

# ***In vitro* AND *in vivo* ANTI-FUNGAL EFFECT OF CHITOSAN ON POST-HARVEST STRAWBERRY PATHOGENS**

## **EFFECTO ANTIFÚNGICO *in vitro* E *in vivo* DE QUITOSANO SOBRE PATÓGENOS DE FRESA EN POSTCOSECHA**

María T. Arceo-Martínez<sup>1</sup>, Rafael Jiménez-Mejía<sup>2</sup>, Rafael Salgado-Garciglia<sup>3</sup>, Gustavo Santoyo<sup>3</sup>, Joel E. López-Meza<sup>1</sup>, Pedro D. Loeza-Lara<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología-Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Apartado postal 53, Administración Chapultepec Morelia, Michoacán, México. <sup>2</sup>Licenciatura en Genómica Alimentaria, Universidad de La Ciénega del Estado de Michoacán de Ocampo. C.P. 59103. Avenida Universidad No. 3000, Colonia Lomas de la Universidad, Sahuayo, Michoacán, México. (pdloeza@ucienegam.edu.mx). <sup>3</sup>Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Edificio B3, Ciudad Universitaria, C.P. 58030, Morelia, Michoacán, México.

### **ABSTRACT**

Plant diseases with a negative impact on strawberry yield (*Fragaria × ananassa*), such as anthracnose and fruit rot, are mainly controlled using pesticides, which can cause harmful effects; thus, new control alternatives for fruit decay are needed. Chitosan is a compound already evaluated for fungal disease control at post-harvest. The aim of this study was to evaluate the *in vitro* and *in vivo* control activity of chitosan against post-harvest fungal strawberry pathogens, such as *Colletotrichum gloeosporioides*, *Colletotrichum acutatum*, *Fusarium oxysporum* and *Phytophthora* sp. The experimental design was completely random, with at least three repetitions for each chitosan treatment (5, 7.5, 10 and 15 mg mL<sup>-1</sup>). The data obtained were transformed with the  $\sqrt{x+0.5}$  function. A variance analysis ( $p \leq 0.05$ ), and a Tukey's test ( $p \leq 0.05$ ) were conducted using the SAS software. *In vitro* bioassays showed the anti-fungal effects of chitosan (5, 7.5, 10 and 15 mg mL<sup>-1</sup>) against all pathogens tested, which are related to the inhibition of mycelial growth and spore germination. The best results were observed in *F. oxysporum* and *Phytophthora* sp. with 100% of mycelial growth and spore germination inhibition. *In vivo* bioassays showed that strawberry fruit inoculated with mycelium or spores, and then immersed in chitosan (7.5, 10 and 15 mg mL<sup>-1</sup>), displayed a significant reduction ( $p \leq 0.05$ ) in disease severity index after two treatments: 1) exposure for 7 d at  $2 \pm 2.0$  °C, and 2) for 3 d at room temperature ( $25 \pm 2.0$  °C). The best results were observed in fruit treated with 15 mg mL<sup>-1</sup> chitosan, which showed a disease severity range of 1-1.2 for fruit

\*Autor responsable ❖ Author for correspondence.

Recibido: agosto, 2018. Aprobado: junio, 2019.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 53: 1297-1311. 2019.

### **RESUMEN**

Las enfermedades con efecto negativo en el rendimiento de la fresa (*Fragaria × ananassa*), como la antracnosis y la pudrición del fruto, se controlan principalmente con el uso de pesticidas que pueden generar efectos nocivos; así, nuevas alternativas se requieren para controlar la descomposición del fruto. El quitosano es un compuesto ya evaluado para el control de enfermedades fúngicas en postcosecha. El objetivo de este estudio fue evaluar la actividad *in vitro* e *in vivo* del quitosano frente a los patógenos fúngicos de la fresa en postcosecha, como *Colletotrichum gloeosporioides*, *Colletotrichum acutatum*, *Fusarium oxysporum* y *Phytophthora* sp. El diseño experimental fue completamente al azar, con al menos tres repeticiones para cada tratamiento con quitosano (5, 7.5, 10 y 15 mg mL<sup>-1</sup>). Los datos obtenidos se transformaron con la función  $\sqrt{x+0.5}$ . Un análisis de varianza ( $p \leq 0.05$ ) y la prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ ) se realizaron con el software SAS. Los bioensayos *in vitro* demostraron los efectos antifúngicos del quitosano (5, 7.5, 10 y 15 mg mL<sup>-1</sup>) contra todos los patógenos evaluados, los cuales están relacionados con la inhibición del crecimiento micelial y la germinación de las esporas. Los mejores resultados se observaron en *F. oxysporum* y *Phytophthora* sp., con una inhibición del 100% en el crecimiento micelial y la germinación de esporas. En los bioensayos *in vivo*, la fresa inoculada con micelio o esporas y luego sumergida en quitosano (7.5, 10 y 15 mg mL<sup>-1</sup>), presentó una disminución significativa ( $p \leq 0.05$ ) en el índice de severidad de la enfermedad después de dos tratamientos: 1) exposición durante 7 d a  $2 \pm 2.0$  °C, y 2) exposición durante 3 d a temperatura ambiente ( $25 \pm 2.0$  °C). Los mejores resultados se observaron en los frutos tratados con 15 mg mL<sup>-1</sup> de quitosano, con un intervalo de severidad de la enfermedad de 1-1.2 para los frutos inoculados con micelio y de 1-1.6 con esporas. Estos resultados demuestran

inoculated with mycelium and 1-1.6 with spores. These findings show that chitosan is a promising alternative in post-harvest disease control in strawberries.

**Key words:** *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora* sp., *Colletotrichum gloeosporioides*, *C. acutatum*, *Fragaria* × *ananassa*, anthracnose.

## INTRODUCTION

Mexico is one of the world's most important producers of strawberries (*Fragaria* × *ananassa* Duch.), and Zamora, a city in the state of Michoacán, is the highest producer and exporter with 338 764 t per year (SIAP-SAGARPA, 2016). But, pre- and post-harvest losses caused by pathogenic fungi in this region range between 10 and 100% of the production (Barrera and Sánchez, 2003).

The strawberry fruit is rich in bio-active compounds and nutrients such as anthocyanin, amino acids and vitamins, but it is highly perishable (Basu *et al.*, 2014). This risk is increased during transportation and storage because it is susceptible to deterioration by drying, mechanical injury, decay or infection by pathogenic microorganisms, especially fungi. Therefore, post-harvest decay of fruit caused by fungi represents a major loss in the food industry (Romanazzi *et al.*, 2013).

There are many post-harvest fungal diseases that cause damage to strawberries and have a negative impact on its yield. Anthracnose is one of the most important diseases and is caused by species of the genus *Colletotrichum* (Cano, 2013), such as *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. and Sacc., and *Colletotrichum acutatum* Simmonds, which cause similar lesions in strawberry fruits (Latinovic *et al.*, 2012). In addition, *Fusarium oxysporum* Schlecht., and the oomycete *Phytophthora* sp., were isolated from strawberry fruits, and showed to produce fruit rot disease (Agrios, 2010).

In Zamora the farmers use synthetic fungicides (Captafol<sup>®</sup>, Trioxil<sup>®</sup> and Vitavax<sup>®</sup>) to reduce the impact of post-harvest diseases. Nevertheless, there is a global concern regarding the overuse of fungicides on crops due to harmful effects on public health (Nicolopoulou-Stamati *et al.*, 2016), the ecosystem and the potential development of pathogen resistance (Hahn, 2014; Pisa *et al.*, 2015). Consequently, it is necessary to evaluate new control alternatives for fruit

que el quitosano es una alternativa prometedora para el control de enfermedades postcosecha de la fresa.

**Palabras clave:** *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora* sp., *Colletotrichum gloeosporioides*, *C. acutatum*, *Fragaria* × *ananassa*, antracnosis.

## INTRODUCCIÓN

México es uno de los productores de fresa (*Fragaria* × *ananassa* Duch.) más importante en el mundo, y Zamora, una ciudad en el estado de Michoacán, es el mayor productor y exportador con 338 764 t por año (SIAP-SAGARPA, 2016). Pero, en esta región, las pérdidas pre y postcosecha causadas por hongos patógenos varían de 10 a 100% de la producción (Barrera y Sánchez, 2003).

La fresa es rica en compuestos bioactivos y nutrientes como antocianinas, aminoácidos y vitaminas, pero es altamente perecedera (Basu *et al.*, 2014). Este riesgo aumenta durante el transporte y almacenamiento, ya que la fresa es susceptible al deterioro por desecación, lesión mecánica, descomposición o infección por microorganismos patógenos, en especial hongos. Por lo tanto, la descomposición fúngica de la fresa en postcosecha es una pérdida importante en la industria alimentaria (Romanazzi *et al.*, 2013).

Hay diversas enfermedades fúngicas postcosecha que afectan a la fresa y ejercen un efecto negativo en su rendimiento. La antracnosis es una de las enfermedades más importantes y es causada por especies del género *Colletotrichum* (Cano, 2013), como *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. y Sacc., y *Colletotrichum acutatum* Simmonds, que generan lesiones similares en las fresas (Latinovic *et al.*, 2012). Además, *Fusarium oxysporum* Schlecht. y el oomiceto *Phytophthora* sp. se aislaron en fresas y se demostró que generan la enfermedad de la pudrición de la fresa (Agrios, 2010).

En Zamora los agricultores usan fungicidas sintéticos (Captafol<sup>®</sup>, Trioxil<sup>®</sup> y Vitavax<sup>®</sup>) para reducir el impacto de las enfermedades postcosecha. Sin embargo, hay una preocupación mundial respecto al uso excesivo de fungicidas debido a los efectos nocivos en la salud pública (Nicolopoulou-Stamati *et al.*, 2016), el ecosistema y el desarrollo potencial de resistencia microbiana (Hahn, 2014; Pisa *et al.*, 2015). Por lo tanto, es necesario evaluar nuevas alternativas de control

decay and thus reduce the use of synthetic pesticides (Darolt *et al.*, 2016).

Chitosan (poly b-[1-4]-*N*-acetyl-D-glucosamine) is a cationic biopolymer produced by chemical deacetylation of chitin (2-acetamido-2-deoxy-b-D-glucose), that is found in exoskeletons of crustaceans and insects (López-Mata *et al.*, 2013). Chitosan is biodegradable, nontoxic, and environmentally friendly; therefore, it is recognized as a safe (GRAS) compound, and it is already evaluated for the control of fungal disease at post-harvest (Darolt *et al.*, 2016).

Chitosan inhibits mycelial growth, sporulation, and germination of different post-harvest fungi. Additionally, it induces defense mechanisms in plants and fruits against pathogens (Muñoz *et al.*, 2009). Furthermore, chitosan has been applied as an edible coating on fruits and vegetables, limiting their decay due to fungi and delaying their ripening (Bautista-Baños *et al.*, 2016).

The anti-fungal activity of chitosan against pathogenic fungi of strawberries was demonstrated mainly against *Botrytis cinerea* and *Rhizopus stolonifer* (Hernández-Muñoz *et al.*, 2008; Romanazzi, 2010; Perdonés *et al.*, 2012; Romanazzi *et al.*, 2013). However, there are no studies for evaluating the effectiveness of chitosan against other major post-harvest strawberry pathogens such as *C. gloeosporioides*, *C. acutatum*, *F. oxysporum* and the oomycete *Phytophthora* sp.

Our hypothesis was that chitosan inhibits mycelial growth and spore germination in *C. gloeosporioides*, *C. acutatum*, *F. oxysporum* and *Phytophthora* sp., therefore controlling the diseases caused by these post-harvest pathogens. The aim of this study was to evaluate the *in vitro* and *in vivo* controlling activity of chitosan against post-harvest fungal pathogens, such as *C. gloeosporioides*, *C. acutatum*, *F. oxysporum* and *Phytophthora* sp.

## MATERIALS AND METHODS

### Fruit material

Strawberry fruits cv. Camino Real, used in this study, were produced in Zamora and purchased from Morelos market, Sahuayo, Michoacán. The fruit was selected based on size uniformity, the absence of physical damage and fungal infection, and degree of ripening (>75% of the surface being red). This was to guarantee the highest uniformity on susceptibility towards the

de la descomposición del fruto y así reducir el uso de plaguicidas sintéticos (Darolt *et al.*, 2016).

El quitosano (poli b-[1-4]-*N*-acetil-D-glucosamina) es un biopolímero catiónico producido por la desacetilación química de la quitina (2-acetamido-2-deoxy-b-D-glucosa), que se encuentra en los exoesqueletos de crustáceos e insectos (López-Mata *et al.*, 2013). El quitosano es biodegradable, no tóxico y amigable con el ambiente, por lo que se le reconoce como un compuesto seguro (GRAS) y además se ha evaluado para el control de enfermedades fúngicas en postcosecha (Darolt *et al.*, 2016).

El quitosano inhibe el crecimiento micelial, la esporulación y la germinación de diferentes hongos postcosecha. Además, induce mecanismos de defensa contra patógenos en plantas y frutas (Muñoz *et al.*, 2009). También, el quitosano se ha aplicado como un recubrimiento comestible en frutas y vegetales, limita su descomposición fúngica y retrasa su maduración (Bautista-Baños *et al.*, 2016).

La actividad antifúngica del quitosano contra los hongos patógenos de la fresa se ha demostrado principalmente contra *Botrytis cinerea* y *Rhizopus stolonifer* (Hernández-Muñoz *et al.*, 2008; Romanazzi, 2010; Perdonés *et al.*, 2012; Romanazzi *et al.*, 2013). Sin embargo, no se ha evaluado la efectividad del quitosano contra otros importantes patógenos de la fresa en postcosecha como *C. gloeosporioides*, *C. acutatum*, *F. oxysporum* y el oomiceto *Phytophthora* sp.

La hipótesis fue que el quitosano inhibe el crecimiento micelial y la germinación de esporas en *C. gloeosporioides*, *C. acutatum*, *F. oxysporum* y *Phytophthora* sp., y así controla las enfermedades causadas por estos patógenos postcosecha. El objetivo de este estudio fue evaluar la actividad *in vitro* e *in vivo* del quitosano frente a hongos patógenos postcosecha como *C. gloeosporioides*, *C. acutatum*, *F. oxysporum* y *Phytophthora* sp.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Frutos

Las fresas cv. Camino Real, utilizadas en este estudio, fueron producidas en Zamora y compradas en el mercado Morelos de Sahuayo, Michoacán. Los frutos se seleccionaron con base en la uniformidad de tamaño, la ausencia de daños físicos e infección fúngica y el grado de maduración (>75% de la superficie de color rojo). Esto para garantizar la mayor uniformidad en la

infection by the pathogens. Before starting the treatments, the calyx of the fruits was removed and their surface was sterilized with 2% sodium hypochlorite for 1 min; then, they were washed three times with sterile distilled water and air-dried on absorbent paper in an aseptic environment (Hernández-Muñoz *et al.*, 2008; Alvarado *et al.*, 2011).

### Pathogenic fungi and inoculum preparation

Isolates of *C. gloeosporioides*, *C. acutatum*, *F. oxysporum* and *Phytophthora* sp., were kindly provided by Dr. Rafael Salgado-Garciglia from Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacán, and were preserved on potato dextrose agar (PDA, Bioxon, Mexico) at  $25 \pm 2$  °C. All isolates were identified according to their morphology. *Colletotrichum gloeosporioides* and *C. acutatum* were characterized according to Damm *et al.* (2012) and Weir *et al.* (2012). *Phytophthora* sp. was identified according to Martin *et al.* (2012), and *F. oxysporum* was recognized according to Hussain *et al.* (2012). For the *in vitro* and *in vivo* bioassays, mycelial fragments of the pathogens were obtained from five-day-old PDA cultures. Likewise, the spores were obtained from two-week-old PDA cultures using 10 mL of sterile distilled water containing 0.1% (v/v) Tween 20 (Hycel, Mexico). The suspension was filtered through sterile cotton. To ensure the fruit's infection, the spore concentration was adjusted to  $1 \times 10^6$  spores  $\text{mL}^{-1}$  with a hemocytometer (Optik Labor) (Rahman *et al.*, 2014).

### Chitosan preparation

Mid-molecular weight chitosan was purchased from Sigma-Aldrich (75-85% deacetylation) and prepared according to Darolt *et al.* (2016), with some modifications: 1) A stock solution ( $20 \text{ mg mL}^{-1}$ ) was prepared by dissolving 4 g of chitosan in 100 mL of distilled water and 2 mL of acetic acid (J. T. Baker, Mexico), and the solution was agitated for 24 h to 400 rpm; 2) the pH value of the stock solution was adjusted to 5.5 with NaOH 1 N (Meyer, Mexico); 3) distilled water was added to reach a total volume of 200 mL, and the solution was autoclaved at 120 °C, 20 psi, 15 min; 4) the stock solution was then diluted to final concentrations of 5, 7.5, 10 and  $15 \text{ mg mL}^{-1}$ , and the pH value was adjusted to 5.5.

### *In vitro* bioassays: inhibition of mycelial growth and spore germination

The effects of chitosan on mycelial growth of post-harvest strawberry pathogens were evaluated *in vitro* according to Muñoz

susceptibilidad a la infección por los patógenos. Antes de iniciar los tratamientos, el cáliz de los frutos se retiró y su superficie se esterilizó con hipoclorito de sodio al 2% por 1 min; luego, los frutos se lavaron tres veces con agua destilada estéril y se secaron al aire sobre papel absorbente en un ambiente aséptico (Hernández-Muñoz *et al.*, 2008; Alvarado *et al.*, 2011).

### Hongos patógenos y preparación del inóculo

Los aislados de *C. gloeosporioides*, *C. acutatum*, *F. oxysporum* y *Phytophthora* sp. fueron proporcionados amablemente por el Dr. Rafael Salgado-Garciglia del Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo en Morelia, Michoacán. Los aislados se mantuvieron en agar papa dextrosa (PDA, Bioxon, México) a  $25 \pm 2$  °C. Todos los aislados se identificaron morfológicamente. *Colletotrichum gloeosporioides* y *C. acutatum* se caracterizaron según Damm *et al.* (2012) y Weir *et al.* (2012). *Phytophthora* sp. se identificó de acuerdo con Martin *et al.* (2012), y *F. oxysporum* según Hussain *et al.* (2012). Para los bioensayos *in vitro* e *in vivo* se obtuvieron fragmentos miceliales de los patógenos de un cultivo en PDA de cinco días. De modo similar, las esporas de cultivos se obtuvieron en PDA de dos semanas con 10 mL de agua destilada estéril con 0.1% (v/v) de Tween 20 (Hycel, México). La suspensión se filtró a través de algodón estéril. Para asegurar la infección de los frutos, la concentración de esporas se ajustó a  $1 \times 10^6$  esporas  $\text{mL}^{-1}$  con un hemocitómetro (Optik Labor) (Rahman *et al.*, 2014).

### Preparación del quitosano

El quitosano de mediano peso molecular se compró de Sigma-Aldrich (75-85% de desacetilación) y se preparó de acuerdo con Darolt *et al.* (2016), con algunas modificaciones: 1) una solución patrón ( $20 \text{ mg mL}^{-1}$ ) se preparó disolviendo 4 g de quitosano en 100 mL de agua destilada y 2 mL de ácido acético (J. T. Baker, México); luego, la solución se agitó 24 h a 400 rpm; 2) el pH de la solución patrón se ajustó a 5.5 con NaOH 1 N (Meyer, México); 3) agua destilada se agregó hasta un volumen final de 200 mL, y la solución se esterilizó 15 min en una autoclave a 120 °C, 20 psi; 4) la solución patrón se diluyó a las concentraciones finales de 5, 7.5, 10 y  $15 \text{ mg mL}^{-1}$ , y el pH se ajustó a 5.5.

### Bioensayos *in vitro*: inhibición del crecimiento micelial y la germinación de esporas

Los efectos *in vitro* del quitosano en el crecimiento micelial de los patógenos de la fresa en postcosecha se evaluaron según Muñoz *et al.* (2009), con algunas modificaciones. El medio PDA se preparó con cuatro concentraciones de quitosano (5, 7.5, 10

*et al.* (2009), with some modifications. PDA medium was prepared with four chitosan concentrations (5, 7.5, 10 and 15 mg mL<sup>-1</sup>). The chitosan solution was added to the medium after autoclaving, and the resulting combination was placed in Petri dishes (60 mm; SyM, Mexico). PDA plugs (5 mm in diameter) containing actively growing pathogens were excised with a sterile cork borer from the edge of the cultures and placed upside-down in the center of each Petri dish. The inoculated plates were incubated at 25 ± 2.0 °C for 4-5 d until the growth of the negative control (sterile water with acetic acid 1%) reached the dish border. We included a positive control with thiabendazole (Tecto 60<sup>®</sup>, powder, 600 g i. a. kg<sup>-1</sup>, MSD AGVET) for *F. oxysporum*, *C. gloeosporioides* and *C. acutatum* and 80% fosepil-Al (Alliete<sup>®</sup> WG, powder, 800 g i. a. kg<sup>-1</sup>, BAYER CropScience) for *Phytophthora* sp. Also, an absolute control with PDA was included.

At the end of the incubation period, the mycelial growth was determined by measuring the colony diameter with a digital vernier caliper (Fisher Scientific, Mexico). With the information obtained, the Anti-fungal Index (AI) was calculated according to the formula:

$$AI(\%) = 1 - (CD_{assay} / CD_{control}) \times 100$$

where:  $CD_{assay}$  = Colony Diameter from the chitosan plates,  $CD_{control}$  = Colony Diameter from the negative control plates (Guo *et al.*, 2008). The experiments were conducted six times.

To evaluate the *in vitro* effect of chitosan on pathogenic spore germination, 50 mL of spore suspension, adjusted to 1 × 10<sup>6</sup> spores mL<sup>-1</sup>, were placed on PDA Petri dishes (60 mm diameter), which contained five concentrations (5, 7.5, 10 and 15 mg mL<sup>-1</sup>) of chitosan. Then, the Petri dishes were incubated at 25 ± 2.0 °C for 12-24 h. The same procedure was performed for the negative control (sterile water with acetic acid 1%). A positive control with thiabendazole (Tecto 60<sup>®</sup>, powder, 600 g i. a. kg<sup>-1</sup>, MSD AGVET) was included for *F. oxysporum*, *C. gloeosporioides* and *C. acutatum* and 80% fosepil-Al (Alliete<sup>®</sup> WG, powder, 800 g i. a. kg<sup>-1</sup>, BAYER CropScience) for *Phytophthora* sp. Approximately 100 spores per treatment within each replicate (six times) were subjected to microscopic observation (40X Leyca DM500 and coupled ICC50 HD camera) to evaluate pathogenic germination. Germination was considered to have occurred when the length of the germ tube equaled or exceeded the length of the spore (Alvarado *et al.*, 2011; Darolt *et al.*, 2016).

#### ***In vivo* bioassays: effect of chitosan on disease severity of strawberry fruits**

Before evaluation of the *in vivo* effects of chitosan on post-harvest strawberry diseases, the pathogenicity of isolates was

and 15 mg mL<sup>-1</sup>). La solución de quitosano se agregó al medio después de esterilizarla en la autoclave y la mezcla se colocó en placas Petri (60 mm; SyM, México). Discos de agar PDA (5 mm de diámetro) con patógenos en crecimiento activo se cortaron con un sacabocados estéril del borde de los cultivos y se colocaron boca abajo en el centro de cada caja Petri. Las placas inoculadas se incubaron 4-5 d a 25 ± 2.0 °C hasta que el crecimiento del testigo negativo (agua destilada con ácido acético al 1 %) alcanzó el borde de la caja. Un testigo positivo con tiabendazol (Tecto 60<sup>®</sup>, polvo, 600 g i. a. kg<sup>-1</sup> MSD AGVET) se incluyó para *F. oxysporum*, *C. gloeosporioides* y *C. acutatum* y con fosepil-Al al 80 % (Alliete<sup>®</sup> WG, polvo, 800 g i. a. kg<sup>-1</sup>, BAYER CropScience) para *Phytophthora* sp. También se incluyó un testigo absoluto con PDA.

Al final del periodo de incubación, el crecimiento micelial se determinó midiendo el diámetro de la colonia con un calibrador vernier digital (Fisher Scientific, México). Con la información obtenida, el Índice Antifúngico (IA) se calculó con la siguiente ecuación:

$$AI(\%) = 1 - (DC_{ensayo} / DC_{control}) \times 100$$

donde:  $DC_{ensayo}$  = Diámetro de las colonias en las placas con quitosano,  $DC_{control}$  = Diámetro de las colonias en las placas del control negativo (Guo *et al.*, 2008). Los experimentos se realizaron seis veces.

Para evaluar el efecto *in vitro* del quitosano sobre la germinación de las esporas patógenas, se colocaron 50 mL de la suspensión de esporas, ajustada a 1 × 10<sup>6</sup> esporas mL<sup>-1</sup>, en placas Petri (60 mm de diámetro) con medio PDA con cinco concentraciones (5, 7.5, 10 y 15 mg mL<sup>-1</sup>) de quitosano. Luego, las placas Petri se incubaron 12-24 h a 25 ± 2.0 °C. El mismo procedimiento se realizó para el testigo negativo (agua estéril con ácido acético al 1%). Un testigo positivo con tiabendazol (Tecto 60<sup>®</sup>, polvo, 600 g i. a. kg<sup>-1</sup>, MSD AGVET) se incluyó para *F. oxysporum*, *C. gloeosporioides* y *C. acutatum*, y con fosepil-Al al 80% (Alliete<sup>®</sup> WG, polvo, 800 g i. a. kg<sup>-1</sup>, BAYER CropScience) para *Phytophthora* sp. Para evaluar la germinación de las esporas patógenas, aproximadamente 100 esporas por tratamiento para cada repetición (seis veces) se observaron al microscopio (40X Leyca DM500 y cámara acoplada ICC50 HD). La germinación se consideró que había ocurrido cuando la longitud del tubo germinativo igualaba o excedía la longitud de la espora (Alvarado *et al.*, 2011; Darolt *et al.*, 2016).

#### **Bioensayos *in vivo*: efecto del quitosano en la severidad de la enfermedad de la fresa**

La patogenicidad de los aislados se evaluó antes de evaluar los efectos *in vivo* del quitosano en las enfermedades de la fresa

evaluated. The disinfected fruits were wounded (two wounds, 5 mm in depth) in the equatorial zone, and a PDA plug (3 mm in diameter) containing actively growing mycelium was excised with a sterile cork borer from the edge of culture grown at 25 °C, and the mycelial plug was placed upside-down on the wound. Fruits inoculated with an agar plug of sterile PDA+acetic acid 1% were used as negative control. The inoculated fruits were placed in sterile plastic containers with moist paper and incubated at  $25 \pm 2.0$  °C, for 5 d (Muñoz *et al.*, 2009).

After completion of the pathogenicity trial, the curative effect of chitosan in fruits inoculated with mycelium and spores was evaluated. The infection of the fruits with mycelium was conducted as mentioned in the pathogenicity experiment. The infection of the fruits with spores was performed by spraying a suspension adjusted to  $1 \times 10^6$  spores  $\text{mL}^{-1}$ , and  $1 \times 10^6$  sporangia  $\text{mL}^{-1}$  in the case of *Phytophthora* sp., on the wounded fruits (Bautista-Baños *et al.*, 2003; Perdonés *et al.*, 2012). Subsequently, the fruits (inoculated with mycelium or spores) were dried for 2 h and immersed for 60 s in chitosan at concentrations of 7.5, 10 and 15  $\text{mg mL}^{-1}$ , which were selected based on the results of the *in vitro* bioassays. The fruits were dried for 2 h and placed in sterile plastic containers with moist paper and refrigerated at  $2 \pm 2.0$  °C, for 7 d. Then, the fruits were stored at room temperature ( $25 \pm 2.0$  °C, 3 d) (Romanazzi *et al.*, 2013). The same procedure was followed for the negative controls (sterile water with acetic acid 1%). Each treatment was conducted in triplicate with 10 fruits per replica, and the experiment was repeated twice.

After the incubation time, the superficial infection of fruits caused by pathogens (fruit damage and mycelial growth) was registered. With this data we obtained the disease severity according to the scale used by Romanazzi *et al.* (2013), which has six degrees: 0: healthy fruit; 1: 1-20% fruit surface infected; 2: 21-40% fruit surface infected; 3: 41-60% fruit surface infected; 4: 61-80% fruit surface infected; and 5: more than 81% of the strawberry surface infected and showing mycelia and sporulation.

#### Experimental design and statistical analysis

The trials were arranged in a completely randomized design. For *in vitro* bioassays, four chitosan treatments were applied, and each treatment was repeated six times. For *in vivo* experiments three chitosan treatments were applied, and each treatment was conducted in triplicate with 10 fruits per replica, and the experiment was repeated twice. The data for the anti-fungal index, spores germination and disease severity were transformed with the  $\sqrt{x+0.5}$  function (Salgado-Garciglia *et al.*, 2008). A variance analysis ( $p \leq 0.05$ ), and a Tukey's test ( $p \leq 0.05$ ) were conducted using SAS software (version 9.1. SAS Inst. Inc., Cary, NC).

en postcosecha. Frutos desinfectados se lesionaron en la zona ecuatorial (dos lesiones, 5 mm de profundidad) y en la herida se colocó boca abajo un disco de agar PDA (3 mm de diámetro) con micelio en crecimiento activo obtenido del borde de un cultivo que creció a 25 °C con un sacabocados estéril. Como testigo negativo se usaron frutos inoculados con un disco de agar PDA estéril+ácido acético al 1%. Los frutos inoculados se colocaron en contenedores de plástico estériles con papel húmedo, y se incubaron 5 d a  $25 \pm 2.0$  °C (Muñoz *et al.*, 2009).

Después de completar la prueba de patogenicidad, se evaluó el efecto curativo del quitosano en los frutos inoculados con micelio y esporas. La infección de los frutos con micelio se realizó como se menciona en el experimento de patogenicidad. La infección de los frutos con esporas se realizó por aspersión de una suspensión ajustada a  $1 \times 10^6$  esporas  $\text{mL}^{-1}$ , y  $1 \times 10^6$  esporangios  $\text{mL}^{-1}$  en el caso de *Phytophthora* sp., en los frutos dañados (Bautista-Baños *et al.*, 2003; Perdonés *et al.*, 2012). Luego, los frutos (inoculados con micelio o esporas) se secaron 2 h y se sumergieron 60 s en una solución de quitosano a 7.5, 10 y 15  $\text{mg mL}^{-1}$ ; estas concentraciones se seleccionaron con base en los resultados de los bioensayos *in vitro*. Los frutos se secaron 2 h, se colocaron en contenedores de plástico estériles con papel humedecido y se refrigeraron 7 d a  $2 \pm 2.0$  °C. Después, los frutos se almacenaron a temperatura ambiente ( $25 \pm 2.0$  °C, 3 d) (Romanazzi *et al.*, 2013). El mismo procedimiento se usó para los testigos negativos (agua estéril con ácido acético al 1%). Cada tratamiento se realizó por triplicado con 10 frutos por repetición y el experimento se repitió dos veces.

Después del tiempo de incubación, se registró la infección superficial de los frutos por los patógenos (daño del fruto y crecimiento micelial). Con estos datos se obtuvo la severidad de la enfermedad conforme a la escala usada por Romanazzi *et al.* (2013), la cual tiene 6 grados: 0: fruta sana; 1: infección del 1-20% de la superficie del fruto; 2: infección del 21-40% de la superficie del fruto; 3: infección del 41-60% de la superficie del fruto; 4: infección del 61-80% de la superficie del fruto; y 5: infección de más del 81% de la superficie del fruto con micelio y esporulación.

#### Diseño experimental y análisis estadístico

El diseño experimental fue completamente aleatorizado. Para los bioensayos *in vitro* se aplicaron cuatro tratamientos con quitosano, y cada tratamiento se repitió seis veces. Para los experimentos *in vivo* se aplicaron tres tratamientos con quitosano y cada tratamiento se realizó por triplicado con 10 frutos por repetición; el experimento se repitió dos veces. Los datos del índice antifúngico, germinación de esporas y severidad de la enfermedad se transformaron con la función  $\sqrt{x+0.5}$  (Salgado-Garciglia *et al.*, 2008). Un análisis de varianza ( $p \leq 0.05$ ) y una prueba de

**RESULTS AND DISCUSSION**

***In vitro* effect of chitosan on mycelial growth of strawberry pathogens**

Table 1 shows the results on anti-fungal index (AI) obtained with the chitosan treatments (5, 7.5, 10 and 15 mg mL<sup>-1</sup>), Tecto 60<sup>®</sup> (5 mg mL<sup>-1</sup>) and Alliete<sup>®</sup> WG (2.5 mg mL<sup>-1</sup>) on the mycelial growth of *F. oxysporum*, *C. gloeosporioides*, *C. acutatum* and *Phytophthora* sp. The mycelial growth was significantly reduced, in comparison with the negative control, in all treatments. A completely inhibition of mycelial growth was observed with chitosan (except 5 mg mL<sup>-1</sup> concentration in *C. acutatum*), and Tecto 60<sup>®</sup>.

With regard to *F. oxysporum*, our results agree with Palma-Guerrero *et al.* (2008), who utilized chitosan (2 mg mL<sup>-1</sup>) and observed an inhibition of mycelial growth in *F. oxysporum* f. sp. *radices-lycopersici* of 77.2%, which suggests that the higher the concentration of chitosan, the stronger the inhibition to the growth of the fungus. In addition, they observed that this fungus was the most susceptible to chitosan, which agrees with our results. Also, López-Benítez *et al.*, (2005) reported a high activity (100% of inhibition) of Tecto 60<sup>®</sup> against *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*.

The inhibition results of *C. gloeosporioides* agrees with Bautista-Baños *et al.* (2003), who used chitosan concentrations of 0.5 to 3% and the

Tukey (p≤0.05) se realizaron con el software SAS (versión 9.1. SAS Inst. Inc., Cary, NC).

**RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

**Efecto *in vitro* del quitosano en el crecimiento micelial de los patógenos de fresa**

El Cuadro 1 muestra el índice antifúngico (IA) obtenido con los tratamientos de quitosano (5, 7.5, 10 y 15 mg mL<sup>-1</sup>), Tecto 60<sup>®</sup> (5 mg mL<sup>-1</sup>) y Alliete<sup>®</sup> WG (2.5 mg mL<sup>-1</sup>) sobre el crecimiento micelial de *F. oxysporum*, *C. gloeosporioides*, *C. acutatum* y *Phytophthora* sp. El crecimiento micelial disminuyó significativamente, en comparación con el testigo negativo, en todos los tratamientos. Una inhibición completa del crecimiento micelial se observó con quitosano (excepto con la concentración de 5 mg mL<sup>-1</sup> en *C. acutatum*) y Tecto 60<sup>®</sup>.

Respecto a *F. oxysporum*, nuestros resultados coinciden con los de Palma-Guerrero *et al.* (2008), quienes utilizaron quitosano (2 mg mL<sup>-1</sup>) y observaron la inhibición del 77.2% del crecimiento micelial de *F. oxysporum* f. sp. *radices-lycopersici*, lo que sugiere que a mayor concentración de quitosano, mayor es la inhibición del crecimiento fúngico. Además, ellos observaron que este hongo era el más susceptible al quitosano, lo que coincide con nuestros resultados. También López-Benítez *et al.* (2005) reportaron alta actividad (inhibición

**Table 1.** Anti-fungal index of chitosan on the mycelial growth of strawberry pathogens after 4 d of inoculation.  
**Cuadro 1.** Índice antifúngico de quitosano en el crecimiento micelial de los patógenos de fresa después de 4 d de inoculación.

Chitosan (mg mL <sup>-1</sup> )	Anti-fungal Index (%)			
	<i>F. oxysporum</i>	<i>Phytophthora</i> sp.	<i>C. gloeosporioides</i>	<i>C. acutatum</i>
15	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>
10	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>
7.5	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>
5	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	64.5 <sup>b</sup>
Positive control <sup>†</sup>	100 <sup>a</sup>	76.6 <sup>b</sup>	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>
Negative control <sup>‡</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>c</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>c</sup>

Values with different letter in a column are different statistically (Tukey; p≤0.05), n=6. <sup>†</sup>Positive control: Tecto 60<sup>®</sup> (Thiabendazole, 5 mg mL<sup>-1</sup>, used on *F. oxysporum*, *C. gloeosporioides* and *C. acutatum*) and Alliete<sup>®</sup> WG (80% foseil-Al, 2.5 mg mL<sup>-1</sup>, utilized on *Phytophthora* sp.). <sup>‡</sup>Negative control: PDA, acetic acid 1%, pH 5.5. <sup>‡</sup> Los valores con diferente letra en una columna son estadísticamente diferentes (Tukey; p≤0.05), n=6. <sup>†</sup>Testigo positivo: Tecto 60<sup>®</sup> (Tiabendazol, 5 mg mL<sup>-1</sup>, usado en *F. oxysporum*, *C. gloeosporioides* y *C. acutatum*) y Alliete<sup>®</sup> WG (Fosetil-Al al 80%, 2.5 mg mL<sup>-1</sup>, utilizado en *Phytophthora* sp.). <sup>‡</sup>Testigo negativo: PDA, ácido acético al 1%, pH 5.5.

mycelial growth of *C. gloeosporioides*, isolated from infected papaya fruits was completely inhibited by chitosan concentrations of 2.5 and 3% after 7 d of incubation. Also, a high activity of Tecto 60<sup>®</sup> against *C. gloeosporioides* in field conditions, with 88.3% of healthy fruit, was reported by Orozco-Santos *et al.* (2016). And the incorporation of 4 mg mL<sup>-1</sup> chitosan to PDA adversely affected the mycelial growth of *C. acutatum* and reduced colonial diameter in a 41% (Barbosa e Marcelo, 2009). This supports the results of our study, since chitosan (5 mg mL<sup>-1</sup>) reduced mycelial growth in 64.5%. No information was found about the effect of Tecto 60<sup>®</sup> against *C. acutatum*.

With regard to *Phytophthora* sp. inhibition, these results support the work of Sunpapao and Pornsuriya, (2014), who utilized chitosan (0.125 to 2 mg mL<sup>-1</sup>) and observed inhibition of mycelial growth in *P. palmivora* in all treatments. A 2 mg mL<sup>-1</sup> concentration caused 93.2% of inhibition, after 7 d of incubation. Also, Alliete<sup>®</sup> WG shows a high anti-fungal activity against *Phytophthora* sp. (Casafe, 2009). Accordingly, it is important to emphasize that the minimal concentrations of chitosan that showed comparable effects to chemical fungicides were 7.5 mg mL<sup>-1</sup> with Tecto 60<sup>®</sup>, and 5 mg mL<sup>-1</sup> with Alliete<sup>®</sup> WG. Interestingly, our study showed the anti-fungal effect of chitosan on the oomycete *Phytophthora* sp., which represents one of the most aggressive pathogenic microorganisms that affects a wide variety of crops, trees and shrubs. The damage this pathogen causes is one of the main reasons for the search for new control methods.

Likewise, this anti-fungal activity is consistent with previous studies which indicate that the polycationic nature of this biopolymer is assumed to be a crucial factor in anti-fungal activity. Thus, the positively charged amino groups from the glucosamine units may interact with the negatively charged extracellular components of the fungi. As a result, some of the cell barriers are altered, blocking the entry of nutrients or causing the release of intracellular content (Verlee *et al.*, 2017). However, there are chitosan-resistant fungi, in which the chitosan is unable to break the cell membrane. In this sense, Palma-Guerrero *et al.* (2010) carried out a study of the phospholipid fatty acid composition of the chitosan-resistant fungi. The results showed that a mutant of *Neurospora crassa* with a reduced amount of unsaturated fatty acids, decreased

del 100%) de Tecto 60<sup>®</sup> contra *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*.

Los resultados de la inhibición de *C. gloeosporioides* coinciden con los de Bautista-Baños *et al.* (2003), quienes usaron concentraciones de quitosano de 0.5 a 3% y el crecimiento micelial de *C. gloeosporioides*, aislado de frutos de papaya infectados, fue inhibido completamente por las concentraciones de 2.5 y 3% de quitosano después de 7 d de incubación. Además, Orozco-Santos *et al.* (2016) reportaron una elevada actividad de Tecto 60<sup>®</sup> contra *C. gloeosporioides* en condiciones de campo, con 88.3% de frutos sanos. Y la incorporación de 4 mg mL<sup>-1</sup> de quitosano al medio PDA tuvo efecto negativo en el crecimiento micelial de *C. acutatum* y redujo el diámetro de las colonias en 41% (Barbosa y Marcelo, 2009). Esto corrobora los resultados de nuestro estudio, ya que el quitosano (5 mg mL<sup>-1</sup>) disminuyó el crecimiento micelial en un 64.5%. No se encontró información sobre el efecto de Tecto 60<sup>®</sup> contra *C. acutatum*.

Respecto a la inhibición de *Phytophthora* sp., estos resultados corroboran el estudio de Sunpapao y Pornsuriya (2014), quienes utilizaron quitosano (0.125 a 2 mg mL<sup>-1</sup>) y observaron la inhibición del crecimiento micelial en *P. palmivora* en todos los tratamientos. Una concentración de 2 mg mL<sup>-1</sup> inhibió el 93.2% después de 7 d de incubación. También, Alliete<sup>®</sup> WG presentó una elevada actividad antifúngica contra *Phytophthora* sp. (Casafe, 2009). En consecuencia, es importante enfatizar que las concentraciones mínimas de quitosano que mostraron efectos comparables a los de los fungicidas químicos fueron 7.5 mg mL<sup>-1</sup> con Tecto 60<sup>®</sup> y 5 mg mL<sup>-1</sup> con Alliete<sup>®</sup> WG. Interesantemente, nuestro estudio demostró el efecto antifúngico del quitosano en el oomiceto *Phytophthora* sp., que es uno de los microorganismos patógenos más agresivos y afecta una amplia variedad de cultivos, árboles y arbustos. El daño provocado por este patógeno es una de las principales razones de la búsqueda de nuevos métodos de control.

Asimismo, está actividad antifúngica coincide con estudios previos, los cuales indican que la naturaleza policationica de este biopolímero es un factor crucial para la actividad antifúngica. Así, los grupos amino con carga positiva de las unidades de glucosamina pueden interactuar con los componentes fúngicos extracelulares con carga negativa. En consecuencia, se alteran algunas de las barreras celulares,

the anti-fungal activity of chitosan compared to the wild type. This suggests that membrane fluidity affects the activity of chitosan, and the action mechanism of this compound depends on the fungi itself.

***In vitro* effect of chitosan on spore germination of strawberry pathogens**

The spore germination of *F. oxysporum* and *Phytophthora* sp. was completely inhibited by chitosan (0% spore germination) at all concentrations tested, and by positive controls (Tecto 60® and Alliete® WG) compared with the negative controls ( $p \leq 0.05$ ). In contrast, the spore germination of *C. gloeosporioides* was completely inhibited only by chitosan at 15 mg mL<sup>-1</sup> and by Tecto 60®. However, chitosan at 5, 7.5 and 10 mg mL<sup>-1</sup> exerted some inhibition ( $p \leq 0.05$ ) allowing spore germination of 70, 51 and 8%, respectively (Table 2). The spores of *C. acutatum* were less sensitive to chitosan, as none of the concentrations tested completely inhibited germination, only Tecto 60®. Nevertheless, all the chitosan treatments showed inhibition ( $p \leq 0.05$ ) compared with the negative control, with 73, 59, 17 and 10% spore germination at 5, 7.5, 10 and 15 mg mL<sup>-1</sup>, respectively (Table 2).

Spore germination of *F. oxysporum* and sporangia of *Phytophthora* sp. were more sensitive to chitosan concentrations than *C. gloeosporioides* and *C. acutatum*, because all concentrations tested completely inhibited

bloqueando la entrada de nutrientes o causando la liberación del contenido celular (Verlee *et al.*, 2017). Sin embargo, hay hongos resistentes al quitosano, en los cuales este compuesto no puede romper la membrana celular. En este sentido, Palma-Guerrero *et al.* (2010) estudiaron la composición de ácidos grasos en la membrana fosfolipídica de los hongos resistentes al quitosano. Los resultados mostraron que una mutante de *Neurospora crassa* con una cantidad reducida de ácidos grasos insaturados, disminuyó la actividad antifúngica del quitosano en comparación con la cepa silvestre. Esto sugiere que la fluidez de la membrana afecta la actividad del quitosano, y el mecanismo de acción de este compuesto depende de los hongos en sí.

**Efecto *in vitro* del quitosano en la germinación de esporas de los patógenos de fresa**

La inhibición completa de la germinación de esporas (0% de esporas germinadas) de *F. oxysporum* y *Phytophthora* sp. se observó en todas las concentraciones de quitosano evaluadas y en los testigos positivos (Tecto 60® y Alliete® WG), a diferencia de los testigos negativos ( $p \leq 0.05$ ). En contraste, la germinación de esporas de *C. gloeosporioides* fue inhibida por completo solo con la concentración de 15 mg mL<sup>-1</sup> de quitosano y por Tecto 60®. Sin embargo, el quitosano a 5, 7.5 y 10 mg mL<sup>-1</sup> ejerció cierta inhibición ( $p \leq 0.05$ ),

**Table 2.** Effect of chitosan on spore germination of strawberry pathogens after 24 h of incubation at 25 °C.  
**Cuadro 2.** Efecto de quitosano en la germinación de esporas de los patógenos de fresa después de 24 h de incubación a 25 °C.

Chitosan (mg mL <sup>-1</sup> )	Spore germination (%)			
	<i>F. oxysporum</i>	<i>Phytophthora</i> sp.	<i>C. gloeosporioides</i>	<i>C. acutatum</i>
15	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	10 <sup>a</sup>
10	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	70 <sup>d</sup>	17 <sup>b</sup>
7.5	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	51 <sup>c</sup>	59 <sup>c</sup>
5	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	8 <sup>b</sup>	73 <sup>d</sup>
0	100 <sup>b</sup>	100 <sup>b</sup>	100 <sup>c</sup>	100 <sup>c</sup>
Positive control <sup>†</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
Negative control <sup>‡</sup>	100 <sup>b</sup>	100 <sup>b</sup>	100 <sup>c</sup>	100 <sup>c</sup>

Values with different letter in a column are different statistically (Tukey;  $p \leq 0.05$ ), n=6. <sup>†</sup>Positive control: Tecto 60® (Thiabendazole, 5 mg mL<sup>-1</sup>, utilized on *F. oxysporum*, *C. gloeosporioides* and *C. acutatum*) and Alliete® WG (80% fosetil-Al, 2.5 mg mL<sup>-1</sup>, utilized on *Phytophthora* sp.). <sup>‡</sup>Negative control: PDA, acetic acid 1%, pH 5.5. <sup>§</sup>Los valores con diferente letra en una columna son estadísticamente diferentes (Tukey;  $p \leq 0.05$ ), n=6. <sup>†</sup>Testigo positivo: Tecto 60® (Tiabendazol, 5 mg mL<sup>-1</sup>, usado en *F. oxysporum*, *C. gloeosporioides* y *C. acutatum*) y Alliete® WG (Fosetil-Al al 80%, 2.5 mg mL<sup>-1</sup>, utilizado en *Phytophthora* sp.). <sup>‡</sup>Testigo negativo: PDA, ácido acético al 1%, pH 5.5.

germination. This agrees with the results described by Palma-Guerrero *et al.* (2008) that 1 mg mL<sup>-1</sup> chitosan completely inhibited spore germination in *F. oxysporum* f. sp. *radices-lycopersici*, and by González-Peña *et al.* (2016), who observed that chitosan concentrations higher than 2.5 mg mL<sup>-1</sup> completely inhibited the sporangia germination of *P. palmivora*.

Spore germination of *C. gloeosporioides* and *C. acutatum* were less sensitive to chitosan concentrations, since only 15 mg mL<sup>-1</sup> completely inhibited spore germination in *C. gloeosporioides*. These results confirm that spores of both fungi are resistance structures, whose objective is reproduction (Agris, 2010).

### Control of post-harvest diseases in strawberry fruits inoculated with mycelium and spores

Before the *in vivo* experiments, a pathogenicity trial was conducted and the results showed that the fungi and pseudo-fungi evaluated in this study, were pathogenic to strawberry fruits cv. Camino Real after 5 d of inoculation (data not shown). But strawberries immersed in all of the tested chitosan treatments displayed a reduction ( $p \leq 0.05$ ) in infection caused by mycelium (Figure 1) and spores (Figure 2) from pathogens. In addition, a reduced disease severity index was observed compared to negative controls after 7 d of incubation at 2 °C and after 3 d of incubation at 25 °C (Tables 3 and 4), principally when a 15 mg mL<sup>-1</sup> concentration was utilized.

In strawberries inoculated with mycelium, the highest anti-fungal effect ( $p \leq 0.05$ ) was observed in fruits treated with chitosan (15 mg mL<sup>-1</sup>) (Figure 1). These results indicated that the infected fruit surface was between 1 and 20%. For the rest of the fruits treated with 7.5 and 10 mg mL<sup>-1</sup> chitosan, damaged fruit surface was between 20 and 60%; however, in the negative controls, the damaged fruit surface was between 41 and 80% (Table 3).

In strawberries inoculated with fungal spores, the lowest disease severity index ( $p \leq 0.05$ ) was observed for fruits treated with 15 mg mL<sup>-1</sup> chitosan (Figure 2). These results indicated that the fruit infected surface was between 1 and 20%. For fruits treated with chitosan at 7.5 and 10 mg mL<sup>-1</sup> it represented a damaged fruit surface between 1 and 40%, while in the negative controls the fruit infected surface was between 41 and 80% (Table 4).

permitiendo la germinación del 70, 51 y 8%, respectivamente (Cuadro 2). Las esporas de *C. acutatum* fueron menos sensibles al quitosano, ya que ninguna de las concentraciones evaluadas inhibió completamente la germinación, solo Tecto 60®. Sin embargo, todos los tratamientos con quitosano ejercieron algún grado de inhibición ( $p \leq 0.05$ ) en comparación con el testigo negativo, con 73, 59, 17 y 10% de las esporas germinadas con 5, 7.5, 10 y 15 mg mL<sup>-1</sup>, respectivamente (Cuadro 2).

La germinación de esporas de *F. oxysporum* y esporangios de *Phytophthora* sp. fue más sensible a las concentraciones de quitosano que *C. gloeosporioides* y *C. acutatum*, porque todas las concentraciones evaluadas inhibieron la germinación por completo. Esto coincide con los resultados descritos por Palma-Guerrero *et al.* (2008), de que 1 mg mL<sup>-1</sup> de quitosano inhibió por completo la germinación de esporas de *F. oxysporum* f. sp. *radices-lycopersici*, y por González-Peña *et al.* (2016), quienes observaron que las concentraciones de quitosano mayores a 2.5 mg mL<sup>-1</sup> inhibieron por completo la germinación de los esporangios de *P. palmivora*.

La germinación de las esporas de *C. gloeosporioides* y *C. acutatum* fue menos sensible a las concentraciones de quitosano, ya que solo la concentración de 15 mg mL<sup>-1</sup> inhibió por completo la germinación de las esporas de *C. gloeosporioides*. Estos resultados confirman que las esporas de ambos hongos son estructuras de resistencia, cuyo objetivo es la reproducción (Agris, 2010).

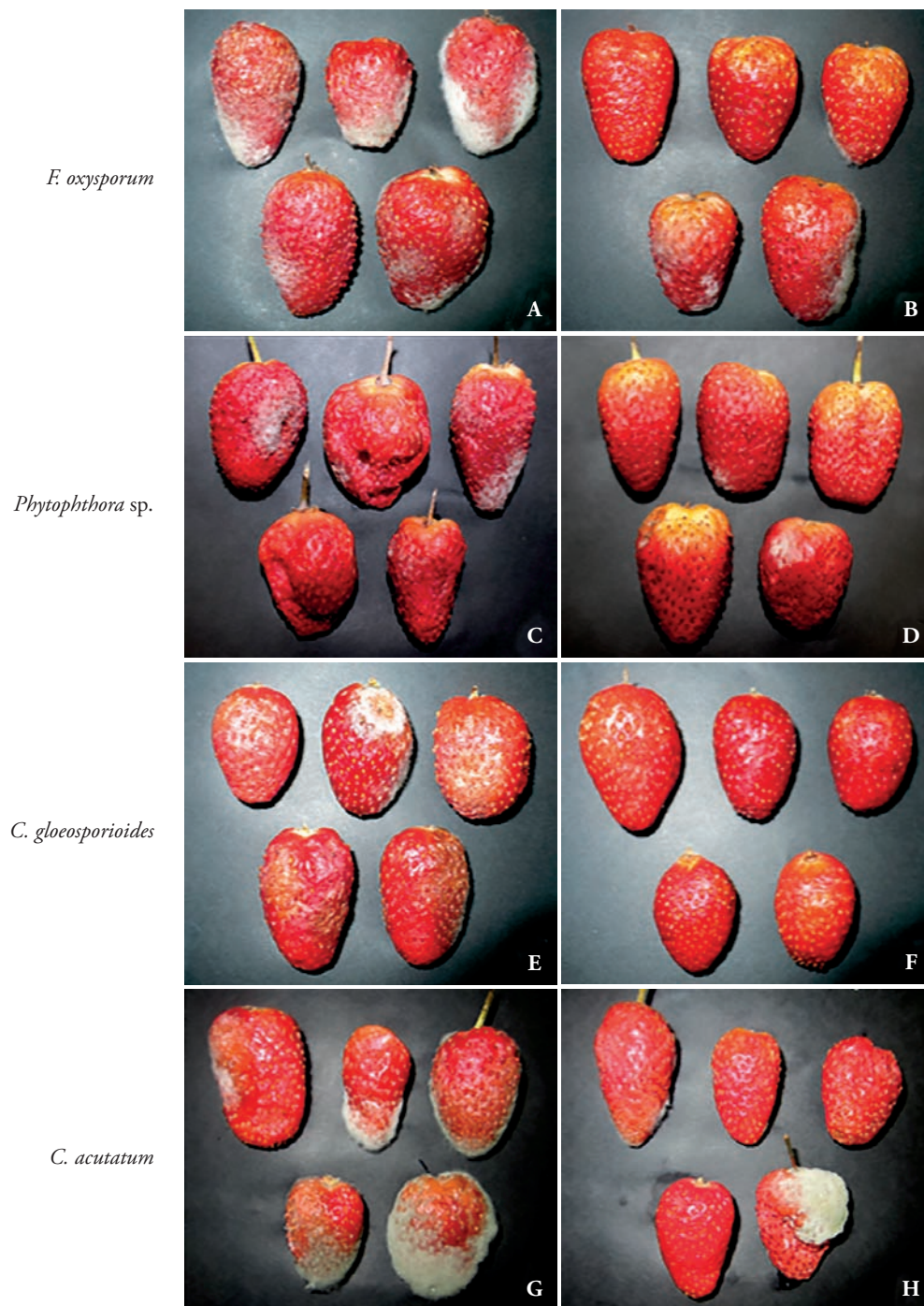
### Control de las enfermedades de fresa postcosecha inoculadas con micelio y esporas

Antes de los experimentos *in vivo*, se realizó una prueba de patogenicidad y los resultados mostraron que los hongos y el pseudohongo evaluados en este estudio eran patógenos de la fresa cv. Camino Real después de 5 d de inoculación (datos no mostrados). Pero las fresas sumergidas en todos los tratamientos de quitosano evaluados presentaron una reducción ( $p \leq 0.05$ ) de la infección causada por el micelio (Figura 1) y las esporas (Figura 2) de los patógenos. Además, se observó un índice reducido de severidad de la enfermedad comparado con los testigos negativos después de 7 d de incubación a 2 °C y después de 3 d de incubación a 25 °C (Cuadros 3 y 4), principalmente cuando se utilizó la concentración de 15 mg mL<sup>-1</sup>.



**Figure 1.** Effect of chitosan on *F. × ananassa* cv. Camino Real fruits inoculated with mycelium from pathogens after 10 d of inoculation. A, C, E, G: negative control, PDA+acetic acid 1%, pH 5.5. B, D, F, H: chitosan at 15 mg mL<sup>-1</sup>.

**Figura 1.** Efecto de quitosano en frutos de *F. × ananassa* cv. Camino Real inoculados con micelio de los patógenos después de 10 d de inoculación. A, C, E, G: testigo negativo, PDA+ácido acético al 1%, pH 5.5. B, D, F, H: 15 mg mL<sup>-1</sup> de quitosano.



**Figure 2.** Effect of chitosan on *F. × ananassa* cv. Camino Real fruits inoculated with spores from pathogens after 10 d of inoculation. A, C, E, G: negative control, PDA+acetic acid 1%, pH 5.5. B, D, F, H: chitosan at 15 mg mL<sup>-1</sup>.

**Figura 2.** Efecto de quitosano en frutos de *F. × ananassa* cv. Camino Real inoculados con esporas de los patógenos después de 10 d de inoculación. A, C, E, G: testigo negativo, PDA+ácido acético al 1%, pH 5.5. B, D, F, H: 15 mg mL<sup>-1</sup> de quitosano.

**Table 3.** Disease severity recorded on strawberry fruits treated with chitosan after 10 d of inoculation with mycelium.  
**Cuadro 3.** Severidad de la enfermedad registrada en las fresas tratadas con quitosano después de 10 d de la inoculación con micelio.

Chitosan (mg mL <sup>-1</sup> )	Disease severity (0-5)			
	<i>F. oxysporum</i>	<i>Phytophthora</i> sp.	<i>C. gloeosporioides</i>	<i>C. acutatum</i>
15	1 <sup>a</sup>	1.2 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>
10	1.2 <sup>ab</sup>	3.2 <sup>b</sup>	1.2 <sup>a</sup>	1.8 <sup>b</sup>
7.5	1.6 <sup>b</sup>	3.4 <sup>b</sup>	2 <sup>b</sup>	2 <sup>b</sup>
Negative control <sup>†</sup>	4.6 <sup>c</sup>	4.4 <sup>c</sup>	4.4 <sup>c</sup>	4.6 <sup>c</sup>

Values with different letter in a column are different statistically (Tukey; p≤0.05). n=30. <sup>†</sup>Negative control: PDA+acetic acid 1%, pH 5.5. ❖ Los valores con diferente letra en una columna son estadísticamente diferentes (Tukey; p≤0.05). n=30. <sup>†</sup>Testigo negativo: PDA+ácido acético al 1%, pH 5.5.

**Table 4.** Disease severity recorded on strawberry fruits treated with chitosan after 10 d of inoculation with spores.  
**Cuadro 4.** Severidad de la enfermedad registrada en las fresas tratadas con quitosano después de 10 d de la inoculación con esporas.

Chitosan (mg/ml)	Disease severity (0-5)			
	<i>F. oxysporum</i>	<i>Phytophthora</i> sp.	<i>C. gloeosporioides</i>	<i>C. acutatum</i>
15	1.6 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>	1.2 <sup>a</sup>	1.2 <sup>a</sup>
10	1.6 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>	1.8 <sup>ab</sup>	2 <sup>b</sup>
7.5	2.4 <sup>b</sup>	2.2 <sup>b</sup>	2.2 <sup>b</sup>	2.8 <sup>c</sup>
Negative control <sup>†</sup>	4.2 <sup>c</sup>	4.8 <sup>c</sup>	4.2 <sup>c</sup>	3.8 <sup>d</sup>

Values with different letter in a column are different statistically (Tukey; p≤0.05). n=30. <sup>†</sup>Negative control: PDA+acetic acid 1%, pH 5.5. ❖ Los valores con diferente letra en una columna son estadísticamente diferentes (Tukey; p≤0.05). n=30. <sup>†</sup>Testigo negativo: PDA+ácido acético al 1%, pH 5.5.

*In vivo* experiments indicated that all chitosan treatments were effective in damage control (curative effect) caused by pathogens in strawberry fruits cv. Camino Real. The fruits inoculated with mycelium and spores, and then covered with chitosan, displayed significant reductions in the disease severity index compared with the controls. As expected, the highest chitosan concentrations (15 mg mL<sup>-1</sup>) showed the best curative effects. It can be expected that an increase in the viscosity of the chitosan coating solution will increase the content of chitosan adhered to the fruit surface and the uniformity of the coating. These results are similar to reports by Hernández-Muñoz *et al.* (2008), who observed that after 6 d of storage, no sign of fungal decay by *B. cinerea* could be detected in fruits coated with 15 mg mL<sup>-1</sup> chitosan. However, their methodology differed with this work in a few steps; for example, they used chitosan of high molecular

En las fresas inoculadas con micelio, el efecto antifúngico más alto (p≤0.05) se observó en los frutos tratados con quitosano (15 mg mL<sup>-1</sup>) (Figura 1). Estos resultados indican una infección de 1 a 20% de la superficie de la fresa. Para los demás frutos tratados con 7.5 y 10 mg mL<sup>-1</sup> de quitosano, la superficie dañada del fruto fue 20 a 60%; sin embargo, en los testigos negativos, la superficie infectada del fruto fue 41 a 80% (Cuadro 3).

En las fresas inoculadas con esporas, el índice de severidad de la enfermedad más bajo (p≤0.05) se observó en los frutos tratados con 15 mg mL<sup>-1</sup> de quitosano (Figura 2). Estos resultados indican una infección de 1 a 20% de la superficie de la fresa. Para los frutos tratados con 7.5 y 10 mg mL<sup>-1</sup> de quitosano, la infección fue 1 a 40% de la superficie del fruto, mientras que en los testigos negativos, la superficie de la fruta fue 41 a 80% (Cuadro 4).

weight and they did not inoculated the fungus in the strawberry fruits.

The curative effect of chitosan is attributed not only to its anti-fungal activity but also to its capacity to induce plant defense responses (Romanazzi, 2010), extending the storage life and controlling the decay of fruits. Thus, the positive impact of chitosan on controlling fungal diseases, found in this study, could be the result of the addition of both effects. However, additional work is needed to determine whether chitosan stimulates a defense response in strawberry fruits or not. Thus, chitosan showed anti-fungal activity on mycelial growth and spore germination of *F. oxysporum*, *C. gloeosporioides*, *C. acutatum* and *Phytophthora* sp., which allowed to control the diseases from pathogenic fungi in strawberry fruits with a curative effect ranging from 40 to 80%.

## CONCLUSIONS

This study indicates that chitosan represents a safe alternative instead of synthetic fungicides in strawberry post-harvest diseases not only against *B. cinerea* and *R. stolonifer* but against other major post-harvest strawberry pathogens, including *F. oxysporum*, *C. gloeosporioides*, *C. acutatum* and *Phytophthora* sp.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by Universidad de La Ciénega del Estado de Michoacán de Ocampo (UCEMICH). The authors thank Dra. Patricia Nayeli Alva Murillo and M. C. Luis Alberto Bretado Aragón by excellent technical support.

## LITERATURE CITED

- Agrios, G. N. 2010. Fitopatología. Limusa, México, D.F. 838 p.
- Alvarado, H. A. M., N. L. L. Barrera, L. A. N. Hernández, and Del V. M. G. Velázquez. 2011. Antifungal activity of chitosan and essential oils on *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.:Fr.) Vuill causal agent of soft rot of tomato. Rev. Colomb. Biotecnol. 8: 127-134.
- Barbosa, F. R., and Di Piero R. Marcelo. 2009. Redução da severidade da podridão-amarga de maçã em pós-colheita pela imersão de frutos em quitosana. Pesq. Agropec. Bras. 44: 1591-1597.
- Barrera, C. G., and B. C. Sánchez. 2003. Caracterización de la cadena agroalimentaria/agroindustrial nacional, identificación de sus demandas tecnológicas: Fresa. Fundación Produce Michoacán. 65 p.
- Basu, A., A. Nguyen, N. M. Betts, and T. J. Lyons. 2014. Strawberry as a functional food: An evidence-based review. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 54: 790-806.

Los experimentos *in vivo* indicaron que todos los tratamientos con quitosano fueron efectivos en el control del daño (efecto curativo) causado por los patógenos en la fresa cv. Camino Real. Los frutos inoculados con micelio y esporas, después sumergidas en quitosano, presentaron disminuciones significativa del índice de severidad de la enfermedad en comparación con los testigos. Como se esperaba, las concentraciones más altas de quitosano (15 mg mL<sup>-1</sup>) ejercieron los mejores efectos curativos. Se puede esperar que un aumento en la viscosidad de la solución de recubrimiento de quitosano aumente el contenido de quitosano adherido a la superficie de los frutos y la uniformidad del recubrimiento. Estos resultados son similares a los reportados por Hernández-Muñoz *et al.* (2008), quienes observaron que después de 6 d de almacenamiento, no había señales de descomposición fúngica por *B. cinerea* en los frutos recubiertos con 15 mg mL<sup>-1</sup> de quitosano. Sin embargo, ellos usaron una metodología diferente a la de este estudio en algunos pasos; por ejemplo, utilizaron quitosano de alto peso molecular y no inocularon el hongo en las fresas.

El efecto curativo del quitosano se atribuye no solo a su actividad antifúngica, sino también a que su capacidad para inducir respuestas de defensa en la planta (Romanazzi, 2010), extiende la vida en almacén y controla la descomposición de los frutos. Así, el impacto positivo del quitosano en el control de las enfermedades fúngicas, encontrado en este estudio, podría ser el resultado de la adición de ambos efectos. Sin embargo, se requieren investigaciones adicionales para determinar si el quitosano estimula una respuesta de defensa en la fresa o no. Así, el quitosano presentó actividad antifúngica en el crecimiento micelial y la germinación de esporas de *F. oxysporum*, *C. gloeosporioides*, *C. acutatum* y *Phytophthora* sp., lo que permitió controlar las enfermedades por hongos patógenos en la fresa, con un efecto curativo de 40 a 80%.

## CONCLUSIONES

Este estudio indica que el quitosano es una alternativa segura para sustituir el uso de fungicidas sintéticos en el control de las enfermedades de la fresa en postcosecha, no sólo contra *B. cinerea* y *R. stolonifer*, también contra otros importantes patógenos de fresa en postcosecha, incluyendo *F. oxysporum*, *C. gloeosporioides*, *C. acutatum* y *Phytophthora* sp.

- Bautista-Baños, S., G. Romanazzi, and A. Jiménez-Aparicio. 2016. Chitosan in the Preservation of Agricultural Commodities. Academic Press. England. 352 p.
- Bautista-Baños, S., M. Hernández-López, E. Bosquez-Molina, and C. L. Wilson. 2003. Effects of chitosan and plant extracts on growth of *Colletotrichum gloeosporioides*, anthracnose levels and quality of papaya fruit. *Crop Prot.* 22: 1087-1092.
- Cano, T. M. A. 2013. Biological strategies for disease management in strawberry growing (*Fragaria* spp.). *Rev. Colomb. Cienc. Hortíc.* 7: 263-276.
- Casafe, 2009. Guía de Productos Fitosanitarios. Editorial CASAFA (pp: 2241-2242).
- Damm, U., P. F. Cannon, J. H. C. Woudenberg, and P. W. Crous. 2012. The *colletotrichum acutatum* species complex. *Stud. Mycol.* 73: 37-113.
- Darolt, F. C., A. C. R. Neto, and R. M. Di Piero. 2016. Effects of the protective, curative, and eradicated applications of chitosan against *Penicillium expansum* in apples. *Braz. J. Microbiol.* 47: 1014-1019.
- González-Peña, F. D., I. G. Gómez, M. A. Fernández, F. D. Vaillant, y A. B. Falcón-Rodríguez. 2016. Actividad inhibitoria de un polímero de quitosana en el crecimiento vegetativo y la reproducción asexual de un aislado de *Phytophthora palmivora* Butler. *Rev. Protección Veg.* 31: 99-106.
- Guo, Z., R. Xing, S. Liu, Z. Zhong, X. Ji, L. Wang, and P. Li. 2008. The influence of molecular weight of quaternized chitosan on antifungal activity. *Carbohydr. Polym.* 71: 694-697.
- Hahn, M. 2014. The rising threat of fungicide resistance in plant pathogenic fungi: *Botrytis* as a case study. *J. Chem. Biol.* 7: 133-141.
- Hernández-Muñoz, P., E. Almenar, V. Del Valle, D. Velez, and R. Gavara. 2008. Effect of chitosan coating combined with postharvest calcium treatment on strawberry (*Fragaria × ananassa*) quality during refrigerated storage. *Food Chem.* 110: 428-435.
- Hussain, M. Z., Ma Rahman, M. N. Islam, Ma Latif, and Ma Bashar. 2012. Morphological and molecular identification of *Fusarium oxysporum* Sch. isolated from Guava wilt in Bangladesh. *Bangladesh J. Bot.* 41: 49-54.
- Latinovic, J., N. Latinovic, J. Todorovic, and A. Odalovic. 2012. First report of anthracnose fruit rot of strawberry caused by *Colletotrichum acutatum* in Montenegro. *Plant Dis.* 96: 1066.
- López-Benítez, A., S. R. López-Betancourt, M. E. Vázquez-Badillo, S. A. Rodríguez-Herrera, M. Mendoza-Elos, y E. Padrón-Corral. 2005. Inhibición del crecimiento micelial de *Fusarium oxysporum* Schlechtend. f. sp. *lycopersici* (Sacc.) Snyder y Hansen, *Rhizoctonia solani* Kühn y *Verticillium dahliae* Kleb. mediante extractos vegetales acuosos. *Rev. Mex. Fitopatol.* 23: 183-190.
- López-Mata, M. A., S. Ruiz-Cruz, N. P. Silva-Beltrán, J. J. Ornelas-Paz, P. B. Zamudio-Flores, and S. E. Burrueal-Ibarra. 2013. Physicochemical, antimicrobial and antioxidant properties of chitosan films incorporated with carvacrol. *Molecules.* 18: 13735-13753.
- Martin, F. N., Z. G. Abad, Y. Balci, and K. Ivors. 2012. Identification and detection of *Phytophthora*: Reviewing our progress, identifying our needs. *Plant Dis.* 96: 1080-1103.
- Muñoz, Z., A. Moret, and S. Garcés. 2009. Assessment of chitosan for inhibition of *Colletotrichum* sp. on tomatoes and grapes. *Crop Prot.* 28: 36-40.
- Nicolopoulou-Stamati, P., S. Maipas, Ch. Kotampasi, P. Stamatis, and L. Hens. 2016. Chemical pesticides and human health: The urgent need for a new concept in agriculture. *Front. Public Health.* 4: 1-8.
- Orozco-Santos, M. D. Nieto-Ángel, M. Bermúdez-Guzmán, J. Velázquez-Monreal, M. Robles-González, y G. Manzo-Sánchez. 2016. Evaluación de fungicidas para el control de enfermedades del fruto de papaya en postcosecha. *In: Rev. Mex. Fitopatol. Sociedad Mexicana de Fitopatología* (ed). Julio de 2016. Carretera Federal México-Texcoco Km 36.5, Montecillo, Texcoco, Edo. de México. S62.
- Palma-Guerrero, J., H. B. Jansson, J. Salinas, and L. V. Lopez-Llorca. 2008. Effect of chitosan on hyphal growth and spore germination of plant pathogenic and biocontrol fungi. *J. Applied Microbiol.* 104: 541-553.
- Palma-Guerrero, J., J. A. Lopez-Jimenez, A. J. Pérez-Berná, I. C. Huang, H. B. Jansson, J. Salinas, J. Villalán, N. D. Read, and L. V. Lopez-Llorca. 2010. Membrane fluidity determines sensitivity of filamentous fungi to chitosan. *Mol. Microbiol.* 75: 1021-1032.
- Perdones, A., L. Sánchez-González, A. Chiralt, and M. Vargas. 2012. Effect of chitosan-lemon essential oil coatings on storage-keeping quality of strawberry. *Postharvest Biol. Technol.* 70: 32-41.
- Pisa, L. W., V. Amaral-Rogers, L. P. Belzunces, J. M. Bonmatin, C. A. Downs, D. Goulson, D. P. Kretzweiser, C. Krupke, M. Liess, M. McField, C. A. Morrissey, D. A. Noome, J. Settele, N. Simon-Delso, J. D. Stark, J. P. Van der Sluijs, H. Van Dyck, and M. Wiemers. 2015. Effects of neonicotinoids and fipronil on non-target invertebrates. *Environ. Sci. Pollut. R.* 22: 68-102.
- Rahman, M. H., H. L. Gordon, B. B. Aam, M. Sørli, and A. Tronsmo. 2014. Antifungal effect of chito-oligosaccharides with different degrees of polymerization. *Eur. J. Plant Pathol.* 141: 147-158.
- Romanazzi, G. 2010. Chitosan treatment for the control of postharvest decay of table grapes, strawberries and sweet cherries. *Fresh Prod.* 4: 111-115.
- Romanazzi, G., E. Feliziani, M. Satini, and L. Landi. 2013. Effectiveness of postharvest treatment with chitosan and others resistance inducers in the control of storage decay of strawberry. *Postharvest Biol. Technol.* 75: 24-27.
- Salgado-Garciglia, R., J. Molina-Torres, J. E. López-Meza, and P. D. Loeza-Lara. 2008. Effect of crude extract and bioactive compounds of *Heliopsis longipes* on anthracnose incidence, mycorrhization, and nodulation of bean. *Agrociencia.* 42: 679-688.
- SIAP-SAGARPA (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación). 2016. [http://infosiap.siap.gob.mx:8080/agricola\\_siap\\_gobmx/AvanceNacionalCultivo.do](http://infosiap.siap.gob.mx:8080/agricola_siap_gobmx/AvanceNacionalCultivo.do) (Consulta: agosto 2018).
- Sunpapao, A, and Ch. Pornsuriya. 2014. Effects of chitosan treatments on para rubber leaf fall disease caused by *Phytophthora palmivora* Butler - a laboratory study. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 36: 507-512.
- Verlee, A., S. Mincke, and C. V. Stevens. 2017. Recent developments in antibacterial and antifungal chitosan and its derivatives. *Carbohydr. Polym.* 164: 268-283.
- Weir, B.S., P. R. Johnston, and U. Damm. 2012. The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. *Stud. Mycol.* 73: 115-180.

