuadro 3-5; Figura 3-8, Figura 3-9, Figura 3-10, Figura 3-11, Figura 3-12 y Figura 3-13 y Cuadro 3-4). En México, la antracnosis es la principal enfermedad causada por *Colletotrichum* que afecta los cultivos de mango, pero no se descarta que las infecciones provocadas por otros géneros de hongos puedan generar problemas para la producción de mango; en ese caso, el quitosano puede ser una alternativa a evaluar. Además, la presencia de estos hongos podría afectar la calidad de la fruta al empeorar los signos necróticos en los sitios inicialmente dañados por *Colletotrichum*.

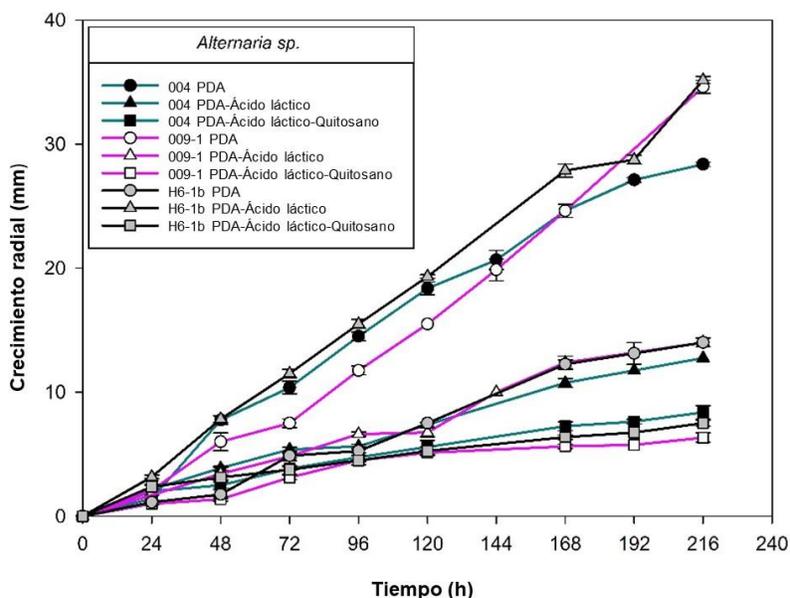


Figura 3-8 *Alternaria sp.* aislado de antracnosis de mango. Cinética de crecimiento radial (mm) en medio PDA, PDA-ácido láctico (0.05 M) y PDA-ácido láctico (0.05 M) con 1 g L-1 de quitosano a 25 °C

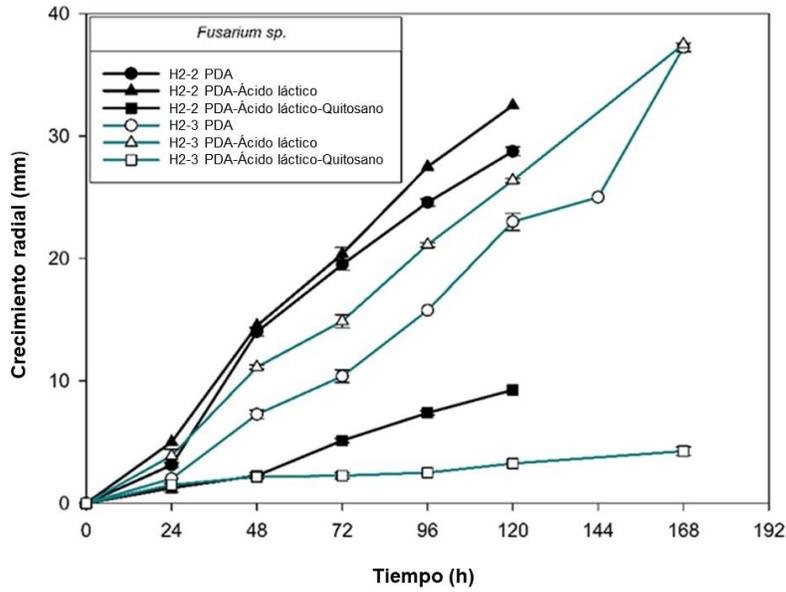


Figura 3-9 *Fusarium sp.* aislados de antracnosis de mango. Cinética de crecimiento radial (mm) en medio PDA, PDA-ácido láctico (0.05 M) y PDA-ácido láctico (0.05 M) con 1 g L<sup>-1</sup> de quitosano a 25 °C

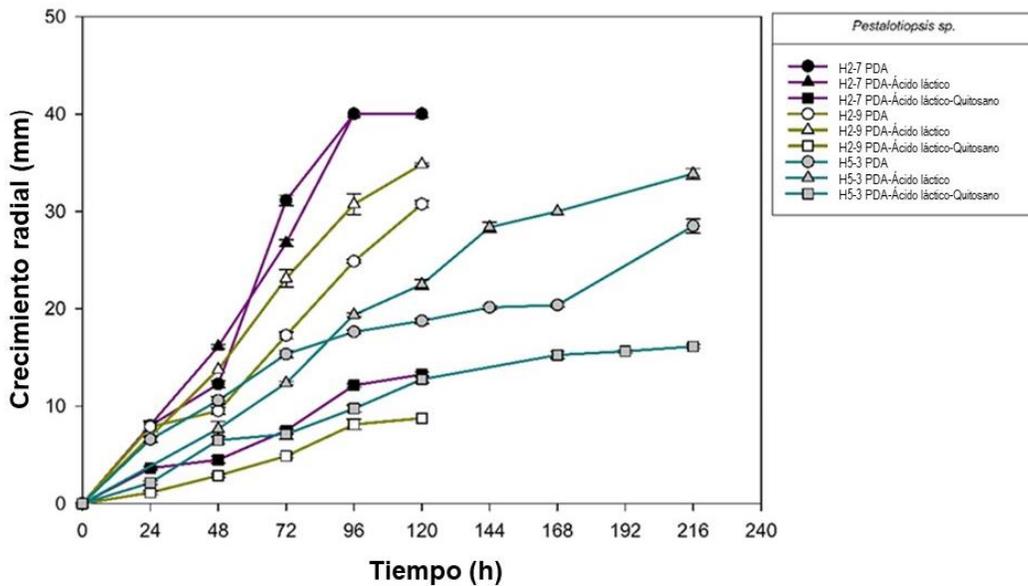


Figura 3-10 *Pestalotiopsis sp.* aislados de antracnosis de mango. Cinética de crecimiento radial (mm) en medio PDA, PDA-ácido láctico (0.05 M) y PDA-ácido láctico (0.05 M) con 1 g L<sup>-1</sup> de quitosano a 25 °C

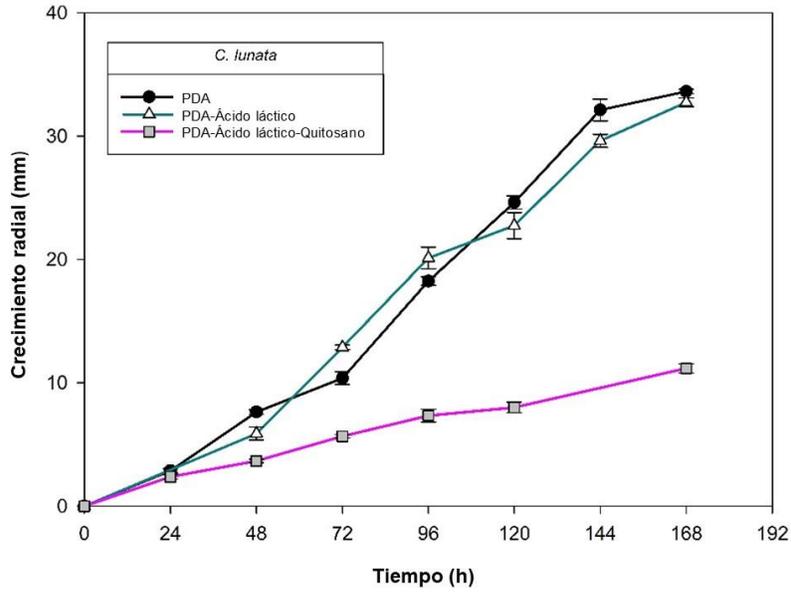


Figura 3-11 *Curvularia lunata* aislada de antracnosis de mango. Cinética de crecimiento radial (mm) en medio PDA, PDA-ácido láctico (0.05 M) y PDA-ácido láctico (0.05 M) con 1 g L<sup>-1</sup> de quitosano a 25 °C

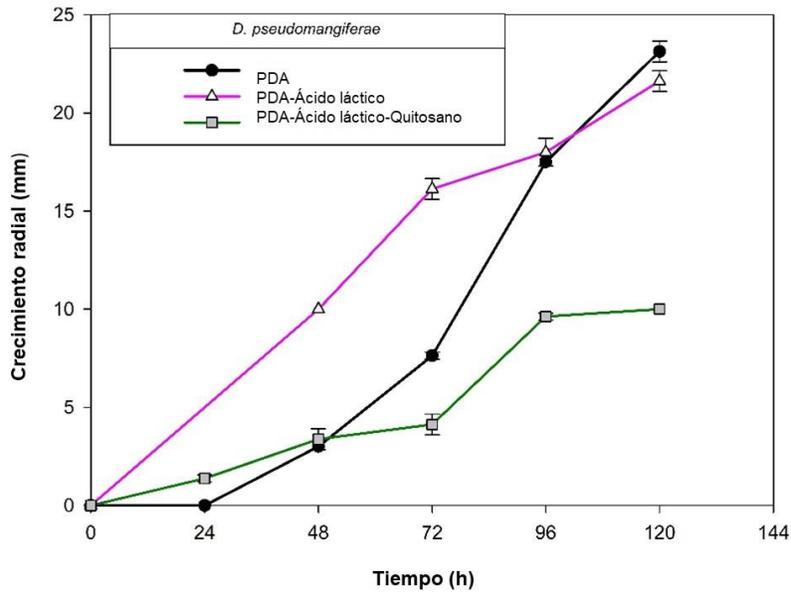


Figura 3-12 *Diaporthe pseudomangiferae* aislada de antracnosis de mango. Cinética de crecimiento radial (mm) en medio PDA, PDA-ácido (0.05 M) y PDA-ácido láctico (0.05 M) con 1 g L<sup>-1</sup> de quitosano a 25 °C

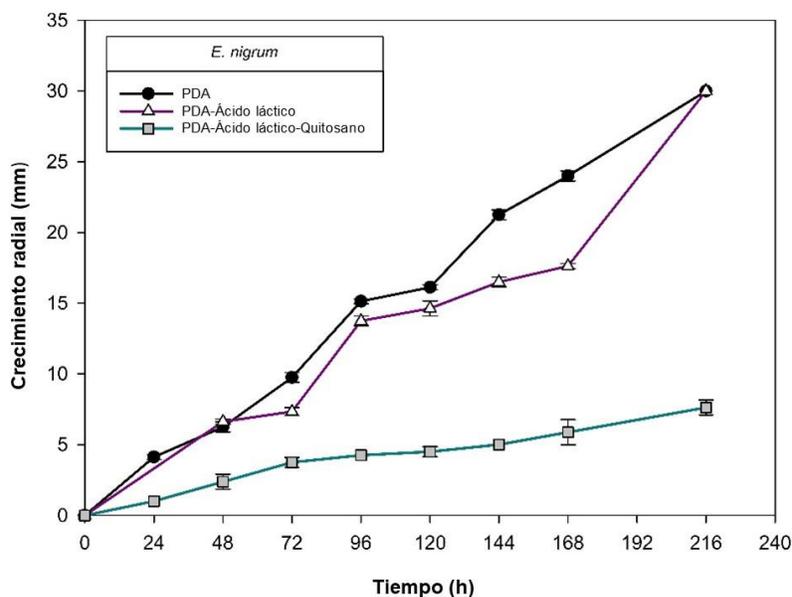


Figura 3-13 *Epicoccum nigrum* aislado de antracnosis de mango. Cinética de crecimiento radial (mm) en medio PDA, PDA-ácido láctico (0.05 M) y PDA-ácido láctico (0.05 M) con 1 g L-1 de quitosano a 25 °C

Cuadro 3-5 Sensibilidad al quitosano de otras especies de hongos aislados de antracnosis en mango. Crecimiento radial en medio PDA, PDA-ácido láctico (0.05 M) y PDA-ácido láctico (0.05 M) con 1 g L-1 de quitosano a 25 °C

Aislado/especie	Tasa de crecimiento radial en fase Log ( $\mu\text{m}\cdot\text{h}^{-1}$ )			Inhibición del crecimiento radial <sup>1</sup> (%) por quitosano a las 120 h
	PDA	PDA-Ácido Láctico	PDA-Ácido láctico-Quitosano	
004/ <i>Alternaria sp.</i>	116 ± 2 <sup>a</sup>	60 ± 1 <sup>b</sup>	35 ± 1 <sup>c</sup>	20.28 ± 2.40 <sup>G</sup>
009-1/ <i>Alternaria sp.</i>	192 ± 3 <sup>b</sup>	294 ± 3 <sup>a</sup>	17 ± 4 <sup>c</sup>	24.07 ± 2.62 <sup>G</sup>
H6-1b/ <i>Alternaria tenuissima</i>	76 ± 3 <sup>b</sup>	155 ± 3 <sup>a</sup>	24 ± 3 <sup>c</sup>	72.72 ± 1.84 <sup>BC</sup>
H2-2/ <i>Fusarium sp.</i>	206 ± 1 <sup>b</sup>	255 ± 2 <sup>a</sup>	105 ± 7 <sup>c</sup>	71.54 ± 0.00 <sup>BC</sup>
H2-3/ <i>Fusarium sp.</i>	277 ± 1 <sup>a</sup>	228 ± 3 <sup>b</sup>	23 ± 4 <sup>c</sup>	87.62 ± 0.00 <sup>A</sup>
H2-7/ <i>Pestalotiopsis sp.</i>	578 ± 7 <sup>a</sup>	497 ± 4 <sup>b</sup>	159 ± 4 <sup>c</sup>	67.18 ± 0.44 <sup>CD</sup>
H2-9/ <i>Pestalotiopsis sp.</i>	297 ± 1 <sup>a</sup>	294 ± 1 <sup>b</sup>	87 ± 1 <sup>c</sup>	74.87 ± 0.00 <sup>B</sup>
H5-3/ <i>Pestalotiopsis sp.</i>	40 ± 0 <sup>c</sup>	158 ± 1 <sup>a</sup>	59 ± 1 <sup>b</sup>	43.33 ± 1.57 <sup>F</sup>
H3-8/ <i>Curvalaria lunata</i>	223 ± 1 <sup>a</sup>	186 ± 8 <sup>b</sup>	55 ± 1 <sup>c</sup>	65.22 ± 1.88 <sup>D</sup>
008/ <i>Diaporthe pseudomangiferae</i>	293 ± 6 <sup>a</sup>	153 ± 7 <sup>b</sup>	106 ± 8 <sup>c</sup>	53.75 ± 0.0 <sup>E</sup>
H6-2/ <i>Epicoccum nigrum</i>	133 ± 2 <sup>a</sup>	56 ± 3 <sup>b</sup>	12 ± 1 <sup>c</sup>	69.22 ± 1.71 <sup>BCD</sup>

PDA: agar patata dextrosa. <sup>1</sup>Con respecto al PDA-ácido láctico (0,05 M). <sup>2</sup>Medias ± desviación estándar (n = 3). Los valores seguidos de diferentes letras mayúsculas en las columnas y minúsculas en las filas son estadísticamente diferentes (Tukey p ≤ 0,05).

Los aislados de hongos de tejido vegetal con antracnosis en mango de México pertenecen al complejo *Colletotrichum*. El uso de siete marcadores genéticos en el alineamiento genómico identificó las especies *C. fructicola*, *C. musae* y *C. chrysophilum*. Los hongos del complejo *Colletotrichum* son susceptibles al quitosano excepto dos aislados de la especie *C. fructicola* que mostraron menos susceptibilidad al quitosano. Asimismo, los géneros *Alternaria*, *Fusarium*, *Pestalotiopsis*, *Curvularia*, *Diaporthe* y *Epicoccum*, causantes de otras enfermedades en el mango, mostraron susceptibilidad al quitosano en todos los casos. Por lo tanto, el quitosano es una alternativa a evaluar en el control de antracnosis y otras infecciones fúngicas en mango. Sin embargo, debido a la menor susceptibilidad demostrada al quitosano que presenta un ejemplar de *C. fructicola*, se deben considerar las interacciones entre las especies del complejo de *C. gloeosporioides* en antracnosis y su efecto sobre la susceptibilidad o resistencia al quitosano.

#### **3.4. CONTRIBUCIONES DE AUTOR**

Conceptualización y adquisición de financiación, E.A.Q.-O.; metodología y redacción: preparación del borrador original, G.V.-O. y E.A.-H.; análisis formal de quitosano, J.L.-M.; conceptualización y redacción: revisión y edición, M.Á.M.-T. y S.M.G.-C. Metodología y redacción de estática: revisión C.S.-M.-H. Todos los autores han leído y aceptado la versión publicada del manuscrito.

#### **3.5. FONDOS**

Esta investigación y APC fueron financiadas por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (FOSEC SEP-INVESTIGACIÓN BÁSICA; FSSEP02-C-2018-2), subvención número A1-S-34064-“Respuestas transcriptómicas de complejos de *Colletotrichum* expuestos a nanopartículas de quitosano en un modelo *in vitro*”.

## CAPÍTULO 4 CONCLUSIONES GENERALES

*C. fructicola*, *C. musae* y *C. chrysophilum*, son especies que se encuentran en huertos de mango del estado de Guerrero, México. Estas especies pertenecen al complejo *Colletotrichum gloeosporioides*. Las cuales mostraron un cambio en el crecimiento radial, durante la fase logarítmica, al estar en contacto con quitosano. Los estudios sobre el estrés abiótico causado por quitosano al complejo *Colletotrichum gloeosporioides* mostraron que este polisacárido puede inhibir el crecimiento radial de *C. fructicola*, *C. musae* y *C. chrysophilum*. Sin embargo, las especies de *C. fructicola* indicaron resistencia al quitosano y cambios en las características morfológicas. Por tal razón, se deben considerar las interacciones entre las especies del complejo de *C. gloeosporioides* en antracnosis y su efecto sobre la susceptibilidad o resistencia al quitosano, así como su etapa de crecimiento y desarrollo del hongo. La inhibición del crecimiento radial y los cambios en las características morfológicas en el complejo *Colletotrichum gloeosporioides* fue favorecida cuando la concentración de quitosano era mayor ( $1 \text{ g L}^{-1}$ ). También, se logró identificar los géneros de *Alternaria*, *Fusarium*, *Pestalotiopsis*, *Curvularia*, *Diaporthe* y *Epicoccum*, causantes de otras enfermedades en el mango, mostrando susceptibilidad al quitosano en todos los casos.

## CAPÍTULO 5 LITERATURA CITADA

- ai, H., Wang, F., Xia, Y., Chen, X. & Lei, C. 2012. Antioxidant, antifungal and antiviral activities of chitosan from the larvae of housefly, *Musca domestica* L. *Food Chemistry*, 132, 493-498.
- Algam, S. A. & Elwagia, M. E. 2015. Evaluation of chitosan efficacy on tomato growth and control of early blight disease. *Jordan J. Agric. Sci*, 11, 27-36.
- Alves, N. M. & Mano, J. F. 2008. Chitosan derivatives obtained by chemical modifications for biomedical and environmental applications. *International journal of biological macromolecules*, 43, 401-414.
- Andueza, I. & Hochhaus, G. 2013. Nanosistema Dextrano/Quitosano con potencial aplicación oftalmológica. *Revista de la Facultad de Farmacia*, 76, 50-57.

- Aranaz, I., Mengíbar, M., Harris, R., Paños, I., Miralles, B., Acosta, N., Galed, G. & Heras, Á. 2009. Functional characterization of chitin and chitosan. *Current chemical biology*, 3, 203-230.
- Arauz, L. F. 2000. Mango anthracnose: Economic impact and current options for integrated management. *Plant disease*, 84, 600-611.
- Arcila-Cardona, A., Castillo-Urquiza, G., Pérez-Artiles, L., Abaunza-González, C., Yacomelo-Hernández, M. & León-Pacheco, R. 2022. Modelo productivo de mango de azúcar (*Mangifera indica* L.) para el departamento del Magdalena. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria-Agrosavia.
- Armijos Briones, M., Vaca Altamirano, G., Moreano Moreano, R. & Torres Nieto, N. 2022. Biomateriales inteligentes usados en odontología. *Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica*, 41.
- Ayala, A., Colina, M., Molina, J., Vargas, J., Rincón, D., Medina, J., Lester, R. & Cárdenas, H. 2014. Evaluación de la actividad antifúngica del quitosano contra el hongo *Mycosphaerella fijiensis* Morelet que produce la sigatoka negra que ataca el plátano. *Revista Iberoamericana de polímeros*, 15, 312-338.
- Badawy, M. E. & Rabea, E. I. 2011. A biopolymer chitosan and its derivatives as promising antimicrobial agents against plant pathogens and their applications in crop protection. *International Journal of Carbohydrate Chemistry*, 2011, 1-29.
- Balana, B. B., Aghadi, C. N. & Ogunniyi, A. I. 2022. Improving livelihoods through postharvest loss management: evidence from Nigeria. *Food security*, 14, 249-265.
- Bally, I. S. 2006. *Mangifera indica* (mango). *Species profiles for pacific island agroforestry*, 1-25.
- Barnett, H. L. & Hunter, B. B. 1998. *Illustrated genera of imperfect fungi*, Minesota, USA, APS Press.
- Barragán, C. R., Fornué, E. D. & Ortega, J. A. 2016. Determinación del grado de desacetilación de quitosana mediante titulación potenciométrica, FTIR y Raman. *CIM*, 4, 769-776.

- Bautista-Baños, S., Hernández-Lauzardo, A. N., Velázquez Del Valle, M. G., Bosquez-Molina, E. & Sánchez-Domínguez, D. 2005. Quitosano: una alternativa natural para reducir microorganismos postcosecha y mantener la vida de anaquel de productos hortofrutícolas. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*, 7, 1-6.
- Bautista-Baños, S., Hernandez-López, M. & Bosquez-Molina, E. 2004. Growth inhibition of selected fungi by chitosan and plant extracts. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 22, 178-186.
- 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, 1087-1092.
- Bautista-Baños, S., Ventura-Aguilar, R. I., Correa-Pacheco, Z. & Corona-Rangel, M. L. 2017. Chitosan: a versatile antimicrobial polysaccharide for fruit and vegetables in postharvest – a review. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 23, 103-122.
- Benavides-López, L. F. 2019. *Cuantificación temprana de Pseudocercospora fijiensis por medio de qpcr en modelos predictivos de Sigatoka negra en plantas de banano (Musa AAA)*. Licenciatura en Ingeniería en Agronomía, Instituto Tecnológico de Costa Rica/Campus Tecnológico Local San Carlos.
- Boeriu, C. G. & Van Den Broek, L. A. 2019. Chemical and enzymatic modification of chitosan to produce new functional materials with improved properties. *Chitin and Chitosan: Properties and Applications*, 245-258.
- Bompard, J. M. 2009. Taxonomy and systematics. In: LITZ, E. B. R. E. (ed.) *The mango: Botany, production and uses*. Florida: CABI Wallingford UK.
- Brugnerotto, J., Lizardi, J., Goycoolea, F. M., Argüelles-Monal, W., Desbrieres, J. & Rinaudo, M. 2001. An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization. *Polymer*, 42, 3569-3580.
- Cai, L., Hyde, K. D., Taylor, P. W. J., Weir, B., Waller, J., Abang, M. M., Zhang, J. Z., Yang, Y. L., Phoulivong, S. & Liu, Z. 2009. A polyphasic approach for studying *Colletotrichum*. *Fungal Diversity*, 39, 183-204.

- Caldera, Y., Clavel, N., Briceño, D., Nava, A., Gutiérrez, E. & Mármol, Z. 2009. Quitosano como coagulante durante el tratamiento de aguas de producción de petróleo. *Boletín del Centro de Investigaciones biológicas*, 43, 541-555.
- Cannon, P. F., Damm, U., Johnston, P. R. & Weir, B. S. 2012. *Colletotrichum*: current status and future directions. *Studies in mycology*, 73, 181-213.
- Cardona, C. E. O. & Fernández, X. A. 2020. Quitosano: una alternativa sustentable para el empaque de alimentos. *Revista Digital Universitaria*, 21.
- Carrillo-Fasio, J. A., García-Estrada, R. S., Muy-Rangel, M. D., Sañudo-Barajas, A., Márquez-Zequera, I., Allende-Molar, R., De La Garza-Ruiz, Z., Vera-Patiño, M. & Galindo-Fentanes, E. 2005. Control biológico de antracnosis [*Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. y Sacc.] y su efecto en la calidad poscosecha del mango (*Mangifera indica* L.) en Sinaloa, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 23, 24-32.
- Castañeda-Ramírez, J. C., Laurel-Ángeles, V., Espinoza-Zamora, J., Salcedo-Hernández, R., López-Ramírez, M. E. & De La Fuente-Salcido, N. M. 2016. Efecto del quitosano para el biocontrol de hongos fitopatógenos identificados molecularmente de frutas y hortalizas en guanajuato. *Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 1, 207-213.
- Chien, P. J. & Chou, C. C. 2006. Antifungal activity of chitosan and its application to control post-harvest quality and fungal rotting of Tankan citrus fruit (*Citrus tankan* Hayata). *Journal of the Science of Food Agriculture*, 86, 1964-1969.
- Chirkov, S. N. 2002. The antiviral activity of chitosan. *Applied Biochemistry Microbiology*, 38, 1-8.
- Chung, Y. C., Wang, H. L., Chen, Y. M. & Li, S. L. 2003. Effect of abiotic factors on the antibacterial activity of chitosan against waterborne pathogens. *Bioresource technology*, 88, 179-184.
- Cia, P., Benato, E. A., Valentini, S. R. D. T., Anjos, V. D. D. A., Ponzio, F. S., Sanches, J. & Terra, M. M. 2009. Ultraviolet radiation (UV-C) on the postharvest control of *Colletotrichum gloeosporioides* in niagara rosada grapes. *Bragantia*, 68, 1010-1015.

- CONASPROMANGO, C. N. S. P. M. 2012. Plan Rector Nacional de Sistema Producto Mango. *In: MANGO, C. N. S. P. (ed.)*.
- Coronado-Partida, L. D., Magdaleno, M. E. C., Pérez, M. A. C. & Gutiérrez-Martínez, P. 2017. Efecto del quitosano para el control in vitro de *Colletotrichum* sp aislado de mango (*Mangifera indica* L.) cv. tommy atkins. *Biotecnología y Sustentabilidad*, 2, 72-72.
- Crouch, J., O'connell, R., Gan, P., Buiate, E., Torres, M. F., Beirn, L., Shirasu, K. & Vaillancourt, L. 2014. The Genomics of *Colletotrichum*. *In: AL., R. A. D. E. (ed.) Genomics of plant-associated fungi: monocot pathogens*. Berlin-Heidelberg: Springer.
- Crouch, J. A., Clarke, B. B., White Jr, J. F. & Hillman, B. I. 2009. Systematic analysis of the falcate-spored graminicolous *Colletotrichum* and a description of six new species from warm-season grasses. *Mycologia*, 101, 717-732.
- Damm, U., Cannon, P. F., Liu, F., Barreto, R. W., Guatimosim, E. & Crous, P. W. 2013. The *Colletotrichum* orbiculare species complex: Important pathogens of field crops and weeds. *Fungal Diversity*, 61, 29-59.
- Damm, U., Cannon, P. F., Woudenberg, J. H. C., Johnston, P. R., Weir, B. S., Tan, Y. P., Shivas, R. G. & Crous, P. W. 2012. The *Colletotrichum* boninense species complex. *Studies in mycology*, 73, 1-36.
- Damm, U., O'connell, R. J., Groenewald, J. Z. & Crous, P. W. 2014. The *Colletotrichum* destructivum species complex-hemibiotrophic pathogens of forage and field crops. *Studies in mycology*, 79, 49-84.
- Damm, U., Woudenberg, J. H. C., Cannon, P. F. & Crous, P. W. 2009. *Colletotrichum* species with curved conidia from herbaceous hosts. *Fungal Diversity*, 39, 45.
- De La Caba, K., Guerrero, P., Trung, T. S., Cruz-Romero, M., Kerry, J. P., Fluhr, J., Maurer, M., Kruijssen, F., Albalat, A. & Bunting, S. 2019. From seafood waste to active seafood packaging: An emerging opportunity of the circular economy. *Journal of cleaner production*, 208, 86-98.
- DE LA PAZ, N., PÉREZ, D., FERNÁNDEZ, M., LÓPEZ, O. D., NOGUEIRA, A., PANEQUE, M. R., VALENTÍN, S. A. & GARCÍA, C. M. 2013. Evaluación

- viscosimétrica del quitosano derivado de la quitina de langosta. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 14, 84-91.
- Dean, R., Van Kan, J. A., Pretorius, Z. A., Hammond-Kosack, K. E., Di Pietro, A., Spanu, P. D. & Foster, G. D. 2012. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular plant pathology*, 13, 414-430.
- Desbrieres, J. 2004. Autoassociative natural polymer derivatives: the alkylchitosans. Rheological behaviour and temperature stability. *Polymer*, 45, 3285-3295.
- Devlieghere, F., Vermeulen, A. & Debevere, J. 2004. Chitosan: antimicrobial activity, interactions with food components and applicability as a coating on fruit and vegetables. *Food microbiology*, 21, 703-714.
- Díaz Ponceca, N. Y., Lino Matos, C. R. & Quispe Huaytalla, R. 2018. *Uso del quitosano como coagulante natural para el tratamiento de efluentes generados por la industria textil caso: Compañía Universal Textil SA*. Ingeniero Ambiental y de Recursos Naturales, Universidad Nacional del Callao.
- Díaz, Y. J. R., De La Cruz Frías, G. A., Mena, W. E. L., Valdés, L. R. & Gutiérrez, M. L. M. 2015. Uso de un polímero natural (quitosano) como coagulante durante el tratamiento de agua para consumo. *Ingeniare*, 25-32.
- Dibona-Villanueva, L. & Fuentealba, D. 2021. Novel chitosan–riboflavin conjugate with visible light-enhanced antifungal properties against *Penicillium digitatum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 69, 945-954.
- Dowling, M., Peres, N., Villani, S. & Schnabel, G. 2020. Managing *Colletotrichum* on fruit crops: A “complex” challenge. *Plant Disease*, 104, 2301-2316.
- Dutta, P. K., Ravikumar, M. N. V. & Dutta, J. 2002. Chitin and chitosan for versatile applications. *Journal of Macromolecular Science, Part C: Polymer Reviews*, 42, 307-354.
- Ehrlich, H., Maldonado, M., Spindler, K. D., Eckert, C., Hanke, T., Born, R., Goebel, C., Simon, P., Heinemann, S. & Worch, H. 2007. First evidence of chitin as a component of the skeletal fibers of marine sponges. Part I. Verongidae (Demospongia: Porifera). *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*, 308, 347-356.

- Everett, K. R., Owen, S. G. & Cutting, J. G. M. 2005. Testing efficacy of fungicides against postharvest pathogens of avocado (<i>Persea americana</i> cv Hass). *New Zealand Plant Protection*, 58, 89-95.
- FAO. 2018. *Post-harvest management of mango for quality and safety assurance* [Online]. Rome, Italy: Food and Agriculture Organization of the United Nations. Available: [www.fao.org/3/18239EN/i8239en.pdf](http://www.fao.org/3/18239EN/i8239en.pdf) [Accessed].
- Ferreira, J. B., Abreu, M. S. D., Pereira, I. S., Fernandes, K. D. & Pereira, R. B. 2009. Sensibility of *Colletotrichum gloeosporioides* (coffee blister spot) to different fungicide concentrations. *Ciência e Agrotecnologia*, 33, 2052-2058.
- Fuentes-Aragón, D., Guarnaccia, V., Rebollar-Alviter, A., Juárez-Vázquez, S. B., Aguirre-Rayó, F. & Silva-Rojas, H. V. 2020. Multilocus identification and thiophanate-methyl sensitivity of *Colletotrichum gloeosporioides* species complex associated with fruit with symptoms and symptomless leaves of mango. *Plant Pathology*, 69, 1125-1138.
- Gan, H. & Wickings, K. 2017. Soil ecological responses to pest management in golf turf vary with management intensity, pesticide identity, and application program. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 246, 66-77.
- Ganan, M., Carrascosa, A. V. & Martínez-Rodríguez, A. J. 2009. Antimicrobial activity of chitosan against *Campylobacter spp.* and other microorganisms and its mechanism of action. *Journal of food protection*, 72, 1735-1738.
- García-Mateos, M. R., Acosta-Ramos, M., Rodríguez-Pérez, E., Vásquez-Sánchez, J. & Hernández-Ramos, L. 2021. Extractos vegetales para el control de *Colletotrichum gloeosporioides* in vitro, en periodo de floración y poscosecha del fruto de *Carica papaya*. *Polibotanica*, 213-228.
- García, J., Floriano, J. A., Corredor, J. P., Bernal, J. A., Vásquez, L. A., Sandoval, A. P., Forero, F. & Gómez, G. J. 2010. Descripción de las variedades de mango criollo colombiano. *CORPOICA, Editor*, 72.
- Garg, N., Singh, B., Vaish, S., Kumar, S. & Arora, S. 2021. Exploring microbial community diversity of mango leaf compost. *Current Horticulture*, 9, 27-35.
- Gildberg, A. & Stenberg, E. 2001. A new process for advanced utilisation of shrimp waste. *Process Biochemistry*, 36, 809-812.

- González-Álvarez, M., Moreno-Limón, S., Salcedo-Martínez, S. M. & Perez-Rodríguez, E. C. 2015. In vitro evaluation of antifungal activity of Agave (Agave scabra, Salm Dyck) extracts against post-harvest mushrooms. *Phyton*, 84, 427.
- Grande-Tovar, C. D., Chaves-López, C., Serio, A., Rossi, C. & Paparella, A. J. 2018. Chitosan coatings enriched with essential oils: Effects on fungi involved in fruit decay and mechanisms of action. *Trends in Food Science Technology*, 78, 61-71.
- Gutiérrez-Alonso, J. G., Gutiérrez-Alonso, O., Nieto-Angel, D., Téliz-Ortiz, D. & Zavaleta-Mejía, E. 2004. Manejo Integrado de la Antracnosis [*Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. y Sacc.] del Mango (*Mangifera indica* L.) durante la Postcosecha. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 22, 395-402.
- Gutiérrez-Martínez, P., Bautista-Baños, S., Berúmen-Varela, G., Ramos-Guerrero, A. & Hernández-Ibañez, A. M. 2017. In vitro response of *Colletotrichum* to chitosan. Effect on incidence and quality on tropical fruit. Enzymatic expression in mango. *Acta Agronómica*, 66, 282-289.
- Gutierrez, L. 2022. Remoción de metales pesados del punto RMoch6 del río Moche mediante biopolímero quitosano comercial. *Revista CIENCIA Y TECNOLOGÍA*, 18, 205-214.
- Hernández-Lauzardo, A. N., Bautista-Baños, S., Velázquez-Del Valle, M. G., Rodríguez, S. L., Corona-Rangel, M. L., Solano-Navarro, A. & Bosquez-Molina, E. 2005. Potencial del quitosano en el control de las enfermedades postcosecha. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 23, 198-205.
- Hernández-Téllez, C. N., Cortez-Rocha, M. O., Hernández, A. B., Rosas-Burgos, E. C., Lizardi-Mendoza, J., Torres-Arreola, W., Burboa-Zazueta, M. G. & Plascencia-Jatomea, M. 2018. Chitosan/carrageenan/lysozyme particles: synthesis, characterization and antifungal activity against *Aspergillus parasiticus*. *Revista Mexicana de Ingeniera Química*, 17, 897-912.
- Herrera-González, J. A., Bautista-Baños, S., Salazar-García, S. & Gutiérrez-Martínez, P. 2020. Situación actual del manejo poscosecha y de

- enfermedades fungosas del aguacate 'Hass' para exportación en Michoacán. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 11, 1647-1660.
- Hosseinnejad, M. & Jafari, S. M. 2016. Evaluation of different factors affecting antimicrobial properties of chitosan. *International journal of biological macromolecules*, 85, 467-475.
- Hu, M. J., Grabke, A. & Schnabel, G. 2015. Investigation of the *Colletotrichum gloeosporioides* species complex causing peach anthracnose in South Carolina. *Plant disease*, 99, 797-805.
- Huertaa, A. C., Rincóna, M. C., Valbuena, A. C. & López, A. 2012. Obtención y caracterización de papel de quitosano. *Revista Iberoamericana de polímeros*, 13, 41-51.
- Husna, O., Mohd, M., Nor, N. M. I. M. & Zakaria, L. 2018. Characterization and pathogenicity of Fusarium species associated with leaf spot of mango (*Mangifera indica* L.). *Microbial pathogenesis*, 114, 362-368.
- Hwang, J. K. & Shin, H. H. 2000. Rheological properties of chitosan solutions. *Korea-Australia Rheology Journal*, 12, 175-179.
- Hyde, K. D., Cai, L., McKenzie, E. H. C., Yang, Y. L., Zhang, J. Z. & Prihastuti, H. 2009. *Colletotrichum*: a catalogue of confusion. *Fungal Diversity*, 39, 1-17.
- Hyde, K. D., Nilsson, R. H., Alias, S. A., Ariyawansa, H. A., Blair, J. E., Cai, L., De Cock, A. W. A. M., Dissanayake, A. J., Glockling, S. L. & Goonasekara, I. D. 2014. One stop shop: backbone trees for important phytopathogenic genera: I (2014). *Fungal Diversity*, 67, 21-125.
- INFOCOMM 2011. Fondo de la UNCTAD para la información sobre los mercados de productos básicos agrícolas.
- Jayakumar, R., Menon, D., Manzoor, K., Nair, S. V. & Tamura, H. 2010. Biomedical applications of chitin and chitosan based nanomaterials—A short review. *Carbohydrate polymers*, 82, 227-232.
- Jiang, J., Zhai, H., Li, H., Wang, Z., Chen, Y., Hong, N., Wang, G., Chofong, G. N. & Xu, W. 2014. Identification and characterization of *Colletotrichum fructicola* causing black spots on young fruits related to bitter rot of pear (*Pyrus bretschneideri* Rehd.) in China. *Crop Protection*, 58, 41-48.

- Jinasena, D., Pathirathna, P., Wickramarachchi, S. & Marasinghe, E. Use of chitosan to control anthracnose on “Embul” banana. *In: IPCBEE*, ed. International Conference on Asia Agriculture and Animal, 2011. 56-60.
- Jung, J. & Zhao, Y. 2011. Characteristics of deacetylation and depolymerization of  $\beta$ -chitin from jumbo squid (*Dosidicus gigas*) pens. *Carbohydrate research*, 346, 1876-1884.
- Kanchanapiboon, J. 2017. Postharvest losses in mango production in Thailand. *Acta Horticulturae*, 1183, 85-92.
- Karabulut, O. A. & Baykal, N. 2004. Integrated control of postharvest diseases of peaches with a yeast antagonist, hot water and modified atmosphere packaging. *Crop Protection*, 23, 431-435.
- Kasaai, M. R. 2007. Calculation of Mark–Houwink–Sakurada (MHS) equation viscometric constants for chitosan in any solvent–temperature system using experimental reported viscometric constants data. *Carbohydrate polymers*, 68, 477-488.
- Khan, T. A., Peh, K. K. & Ch’ng, H. S. 2002. Reporting degree of deacetylation values of chitosan: the influence of analytical methods. *Pharm Pharmaceut Sci*, 5, 205-212.
- Kong, M., Chen, X. G., Xing, K. & Park, H. J. 2010. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: a state of the art review. *International journal of food microbiology*, 144, 51-63.
- Kostermans, A. J. G. H. & Bompard, J. M. 1993. *The mangoes. Their botany, Nomenclature, Horticulture and Utilization*, London, Academic Press.
- Kurita, K. 2006. Chitin and chitosan: functional biopolymers from marine crustaceans. *Marine biotechnology*, 8, 203-226.
- Landero-Valenzuela, N., Lara-Viveros, F. M., Andrade-Hoyos, P., Aguilar-Pérez, L. A. & Aguado-Rodríguez, G. J. 2016a. Alternativas para el control de *Colletotrichum spp.*. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 7, 1189-1198.
- Landero-Valenzuela, N., Lara-Viveros, F. M., Andrade-Hoyos, P., Aguilar-Pérez, L. A. & Aguado Rodríguez, G. J. 2016b. Alternatives for the control of *Colletotrichum spp.* *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 7, 1189-1198.

- Landero-Valenzuela, N., Lara-Viveros, F. M., Nieto-Angel, D., Aguado-Rodríguez, J. & Callejas-Hernández, J. 2017. Mulberry (*Morus alba*) leaf extracts as a control alternative of blue mold on postharvest apple fruit. *Revista mexicana de fitopatología*, 35, 1-19.
- Lárez-Velásquez, C. 2003. Algunos usos del quitosano en sistemas acuosos. *Revista Iberoamericana de polímeros*, 4, 91.
- Lárez-Velásquez, C. 2006. Quitina y quitosano: materiales del pasado para el presente y el futuro. *Avances en química*, 1, 15-21.
- Lárez-Velásquez, C. 2008. Algunas potencialidades de la quitina y el quitosano para usos relacionados con la agricultura en Latinoamérica. *Revista UDO Agrícola*, 8, 1-22.
- Li, M., Chen, X., Liu, J., Zhang, W. & Tang, X. 2011. Molecular weight-dependent antifungal activity and action mode of chitosan against *Fulvia fulva* (cooke) ciffrii. *Journal of applied polymer science*, 119, 3127-3135.
- Li, Q., Bu, J., Shu, J., Yu, Z., Tang, L., Huang, S., Guo, T., Mo, J., Luo, S. & Solangi, G. S. 2019. Colletotrichum species associated with mango in southern China. *Scientific reports*, 9, 18891.
- Li, Y., Chen, X. G., Liu, N., Liu, C. S., Liu, C. G., Meng, X. H. & Kenedy, J. 2007. Physicochemical characterization and antibacterial property of chitosan acetates. *Carbohydrate Polymers*, 67, 227-232.
- Lim, L., Mohd, M. H. & Zakaria, L. 2019. Identification and pathogenicity of Diaporthe species associated with stem-end rot of mango (*Mangifera indica* L.). *European journal of plant pathology*, 155, 687-696.
- Liu, J., Tian, S., Meng, X. & Xu, Y. 2007. Effects of chitosan on control of postharvest diseases and physiological responses of tomato fruit. *Postharvest Biology Technology*, 44, 300-306.
- López-Mora, L. I., Gutiérrez-Martínez, P., Bautista-Baños, S., Jiménez-García, L. F. & Zavaleta-Mancera, H. A. 2013. 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, 315-331.

- Lotmar, W. & Picken, L. E. R. 1950. A new crystallographic modification of chitin and its distribution. *Experientia*, 6, 58-59.
- Maia, T. F., De Donato, A. & Fraga, M. E. 2015. Atividade antifúngica de óleos essenciais de plantas. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*, 17, 105-116.
- Majumdar, N. & Mandal, N. C. 2019. Evaluation of Media for growth and sporulation characteristics of postharvest pathogens *Curvularia lunata* and *Pestalotiopsis mangiferae*. *Annals of Plant Protection Sciences*, 27, 89-94.
- Mati-Baouche, N., Elchinger, P. H., De Baynast, H., Pierre, G., Delattre, C. & Michaud, P. 2014. Chitosan as an adhesive. *European Polymer Journal*, 60, 198-212.
- Meletiadiis, J., Meis, J. F. G. M., Mouton, J. W. & Verweij, P. E. 2001. Analysis of growth characteristics of filamentous fungi in different nutrient media. *Journal of Clinical microbiology*, 39, 478-484.
- Mendoza-Herrera, Y. M., Rios-Velasco, C., Cambero-Campos, J., De Dios-Ávila, N., Pérez-Corral, D. A., Rodríguez-Guerra, R. & Estrada-Virgen, M. O. 2020. Antagonistic Actinomycetes to *Colletotrichum* sp. Penz in the mango cultivation in Nayarit, Mexico. *Ecosist. Recur. Agropec*, 7, 1-9.
- Mesa, V. A. M., Marín, P., Ocampo, O., Calle, J. & Monsalve, Z. J. 2019. Fungicidas a partir de extractos vegetales: una alternativa en el manejo integrado de hongos fitopatógenos. *RIA. Revista de investigaciones agropecuarias*, 45, 23-30.
- Mukherjee, S. K. & Litz, R. E. 2009. Introduction: botany and importance. *The mango: Botany, production and uses*. Wallingford, UK: CABI
- Nascimento, J. I. G., Stamford, T. C. M., Melo, N. F. C. B., Dos Santos Nunes, I., Lima, M. A. B., Pintado, M. M. E., Stamford-Arnaud, T. M., Stamford, N. P. & Stamford, T. L. M. 2020. Chitosan–citric acid edible coating to control *Colletotrichum gloeosporioides* and maintain quality parameters of fresh-cut guava. *International Journal of Biological Macromolecules*, 163, 1127-1135.
- Nei, M. & Kumar, S. 2000. *Molecular evolution and phylogenetics*, Oxford university press.

- O´Farrill-Nieves, H. 2024. *Insecticidas Bioracionales* [Online]. Available: <https://uprmweb.uprm.edu/ofarrill/> [Accessed].
- Oliveira, P. D. L., De Oliveira, K. Á. R., Dos Santos Vieira, W. A., Câmara, M. P. S. & De Souza, E. L. 2018. Control of anthracnose caused by *Colletotrichum* species in guava, mango and papaya using synergistic combinations of chitosan and *Cymbopogon citratus* (DC ex Nees) Stapf. essential oil. *International journal of food microbiology*, 266, 87-94.
- Palma-Guerrero, J., Jansson, H. B., Salinas, J. & Lopez-Llorca, L. V. 2008. Effect of chitosan on hyphal growth and spore germination of plant pathogenic and biocontrol fungi. *Journal of applied Microbiology*, 104, 541-553.
- Palou, L. & Montesinos-Herrero, C. 2015. Uso de fungicidas en poscosecha de frutos cítricos. *Horticultura*, 321, 72-76.
- Pastrana, E. 2010. Importancia industrial de la quitina. *Bioquímica, facultad, USCO*.
- Peña, A., Sánchez, N. S. & Calahorra, M. 2013. Effects of Chitosan on *Candida albicans*: Conditions for Its Antifungal Activity. *BioMed research international*.
- Pérez-Legaspi, I., García-Villar, A., Garatachia-Vargas, M., Hernández-Vergara, M., Pérez-Rostro, C. & Ortega-Clemente, L. 2015. Investigación y Ciencia. *Universidad Autónoma de Aguascalientes*, 11-18.
- Philibert, T., Lee, B. H. & Fabien, N. 2017. Current status and new perspectives on chitin and chitosan as functional biopolymers. *Applied biochemistry biotechnology*, 181, 1314-1337.
- Phoulivong, S. 2011. *Colletotrichum*, naming, control, resistance, biocontrol of weeds and current challenges. *Current Research in Environmental Applied Mycology*, 1, 53-73.
- Pillai, C. K. S., Paul, W. & Sharma, C. P. 2009. Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. *Progress in polymer science*, 34, 641-678.
- Plascencia-Jatomea, M., Viniegra, G., Olayo, R., Castillo-Ortega, M. M. & Shirai, K. 2003. Effect of Chitosan and Temperature on Spore Germination of *Aspergillus niger*. *Macromolecular Bioscience*, 3, 582-586.

- Prashanth, K. V. H. & Tharanathan, R. N. 2007. Chitin/chitosan: modifications and their unlimited application potential—an overview. *Trends in food science technology*, 18, 117-131.
- Quintana-Obregón, E. A., Plascencia-Jatomea, M., López-Cervantes, J., Cira-Chávez, L. A., Sánchez-Machado, D. I. & Cortez-Rocha, M. O. 2011. Antifungal activity of chitosan in *Cladosporium cladosporioides* isolated from safflower. *Revista mexicana de micología*, 34, 93-96.
- Raafat, D., Von Bargen, K., Haas, A. & Sahl, H. G. 2008. Insights into the mode of action of chitosan as an antibacterial compound. *Applied environmental microbiology*, 74, 3764-3773.
- Rabea, E. I., Badawy, M. E. T., Stevens, C. V., Smagghe, G. & Steurbaut, W. 2003. Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action. *Biomacromolecules*, 4, 1457-1465.
- Ragazzo, S. J. A., Coria, T., Ramírez De León, J. A., Ortíz-Basurto, R. I., Cabanillas-Beltrán, H. & Calderon-Santoyo, M. 2015. Control of antracnose in mango (*Mangifera indica* L.) var. ataulfo by high hydrostatic pressure combined with moderated temperature and the biocontrol agent candidat famata. *Sylwan*, 159, 448-460.
- Rakesh, A., Mishra, J. P., Prasad, R., Sekhar, J. C., Gupta, D., Reddy, V. P. & Kumar, S. 2020. Isolation and in vitro evaluation of fungicides against *Pestalotiopsis mangiferae* causing grey blight of mango. *Journal of Pharmacognosy Phytochemistry*, 9, 1368-1370.
- Ramírez-Navas, J. S., Oviedo, M. Y. & Morales, J. S. 2016. Fungicidal effect of chitosan on rust inoculated in coffee. *Revista UGCiencia*, 79.
- Ramírez, M. A., Rodríguez, A. T., Alfonso, L. & Peniche, C. 2010. Chitin and its derivatives as biopolymers with potential agricultural applications. *Biotecnología aplicada*, 27, 270-276.
- Ramos-Cruz, M. A. 2015. *Extracción del quitosano para la producción y venta de píldoras reductoras de peso en la ciudad de Guayaquil*. Ingeniería en Ciencias Empresariales, Universidad de Especialidades Espíritu Santo.

- Ramos, L. R., Mantenegro, T. C., Rima, K. Á., Pereira, A. D. M., Barbosa, M. A., Estevez, M. M., Saraiva, M. P., De Oliveira, L. F., Magnani, M. & De Souza, E. L. 2018. Chitosan produced from Mucorales fungi using agroindustrial by-products and its efficacy to inhibit *Colletotrichum* species. *International journal of biological macromolecules*, 108, 635-641.
- Réblová, M., Miller, A. N., Rossman, A. Y., Seifert, K. A., Crous, P. W., Hawksworth, D. L., Abdel-Wahab, M. A., Cannon, P. F., Daranagama, D. A. & Wijayawardena, N. N. 2016. Recommendations for competing sexual- asexually typified generic names in Sordariomycetes (except Diaporthales, Hypocreales, and Magnaporthales). *IMA fungus*, 7, 131-153.
- Rinaudo, M. 2006. Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in polymer science*, 31, 603-632.
- Rincón, L., Higuera, B., Sánchez, J. I. M. E. N. A., Bustamante, S. & Buitrago, G. 2006. Growth and Development of *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *alatae* During Culture in Liquid Medium. *Acta Biológica Colombiana*, 11, 99-109.
- Rios-Ruiz, C. A., Bojórquez-Vejar, G., Cárdenas-Robles, A., Mariscal-Camacho, J., Justo-López, A. C. & Nito-Carreño, M. A. N. 2020. Chitosan as a fungicide from shrimp exoskeleton. *Revista de Ciencias Tecnológicas*, 151.
- Rodríguez-Pedroso, A. T., Plascencia-Jatomea, M., Bautista-Baños, S., Cortez-Rocha, M. O. & Ramírez-Arrebató, M. Á. 2016. Actividad antifúngica in vitro de quitosanos sobre *Bipolaris oryzae* patógeno del arroz. *Acta Agronomica*, 65, 98-103.
- Rodríguez-Pedroso, A. T., Ramírez-Arrebató, M. A., Rivero-Gonzalez, D., Bosquez-Molina, E., Barrera-Necha, L. L. & Bautista-Banos, S. 2009. Chemical- structural properties and biological activity of chitosan on phytopathogenic microorganisms. *Revista Chapingo. Serie horticultura*, 15, 307-317.
- Rodríguez-Romero, V. M., Villanueva-Arce, R., Trejo-Raya, A. B. & Bautista-Baños, S. 2019. Chitosan and *Pseudomonas fluorescens* extracts for *Alternaria alternata* control in tomato (*Solanum lycopersicum*). *Revista mexicana de fitopatología*, 37, 202-219.

- Rojo-Báez, I., Álvarez-Rodríguez, B., García-Estrada, R. S., León-Félix, J., Sañudo-Barajas, A. & Allende-Molar, R. 2017. Current status of *Colletotrichum* spp. in Mexico: Taxonomy, characterization, pathogenesis and control. *Revista mexicana de fitopatología*, 35, 549-570.
- Romero Serrano, A. & Pereira, J. 2020. Chitosan, a versatile biomaterial. State of the art from its obtaining to its multiple applications. *INGENIERÍA UC*, 118-135.
- SADR. 2020. *Mango mexicano: el sabor de la primavera* [Online]. Available: <https://www.gob.mx/agricultura/articulos/mango-mexicano-el-sabor-de-la-primavera?tab=#:~:text=M%C3%A9xico%20posee%20la%20denominaci%C3%B3n%20de,%C3%A1rboles%20de%20mangos%20distintos%20injertos>. [Accessed 2024].
- Sánchez-Domínguez, D., Bautista-Baños, S. & Castillo-Ocampo, P. 2007. Efecto del quitosano en el desarrollo y morfología de *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl. *Anales de Biología*, 29, 23-32.
- 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 physiology*, 99, 250-255.
- Santamaría-Basulto, F., Díaz-Plaza, R., Gutiérrez-Alonso, O., Santamaría-Fernández, J. & Larqué-Saavedra, A. 2011. Control de dos especies de *Colletotrichum* y su efecto sobre el color y sólidos solubles totales en frutos de papaya maradol. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*, 12, 19-27.
- Sarkar, A. K. 2016. Anthracnose diseases of some common medicinally important fruit plants. *Journal of Medicinal Plants Studies*, 4, 233-236.
- Schoch, C. L., Seifert, K. A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J. L., Levesque, C. A., Chen, W. & White, M. M. 2012. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the national academy of Sciences*, 109, 6241-6246.

- Seo, S., King, J. M. & Prinyawiwatkul, W. 2007. Simultaneous depolymerization and decolorization of chitosan by ozone treatment. *Journal of food science*, 72, C522-C526.
- Seuvre, A. M. & Mathlouthi, M. 2010. Solutions properties and solute–solvent interactions in ternary sugar–salt–water solutions. *Food chemistry*, 122, 455-461.
- Shahid, M., Zaidi, A., Khan, M. S., Rizvi, A., Saif, S. & Ahmed, B. 2017. Recent advances in management strategies of vegetable diseases. *Microbial strategies for vegetable production*, 197-226.
- SIAP, S. D. I. A. Y. P. 2018. *Atlas Agroalimentario 2012-2018* [Online]. México: Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. [Accessed Abril 17, 2024].
- SIAP, S. D. I. A. Y. P. 2019. *Panorama Agroalimentario 2019* [Online]. México: Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera [Accessed Abril 17, 2024].
- SIAP, S. D. I. A. Y. P. 2020. *Panorama Agroalimentario 2020* [Online]. México: Servicios de Información Agroalimentaria y Pesquera. Available: [https://nube.siap.gob.mx/gobmx\\_publicaciones\\_siap/](https://nube.siap.gob.mx/gobmx_publicaciones_siap/) [Accessed Abril 11, 2024].
- SIAP, S. D. I. A. Y. P. 2021. *Panorama Agroalimentario 2021* [Online]. México: Servicios de Información Agroalimentaria y Pesquera. Available: [https://nube.siap.gob.mx/gobmx\\_publicaciones\\_siap/pag/2021/Panorama-Agroalimentario-2021](https://nube.siap.gob.mx/gobmx_publicaciones_siap/pag/2021/Panorama-Agroalimentario-2021) [Accessed Abril 08, 2024].
- SIAP, S. D. I. A. Y. P. 2022. *Panorama Agroalimentario 2022* [Online]. México: Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. [Accessed Abril 14, 2024].
- SIAP, S. D. I. A. Y. P. 2023. *Panorama Agroalimentario 2023* [Online]. México: Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. [Accessed 16 April, 2024].
- Solano-Doblado, L. G. 2014. *Control poscosecha de papaya (Carica papaya L maradol) por tratamiento superficial de quitosano y mucílago de nopal*

- (*Opuntia ficus-indica*). Maestría en Ciencias Alimentarias, Universidad Veracruzana.
- Solomon, O. F. & Ciută, I. Z. 1962. Détermination de la viscosité intrinsèque de solutions de polymères par une simple détermination de la viscosité. *Journal of applied polymer science*, 6, 683-686.
- Struszczyk, M. 2002. Chitin and chitosan. Part II. Applications of chitosan. *Polimery*, 47, 396-403.
- Tanaka, S., Umemori, T., Hirai, K., Muramatsu, S., Kamimura, Y. & Araki, H. 2007. CDK-dependent phosphorylation of Sld2 and Sld3 initiates DNA replication in budding yeast. *Nature*, 445, 328-332.
- Thokchom, R. & Mandal, G. 2019. Effect of postharvest treatments on physical characteristics of mango. *Journal of Pharmacognosy Phytochemistry*, 8, 2239-2243.
- Torres-Calzada, C., Tapia-Tussell, R., Higuera-Ciapara, I., Martin-Mex, R., Nexticapan-Garcez, A. & Perez-Brito, D. 2015. Sensitivity of *Colletotrichum truncatum* to four fungicides and characterization of thiabendazole-resistant isolates. *Plant Disease*, 99, 1590-1595.
- Torres-Calzada, C., Tapia-Tussell, R., Higuera-Ciapara, I. & Perez-Brito, D. 2013. Morphological, pathological and genetic diversity of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose in papaya (*Carica papaya* L). *European Journal of Plant Pathology*, 135, 67-79.
- Tovar-Pedraza, J. M., Mora-Aguilera, J. A., Nava-Díaz, C., Lima, N. B., Michereff, S. J., Sandoval-Islas, J. S., Camara, M. P. S., Téliz-Ortiz, D. & Leyva-Mir, S. G. 2020. Distribution and Pathogenicity of *Colletotrichum* Species Associated With Mango Anthracnose in Mexico. *Plant disease*, 104, 137-146.
- Udayanga, D., Manamgoda, D. S., Liu, X., Chukeatirote, E. & Hyde, K. D. 2013. What are the common anthracnose pathogens of tropical fruits? *Fungal Diversity*, 61, 165-179.
- Uddin, M., Shefat, S., Afroz, M. & Moon, N. 2018. Management of anthracnose disease of mango caused by *Colletotrichum gloeosporioides*: A review. *Acta Scientific Agriculture*, 2, 169-177.

- Valdés, L. A., Calero Consuegra, D., Carballo, M. E., Capote, M., González, I. & Alvarez, J. M. 2017. Characterization morphological, cultural and pathogenic of isolated *Colletotrichum* sp. anthracnose producing in mango (*Mangifera indica* L.). *LA GRANJA. Revista de Ciencias de la Vida*, 26, 38-51.
- Varela, G., Coronado, L., Ochoa, V., Chacón, M. & Martínez, P. 2015a. Investigación y Ciencia. *Investigación y Ciencia*, 23, 16-21.
- Varela, G. B., Partida, L. D. C., Jiménez, V. A. O., López, M. A. C. & Martínez, P. G. 2015b. 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. *Investigación y Ciencia de la Universidad Autónoma de Aguascalientes*, 66, 16-21.
- Verlee, A., Mincke, S. & Stevens, C. V. 2017. Recent developments in antibacterial and antifungal chitosan and its derivatives. *Carbohydrate polymers*, 164, 268-283.
- Villafana, R. T., Rampersad, S. N. & Evolution 2020. Diversity, structure, and synteny of the cutinase gene of *Colletotrichum* species. *Ecology*, 10, 1425-1443.
- Vos, C. M., Yang, Y., De Coninck, B. & Cammue, B. P. A. 2014. Fungal (-like) biocontrol organisms in tomato disease control. *Biological control*, 74, 65-81.
- WALKER, G. M. & WHITE, N. A. 2017. Introduction to fungal physiology. *Fungi: biology applications*, 1-35.
- Wang, J. & Wang, H. 2011. Preparation of soluble p-aminobenzoyl chitosan ester by Schiff's base and antibacterial activity of the derivatives. *International journal of biological macromolecules*, 48, 523-529.
- Wang, W., Bo, S., Li, S. & Qin, W. 1991. Determination of the Mark-Houwink equation for chitosans with different degrees of deacetylation. *International Journal of Biological Macromolecules*, 13, 281-285.
- Weir, B. S., Johnston, P. R. & Damm, U. 2012. The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. *Studies in mycology*, 73, 115-180.

- Wiśniewska-Wrona, M., Niekraszewicz, A., Ciechańska, D., Pospieszny, H. & Orlikowski, L. B. 2007. Biological properties of chitosan degradation products. *Polish Chitin Society, Monograph*, 12, 149-156.
- Wu, L. Q., Lee, K., Wang, X., English, D. S., Losert, W. & Payne, G. F. 2005. Chitosan-mediated and spatially selective electrodeposition of nanoscale particles. *Langmuir*, 21, 3641-3646.
- Xiao, C. L., Mackenzie, S. J. & Legard, D. E. 2004. Genetic and pathogenic analyses of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates from strawberry and noncultivated hosts. *Phytopathology*, 94, 446-453.
- Yadav, M., Goswami, P., Paritosh, K., Kumar, M., Pareek, N., Vivekanand, V. & Bioprocessing 2019. Seafood waste: a source for preparation of commercially employable chitin/chitosan materials. *Bioresources*, 6, 1-20.
- Yamakawa, H. 1971. *Modern theory of polymer solutions*, Harper & Row.
- Zakaria, L. 2021. Diversity of *Colletotrichum* species associated with anthracnose disease in tropical fruit crops—A review. *Agriculture*, 11, 297.
- Zhang, N., Castlebury, L. A., Miller, A. N., Huhndorf, S. M., Schoch, C. L., Seifert, K. A., Rossman, A. Y., Rogers, J. D., Kohlmeyer, J. & Volkmann-Kohlmeyer, B. 2006. An overview of the systematics of the Sordariomycetes based on a four-gene phylogeny. *Mycologia*, 98, 1076-1087.
- Zhang, N., Rossman, A. Y., Seifert, K., Bennett, J. W., Cai, G., Cai, L., Hillman, B., Hyde, K. D., Luo, J. & Manamgoda, D. 2013. Impacts of the International Code of Nomenclature for algae, fungi and plants (Melbourne Code) on the scientific names of plant pathogenic fungi. *APS Features*.
- Zhou, Y., Zhang, L. & Zeng, K. 2016. Efficacy of *Pichia membranaefaciens* combined with chitosan against *Colletotrichum gloeosporioides* in citrus fruits and possible modes of action. *Biological Control*, 96, 39-47.
- Zhu, J., Zhu, Z., Lai, Z., Wang, R., Guo, X., Wu, X., Zhang, G., Zhang, Z., Wang, Y. & Chen, Z. 2002. Planar amperometric glucose sensor based on glucose oxidase immobilized by chitosan film on Prussian blue layer. *Sensors*, 2, 127-136.

