

Actividad Antifúngica del Quitosano en el Control de *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.:Fr.) Vuill. y *Mucor* spp.

Ana Niurka Hernández-Lauzardo, Maricruz Hernández-Martínez, Miguel Gerardo Velázquez-del Valle, Instituto Politécnico Nacional (IPN), Centro de Desarrollo de Productos Bióticos, Depto. de Interacciones Planta-Insecto, km 8.5 Carr. Yautepec-Jojutla San Isidro, Yautepec, Morelos, México CP 62730; **María Guadalupe Guerra-Sánchez**, IPN, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Depto. de Microbiología, Prolongación Carpio s/n Esquina Plan de Ayala, Colonia Plutarco Elías Calles, Delegación Miguel Hidalgo, México, D.F. CP 11340; y **Gloria Elena Melo-Giorgana**, Universidad Autónoma de Veracruz, Facultad de Ciencias Químicas, Prolongación Ote. 6, No. 1009, Apdo. Postal 215, Orizaba, Veracruz, México CP 23456. Correspondencia: aniuurka10@hotmail.com

(Recibido: Octubre 9, 2006 Aceptado: Marzo 2, 2007)

Hernández-Lauzardo, A.N., Hernández-Martínez, M., Velázquez-del Valle, M.G., Guerra-Sánchez, M.G. y Melo-Giorgana, G.E. 2007. Actividad antifúngica del quitosano en el control de *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.:Fr.) Vuill. y *Mucor* spp. Revista Mexicana de Fitopatología 25:109-113.

Resumen. Las enfermedades postcosecha han sido controladas mediante el empleo de fungicidas químicos; sin embargo, diferentes alternativas naturales de control han sido desarrolladas recientemente. En esta investigación, se evaluó la actividad antifúngica del quitosano a diferentes concentraciones (0.5, 1.0, 1.5 y 2.0 mg mL⁻¹) en condiciones *in vitro* e *in situ* sobre el desarrollo de *Rhizopus stolonifer* y *Mucor* spp. El crecimiento micelial y la esporulación de ambas cepas se inhibió a diferentes concentraciones de quitosano, siendo la concentración de 2 mg mL⁻¹ la mejor. La morfología de las esporas varió dependiendo del hongo evaluado, fueron más susceptibles las esporas de *R. stolonifer* porque presentaron variaciones en su área, forma y densidad óptica (2 y 1.5 mg mL⁻¹), mientras que *Mucor* spp. sólo manifestó variaciones de densidad óptica desde 1.5 mg mL⁻¹. Ambos fitopatógenos presentaron inhibición en la germinación de sus esporas (2.0 mg mL⁻¹). Los resultados *in situ* demostraron el potencial antifúngico del quitosano para controlar enfermedades postcosecha.

Palabras clave adicionales: Pudriciones postcosecha, características morfométricas, germinación, esporulación.

Abstract. Postharvest diseases have been controlled through chemical fungicides; however, recently, different natural alternatives have been developed. In this research, the antifungal activity of chitosan at different concentrations (0.5, 1.0, 1.5, and 2.0 mg mL⁻¹) was evaluated *in vitro* and *in situ* against *Rhizopus stolonifer* and *Mucor* spp. The mycelial growth and sporulation of both strains were inhibited at

different concentrations of chitosan, with the best results when 2 mg mL⁻¹ were applied. Spore morphology varied according to the fungus evaluated; *R. stolonifer* was more susceptible since spores showed variations in area, form, and optical density (2 and 1.5 mg mL⁻¹), while *Mucor* spp. showed variations only in optical density starting from 1.5 mg mL⁻¹. Both phytopathogens showed inhibition in spore germination (2.0 mg mL⁻¹). The *in situ* results demonstrated the antifungal potential of chitosan for control of postharvest diseases.

Additional keywords: Postharvest rots, morphometrics characteristic, germination, sporulation.

El quitosano, polímero de naturaleza policatiónica que se obtiene mediante un proceso de desacetilación de la quitina, ha sido ampliamente utilizado con fines biotecnológicos, entre los que destacan la inmovilización enzimática y el efecto como agente floculante (Sandford, 1989). En la agricultura se ha empleado como modificador de suelos, fungicida, inductor de resistencia (Ait-Barka *et al.*, 2004; Hoagland y Parris, 1996) y en el recubrimiento de frutos para prevenirlos de enfermedades postcosecha (Bautista-Baños *et al.*, 2006). Estas enfermedades han sido controladas durante muchos años mediante el uso de fungicidas químicos, los cuales debido a su intensa utilización han generado problemas de contaminación en el medio ambiente, complicaciones en la salud de los seres humanos y resistencia en los microorganismos que se tratan de controlar (Tripathi y Dubey, 2004). El quitosano figura dentro de las alternativas naturales más importantes para controlar las pudriciones postcosecha de los productos hortofrutícolas causadas por diferentes hongos fitopatógenos. Estudios previos han sido realizados en *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.:Fr.) Vuill. Se ha observado que el efecto del quitosano depende de varios

factores: grado de acetilación, polimerización, concentración y su forma de aplicación (Bautista-Baños *et al.*, 2004; El Ghaouth *et al.*, 1992 a, b; Savard *et al.*, 2002). Sin embargo, no se encontraron reportes previos en la literatura del empleo de quitosano en el control de *Mucor* spp. El objetivo de este trabajo fue evaluar la actividad antifúngica del quitosano sobre el crecimiento micelial, esporulación, características morfológicas y germinación de *R. stolonifer* y *Mucor* spp. en medio papa-dextrosa-agar (PDA). Así mismo, se evaluó el efecto de la utilización de este polímero en la prevención del desarrollo de la pudrición blanda en frutos de jitomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.).

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico. Las cepas de *Rhizopus stolonifer* y *Mucor* spp. se obtuvieron de frutos de jitomate de la variedad Saladette con un estado de madurez $\frac{3}{4}$ sazón, provenientes del mercado Centenario del municipio de Yauatepec, Morelos, México. Se mantuvieron en cámaras húmedas a temperatura ambiente (25°C) para permitir el desarrollo de los hongos fitopatógenos estudiados. Posteriormente, se tomaron fragmentos del micelio y se sembraron en cajas Petri con PDA a 25°C durante 96 h. Después de la aparición de las estructuras de reproducción se procedió al aislamiento e identificación de los hongos (Barnett y Hunter, 1972; Hernández-Lauzardo *et al.*, 2006; Schipper, 1984).

Preparación del quitosano: Se utilizó quitosano de bajo peso molecular (Sigma-Chemical Co. St. Louis, MI, USA). Se preparó una solución de quitosano de 10 mg mL⁻¹, disuelto en ácido acético. Se esterilizó en autoclave y posteriormente se tomaron las alícuotas correspondientes para adicionarse al medio PDA estéril y obtener concentraciones finales de 0.5, 1.0, 1.5 y 2.0 mg mL⁻¹.

Evaluaciones *in vitro*. Para cada uno de los hongos se emplearon cinco tratamientos que consistieron en: un testigo sin quitosano (PDA) y la aplicación de quitosano en placas de PDA en concentraciones de 0.5, 1.0, 1.5 y 2.0 mg mL⁻¹, respectivamente. Se tomaron fragmentos de 5 mm de inóculo (*R. stolonifer* o *Mucor* spp. crecidos en PDA), se sembraron individualmente en el centro de las cajas Petri conteniendo los tratamientos mencionados anteriormente y se incubaron durante 72 h a 25°C. Se establecieron tres réplicas por tratamiento y el experimento se repitió dos veces.

Crecimiento micelial. Consistió en medir el diámetro de las colonias con ayuda de un Vernier digital, cuando el micelio del tratamiento testigo cubrió la caja Petri (48 h).

Esporulación. Se evaluó a las 72 h de incubación de los hongos fitopatógenos. Se adicionaron 10 mL de agua destilada estéril, con una varilla de vidrio se raspó cuidadosamente la superficie de las cajas para arrastrar las esporas y éstas fueron transferidas a un frasco color ámbar, se adicionaron otros 10 mL de agua destilada estéril a la caja Petri y se repitió el mismo procedimiento. A cada frasco se le agregaron siete gotas de lactofenol para inhibir la germinación. El conteo de esporas se realizó agitando previamente la suspensión de esporas en

un Vortex, se tomaron 20 µL de la misma y se colocaron sobre una cámara de Neubauer para cuantificar las esporas en un microscopio óptico (40X) (Nikon, Alphaphot-2YS2). Los datos se procesaron considerando el factor de la cámara (50,000) y se reportaron en número de esporas mL⁻¹.

Características morfológicas de las esporas. Se tomaron alícuotas de 10 µL de la suspensión de esporas de los tratamientos referidos anteriormente, las cuales se colocaron en portaobjetos y se analizaron empleando un microscopio óptico (40x) acoplado a una cámara de video (DL 330 DAGE-MTI). Mediante un sistema de análisis de imágenes (Meta imaging series para Microsoft Windows versión 4.0, Universal Imaging Corporation, USA) se realizaron mediciones de área total (µm²), ancho (µm), largo (µm), altura (µm), densidad óptica y factor de forma elíptica.

Germinación de las esporas. La germinación se analizó en soluciones de quitosano y en discos de PDA. Alícuotas de 50 µL de una suspensión de 1×10^5 esporas mL⁻¹ se colocaron en tubos eppendorf (0.5 mL) y en discos de PDA (20 mm) con los tratamientos estudiados. Se incubaron durante 10 (*R. stolonifer*) y 16 h (*Mucor* spp.) a 25°C. El conteo de la germinación de 100 esporas por muestra se realizó en un microscopio óptico (40X) con un contador manual. Las esporas se consideraron germinadas cuando el largo del tubo germinal fue igual o excedió la longitud de la espора (El Ghaouth *et al.*, 1992b).

Evaluaciones *in situ*. Se emplearon frutos de jitomate de la variedad Saladette con un estado de madurez $\frac{3}{4}$ sazón provenientes de la central de abastos de Cuautla, Morelos. Se seleccionaron los frutos sanos que no presentaban síntomas de enfermedad o daños mecánicos, se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 1% durante 15 min, se lavaron con agua destilada estéril y se dejaron secar a temperatura ambiente sobre papel absorbente. Se establecieron los siguientes tratamientos: testigo, diclorán, los restantes con diferentes concentraciones de quitosano de bajo peso molecular (0.5, 1.0, 1.5 y 2.0 mg mL⁻¹). En la campana de flujo laminar a cada fruto se le hizo heridas de 1 cm de largo con un bisturí estéril y se asperjaron con una suspensión de esporas (1×10^5 esporas mL⁻¹) de *R. stolonifer* o *Mucor* spp., posteriormente se sumergieron en los tratamientos correspondientes, se dejaron secar y se mantuvieron en charolas de unicel sobre papel absorbente a 25°C durante 120 h.

Porcentaje de infección e índice de severidad. Al término del período de almacenamiento de 5 días, se contaron los frutos que presentaban síntomas de pudrición blanda en cada tratamiento, el número total de frutos se consideró como el 100%. El índice de severidad se determinó sobre la superficie de los frutos con cinco grados de daño en base a una escala establecida con las siguientes categorías 1 = 0, 2 = 1-25, 3 = 26-50, 4 = 51-75 y 5 = 76-100 % de daño visual por fruto. El índice se estableció mediante la ecuación descrita por Pérez *et al.* (1995), Índice de severidad = $\frac{X_1(1) + X_2(2) + X_3(3) + X_4(4) + X_5(5)}{N}$ donde: X_i = número de frutos enfermos por

cada grado de daño; 1, 2, 3, 4 y 5 = grado de daño en la escala utilizada y N = número total de frutos por unidad experimental.

Pérdida de peso. Los frutos de cada tratamiento se pesaron diariamente hasta el término del período de almacenamiento. La pérdida de peso se evaluó en base a la siguiente fórmula: pérdida de peso = (peso inicial-peso final/peso inicial) x 100 (Hernández-López, 2002).

Análisis estadístico. Los experimentos se desarrollaron mediante un diseño experimental completamente al azar en arreglo simple. Los datos fueron analizados mediante un análisis de varianza (ANOVA) con el programa Sigma Stat versión 2.0. La comparación de medias se realizó con la prueba de rangos múltiples de Tukey ($p < 0.05$) y la prueba de Dunn, según correspondiera.

RESULTADOS

Efecto del quitosano sobre el crecimiento micelial y esporulación de *R. stolonifer* y *Mucor* spp. En el Cuadro 1 se muestran los resultados del crecimiento micelial de *R. stolonifer* y del porcentaje de inhibición del mismo. Se observaron diferencias entre los tratamientos. El crecimiento micelial se redujo en comparación con el testigo que invadió la caja a las 48 h de incubación (86 mm). El menor crecimiento micelial se presentó con la concentración de 2.0 mg mL⁻¹ (32.9 mm), se obtuvo un porcentaje de inhibición del 61.7%. En el caso de *Mucor* spp., las diferencias en el crecimiento con relación al tratamiento testigo se observaron a partir de la aplicación de 1.0 mg mL⁻¹ de quitosano; el menor crecimiento micelial se obtuvo con la concentración de 2.0 mg mL⁻¹ (23.2 mm) la cual presentó un 52.1% de inhibición. La inhibición en la esporulación de *R. stolonifer* se reflejó a partir del tratamiento de 1.0 mg mL⁻¹ del biopolímero. El menor número de esporas se presentó con la concentración de 2.0 mg mL⁻¹ (0.4×10^5 esporas mL⁻¹). En *Mucor* spp. se observó una respuesta inhibitoria desde la concentración de 1 mg mL⁻¹, con el menor valor de esporulación (0.3×10^6 esporas mL⁻¹)

Cuadro 1. Crecimiento micelial, inhibición del crecimiento y esporulación de *Rhizopus stolonifer* y *Mucor* spp.

Tratamiento (quitosano mg mL ⁻¹)	Crecimiento micelial (mm) (48 h)	Inhibición del crecimiento micelial (%)	Esporulacón (No. de esporas mL ⁻¹) (72 h)
<i>Rhizopus stolonifer</i>			
Testigo	86 a	0	3.2×10^5 ab
0.5	63.9 b	25.7	3.5×10^5 a
1.0	39.2 c	54.4	1.1×10^5 b
1.5	36.2 d	57.9	0.9×10^5 b
2.0	32.9 e	61.7	0.4×10^5 c
<i>Mucor</i> spp.			
Testigo	48.4 a	0	1.9×10^6 a
0.5	48.3 a	0.2	1.7×10^6 a
1.0	47.4 b	2.1	1.3×10^6 b
1.5	39.4 c	18.6	0.8×10^6 c
2.0	23.2 d	52.1	0.3×10^6 d

Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas (Tukey, $P < 0.05$).

con la aplicación de 2.0 mg mL⁻¹ de quitosano.

Características morfométricas de las esporas de *R. stolonifer* y *Mucor* spp. *R. stolonifer* mostró una disminución del área (201 µm²) de sus esporas y del factor de forma elíptica (1.1) cuando se empleó la concentración de 2.0 mg mL⁻¹. La densidad óptica de sus esporas presentó cambios sólo con la aplicación de 1.5 mg mL⁻¹ (Cuadro 2). En el caso de *Mucor* spp. el área de las esporas (72 µm²) y el factor de forma elíptica (1.3) no presentaron diferencias entre los tratamientos. La densidad óptica (0.29) de las mismas disminuyó en las concentraciones de 1.5 y 2.0 mg mL⁻¹.

Germinación de las esporas de *R. stolonifer* y *Mucor* spp. La germinación de las esporas de *R. stolonifer* (Cuadro 3) se inhibió tanto en soluciones de quitosano como en discos de PDA, a partir de una concentración de 1.0 mg mL⁻¹. El menor porcentaje de germinación se observó en la concentración de 2.0 mg mL⁻¹ (54.5). De forma similar, *Mucor* spp. presentó el menor valor de germinación tanto en soluciones de quitosano como en discos de PDA en la concentración de 2.0 mg mL⁻¹ (31.5), se obtuvo un efecto inhibitorio con todas las concentraciones de quitosano aplicadas.

Evaluación de la aplicación de quitosano en frutos de jitomate. En el Cuadro 4 se muestra que el experimento inoculado con *R. stolonifer* presentó el mayor porcentaje de infección (99.5%), el menor valor se encontró al tratar los frutos con 2.0 mg mL⁻¹ (20.5%) de quitosano y una respuesta intermedia se obtuvo cuando se aplicó diclorán (60.9%). El menor índice de severidad se alcanzó cuando se aplicaron 2.0 mg mL⁻¹ de quitosano (0.7) y la menor pérdida de peso se observó con el tratamiento de 1.5 mg mL⁻¹ (4.7%). Con la cepa de *Mucor* spp. se evidenció un menor porcentaje de infección (40.4 %) e índice de severidad (1.3) cuando se trataron los frutos con diclorán. Sin embargo, la pérdida de peso no presentó diferencias entre los tratamientos.

Cuadro 2. Características morfométricas de las esporas de *Rhizopus stolonifer* y *Mucor* spp. a las 72 h de incubación.

Tratamientos (quitosano mg mL ⁻¹)	Área (µm ²)	Factor de forma elíptica	Densidad óptica
<i>Rhizopus stolonifer</i>			
Testigo	300 a	1.2 ab	0.33 ab
0.5	275 ab	1.2 ab	0.29 ab
1.0	261 ab	1.2 ab	0.31 ab
1.5	259 ab	1.1 b	0.29 b
2.0	201 c	1.1 b	0.36 a
<i>Mucor</i> spp.			
Testigo	72 a	1.3 a	0.42 a
0.5	71 a	1.2 a	0.45 a
1.0	69 a	1.2 a	0.38 ab
1.5	68 a	1.2 a	0.29 b
2.0	68 a	1.2 a	0.29 b

Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas (Dunn, $P < 0.05$).

Cuadro 3. Evaluación del porcentaje de germinación de las esporas de *Rhizopus stolonifer* y *Mucor* spp. en soluciones de quitosano y en discos de papa-dextrosa agar incubadas a 25°C.

Tratamientos (quitosano mg mL ⁻¹)	Soluciones germinación (%)	PDA germinación (%)
<i>Rhizopus stolonifer</i>		
Testigo	100 a	100 a
0.5	100 a	100 a
1.0	95.2 ab	83.7 b
1.5	81.3 bc	70.5 c
2.0	54.5 c	58.5 d
<i>Mucor</i> spp.		
Testigo	100 a	100 a
0.5	78.3 b	78.2 b
1.0	64.8 c	70.3 c
1.5	56.7 d	56.8 d
2.0	37.2 e	31.5 e

Letras diferentes indican diferencias estadísticas (Tukey, $P < 0.05$).

DISCUSIÓN

En general, en los experimentos *in vitro* se demostró la actividad antifúngica del quitosano; el crecimiento micelial y la esporulación de los hongos *R. stolonifer* y *Mucor* spp. variaron de acuerdo a la concentración de quitosano aplicada, se obtuvo una respuesta diferente dependiendo del género. *R. stolonifer* mostró mayor susceptibilidad ante la aplicación de este polímero, al presentar mayores valores de inhibición del crecimiento micelial. Se observó que a mayores concentraciones de este polímero, el efecto de inhibición es mayor, coincidiendo con estudios reportados anteriormente (Bautista-Baños *et al.*, 2004, 2005; El Ghaouth *et al.*, 1992 b). La esporulación de *R. stolonifer* y *Mucor* spp. disminuyó al incrementarse las concentraciones de quitosano, concordando con los resultados obtenidos por Bautista-Cerón (2004), quien observó una disminución proporcional en la esporulación de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. y Sacc. El área, la forma y la densidad de las esporangiosporas de *R. stolonifer* sólo se modificaron con la aplicación de altas concentraciones de quitosano. Sin embargo, en estudios previos no se observaron cambios en la forma de las esporas de *R. stolonifer* por adición de quitosano (Hernández-López, 2002). En *Mucor* spp. no se observaron cambios en la morfología de las esporas, excepto en los valores de densidad óptica que reflejaron variaciones con las concentraciones de 1.5 y 2.0 mg mL⁻¹. Por otra parte, la germinación de las esporas de *R. stolonifer* y *Mucor* spp. se inhibió con cualquiera de las formas de aplicación del quitosano; en otras investigaciones realizadas con *C. gloeosporioides*, se encontró que la respuesta fue diferente dependiendo de la incubación en soluciones de quitosano y se relacionó con el efecto fungicida o fungistático del mismo

Cuadro 4. Porcentaje de infección, índice de severidad y pérdida de peso en jitomate (*Lycopersicon esculentum*) inoculado con *Rhizopus stolonifer*, con *Mucor* spp. y tratado con quitosano o diclorán.

Tratamientos (quitosano mg mL ⁻¹)	Infección (%) ^y	Índice de severidad ^z	Pérdida de peso (%) ^y
<i>Rhizopus stolonifer</i>			
Testigo	99.5 a	3.3 a	7.5 a
diclorán	60.9 d	2.0 ab	5.4 ab
0.5	66.8 c	2.2 ab	5.9 ab
1.0	73.4 b	2.4 ab	7.0 a
1.5	33.6 e	1.1 ab	4.7 b
2.0	20.5 f	0.7 b	4.9 ab
<i>Mucor</i> spp.			
Testigo	99.7 a	3.3 a	8.3 a
diclorán	40.4 f	1.3 b	7.6 a
0.5	86.7 b	2.8 a	7.4 a
1.0	80.5 c	2.6 a	7.8 a
1.5	73.6 d	2.4 a	7.8 a
2.0	66.7 e	2.2 a	8.3 a

^yLetras diferentes indican diferencias estadísticas significativas (Tukey, $P < 0.05$).

^zLetras diferentes indican diferencias estadísticas significativas (Dunn, $P < 0.05$).

(Bautista-Baños *et al.*, 2005); este estudio evidencia que es muy importante el género y/o especie estudiada y la concentración de este polímero con actividad antifúngica. El quitosano mostró potencial antifúngico *in situ*, variando de acuerdo al género estudiado; a una misma concentración del polímero (2 mg mL⁻¹), *R. stolonifer* mostró mayor susceptibilidad que *Mucor* spp. en cuanto a infección e índice de severidad se refiere. El efecto del quitosano sobre frutos no ha sido del todo dilucidado, son varias las hipótesis que contribuyen a esclarecerlo, entre las que se encuentran, la reducción de las enzimas pectinolíticas (Reddy *et al.*, 2000), el incremento de hidrolasas antifúngicas (Zhang y Quantick, 1998) y la inducción de cambios ultraestructurales y citoquímicos en las hifas invasoras (El Ghaouth *et al.*, 1997). Por otra parte, también se ha demostrado que el efecto del quitosano varía dependiendo del momento en que se aplique (Zhang *et al.*, 2005). El uso del quitosano en el control de las enfermedades postcosecha es una alternativa de conservación de los productos hortícolas durante el almacenamiento, sin riesgos ecológicos, no obstante, es necesario continuar profundizando en los diferentes aspectos básicos que contribuyen a explicar el efecto de la aplicación de este polímero en los frutos.

Agradecimientos. Se agradece el apoyo financiero de la Secretaría de Investigación y Posgrado del Instituto Politécnico Nacional.

LITERATURACITADA

- Ait-Barka, E., Eullaffroy, P., Clément, C., and Vernet, G. 2004. Chitosan improves development and protects *Vitis vinifera* L. against *Botrytis cinerea*. Plant Cell Report 22:608-614.
- Barnett, H.L., and Hunter, B.B. 1972. Illustrated Genera of Imperfect Fungi. Burgess Publishing Co. Minneapolis, MN, USA. 241 p.
- Bautista-Baños, S., Hernández-Lauzardo, A.N., Velázquez-del Valle, M.G., Hernández-López, M., Ait-Barka, E., Bosquez-Molina, E., and Wilson, C.L. 2006. Chitosan as a potencial natural compounds to control pre and postharvest diseases of horticultural commodities. Crop Protection 25:108-118.
- Bautista-Baños, S., Hernández-López, M., and 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., Hernández-Lauzardo, A.N., Bautista-Cerón, M., and Melo-Giorgana, G.E. 2005. Effect of chitosan on *in vitro* development and morphology of two isolates of *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. and Sacc. Revista Mexicana de Fitopatología 23:62-67.
- Bautista-Cerón, M.K. 2004. Efecto del quitosano en el desarrollo *in vitro* y morfología de dos cepas del hongo *Colletotrichum gloeosporioides*. Tesis de licenciatura. Instituto Politécnico Nacional, CEPROBI. Yautepec, Morelos. México. 87 p.
- El Ghaouth, A., Arul, J., and Asselin, A. 1992a. Potential use of chitosan in postharvest preservation of fruits and vegetables. pp. 440-452. In: C.J. Brines, P.A. Sandfors, and J.P. Zikakis (eds.) Advances in Chitin and Chitosan. Elsevier Applied Science. New York, USA. 835 p.
- El Ghaouth, A., Arul, J., Grenier, J., and Asselin, A. 1992b. Antifungal activity of chitosan on two postharvest pathogens of strawberry fruits. Phytopathology 82:398-402.
- El Ghaouth, A., Arul, J., Wilson, C., and Benhamou, N. 1997. Biochemical and cytochemical aspects of the interactions of chitosan and *Botrytis cinerea* in bell pepper fruit. Postharvest Biology and Technology 12:183-194.
- Hernández- López, M. 2002. Uso potencial del quitosano y extractos vegetales en el control de *Colletotrichum gloeosporioides*, *Rhizopus stolonifer*, *Penicillium digitatum* y *Fusarium oxysporum* de la papaya (*Carica papaya*). Tesis de Maestría. Instituto Politécnico Nacional, CEPROBI. Yautepec, Morelos, México 101 p.
- Hernández-Lauzardo, A.N., Bautista-Baños, S., Velázquez-del Valle, M.G. y Trejo-Espino, J.L. 2006. Identification of *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.: Fr.) Vuill., causal agent of Rhizopus rot disease of fruits and vegetables. Revista Mexicana de Fitopatología 24:65-69.
- Hoagland, P.D., and Parris, N. 1996. Chitosan/pectin laminated films. Journal of Agricultural and Food Chemistry 44:1915-1919.
- Pérez, M.N., Flores, P.J., García, V.L. y Lozano, V.C. 1995. Factores genéticos y ambientales relacionados con la dinámica temporal y efecto de las enfermedades en frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) en Marín, Nuevo León, México. Revista Mexicana de Fitopatología 13:1-9.
- Reddy, B.M.V., Angers, P., Castaigne, F., and Arul, J. 2000. Chitosan effects on black mold rot and pathogenic factors produced by *Alternaria alternata* in postharvest tomatoes. Journal of the American Society for Horticultural Science 125:742-747.
- Sandford, P. 1989. Chitosan: Commercial uses and potential applications. pp. 51-69. In: G. Skjak-Braek, T. Anthosen, and P. Standford (eds.). Chitin and Chitosan. Sources, Chemistry, Biochemistry. Physical Properties and Applications. Elsevier Applied Science. New York, USA. 835 p.
- Savard, T., Beaulieu, C., Boucher, I., and Champagne, C.P. 2002. Antimicrobial activity of hydrolyzed chitosan against spoilage yeasts and lactic acid bacteria of fermented vegetables. Journal of Food Protection 65:828-833.
- Schipper, M.A. 1984. A Revision of the Genus *Rhizopus*. Studies in Mycology. Serie No. 25. Centraalbureau voor Schimmelcultures. Baarn, The Netherlands, 34 p.
- Tripathi, P., and Dubey, N.K. 2004. Exploitation of natural products as an alternative strategy to control postharvest fungal rotting of fruit and vegetables. Postharvest Biology and Technology 32:235-245.
- Zhang, D., and Quantick, P. 1998. Antifungal effects of chitosan coating on fresh strawberries and raspberries during storage. Journal of Horticultural Science and Biotechnology 73:763-767.
- Zhang, H., Zheng, X., Fu, C., and Xi, Y. 2005. Postharvest biological control of gray mold rot of pear with *Cryptococcus laurentii*. Postharvest Biology and Technology 35:79-86.