



Effect of chitosan on the *in vitro* control of *Colletotrichum* sp., and its influence on post-harvest quality in Hass avocado fruits

Efecto del quitosano en el control *in vitro* de *Colletotrichum* sp., y su influencia en la calidad poscosecha en frutos de aguacate Hass

Xoca-Orozco, L. A., Aguilera-Aguirre, S., López-García, U. M., Gutiérrez-Martínez, P., Chacón-López, A. *

Tecnológico Nacional de México-Instituto Tecnológico de Tepic (LIIA). Laboratorio de Biotecnología.
Av. Tecnológico #2295 Lagos del Country. Tepic, Nayarit, México.

Cite this paper/Como citar este artículo: Xoca-Orozco, L. A., Aguilera-Aguirre, S., López-García, U. M., Gutiérrez-Martínez, P., Chacón-López, A. (2018). Effect of chitosan on the *in vitro* control of *Colletotrichum* sp., and its influence on post-harvest quality in Hass avocado fruits. *Revista Bio Ciencias* 5, e355 doi:

<https://doi.org/10.15741/revbio.05.e355>



ABSTRACT

Avocado fruit cv Hass, is from an economic point of view, one of the most important crops for Mexico, because Mexico is the main producer of avocado in the world. However, the production is often reduced due to large postharvest losses because the fruit is susceptible to attack by *Colletotrichum* sp., the causal agent of anthracnose. In recent years it has been explored new alternatives to combat postharvest fungi because of the risk that involve the use of harmful chemical fungicides on the environment and consumer health. One alternative is the application of chitosan films, which has an antifungal effect. In this study the *in vitro* antifungal activity of low and medium molecular weight chitosan on two strains of *Colletotrichum* sp., isolated from Hass avocado fruits whit anthracnose symptoms was evaluated. Additionally, the chitosan

Article Info/Información del artículo

Received/Recibido: September 26th 2017.

Accepted/Aceptado: January 29th 2018.

Available on line/Publicado: March 21st 2019.

RESUMEN

El aguacate Hass desde el punto de vista económico, es uno de los frutos más importantes para México, por ser el principal productor en el mundo. No obstante, la alta producción puede ser afectada considerablemente por grandes pérdidas poscosecha debido a que el fruto es susceptible al ataque de *Colletotrichum* sp., agente causal de la antracnosis. En los últimos años se han explorado nuevas alternativas para combatir los hongos poscosecha debido al riesgo que implica el uso de fungicidas químicos que son nocivos para el medio ambiente y la salud del consumidor. Una de estas alternativas es la aplicación de películas de quitosano, el cual posee un efecto antifúngico. En este estudio se evaluó la actividad antifúngica *in vitro* de quitosano de bajo y medio peso molecular en dos cepas de *Colletotrichum* sp., que fueron aisladas de frutos de aguacate Hass con síntomas de antracnosis. También fue evaluado el efecto del quitosano sobre la calidad poscosecha en frutos de aguacate. Se utilizaron soluciones de quitosano al 0,1, 0,5, 1,0, 1,5 y 2,0 % (p/v) para evaluar la inhibición

*Corresponding Author:

Chacón-López, A. Tecnológico Nacional de México-Instituto Tecnológico de Tepic. LIIA. Laboratorio de Biotecnología. Av. Tecnológico #2595 Lagos del Country. Tepic, Nayarit, México. E-mail: mchacon@ittec.edu.mx, pgutierrez@ittec.edu.mx

effect on the post-harvest quality of the avocado fruit was also evaluated. Chitosan solutions at 0.1, 0.5, 1.0, 1.5 and 2.0 % (w/v) were used to assess inhibition of mycelial growth, sporulation and germination of spores recording measurements every 24 h for 9 days. *In vivo* trials were performed by inoculating avocado fruits with a suspension of *Colletotrichum* sp (1×10^6 spores·mL⁻¹). The fruits were immersed in low molecular weight chitosan solution (1.5 % w/v). The incidence of disease, physiological weight loss, firmness and percent of dry matter of the treated fruits were evaluated after 12 days of storage at 25 °C. The *in vitro* results demonstrated that low and medium molecular weight chitosan solution at 1 % inhibited more than 90 % of mycelial growth and significantly reduced sporulation and germination of conidia of *Colletotrichum* sp. The *in vivo* results showed that the application of chitosan on avocado fruits reduced physiological weight loss, kept the firmness and decreased disease incidence. According to our results, the application of chitosan films on avocado fruits could be a plausible alternative to control of anthracnose and preserve the Hass avocado quality during its storage at room temperature.

KEY WORDS

Avocado, chitosan, antifungal, anthracnosis, *in vitro*, *in vivo*.

Introduction

Avocado is one of the main agricultural products in Mexico; its production represents an important source of income for local, national and international markets because Mexico ranks first in worldwide production of avocado (SENASICA, 2017) Avocado is particularly susceptible to damage caused by *Colletotrichum* sp., a pathogen responsible for approximately 20 % of postharvest losses (Rodríguez-López *et al.*, 2009). Chemical fungicides reduce these losses but may have a negative effect on the environment and cause consumer health problems if residues remain in the fruit. Therefore, fungicides of biological origin are attractive alternatives (Ochoa-Ascencio, 2009; Tamayo, 2007; Lárez, 2008).

Chitosan is a biological fungicide that does not pollute the environment and does not presents risks to the health

de crecimiento micelial, esporulación y germinación de esporas, registrando las mediciones cada 24 h durante 9 días. Los ensayos *in vivo* se llevaron a cabo inoculando frutos de aguacate con una suspensión de esporas de *Colletotrichum* sp (1×10^6 esporas·mL⁻¹). Los frutos fueron sumergidos en una solución de quitosano de bajo peso molecular (1.5 % p/v). Se evaluó en los frutos tratados la incidencia de la enfermedad, la pérdida fisiológica de peso, firmeza y el porcentaje de materia seca después de 12 días de almacenamiento a 25 °C. Los resultados *in vitro* demostraron que tanto la solución de quitosano de bajo como de medio peso molecular al 1 % inhibieron más del 90 % del crecimiento micelial y redujeron significativamente la esporulación y la germinación de los conidios de *Colletotrichum* sp. Los resultados *in vivo* mostraron que la aplicación de quitosano en frutos de aguacate redujo la pérdida fisiológica de peso, mantuvo la firmeza y disminuyó la incidencia de la enfermedad. De acuerdo con nuestros resultados, la aplicación de la película de quitosano en frutos de aguacate puede ser una alternativa recomendable para controlar la antracnosis y preservar la calidad del aguacate Hass durante su almacenamiento a temperatura ambiente.

PALABRAS CLAVE

Aguacate, quitosano, antifúngico, antracnosis, *in vitro*, *in vivo*.

Introducción

El aguacate es uno de los principales productos agrícolas en México y representa una fuente importante de ingresos económicos para el mercado local, nacional e internacional. México ocupa el primer lugar en la producción de aguacate a nivel mundial (SENASICA, 2017). No obstante, ésta se ve afectada debido a que los frutos son susceptibles a daños causados principalmente por *Colletotrichum* sp., patógeno que ocasiona pérdidas importantes en poscosecha, alcanzando hasta un 20 % (Rodríguez-López *et al.*, 2009). Los fungicidas químicos reducen estas pérdidas, no obstante, afectan el ambiente y causan problemas en la salud del consumidor si permanecen residuos en el fruto. Por lo tanto, los fungicidas de origen biológico son alternativas atractivas (Ochoa-Ascencio, 2009; Tamayo, 2007; Lárez, 2008).

El quitosano es un fungicida de origen biológico, el cual no contamina el ambiente, ni representa riesgos a la salud (Martínez-Camacho *et al.*, 2010; Gutiérrez-Martínez *et*

(Martínez-Camacho *et al.*, 2010, Gutiérrez-Martínez *et al.*, 2012). Chitosan, poly [β (1-4) 2-amino-2-deoxy-D-glucopyranose], is a copolymer of D-glucosamine units of N-acetyl-D-glucosamine derived from the chitin deacetylation in alkaline medium (Monarul *et al.* 2011). The fungicidal activity of chitosan is partially explained by its cationic character. Positively charged free amino groups in acid media interact with the negative residues from the macromolecules of the exposed fungal wall, inducing changes in the permeability of the plasma membrane and thus alteration of its functions (Benhamou, 1992). Chitosan may also inhibit the synthesis of some essential enzymes for the fungus (El-Ghaouth *et al.* 1992) and cause cytological disorders, such as blistering or lack of cell cytoplasm, as reported for spores of *A. alternata*, *Colletotrichum* sp. and *Fusarium* sp., subjected to 1-2 % chitosan solutions (Sánchez-Domínguez *et al.*, 2007; López-Mora *et al.*, 2013; Bautista-Baños *et al.*, 2012).

Chitosan coatings form a semipermeable film on the fruit surface that slows the respiration rate, reduces weight loss, maintains overall quality and increases the shelf life of the fruit (Romanazzi, *et al.*, 2013). In other fruits, such as mango, chitosan has decreased the incidence of fungal diseases, increased firmness and abated the physiological weight loss (López-Mora *et al.*, 2013). Correa-Pacheco *et al.* (2017) applied chitosan nanoparticles in combination with thyme essential oil, finding a reduction in the incidence of *C. gloeosporioides* on avocado Hass, moreover, fruit firmness was better maintained in comparison with untreated fruit. However, publications about chitosan use in avocado fruits are scarce. For this reason, the objective of this research was to determine the *in vitro* antifungal effect of low and medium molecular weight chitosan on *Colletotrichum* sp, which is the causal agent of anthracnose and is considered one of the main postharvest fungi that affects Hass avocado fruit (*Persea Americana* Mill), and on the other hand, evaluate the fruit quality during storage at room temperature.

Materials and Methods

Isolation of phytopathogens

Hass avocado (*Persea americana* Mill) fruits in physiological maturity stage were obtained from an orchard located in the Town of Tepic, Mexico. Fungus development was encouraged by placing fruits in

al., 2012). El quitosano, poli [β -(1-4)-2-amino-2-desoxi-D-glucopiranosas], es un copolímero de D-glucosamina y unidades de N-acetyl-D-glucosamina, derivado de la desacetilación de la quitina en un medio alcalino (Monarul *et al.*, 2011). La actividad fungicida del quitosano se explica parcialmente por su carácter catiónico, donde la interacción de los grupos amino libres (cargados positivamente en medio ácido) con los residuos negativos de las macromoléculas expuestas en la pared de los hongos, cambian la permeabilidad de la membrana plasmática, con la consecuente alteración de sus funciones (Benhamou, 1992). Se ha propuesto que la actividad fungicida del quitosano se relaciona con la inhibición de la síntesis de algunas enzimas esenciales para el hongo (El-Ghaouth *et al.*, 1992) y causa alteraciones citológicas, donde se ha observado la aparición de vesículas y/o células vacías carentes de citoplasma, como se ha reportado en el caso de esporas de *A. alternata*, *Colletotrichum* sp. y *Fusarium* sp., cuando fueron tratadas con soluciones de quitosano a concentraciones de 1 al 2 % (Sánchez-Domínguez *et al.*, 2007; López-Mora *et al.*, 2013; Bautista-Baños *et al.*, 2012).

Los recubrimientos de quitosano forman una película semipermeable en la superficie de las frutas que disminuye la tasa de respiración, reduce la pérdida fisiológica de peso, mantiene la calidad global y prolonga la vida de anaquel del fruto (Romanazzi *et al.*, 2013). En otros frutos, tales como mango, el quitosano ha disminuido la incidencia de enfermedades fúngicas, incrementado la firmeza y disminuido la pérdida fisiológica de peso (López-Mora *et al.*, 2013). Correa-Pacheco *et al.* (2017) aplicaron nanopartículas de quitosano en combinación con aceite esencial de lima en aguacate Hass y encontraron reducción en la incidencia de *C. gloeosporioides*, además de mantener la firmeza del fruto en comparación con frutos no tratados. No obstante, los reportes del uso del quitosano en frutos de aguacate son escasos. Por lo anterior, el objetivo de esta investigación fue determinar *in vitro* el efecto antifúngico de quitosano de bajo y medio peso molecular sobre *Colletotrichum* sp, el cual es el agente causal de la antracnosis y es considerado uno de los principales hongos de poscosecha que afectan al fruto de aguacate (*Persea americana*) cv Hass, así como también determinar algunos parámetros de calidad durante el almacenamiento a temperatura ambiente de frutos de aguacate tratados con quitosano.

Material y Métodos

Aislamiento de fitopatógenos

Los frutos de aguacate (*Persea americana*) cv Hass en estado de madurez fisiológica, fueron obtenidos de una huerta ubicada en el municipio de Tepic Nayarit, México.

chambers at a relative humidity of 90-95 % at 25 °C for 5 days. Once symptoms developed, injured tissue was disinfected by immersion in sodium hypochlorite solution (2 %) for 2 min, rinsed with sterile water for 2 min and placed on filter paper to eliminate moisture. Moisture-free tissue sections were plated on potato dextrose agar (PDA) (DIFCO, cat:DF0013) and were incubated at 25 °C for 24 to 72 h. The fungus genus was determined considering the taxonomic keys described by Barnett & Hunter (1998).

Pathogenesis test of isolates in avocado fruits

For the evaluation of the pathogenesis of the isolates and verify the Koch's postulates, avocado fruits were inoculated with the isolated strains. Prior to inoculation, strains were pre-incubated for 8 days. A spore suspension was prepared according to Sellamuthu *et al.* (2013). Spores were counted using a haemocytometer and were adjusted to 1×10^6 spores·mL⁻¹. Using an insulin needle, 40 µL of the suspension was inoculated through the skin of healthy fruits previously washed with water. Inoculated fruits were then stored at 25 °C until the onset of symptoms appeared. A comparison of symptoms between the non-inoculated (control) and the inoculated fruits was performed (Morales-García *et al.*, 2009).

Preparation of chitosan solutions and treatments

Chitosan was prepared as follows: low molecular weight chitosan (LMW) (Sigma Aldrich cat: 448869; viscosity 35 cps in 1% chitosan solution; 96.1 % deacetylation) and medium molecular weight chitosan (MMW) (Sigma Aldrich cat: 448877; viscosity 590 cps in 1% chitosan solution; 80 % deacetylation) were used to prepare solutions at 0.1, 0.5, 1.0, 1.5 and 2.0 % (w/v) in 2 % acetic acid. Solutions were placed under constant stirring for 24 h, and then pH was adjusted to 5.6 with 1N NaOH prior to the addition of 0.1 mL of Tween 80.

In-vitro evaluations

Application of treatments

An 8 mm disc of mycelium was taken from the fungal periphery after 8 days of incubation at 26 °C. Discs were placed in the center of petri plates containing the PDA-Chitosan media at the corresponding concentrations (0.1, 0.5, 1.0, 1.5 and 2.0 %). A plate of

Los frutos se colocaron en cámaras con una humedad relativa entre 90 y 95 % a temperatura de 25 °C por 5 días, con el fin de estimular el desarrollo de los hongos establecidos. Una vez desarrollados los síntomas, el tejido dañado fue desinfectado superficialmente sumergiéndolo en una solución de hipoclorito de sodio al 2 % por 2 min, se enjuagaron con agua estéril por 2 min y fueron colocados sobre papel filtro para eliminar la humedad. Las secciones de tejidos libres de humedad, se colocaron en cajas de petri conteniendo agar papa dextrosa (PDA, DIFCO, cat: DF0013), y se incubaron a 25 °C por un periodo de 24 a 72 h. El género de los hongos aislados fue determinado mediante las claves taxonómicas descritas por Barnett & Hunter (1998).

Prueba de patogénesis de las cepas aisladas en frutos de aguacate

Para determinar la patogénesis de las cepas y comprobar los postulados de Koch, se inocularon frutos de aguacate con las cepas aisladas. Previa a la inoculación, las cepas fueron incubadas durante 8 días. Se preparó una suspensión de esporas de acuerdo a lo reportado por Sellamuthu *et al.* (2013). Las esporas fueron contabilizadas en una cámara de Neubauer y la suspensión se ajustó a 1×10^6 esporas·mL⁻¹. De la suspensión de esporas ajustada se inocularon 40 µL en los frutos de aguacate previamente lavados con agua, la solución de esporas se inoculó mediante una aguja de insulina, traspasando solamente la cáscara del fruto. Los frutos inoculados se almacenaron a 25 °C hasta la aparición de los síntomas. Se hizo una comparación entre los síntomas de los frutos de origen con los inoculados con los hongos aislados (Morales-García *et al.*, 2009).

Preparación de soluciones y tratamientos con quitosano.

Las soluciones de quitosano fueron preparadas de la siguiente manera: quitosano de bajo peso molecular (LMW) (Sigma Aldrich; viscosidad 35 cps en 1 % solución de quitosano, 96.1 % desacetilación) y quitosano de medio peso molecular (MMW) (Sigma Aldrich; viscosidad 590 cps en 1 % solución de quitosano, 80 % desacetilación), ambos fueron usados para preparar soluciones a 0.1, 0.5, 1.0, 1.5 y 2.0 % (p/v) en ácido acético al 2 %. Las soluciones se dejaron en agitación constante por 24 h y fueron ajustadas a pH 5.6 con NaOH 1N, previa adición de 0.1 mL de Tween 80.

Evaluaciones in-vitro

Aplicación de los tratamientos.

Se tomó un disco de micelio de 8 mm de diámetro de la periferia del hongo con 8 días de crecimiento a 26 °C y se colocó en el centro de una caja de petri con medio PDA-Quitosano, a la correspondiente concentración de

PDA without chitosan was inoculated with the fungus and used as the control. The inoculated petri plates were incubated at 26 °C, for 9 days.

Evaluations of the antifungal effect

EEvaluation of the antifungal effect of chitosan on the isolates strain was determined by mycelial growth in petri plates (MG) and inhibition of mycelial growth (IMG), sporulation and germination of spores, was evaluated according to the methodology proposed by Cordova-Albores et al. (2014).

In vivo evaluations

Inoculation of *Colletotrichum* sp., in avocado fruits

Avocado fruits in physiological maturity and free of pathogens or insect damage were collected from a local orchard. The fruits were washed with potable water and dried at room temperature. Using an insulin syringe, 40 µL of a spore suspension (1×10^6 spores·mL⁻¹) was inoculated by penetrating 3 mm into the fruit peel. After 30 min, fruits were treated with both low and medium weight chitosan solutions (López-Mora et al., 2013).

Treatment of fruits with chitosan

Briefly, fruits were immersed for 1 min into the best treatment resulting from the *in vitro* test (LMW chitosan solution at 1.5 %, w/v). Fruits were then allowed to dry for 60 min and were stored at 25 °C for 12 days. Treatments were labeled as FCh (fruits treated with chitosan, 8 fruits), Fc (control fruit without chitosan, 8 fruits), FChP (8 fruits treated with chitosan and inoculated with the fungus) and FP (8 fruits inoculated with the fungus and without chitosan).

Incidence and severity of anthracnose

To evaluate the effectiveness of chitosan to inhibit symptoms and decrease anthracnose incidence, 32 fruits ripened to intermediate stage (firmness between 60 and 80 N) were inoculated with the pathogen (as described above). Half of the samples (16 fruits) were treated with LMW chitosan solution (1.5 %, w/v), and the other half was left untreated. All fruits were stored at room temperature for ripening. In order to evaluate the development of anthracnose symptoms, fruits were cut in the area of inoculation and disease development was measured. Those fruits that had size spots >1 cm² were considered contaminated (Bill et al., 2014). The

quitosano (0.1, 0.5, 1.0, 1.5 y 2.0 %). Como control se inoculó al hongo en PDA sin quitosano. Las cajas inoculadas se incubaron a una temperatura de 26 °C, durante 9 días.

Evaluación del efecto antifúngico

La evaluación del efecto antifúngico del quitosano sobre las cepas fúngicas aisladas, fue determinado por la medición del crecimiento micelial en las cajas Petri (MG), mientras que la inhibición del crecimiento micelial (IMG), esporulación y germinación de esporas, se realizó de acuerdo a la metodología propuesta por Cordova-Albores et al. (2014).

Evaluations in vivo

Inoculación de *Colletotrichum* sp., en los frutos de aguacate

Los frutos de aguacate en madurez fisiológica y libres de patógenos o daño por insectos, fueron colectados en una huerta local. Los frutos fueron lavados con agua potable y secados a temperatura ambiente. La inoculación de los frutos se realizó con una jeringa para insulina, introduciendo 40 µL de la suspensión de esporas (1×10^6 esporas·mL⁻¹), la inoculación se realizó penetrando 3 mm en la cáscara del fruto. Después de 30 min los frutos fueron tratados con las soluciones de quitosano de bajo y medio peso molecular (López-Mora et al., 2013).

Tratamiento a los frutos con quitosano

Los frutos fueron sumergidos por 1 min en la solución de quitosano que presentó los mejores resultados en las evaluaciones *in vitro* (solución de quitosano de LMW al 1.5 % p/v). Los frutos tratados se dejaron secar al aire libre por 60 min y fueron almacenados a 25 °C durante 12 días. Los tratamientos se designaron como FCh (frutos con quitosano sin inoculación, n=8), Fc (frutos control sin quitosano y sin patógeno, n=8), FChP (frutos con quitosano e inoculados con el hongo, n=8) y FP (frutos inoculados con el hongo y sin quitosano, n=8).

Evaluación de la incidencia y severidad de la antracnosis

Para evaluar la efectividad del quitosano en la inhibición de los síntomas y disminución la incidencia de la antracnosis ocasionada por el patógeno, se midió la incidencia de la enfermedad, para ello se inocularon 32 frutos (como se indicó antes) de aguacate en estado de madurez intermedio (firmeza entre 60 y 80 N). La mitad de los frutos fueron tratados con LMW al 1.5 % (p/v), mientras que la otra mitad no fueron tratados. Todos los frutos fueron almacenados a temperatura ambiente hasta la madurez de consumo. Para evaluar el desarrollo de la antracnosis, los frutos fueron cortados

% of incidence of disease (ID) was measured using the following equation:

$$\% \text{ ID} = \text{fruit diseased} / \text{total fruits} * 100$$

For the assessment of severity of the infection, the peels from the mature fruits previously treated, were removed and pictures of the fruits without peel were taken, then, the images were processed using the ImageJ software (Schneider *et al.*, 2012) to determine the percentage of the total damaged area. This parameter was expressed as percentage of affected area with respect to the total area of the fruit.

Evaluation of the quality parameters in avocado fruit

Some quality parameters were evaluated in fruit treated and not treated with chitosan. The parameters were the physiological weight loss (PWL), fruit firmness and percent of dry matter. The PWL was measured every 24 h during 12 days of storage. To determine the PWL, 10 fruits per treatment (FCh, Fc, FChP and FP) were weighed every 24 hours using a digital weight scale (Sartorius model BL 3100, USA), and the results were expressed as suggested by El-Ghaouth *et al.* (1991) and were calculated as follows:

$$\% \text{ PWL} = (\text{Initial weight} - \text{Final weight}) / \text{Initial weight} * 100$$

Determination of fruit firmness was performed on 3 samples using a texture analyzer (Shimpo FGE-50, USA), equipped with a punch probe of 5 x 10 mm diameter. The penetration test was applied to 3 points along the fruit husk (ends and middle). The result was expressed as to the average of the obtained values expressed in Newtons (N) (López-Mora *et al.*, 2013). The determination of dry matter was conducted per each treatment on 3 fruits previously peeled and cut into small pieces (<0.5 cm²) and placed in a microwave oven (General Electric JES832WK, 800 W) until a constant weight was achieved. The initial and final weights of each sample were used for the calculations (Wang *et al.*, 2012). The evaluation of the firmness and dry matter was done on days 0, 3, 6, 7, 8, 9 and 10 of storage.

Statistical Analysis

For the *in-vitro* evaluation a 2x6 bifactorial design was used. The factors were: chitosan molecular weight (LMW and MMW) and concentration (0.1, 0.5,

en el área de la inoculación y se midió el área en donde se observaron síntomas de la enfermedad. Aquellos frutos que presentaron zonas necróticas >1 cm² fueron considerados como frutos enfermos (Bill *et al.*, 2014). El % de incidencia de la enfermedad se midió utilizando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ ID} = \text{frutos enfermos} / \text{total frutos} * 100$$

Para evaluar la severidad de la infección, a los frutos maduros previamente tratados se les retiró la cáscara y se tomaron imágenes de los frutos pelados, más tarde, las imágenes se procesaron utilizando el software ImageJ (Schneider *et al.*, 2012) para determinar el porcentaje del área total dañada. Este parámetro se expresó como porcentaje del área afectada con respecto al área total del fruto.

Evaluación de los parámetros de calidad en el fruto de aguacate

Se evaluaron algunos parámetros de calidad en los frutos tratados y no tratados con quitosano. Los parámetros que se evaluaron fueron pérdida fisiológica de peso (PWL), firmeza y porcentaje de material seco. La PWL fue medida cada 24 h durante 12 días de almacenamiento. Para determinar la PWL, se tomaron 10 frutos por cada tratamiento (FCh, Fc, FChP y FP), se pesaron cada 24 horas en una báscula digital marca (Sartorius modelo BL 3100, USA), los resultados fueron expresados de acuerdo a lo sugerido por El-Ghaouth *et al.* (1991) donde el cálculo se realizó de la siguiente manera:

$$\% \text{ PWL} = (\text{Peso inicial} - \text{Peso final}) / \text{peso inicial} * 100$$

Para la determinación de la firmeza se usaron tres frutos por tratamiento. Se utilizó un Texturómetro marca Shimpo modelo FGE-50, equipado con un punzón de 5 x 10 mm de diámetro. La prueba de penetración fue aplicada en 3 puntos a lo largo del fruto con cáscara (extremos y medio). El resultado correspondió al promedio de los valores obtenidos y fue expresado en Newtons (N) (López-Mora *et al.*, 2013). La determinación de la materia seca se realizó tomando tres frutos por tratamiento, estos fueron pelados y cortados en trozos pequeños (<0.5 cm²) y colocados en un horno de microondas (General Electric JES832WK, 800 W) hasta alcanzar un peso constante. El cálculo se realizó tomando en cuenta el peso inicial y final de cada una de las muestras (Wang *et al.*, 2012). Las evaluaciones de firmeza y materia seca se hicieron a los días 0, 3, 6, 7, 8, 9 y 10 de almacenamiento.

Análisis estadístico

Para las evaluaciones *in vitro* se usó un diseño bifactorial 2x6. Los factores fueron: el peso molecular del

1.0, 1.5 and 2.0 %). Each treatment was repeated three times. The *in vivo* evaluations were conducted using a univariate completely randomized block design; all *in vivo* assays were performed by duplicate. In both cases (*in vitro* and *in vivo*) the results were analyzed statistically by analysis of variance (ANOVA). The comparisons of means were made by Tukey test ($p \leq 0.01$) using the statistical package SAS System V9.

Results

Isolation and identification of pathogens and pathogenicity test

The isolated pathogenic strains obtained from the damaged tissue were identified as AG1, AG2 and AG3. Strains AG1 and AG3 exhibited similar characteristics: random mycelial growth and small, white, cottony mycelium (Figure 1a). Strain AG2 showed different characteristics than AG3 and AG1, it exhibited whiter cottony growth compared to the grey colony color of AG1 and AG3 and

quitosano (LMW y MMW) y las concentraciones (0.1, 0.5, 1.0, 1.5 y 2.0 %). Cada tratamiento se realizó por triplicado. Para las evaluaciones *in vivo* los experimentos se realizaron empleando un diseño unifactorial de bloques completamente aleatorizado. Todos los ensayos *in vivo* fueron hechos por duplicado. En ambos casos (*in vitro* e *in vivo*) Los datos se analizaron estadísticamente mediante un análisis de varianza (ANOVA) y para la comparación de medias se utilizó una prueba de Tukey ($p \leq 0.01$) empleando el paquete estadístico SAS System V9.

Resultados

Aislamiento e identificación de patógenos y pruebas de patogenicidad.

Los aislados de cepas patógenas obtenidas a partir del tejido dañado de aguacate por antracnosis fueron identificadas como AG1, AG2 y AG3. Las cepas AG1 y AG3 presentaron características similares: crecimiento del micelio al azar, blanco y de consistencia poco algodonosa (Figura 1a). La cepa AG2 mostró características diferentes a AG1 y AG3, presentó

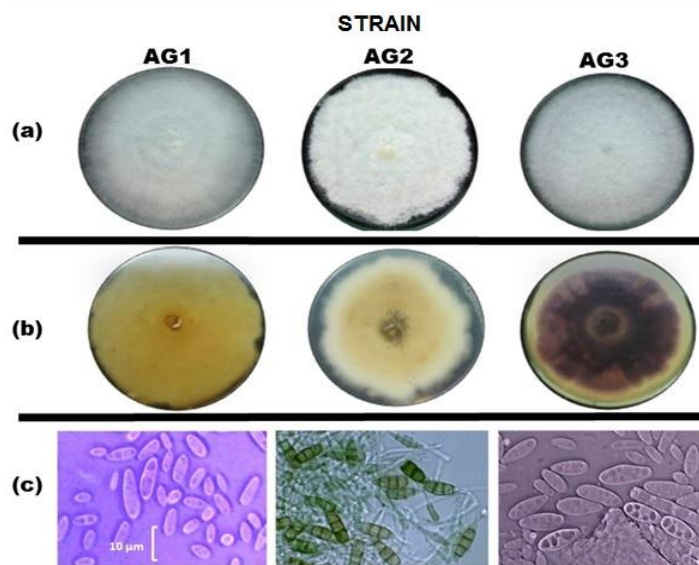


Figure 1. Detail of isolates; AG1: *Colletotrichum* sp. AG2: *Pestalotia* sp. AG3: *Colletotrichum* sp. (a) Top view of the growth plate. (b) Back view of the growth plate. (c) Detail of the conidia of the isolates (100x).

Figura 1. Detalle de las cepas aisladas; AG1: *Colletotrichum* sp. AG2: *Pestalotia* sp. AG3: *Colletotrichum* sp. (a) Vista superior del crecimiento en placa. (b) Vista inferior del crecimiento en placa. (c) Detalle de los conidios de las cepas aisladas (100x).

a white-yellowish coloration was observed on the base of the petri-dish (Figure 1b). According to the identification performed with the taxonomic keys, AG1 and AG3 belong to the *Colletotrichum* genus, whereas AG2 matches the genus *Pestalotia* (Figure 1c), which is not considered an important pathogen of avocado fruit and for this reason it was

crecimiento muy algodonoso y color blanco, en comparación con el color gris de las colonias AG1 y AG3, además de una coloración amarillenta que fue observada en la base de la caja petri (Figura 1b). De acuerdo a la identificación hecha mediante claves taxonómicas, resultó que AG1 y AG3 corresponden a hongos del género *Colletotrichum*,

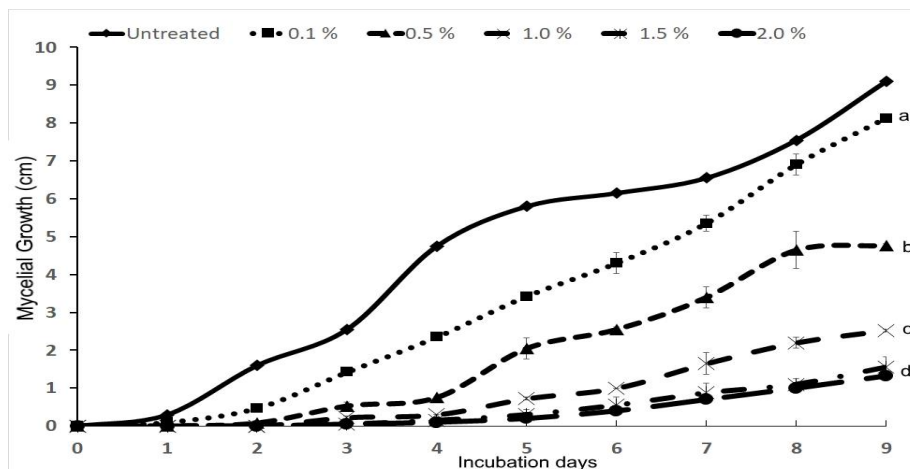


Figure 2. Effect of LMW chitosan at different concentrations on mycelia growth of AG1.

Note: a-d means with the same letter are not significantly different ($p < 0.05$).

Figura 2. Efecto del quitosano de BPM a diferentes concentraciones sobre el crecimiento micelial de AG1.

Nota: a-d los medios con la misma letra no son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

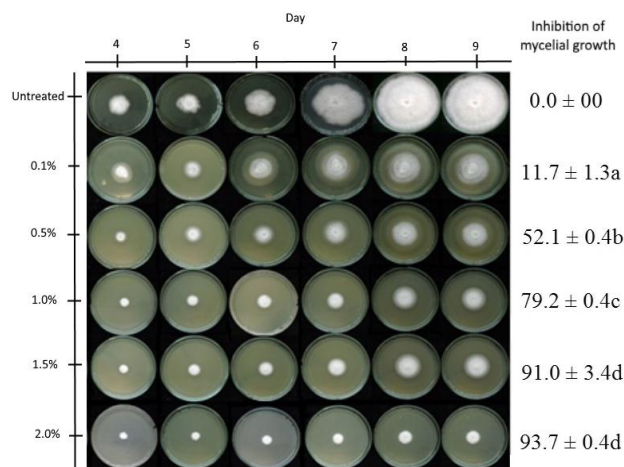


Figure 3. Effect of LMW chitosan at different concentrations on % inhibition of mycelial growth of AG1. Note: a-d means with the same letter are not significantly different ($p < 0.05$).

Figura 3. Efecto del quitosano de BPM a diferentes concentraciones sobre el % de inhibición del crecimiento micelial de AG1.

Nota: a-d los promedios con la misma letra no son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

not included in the future evaluations. Fruits inoculated with strains AG1 and AG3 presented the symptoms of anthracnose disease described above. The macroscopic and microscopic characteristics of the strains corresponded to those observed in the initial isolated strains (data not shown), complying with Koch's postulates.

Antifungal effect of chitosan

In vitro evaluation of MG and % IMG of the strains AG1 and AG3 in the presence of both LMW as MMW chitosan solutions at different concentrations, demonstrated that the lowest MG occurred at the highest concentrations (1.5 and 2.0 % w/v) of LMW (Figure 2) and that >90 % IMG was observed under these treatments irrespective of the fungus strain (Figure 3). Similar results were obtained with the MMW chitosan solutions ($p < 0.05$) (data not shown). The data displayed an inverse relationship between the chitosan concentration and sporulation. LMW chitosan reduced the sporulation of strains AG1 and AG3 by 29 and 51 %, respectively, whereas MMW chitosan reduced sporulation by 47 and

mientras que AG2, corresponde al género *Pestalotia* (Figura 1c), la cual no es considerado un patógeno importante para los frutos de aguacate, por lo que no fue incluida para las posteriores evaluaciones. Los frutos inoculados con las cepas AG1 y AG3 presentaron los síntomas de antracnosis descritos anteriormente. Las características macro y microscópicas de las cepas corresponden a aquéllas observadas en los aislados iniciales (dato no mostrado), cumpliendo así con los postulados de Koch.

Efecto antifúngico del quitosano

Las evaluaciones *in vitro* del MG y el % de IMG de las cepas AG1 y AG3 tanto en quitosano de LMW como en MMW a las diferentes concentraciones mostraron que el menor MG ocurrió a las concentraciones más altas (1.5 y 2 % p/v) del quitosano LMW (Figura 2) y se observó una IMG > 90 % bajo los mismos tratamientos independientemente de la cepa de hongo (Figura 3). Resultados similares se obtuvieron con soluciones de quitosano de MMW ($p < 0.05$) (dato no mostrado). Los datos mostraron una relación inversa entre la concentración de quitosano y la esporulación. El quitosano LMW redujo la esporulación de las cepas AG1 y AG3 en 29 y 51 % respectivamente, mientras que el quitosano de MMW redujo

Table 1.
Final sporulation and germination of LMW and MMW chitosan treatments for AG1 strains and AG3.

Tabla 1.
Esporulación y Germinación final para las cepas AG1 y AG3 en tratamiento con quitosano de BPM y MPM.

Treatment	Sporulation ($\times 10^7$ spore·mL ⁻¹)				% Germination			
	LMW		MMW		LMW		MMW	
% w/v	AG1	AG3	AG1	AG3	AG1	AG3	AG1	AG3
Untreated	3.83 ± 1.54	3.54 ± 0.01	4.05 ± 1.29	3.65 ± 0.41	100	100	100	100
0.1	3.25 ± 0.01 ^{Aa*}	3.42 ± 0.06 ^{Aa}	3.93 ± 0.10 ^{Aa}	3.54 ± 0.03 ^{Aa}	60 ^{Aa*}	100 ^{Aa}	50 ^{Aa}	50 ^{Aa}
0.5	3.14 ± 0.2 ^{Aa}	3.31 ± 0.52 ^{Aa}	3.22 ± 1.16 ^{Ba}	3.04 ± 0.79 ^{Ba}	50 ^{Aa}	50 ^{Ba}	50 ^{Aa}	33 ^{Aa}
1.0	2.96 ± 0.25 ^{Ba}	1.77 ± 0.01 ^{Ba}	3.14 ± 0.02 ^{Ba}	2.60 ± 0.08 ^{Ca}	25 ^{Ba}	50 ^{Ba}	50 ^{Aa}	25 ^{Ba}
1.5	2.73 ± 0.05 ^{Ca}	1.71 ± 0.13 ^{Ba}	2.13 ± 0.16 ^{Ca}	1.99 ± 0.83 ^{Da}	0 ^{Ca}	0 ^{Ca}	0 ^{Ba}	0 ^{Ca}
2.0	2.62 ± 0.4 ^{Ca}	1.47 ± 0.13 ^{Ca}	1.71 ± 0.01 ^{Ca}	1.80 ± 0.48 ^{Da}	0 ^{Ca}	0 ^{Ca}	0 ^{Ba}	0 ^{Ca}
**Reduction	29 %	51 %	47 %	45 %	100 %	100 %	100 %	100 %

Note: *Equal capital letters do not represent significant difference between the different concentrations (rows). Equal lower letters do not represent significant difference between the different strains (columns) ($p < 0.05$). Mean ± SD. (n = 3). **Reduction of sporulation and % germination compared to control and the treatment of 1.5 % w/v of chitosan.

Nota: *Letras mayúsculas iguales no presentan diferencia significativa entre concentraciones (renglones). Letras minúsculas iguales no presentan diferencia significativa entre cepas (columnas) ($p < 0.05$, n=3). Media±DE. **Reducción de la esporulación y el % de germinación en el tratamiento de 1.5 % p/v de quitosano de BPM y MPM con respecto al control.

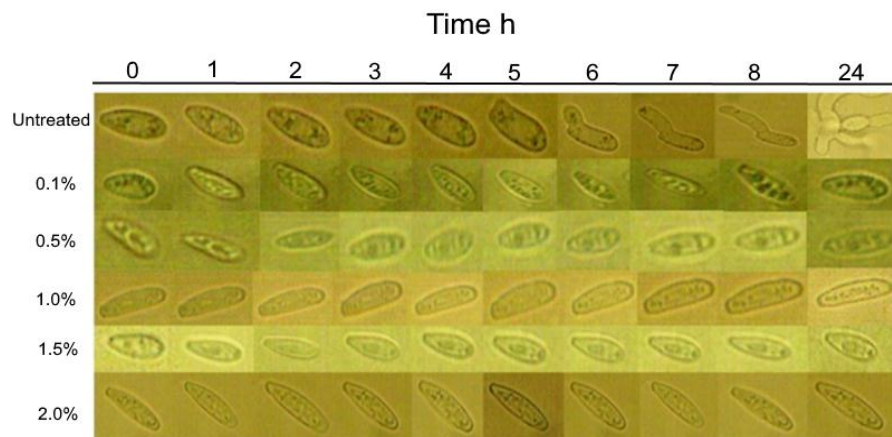


Figure 4. Development of the germination of *Colleotrichum* spores treated with different concentration of LMW chitosan, during 24 hours of incubation at 27 °C.

Figura 4. Germinación de esporas de *Colleotrichum* tratadas con diferentes concentraciones de quitosano de BPM, durante 24 horas de incubación a 27 °C.

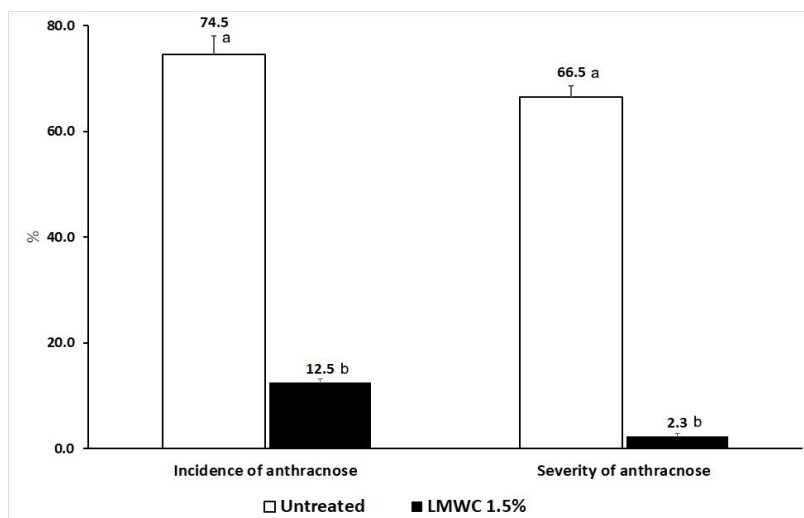


Figure 5. Effect of chitosan in the incidence and severity of anthracnose in avocado fruits. Different letters means are significantly different between treated and untreated fruits ($p < 0.05$).

Figura 5. Efecto del quitosano en la incidencia y severidad de la antracnosis en frutos de aguacate. Letras medias son significativamente diferentes entre las frutas tratadas y las no tratadas ($p < 0.05$).

45 %, (Table 1). Chitosan concentrations of 0.1, 0.5 and 1.0 % (w/v) decreased spore germination (Figure 4); this parameter was completely inhibited in both strains AG3 and AG1 when 1.5 % LMW and MMW chitosan solutions were used (Table 1).

la esporulación en 47 y 45 %, (Tabla 1). Las concentraciones de quitosano de 0.1, 0.5 y 1 % (p/v) disminuyeron la germinación de esporas (Figura 4); este parámetro estuvo completamente inhibido en ambas cepas AG3 y AG1 cuando se utilizaron soluciones de quitosano de LMW y MMW al 1.5 % (Tabla 1).

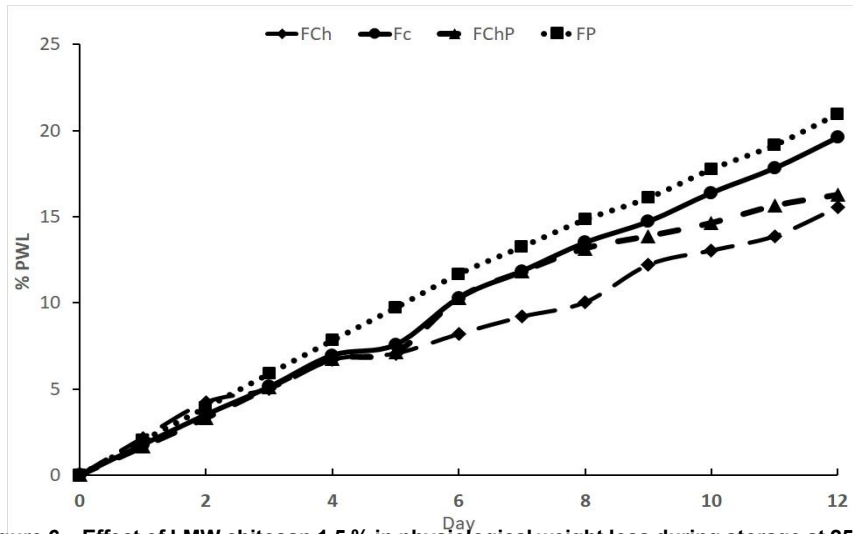


Figure 6. Effect of LMW chitosan 1.5 % in physiological weight loss during storage at 25 °C. FCh: fruits with chitosan. Fc: fruits untreated (control). FChP: fruits treated with chitosan and inoculated with pathogen. FP: fruits inoculated with pathogen without chitosan.

Figura 6. Efecto del quitosano de BPM al 1.5 % sobre la pérdida fisiológica de peso durante el almacenamiento a 25 °C. FQ: frutos con quitosano. Fc: frutos no tratados (control). FQP: frutos tratados con quitosano e inoculados con el patógeno. FP: frutos sin quitosano inoculados con el patógeno.

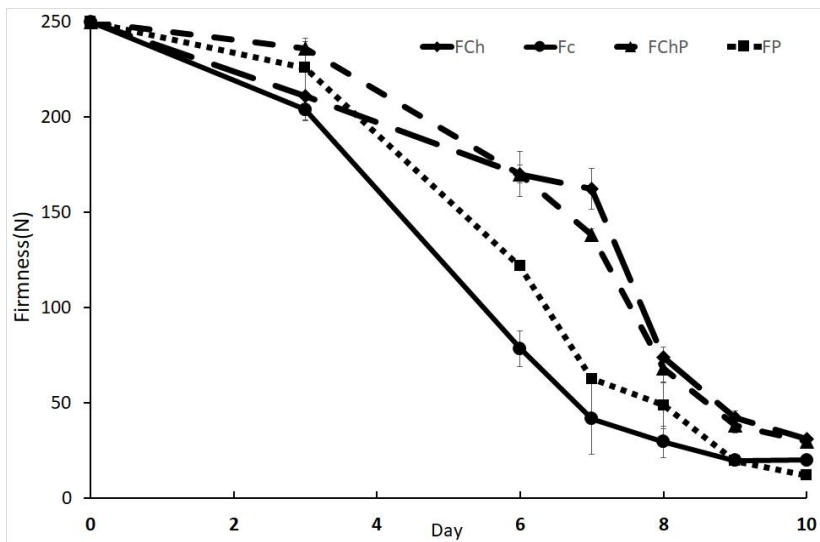


Figure 7. Effect of LMW chitosan at 1.5 % on firmness fruit. FCh: fruits with chitosan. N: Newton. Fc: fruits untreated (control). FChP: fruits treated with chitosan and inoculated with pathogen. FP: fruits inoculated with pathogen without chitosan.

Figura 7. Efecto del QBPM a 1.5 % sobre la firmeza del fruto. FQ: Frutos con quitosano. Fc: Frutos sin tartar (testigos). FQP: Frutos tratados con quitosano e inoculados con el patógeno. FP: Frutos inoculados con el patógeno sin quitosano.

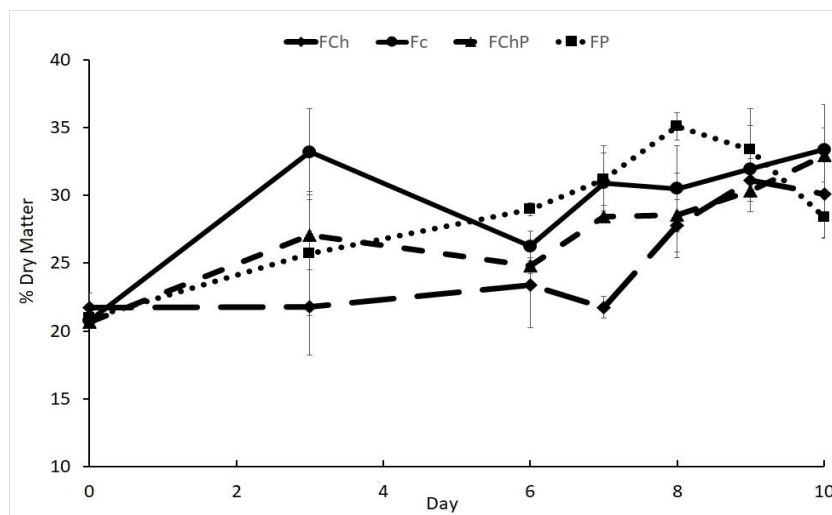


Figure 8. Effect of LMW chitosan 1.5 % in dry matter of avocado fruits. FCh: fruits with chitosan. Fc: fruits untreated (control). FChP: fruits treated with chitosan and inoculated with pathogen. FP: fruits inoculated with pathogen without chitosan.

Figura 8. Efecto del quitosano de BPM al 1.5 % sobre la material seca de frutos de aguacate. Fch: Frutos con quitosano. FQ: Frutos con quitosano. Fc Frutos sin tartar (testigos). FQP: Frutos tratados con quitosano e inoculados con el patógeno. FP:Frutos inoculados con el patógeno y sin quitosano.

Effect of chitosan on the incidence and severity of anthracnose in avocado fruits

LMW chitosan treatment resulted in a decrease in the incidence of anthracnose reducing it by more than 80 % compared to untreated fruits. The results of this study showed that in fruits treated with chitosan the severity of infection decreased by more than 95 % (Figure 5).

Effect of chitosan on avocado fruit

During the 12 days of storage, PWL of untreated (Fc) and inoculated fruits (FP) was of 19.6 and 20.9 %, respectively. Chitosan treated fruits (FCh and QChP) exhibited weight loss of 15.5 and 16.2 %, respectively (Figure 6).

Chitosan treatment (FCh and FChP) maintained fruit firmness during 10 days of evaluation at values of 30.8 and 29.5 N, respectively. Untreated samples (Fc and FP) exhibited a decrease in firmness up to values of 19.8 and 11.8 N, respectively (Figure 7).

Chitosan treated fruits exhibited lower dry matter content until 9 days of storage compared to untreated samples. At the end of the evaluated period, the percent of dry matter of fruits treated with chitosan (FCh and

Efecto del quitosano sobre la incidencia y severidad de antracnosis en frutos de aguacate.

Los tratamientos de quitosano de LMW resultaron en una disminución de la incidencia de antracnosis en más del 80 % en comparación con frutos no tratados. Los resultados de este estudio muestran que en frutos tratados con quitosano, la severidad de la infección se redujo más del 95 % (Figura 5).

Efecto del quitosano en los frutos de aguacate

Durante los 12 días de almacenamiento, la PWL de frutos sin tratar (Fc) y frutos inoculados (FP) fue de 19.6 y 20.9 % respectivamente. Los frutos tratados con quitosano (FCh y QChP), mostraron una pérdida de peso de 15.5 y 16.2 % respectivamente (Figura 6).

Los tratamientos con quitosano, FCh y QChP, mantuvieron a los frutos firmes durante 10 días de almacenamiento, con valores de 30.8 y 29.5 N, respectivamente. Los frutos no tratados, Fc y FP, mostraron una disminución de la firmeza de hasta 19.8 y 11.8 N respectivamente (Figura 7).

Los frutos tratados con quitosano mostraron menor contenido de material seca hasta los 9 días de

FChP) was of 30 to 33 %, and of untreated fruits (Fc and FP) was of 33 and 28 %, respectively (Figure 8).

Discussion

Beside of two strains of *Colletotrichum*, colonies identified as *Pestalotia* sp. were also isolated from lesions similar to anthracnose. This fungus is found mainly in the leaves of avocado trees and causes dead of branches and leaf spots (Morales-García et al., 2009). Some authors do not consider this fungus as an important postharvest pathogen due to its low occurrence in avocado orchards (Tamayo, 2007). However, it is commonly confused with *C. gloeosporioides* because it causes similar symptoms in fruits, although *Pestalotia* sp develops only in the peel, does not damage the pulp and is less apparent in mature avocado (Morales-García et al., 2009). In contrast, *Colletotrichum* causes the anthracnose disease in avocado fruits forming dark, sunken, circular or ellipsoidal lesions with large numbers of spores that form compact salmon, orange or pink masses. In Mexico, *C. gloeosporioides* is the main cause of anthracnose in avocado, but also *C. acutatum* has been isolated from orchards in the state of Michoacán (Guillén-Andrade et al., 2007). Among *C. gloeosporioides* fungus a morphological genetic and pathogenic diversity has been identified using isozyme and fragments of randomly amplified polymorphic DNA (Montero-Tavera et al., 2010). Genetic relationships between different monoconidial strains are influenced by the geographic origin and the symptoms they produce. The strains isolated in our study named AG1 and AG3 had different coloration at the base of the petri dish but share the same shape and size of spores. The color difference may be attributed to this genetic variability observed between isolates.

Both LMW and MMW chitosan had a significant effect on the growth of the fungus, and the maximum inhibition achieved was over 90% (at 1.5 and 2.0 % chitosan) (Figure 3b). Salvador et al. (1999) reported 100 % inhibition of *Colletotrichum* sp and *Diplodia* sp., isolated from Hass avocado with anthracnose symptoms, using chitosan solutions of 0.1 to 0.5 % w/v, but the study did not specify the chitosan characteristics. Chitosan concentration and characteristics (molecular weight and % of deacetylation) are responsible for the inhibition of fungus growth, mainly through its polycationic nature

almacenamiento en comparación con las muestras no tratadas. Al final del periodo de evaluación, el porcentaje de materia seca de los frutos tratados con quitosano (FCh y QChP) fue del 30 al 33 % y en frutos no tratados (Fc y FP) fue del 33 y 28 % respectivamente (Figura 8).

Discusión

Además de las dos cepas de *Colletotrichum* se aisló una cepa identificada como *Pestalotia* sp aislada de lesiones similares a las de antracnosis. Este hongo se encuentra principalmente en las hojas del árbol de aguacate ocasionando ramas secas o manchas foliares, se presenta en forma ocasional causando daños ligeros en hojas terminales (Morales-García et al., 2009). Algunos autores no lo consideran como patógeno importante en poscosecha ya que su ocurrencia en cultivos de aguacate es poco común (Tamayo, 2007). Sin embargo, es común confundirlo con *C. gloeosporioides* debido a que los síntomas en el fruto son muy parecidos, aunque *Pestalotia* sp se desarrolla sólo en la cáscara y no daña la pulpa, siendo menos aparente en el aguacate maduro (Morales-García et al., 2009). En contraste, *Colletotrichum* ocasiona la enfermedad de antracnosis en frutos de aguacate, formando lesiones oscuras hundidas, circulares o elipsoidales con gran cantidad de esporas que forman masas compactas de color salmón, naranja o rosada. En México *C. gloeosporioides* es el principal causante de la antracnosis en aguacate, aunque también *C. acutatum* ha sido aislado de huertas de aguacate de Michoacán (Guillén-Andrade et al., 2007). Entre cepas de *C. gloeosporioides*, se ha identificado una diversidad morfológica y patogénica mediante patrones isoenzimáticos y fragmentos de polimorfismo de ADN amplificado al azar (RAPD) (Montero-Tavera et al., 2010). La relación genética entre diferentes cepas monoconidiales está influenciada por la localidad de origen y por los síntomas que producen. Las cepas aisladas en nuestro estudio denominadas AG1 y AG3 presentaron diferente coloración en la base de la caja petri, pero compartieron la misma forma y tamaño de las esporas. La diferencia del color puede ser atribuida a la variabilidad genética entre aislados.

Tanto el quitosano de LMW como el de MMW tuvieron un efecto significativo en el crecimiento del hongo. La máxima inhibición lograda fue superior al 90 % (a concentraciones de 1.5 y 2.0 % de quitosano) (Figura 3b). Salvador et al. (1999) reportó una inhibición del 100 % para *Colletotrichum* sp y *Diplodia* sp., aislados de frutos de aguacate Hass con síntomas de antracnosis, utilizando soluciones de quitosano desde 0.1 a 0.5 % p/v, sin embargo el estudio no especifica las características del quitosano utilizado. La concentración y características del quitosano (peso molecular y % de desacetilación) podrían tener influencia en la inhibición del crecimiento del hongo, principalmente por su naturaleza policationica que

that interacts electrostatically with negatively charged phospholipids in the membrane, forming spaces through which the chitosan can penetrate and reach the cytosol (Palma-Guerrero *et al.*, 2010). The interaction of the free amino groups, which are positively charged in acid media, with the negative residues of exposed macromolecules in the wall of the fungi, change the permeability of the plasmatic membrane, resulting in an alteration of its principal functions, such as the output of wastes and intake of nutrients (Benhamou, 1992). In other studies it was demonstrated that chitosan influences the output of potassium, the pH of the medium and the activity of the ATPase in the cell membrane of the fungus *R. stolonifer* (García-Rincón *et al.*, 2010). The spaces formed in the membrane may also allow the free passage of calcium, causing an imbalance gradient that destabilizes the cell (Bautista-Baños *et al.*, 2005, Palma-Guerrero *et al.*, 2010). Chitosan altered the outer and nuclear membrane permeability and may also inhibit RNA and protein synthesis when it entering the cell and can be able to interact with the DNA, interfering the transcription process, in addition to the polycationic nature (Möller *et al.*, 2004; Rodríguez *et al.*, 2005). Furthermore, there is evidence that chitosan induces marked morphological changes such as cell disruption and structural alterations (López-Mora *et al.*, 2013; El-Ghaouth *et al.*, 1992). Evidence of the *in vitro* effectiveness of chitosan is described by López-Mora *et al.* (2013), who used 1 % LMW solution achieved inhibition of approximately 80 % for *A. alternata* isolated from mango; by the other hand Liu *et al.* (2007), achieved 100 % and 90 % of inhibition of mycelial growth of *Botrytis cinerea* and *Penicillium expansum*, respectively, using 1% (w/v) chitosan solution. Our results were more effective compared to those described by Bautista-Baños *et al.* (2005), who reported only 10 % of IMG for *C. gloeosporioides*, isolated from papaya using 1 and 2 % (w/v) LMW chitosan. Some authors suggest that the molecular weight of chitosan influences its action mechanism, so that, higher molecular weight reduces permeability of the double nuclear membrane (Liu *et al.*, 2001; Aranaz *et al.*, 2009). However, our results did not show significant differences between the LMW and MMW treatments. The contrasting results may be partially explained by the genetic and morphological variability between different monoconidial strains of *C. gloeosporioides* (Ramos-García *et al.*, 2010). Both chitosan solutions (LMW and MMW) had a % IMG >90

interactúa electrostáticamente con las cargas negativas de los fosfolípidos de la membrana, formando espacios a través de ella, con lo cual el quitosano puede entrar y llegar al citosol (Palma-Guerrero *et al.*, 2010). La interacción de los grupos amino libres, positivamente cargados en medio ácido, con los residuos negativos que exponen las macromoléculas de la pared celular del hongo, inducen cambios en la permeabilidad de la membrana plasmática, resultando en una alteración de su función principal, que es la salida de desechos y la entrada de nutrientes (Benhamou, 1992). En otros estudios se ha demostrado que el quitosano influye en la salida de potasio, el pH del medio y la actividad de ATPasas presentes en la membrana del hongo *R. stolonifer* (García-Rincón *et al.*, 2010). Los espacios que se forman en la membrana permiten el paso libre de calcio, lo que ocasiona un desajuste en el gradiente y como consecuencia inestabilidad en la célula (Bautista-Baños *et al.*, 2005; Palma-Guerrero *et al.*, 2010). Dada su naturaleza química, el quitosano puede alterar la permeabilidad de la membrana celular y nuclear, puede inhibir la síntesis de RNA y proteínas cuando entra en el núcleo celular, y puede ser capaz de interactuar con el DNA, interfiriendo el proceso de transcripción (Möller *et al.*, 2004; Rodríguez *et al.*, 2005). Además, existe evidencia que el quitosano induce en hongos, marcados cambios morfológicos, como alteraciones estructurales y desorganización celular (López-Mora *et al.*, 2013; El-Ghaouth *et al.*, 1992). Evidencias de la efectividad *in vitro* del quitosano son descritas por López-Mora *et al.* (2013), quien utilizó soluciones de quitosano de BPM al 1 % logrando una inhibición de casi un 80 % para *A. alternata* aislado de mango. Por otro lado Liu *et al.* (2007) lograron inhibir en un 100 % el crecimiento micelial de *Botrytis cinerea* y en un 90 % el de *Penicillium expansum* respectivamente, usando una solución de 1 % (p/v) de quitosano. Nuestros resultados fueron más efectivos comparados con los reportados por Bautista-Baños *et al.* (2005), quien reporta solo un 10 % de IMG de *C. gloeosporioides*, aislado de papaya, empleando 1 y 2 % (p/v) de quitosano de LMW. Algunos autores sugieren que el peso molecular del quitosano influencia su mecanismo de acción, ya que un peso molecular alto reduce su permeabilidad en la doble membrana nuclear (Liu *et al.*, 2001; Aranaz *et al.*, 2009). Sin embargo, nuestros resultados no muestran diferencias significativas entre los tratamientos con quitosano de LMW y MMW. Los resultados contrastantes pueden ser parcialmente explicados por la variabilidad genética y morfológica entre las diferentes cepas monoconidiales de *C. gloeosporioides* (Ramos-García *et al.*, 2010). Ambas soluciones de quitosano (LMW y MMW) tuvieron un % de IMG >90 %. Estudios previos reportaron similares % de ICM con quitosano de bajo y medio peso molecular (Kong *et al.*, 2010).

Por su parte, la esporulación es importante durante el crecimiento fúngico. El quitosano afecta la producción de esporas y altera el proceso de diferenciación celular en el hongo. Todos

% . Previous studies reported similar % IMG with low and medium molecular weight chitosan (Kong et al., 2010).

For its part, sporulation is important during fungal growth. The chitosan concentration affects sporulation, and alters the cell differentiation processes and the spores production. All the chitosan treatments reduced sporulation up to 50 % compared to the control. Strain AG3 was more susceptible to chitosan treatment, whereas AG1 showed more resistance. However, neither strain (AG1 and AG3) showed significant difference. Bautista-Baños et al. (2005) studied the behavior of two *C. gloeosporioides* strains isolated from papaya (Veracruz and Guerrero, Mexico) subjected to LMW, MMW and high molecular weight chitosan (HMW) and found a reduction in sporulation greater than 50 %, but there was no effect of polymer weight on this parameter. We found that spore germination was reduced by chitosan regardless of the type. Spore germination of 0 % was achieved with 1.5 % chitosan solutions (Tabla 2). According to Ocampo et al. (2009) the development, growth, sporulation, germination, differentiation and virulence in a variety of fungi is mediated by signal transduction, specifically by protein kinase A which, which regulates, the asexual sporulation of the fungus *Mucor circinelloides* (Rodríguez-López et al., 2009). This process may be affected in mutants that lack the regulatory subunit of this protein. Chitosan treatments may affect signal transduction of the protein kinase A pathway and affect spore development by impairing the structure, physiological and reproductive functions or by differentially activating signaling pathways. According to our results, spore germination was decreased by the effect of chitosan and according to our results, it occurs independently of the type used but is affected by chitosan concentration. As mentioned previously chitosan affects the integrity of the fungi cell membrane, which can cause losses of intracellular material (Zakrzewska et al., 2005). This could be a signal to inhibit the germination of those spores that were formed.

Since that *in vitro* tests we did not find significant differences between LMW and MMW, for the *in vivo* experiments we used LMW only. LMW treatment reduced disease incidence and severity in comparison to untreated fruits. This result may be attributed to the effectiveness of the chitosan elicitor-like substance that may activate the fruit defense system (Benigne-Ernest et al., 2008). In previous studies, we analyzed the global

los tratamientos con quitosano redujeron la esporulación hasta un 50 %, respecto al testigo. La cepa AG3 fue más susceptible a los tratamientos con quitosano, mientras que la cepa AG1 muestra mayor resistencia. Sin embargo, ninguna cepa (AG1 y AG3) mostró diferencia significativa. Bautista-Baños et al. (2005) estudiaron el comportamiento de dos cepas de *C. gloeosporioides* (aisladas de papaya en Veracruz y Guerrero, México) sujetas quitosano de LMW, MMW y HMW (alto peso molecular), encontrando una disminución en la esporulación mayor al 50 %, sin efecto del peso molecular del polímero sobre este parámetro. Con respecto a la germinación de esporas, nosotros encontramos que fue reducida por quitosano sin importar el tipo. Un 0 % de la germinación de esporas se logró con soluciones de quitosano al 1.5 % (Tabla 2). De acuerdo con Ocampo et al. (2009), los procesos de desarrollo, crecimiento, esporulación, germinación, diferenciación y virulencia en una variedad de hongos, son mediados por transducción de señales, específicamente por la proteína cinasas A, la cual, regula la esporulación asexual del hongo *Mucor circinelloides* (Rodríguez-López et al., 2009). Este proceso puede afectarse en mutantes carentes de la subunidad regulatoria de esta enzima. Posiblemente el quitosano incida en la transducción de señales en la ruta de la proteína cinasa A y esto pueda afectar funciones fisiológicas y reproductivas, deteriorando la estructura y desarrollo de las esporas. De acuerdo con nuestros resultados, la germinación de esporas disminuyó por el efecto del quitosano independientemente del tipo de quitosano empleado y dependiente de la concentración del mismo. Como se ha mencionado anteriormente, el quitosano afecta la integridad de la membrana celular del hongo, lo cual puede causar pérdida de material intracelular (Zakrzewska et al., 2005). Esto podría ser una señal para inhibir la germinación de aquellas esporas que fueron formadas.

Dado que en las pruebas *in vitro* no mostraron diferencias significativas entre el quitosano de LMW y el de MMW, para los experimentos *in vivo* solo se usó solo del de LMW. Los tratamientos con quitosano de LMW redujeron la severidad e incidencia de la enfermedad en comparación con los frutos no tratados. Este resultado se puede atribuir a la efectividad del quitosano como sustancia elicitor que puede activar el sistema de defensa del fruto (Benigne-Ernest et al., 2008). En estudios previos analizamos la expresión genética global de la interacción en el sistema aguacate Hass-*Colletotrichum*-quitosano, el análisis transcriptómico mostró una amplia expresión de genes que participan en la respuesta de defensa del fruto (Xoca-Orozco et al., 2017; Gutiérrez-Martínez et al., 2016). Además, también observamos una alta expresión de

gene expression of interaction of the Hass avocado-*Colletotrichum*-chitosan system, the transcriptomic analysis showed a broad expression for genes participating in fruit defense response (Xoca-Orozco et al., 2017; Gutiérrez-Martínez et al., 2016). In addition to this, we also observed a high expression in some genes related to epicatechin and AFD synthesis, compounds that are related to the defense system of the avocado fruit against the attack of *Colletotrichum* (Wang et al., 2004a; 2004b; 2006).

Chitosan films also act as barriers for oxygen and carbon dioxide, which reduce the incidence of the disease (Miranda et al., 2003) by ensuring water permeability, slowing gas exchange limiting the development of the pathogen due to low oxygen and ethylene production (Xaun-Zhu et al., 2008). This coating effect also reduced the physiological weight loss of chitosan-treated fruits during storage (Figure 4a). Salvador et al. (1999) evaluated different chitosan films and observed that fruits lost 10 % of their physiological weight after 6 days of storage, which was similar to our results.

During fruit ripening and storage, firmness gradually decreased due to changes at the cell wall level, hydrolysis of peptides, cellulase, pectin methylesterase and polygalacturonase enzyme activity, which in turn degrade high molecular weight polymers such as cellulose and hemicellulose (Silveira, 2007). In fruits treated with LMW chitosan these processes are delayed by the presence of the film resulting in less firmness loss and an extension of the fruit shelf life. Chitosan may contribute to the preservation of pectin links and the distribution of cellulose in the cell wall preventing degradation and maintaining fruit firmness (Elsabee & Abdou, 2013). Bill et al. (2014) applied chitosan films to avocado fruits and reduced the incidence and severity of anthracnose disease, increased resistance to the pathogen and also maintained the firmness, the content of phenolic compounds and the activity of enzymes related to the defense system of the fruit.

Fruit dry matter is an important parameter to determine avocado ripeness and it depends on the period of fruit harvesting. However, as maturity progresses there is a gradual increase in dry matter, and when the fruit ripens in the field it decreases (Wang et al., 2012). Our results showed that dry the matter of fruits treated with LMW did not increased during storage but significantly ($p < 0.05$) decreased when fruit reached maturity. Ozdemir & Cavallazzi (2004) reported that this effect could be due to

algunos genes relacionados con la síntesis de epicatequina y AFD, compuestos que están relacionados con el sistema de defensa del fruto de aguacate contra el ataque de *Colletotrichum* (Wang et al., 2004a; 2004b; 2006).

Las películas de quitosano también actúan como barreras para el oxígeno y bióxido de carbono, lo cual reduce la incidencia de la enfermedad (Miranda et al., 2003), al hacer más lento el intercambio gaseoso, limita el desarrollo del patógeno debido a la baja concentración de oxígeno y baja producción de etileno (Xaun-Zhu, 2008). Estas películas también reducen la pérdida fisiológica de peso durante el almacenamiento de frutos tratados con quitosano (Figura 4a). Salvador et al. (1999) evaluaron diferentes películas de quitosano obteniendo que los frutos de aguacate tratados con películas simples perdieron 10 % del peso fisiológico a los 6 días de almacenamiento, lo cual fue similar a nuestros resultados.

Durante la maduración y el almacenamiento del fruto, la firmeza fue disminuyendo gradualmente debido a cambios ocurridos a nivel de la pared celular, por la acción de enzimas como celulasa, pectin metilesterasa y poligalacturonasa, que degradan polímeros de alto peso molecular como celulosa y hemicelulosa (Silveira, 2007). En los frutos tratados con quitosano de LMW estos procesos son retardados por la presencia de la película, resultando en menor pérdida de firmeza y promoviendo la prolongación de la vida de anaquel del fruto. El quitosano podría contribuir a preservar los puentes de unión de la pectina y la distribución de la celulosa en la pared celular para evitar su degradación, manteniendo así la turgencia del fruto (Elsabee & Abdou, 2013). Bill et al. (2014), aplicaron películas de quitosano a frutos de aguacate y redujeron la incidencia y severidad de la antracnosis, incrementaron la resistencia al patógeno así como también la firmeza, el contenido de compuestos fenólicos y la actividad de enzimas relacionada con el sistema de defensa del fruto.

La materia seca es un parámetro importante para determinar el estado de madurez de los frutos de aguacate y depende del periodo en que se coseche el fruto. Sin embargo, se ha observado que conforme aumenta la maduración, hay un aumento gradual de materia seca y cuando el fruto madura en el campo, ésta disminuye (Wang et al., 2012). Nuestros resultados mostraron que la materia seca en los frutos tratados con quitosano de LMW no se incrementó durante el almacenamiento pero disminuyó significativamente ($p < 0.05$) cuando alcanzaron la madurez de consumo. Ozdemir & Cavallazzi (2004) reportaron que este efecto puede ser

inactivation of acetyl-CoA carboxylase, a key enzyme in the production of long chain fatty acid from acetate-14C. Chitosan probably affected the function of this enzyme in avocado tissue, which caused this behavior. Further studies are needed to verify the effect of chitosan in inactivation of acetyl-CoA carboxylase in avocado fruits.

Conclusions

The *in vitro* antifungal effectiveness of chitosan was optimal at concentrations of 1.5 % w/v irrespective of the molecular weight. This treatment allowed a high percent of IMG and reduced sporulation and germination of both strains of *Colletotrichum* sp. Statistical analysis revealed no significant difference ($p < 0.05$) between LMW and MMW but some differences among the evaluated strains of *Colletotrichum* sp were observed.

Chitosan treatment maintained the postharvest quality of the fruit, reduced the incidence and severity of disease and physiological weight loss, and maintained the firmness during storage. We propose that chitosan films could be a plausible alternative to preserve the avocado quality and lessen the anthracnose incidence. Additional to quality parameters, could be evaluated others such as CO₂ and ethylene production, and enzyme activity in order to determinate the effectiveness of chitosan films during storage of avocado fruits.

Acknowledgement

The authors thanks the CONACYT for the fellowship number 262345 awarded to the participating master student and the PROMEP ITTEP-PTC-004 for the support given to this project.

otorgado para este proyecto.

References

- Aranaz, I., Mengibar, M., Harris, R., Paños, I., Miralles, B., Acosta, N., Galed, G. and Heras, A. (2009). Functional characterization of chitin and chitosan. *Current Chemical Biology*. 3(2): 203-230. <https://doi.org/10.2174/187231309788166415>
- Barnett, H. & Hunter, B. (1998). Illustrated genera of imperfect fungi. Mac Millan Publishing Co. New York Géneros ilustrados de hongos imperfectos: 200-201.
- Bautista-Baños, S., Hernández-López, M., Hernández-Lauzardo, A., Trejo-Espino, J., Bautista-Cerón, M. and Melo-Giorgana, G. (2005). Effect of chitosan on *in vitro* development and morphology of two isolates of

debido a la inactivación de la acetil-CoA carboxilasa, una enzima clave para la producción de ácidos grasos de cadena larga a partir de acetato-14C. El quitosano probablemente afecte la función de esa enzima en los tejidos de aguacate, lo cual provoca este comportamiento. Son necesarios más estudios para verificar el efecto del quitosano en la inactivación de la acetil-CoA carboxilasa en frutos de aguacate.

Conclusiones

La efectividad antifúngica *in vitro* del quitosano fue óptima a la concentración de 1.5 % p/v independientemente del peso molecular. Este tratamiento permitió un alto porcentaje de IMG y reducción de la esporulación y germinación para ambas cepas de *Colletotrichum* sp. El análisis estadístico mostró que no hay diferencia significativa ($p < 0.05$) entre LMW y MMW, pero se observaron algunas diferencias entre las cepas de *Colletotrichum* sp evaluadas.

El tratamiento de quitosano mantuvo la calidad poscosecha del fruto de aguacate, redujo la incidencia y severidad de la enfermedad, así como la pérdida fisiológica de peso, manteniendo la firmeza del fruto durante el almacenamiento. Proponemos que las películas de quitosano podrían ser una alternativa recomendable para preservar la calidad del aguacate y disminuir la incidencia de antracnosis. Adicionalmente a los parámetros de calidad, se podrían evaluar otros durante el almacenamiento tales como producción de CO₂ y etileno, y actividad enzimática para determinar la efectividad de las películas de quitosano durante el almacenamiento de frutos de aguacate.

Agradecimientos

Los autores agradecen al CONACYT por la beca número 262345 otorgada para el estudiante de maestría participante y al PROMEP ITTEP-PTC-004 por el apoyo

- Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. And Sacc. *Revista Mexicana De Fitopatología*, 23(1): 62-67. <http://www.redalyc.org/pdf/612/61223109.pdf>
- Bautista-Baños, S., Ramos-García, L., Hernández-López, L., Córdova-Albores, L., López-Mora, L., Gutiérrez-Martínez, P. and Sánchez-Domínguez, D. (2012). Use of scanning and transmission electron microscopy to identify morphological and cellular damage on phytopathogenic fungi due to natural products application. *Current microscopy contributions to advances in science and technology Microscopy Series*. 5(1): 401-405. https://www.researchgate.net/profile/Silvia_Bautista-Banos/publication/261099023_Use_of_scanning_and_transmission_electron_microscopy_to_identify_morphological_and_cellular_damage_on_phytopathogenic_fungi_due_to_natural_products_application/links/00b4953359d42386ae000000.pdf
- Benhamou, N. (1992). Ultrastructural and cytochemical aspects of chitosan on *Fusarium oxysporum* f. Sp. Radicis-lycopersici, agent of tomato crown and root rot. *Food and Agriculture Organization of the United National* 82: 1185–1193. <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US9416475>
- Benigne-Ernest, A., Bonmort, J., Fleurat-Lessard, P. and Roblin, G. (2008). Early events induced by chitosan on plant cells. *Journal Experimental Botan.* 59(9): 2317-2324. <https://doi.org/10.1093/jxb/ern096>
- Bill, M., Sivakumar, D., Korsten, L. and Keith, A. (2014). The efficacy of combined application of edible coatings and thyme oil in inducing resistance components in avocado (*Persea americana* Mill.) against anthracnose during post-harvest storage. *Crop Protection*. 64: 159-167. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2014.06.015>
- Cordova-Albores, L., Rios, M., Barrera-Necha, L. and Bautista-Baños, S. (2014). Chemical compounds of a native *Jatropha curcas* seed oil from Mexico and their antifungal effect on *Fusarium oxysporum* F.sp. gladioli. *Industrial Crops and Products*. 62: 166–172. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.08.005>
- Correa-Pacheco, Z. N., Bautista-Baños, S., Valle-Marquina, M. Á. and Hernández-López, M. (2017). The Effect of Nanostructured Chitosan and Chitosan-thyme Essential Oil Coatings on *Colletotrichum gloeosporioides* Growth in vitro and on cv Hass Avocado and Fruit Quality. *Journal of Phytopathology*, 165(5): 297-305. <https://doi.org/10.1111/jph.12562>
- El-Ghaouth, A., Arul, J., Ponnampalam, R. and Boulet, M. (1991). Chitosan coating effect on storability and quality of fresh strawberries. *Journal of Food Science* 56(6): 1618–1620. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1991.tb08655.x>
- El-Ghaouth, A., Arul, J., Grenier, J. and Asselin, A. (1992). Antifungal activity of chitosan on two postharvest pathogens of strawberry fruits. *Postharvest Pathology and Mycotoxins*. 82: 398–402. https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1992Articles/Phyto82n04_398.PDF
- Elsabee, M. & Abdou, E. (2013). Chitosan based edible films and coatings: A review. *Materials Science and Engineering: C*. 33(4): 1819-1841. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2013.01.010>
- García-Rincón, J., Vega-Pérez, J., Guerra-Sánchez, M-G., Hernández-Lauzardo, A-N., Peña-Díaz, A., and Velázquez-Del Valle, M-G. (2010). Effect of chitosan on growth and plasma membrane properties of *Rhizopus stolonifer* (Ehrb.:Fr.) Vuill. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 97(3): 275-278. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2010.03.008>
- Guillén-Andrade, H., Gutiérrez, M., Lara-Chávez, M., Chávez, T., Vidales-Fernández, A., Ochoa, S. and López-Medina, J. (2007). Anthracnose: Research on its causing agent in the avocado producing area of Michoacan, Mexico. Proceedings VI World Avocado Congress 2007. Viña Del Mar, Chile: 12 – 16 LINK Noviembre 2007. <https://www.researchgate.net/publication/237574326>
- Gutiérrez-Martínez P., Chacón-López A., Xoca-Orozco L-Á., Ramos-Guerrero A., Velázquez-Estrada R. and Aguilera-Aguirre S (2016) Chitosan and Changes in Gene Expression During Fruit-Pathogen Interaction at Postharvest Stage. "Chitosan Preserv. Agric. Commod." (Eds S Bautista-Baños, G Romanazzi, A Jiménez-Aparicio) *Chitosan in the Preservation of Agricultural Commodities*: 299–312. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802735-6.00011-2>
- Gutiérrez-Martínez, P., Bautista-Baños, S. and Barrera-Necha, L. (2012). Ciencia Y Tecnología Alimentaria En México. Red de alimentos nutrición y salud. Uso potencial de extractos vegetales, aceites esenciales y quitosano para reducir el daño causado por hongos postcosecha en productos hortofrutícolas. Ed. Plaza Editores. México. 657 p.
- Kong, M., Guang, X., Xing, K. and Park, J. (2010). Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review. *International Journal of Food Microbiology* 144(1): 51–63 <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.09.012>
- Lárez C. (2008). Algunas potencialidades de la quitina y el quitosano para usos relacionados con la agricultura en Latinoamérica. *Revista UDO Agrícola*. Vol. 8 (1): 1-22. <https://s3.amazonaws.com/academia.edu.documents/37269876>

- [udo-agricola2008.pdf?response-content-disposition=inline%3B%20filename%3DSome_potentialities_of_chitin_and_chitos.pdf&X-Amz-Algorithm=AWS4-HMAC-SHA256&X-Amz-Credential=AKIAIWOWYYGZ2Y53UL3A%2F20190628%2Fus-east-1%2Fs3%2Faws4_request&X-Amz-Date=20190628T154300Z&X-Amz-Expires=3600&X-Amz-SignedHeaders=host&X-Amz-Signature=1f4cebfd0afc8df57f50dc3bd11d2ecf4be85f2011984653ecf00bee30c40c9b](#)
- Liu, X., Yun, L. Dong, Z., Zhi, L. and Kang, D. (2001). Antibacterial action of chitosan and carboxymethylated chitosan. *Journal of Applied Polymer science*. 79(7): 1324-35. [https://doi.org/10.1002/1097-4628\(20010214\)79:7<1324::AID-APP210>3.0.CO;2-L](https://doi.org/10.1002/1097-4628(20010214)79:7<1324::AID-APP210>3.0.CO;2-L)
- Liu, J., Tian, S., Meng, X., and Xu, Y. (2007). Effects of chitosan on control of postharvest diseases and physiological responses of tomato fruit. *Postharvest Biology and Technology*. 44(3): 300–306. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2006.12.019>
- López-Mora, L., Gutiérrez-Martínez, P., Bautista-Baños, S., Jiménez, L. and Zavaleta, H. (2013). Evaluation of antifungal activity of chitosan in *Alternaria alternata* and in the quality of 'tommy Atkins' mango during storage. *Revista Chapingo serie Horticultura*. 19(3): 315-331. <https://doi.org/10.5154/r.rchsh.2012.07.038>
- Martínez-Camacho, A., Cortez-Rocha, M., Ezquerro-Brauer, J., Graciano-Verdugo, A., Rodríguez-Félix, F., Castillo-Ortega, M. Yépiz-Gómez, Y. and Plascencia-Jatomeaa, M. (2010). Chitosan composite films: Thermal, structural, mechanical and antifungal properties. *Carbohydrate Polymers*. Vol. 82(2): 305-315. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.04.069>
- Miranda, P., Cárdenas, G., López, D. and Lara-Sagahon, A. (2003). Comportamiento de películas de quitosán compuesto en un modelo de almacenamiento de aguacate. *Revista de la Sociedad Química de México*. 47(4): 331-336. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S0583-76932003000400008&script=sci_abstract&lng=en
- Möller, H., Grelier, S., Pardon, P. and Coma, V. (2004). Antimicrobial and physicochemical properties of chitosan–HMPC based films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52(21): 6585–6591. <https://doi.org/10.1021/jf0306690>
- Monarul, I., Shah, M., Masum, M., Mahbubur, R., Molla, A., Shaikh, A. and Roy, S. (2011). Preparation of chitosan from shrimp shell and investigation of its properties. *International Journal of Basic & Applied Sciences*. 11 (1): 116-130 <http://www.ijens.org/Vol%2011%201%2001/110201-8484%20IJBAS-IJENS.pdf>
- Montero-Tavera, V., Morales, L., González, M., Anaya, J., Corona, T. and Gálvez, A. (2010). Genetic, pathogenic and morphological diversity of fungi *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) from Michoacán, Mexico. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 1(2): 157-172.
- Morales-García, J., Azpiroz-Rivero, H. and Pedraza-Santos, M. (2009). Cultural, morphological, pathogenic and isoenzymatic characterization of *Colletotrichum gloeosporioides* Penz., isolates causing anthracnose on avocado (*Persea americana* Mill.) in Michoacán, México. *Revista científica UDO Agrícola*. 9(4): 848-856. <http://www.bioline.org.br/abstract?cg09102>
- Ocampo, J. Fernandez, L. Silva, F. Pereyra, E. Moreno, S. Garre, V. and Rossi, S. (2009). A Subunit of Protein Kinase A Regulates Growth and Differentiation in the Fungus *Mucor circinelloides*. *Eukaryotic cell* 8(7): 933–944. <https://doi.org/10.1128/EC.00026-09>
- Ochoa-Ascencio, S. (2009). Enfermedades poscosecha del fruto de aguacate. Memorias del III Congreso Latinoamericano del Aguacate 2009: 1-14. https://www.researchgate.net/publication/237212579_Enfermedades_poscosecha_del_fruto_de_aguacate
- Ozdemir, F. & Topuz, A. (2004). Changes in dry matter, oil content and fatty acids composition of avocado during harvesting time and post-harvesting ripening period. *Food Chemistry*, 86(1): 79–83. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2003.08.012>
- Palma-Guerrero, J., López-Jiménez, J., Pérez-Berná, A., Huang, I-C., Jansson, H-B., Salinas, J., Villalaín, J., Read, N. and López-Llorca, L. (2010). Membrane fluidity determines sensitivity of filamentous fungi to chitosan. *Molecular Microbiology*. 75(4), 1021–1032. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.07039.x>
- Ramos-García, M., Bautista-Baños, S., Troncoso-Rojas, R., Bosquez-Molina, E., Alía-Tejacal, J., Guillén-Sánchez, D. and Gutiérrez-Martínez, P. (2010). Papaya postharvest handling in México: use of chitosan and isothiocyanates to control postharvest diseases. *Fresh Produce Global Science book* 4(1): 21-28. https://www.researchgate.net/profile/Porfirio_Gutierrez-Martinez/publication/286806340_Papaya

- [postharvest_handling_in_Mexico_use_of_chitosan_and_isothiocyanates_to_control_postharvest_diseases/links/5672fd808aedbbb3f9f78f6/Papaya-postharvest-handling-in-Mexico-use-of-chitosan-and-isothiocyanates-to-control-postharvest-diseases.pdf](https://doi.org/10.1080/10408398.2014.900474)
- Rodríguez, M. S., Albertengo, L., Debbaudt, A. and Agulló, E. (2005). Uso del quitosano en alimentos. In A. G. A. González, A. A. Gardea, & N. F. Cuamea (Eds.), *Nuevas tecnologías de conservación de productos frescos cortados* (p. 558). México: CIAD.
- Rodríguez-López, E., González-Prieto, J. and Mayek-Pérez, N. (2009). La Infección de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. Y Sacc. En Aguacatero (*Persea americana* Mill.): Aspectos Bioquímicos y Genéticos. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 27(1): 53-63. <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmfi/v27n1/v27n1a7.pdf>
- Romanazzi, G., Feliziani, E., Bautista-Baños, S. and Sivakumar, D. (2013). Shelf life extensión of fresh fruit and vegetables by chitosan treatment. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. In press. 57(3): 579-601 <https://doi.org/10.1080/10408398.2014.900474>
- Salvador, L., Miranda, P., Aragón, N. and Lara, V. (1999). Recubrimiento de quitosán en aguacate. *Revista de la Sociedad Química de México*. 43(1): 18-23. <https://www.redalyc.org/pdf/475/47543204.pdf>
- Sánchez-Domínguez, D., Bautista-Baños, S. and Castillo, P. (2007). The effect of chitosan in the development and morphology of *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl. *Anales de Biología*. 29: 23-32. <https://www.um.es/analesdebiologia/numeros/29/PDF/03-EFECTO.pdf>
- Schneider CA., Rasband WS. and Eliceiri KW (2012) NIH Image to ImageJ : 25 years of image analysis. *Nature Methods* 9: 671–675 <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>
- Sellamuthu, P.S., Sivakumar, D. and Soundy, P., (2013). Antifungal activity and chemical composition of thyme, peppermint and citronella oils in vapour phase against avocado and peach postharvest pathogens. *Journal of Food Safety*. 33(1): 86-93. <https://doi.org/10.1111/jfs.12026>
- SENASICA (Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria), (2017). SAGARPA (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación). Link December 2017.
- Silveira, A. (2007). Fisiología y bioquímica de los productos MPF. En: V Congreso Iberoamericano de Postcosecha y Agroexportaciones. Cartagena: Universidad de Cartagena. p 12.
- Tamayo, P. (2007). Enfermedades del aguacate. Encuentro Nacional de la Cadena Productiva del Aguacate. *Revista Politécnica* 4(3): 51-70. <http://revistas.elpoli.edu.co/index.php/pol/article/view/62>
- Wang, M. Zheng, Y. Khuong, T., and Lovatt, C. (2012). Effect of harvest date on the nutritional quality and antioxidant capacity in 'Hass' avocado during storage. *Food Chemistry*. 135: 694–698. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.05.022>
- Wang X, Beno-Moualem D, Kobiler I, Leikin-Frenkel A, Lichter A. and Prusky D. (2004a) Expression of $\Delta 12$ fatty acid desaturase during the induced accumulation of the antifungal diene in avocado fruits. *Molecular Plant Pathology* 5(6): 575–585. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2004.00249.x>
- Wang X, Kobiler I, Lichter A, Leikin-Frenkel A, Pesis E. and Prusky D (2006) 1-MCP prevents ethylene-induced accumulation of antifungal diene in avocado fruit. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 67: 261–267 <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2006.03.002>
- Wang X, Kobiler I, Lichter A, Leikin-Frenkel A. and Prusky D (2004b) Enhanced expression of avfae1 encoding a long-chain fatty acid elongase during the induction of the antifungal diene in avocado fruits. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 65: 171–180. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2005.01.004>
- Xaun-Zhu, Qiuming-Wang, Jiankang-Cao. and Weibo-Jiang. (2008). Effects of chitosan coating on postharvest quality of mango (*Mangifera indica* L. Tainong) fruits. *Journal of Food Processing and Preservation*, 32: 770-784. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4549.2008.00213.x>
- Xoca-Orozco L-Á, Cuellar-Torres EA, González-Morales S, Gutiérrez-Martínez P, López-García U, Herrera-Estrella L, Vega-Arreguín J. and Chacón-López A (2017) Transcriptomic Analysis of Avocado Hass (*Persea americana* Mill) in the Interaction System Fruit-Chitosan-*Colletotrichum*. *Frontiers in Plant Science* 8: 1–13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00956>
- Zakrzewska, A., Boorsma, A., Brul, S., Hellingwerf, K. and Klis, F. (2005). Transcriptional Response of *Saccharomyces cerevisiae* to the Plasma Membrane-Perturbing Compound Chitosan. *Eukaryotic Cell*. 4(4): 703. <https://doi.org/10.1128/EC.4.4.703-715.2005>