



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLAN

EVALUACION DEL EFECTO DEL RECUBRIMIENTO  
DE FRIJOL (*Phaseolus vulgaris L.*) CON QUITOSAN A  
DIFERENTES CONCENTRACIONES Y PESOS  
MOLECULARES, EN LA OVIPOSICION Y  
EMERGENCIA DE *Zabrotes subfasciatus* Boheman,  
ASI COMO LA ACTIVIDAD ANTIFUNGICA *IN-VITRO*  
EN HONGOS DE CAMPO Y ALMACEN QUE AFECTAN  
AL FRIJOL

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

**INGENIERA EN ALIMENTOS**

P R E S E N T A N :

**MIRIAM KARINA SANCHEZ ALEMAN  
SILVIA ARCADIA SANCHEZ CORTES**

ASESORES:

DRA. SUSANA PATRICIA MIRANDA CASTRO

DR. SERGIO JIMENEZ AMBRIZ

MC. MA. CRISTINA JULIA PEREZ REYES



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AVENIDA DE  
MEXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN**  
**UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR**  
**DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES**

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS  
FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES CUAUTITLAN



DEPARTAMENTO DE  
EXAMENES PROFESIONALES

**DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO**  
**DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN**  
**PRESENTE**

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares  
Jefe del Departamento de Exámenes  
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicarle a usted que revisamos la TESIS:

Evaluación del efecto del recubrimiento de frijol (Phaseolus vulgaris L.) con quitosán a diferentes concentraciones y pesos moleculares en la oviposición y emergencia de Zabrotes subfasciatus Boheman, así como la actividad antifúngica in-vitro en hongos de campo y almacén que afectan al frijol.  
que presenta la pasante: Miriam Karina Sánchez Alemán  
con número de cuenta: 09955395-3 para obtener el título de :  
Ingeniera en Alimentos

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

**ATENTAMENTE**  
**"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"**

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 20 de Junio de 2005

PRESIDENTE MC. Rosa Manuela Arriaga Orihuela

VOCAL Dra. Susana Patricia Miranda Castro

SECRETARIO Dra. Clara Ines Alvarez Manrique

PRIMER SUPLENTE MC. Carolina Moreno Ramos

SEGUNDO SUPLENTE IA. María Guadalupe López Franco

*[Firma de Rosa Manuela Arriaga Orihuela]*  
*[Firma de Susana Patricia Miranda Castro]*  
*[Firma de Clara Ines Alvarez Manrique]*  
*[Firma de Carolina Moreno Ramos]*  
*[Firma de María Guadalupe López Franco]*



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AVENIDA DE  
MEDICINA

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN  
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES CUAUTITLAN



DEPARTAMENTO DE  
EXAMENES PROFESIONALES

DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN  
PRESENTE

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares  
Jefe del Departamento de Exámenes  
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

Evaluación del efecto del recubrimiento de frijol (Phaseolus vulgaris L.) con quitosán a diferentes concentraciones y pesos moleculares en la oviposición y emergencia de Zabrotes subfasciatus Boheman, así como la actividad antifúngica in-vitro en hongos de campo y almacén que afectan al frijol.

que presenta la pasante: Silvia Arcadia Sánchez Cortés  
con número de cuenta: 08155025-0 para obtener el título de :  
Ingeniera en Alimentos

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 20 de Junio de 2005

|                  |                                     |  |
|------------------|-------------------------------------|--|
| PRESIDENTE       | MC. Rosa Manuela Arriaga Orihuela   |  |
| VOCAL            | Dra. Susana Patricia Miranda Castro |  |
| SECRETARIO       | Dra. Clara Ines Alvarez Manrique    |  |
| PRIMER SUPLENTE  | MC. Carolina Moreno Ramos           |  |
| SEGUNDO SUPLENTE | IA. María Guadalupe López Franco    |  |

*Agradecimientos:*

*A la Dra. Susana P. Miranda C. por su valioso apoyo brindado para la realización de éste proyecto, así como su comprensión, amistad y gran sentido humano.*

*A la Dra. Alma Virginia Lara Sagahonn por sus acertadas sugerencias.*

*Al Dr. Sergio Jiménez Ambriz por su disponibilidad durante el proyecto y comentarios.*

*A la M. en C. Cristina Pérez Reyes por compartirnos su experiencia y conocimientos.*

*A la Unidad de Investigación de granos y semillas de la FESC-UNAM, por habernos proporcionado el uso de sus instalaciones.*

*A mi compañera de tesis Silvia por haber compartido con migo esta experiencia de vida y por haberme entregado su amistad.*

*Karina.*

*A mi compañera de tesis Karina, por sus valiosas aportaciones y porque las circunstancias permitieron una sólida amistad.*

*Silvia.*

---

---

## AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIAS

### *A DIOS:*

*Por haberme permitido estar aquí, mostrarme el camino y dejarme seguirlo por toda su infinita bondad gracias señor por dejarme ser quien soy.*

### *A mis padres:*

*Por el apoyo, el esfuerzo y los sacrificios además del amor y atención de toda una vida de verdad gracias porque sin ustedes no hubiera logrado ser lo que soy hoy en día.*

### *A mis hermanos:*

*A pesar de nuestros pleitos y diferencias los quiero mucho y son parte importante en mi vida gracias por ponerle sabor a mi vida.*

### *A mis tíos y tías:*

*A mis tíos Jorge y Leo por estar siempre al pendiente de mí, por ayudarme y apoyarme en mi proyecto de vida, a mi tía Laura y Gustavo por su apoyo y aliento para realización de mi carrera. A mis tíos Ismael, Pilar, Lourdes, Roberto, Héctor y Leticia, por que a pesar de la distancia siempre se preocupan por mí.*

### *A mi esposo e hija:*

*Gracias Ro por ser mi compañero, amigo y más por estar ahí no importando las circunstancias y por amarme inmensamente, a Denny por ser la chispa que enciende mi vida por venir a enseñarme y mostrarme que su amor lo cura todo  
Los amo.*

### *A mis suegros y cuñado:*

*Gracias por todo el cariño, apoyo y comprensión para realizar este proyecto y por estar siempre al pendiente de mi familia.*

### *A mi abue Lulú:*

*Por ser siempre mi apoyo en momentos difíciles, por transmitirme tu fortaleza y ser un ejemplo de vida por todo tu inmenso amor y dedicación mil gracias y siempre vivirás en mi corazón.*

### *A mis primos:*

*Por ser parte de mi familia por los buenos momentos juntos gracias, a la tía Lala y Alita por el amor y cuidados para mi hija.*

### *A mis amigos:*

*Porque he merecido con ello un don divino, gracias a Fumy, Gilda Juana, Loro, Martín y Yarery por su amistad leal y sincera y por estar ahí no importando la distancia.*

*Karina*

---

---

**AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIAS**

*A mis papás, por su gran fortaleza y  
ejemplo de vida; a Juan Carlos, mi esposo,  
por su apoyo incondicional y a mis hijos:  
Uriel, Alan y Karla con infinito amor.*

*Silvia.*

**ÍNDICE GENERAL**

|  |           |
|--|-----------|
| Resumen  | i         |
| Introducción   | 1         |
| <b>Capítulo I. Generalidades del frijol</b>  | <b>8</b>  |
| 1. Generalidades del frijol  | 9         |
| Descripción botánica y morfología  | 10        |
| Estructura básica  | 10        |
| Pericarpio   | 10        |
| Semilla  | 11        |
| Partes de la semilla   | 12        |
| Morfología de la semilla   | 12        |
| Epispermo  | 12        |
| Endopleura   | 12        |
| Eje embrionario  | 13        |
| Tejido de reserva  | 13        |
| Morfología de la planta de frijol  | 13        |
| Composición química  | 16        |
| Carbohidratos  | 17        |
| Lípidos  | 17        |
| Vitaminas y minerales  | 17        |
| Producción   | 18        |
| Superficie cultivada y cosechada   | 19        |
| Pérdidas en el campo y en el almacén   | 20        |
| Factores que influyen en la calidad de los granos  | 21        |
| Condiciones climáticas durante el período de maduración del grano                            | 22        |
| Grado de maduración en el momento de la cosecha  | 23        |
| Daños mecánicos  | 23        |
| Impurezas  | 25        |
| Humedad  | 26        |
| Contenido de humedad de los granos   | 26        |
| Control de insectos en el campo y en grano almacenado  | 27        |
| <b>Capítulo II. Generalidades del gorgojo de frijol <i>Zabrotes subfasciatus</i> Boheman</b> | <b>30</b> |
| 2. Generalidades de insectos   | 31        |
| Morfología   | 31        |
| Clasificación de los insectos  | 32        |
| Generalidades del gorgojo pinto del frijol <i>Z. subfasciatus</i>                            | 33        |
| Taxonomía  | 33        |
| Hábitat  | 34        |
| Distribución   | 34        |
| Morfología   | 34        |
| Tegumento  | 35        |
| Desarrollo   | 36        |
| Biología, ecología y comportamiento  | 37        |
| Hábitos de apareamiento  | 40        |

|  |           |
|--|-----------|
| Factores que influyen en la oviposición  | 41        |
| <b>Capítulo III. Generalidades de hongos</b>   | <b>42</b> |
| Hongos en granos y semillas  | 43        |
| Hongos de Campo  | 44        |
| Daños por hongos en la planta  | 48        |
| Penetración de los hongos fitopatógenos  | 48        |
| Daños por hongos en frijol   | 50        |
| Hongos de Almacén  | 50        |
| Fuente de inóculo de los hongos de almacén   | 52        |
| Factores que favorecen el desarrollo de los hongos de almacén  | 53        |
| Humedad  | 53        |
| Temperatura  | 53        |
| Tiempo de almacenamiento y grado de invasión   | 54        |
| Material extraño   | 54        |
| Insectos y ácaros  | 55        |
| Daños causados por hongos en granos almacenados  | 55        |
| <b>Capítulo IV. Generalidades de Quitina y Quitosán</b>  | <b>57</b> |
| Generalidades sobre quitina y quitosán   | 58        |
| Quitina  | 58        |
| Propiedades fisicoquímicas   | 59        |
| Quitosán   | 60        |
| Propiedades fisicoquímicas   | 60        |
| Propiedades funcionales  | 62        |
| Propiedades de enlace  | 63        |
| Propiedades biológicas   | 63        |
| Quitina y Quitosán como agentes antimicrobianos  | 64        |
| Efecto de quitosán en hongos   | 64        |
| Factores que afectan la actividad antimicrobiana   | 68        |
| El peso molecular (PM)   | 68        |
| El grado de desacetilación (°GD)   | 68        |
| pH   | 68        |
| Temperatura  | 69        |
| Efecto de quitosán en bacterias  | 70        |
| Quitosán como Inductor (Elicitor)  | 71        |
| <b>Capítulo V. Metodología</b>   | <b>74</b> |
| Objetivos  | 75        |
| Cuadro Metodológico  | 76        |
| Descripción de actividades   | 77        |
| Actividades preliminares   | 77        |
| I. Obtención de los insectos para la prueba  | 77        |
| II. Preparación de dispersiones de quitosán  | 78        |
| 1. Efecto insecticida del quitosán a diferentes concentraciones como cubierta en frijol sobre <i>Z. subfasciatus</i> . | 79        |
| Actividad 1.1. Recubrimiento de frijol con quitosán  | 79        |

|  |     |
|--|-----|
| 2. Efecto de la cubierta de quitosán de bajo y alto PM en frijol sobre la oviposición y emergencia de <i>Z. subfasciatus</i> .             | 81  |
| Actividad 2.1. Marcado de color de los granos de frijol por la parte del hilo.   | 81  |
| Actividad 2.1.1. Efecto del color marcando el grano de frijol para la oviposición.   | 81  |
| Actividad 2.2. Efecto de la cubierta de quitosán de bajo y alto PM en frijol sobre la oviposición y emergencia de <i>Z. subfasciatus</i> . | 82  |
| Actividad 2.2.1. Separación de los granos.   | 85  |
| Actividad 2.2.2. Cuantificación de grano dañado.   | 85  |
| III. Preparación de medios de cultivo PDA y MSA  | 86  |
| Incremento de cepas  | 87  |
| 3. Evaluación del efecto de la actividad antifúngica de Quitosán en hongos de campo y almacén <i>in-vitro</i> .                            | 87  |
| Actividad 3.1. Preparación de medios de cultivo-quitosán   | 87  |
| Macromorfología de la colonia  | 89  |
| Actividad 3.2. Evaluación del efecto fungistático y fungicida del quitosán   | 89  |
| <b>Capítulo VI. Resultados y discusión</b>   | 91  |
| <b>Capítulo VII. Conclusiones y Recomendaciones</b>  | 130 |
| <b>Referencias consultadas</b>   | 134 |
| <b>Apéndice</b>  | 143 |

**ÍNDICE DE FIGURAS, CUADROS, TABLAS Y GRÁFICAS**

**FIGURA**

|     |   |    |
|-----|---|----|
| 1.  | Morfología de la semilla de frijol                | 11 |
| 2.  | Morfología de la planta de frijol                 | 15 |
| 3.  | Época de siembra de frijol 2003                   | 19 |
| 4.  | Ciclo del manejo del frijol                       | 28 |
| 5.  | Anatomía de un insecto                            | 32 |
| 6.  | <i>Zabrotes subfasciatus</i> Boheman              | 35 |
| 7.  | Ciclo biológico de <i>Zabrotes subfasciatus</i> B | 38 |
| 8.  | Semillas dañadas por hongos                       | 47 |
| 9.  | Grado de infección causada por <i>Rhizoctonia</i> | 49 |
| 10. | Estructura química del quitosán                   | 59 |

**CUADROS**

|    |   |    |
|----|---|----|
| 1. | Composición química de diversas variedades de frijol  | 16 |
| 2. | Cuadro Metodológico   | 76 |
| 3. | Propiedades químicas del quitosán a diferentes pesos moleculares  | 78 |
| 4. | Formato de resultados para la prueba del efecto insecticida del quitosán                                  | 80 |
| 5. | Formato de resultados para la prueba del efecto de la cubierta de quitosán en la oviposición y emergencia | 84 |
| 6. | Formato de resultados para el porcentaje de inhibición de hongos de campo y almacén                       | 89 |
| 7. | Formato de resultados para el efecto fungicida y fungistático del quitosán en cultivos secundarios        | 90 |

**TABLAS**

|    |  |     |
|----|--|-----|
| 1. | Elicitors de plantas y células microbianas   | 72  |
| 2. | Resultados obtenidos del porcentaje de inhibición de hongos de campo y almacén en tres diferentes concentraciones de quitosán y tres pesos moleculares durante un periodo de 9 días de incubación a una temperatura de 25 °C | 113 |
| 3. | Descripción de la macromorfología de los hongos de campo y almacenados con quitosán con diferentes pesos moleculares y concentraciones.  | 124 |
| 4. | Efecto del quitosán en los hongos de campo y almacén en cultivos secundarios   | 128 |

---

---

**ÍNDICE DE FIGURAS, CUADROS, TABLAS Y GRÁFICAS**

---

---

**GRAFICAS**

|     |  |     |
|-----|--|-----|
| 1.  | Porcentaje de mortalidad de <i>Zabrotes sub.</i> en semillas de frijol cubiertas con quitosán de bajo PM   | 93  |
| 2.  | Porcentaje de mortalidad de <i>Zabrotes sub.</i> en semillas de frijol cubierto con quitosán de alto PM  | 94  |
| 3.  | Efecto del color en la oviposición   | 95  |
| 4.  | Efecto del periodo de exposición del insecto en la oviposición para la prueba de color   | 96  |
| 5.  | Efecto de la cubierta del frijol con quitosán de bajo PM a diferentes concentraciones en la oviposición de <i>Zabrotes subfasciatus</i> Boh                  | 98  |
| 6.  | Efecto del periodo de exposición del insecto y los tratamientos en la oviposición de <i>Zabrotes subfasciatus</i> en frijol cubierto con quitosán de bajo PM | 98  |
| 7.  | Efecto del periodo de exposición del insecto y los tratamientos en la oviposición de <i>Zabrotes subfasciatus</i> en frijol cubierto con quitosán de alto PM | 100 |
| 8.  | Efecto del periodo de exposición, la concentración y los tratamientos en la oviposición con frijol cubierto con quitosán de alto PM                          | 101 |
| 9.  | Efecto del periodo de exposición del insecto y los tratamientos en la emergencia en frijol cubierto con quitosán de bajo PM                                  | 102 |
| 10. | Efecto del periodo de exposición y los tratamientos En la emergencia en frijol cubierto con quitosán de alto PM.   | 103 |
| 11. | Efecto del periodo de exposición del insecto en la diferencia de peso del frijol cubierto con quitosán de bajo PM  | 105 |
| 12. | Efecto de la concentración de la cubierta de quitosán de bajo PM sobre la diferencia de peso   | 107 |
| 13. | Efecto del periodo de exposición del insecto en la diferencia de peso del frijol cubierto con quitosán de alto PM  | 107 |
| 14. | Efecto del tratamiento en la diferencia de peso del frijol cubierto con quitosán de alto PM  | 108 |
| 15. | Efecto del periodo de exposición y los tratamientos en grano dañado cubierto con quitosán de bajo PM   | 109 |
| 16. | Efecto del periodo de exposición y la concentración en grano dañado cubierto con quitosán de bajo PM   | 110 |
| 17. | Efecto del periodo de exposición y los tratamientos en grano dañado cubierto con quitosán de alto PM   | 111 |
| 18. | Efecto del peso molecular y concentración de quitosán sobre el porcentaje de inhibición del hongo <i>Alternaria alternata</i>                                | 114 |
| 19. | Efecto del peso molecular y la concentración de quitosán sobre el porcentaje de inhibición del hongo <i>Fusarium oxisporium</i> .                            | 116 |
| 20. | Efecto del peso molecular y concentración de   |     |

**ÍNDICE DE FIGURAS, CUADROS, TABLAS Y GRÁFICAS**

---

---

|     |   |     |
|-----|---|-----|
|     | quitosán sobre el porcentaje de inhibición del hongo <i>Rhizoctoni solani</i> .   | 117 |
| 21. | Efecto del peso molecular y concentración de quitosán sobre el porcentaje de inhibición del hongo <i>Aspergillus Flavus</i> .           | 119 |
| 22. | Efecto del peso molecular y concentración de quitosán sobre el porcentaje de inhibición del hongo <i>Aspergillus chevalieri</i> .       | 120 |
| 23. | Efecto del tiempo y concentración de quitosán sobre el porcentaje de inhibición del hongo <i>Aspergillus chevalieri</i> .               | 121 |
| 24. | Efecto del peso molecular y la concentración de quitosán sobre el porcentaje de inhibición del hongo <i>Aspergillus nidulans</i> .      | 122 |
| 25. | Efecto del peso molecular, tiempo y concentración de quitosán sobre el porcentaje de inhibición del hongo <i>Aspergillus nidulans</i> . | 123 |

## Resumen

Este proyecto se realizó con el objetivo de evaluar el efecto que tiene el recubrir granos de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) con quitosán a diferentes concentraciones y pesos moleculares sobre la oviposición de la hembra y consecuentemente la emergencia del insecto *Zabrotes subfasciatus* Boheman; así como determinar su efecto insecticida y evaluación *in-vitro* de la actividad antifúngica sobre hongos patógenos que afectan al frijol en el campo y almacén.

El grano fue recubierto por inmersión en dispersiones de quitosán a las concentraciones de 0.5, 1.0, 2.0 y 4.0% de dos quitosanos de diferentes pesos moleculares denominados bajo y alto (52,800 y 136000 g/mol). Se usaron como controles negativos, el recubrimiento por inmersión del grano en agua y agua acidificada. Se usó el insecto *Zabrotes subfasciatus* Boheman de menos de 24 horas de emergido y el frijol peruano cosecha 2004 proveniente de la central de abastos del D.F. manteniéndose por 5 días en congelación para eliminar una posible infestación previa.

Se encontró que el quitosán tiene efecto insecticida a la concentración de 0.5 % de bajo y alto PM. Los resultados del efecto en la oviposición indican que las hembras no ovipositan en granos cubiertos con quitosán y que el peso molecular alto a cualquier de las concentraciones estudiadas y tiempos de infestación se inhibe la oviposición. Los resultados estadísticos del efecto en la emergencia muestran que sigue el mismo comportamiento que la oviposición.

Respecto al trabajo experimental con hongos, se probó *in-vitro* el uso de quitosán de tres diferentes pesos moleculares a tres diferentes concentraciones.

Se utilizaron 6 cepas de hongos de diferentes variedades de frijol aisladas directamente de la planta y semillas en la Unidad de Investigación de granos y semillas (UNIGRAS) en la FESC-UNAM. Las cepas de campo fueron *Alternaria alternata*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani* y de almacén *Aspergillus chevalierii*, *Aspergillus flavus* y *Aspergillus nidulans*. Los resultados estadísticos indicaron que existe diferencia significativa en la interacción del peso molecular y la concentración con respecto al porcentaje de inhibición. En general se encontró que el quitosán de mediano peso molecular a la concentración del 2% inhibe completamente el desarrollo de todos los hongos probados.

# **INTRODUCCIÓN**

## **Introducción**

El frijol constituye la base de la alimentación de la población mexicana y dada la cantidad de hectáreas sembradas y el volumen de consumo, ocupa el segundo lugar en importancia nacional. Una vez cosechado el frijol, se tiene que conservar de una manera tal que no pierda su calidad nutrimental y/o su capacidad de germinación; por tal motivo, su almacenamiento debe recibir la atención adecuada ya que durante este período, el frijol puede ser afectado por factores físicos del medio ambiente, como la temperatura y humedad, así como factores biológicos entre los que se incluyen los insectos, hongos, bacterias, roedores y aves. La infestación con insectos es la principal causa de grandes pérdidas que en términos de cantidad significan aproximadamente 550 millones de toneladas <sup>(62)</sup> sobre todo en lugares alejados de los centros de acopio. <sup>(16)</sup>

El deterioro de los granos almacenados es causado principalmente por insectos de almacén y debido a sus tamaños, capacidad de reproducción y a su amplia capacidad de adaptación a los medios en que viven, contribuyen a que los métodos de control no tengan el éxito esperado; siendo el gorgojo *Zabrotes subfasciatus* una de las principales plagas que dañan al frijol almacenado. <sup>(4, 88, 90)</sup>

Para el control de esta plaga, es común utilizar grandes cantidades de insecticidas y fumigantes, que aún cuando son efectivos, han ocasionado que los insectos sobrevivientes adquieran resistencia a estas

sustancias. Para controlar las poblaciones de insectos resistentes se hace necesario incrementar las dosis y el número de aplicaciones lo cual aumenta los residuos de estos compuestos en los alimentos así como también se ha demostrado que contaminan al medio ambiente.

Los agricultores emplean para el control de las plagas, productos que muchas veces son altamente tóxicos, que contaminan los granos y el medio ambiente, otras veces utilizan cenizas o simplemente dejan el producto con restos de follaje.<sup>(11)</sup>

Un método alternativo de control de insectos que dañan a granos almacenados, lo representa el empleo de polvos y extractos vegetales, debido a que las plantas en su composición química, contienen una gran diversidad de sustancias (metabolitos secundarios) que presentan efectos antagónicos sobre ellos, tal como ha sido demostrado en diversos estudios.<sup>(4, 16)</sup>

Otro de los factores biológicos que afecta a los granos almacenados es el ataque por hongos que se alojan en la semilla causando diferentes daños; si la infección es muy severa, el daño puede ocasionar la muerte del embrión. En infecciones leves, las semillas pierden su poder germinativo o puede verse afectado su vigor,<sup>(62)</sup> e incluso algunas especies son productoras de micotoxinas que al ser consumidas por el hombre o animales les causan diversos daños. Una de las especies mejor conocidas es *Aspergillus flavus* Link productora de aflatoxinas, metabolito secundario carcinógeno más potente que se conoce.

Muchos hongos no causan problemas a las semillas ni a las plántulas durante su germinación y emergencia, pero son capaces de causar el desarrollo de enfermedades foliares, del tallo o de los frutos que reducen la cantidad y calidad de las cosechas. <sup>(61)</sup>

El quitosán inhibe el crecimiento de una amplia variedad de hongos. La explicación de este efecto es que el quitosán con sus grupos amino cargados positivamente, interactúan con los grupos fosfatos negativos de los ácidos nucleicos del material genético de los hongos <sup>(33, 52)</sup>, en especial cuando los oligómeros de 7 unidades de quitosán inhiben el crecimiento de los hongos. En las plantas se induce la expresión de genes, <sup>(32, 52)</sup> ya que se detectó un aumento en la producción de proteínas y enzimas, <sup>(32, 33, 52)</sup> además de que se incrementan los compuestos fenólicos asociados a la pared induciendo cambios en la permeabilidad de la membrana. <sup>(32, 33, 52)</sup>

No todos los hongos se ven inhibidos de igual manera ya que esto depende de su composición, así los que no se inhiben con el, tienen mecanismos de eliminación o degradación <sup>(31, 32)</sup> Se cree que cuando el quitosán se libera de la pared celular de patógenos fungales, debido a la acción de enzimas hidrolíticas de la planta hospedera, alcanza el núcleo del hongo e interfiere con la síntesis de RNAm y proteína.

El quitosán también tiene actividad bactericida, ya que él junto con otras poliaminas interactúa con la membrana celular para alterar la permeabilidad de la misma. <sup>(68)</sup>

Se ha examinado la actividad anti-bacteriana de quitosán para varias bacterias como son, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* y *Vibrio*, y esta actividad depende del grado de desacetilación y del tipo de bacteria. <sup>(68)</sup>

También el N-carboxibutil quitosán se ha probado contra varios microorganismos patógenos, demostrando su actividad bacterioestática, bactericidas y candidacida. Los microorganismos tratados experimentan las alteraciones morfológicas marcadas compatibles con efecto bactericida cuando son examinadas por microscopía electrónica. <sup>(47)</sup>

El quitosán también inhibe la transmisión fúngica a las raíces primarias de las plantas de trigo, controlando el crecimiento de *Fusarium graminearum*, estimulando la acumulación de fenoles y lignina. El quitosán tiene un potencial para la mejora de la calidad de la semilla y el realce de la cosecha y de granos almacenados. <sup>(9)</sup>

El quitosán inhibe el crecimiento del *Aspergillus flavus* y de la aflatoxina que produce en maíz y cacahuate postcosecha. <sup>(9)</sup>

El recubrimiento de quitosán a la semilla de trigo da lugar a la reducción de infecciones primarias de la raíz provocadas por *Fusarium graminearum*, demostrando ningún síntoma de fitotoxicidad. <sup>(9)</sup>

En vista de su naturaleza policatiónica, el quitosán puede actuar fácilmente con residuos negativamente cargados de las macromoléculas expuestas en la superficie de la célula, causando cambios importantes en la composición de la membrana. También puede actuar con el DNA celular de la planta activando la inhibición de la acción de los genes de los hongos patógenos, induciendo reacciones de defensa en la planta. <sup>(9)</sup>

Con el objeto de generar una innovadora tecnología para la reducción de pérdidas poscosecha de los granos y semillas se evaluará la actividad insecticida del quitosán recubriendo al grano con este producto derivado de la desacetilación de la quitina proveniente del exoesqueleto de crustáceos. <sup>(8, 53, 81)</sup> Además de evaluar la actividad antifúngica *in-vitro* en hongos que atacan al frijol en campo y almacén.

Existen pocas investigaciones acerca del recubrimiento de granos contra el combate de insectos, sin embargo hay muchas investigaciones en cuanto la actividad bacteriana y antifúngica del quitosán tanto en frutos como cereales y siendo este el segundo problema a enfrentar en cuanto a granos almacenados, se evaluará la actividad antifúngica contra seis especies de hongos que atacan al frijol, tres principalmente en el campo y tres una vez que está en el almacén.

Estos hongos son: *Alternaria alternata*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus chevalierii* (Mangin) Tom y Church. Y el grupo *Aspergillus nidulans*, para campo y almacén respectivamente. <sup>(31, 33, 52, 62)</sup> Aunque en los últimos años se ha encontrado que *A.flavus* dependiendo de las condiciones ambientales también se puede desarrollar en el campo.

**CAPÍTULO I**

**GENERALIDADES DEL FRIJOL**

## **I. Generalidades del Frijol (*Phaseolus vulgaris* L).**

El frijol en México es uno de los cultivos más importantes del país, así como para muchos otros países en desarrollo. En estos países el frijol es producido principalmente en pequeñas superficies.<sup>(98)</sup> y forma parte de la dieta fundamental de sus habitantes por su alto grado de nutrientes, ya que contiene fibra, hidratos de carbono y proteínas, cualidades que lo convierten en un producto básico.<sup>(80)</sup>

Cultivado desde hace 8,000 años, el frijol formó parte de los cuatro productos agrícolas (maíz, frijol, calabaza y chile), que constituyeron la columna vertebral de la alimentación de los pueblos mesoamericanos. Nuestro país es considerado como uno de los centros de origen de diversos tipos de frijol, siendo el principal el *Phaseolus vulgaris* L.<sup>(98)</sup>

Se estima que en la actualidad se siembran 20 variedades y 50 criollas en el territorio nacional, hecho que demuestra la diversidad de mercados, preferencias, precios y calidades.<sup>(98)</sup>

Esta leguminosa, en combinación con el maíz, brinda beneficios para el organismo donde al consumir ambos, se obtiene una proteína de alta calidad, comparable a la que aporta la carne, el huevo o la leche; con la ventaja adicional de que tienen menor proporción de grasa saturada y no contienen colesterol.<sup>(80)</sup>

Uno de los problemas que enfrenta esta leguminosa es que existe una pérdida de su producción que asciende a 30%, ya que éste, al igual que otros cultivos, es afectado por organismos fitopatógenos, como hongos, bacterias, virus y nemátodos; e insectos sobre todo porque durante el almacenamiento no se tienen lugares de acopio y precios adecuados. Por otra parte, los agricultores al no poder almacenar su producto por períodos largos, lo venden a un precio inferior porque existe gran oferta de ese grano en el mercado. <sup>(80)</sup>

### **1.1 Descripción botánica y morfología de *P. vulgaris*.**

El frijol *P.vulgaris*, forma parte de la familia de las leguminosas y presenta granos formados por dos cotiledones. Esta familia está constituida por unos 600 géneros de donde se derivan más 1,300 especies, pero sólo más de 20 de ellos son de interés comercial y de importancia económica, y se consumen como alimento ya sea en forma de vaina madura o como grano seco. <sup>(26)</sup>

#### **Estructura básica**

La fruta es una vaina que consiste en varias semillas dentro de una cubierta exterior. <sup>(26)</sup>

#### **Pericarpio**

Durante el crecimiento de la planta, las capas del pericarpio, exocarpio, mesocarpio y endocarpio de la vaina son gruesas (figura 1), secándose en la maduración y pueden abrirse una vez que están secas. <sup>(26)</sup>

## Semilla

Esta formada por:

- Tegumento
- Embrión
- Dos cotiledones
- Células para el desarrollo de una nueva planta
- No hay endospermo como en los cereales. <sup>(26)</sup>

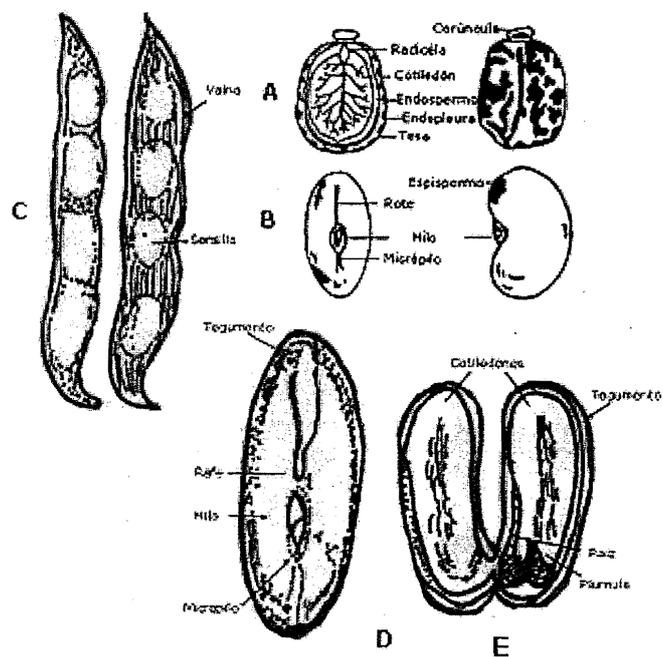


Figura 1. Morfología de la semilla de frijol. (A) Semilla con endospermo (higuerilla), <sup>(63)</sup> (B) Semilla sin endospermo (frijol), <sup>(94)</sup> (C) vaina, (D) vista frontal, (E) corte longitudinal. <sup>(26)</sup>

El frijol crece semirrecto y sin guía. Sus flores son blancas, teniendo un período de floración de 49 días. Alcanza su madurez fisiológica a los 100 días. En promedio la altura de las plantas es de 43 cm. El color del grano es amarillo claro. <sup>(25)</sup>

### **1.1.1. Partes de la semilla**

#### **Morfología de la semilla**

Los elementos básicos de la estructura de una semilla son: tegumentos, embrión y tejido de reserva, los cuales constituyen el esporofito joven parcialmente desarrollado. En las semillas de algunas plantas el tejido nuclear persiste y puede originar el perispermo (figura 1). <sup>(63)</sup>

#### **Epispermo**

El epispermo es una cubierta seminal, está constituido por: la testa o cubierta seminal externa. En la testa se puede reconocer: el hilo o cicatriz. Las excrecencias de la testa son: el arilo que se origina en el hilo y la curúncula (figura 1B). <sup>(63)</sup>

#### **Endopleura**

La endopleura es la cubierta seminal interna, es delgada y generalmente blanquecina (figura 1A). <sup>(63)</sup>

### **Eje embrionario**

El embrión o eje embrionario tiene función reproductiva. Es la parte vital de la semilla. Está constituido por radícula, plúmula, uno o dos cotiledones, hipocótilo y epicótilo (figura 1E). <sup>(63)</sup>

### **Tejido de reserva**

Se obtienen las sustancias orgánicas fuente de energía para la elaboración de nuevas paredes celulares, citoplasma y núcleos. Pueden localizarse en los cotiledones, en el endospermo o en el perispermo. Los cotiledones se originan del cigoto y hacen parte del embrión (figura 1). <sup>(63)</sup>

### **1.1.2. Morfología de la planta de frijol.**

La planta es en forma de arbusto y de crecimiento determinado. Su altura varía entre 30 y 90 cm. Existen otros tipos, como frijol trepador, de crecimiento indeterminado que alcanza alturas de dos o más metros, su raíz principal puede alcanzar una profundidad de 1 a 2 m y las raíces laterales desarrollan una radícula cónica. <sup>(74)</sup>

En los nódulos en las raíces se encuentran las bacterias simbióticas que fijan el nitrógeno del aire, los cotiledones son las primeras dos especies de hojas de forma acorazonada, sencilla y opuestas. Estas hojas son el resultado de la germinación epigea, o sea, cuando los cotiledones salen a la superficie, las hojas verdaderas son pinnadas,

trifoliadas y pubescentes su tamaño varía de acuerdo con la variedad de frijol. La inflorescencia aparece en forma de racimo, nace en la axila de las hojas y la flor está formada de cinco sépalos, cinco pétalos, diez estambres y un pistilo. Esta flor es típica de las leguminosas. En las leguminosas, sus pétalos difieren morfológicamente, pero en conjunto forman la corola. <sup>(74)</sup>

El estandarte es el pétalo más grande, está situado en la parte superior de la corola. Las alas son los dos pétalos laterales y la quilla son los dos pétalos inferiores, unidos por los bordes laterales (figura 2) <sup>(74)</sup>

La legumbre es el fruto de las leguminosas, la semilla está encerrada en vaina, el color de la vaina puede ser verde, amarillo, blanco o plateado y las semillas se propagan por dehiscencia, o sea, que la vaina al madurar se abre dejando escapar sus semillas. <sup>(74)</sup>

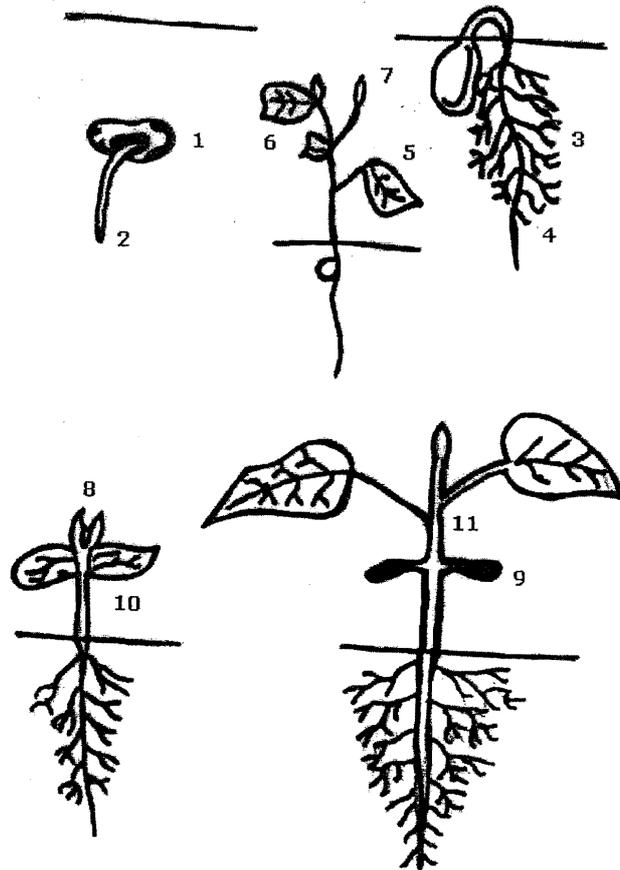


Figura 2. Morfología de la planta de frijol. 1. Frijol común; 2. Raíz principal; 3. Raíces laterales; 4. Nódulos en las raíces; 5. Cotiledones; 6. Hojas verdaderas; 7. Inflorescencia; 8. Flor; 9. Leguminosas; 10. Estandarte; 11. Alas.  
Fuente:qro.itesm.mx<sup>(98)</sup>

### 1.2 Composición química de la semilla de frijol.

La principal característica es el contenido de proteína, siendo el frijol de soya donde se presenta mayor proporción. En el cuadro 1 se describe la composición química de algunas variedades de frijol. <sup>(26)</sup>

Como se observa, todas estas variaciones contienen una elevada proporción de proteína; sin embargo, son deficientes en algunos aminoácidos esenciales, sobre todo en aquellos que contienen azufre, pero son mejores que los cereales en lisina y triptófano por lo que la ingesta se ve favorecida mejorando la calidad nutritiva cuando se combina el consumo de las leguminosas con los cereales. <sup>(26)</sup>

El valor biológico de las proteínas es bastante bajo más que por su valor nutritivo, por su baja digestibilidad. Esto ocurre por la existencia de factores tóxicos en las leguminosas tales como inhibidores de tripsina, quiotripsina, amilasa pancreática etc. Por fortuna la mayoría de esos factores son termolábiles, lo que reduce su actividad y favorece su consumo después de su cocción. <sup>(26)</sup>

**Cuadro. 1: Composición química del frijol.**

| Tipo de Frijol | Nutrimentos (%) |      |      | Minerales (mg/100g) |     | Vitaminas (µg/100g) |         |             |
|----------------|-----------------|------|------|---------------------|-----|---------------------|---------|-------------|
|                | P               | G    | C    | Ca                  | Fe  | Niacina             | Tiamina | Riboflavina |
| <b>Negro</b>   | 23.5            | 1.4  | 41.7 | 100                 | 6.4 | 2.1                 | 0.54    | 0.18        |
| <b>Soya</b>    | 33.7            | 18.1 | 6.1  | 155                 | 8.6 | 2.1                 | 1.03    | 0.3         |

P =proteína; G =grasa; C =carbohidatos; Ca =calcio; Fe =hierro

Fuente: Krautsf. 1991. <sup>(49)</sup>

### **Carbohidratos**

El frijol contiene almidón en mayor proporción (65 a 70 % en promedio). También contiene celulosa y hemicelulosa en un 15 a 20 % localizadas en la capa periférica. La mayor proporción de los azúcares está formada por rafinosa y estaquinososa y se conocen como factores de flatulencia, debido a que el organismo humano no los asimila y son metabolizados por la flora intestinal produciendo grandes cantidades de gases, como CO<sub>2</sub>, hidrógeno y metano en diferentes partes del tracto intestinal, además de otras sustancias volátiles malolientes como amoníaco y aminas. <sup>(26)</sup>

### **Lípidos**

El contenido de lípidos es muy bajo en las leguminosas y sólo en el caso del frijol soya y el cacahuate los niveles son elevados, siendo el primero usado a gran escala para la obtención de aceite a nivel industrial, más que para consumo como grano. Los glóbulos de grasa se encuentran insertos entre la red que forman las proteínas y los carbohidratos en cada cotiledón, encontrándose principalmente triglicéridos. Entre los ácidos grasos libres se ha identificado: ácido láurico, palmítico, esteárico, siendo el palmítico el que más se encuentra. <sup>(26)</sup>

### **Vitaminas y minerales**

En general las leguminosas son buenas fuentes de vitaminas del grupo B disponibles en ellas.

En cuanto a los minerales, las semillas de frijol son ricas en calcio, hierro y fósforo; su asimilación depende de la acción del ácido fitico, que por su acción inhibitoria reduce un alto porcentaje de su asimilación. <sup>(26)</sup>

### **1.3 Producción.**

En México en la presente década se ha obtenido un promedio de 1.2 millones de toneladas de frijol, cuyo valor representa el 4.9 % del Producto Interno Bruto del Sector Agrícola; en esta producción participan más de 450,000 productores, con una superficie promedio de 5 hectáreas por productor. Sin embargo, en los últimos años la producción no ha sido suficiente para satisfacer la demanda interna, (por lo que somos un país importador) que se estima en 1.4 millones de toneladas. <sup>(1)</sup>

En la última década se ha sembrado en México un promedio de 2.3 millones de ha anuales con grandes fluctuaciones en la superficie cosechada, debido principalmente a problemas de sequía. <sup>(86)</sup>

En México, el frijol es un cultivo tradicional y se le encuentra en todas las regiones agrícolas del país. La demanda es casi universal e incluye diversas clases de frijol. La mayor parte de la producción en marzo del 2003, se obtuvo en los estados de Nayarit, Campeche, Yucatán, Tabasco, Sinaloa, Oaxaca, Sonora, Veracruz y Chiapas, siendo de mayor relevancia en los primeros cinco. <sup>(86, 12)</sup>

**Superficie cultivada y cosechada.**

Tradicionalmente la superficie sembrada del frijol ha tenido una importante participación en las áreas dedicadas a la agricultura. El frijol se ha ubicado como el segundo cultivo que mayor superficie sembrada ocupa en México, sólo detrás del maíz y a pesar de que el frijol ha mostrado una ligera disminución en el número de hectáreas dedicadas para su siembra, la producción de este básico no se ha visto afectada; fenómeno derivado principalmente por el incremento en los rendimientos de frijol presentados en los últimos dos años. <sup>(86)</sup>

La superficie cultivada promedio del período 1980-1993 fue de 2'169,690 hectáreas, con un mínimo de 1'736,628 hectáreas en 1989 y un máximo de 2'478,869 hectáreas en 1982; por el lado de la superficie cosechada los datos son los siguientes: promedio en el periodo 1'760,587 hectáreas, un mínimo de 1'295,588 hectáreas en 1992 y un máximo de 2'094,017 hectáreas en 1990. <sup>(86)</sup>

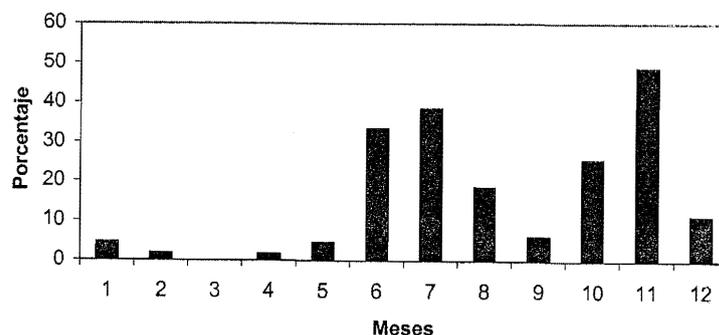


Figura 3. Época de siembra de frijol en porcentaje, modalidad: riego + temporal, ciclo: 2003. Fuente: SAGARPA, 2004. <sup>(87)</sup>

#### **1.4 Pérdidas en el campo y en el almacén.**

Las plagas que infestan al cultivo del frijol en el campo, como la conchuela *Epilachna varivestis* Mulsant, el picudo *Apion godmani* Wagner, la mosquilla blanca *Trialeurodes vaporariorum* y las chicharritas *Empoasca spp*, ocasionan pérdidas hasta del 30 por ciento en el valor de las cosechas. <sup>(89)</sup>

Las pérdidas poscosecha de granos de frijol se han estimado conservadoramente que son alrededor del 10 % sean granos producidos en México o granos importados, lo cual significa pérdidas económicas multimillonarias. La magnitud de las pérdidas varía de un país a otro y de un año a otro, pero en los países subdesarrollados de Asia, Africa y América Latina, se calcula que se pierde alrededor del 30 % de la cosecha anual.<sup>(1)</sup>

Por otra parte, al almacenar el grano las pérdidas pueden ser del orden del 10 al 20 por ciento de la producción, ya que en las instalaciones para almacenamiento se presentan varios géneros y especies de insectos como gorgojos, palomillas y picudos, que destruyen y contaminan los granos, <sup>(89)</sup> así como también hongos y roedores.

En México se pierde aproximadamente del 10 al 20 %, aunque otros autores estiman que es del 5 por ciento del frijol cosechado por concepto de ataque de plagas en el almacén. Si se toma en cuenta las cantidades de grano que se almacenan, las cuales sobrepasan al millón de toneladas anuales, se pueden perder entre 100 y 200 mil toneladas. <sup>(89, 14)</sup>

Existe un problema en cuanto a gorgojos que afectan al frijol *Phaseolus vulgaris* L. en semilla y grano durante el almacenaje. Al comienzo, el gorgojo picudo del frijol, *Acanthoscelides obtectus* infesta al frijol en el campo para continuar en el almacén, mientras que *Zabrotes subfasciatus* infesta a los frijoles solamente en el almacén. Los daños ocasionados por los brúquidos, reduce el peso, la calidad y la viabilidad de la semilla de frijol. <sup>(67)</sup>

El grado de pérdida debido al daño es variable y depende del período y condiciones de almacenaje. Los frijoles que han sido dañados por los brúquidos son indeseables en el mercado y causan pérdidas económicas al productor, ya que la semilla se cubre generalmente de huevecillos y perforaciones. <sup>(67)</sup>

#### **1.4.1 Factores que influyen en la calidad de los granos.**

Bajo las mismas condiciones de almacenamiento, los granos y las semillas pueden tener calidades diferentes, que dependen de variables ocurridas en etapas anteriores. <sup>(29)</sup>

De este modo, no se puede esperar que un lote de granos de calidad mediana se comporte igual que un lote de granos de alta calidad. La calidad inicial de los granos y de las semillas depende de los siguientes factores:

Condiciones climáticas durante el período de maduración del grano

Grado de maduración en el momento de la cosecha

Daños mecánicos

Impurezas

Humedad

Temperatura

Mecanismos<sup>(29)</sup>

**Condiciones climáticas durante el período de maduración del grano.**

Las condiciones del clima pueden ejercer gran influencia en dos etapas de la maduración de los granos.

La primera corresponde a la etapa en que el grano está acumulando rápidamente materia seca en el campo, antes de ser cosechada; en esta etapa es indispensable la presencia de humedad en el suelo en cantidades adecuadas. Un período de sequía traería como consecuencia una semilla más liviana, es decir, con menor contenido de materia seca y, por lo tanto, serían menos vigorosas y tendrían menor potencial para el almacenamiento.<sup>(29)</sup>

La segunda etapa, en que el grano se muestra particularmente sensible, se presenta cuando alcanza su máximo contenido de materia seca; en este caso el grano se deshidrata rápidamente para entrar en equilibrio con la humedad relativa del aire. Si durante esta etapa llueve mucho, la deshidratación será lenta y el contenido de humedad permanecerá elevado por un período mayor, lo que propicia que los granos se deterioren con rapidez. <sup>(29)</sup>

#### **Grado de maduración en el momento de la cosecha.**

Los granos recolectados antes o después del punto de madurez fisiológica son granos con menor potencial de almacenamiento, ya sea porque no han alcanzado su máximo vigor o porque ya se inició el proceso de deterioro. <sup>(29)</sup>

#### **Daños mecánicos.**

Desde la cosecha hasta el momento del almacenamiento, los granos pueden sufrir impactos que les ocasionan grietas o fragmentaciones. Los granos quebrados se pueden eliminar durante el beneficio, pero no se eliminan los que presentan grietas y que permanecen con la masa de granos que va a ser almacenada. Estos granos se deterioran con gran facilidad y se convierten en focos que afectan a los granos sanos. <sup>(29)</sup>

Un grano se puede dañar mecánicamente bajo las siguientes circunstancias. <sup>(29)</sup>

- En la cosechadora. Se trata de una de las más importantes fuentes de daño y ocurre en el momento del desgranado, es decir, cuando se separan los granos de la estructura que los contiene (vaina, mazorca, etc.). <sup>(29)</sup>
- Durante la selección. El daño ocurre durante las sucesivas caídas de los granos desde diversas alturas. Los granos y las semillas pasan por una serie de equipos desde que llegan del campo hasta que se almacenan, presentándose rozamientos y caídas. <sup>(29)</sup>
- Durante el almacenamiento. El daño ocurre tanto en el almacenamiento a granel como en sacos. Los granos que quedan debajo de una pila de sacos o de un montón a granel tienden a quebrarse por el peso de los que están arriba. <sup>(29)</sup>
- Durante el transporte. Este daño se produce como consecuencia de la falta de una buena supervisión durante la carga y descarga, sobre todo de camiones o vagones. Los obreros que realizan esta labor debieran estar conscientes de la importancia que tiene el no dañar los granos y tratar los granos envasados o a granel con el debido cuidado. <sup>(29)</sup>

### **Impurezas.**

Los granos que contienen impurezas (fragmentos del mismo producto) y materias extrañas (residuos vegetales y cuerpos extraños, como tierra, etc.) son portadores de una mayor cantidad de microorganismos y presentan condiciones que facilitan su deterioro. Las materias extrañas impurezas, bajo las mismas condiciones de humedad relativa y temperatura del aire, presentan contenidos de humedad más altos que el producto. <sup>(29)</sup>

La acumulación de impurezas y materias extrañas en determinadas zonas de un silo vertical o de un granero forma una masa compacta y húmeda que dificulta las operaciones de secado, aireación y fumigación. En general, los granos almacenados presentan un espacio vacío del 40 al 50 % del volumen que ocupan. Si la masa de los granos contiene un alto porcentaje de polvo, fragmentos del producto y cuerpos extraños, éstos ocuparán los espacios vacíos, lo que dificultará las diversas operaciones. El espacio intergranular deberá estar exento de impurezas y materias extrañas, con la finalidad de que presente condiciones óptimas para el paso del aire caliente (secado), del aire frío (aireación) y de los fumigantes. El contenido de impurezas y materia extrañas también es de gran importancia desde el punto de vista comercial. Cuando el producto está sucio es clasificado como de menor calidad y sufre una considerable reducción de precio. <sup>(29)</sup>

### **Humedad.**

Si bien hay otros factores que pueden ejercer influencia sobre la conservación de los granos, el contenido de humedad es el principal factor que influye en la calidad del producto almacenado. Para obtener un almacenamiento eficiente, los granos deben tener un bajo contenido de humedad, ya que los granos húmedos constituyen un medio ideal para el desarrollo de microorganismos, insectos y ácaros. (29)

### **Contenido de humedad de los granos.**

Los granos están constituidos por una sustancia sólida, denominada materia seca, y por cierta cantidad de agua.

La materia seca está formada por las proteínas, los carbohidratos, las grasas, las vitaminas y las cenizas. El agua existente en la estructura orgánica de los granos se presenta bajo distintas formas, pero para fines prácticos se consideran dos tipos de agua: el agua libre que se retira fácilmente por medio de calor, y el agua que retiene la materia sólida y que sólo se libera por la acción de altas temperaturas, lo que puede originar la volatilización y descomposición de las sustancias orgánicas y, por lo tanto, la destrucción del producto. (29)

La figura 4 esquematiza e identifica los focos de la problemática en el manejo de la producción, almacenamiento y conservación de granos y semillas de granos de frijol.

### **1.4.2 Control de insectos en el campo y en grano almacenado.**

Se ha mencionado que uno de los factores que disminuyen el rendimiento del frijol son los insectos plaga, los cuales durante el ciclo vegetativo y almacenamiento pueden ocasionar pérdidas de 20 a 80 %. La gran mayoría de los campesinos dedicados al cultivo, no utilizan los productos químicos por falta de recursos económicos y por los bajos rendimientos que obtienen en la agricultura de subsistencia, por lo que se torna obligada la búsqueda de métodos de control de insectos acorde con la realidad de nuestro país. <sup>(48)</sup>

El método que comúnmente se utiliza para proteger al maíz y frijol almacenados del ataque de insectos, es el químico, método que consiste en la aplicación de insecticidas y fumigantes y que trae consigo problemas de contaminación ambiental y toxicidad; ésta situación obliga a reflexionar sobre las ventajas de utilizar otros productos con propiedades insecticidas que no causen contaminación, que sean económicos, y de fácil obtención y aplicación. <sup>(4, 16)</sup>

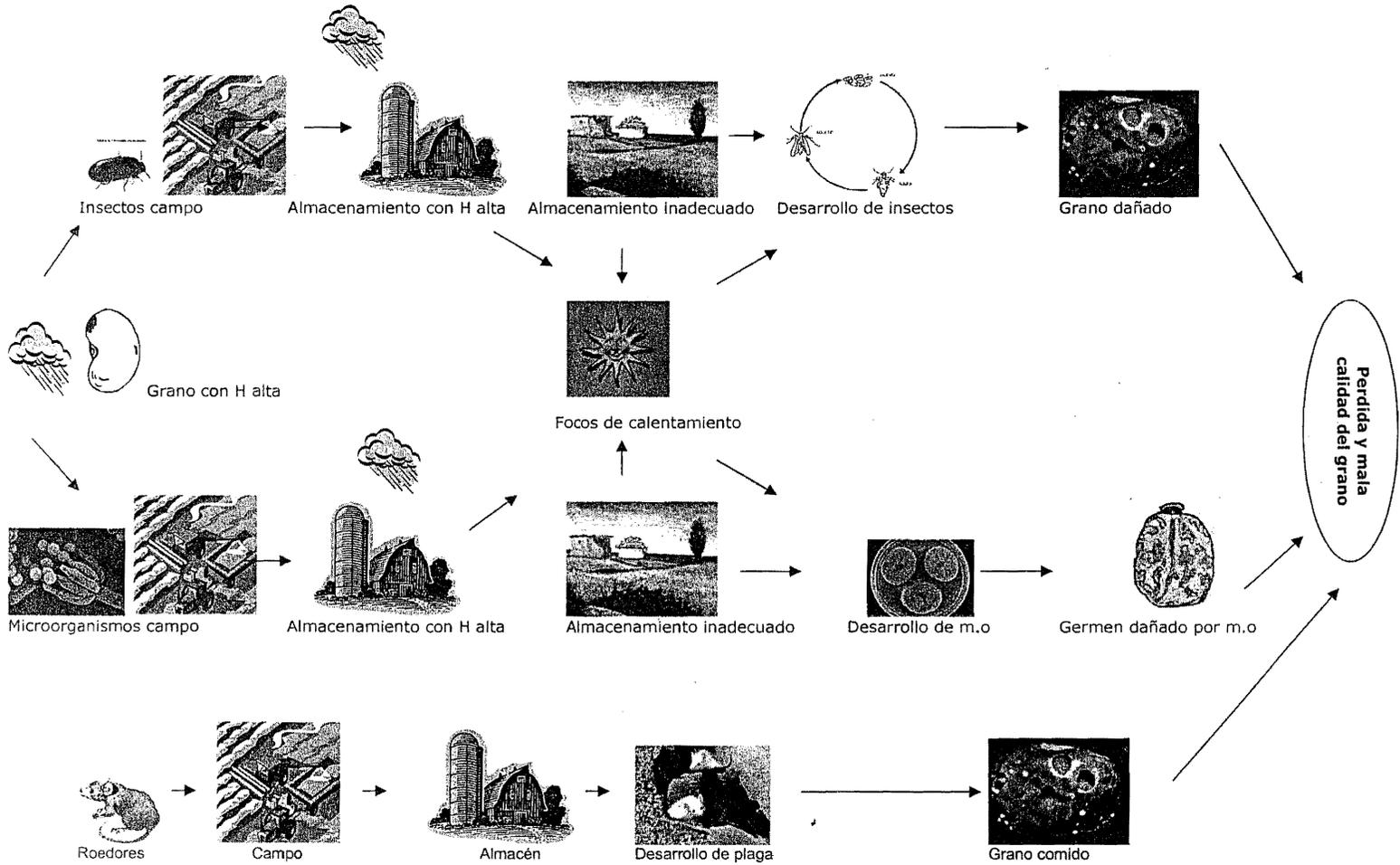


Figura 4. Identificación y análisis de la problemática que existe en el manejo de la producción, almacenamiento y conservación de granos y semillas. (H=humedad)

Como alternativa a éste problema se han utilizado polvos minerales y vegetales, así como extractos acuosos de plantas silvestres asociadas al cultivo de maíz y frijol. El recubrimiento de la superficie libre del grano con polvo, ceniza vegetal u otro material fino, o la mezcla de estos polvos con el grano para prevenir las invasiones de los insectos se empleo durante mucho tiempo sin que se haya abandonado por completo. Cuando se mezcla con el grano un polvo químicamente inerte y pulverizado, se origina un rápido descenso del grado de humedad del grano, así como la del propio cuerpo de los insectos que infestan la masa del grano, por lo que se produce la muerte por desecación. <sup>(51)</sup>

Se ha mencionado que la presencia de propiedades insecticidas en plantas se ha reconocido desde hace muchos años. Entre los productos que se han utilizado se encuentra el tabaco (*Nicotiana tabacum*; *solanaceae*), la raíz de *Microsechum helleri* (*Cucurbitaceae*) contra plagas del suelo, la semilla de *Trichilia havanensis* (*Meliaceae*) en forma de pasta para impregnar la semilla del maíz antes de la siembra, éste tratamiento es considerado efectivo en el estado de Puebla para repeler el ataque de parásitos durante la germinación. <sup>(29)</sup>

La aplicación de ceniza de olote aplicada al grano disminuye el daño causado por *P. truncatus*; y que la cal y el polvo del chichonal también disminuye el porcentaje de infestación del gorgojo. <sup>(29)</sup>

## **CAPÍTULO II**

### **GENERALIDADES DEL GORGOJO DE FRIJOL** ***Zabrotes subfasciatus* Boheman**

## **II. Generalidades de insectos.**

Los insectos son animales pequeños que tienen el cuerpo dividido en cabeza, tórax y abdomen como se muestra en la figura 5. Por lo general tienen un par de antenas en la cabeza, tres pares de patas en el tórax y generalmente un exoesqueleto externo que consiste en una membrana gruesa (cutícula); así como uno o dos pares de alas en su etapa adulta.<sup>(55)</sup>

### **2.1 Morfología**

La cabeza esencialmente es una cápsula no segmentada, con una abertura en el frente, que es parte de la boca y otra en la parte posterior que se comunica con el tórax. En la cabeza se encuentran las antenas (apéndices sensoriales), donde residen las funciones sensoriales del tacto y olfato,<sup>(5)</sup> el cerebro, los ojos y las piezas bucales.<sup>(21)</sup>

Las patas y las alas están adheridas al tórax. El abdomen se compone de varios segmentos. Cada uno de ellos lleva un par de espiráculos o aberturas que permiten la respiración. En la parte posterior del abdomen se encuentran los órganos genitales y el sistema excretor.<sup>(5)</sup>

El exoesqueleto presenta algunas ventajas: protección a algunos daños externos físicos y químicos; mejor conservación del agua del cuerpo, por reducción de la evaporación; y ventajas mecánicas para la inserción de los músculos, lo que le da una agilidad y fuerza fuera de proporción con el porte de su cuerpo.<sup>(5)</sup>

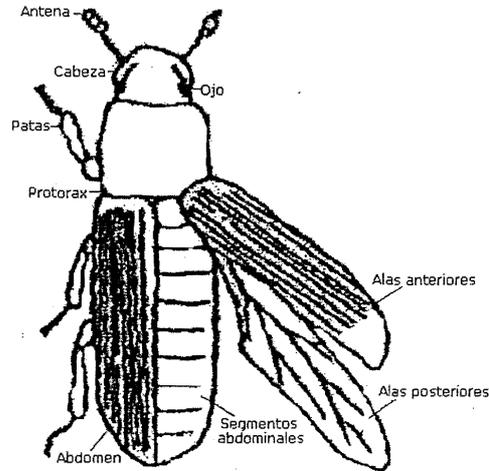


Figura 5. Anatomía de un insecto <sup>(75)</sup>

## 2.2 Clasificación de los insectos

Los insectos se clasifican en grupos con características generales llamados órdenes; a su vez, los órdenes se dividen en familias y éstas en géneros que agrupan a varias especies. <sup>(21)</sup>

A cada especie se le da un nombre científico generalmente en latín, compuesto de dos palabras, la primera corresponde al género y la segunda, a la especie misma. A veces se agrega una tercera palabra que corresponde al nombre de la persona que lo describió. <sup>(21)</sup>

En base al daño que ocasionan, los insectos se han agrupado en especies primarias, que aunque relativamente pocas, son capaces de dañar granos enteros y tienen gran importancia económica. Las especies secundarias, son aquellas que atacan granos partidos o que previamente han sido dañados por las primarias y se multiplican con facilidad en los productos obtenidos de la molienda de granos. Por último, las especies terciarias se multiplican en granos y productos en avanzado estado de deterioro causado por otros insectos o por microorganismos. <sup>(21)</sup>

### **2.3 Generalidades del gorgojo pinto del frijol *Zabrotes subfasciatus*.**

El insecto *Zabrotes subfasciatus* Boheman también llamado gorgojo pinto del frijol, es una especie que pertenece al orden Coleóptera y a la familia Bruchidae. Ataca al frijol almacenado en México y representa un grave problema en virtud de su amplia distribución y de su gran abundancia. <sup>(56)</sup>

#### **2.3.1 Taxonomía.**

Phylum: Arthropoda Clase: Insecta

Orden: Coleóptera

Género: *Zabrotes*

Familia: Bruchidae

**CAPÍTULO II. GENERALIDADES DEL GORGOJO DE FRIJOL**  
***Zabrotes subfasciatus* Boheman**

---

---

Especie: *Zabrotes subfasciatus* (Boheman).

Nombre común: gorgojo pinto o mexicano del frijol

Sinonimia: *Spermophagus pectoralis* (Sharp).<sup>(84)</sup>

### **2.3.2 Hábitat.**

El gorgojo pinto del frijol es una especie originada aparentemente en América Central y Sudamérica y ahora ampliamente distribuida a lo largo del mundo. Las especies de frijol *Phaseolus vulgaris*, *P. lunatus*, *Vigna subterranea*, *V. Radíata*, y *V. Unguiculata* son sus hospedantes.<sup>(29)</sup>

### **2.3.3. Distribución.**

*Z. subfasciatus* se distribuye principalmente en las zonas tropicales y sub tropicales, de México<sup>(7, 11)</sup> y se considera como plaga primaria por el tipo de daño que ocasiona a la semilla y grano en el almacén.<sup>(83)</sup>

### **2.3.4 Morfología.**

La especie presenta dimorfismo sexual, siendo las hembras más grandes que los machos,<sup>(75)</sup> diferenciándose de éstos por tener cuatro puntos color crema característicos en la parte dorsal.<sup>(40)</sup> El macho es de color negro con manchas blancas amarillentas y la hembra es de color café pardo, parecido al gorgojo pardo aunque más chico y de cuerpo mas ancho. Tiene antenas largas y delgadas. El fémur posterior liso y la tibia con dos dientes largos rojizos. Su longitud va de 2 a 3 mm. (figura 6).

Es capaz de volar. Su metamorfosis es completa (holometábola), dado que comprende los estadios de huevo, larva, pupa y adulto. <sup>(21)</sup>

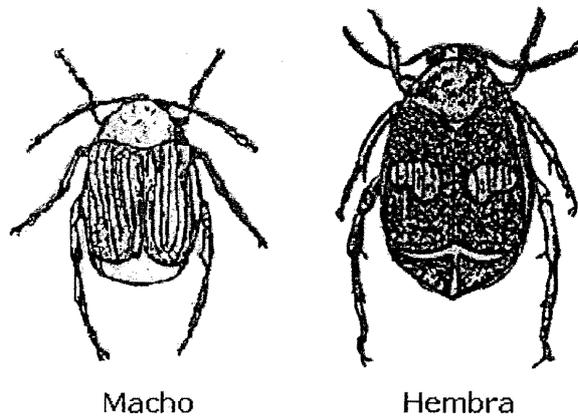


Figura 6. *Zabrotes subfasciatus* Boheman. Fuente: Saucedo, 1993. <sup>(84)</sup>

### **2.3.5 Tegumento (Exoesqueleto).**

El tegumento es el tejido que cubre propiamente al insecto y consta de las siguientes capas: la cutícula, la epidermis y la membrana basal. La cutícula es una capa compleja, no celular, ampliamente secretada por la epidermis de casi todos los insectos. <sup>(37)</sup>

En la cutícula pueden distinguirse dos capas, una epicutícula exterior y una procutícula interior. La epicutícula es una capa muy fina desprovista de quitina y de composición química compleja. La procutícula, es secretada por las células epidérmicas y constituye la mayor parte del tegumento. <sup>(37)</sup>

La procutícula comprende una exocutícula que cuando se endurece se desprende totalmente cuando el insecto muda. Los dos componentes principales de la cutícula de los insectos son la quitina, un hidrato de carbono que representa el 25-60% del peso seco en las cutículas de diversas especies. En su hidrólisis, la quitina libera ácido acético y glucosamina; es un polímero de alto peso molecular que consta principalmente de restos de anhidro-N-acetilglucosamina unidos por enlaces beta-1-4, aunque hasta el 10% de los restos pueden ser desacetilados. <sup>(37)</sup>

### **2.3.6 Desarrollo.**

La metamorfosis es un proceso de cambios morfológicos y fisiológicos que ocurren desde que nace el insecto hasta que llega a adulto.

En ocasiones es poco conocida, a pesar de que en muchas especies de insectos que atacan granos almacenados, el daño es causado por los estados inmaduros del desarrollo. <sup>(21)</sup>

*Z. subfasciatus* es de metamorfosis completa, dado que el insecto pasa por cuatro fases, que son la de huevo, larva, pupa o crisálida y adulto o imago. <sup>(21)</sup>

### **2.3.7 Biología, ecología y comportamiento.**

Su ciclo biológico se completa en 8 semanas, figura 7. La hembra adulto oviposita entre 50 y 60 huevecillos en el lapso de 2 a 30 horas después de la cópula. El hábito de oviposición es en grupos de 2 a 4 huevecillos sobre la testa ó entre las rajaduras de los granos de frijol. <sup>(75)</sup> Los huevos son pequeños, difíciles de detectar a simple vista y tienen diferencias en cuanto a tamaño y forma. Generalmente son de color blanco. <sup>(21)</sup> *Z. subfasciatus* es raro dentro de la familia de los brúquidos puesto que adhiere de 30-40 % de sus huevos en grupos de dos o más huevos sobre la testa de la semilla, un hábito que puede ser una adaptación a la vida en los frijoles de bajo contenido de humedad. La mortalidad es más baja entre las larvas incubadas de huevos agrupados que entre aquellos incubadas de huevos diseminados, aun cuando el número total de huevos en un frijol sea el mismo.

Este efecto es más pronunciado en los frijoles secos. Se ha sugerido que el agua producida por las larvas agregadas puede suavizar el frijol, con lo cual se reduce la mortalidad. <sup>(11)</sup> El adulto vive de 2 a 4 semanas. <sup>(75)</sup>



Figura 7. Ciclo biológico de *Zabrotes subfasciatus* Boheman. Fuente: CIAT, 1986. <sup>(15)</sup>

Las condiciones apropiadas para su desarrollo son 32 °C y 70% de humedad relativa. <sup>(7)</sup>

El en caso del *Z. subfasciatus* las larvas cavan una galería para penetrar dentro del grano. La larva muda de piel (écdisis) 4 veces aumentando de tamaño en cada cambio (instar) y forma cavidades donde pasará al estado de pupa; la pupa es un estado de reposo, que prácticamente no se mueve; permanece inmóvil en lugares protegidos. <sup>(21)</sup>

El macho adulto puede permanecer en la cámara varios días antes de salir al exterior. La hembra adulta sale inmediatamente e inicia la oviposición, <sup>(75)</sup> tiene desarrollados todos sus órganos reproductivos, aunque le puede llevar un tiempo para tener madurez sexual. <sup>(21)</sup>

**CAPÍTULO II. GENERALIDADES DEL GORGOJO DE FRIJOL**  
***Zabrotes subfasciatus* Boheman**

---

---

La hembra produce los huevos en los ovarios y el huevo maduro es fecundado con los espermatozoides del macho que se encuentran almacenados en una bolsa o espermateca. Del huevo fecundado emerge una larva que después de pasar por diferentes cambios morfológicos se transforma en adulto. <sup>(21)</sup>

El insecto adulto normalmente no se alimenta de granos, aunque puede consumir agua y néctar. <sup>(75)</sup>

Después de terminar su desarrollo pupal, los gorgojos adultos requieren aproximadamente de un día para emerger de la semilla. Para emerger, el adulto empuja la testa cortada por la larva antes de pupar y sale del grano. <sup>(7)</sup>

La temperatura juega un papel importante en la emergencia del adulto y dependiendo de su variación es como puede limitarse el proceso. Se ha reportado que en condiciones óptimas ( $32.5 \pm 2$  °C y  $70 \pm 2$  % de H.R), el primer gorgojo emergió a los 23 días. <sup>(7)</sup>

Los orificios de salida se formaron 26 días después de la eclosión de los huevecillos en condiciones óptimas de desarrollo. <sup>(7)</sup>

El gorgojo *Zabrotes subfasciatus* se desarrolla más ampliamente bajo las condiciones de 67-70 % de H.R y 25-30 °C, las cuales son óptimas para infectar el cultivo de frijol en el campo. <sup>(78)</sup>

**CAPÍTULO II. GENERALIDADES DEL GORGOJO DE FRIJOL**  
***Zabrotes subfasciatus* Boheman**

---

---

El número de adultos emergidos por semilla también es variable y depende principalmente del tamaño del grano, que está relacionado con el contenido de nutrientes esenciales para el insecto y el espacio necesario para su buen desarrollo. <sup>(7)</sup>

El tiempo que viven los adultos está relacionado con la temperatura, humedad relativa y variedad de frijol en que se desarrollan.

Se ha reportado que la longevidad máxima del adulto es de 51 días para las hembras y 55 días para los machos. <sup>(7)</sup>

En general el macho vive 3 días más que la hembra, siendo la duración variable dependiendo de la variedad de frijol en que se desarrollan. En condiciones óptimas las hembras viven en promedio 13 días. <sup>(7)</sup>

### **2.3.8 Hábitos de apareamiento.**

Respecto a los hábitos de apareamiento, estudios bionómicos mostraron que éste dura 4-5 minutos y que un macho puede aparearse con 21 hembras; las hembras se aparean 2 veces. <sup>(7)</sup>

El período de preoviposición dura de 1-7 días y que el 10 % de las hembras no producen huevecillos aún apareándose. <sup>(7)</sup>

### **2.3.9 Factores que influyen en la oviposición.**

Algunos factores que influyen en la oviposición son la temperatura y la inseminación por el macho, además de la preferencia por variedades de semillas grandes mostrada por *Zabrotes*.<sup>(7)</sup>

Las hembras apareadas, después del período de preoviposición, depositan los huevecillos, la oviposición es variable y depende de cada hembra, del número de granos, de las condiciones ambientales a las que se someten los adultos, así como de la variedad de frijol atacado.

Se ha reportado que la oviposición puede ser de 40 hasta 69 huevecillos por hembra.<sup>(7)</sup>

Ahora bien, la oviposición no es un fenómeno continuo y presenta períodos de descanso. El período de oviposición dura de 3-4 días y las hembras ovipositan 17 huevecillos en un lapso de 24 horas. La hembra oviposita el mayor número de huevecillos el tercer día, esto representa del 6 al 14 %.<sup>(7)</sup>

**CAPÍTULO III.**

**GENERALIDADES DE HONGOS DE CAMPO  
Y ALMACÉN QUE INVADEN AL FRIJOL.**

### **III. Generalidades de hongos.**

#### **3.1 Hongos en granos y semillas**

Los hongos tienen una influencia directa sobre el bienestar del hombre; algunos son altamente benéficos y el hombre los utiliza directamente, como en la producción de antibióticos, bebidas, ácidos orgánicos, proteínas unicelulares, alimentos, etc. Otros juegan un papel importante en la naturaleza como degradadores de materia orgánica; pero por otra parte, los hongos son la principal causa de enfermedades de los cultivos agrícolas, afectando severamente la economía del hombre. <sup>(58)</sup>

La alimentación humana y animal en gran parte se basa en el consumo de granos y sus derivados, los que frecuentemente son invadidos por hongos, causando diferentes problemas, entre ellos la contaminación con metabolitos secundarios llamados micotoxinas las que al ser ingeridas pueden ser dañinas al hombre y a los animales domésticos. <sup>(58)</sup>

La actividad metabólica de los hongos, incrementa la humedad y temperatura del sustrato en que se desarrollan, creando las condiciones para su proliferación elevando aún más la temperatura, haciéndola intolerable para los insectos que emigran hacia otras fuentes de alimento. El grano queda destruido, ocasionando graves pérdidas y disminuyendo su disponibilidad. <sup>(21)</sup>

La presencia de hongos en semillas se ha estudiado con gran interés, ya que los hongos causan el mayor número de enfermedades en plantas y ocurren con más frecuencia en semillas más que las bacterias, virus o nemátodos. Los hongos que invaden granos y semillas se dividen ecológicamente en dos grupos importantes: hongos de campo y hongos de almacén. <sup>(13)</sup>

### **3.2 Hongos de Campo**

Los hongos de campo invaden los granos o semillas antes de la cosecha, mientras las plantas están creciendo en el campo o después de que el grano es segado y amontonado pero antes de que sea trillado. <sup>(14)</sup> Los hongos de campo dañan el grano desde el momento de la cosecha o a más tardar al momento en que el grano es secado a un contenido de humedad abajo del 20-22 %. Todos los hongos de campo requieren un alto contenido de humedad en equilibrio con una humedad relativa arriba del 90 %. Los hongos de campo pueden sobrevivir por años en grano seco, pero mueren rápidamente en granos con contenidos de humedad en equilibrio con humedades relativas del 75 % en los granos de cereales almidonosos. <sup>(14)</sup>

Estos hongos usualmente no causan daños en almacenamiento, aunque si lo pueden hacer ocasionalmente.

### ***CAPÍTULO III. GENERALIDADES DE HONGOS DE CAMPO Y ALMACÉN QUE INVADEN AL FRIJOL***

---

---

Si las semillas o granos son cosechados con alto contenido de humedad (más de 20-25 %) y almacenados con humedad relativa y temperaturas altas, estos hongos pueden continuar creciendo y causar daños posteriormente. <sup>(13)</sup>

Los hongos de campo que predominan varían de acuerdo con la cosecha, la región o localización geográfica y el clima. <sup>(14)</sup>

La mayoría de los hongos de campo que invaden a los granos son especies de *Alternaria*, *Fusarium* y *Rhizoctonia* entre otros. Aunque se encontró que el hongo de campo más comúnmente encontrado es el *Cladosporium spp.*, así como *Helminthosporium*. <sup>(13)</sup>

El hongo *Alternaria* es común en muchos granos y semillas, especialmente de cereales, pero no está restringido a ellos, ya que también abunda en el cacahuate. <sup>(14)</sup>

Algunos microorganismos patógenos y saprófitos se pueden encontrar solo en la superficie de la semilla, mezclados con residuos vegetales o suelo, tal es el caso de *Fusarium solani f. sp phaseoli*. <sup>(23)</sup>

*Fusarium solani f. phaseoli* es un hongo parásito primordialmente del hipocótilo, pero puede afectar todo el sistema radicular, causando una pudrición seca.

Su manera de penetración puede ser directa o indirecta, por heridas o por aberturas naturales de la raíz, pero lo más común es a través de los estomas del hipocótilo. <sup>(69)</sup>

Este hongo es capaz de penetrar únicamente en forma miceliar y para lograrlo no necesita formar apresorios <sup>(69)</sup>

*Fusarium* también es común en semillas de cereales recién cosechados. Algunas cepas de éste hongo causan la roña en cebada, trigo y maíz. Estos granos invadidos pueden ser tóxicos en animales y para el hombre, de tal manera que son indeseables como alimento. Se tiene la evidencia de que infecciones leves por *Fusarium* no pueden detectarse a simple vista (pero son detectables cultivando en agar los granos superficialmente desinfectados) pero pueden causar la muerte y ennegrecimiento de los embriones de los granos almacenados. Las infecciones por *Fusarium* ocurridas en el campo, aún las muy leves que no reducen la calidad del grano al momento de la cosecha, pueden ser responsables del daño al embrión durante el almacenamiento, causando una reducción en la calidad y en el valor comercial. *Fusarium* muere relativamente rápido en grano almacenado con contenidos de humedad del 12 al 13 % y con una temperatura arriba de 21 °C, y después de que ha muerto, no existe forma de determinar que estuvo presente. <sup>(14)</sup>

En un estudio realizado, se encontró que diferentes hongos pueden invadir diferentes tejidos de la semilla. <sup>(23)</sup> (figura 8) y hace la observación de que las especies del género *Fusarium* se concentran principalmente en el intergumento superficial, hilio y en los cotiledones del frijol.

*F. oxysporum* y *Fusarium sp* se encuentran en lesiones de los cotiledones y lesiones superficiales de la semilla, siempre en asociación con daños causados por *Rhizoctonia solani*, el cual prolifera con mayor éxito bajo condiciones de alta humedad relativa.

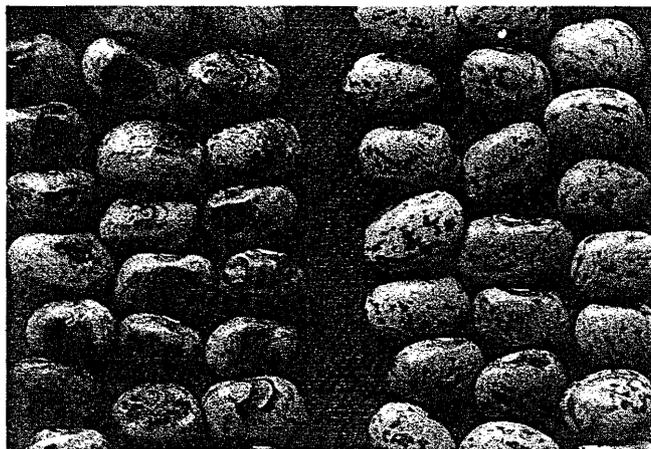


Figura 8. Semillas infectadas por hongos. Fuente: Campos 1997. <sup>(12)</sup>

### **3.2.1 Daños por hongos en la planta.**

Las enfermedades causadas por hongos producen en sus hospederos una amplia variedad de síntomas. Entre otros, los hongos fitopatógenos pueden producir manchas cloróticas y necróticas, cribados, tizones, podredumbres húmedas o secas, momias, agallas, abolladuras, costras, ahogamientos, marchitamientos y pústulas. <sup>(35)</sup>

#### **3.2.1.1 Penetración de los hongos fitopatógenos.**

Los hongos penetran en la planta a través de las aberturas naturales como estomas y lenticelas; a través de heridas causadas por granizadas o vientos fuertes o atravesando la epidermis, como lo hacen algunos hongos. <sup>(12)</sup>

Para que los hongos se desarrollen son necesarias determinadas condiciones de humedad, luz, temperatura oxígeno y precipitación pluvial, mismas que determinan la gravedad de los síntomas. <sup>(12)</sup>

Marchitamiento por *Rhizoctonia*.

*Rhizoctonia solani*.

El hongo *Rhizoctonia* ataca a un gran número de plantas, y cada cepa es específica, como en el caso del frijol.

**CAPÍTULO III. GENERALIDADES DE HONGOS DE CAMPO Y ALMACÉN QUE  
INVADEN AL FRIJOL**

---

Este hongo penetra directamente a través de la cutícula y epidermis en forma mecánica. Inicialmente el hongo produce un cojinete de infección a partir del cual emite clavijas de infección o mediante hifas individuales; además puede penetrar por las aberturas naturales o las heridas. Esta enfermedad es más frecuente en plántulas; se caracteriza por pudrición del cuello de la raíz, donde se observan lesiones hundidas que invaden al hipocótilo y las raíces (figura 9). Además de afectar al frijol, puede atacar al tomate, chile, berenjena y papa. <sup>(12)</sup>

Marchitamiento por *Fusarium*, *Fusarium solani* f. *phaseoli*, *Fusarium oxysporum*.

Este hongo se encuentra en el suelo y esporula en las lesiones que causa en las raíces, principalmente en las que quedan por encima del suelo, produciendo macroconidios y pudiendo sobrevivir formando clamidosporas.

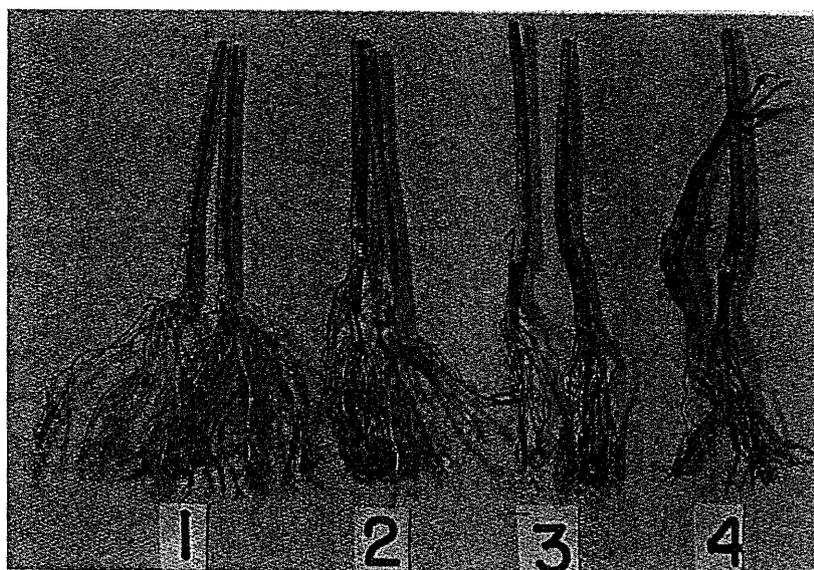


Figura 9. Grado de infección causada por *Rhizoctonia*. Fuente. Campos 1997. <sup>(12)</sup>

Al penetrar en la planta lo hace en forma directa o indirecta a través de heridas, pero comúnmente es a través de los estomas del hipocótilo. Los primeros síntomas se observan en el hipocótilo y en la raíz, en forma de manchas rojizas cuando la plántula tiene de 8 a 15 días; a medida que la enfermedad avanza las lesiones se unen y se tornan color café; se extienden hasta el cuello de la raíz sin forma definida. Las raicillas mueren y oponen muy poca resistencia al ser extraídas del suelo. Este hongo ataca a varias especies de frijol: *P. coccineus*, *P. angularis* y *P. lunatus*, entre otros. <sup>(12)</sup>

### **3.2.2 Daños por hongos en frijol.**

Cuando las lesiones de las vainas son profundas, el hongo puede infectar la semilla; entonces aparecen en ésta manchas de diferentes tamaños, ligeramente hundidas, de color café a negro (figura 8). El hongo puede permanecer por mucho tiempo en forma latente en la semilla, debajo de la cutícula, en los cotiledones o en el embrión. La semilla infectada sirve de fuente potencial de inóculo primario, aún cuando pierde viabilidad. <sup>(12)</sup>

### **3.3 Hongos de Almacén.**

Estos hongos son generalmente saprófitos o parásitos facultativos que se desarrollan después de la cosecha. <sup>(13, 58, 72)</sup> Pueden crecer en humedades relativas de 65 a 90 % bajo condiciones en que normalmente almacenan los granos y las materias primas que se utilizan en la elaboración de alimentos para el hombre y animales

### **CAPÍTULO III. GENERALIDADES DE HONGOS DE CAMPO Y ALMACÉN QUE INVADEN AL FRIJOL**

domésticos. <sup>(58)</sup> *Aspergillus* y *Penicillium* son los géneros de hongos de almacén más importantes. La suma de sus actividades metabólicas provocan trastornos a la calidad biológica de los granos y semillas, induciendo grandes pérdidas económicas. Siendo parásitos o saprófitos de los productos almacenados, son capaces de destruir, en relativamente poco tiempo, grandes cantidades de nutrimentos. <sup>(34)</sup> Los hongos de almacén comprenden varias especies del género *Aspergillus* y *Penicillium*. <sup>(14)</sup>

Se ha reportado a la especie *Aspergillus glaucus* como la más común en granos almacenados. <sup>(72, 14)</sup>

Otros autores <sup>(58)</sup> reportan los grupos, tales como: *Aspergillus restrictus*, *A. glaucus*, *A. flavus*, *A. candidus*, *A. versicolor* y *A. ochraceus*. Algunas especies del grupo *Aspergillus flavus* producen las aflatoxinas, metabolitos secundarios altamente tóxicos, cancerígenos y teratógenos, siendo la aflatoxina B1 la más potente. <sup>(58)</sup>

Los hongos tóxicos mas importantes (*Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium*) tienen una amplia distribución geográfica y pueden desarrollarse sobre diversos sustratos de granos y semillas almacenados. <sup>(72)</sup>

*Aspergillus flavus*. Las especies de este grupo requieren para crecer humedades relativas de 80-85%, en cereales con contenido de humedad de 16.5-18%. Su desarrollo contribuye al calentamiento de los granos, <sup>(58)</sup> además de la producción de aflatoxinas.

### **CAPÍTULO III. GENERALIDADES DE HONGOS DE CAMPO Y ALMACÉN QUE INVADEN AL FRIJOL**

*Aspergillus glaucus*. Las especies de este grupo entre ellas *A. chevalierii*; *A. amstelodami* y *A. ruber* requieren una humedad relativa de 75% y crecen en cereales con contenidos de humedad tan bajos como 13.5-14.0 %.<sup>(58)</sup>

Estos hongos imparten colores y olores desagradables a los granos y afectan la germinación de las semillas. Las colonias que forman sobre el grano son de color verde.<sup>(58)</sup>

#### **3.3.1 Fuente de inóculo de los hongos de almacén.**

A medida que los granos llegan desde el campo, cosecha y transporte a la bodega aumenta el riesgo del número de los granos invadidos por hongos de almacén, y a menos de que la temperatura o el contenido de humedad, o ambos, se bajen lo suficiente para detener el crecimiento de dichos hongos, éstos seguirán creciendo y eventualmente causarán daño al embrión, hedor, humedad, calentamiento y apelmazamiento del grano y producción de micotoxinas. Se ha encontrado que una pequeña cantidad de inóculo de hongos se presenta como esporas en estado latente en la parte exterior del grano o como micelio en estado latente bajo el pericarpio de algunos granos, y se tienen condiciones favorables para su desarrollo, estos hongos proliferarán rápidamente en pocos días.<sup>(14)</sup>

### **3.3.2 Factores que favorecen el desarrollo de los hongos de almacén.**

Las principales condiciones que influyen en el desarrollo de los hongos de almacén son: humedad del grano almacenado; la temperatura; el tiempo de almacenamiento; el grado de invasión por hongos de almacén que presente el grano antes de su arribo a un determinado sitio; material extraño y los insectos y ácaros. <sup>(14)</sup>

Estos factores de humedad relativa, contenido de humedad del grano, temperatura y tiempo de almacenaje, determinarán la presencia, en calidad y cantidad, de géneros y especies de hongos. <sup>(34)</sup>

**Humedad:** Existe un mínimo contenido de humedad en los granos para el desarrollo de cada una de las especies comunes de hongos de almacén, abajo del cual ellos no pueden crecer. <sup>(14)</sup>

**Temperatura:** El efecto de la temperatura sobre el crecimiento de los hongos y sobre el daño que ellos ocasionan es determinante. <sup>(14)</sup>

Los hongos más comunes en granos y semillas almacenados son mesófilos, crecen más rápidamente a temperaturas de 30 a 32 °C, y su crecimiento disminuye cuando la temperatura decrece.

### ***CAPÍTULO III. GENERALIDADES DE HONGOS DE CAMPO Y ALMACÉN QUE INVADEN AL FRIJOL***

---

---

Se ha demostrado que los cambios de temperatura y humedad del medio ambiente, por fenómenos meteorológicos que afecten las condiciones internas de la bodega tienen una influencia decisiva para el desarrollo de los microorganismos. <sup>(34)</sup>

**Tiempo de almacenamiento y grado de invasión:** Si el grano va a conservarse únicamente por pocos días, su condición y capacidad de almacenaje pueden ser de poco interés, por lo menos para el vendedor. Cuanto más largo es el período de almacenamiento, más bajo debe ser el contenido de humedad. <sup>(14)</sup>

El grano recién cosechado que ha estado almacenado de tal modo que ya ha sido invadido, se encuentra en las primeras fases de deterioro. Si posteriormente este grano es almacenado bajo condiciones que permitan que el deterioro continúe, se desarrollará más daño en un determinado período y además estará sujeto a que la invasión por los hongos de almacén y que los daños asociados continúen a contenidos de humedad y temperaturas más bajas que en el caso de un grano perfectamente sano. <sup>(14)</sup>

**Material extraño:** El material extraño consiste principalmente de partículas más finas que las semillas, tales como semillas quebradas, semillas de hierbas, fragmentos de plantas, partes de insectos del campo como grillos y chapulines, así como partículas de suelo. Cuando el grano es depositado en un silo por medio de un transportador de grano, el material extraño generalmente se separa, pero el que llega a quedar, propicia el desarrollo de hongos.

### ***CAPÍTULO III. GENERALIDADES DE HONGOS DE CAMPO Y ALMACÉN QUE INVADEN AL FRIJOL***

---

Si este material se encuentra compactado, el aire que se emplea en el silo para reducir la temperatura no penetrará a dicha zona y el deterioro puede iniciarse. <sup>(14)</sup>

**Insectos y ácaros:** Los insectos y ácaros contribuyen al desarrollo de los hongos de almacén aumentando el contenido de humedad del grano, y dispersando las esporas de hongos entre los granos. Como todos los seres vivos, los insectos y los ácaros transforman gran parte de su alimento en bióxido de carbono y agua, aumentando el contenido de humedad del grano en que viven. <sup>(14)</sup>

#### **3.3.3 Daños causados por hongos en granos almacenados.**

Los daños más importantes causados por hongos que se desarrollan en granos almacenados son: una marcada disminución de la germinación, decoloración de la semilla, fermentación y pérdida de buen sabor, cambios bioquímicos en la semilla y pérdida de peso, <sup>(13)</sup> estas características afectan la calidad sanitaria y nutrimental tanto de la materia prima como los productos alimenticios transformados a partir de ésta.

Generalmente los tres primeros tipos de daño ocurren en secuencia. La decoloración puede estar confinada a partes de la semilla (generalmente al embrión o gérmen) o cubrirla completamente dependiendo de la especie del organismo involucrado.

***CAPÍTULO III. GENERALIDADES DE HONGOS DE CAMPO Y ALMACÉN QUE  
INVADEN AL FRIJOL***

---

---

A medida que las semillas alcanzan estados avanzados de deterioro, se hace evidente un olor desagradable acompañado de un aumento en la temperatura; el aumento de ésta es el resultado, inicialmente, de la actividad del organismo y más tarde, de reacciones químicas que se llevan a cabo. <sup>(13)</sup>

**CAPÍTULO IV.**

**GENERALIDADES DE QUITINA Y  
QUITOSÁN**

## **IV. Generalidades de quitina y quitosán.**

### **4.1 Quitina**

La quitina fue descubierta por Pelletier y Caventon en el año de 1823,<sup>(65)</sup> y es el segundo biopolímero más abundante en la naturaleza después de la celulosa.<sup>(8)</sup> Es un polisacárido proteico e insoluble,<sup>(53)</sup> que constituye junto con otros materiales tales como proteínas y sales minerales,<sup>(18)</sup> el exoesqueleto de los artrópodos (crustáceos e insectos) y las paredes de las células de muchos hongos y algas.<sup>(53)</sup>

La quitina es un copolímero lineal compuesto aproximadamente de 70-90 % de unidades de N-acetil glucosamina y 10-30 % de unidades de D-glucosamina.<sup>(53)</sup> Que químicamente se describe como  $\beta$ -(1-4)-2-acetamido-2-deoxi-D-glucosa (figura 10). En la naturaleza se encuentra en distintas configuraciones  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  quitina, siendo la más abundante la  $\alpha$  quitina.<sup>(8)</sup>

En este biopolímero los grupos amino se encuentran acetilados, por lo que la quitina corresponde a una amida de ácido acético. Este aminopolisacárido es de tipo lineal, llegando a formar cadenas de miles de unidades de N-acetilglucosamina.<sup>(18)</sup>

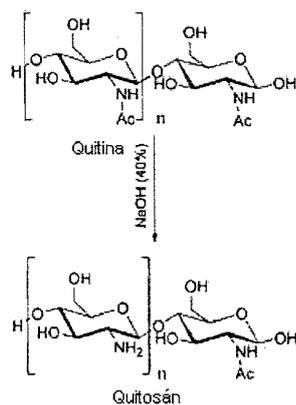


Figura 10. Estructura química de la quitina y quitosán. Fuente: Rabea y Bawy. 2003.<sup>(76)</sup>

#### **4.1.1 Propiedades fisicoquímicas**

La quitina es un compuesto de alto peso molecular y de estructura micelar de cadenas orientadas paralelamente. En estado puro la quitina es un material blanco, amorfo e insoluble en agua, ácidos diluidos, álcalis (diluidos y concentrados), alcohol y en todos los disolventes orgánicos. Es soluble en ácidos minerales concentrados. Por hidrólisis ácida enérgica se degrada a glucosamina, la hidrólisis alcalina la desacetila en gran medida con sólo una ligera reducción de la longitud de cadena. Se disuelve lentamente en soluciones de hipoclorito a la temperatura ordinaria y en una solución de sodio en amoniaco líquido. Las moléculas lineales de quitina tienden a asociarse en forma compacta, gracias a la formación de puentes de hidrógeno intra e intercadena. Los haces multimoleculares de quitina, densamente envasetados, se asocian como moléculas de proteínas. <sup>(8)</sup>

## **4.2 Quitosán**

Uno de los derivados más importantes de la quitina es el quitosán. <sup>(53)</sup> Cuando la quitina se hidroliza en medio alcalino, esta se desacetila y se convierte a "quitosán" utilizando NaOH ó KOH a temperaturas elevadas; modificándose sus grupos funcionales y por ende sus propiedades, como el volverse hidrosoluble en condiciones ácidas. Entonces es conocido químicamente como (1-4)-2-amino-2 deoxi β-D-glucosa. <sup>(27)</sup>

El quitosán tiene un contenido de nitrógeno mayor al 7% y un grado de acetilación menor a 0.40. El peso molecular de este polisacárido puede ser tan alto como  $10^6$  Da. <sup>(53)</sup>

### **4.2.1 Propiedades fisicoquímicas**

El quitosán es un polielectrólito a pH ácido. Presenta una alta densidad de carga por unidad de glucosamina. Por su carga positiva interactúa fuertemente con muchos materiales que portan cargas negativas (proteínas, polisacáridos, aniones, ácidos nucleicos, etc.) dando una neutralidad eléctrica. <sup>(18)</sup>

Entre los usos potenciales debido a su facultad de formar enlaces catiónicos, se puede mencionar sus propiedades secuestrantes de colorantes al combinarse probablemente con los grupos amino y carbonilamino, en la ayuda de recuperación de proteínas, grasas y carbohidratos. <sup>(27)</sup>

La solubilidad del quitosán en soluciones ácidas y la viscosidad dependen del grado de desacetilación y del grado de degradación del polímero. <sup>(8)</sup> Los mejores solventes para el quitosán son soluciones acuosas que contienen de 0.2 a 100 % de ácido fórmico y ácido acético. <sup>(18)</sup>

Es un polímero de alto peso molecular, lineal cuyo grupo amino está fácilmente disponible para reacciones químicas y formación de sales con ácidos. El quitosán seco no tiene punto de fusión definido. Si se guarda suficiente tiempo, se vuelve insoluble en soluciones acuosas de ácidos orgánicos. Se asemeja mucho al papel y al algodón en su estabilidad al aire, calor, etc. <sup>(8)</sup>

La mayor parte de las reacciones características de la quitina lo son también para el quitosán. El quitosán produce otras reacciones por los grupos amino primarios. Las películas de quitosán se insolubilizan por tratamiento con formaldehído, cloruros de acilo, anhídridos de ácidos o sales de metales alcalinos o de amonio de ciertos arenosulfonatos alquilados. <sup>(8)</sup>

#### **4.2.2. Propiedades funcionales**

La quitina y quitosán tienen características tales como, biodegradabilidad y bioactividad, por lo que estos materiales pueden emplearse en la industria de alimentos ya que además poseen diferentes propiedades funcionales tales como: regulador de formación de cristales de hielo en alimentos congelados, agente espesante, texturizante, quelante, emulsificante, etc, por lo que se pueden emplear en diferentes productos entre los cuales se encuentran los aderezos, salsas, bebidas, pastelería, embutidos, gelatinas, productos lácteos, etc.<sup>(8)</sup>

La propiedad coagulante o quelante de la quitina y el quitosán dada por su naturaleza policatiónica hacen de estos polímeros un producto ideal para la separación de coloides y partículas suspendidas que se generan durante la elaboración de ciertos tipos de alimentos, permitiendo además la reducción de sólidos totales, la recuperación de materiales como: proteínas, grasas y carbohidratos de buena calidad, que pueden ser reciclados como alimento o forraje para animales.<sup>(8)</sup>

Como agente coagulante en la industria de tratamientos residuales el quitosán ha llamado mucho la atención, debido a su efectividad en la separación de coloides y partículas dispersas en agua. Se ha evaluado como coagulante en el tratamiento de aguas de desecho provenientes de industrias alimentarias, tales como procesamiento de vegetales y aves.<sup>(8)</sup>

### **4.2.3 Propiedades de enlace**

Entre los usos potenciales debido a su facultad de formar enlaces catiónicos se pueden mencionar sus propiedades secuestrantes de colorantes al combinarse probablemente con los grupos amino y carbonil amino, <sup>(45,3)</sup> en la ayuda de recuperación de proteínas, <sup>(45)</sup> grasas y carbohidratos.

La viabilidad para la remoción de metales indeseables como el mercurio, plomo, zinc, cobre, cromo, plutonio, y uranio, así como la remoción de elementos traza en agua de mar por cromatografía en quitosán. <sup>(45, 46)</sup>

### **4.2.4 Propiedades biológicas**

Se ha investigado la aplicación del quitosán en el área biomédica debido a que no es tóxico y fácilmente biodegradable. Se ha encontrado entre otras actividades que reduce los niveles de colesterol en la sangre y estimula el sistema inmunológico.

El quitosán se ha utilizado como suplemento alimenticio por el efecto beneficioso de la reducción del colesterol y los triglicéridos del plasma debido a su capacidad de unir los lípidos dietéticos, además de haber indicios en la curación de varios desórdenes, incluyendo asma, dermatitis atópica, arteriosclerosis, la hipertensión, la degeneración muscular, la artritis, el cáncer, la diabetes, el osteoporosis entre otras. <sup>(47)</sup>

La actividad bacterioestáticas y bactericidas sugieren que la quitina y quitosán pueden prevenir infecciones de heridas por el uso directo. <sup>(47)</sup>

Cuando se adiciona quitosán a una semilla se tienen incrementos en la producción, aparentemente debido a la protección que da durante la germinación a la semilla por probable interacción con microorganismos patógenos. <sup>(46)</sup>

#### **4.2.5 Quitina y Quitosán como agentes antimicrobianos.**

##### **4.2.5.1 Efecto de quitosán en hongos**

Los tratamientos fungicidas son desalentadores debido a que dejan residuos tóxicos y que permiten el desarrollo de cepas resistentes de hongos, por lo que surge la necesidad de explorar otros métodos más seguros en el control de hongos. <sup>(9)</sup>

Hay un interés cada vez mayor en el uso de quitosán para proporcionar un nivel de protección de la planta contra el ataque de hongos. El quitosán se ha utilizado en la mejora del suelo, en semilla y como tratamiento foliar para el control de hongos. <sup>(9)</sup>

El quitosán inhibe el crecimiento de una amplia variedad de hongos. <sup>(53)</sup>

La pared celular de muchas especies de hongos a excepción de Omicetos y levaduras contienen quitina, <sup>(33, 52)</sup> aprox. en un 1 %, y existe la evidencia de que en la naturaleza al encontrarse hongos como Zigomicetos <sup>(27)</sup> o Actinomicetos <sup>(33, 52)</sup> en presencia de quitosán muestran un favorecimiento hacia la forma latente del organismo, es decir éste deja de ser patógeno o de plano se inhibe, además que la concentración de quitosán en él aumenta. Por ejemplo se ha encontrado quitosán acumulado en clamidosporas en latencia, las cuales al germinar reducen los niveles de quitosán. <sup>(33)</sup>

La explicación de este efecto es que el quitosán con sus grupos amino cargados positivamente, interactúan con los grupos fosfatos negativos de los ácidos nucleicos del material genético de los hongos <sup>(33, 52)</sup>, en especial cuando los oligómeros de 7 unidades de quitosán inhiben el crecimiento de los hongos. En las plantas se induce la expresión de genes, <sup>(33, 52)</sup> ya que se detectó un aumento en la producción de proteínas y enzimas, <sup>(32, 33, 52)</sup> además de que se incrementan los compuestos fenólicos asociados a la pared induciendo cambios en la permeabilidad de la membrana. <sup>(32, 33, 52)</sup>

En vista de su naturaleza policationica, el quitosán puede actuar fácilmente en forma recíproca con residuos negativamente cargados de las macromoléculas expuestas en la superficie de la célula, causando cambios importantes en la composición de la membrana. <sup>(9, 25)</sup>

La forma en que puede estar actuando el quitosán a nivel de genes es al acoplar sus unidades positivas con las cargas negativas en la hélice de DNA del hongo. Induciendo cambios conformacionales del DNA (hélice de forma B a hélice de forma Z). <sup>(27)</sup>

Sin embargo no todos los hongos se ven inhibidos de igual manera ya que esto depende de su composición, así el crecimiento de hongos en presencia de quitosán, teniéndolo a éste como mayor componente, no se inhiben ya que parecen tener mecanismos de eliminación o degradación. Algunas especies de *Fusarium* pueden incluso regular sus niveles de quitosán, ya que al eliminar el exceso de quitosán del medio reanudan su crecimiento. <sup>(52)</sup>

Se postula que cuando el quitosán se libera de la pared celular de patógenos fungales, debido a la acción de enzimas hidrolíticas de la planta hospedera, éste alcanza el núcleo del hongo e interfiere con la síntesis proteína y el RNAm. <sup>(53)</sup>

El quitosán activa varios procesos de la defensa en el tejido fino del hospedero, actos como agente en la ligación de agua inhibe varias enzimas. La actividad antimicrobiana del quitosán depende de varios factores; tales como el grado de desacetilación, el peso molecular, el pH del medio, la temperatura, la presencia de varios componentes del alimento, etc. El mecanismo de la actividad antimicrobiana no se ha aclarado completamente todavía, pero se han postulado varias hipótesis. La hipótesis más factible es un cambio en la permeabilidad de la célula debido a las interacciones entre el quitosán policatiónico y las cargas electronegativas en las superficies de la célula.

Esta interacción conduce a la salida de electrólitos intracelulares y de componentes proteicos. Otros mecanismos mencionados en la literatura son la interacción de los productos difundidos de la hidrólisis con el DNA microbiano, que conduce a la inhibición del mRNA y de la síntesis de proteínas, la quelación de metales, elementos de la espora y nutrientes esenciales. <sup>(22)</sup>

Se han propuesto varios mecanismos para la inhibición microbiana por quitosán, pero el mecanismo exacto todavía no se sabe. El más aceptado es la interacción del quitosán positivamente cargado con residuos negativamente cargados en la superficie de la célula de muchos hongos y bacterias, los cuales causan alteraciones extensas de la superficie de la célula por causa del quitosán alterando la permeabilidad de la célula y consecuentemente la salida de sustancias intracelulares, tales como electrólitos, material de absorción de luz UV, proteínas, aminoácidos, glucosa y lactato dehidrogenasa. Consecuentemente, el quitosán inhibe el metabolismo normal de microorganismos y finalmente conduce a la muerte de estas células. <sup>(54)</sup>

Uno de los mecanismos propuesto es el de inducción en los hongos, donde el inductor entra en contacto con el receptor, la primera respuesta es un cambio en el flujo de iones a través de la membrana de la célula. Durante los primeros minutos en contacto con el inductor existe una salida de  $\text{Cl}^-$  y  $\text{K}^+$  y entra  $\text{Ca}^{2+}$  al mismo tiempo hay un cambio en el pH en el citoplasma, que se convierte más ácido (debido a la inactivación del  $\text{ATPase-H}^+$ ), y una disminución en la polarización de la membrana. <sup>(77)</sup>

Otro mecanismo es que el quitosán positivamente cargado actúa recíprocamente con el DNA celular de algunos hongos y bacterias, por lo tanto inhibe al RNA y la síntesis de proteínas. En este mecanismo, el quitosán podría ser hidrolizado a un PM más bajo para penetrar en la célula de los microorganismos. Sin embargo, este mecanismo sigue siendo polémico. <sup>(54)</sup>

#### **4.2.5.2. Factores que afectan la actividad antimicrobiana.**

**El peso molecular (PM).** La actividad antimicrobiana de quitosán esta relacionada no solamente con su naturaleza catiónica si no también con la longitud de cadena. <sup>(54)</sup>

**El grado de desacetilación (°GD).** El grado de desacetilación es directamente proporcional a la actividad antimicrobiana. El aumento del °GD significa un incremento en el número de grupos amino del quitosán. Como resultado, el quitosán tiene un incremento en el número de protones del grupo amino en condiciones ácidas se disuelve completamente, lo cual conduce a un incremento en el cambio de interacción entre el quitosán y las paredes celulares del microorganismo cargadas negativamente. <sup>(54)</sup>

**pH.** La actividad antimicrobiana del quitosán es fuertemente afectada por el pH. Disminuye cuando el pH aumenta debido a la desprotonización de los grupos amino y la baja solubilidad en agua.

Como se mencionó anteriormente la actividad antimicrobiana del quitosán proviene de la naturaleza catiónica del quitosán. <sup>(54)</sup>

**Temperatura.** La actividad antibacteriana es directamente proporcional a la temperatura. <sup>(54)</sup> Los patógenos entonces pueden ser inhibidos o estar bajo la acción tanto de su propio quitosán como de las fitoalexinas del hospedero, inducidas por el quitosán liberado. <sup>(52)</sup>

Otra forma de actividad antimicrobiana del quitosán es referida a que se ha aplicado quitosán a la superficie de chícharos antes de infectarlos y posteriormente se han utilizado radioisótopos que muestran que las enzimas en la cáscara, rompen la pared celular de hongos e intervienen en la síntesis de RNA y en el crecimiento del hongo. <sup>(33)</sup> Mientras que en el mismo chícharo los fragmentos activan la producción de enzimas y proteínas <sup>(33)</sup> selectivamente sintetizadas como respuesta de resistencia inducida, al tiempo que hay un incremento en la actividad de enzimas de rutas secundarias, iniciándose la producción de antifúngicos como la fitoalexina y pisatum así como enzimas hidrolíticas quitinasas y  $\beta$ -glucanasas <sup>(33, 52)</sup> todos con potencial de atacar y liberar oligómeros de carbohidratos de las paredes celulares de los hongos. <sup>(52)</sup>

El quitosán inhibió el crecimiento de *Aspergillus flavus* y de la aflatoxina en maíz y cacahuate en condiciones postcosecha. <sup>(9)</sup>

Los residuos de micelio de la industria se pueden utilizar para la producción de quitosán. <sup>(36)</sup>

Aunque el *A. glaucus*, *A. nidulans* y *M. rouxii* son poco importantes a nivel industrial, poseen un alto contenido de quitosán en sus paredes de la célula, y por lo tanto se pueden utilizar como productores de quitosán. Los hongos de Ascomicetos, de Basidiomicetos y de Deuteromicetos contienen quitina como principal componente estructural de sus paredes celulares.<sup>(36)</sup> También se ha encontrado que el quitosán se extrae no solamente de los hongos Zygomycetos, si no también de los *no*-Zygomycetos. Algunos hongos industriales exhiben una alta productividad de quitosán, como lo es el *A. glaucus*.<sup>(36)</sup>

#### **4.2.5.2 Efecto de quitosán en bacterias**

La quitina y quitosán tienen actividad antimicrobiana contra bacterias y levaduras.<sup>(47)</sup> Se ha examinado la actividad anti-bacteriana en bacterias gram+ y gram-. Se encontró que el quitosán en las bacterias gram+ (como el *Staphylococcus aureus*) tiene mayor efecto inhibitorio que en las bacterias gram- (tales como *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* y *Vibrio parahemolyticum*), donde el quitosán inhibió el crecimiento de la mayoría de las bacterias probadas. Esta inhibición depende del grado de desacetilación y del tipo de bacteria.<sup>(68)</sup>

El quitosán también tiene actividad bactericida, ya que él junto con otras poliaminas interactúa con la membrana celular para alterar la permeabilidad de la misma.<sup>(53)</sup>

El N-carboxibutil quitosán se ha probado contra varios microorganismos patógenos, demostrando su actividad bacterioestática, bactericida y candidal.<sup>(47)</sup>

Los microorganismos tratados experimentan alteraciones morfológicas marcadas con efecto bactericida cuando son examinadas por microscopía electrónica. <sup>(47)</sup>

#### **4.2.6 Quitosán como Inductor (Elicitor)**

Los elicitors se pueden definir como promotores de mecanismos en la síntesis de metabolitos, o bien como potenciadores de la síntesis de metabolitos secundarios en plantas y que podrían jugar un papel importante en las vías biosintéticas.

Los elicitors están clasificados en físicos o químicos, bióticos o abióticos y complejos o definidos, dependiendo de su origen y su estructura molecular como lo muestra la tabla 1.

Además, también pueden obrar recíprocamente con el DNA celular de la planta activando la inhibición de la acción de los genes de un hongo patógeno, induciendo reacciones de defensa en la planta. <sup>(15)</sup>

En las plantas se induce la expresión de genes, <sup>(33, 52)</sup> ya que se detectó un aumento en la producción de proteínas y enzimas. <sup>(32, 33, 52)</sup> Además de que se incrementan los compuestos fenólicos asociados a la pared induciendo cambios en la permeabilidad de la membrana. <sup>(32, 33, 52)</sup>

Probablemente esto es debido a que una pequeña cantidad de quitosán puede penetrar en el núcleo de la planta, conteniendo una gran cantidad de cromatina y puede más fácilmente alterar la conformación de la cromatina en regiones selectas causando así cambios de transcripción

preferentemente que suprimiendo la síntesis de RNA como es posible con los hongos, los cuales contienen mucho menos DNA. <sup>(27)</sup>

Tabla 1. Inductores de plantas y células microbianas. Fuente: Radman, 2003. <sup>(77)</sup>

| Inductor            |           |  |   |               |                 |
|---------------------|-----------|--|---|---------------|-----------------|
| Inductores físicos  | Daño      |  |   |               |                 |
| Inductores químicos | Abióticos | Iones metálicos (lanthanum, europium, calcio, plata, cadmio) oxalato |   |               |                 |
|                     | Bióticos  | Composición compleja   | Paredes celulares de levaduras, micelios, esporas de hongos |               |                 |
|                     |           | Composición definida   | Carbohidratos   | Polisacáridos | Alginato        |
|                     |           |  |   |               | LBG             |
|                     |           |  |   |               | Pectina         |
|                     |           |  |   |               | <b>Quitosán</b> |
|                     |           |  |   |               | Goma Guar       |
|                     |           |  | Oligosacaridos  | Mannuronate   |                 |
|                     |           |  |   | Guluronate    |                 |
|                     |           |  |   | Mannan        |                 |
| Proteicos           | Peptidos  |  | Glutathione   |               |                 |
|                     | Proteínas |  | Celulosa, Elicitins, Oligandrin                             |               |                 |
| Lípidos             |           | Lipopolisacaridos  |   |               |                 |
| Glicoproteinas      |           | No caracterizados  |   |               |                 |
| Volátiles           |           | C <sub>6</sub> -C <sub>10</sub>                                      |   |               |                 |

El tratamiento con quitosán para el control de la infección de la semilla de trigo contra *Fusarium graminearum*, aumentó la germinación y el vigor de ésta. <sup>(9)</sup>

#### **CAPITULO IV. GENERALIDADES DE QUITINA Y QUITOSÁN**

El recubrimiento de quitosán a la semilla de trigo dió lugar a la reducción de infecciones primarias de la raíz provocadas por *Fusarium graminearum*, demostrando la carencia de síntomas de fitotoxicidad. <sup>(9)</sup>

La actividad de quitosán decrece ligeramente en hojas y raíces durante el crecimiento. <sup>(27)</sup> Lo que sugiere que la actividad puede ser una función de degradación del tejido de colénquima.

También se ha aplicado el quitosán a trigo y lenteja, mejorando el rendimiento en un 10 a 30 %, <sup>(33)</sup> al disminuir las pérdidas por pudrición. En frijol y rábanos disminuye la pudrición de raíz por *Fusarium*. <sup>(52)</sup>

**CAPÍTULO V.**

**METODOLOGÍA**

## **OBJETIVOS**

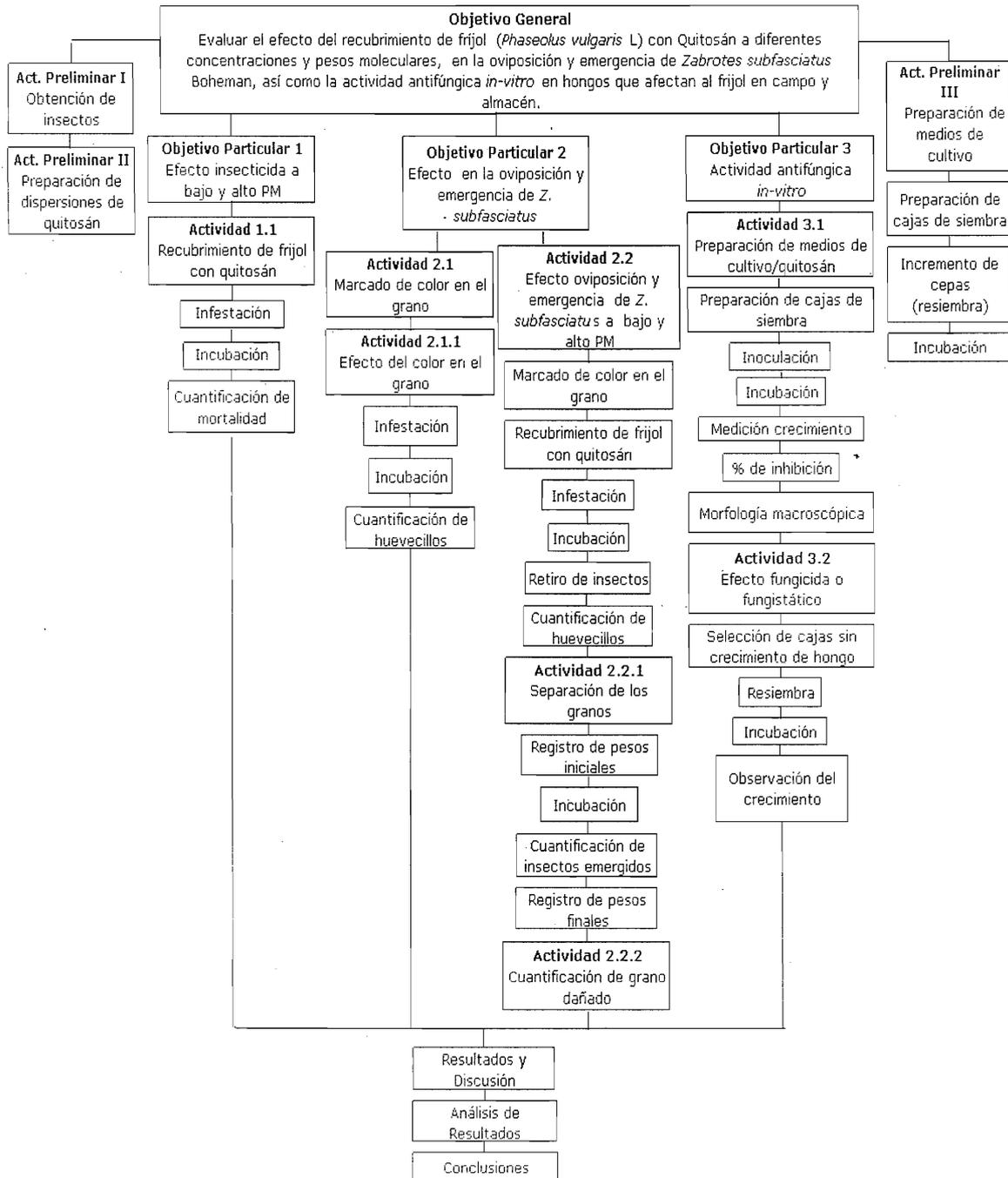
### **OBJETIVO GENERAL.**

Evaluar el efecto del recubrimiento de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) con quitosán a diferentes concentraciones y pesos moleculares, en la oviposición y emergencia de *Zabrotes subfasciatus* Boheman, así como la actividad antifúngica *in-vitro* en hongos que afectan al frijol en campo y almacén.

### **OBJETIVOS PARTICULARES.**

1. Determinar el efecto insecticida del quitosán a diferentes concentraciones como cubierta en frijol sobre *Z. subfasciatus*.
2. Evaluar el efecto del recubrimiento de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) con quitosán a diferentes concentraciones y pesos moleculares, en la oviposición y emergencia de *Z. subfasciatus*.
3. Evaluar *in-vitro* la actividad antifúngica del quitosán de diferentes concentraciones y pesos moleculares, sobre hongos patógenos que afectan al frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) en el campo y almacén.

Cuadro 2. Cuadro Metodológico



## DESCRIPCIÓN DE ACTIVIDADES

### ACTIVIDADES PRELIMINARES

#### I. Obtención de los insectos para la prueba.

Se tomaron insectos de la especie (*Zabrotes subfasciatus* Boh.) de los pies de cría ya existentes en el laboratorio de Entomología de la UNIGRAS (Unidad de investigación de granos y semillas) de la FES-Cuautitlán, con la finalidad de tener suficientes insectos de una edad uniforme para la experimentación. Esto se realizó utilizando un tamiz del No.10 para separar los insectos del pie de cría y con el aspirador manual se tomaron aproximadamente 300 insectos de ambos sexos al azar. Los insectos se colocaron en frascos de vidrio de 4 L que contenían 1 kg de frijol peruano previamente tratado en congelación a  $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 5 días para eliminar alguna posible infestación previa.

Los frascos fueron cerrados con tapaderas de malla metálica para permitir la adecuada entrada de aire y se introdujeron en una cámara bioclimática a una temperatura de  $27 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  y humedad relativa de  $70 \pm 5\%$ . Los adultos fueron mantenidos por un período de 10 días, tiempo en el cual las hembras ovipositaron en el frijol y posteriormente fueron retiradas de los frascos junto con los machos. Los adultos no mayores de 24 horas de emergidos fueron utilizados en los diferentes experimentos (pruebas).

**II. Preparación de dispersiones de quitosán.**

Se prepararon tres dispersiones de quitosán a las concentraciones de 0.5, 1.0, 2.0 y 4.0% p/v para cada uno de los pesos moleculares (25.800 y 136,131 g/mol). Se utilizó una solución de ácido acético al 1 % v/v para su dispersión e hidratación, utilizando un homogenizador marca Braun por un tiempo de mezclado de 5 minutos.

Posteriormente se ajustó el pH a 5.5 con una solución alcalina empleando un potenciómetro digital de la marca HANNA Instruments.

El quitosán utilizado fue obtenido a partir de la desacetilación de la quitina, según la metodología establecida en el laboratorio de Biotecnología de la FES CUAUTITLAN; <sup>(73)</sup> y sus propiedades químicas se muestran en el cuadro 3.

Cuadro. 3. Propiedades químicas del quitosán a diferentes pesos moleculares.

| <b>Quitosán de bajo PM</b> | <b>Quitosán de medio PM</b> | <b>Quitosán de alto PM</b> |
|----------------------------|-----------------------------|----------------------------|
| Origen: Centolla           | Origen: Langostino          | Origen: Centolla           |
| PM: 52,800 g/mol           | PM: 136,130 g/mol           | PM: 251,500 g/mol          |
| GD°: 99 %                  | GD°: 79 %                   | GD°: 100 %                 |
| N <sub>T</sub> : 8.5 %     | N <sub>T</sub> : 8.0 %      | N <sub>T</sub> : 8.4 %     |
| Ceniza: 0.4 %              | Ceniza: 0.26 %              | Ceniza: 0.31 %             |

**1. Efecto insecticida del quitosán a diferentes concentraciones como cubierta en frijol, sobre *Z. subfasciatus*.**

**Actividad 1.1 Recubrimiento de frijol con quitosán**

Se recubrieron de 80 a 100 g de frijol. El recubrimiento se hizo por inmersión del grano en un vaso de precipitado, a las diferentes concentraciones de quitosán de dos pesos moleculares, identificando cada uno con etiquetas. El excedente de la solución se separó con un colador, posteriormente se colocaron los frijoles en una charola de malla metálica, tratando de esparcirlos lo más posible, para evitar aglomeración entre ellos. Las muestras fueron secadas con la ayuda de un ventilador, de 15 a 20 minutos a temperatura ambiente. Se emplearon como controles granos de frijol cubiertos por inmersión en agua y agua acidificada (preparada con ácido acético a pH 5.5).

Se colocaron 50 g de frijol cubierto con quitosán de bajo peso molecular (52,800 g/mol) y mediano peso molecular (136,130 g/mol) a las concentraciones de 0.5, 1.0, 2.0 y 4.0% en frascos de vidrio de 8 cm de alto y 6 cm de diámetro. Se realizaron tres repeticiones por concentración y para cada uno de los tiempos de exposición del insecto. (cuadro 4).

Cuadro 4. Formato de resultados para la prueba del efecto insecticida del quitosán.

| Quitosán<br>PM<br>(g/mol) | Concentraciones<br>(%) | 6 (h) |    |    | 24 (h) |    |    | 48 (h) |    |    | 96 (h) |    |    |
|---------------------------|------------------------|-------|----|----|--------|----|----|--------|----|----|--------|----|----|
|                           |                        | R1    | R2 | R3 | R1     | R2 | R3 | R1     | R2 | R3 | R1     | R2 | R3 |
| controles                 | Agua                   |       |    |    |        |    |    |        |    |    |        |    |    |
|                           | Agua ácida             |       |    |    |        |    |    |        |    |    |        |    |    |
| 52,800                    | 0.5                    |       |    |    |        |    |    |        |    |    |        |    |    |
|                           | 1.0                    |       |    |    |        |    |    |        |    |    |        |    |    |
| 136,130                   | 2.0                    |       |    |    |        |    |    |        |    |    |        |    |    |
|                           | 4.0                    |       |    |    |        |    |    |        |    |    |        |    |    |

Cada frasco se infestó con 15 insectos tomados, al azar, de la especie *Z. subfaciatus* recién emergidos (menos de 24 hrs). Los frascos se cerraron con tapaderas de malla metálica para asegurar la entrada de aire a los insectos y se colocaron dentro de una cámara bioclimática con una temperatura de  $27 \pm 2$  °C y una humedad relativa de  $70 \pm 2$  %, lo cual se logró mediante un humidificador integrado.

Los tiempos de exposición en la cámara fueron de 6, 24, 48 y 96 horas. Cada frasco fue revisado a dichos tiempos para cuantificar la mortalidad de los insectos. Con los resultados de mortalidad de los insectos se sacaron las medias y se realizaron gráficas de barras.

## **2. Efecto de la cubierta de quitosán de bajo y alto PM en frijol sobre la oviposición y emergencia de *Z. subfasciatus*.**

### **Actividad 2.1 Marcado de color de los granos de frijol por la parte del hilo.**

Se marcaron 100 g de frijol para cada color: azul, rojo, café y negro, por la parte del hilo utilizando marcadores de agua de la marca Pelikan Markana. Se dejaron secar y se almacenaron en bolsas de plástico bien cerradas para evitar contaminación. Este ensayo se hizo con el fin de determinar si el color tiene algún efecto en la oviposición de *Z. subfasciatus*.

#### **Actividad 2.1.1 Efecto del color marcando el grano de frijol para la oviposición**

El bioensayo de color se realizó con la finalidad de determinar si el marcar la parte del hilo de los frijoles con diferentes colores tenía algún efecto en la oviposición.

Se probaron los diferentes colores (azul, rojo, café y negro). Los cuales fueron aplicados por separado en el hilo del frijol. Una vez que la tinta se secó se colocaron 20 granos de frijol de cada color en cajas de petri de plástico (5 cm de diámetro y 1 cm de altura) haciendo la prueba por triplicado para cada color, incluyéndo un control (cajas

con frijol sin marcar). Se colocaron, con la ayuda de un pincel, 2 hembras y 1 macho por caja para asegurar la oviposición.

Las cajas se introdujeron en la cámara bioclimática en condiciones controladas de humedad y temperatura durante 24 horas. Al término de las 24 horas se eliminaron los insectos y se cuantificó el número de huevecillos colocados por las hembras en los frijoles con la ayuda de un microscopio estereoscópico. Los resultados de oviposición sobre los frijoles de cada color se analizaron por medio de un ANDEVA (Análisis de Varianza) factorial.

**Actividad 2.2 Efecto de la cubierta de quitosán de bajo y alto PM en frijol sobre la oviposición y emergencia de *Z. subfasciatus*.**

Para el desarrollo de éste experimento fue necesario diferenciar los granos de frijol para cada uno de los tratamientos, marcando 4.8 Kg por la parte del hilo, descrito previamente en la actividad 2.1. Posteriormente se recubrieron con quitosán de acuerdo a la metodología mencionada en la actividad 1.1.

El grano de frijol marcado con color azul correspondió al tratamiento con agua; el grano marcado con color rojo para el tratamiento con agua acidificada y los marcados con color café para los tratados con quitosán.

Se colocaron 20 granos de cada tratamiento (H<sub>2</sub>O, H<sub>2</sub>O acidificada y concentración de quitosán) en cajas petri de plástico de 9.0 cm de diámetro y 1.5 cm de altura.

Este procedimiento se siguió para cada una de las concentraciones (0.5, 1.0 y 2.0 %) de quitosán, realizándose diez repeticiones por concentración.

Posteriormente, las cajas se infestaron con una pareja de insectos de la especie *Z. subfasciatus* previamente seleccionadas y con un tiempo de 24 horas de haber emergido.

Los granos de frijol con los tres tratamientos fueron ofrecidos en la misma caja a la hembra, en una prueba de libre elección.

Las cajas se incubaron dentro de una cámara bioclimática que prevaleció a una temperatura de  $27^{\circ} \pm 2$  °C y una humedad relativa de  $70 \pm 5$  %, lo cual se logró mediante un humidificador integrado. Los tiempos de permanencia en la cámara fueron de 24, 48 y 96 horas.

Cuadro 5. Formato de resultados para la prueba del efecto de la cubierta de quitosán en la oviposición y emergencia.

| Quitosán PM (g/mol) | TIEMPO (h) | CONCENTRACIÓN (%) | TRATAMIENTO | # REPLICAS | OVIPOSICIÓN (#huevecillos) | EMERGENCIA (#insectos) | *D.P (g) | *% GD |  |
|---------------------|------------|-------------------|-------------|------------|----------------------------|------------------------|----------|-------|--|
| 52,800<br>136,130   | 24         | 0.5               | Agua        | 10         |                            |                        |          |       |  |
|                     |            |                   | Agua ácida  | 10         |                            |                        |          |       |  |
|                     |            |                   | Quitosán    | 10         |                            |                        |          |       |  |
|                     |            | 1.0               | Agua        | 10         |                            |                        |          |       |  |
|                     |            |                   | Agua ácida  | 10         |                            |                        |          |       |  |
|                     |            |                   | Quitosán    | 10         |                            |                        |          |       |  |
|                     |            | 2.0               | Agua        | 10         |                            |                        |          |       |  |
|                     |            |                   | Agua ácida  | 10         |                            |                        |          |       |  |
|                     |            |                   | Quitosán    | 10         |                            |                        |          |       |  |
|                     |            | 4.0               | Agua        | 10         |                            |                        |          |       |  |
|                     |            |                   | Agua ácida  | 10         |                            |                        |          |       |  |
|                     |            |                   | Quitosán    | 10         |                            |                        |          |       |  |
|                     | 48         | 0.5               | Agua        | 10         |                            |                        |          |       |  |
|                     |            |                   | Agua ácida  | 10         |                            |                        |          |       |  |
|                     |            |                   | Quitosán    | 10         |                            |                        |          |       |  |
|                     |            | 1.0               | Agua        | 10         |                            |                        |          |       |  |
|                     |            |                   | Agua ácida  | 10         |                            |                        |          |       |  |
|                     |            |                   | Quitosán    | 10         |                            |                        |          |       |  |
|                     |            | 2.0               | Agua        | 10         |                            |                        |          |       |  |
|                     |            |                   | Agua ácida  | 10         |                            |                        |          |       |  |
|                     |            |                   | Quitosán    | 10         |                            |                        |          |       |  |
|                     |            | 4.0               | Agua        | 10         |                            |                        |          |       |  |
|                     |            |                   | Agua ácida  | 10         |                            |                        |          |       |  |
|                     |            |                   | Quitosán    | 10         |                            |                        |          |       |  |
|                     | 96         | 0.5               | Agua        | 10         |                            |                        |          |       |  |
|                     |            |                   | Quitosán    | 10         |                            |                        |          |       |  |
|                     |            | 1.0               | Agua        | 10         |                            |                        |          |       |  |
|                     |            |                   | Agua ácida  | 10         |                            |                        |          |       |  |
|                     |            | 2.0               | Quitosán    | 10         |                            |                        |          |       |  |
|                     |            |                   | Agua        | 10         |                            |                        |          |       |  |
|                     |            | 4.0               | Agua ácida  | 10         |                            |                        |          |       |  |
|                     |            |                   | Quitosán    | 10         |                            |                        |          |       |  |

\*DP = diferencia de peso; %GD = Porcentaje de grano dañado.

Al término de dichos tiempos se retiraron los insectos para evitar que la hembra siguiera ovipositando y se cuantificaron los huevecillos depositados en la testa del frijol de cada tratamiento utilizando un microscopio estereoscópico

### **Actividad 2.2.1 Separación de los granos**

Se separaron los granos de cada color en cajas de petri de 5.5 cm de diámetro (cuadro 5), y se registraron los pesos iniciales de cada una de las muestras.

Las cajas se colocaron nuevamente en la cámara bioclimática y se cuantificó la emergencia de los adultos de la misma generación desde el primer día de haber emergido hasta observar que ya no había insectos.

Al terminar la emergencia de los adultos, se registraron los pesos finales de cada una de las muestras, para obtener la pérdida de peso por medio de la diferencia de peso inicial y final.

### **Actividad 2.2.2 Cuantificación de grano dañado**

Se cuantificó el grano dañado de cada una de las muestras, observando a simple vista cada grano. Se denominó grano dañado aquel que en su superficie presentara indicios de huevos de insecto o ventanas de emergencia, obteniendo así el porcentaje de grano dañado.

### **III. Preparación de medios de cultivo PDA y MSA.**

Para la prueba *in-vitro* de la actividad antifúngica del quitosán se utilizaron dos tipos de medio de cultivo. El medio de cultivo PDA (papa dextrosa agar) para hongos de campo y el MSA (malta sal agar) para hongos de almacén. La preparación de los medios de cultivo se realizó de la siguiente manera:

Papa dextrosa agar (PDA). Se preparó con una infusión de papas de la siguiente manera. Se pesaron 200 g de papa previamente lavadas y peladas. Posteriormente se hirvieron hasta estar suaves. La infusión obtenida se filtró con manta de cielo se colocó en un matraz de 1 L y se aforó a 500 ml con agua destilada. Se agregaron, 7.5 g de agar bacteriológico de la marca Bioxon y 5 g de sacarosa.

La esterilización del medio de cultivo, se realizó a una presión de 15 lb/in<sup>2</sup> por 20 minutos a una temperatura de 120 °C. Cuando el medio bajó de temperatura (40 °C), se vertió en cajas de Petri y posteriormente se refrigeraron a una temperatura de 5 °C.

Malta Sal Agar (MSA). Se preparó 1 L con agua destilada. Se agregaron 20 g de agar bacteriológico de la marca Bioxon, 20 g de malta y 60 g de cloruro de sodio. El medio de cultivo se esterilizó con el mismo procedimiento ya descrito.

#### Incremento de cepas

Se utilizaron 6 cepas aisladas de diferentes variedades de frijol por el método de placa agar, almacenadas a 5 °C, en el laboratorio de Fitopatología del UNIGRAS FES Cuautitlán. Los hongos de campo fueron: *Alternaria alternata*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani* y de almacén *Aspergillus chevalierii*, *Aspergillus flavus* y *Aspergillus nidulans*.

Las cepas se resembraron en medios de cultivo de papa dextrosa y malta sal agar para los hongos de campo y almacén respectivamente se incubaron durante 7 días a una temperatura de 25° C.

### **3. Evaluación del efecto de la actividad antifúngica del Quitosán en hongos de campo y almacén *in-vitro*.**

#### **Actividad 3.1 Preparación de medios de cultivo/quitosán.**

La preparación de las soluciones de quitosán se realizaron con el mismo procedimiento ya descrito en la actividad preliminar II, utilizando los siguientes PM; 52,800, 136,130, 251,500 g/mol en concentraciones de 0.5, 1.0 y 2.0 % p/v. Así como la preparación del medio de cultivo PDA y MSA antes descrito.

La esterilización del medio de cultivo, se realizó en una autoclave a una presión de 15 lb/in<sup>2</sup> por 20 minutos a una temperatura de 120 °C. El quitosán fue esterilizado en un microondas de la marca Panasonic por un tiempo de 1.35 minutos.

Una vez ya esterilizados tanto el medio de cultivo como el quitosán, este último fue agregado al medio de cultivo mezclando en una parrilla con agitación para homogenizarlo. Se prepararon cajas de Petri con medio de cultivo de PDA/quitosán y MSA/quitosán para las diferentes concentraciones y pesos moleculares ya descritos.

Utilizando las cepas resembradas y las cajas de medio de cultivo/quitosán se realizó la inoculación de cada uno de los hongos de campo y de almacén, tomando un inóculo de las cepas, para poder determinar a que concentración de quitosán se inhibe el crecimiento del hongo.

Esto se realizó por triplicado utilizando como control medio de cultivo sin concentración de quitosán, se incubaron a 25 °C durante 9 días. Se evaluó el porcentaje de inhibición midiendo el crecimiento radial de la colonia a los 3, 6 y 9 días para obtener el porcentaje de inhibición del quitosán (cuadro 6).

Cuadro 6. Formato de resultados para el Porcentaje de inhibición de hongos de campo y almacén.

| HONGOS DE CAMPO |                             |     |     |                           |     |     |                           |     |     |
|-----------------|-----------------------------|-----|-----|---------------------------|-----|-----|---------------------------|-----|-----|
| % de Inhibición |                             |     |     |                           |     |     |                           |     |     |
|                 | <i>Alternaria alternata</i> |     |     | <i>Fusarium oxysporum</i> |     |     | <i>Rhizoctonia solani</i> |     |     |
| [QN] (%)        | 0.5                         | 1.0 | 2.0 | 0.5                       | 1.0 | 2.0 | 0.5                       | 1.0 | 2.0 |
| PM (g/mol)      |                             |     |     |                           |     |     |                           |     |     |
| 52.800          |                             |     |     |                           |     |     |                           |     |     |
| 136.130         |                             |     |     |                           |     |     |                           |     |     |
| 521.500         |                             |     |     |                           |     |     |                           |     |     |

| HONGOS DE ALMACEN |                           |     |     |                                |     |     |                             |     |     |
|-------------------|---------------------------|-----|-----|--------------------------------|-----|-----|-----------------------------|-----|-----|
| % de Inhibición   |                           |     |     |                                |     |     |                             |     |     |
|                   | <i>Aspergillus flavus</i> |     |     | <i>Aspergillus chevalierii</i> |     |     | <i>Aspergillus nidulans</i> |     |     |
| [QN] (%)          | 0.5                       | 1.0 | 2.0 | 0.5                            | 1.0 | 2.0 | 0.5                         | 1.0 | 2.0 |
| PM (g/mol)        |                           |     |     |                                |     |     |                             |     |     |
| 52.800            |                           |     |     |                                |     |     |                             |     |     |
| 136.130           |                           |     |     |                                |     |     |                             |     |     |
| 521.500           |                           |     |     |                                |     |     |                             |     |     |

Macromorfología de la colonia.

Para determinar el efecto fungistático o fungicida del quitosán se observó la macromorfología de la colonia, la cual se reporta en la tabla 3.

### **Actividad 3.2 Efecto fungistático y fungicida del quitosán.**

Una vez transcurridos los 9 días de medición de diámetros, se seleccionaron las cajas en las que no hubo crecimiento del hongo y

se inocularon cajas para evaluar el efecto fungicida y fungistático, de agar papa dextrosa y malta sal agar para hongos de campo y hongos de almacén respectivamente; las cajas se incubaron a 25 °C durante 7 días. Posteriormente se tomó como referencia que si el hongo crecía, el efecto del quitosán se consideraba fungistático y si no crecía su efecto era fungicida. (cuadro 7).

Cuadro 7. Formato de resultados para el efecto fungicida y fungistático del quitosán en cultivos secundarios.

| Hongo                   | PM<br>(g/mol) | [QN]<br>(%) | Efecto<br>Fungicida<br>o<br>Fungistático |
|-------------------------|---------------|-------------|--|
| Hongos de campo/almacén | 52,800        | 0.5         |  |
|                         |               | 1.0         |  |
|                         |               | 2.0         |  |
|                         | 136,130       | 0.5         |  |
|                         |               | 1.0         |  |
|                         |               | 2.0         |  |
|                         | 251,500       | 0.5         |  |
|                         |               | 1.0         |  |
|                         |               | 2.0         |  |

**CAPÍTULO VI.**

**RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Los resultados obtenidos en este trabajo experimental se resumen en las gráficas y cuadros siguientes; en éstos se representaron los valores de las medias correspondientes a las repeticiones de cada tratamiento establecido como unidades experimentales.

Los resultados obtenidos se analizaron utilizando un ANDEVA factorial totalmente aleatorizado y solo se reportaron las gráficas en las cuales se encontró diferencia significativa ( $p < 0.05$ ). Debido a que cada uno de los experimentos a diferentes pesos moleculares se realizaron en distintos tiempos, desde el punto de vista estadístico, no pueden ser comparados. Los análisis de resultados para cada peso molecular se presentaron en la misma sección.

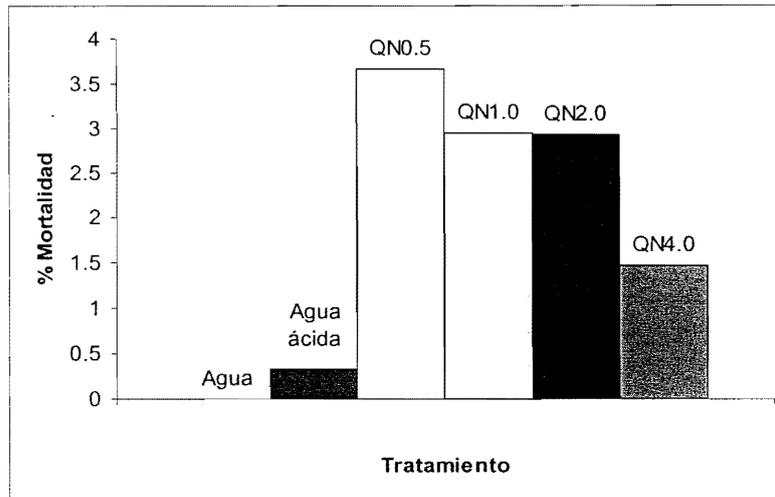
Estos resultados se describen de acuerdo al cuadro metodológico referido en la página 76.

### **1. Efecto insecticida sobre *Zabrotes subfasciatus* en frijol cubierto con quitosán de bajo PM**

El recubrimiento del frijol con quitosán se realizó para evaluar el efecto insecticida dando los siguientes resultados. En la gráfica 1, se muestra el porcentaje de mortalidad del insecto al cubrir frijol con diferentes tratamientos de quitosán.

Como se puede observar, a las concentraciones de 0.5, 1.0, 2.0 y 4.0 por ciento de quitosán de bajo peso molecular utilizadas para encontrar una respuesta biológica, muestran que tiene efecto insecticida y que el

porcentaje de mortalidad promedio no es mayor al 4 % en la concentración del 0.5 % de quitosán. También se observa una disminución del porcentaje de mortalidad con forme aumenta la concentración.



Gráfica 1. Porcentaje de mortalidad de *Zabrotes subfasciatus* en semillas de frijol recubiertas con quitosán de bajo peso molecular.

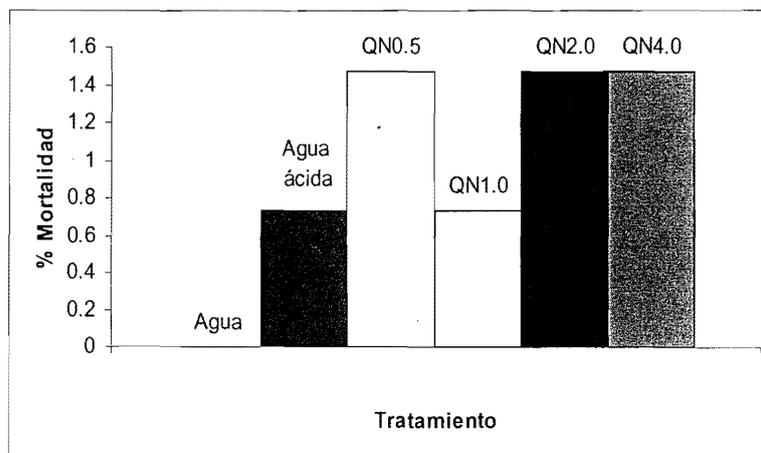
### **Efecto insecticida sobre *Zabrotes subfasciatus* en frijol cubierto con quitosán de alto PM.**

Al igual que en el análisis del recubrimiento de frijol con quitosán de bajo peso molecular el peso molecular alto presenta efecto insecticida, inclusive este se ve disminuido hasta el 1%.

En la gráfica 2 se muestra que el quitosán de alto PM al igual que el de bajo PM tiene efecto insecticida en todas las concentraciones utilizadas y que éste no excede del 1 por ciento.

También se observa que el control de agua acidificada y la concentración del 1.0 % tienen valores de porcentaje de mortalidad iguales.

En un estudio realizado por García 2004, se encontró que el uso del almacenamiento hermético al 11.5 % de oxígeno en la atmósfera ocasiona la muerte de *Z.subfasciatus* entre el sexto y noveno día.



Gráfica 2. Porcentaje de mortalidad de *Zabrotes subfasciatus* en frijol cubierto con quitosán de alto PM.

Lagunes 1986, menciona que el uso de algunos polvos vegetales ocasiona una mortalidad de *Z. subfasciatus* mayor al 20 %.

En comparación a los métodos anteriores como alternativas de control, se obtuvo que el uso de quitosán de bajo y alto peso molecular como insecticida es de menor actividad.

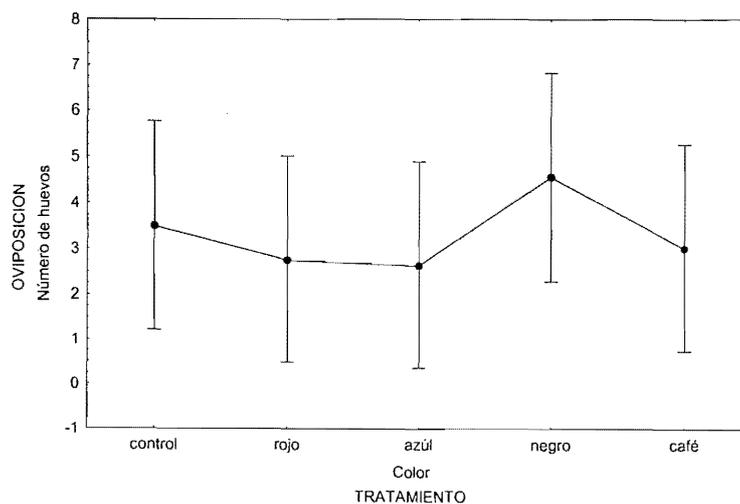
### **2.1.1 Efecto del marcado de color del grano en la oviposición.**

Como se mencionó en la metodología, el frijol se marcó con diferentes colores (rojo, azul, negro y café) por la parte del hilo para evaluar el efecto que tiene este parámetro en la oviposición y al mismo tiempo

para poder identificar por medio del color los diferentes tratamientos en pruebas posteriores.

Con la prueba que se realizó se encontró que el marcar el hilo del frijol con color no afectaba la oviposición de la hembra sobre el éste (gráfica 3), dado que estadísticamente no se encontraron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre el control y los tratamientos.

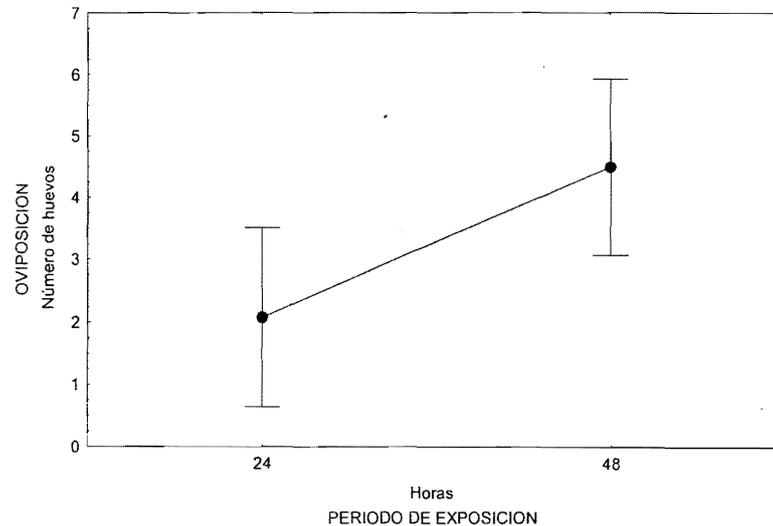
Al respecto, Teixeira y Zucoloto, 2003 refieren que aunque para muchos insectos tales como los polinizadores, los colores son importantes para la selección del hospedero, probablemente no lo son para *Zabrotes subfasciatus*.



Gráfica 3. Efecto del color en la oviposición

En cuanto al tiempo que tiene la hembra para depositar sus huevecillos sobre el frijol, se observa que existe una relación directamente proporcional (gráfica 4), dado que desde el inicio del experimento se observó que los insectos empezaron a ovipositar el primer día de estar en contacto con el frijol ( $p < 0.05$ ).

Además se ha encontrado que los resultados de trabajos realizados con diferentes tipos de frijol respecto al color no tienen efecto sobre la oviposición de *Z. subfasciatus*.<sup>(83)</sup>



Gráfica 4. Efecto del período de exposición del insecto en la oviposición para la prueba de color.

Aunque Rentería y Sánchez, 1997, sugieren que debe continuarse con los estudios de preferencia para determinar que factores intervienen en la selección que hace el insecto para ovipositar.

## **2.2 Efecto de la cubierta de quitosán de bajo PM en frijol sobre la oviposición de *Zabrotes subfasciatus*.**

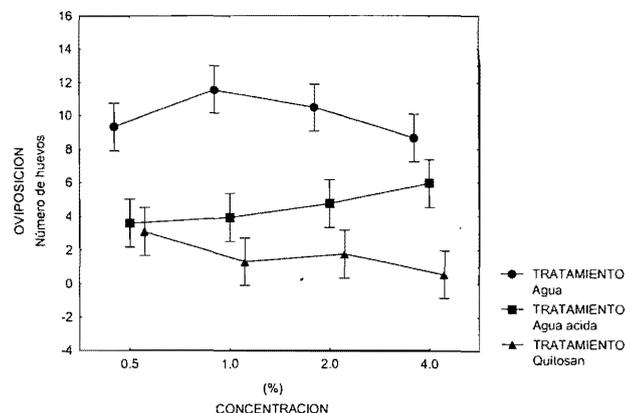
La disminución de la oviposición sobre el frijol cubierto con quitosán es el principal parámetro que puede definir la efectividad del quitosán como un método de control para *Z. subfasciatus*.

Los resultados obtenidos resaltan que el frijol recubierto con quitosán de bajo peso molecular al 4% presenta menor oviposición comparativamente con las concentraciones más bajas (gráfica 5). Así mismo se observa una disminución de la oviposición con respecto a los controles (agua y agua acidificada).

Según Teixeira 2003, este comportamiento puede ser debido a que la hembra determina la calidad y cantidad de alimento para poder ovipositar, siendo factores como el tamaño, textura y factores nutricionales los que influyen en la oviposición.

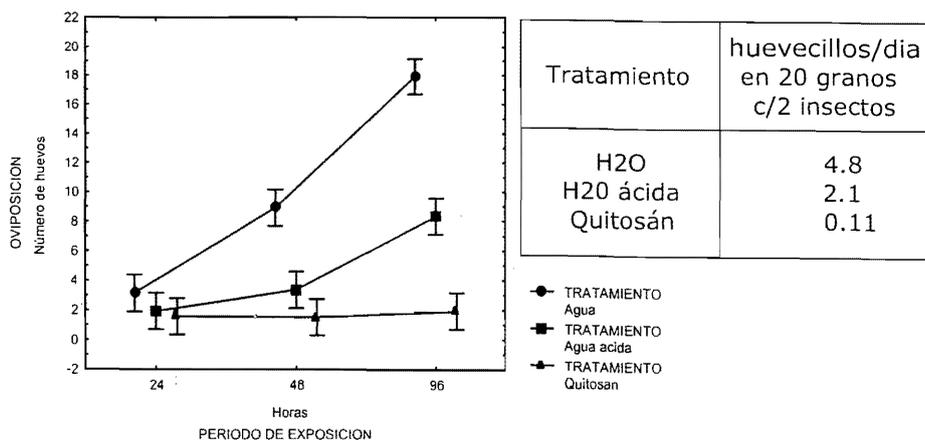
Davies 1991, menciona que los insectos por medio de receptores olfatorios perciben muchos olores y que prefieren; agua destilada, soluciones diluidas de ácidos, sales y azúcares, aunque rechazan soluciones más concentradas de ácidos, sales, ésteres alcoholes y aminoácidos, y probablemente esto disminuya la oviposición en los tratamientos con quitosán.

En la concentración de 0.5 no se observa el efecto del quitosán con respecto al de agua acidificada, sin embargo con forme aumenta la concentración de quitosán aumenta la significancia comprobando el efecto inhibitor de la oviposición a la concentración del 4.0 % ( $p < 0.05$ ).



Gráfica 5. Efecto de la cubierta del frijol con quitosán de bajo PM a diferentes concentraciones en la oviposición de *Zabrotes subfasciatus* Boh.

En cuanto al efecto de los períodos de exposición del insecto en la oviposición, los insectos que estuvieron en contacto con el frijol recubierto con quitosán durante 96 horas tuvieron una oviposición promedio mucho menor (gráfica 6). El frijol que no fue tratado con quitosán reportó mayor oviposición ( $p < 0.05$ ).



| Tratamiento | huevecillos/día en 20 granos c/2 insectos |
|-------------|---|
| H2O         | 4.8                                       |
| H2O ácida   | 2.1                                       |
| Quitosán    | 0.11                                      |

Gráfica 6. Efecto del período de exposición del insecto y los tratamientos en la oviposición de *Zabrotes subfasciatus* en frijol cubierto con quitosán de bajo PM

En la misma gráfica se muestra que la oviposición es directamente proporcional al período de exposición del insecto, únicamente en los tratamientos controles (agua y agua acidificada).

Bautista 1998, menciona que el período de oviposición dura de 3-4 días y la hembra oviposita el mayor número de huevecillos el tercer día.

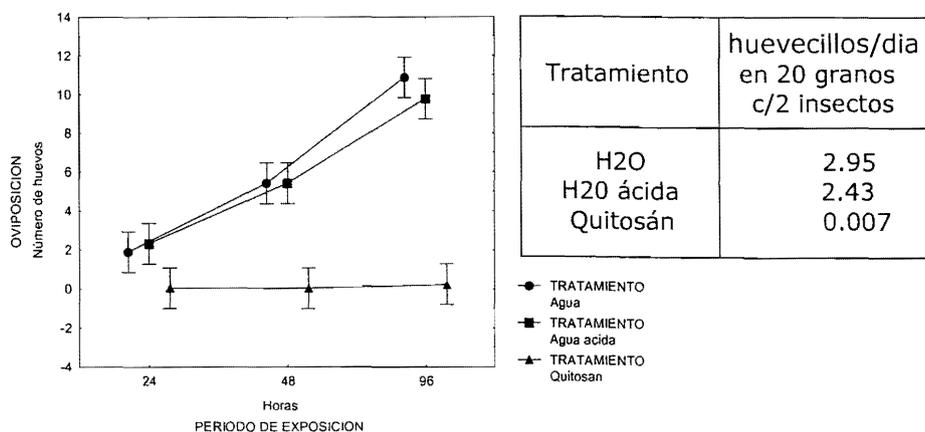
Utida 1967, ha reportado que la hembra inicia la oviposición poco después del apareamiento y que deposita cerca del 30-40% del total de huevecillos en el primer día después de aparearse. Aunque Dell'Orto menciona que le lleva tiempo tener madurez sexual. Y que entre más largo sea el período de exposición o contacto tanto con el macho como con el grano de frijol, la hembra puede ovipositar una mayor cantidad de huevecillos.

Realizando la linearización de los datos de la gráfica 6, se obtuvieron las respectivas pendientes de los tres tratamientos, las cuales representan la velocidad a la cual la hembra oviposita en promedio durante un período de exposición con 20 semillas y una pareja de insectos. (gráfica 6)

Como se puede observar en la gráfica 6 existe una clara disminución de huevecillos del tratamiento con quitosán con respecto a los controles (agua y agua ácida). Esta disminución de huevecillos/día en 20 granos de frijol con una pareja de insectos con respecto al quitosán corresponde al 97.71 % promedio.

**Efecto de la cubierta de quitosán de alto PM en frijol sobre la oviposición de *Zabrotes subfasciatus*.**

Como ya se mencionó anteriormente, la disminución de la oviposición define la efectividad del quitosán como un método de control para el insecto en cuestión.



Gráfica 7. Efecto del período de exposición del insecto y los tratamientos en la oviposición de *Zabrotes subfasciatus* en frijol cubierto con quitosán de alto PM.

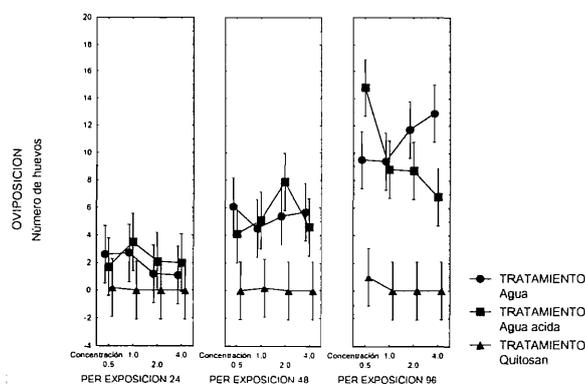
Para los tratamientos de agua y agua acidificada (controles) la oviposición es directamente proporcional al período de exposición. En los granos cubiertos con quitosán durante los tres períodos de exposición no hubo oviposición con respecto a los tratamientos control ( $p=0$ ) como se muestra en la gráfica 7.

De acuerdo a la metodología, se realizó la linearización de los datos de la gráfica 7 y se obtuvieron los siguientes resultados.

Existe una clara disminución de insectos en el tratamiento con quitosán de alto PM con respecto a los controles (agua y agua ácida), esta disminución de huevecillos/día en 20 granos de frijol con una pareja de insectos con respecto al quitosán corresponde al 99.76 %.

En la gráfica 8, se observa que los insectos no ovipositan en el grano de frijol que fué cubierto con el tratamiento de quitosán de alto PM en cualquiera de las concentraciones utilizadas e independientemente del período de exposición. Existe diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) entre los tratamientos control y el tiempo.

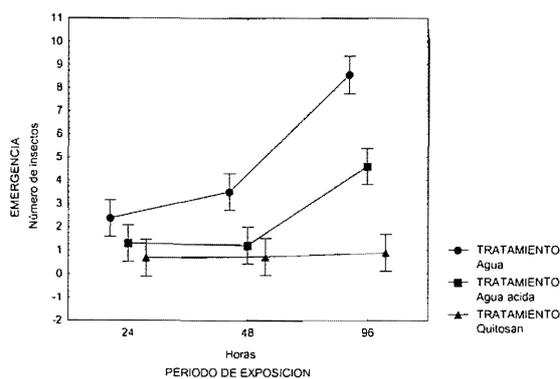
En los tratamientos control se puede observar que conforme aumenta el período de exposición de los insectos aumenta la oviposición en todas las concentraciones.



Gráfica 8. Efecto del período de exposición, la concentración y los tratamientos en la oviposición con frijol cubierto con quitosán de alto PM.

**Efecto de la cubierta de quitosán de bajo PM en frijol sobre la emergencia del insecto.**

Una vez realizada la cuantificación de huevecillos, las cajas que fueron infestadas se incubaron por 34 días (día en que emergió el primer insecto) a  $70 \pm 2$  % H.R y  $25 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2$   $^\circ\text{C}$ , para permitir el desarrollo de las larvas. Después de este período se cuantificaron los insectos que emergieron.



Gráfica 9. Efecto del período de exposición del insecto y los tratamientos en la emergencia en frijol cubierto con quitosán de bajo PM.

Dado que la emergencia del insecto es consecuencia de la oviposición, los resultados de emergencia se comportan de la misma manera que en la oviposición, existiendo diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) entre el período de exposición y los tratamientos control. (gráfica 9)

Esto probablemente se debió a que en los primeros muestreos los insectos tuvieron menos tiempo de exposición y por lo tanto menor oviposición.

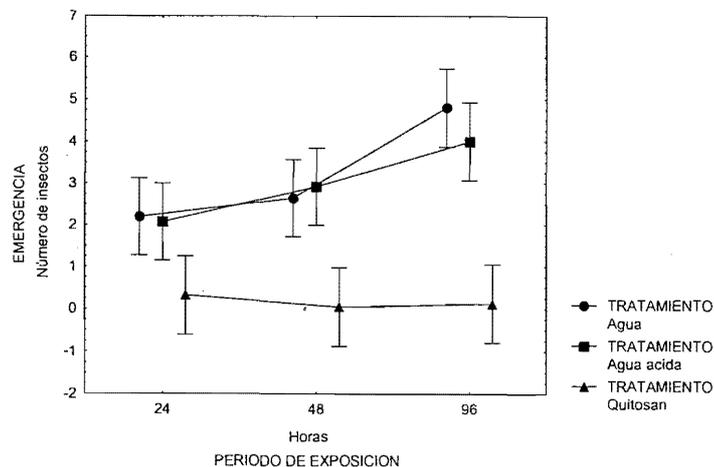
Conforme transcurrió el período de exposición, los últimos muestreos estuvieron más expuestos a los tratamientos por lo que aumentó la oviposición.

Los granos de frijol tratados con quitosán durante 96 horas tuvieron una emergencia promedio mucho menor que aquellas que no fueron tratados con quitosán ( $p < 0.05$ ) como se muestra en la gráfica 9.

En un estudio realizado por Utida 1967, se encontró que el número de huevecillos depositados en frijol era igual al número de gorgojos que emergían y que esto dependía de que los huevecillos hayan sido depositados en agrupaciones o dispersos.

#### **Efecto de la cubierta de quitosán de alto PM en frijol sobre la emergencia del insecto.**

Es importante recordar que la emergencia del insecto esta directamente relacionada con el número de huevecillos colocados por la hembra, por lo que este análisis se comporta de la misma manera que en la oviposición.



Gráfica 10. Efecto del período de exposición y los tratamientos en la emergencia en frijol cubierto con quitosán de alto PM.

El análisis estadístico de los datos de emergencia del insecto a alto PM sigue el mismo comportamiento que la oviposición como se puede apreciar en la gráfica 10. Así mismo se observa que existe una marcada significancia entre los controles y el tratamiento de quitosán a los tres períodos de exposición.

En la misma gráfica es claro que a las 96 horas no hubo emergencia en los granos de frijol cubiertos con quitosán y que en los controles emergieron menos insectos de los que se reportan como ovipositados en la gráfica 7.

Estudios realizados por Rentería 1994, reportan que existe una alta mortalidad durante el primer estadio larval utilizando genotipos de frijol debido a la dureza de la cubierta de la semilla, ya que según Thiery 1982, esta característica influye en la capacidad de la larva para penetrar al grano.

De acuerdo a lo anterior, posiblemente la nula emergencia en el tratamiento del quitosán sea debida a que la cubierta actúa como una capa con una dureza tal que impide que la larva penetre al grano y por consecuencia emerja.

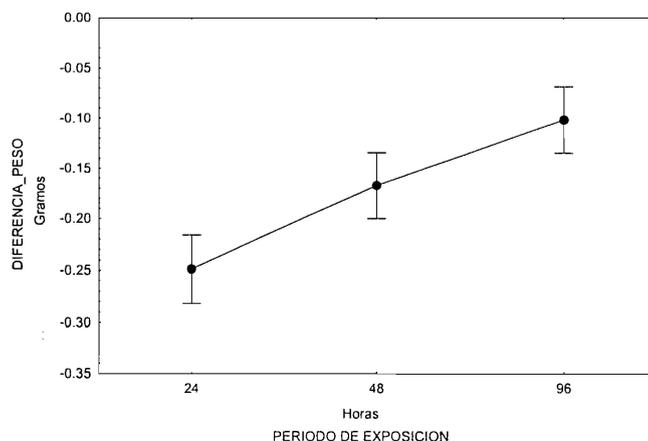
**2.2.1 Diferencia de peso del frijol cubierto con quitosán de bajo PM.**

Una vez realizada la cuantificación de los insectos y al observar que ya no había emergencia de insectos, se pesó el contenido de las cajas registrando el peso final de los granos.

Se calculó la diferencia de peso con los datos iniciales y finales de las muestras. La diferencia de peso se puede interpretar como el daño causado al grano debido al ataque del insecto y posteriormente al desarrollo de larvas y emergencia de los mismos.

De acuerdo a los resultados de oviposición y emergencia, entre mayor fue el período de exposición de los insectos mayor fue la cantidad de huevecillos (esto en los tratamientos controles) y por lo tanto mayor daño y mayor diferencia de peso.

La diferencia de peso con respecto al período de exposición tiene una marcada diferencia significativa ( $p=0$ ); gráfica 11.



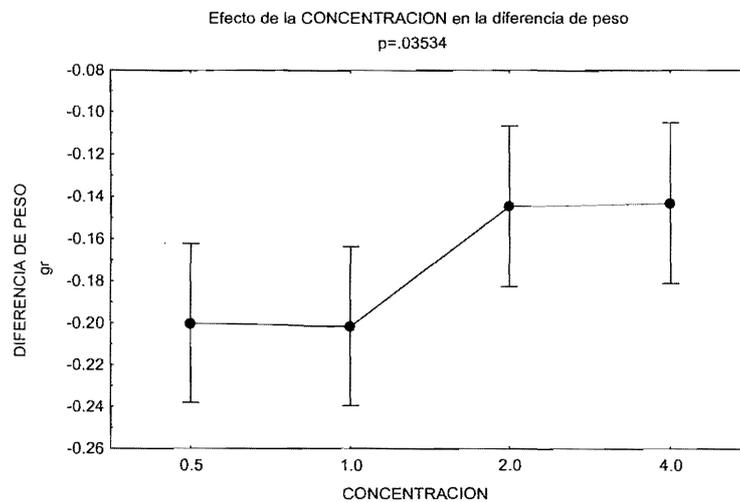
Gráfica 11. Efecto del período de exposición del insecto en la diferencia de peso del frijol cubierto con quitosán de bajo PM.

En la gráfica 11 se muestra que a medida que transcurre el período de exposición, aumenta la diferencia de peso. Sin embargo García 2004, reporto que el hecho de que existan diferencias de peso negativas, podría ser debido a la naturaleza higroscópica del grano, es decir, que su contenido de humedad varía de acuerdo a las condiciones de temperatura y humedad relativa del medio ambiente donde se encuentran.

Las condiciones a las que mantuvo el experimento fueron ( $70 \pm 2$  % H.R y  $25 \pm 2$  °C) siendo estas favorables para el desarrollo de los insectos; aunque estas condiciones no suelen ser las mismas que para el almacenamiento del grano.

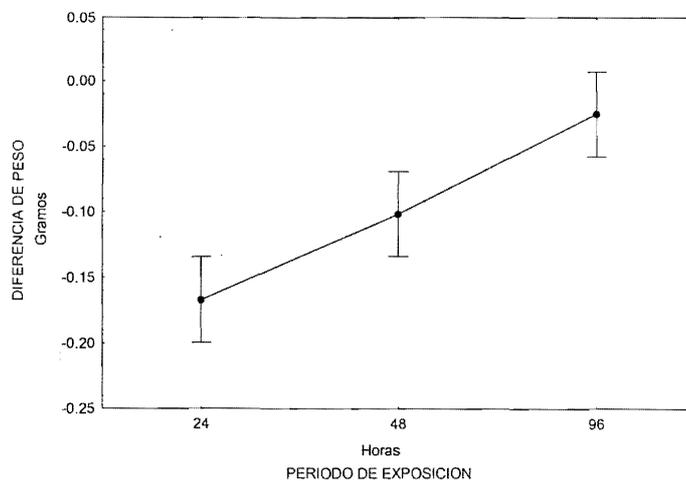
En la gráfica 12, se observa que a medida que se incrementa la concentración de quitosán, aumenta la diferencia de peso del grano teniendo una significancia menor de 0.05.

El quitosán en cubierta posee la propiedad de ser hidrofílico según las condiciones ambientales en las que se encuentre llegando a un equilibrio tanto en la parte cubriente como en el exterior; esta propiedad podría ser la razón de que los pesos finales fueran mayores y por lo tanto arrojara una diferencia de peso negativa. Dado que en este caso el grano ganó humedad (absorción).



Gráfica 12. Efecto de la concentración de la cubierta de quitosán de bajo PM sobre la diferencia de peso.

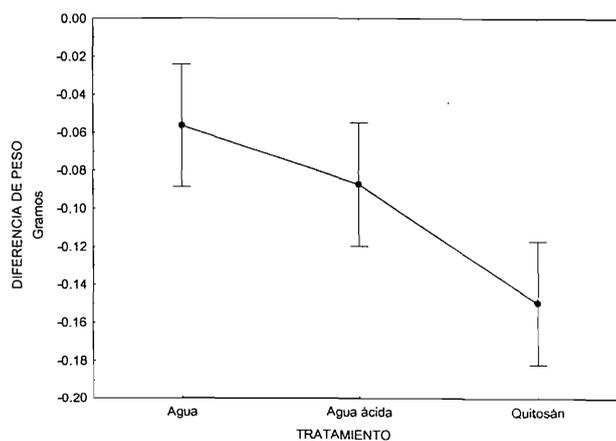
**Diferencia de peso en frijol cubierto con quitosán de alto PM**



Gráfica 13. Efecto del período de exposición del insecto en la diferencia de peso del frijol cubierto con quitosán de alto PM

La gráfica 13 muestra diferencia significativa entre la diferencia de peso con respecto al período de exposición ( $p=0$ ).

Al igual que en la gráfica de diferencia de peso de frijol cubierto con quitosán de bajo PM (gráfica 11), en la gráfica 13 se muestra que a medida que transcurre el período de exposición, aumenta la diferencia de peso. Y como ya se menciona la causa de que la diferencia de peso sean valores negativos pudiera ser debido a lo reportado por García 2004.



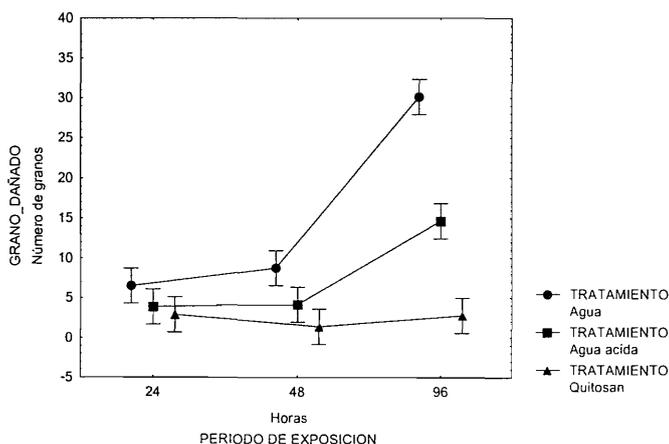
Gráfica 14. Efecto del tratamiento en la diferencia de peso del frijol cubierto con quitosán de alto PM

En la gráfica 14, se observa diferencia significativa entre la diferencia de peso y los tratamientos ( $p=0$ ). Y que el tratamiento de quitosán en la diferencia de peso es mayor con respecto a los tratamientos controles.

Como ya se explicó esto se puede deber a la naturaleza giroscópica del grano y a la propiedad del quitosán en cubierta de ser hidrofílico, en donde el grano gana humedad.

**2.2.2 Porcentaje de grano dañado cubierto con quitosán de bajo PM.**

En la gráfica 15 se puede observar que a 24 horas existe una mínima diferencia significativa entre los tratamientos. Sin embargo, a medida que transcurre el período de exposición se hace visible una marcada significancia ( $p=0$ ) demostrando que el quitosán reduce el porcentaje de grano dañado causado por el insecto a las 96 horas con respecto a los controles.

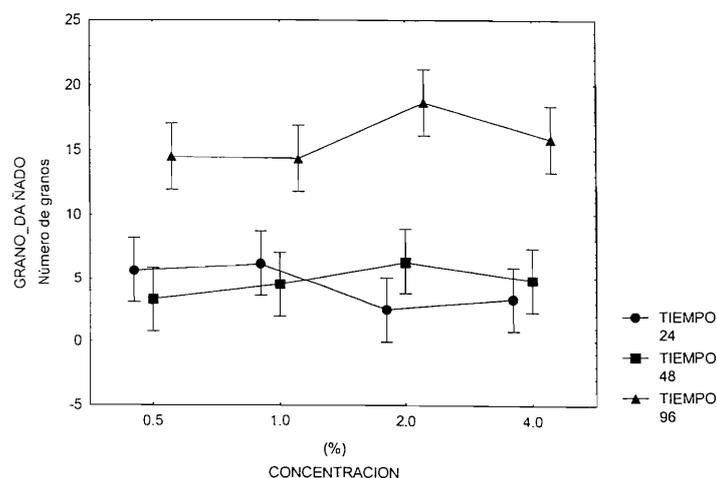


Gráfica 15. Efecto del período de exposición y los tratamientos en grano dañado cubierto con quitosán de bajo PM

Los resultados del porcentaje de grano dañado se comportaron de la misma manera que en la emergencia ya que al realizarse la cuantificación del total del grano de frijol dañado y sano, el porcentaje fue el resultado de la emergencia de los insectos al perforar el grano y por la presencia de cavernas pupales donde el adulto no llegó a emerger.

Tyler y Evans, mencionan que los brúquidos pueden consumir más del 50% del peso de la semilla a la cual degradan y por consiguiente reducen su valor alimenticio y comercial.

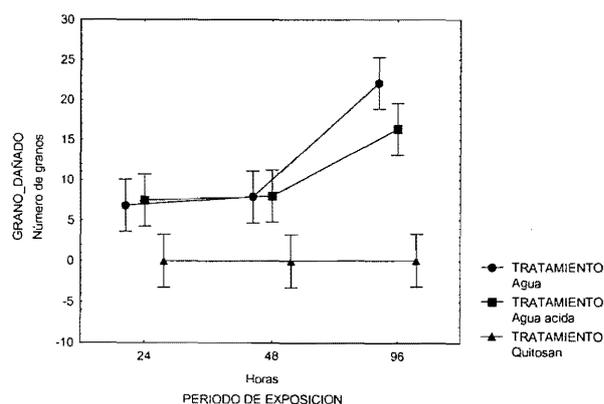
En cuanto al efecto del período de exposición y las concentraciones de quitosán en el grano dañado (gráfica 16), durante las primeras 48 horas no se observa ninguna significancia para cualquiera de las concentraciones, sin embargo a las 96 horas se ve una marcada significancia habiendo la mayor cantidad de grano dañado a la concentración del 2.0 por ciento.



Gráfica 16. Efecto del período de exposición y la concentración en grano dañado cubierto con quitosán de bajo PM.

**Porcentaje de grano dañado cubierto con quitosán de alto PM.**

Como ya se mencionó, el porcentaje de grano dañado se comporta de igual manera que la emergencia de los insectos, ya que el daño está relacionado a la emergencia, puesto que por cada insecto que emerge o que pupa (etapa en la cual la larva forma la ventana por donde saldrá el adulto) se daña el grano.



Gráfica 17. Efecto del período de exposición y los tratamientos en grano dañado cubierto con quitosán de alto PM.

Garduño 1994, reportó que cuando se utilizan temperaturas por debajo de los -5 °C por períodos de tiempo de 60 a 90 minutos, el porcentaje de grano dañado disminuye hasta en un 80% con este método.

Barahona 1994, reporta que el nivel de daño considerado como parámetro es del 4 %. De acuerdo con lo anterior el frijol cubierto con quitosán de bajo y alto peso molecular a cualquier concentración y en ninguno de los períodos de exposición, no sobrepasa el 4 %.

Arias 1994, reporta que con el uso insecticidas comerciales como el pirimifós metil y el fosfuro de aluminio, el porcentaje de grano dañado es del 3.29, 2.34 % respectivamente, dicho método también cumple con la norma.

Schoonhoven 1985, menciona que el control más frecuente de este insecto es por medio de aplicaciones de insecticidas, que aunque a mediano y largo plazo presentan grandes desventajas: intoxicación, contaminación, especies resistentes, etc.

Para evitar tales riesgos el quitosán como alternativa de control disminuye la oviposición evitando la proliferación de la plaga y reduciendo el porcentaje de grano dañado dando mejor calidad al grano de frijol para su comercialización y consumo.

**3. Efecto de la actividad antifúngica del quitosán en hongos de campo y almacén.**

Es importante resaltar que este trabajo se realizó como una alternativa de control de hongos como agentes causantes de enfermedades en los cultivos y en el almacenamiento de granos y semillas, provocando grandes pérdidas económicas.

Para evaluar la actividad antifúngica se determinó el porcentaje de inhibición de acuerdo a los datos experimentales obtenidos del crecimiento radial de la colonia del hongo y al procedimiento descrito en la metodología.

En la tabla 2 se reportan los porcentajes de inhibición encontrados para hongos de campo y almacén, que se obtuvieron en el medio de cultivo de MSA y PDA preparado con quitosán a diferentes concentraciones (0,5, 1.0 y 2.0%) y tres pesos moleculares (52,000, 136,000 y 231,000 g/mol).

Tabla 2. Resultados obtenidos del porcentaje de inhibición de hongos de campo y almacén en tres diferentes concentraciones de quitosán y tres pesos moleculares durante un período de 9 días de incubación a una temperatura de 25 °C.

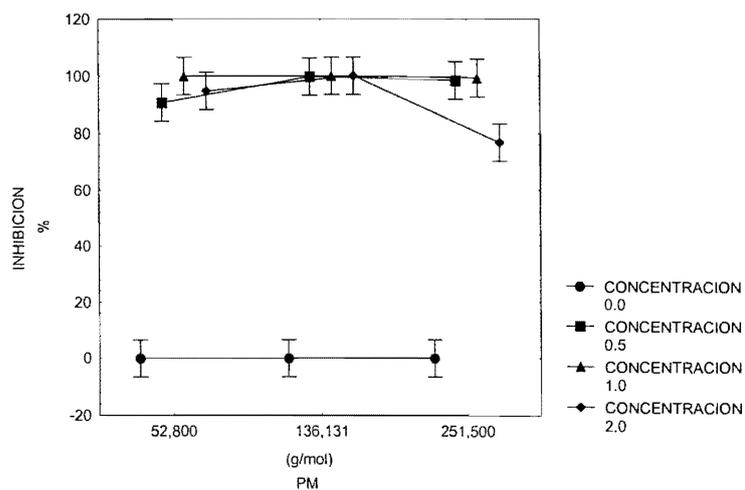
| <b>HONGOS DE CAMPO</b> |                             |            |            |                           |            |            |                           |     |            |
|------------------------|-----------------------------|------------|------------|---------------------------|------------|------------|---------------------------|-----|------------|
| <b>% de Inhibición</b> |                             |            |            |                           |            |            |                           |     |            |
|                        | <i>Alternaria alternata</i> |            |            | <i>Fusarium oxysporum</i> |            |            | <i>Rhizoctonia solani</i> |     |            |
|                        | 0.5                         | 1.0        | 2.0        | 0.5                       | 1.0        | 2.0        | 0.5                       | 1.0 | 2.0        |
| [QN]<br>PM             |                             |            |            |                           |            |            |                           |     |            |
| 52.800                 | 88                          | <b>100</b> | 92         | 58                        | <b>100</b> | 86         | 88                        | 82  | 64         |
| 136.131                | 99                          | <b>100</b> | <b>100</b> | 72                        | 80         | <b>100</b> | 68                        | 74  | <b>100</b> |
| 521.500                | 95                          | 99         | 74         | 65                        | 52         | 54         | 85                        | 54  | 46         |

| HONGOS DE ALMACEN |                           |     |     |                                |     |     |                             |     |     |
|-------------------|---------------------------|-----|-----|--------------------------------|-----|-----|-----------------------------|-----|-----|
| % de inhibición   |                           |     |     |                                |     |     |                             |     |     |
|                   | <i>Aspergillus flavus</i> |     |     | <i>Aspergillus chevalierii</i> |     |     | <i>Aspergillus nidulans</i> |     |     |
| [QN]<br>PM        | 0.5                       | 1.0 | 2.0 | 0.5                            | 1.0 | 2.0 | 0.5                         | 1.0 | 2.0 |
| 52.800            | 100                       | 25  | 100 | 77                             | 67  | 46  | 100                         | 12  | 100 |
| 136.131           | 68                        | 36  | 100 | 80                             | 47  | 100 | 74                          | 59  | 100 |
| 521.500           | 75                        | 42  | 100 | 70                             | 37  | 100 | 59                          | 18  | 100 |

[QN]: Concentración de quitosán; PM; Peso molecular

## HONGOS DE CAMPO

### *Alternaria alternata*



Gráfica 18. Efecto del peso molecular y concentración de quitosán sobre el porcentaje de inhibición del hongo *Alternaria alternata*.

En la gráfica 18 se muestran que los valores del porcentaje de inhibición del hongo *Alternaria alternata* los cuales fueron significativamente altos ( $p < 0.005$ ) con respecto al control.

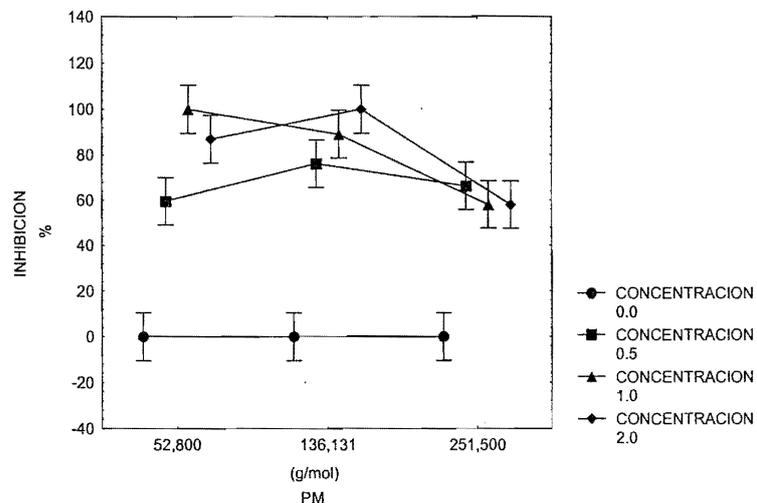
Para el peso molecular de 52,800 g/mol el comportamiento del porcentaje de inhibición para el hongo de *Alternaria alternata* fue muy cercano al 100%, sin embargo este valor solo lo presenta la concentración de 1.0%, disminuyendo en los pesos moleculares de los extremos (52,800 y 251,500 g/mol) presentando un efecto campana.

También se encontró que para el peso molecular de 136,131 g/mol (medio) la inhibición del quitosán fue del 100 por ciento para todas las concentraciones probadas en este experimento (0.5, 1.0 y 2.0%). En dicha gráfica se observa que a peso molecular de 251,500 g/mol (alto) el efecto para las concentraciones de 0.5 y 1.0 % fue del 100 por ciento. El porcentaje de inhibición se redujo a un 80% para la concentración del 2.0%.

Bhaskara R. 1999 y otros, también reportaron que el quitosán a la concentración del 0.5% inhibió el crecimiento y la producción de toxinas por *Alternaria alternata Lycopersici in-vitro*.

Sin embargo no determinan el peso molecular y se sabe que la actividad antifúngica depende de este.

***Fusarium oxysporum***



Gráfica 19. Efecto del peso molecular y la concentración de quitosán sobre el porcentaje de inhibición del hongo *Fusarium oxysporum*.

El uso de quitosán a concentraciones de 0.5, 1.0, y 2.0% inhibió el crecimiento del hongo *Fusarium oxysporum*, a más del 50%. Encontrando estadísticamente una alta significancia ( $p < 0.05$ ).

La gráfica 19 muestra que al peso molecular de 52,800 g/mol hay un cien por ciento de inhibición solo para la concentración del 1.0 %, en el caso de las concentraciones de 0.5 y 2.0 % el porcentaje de inhibición se ve reducido hasta el 70 % y 90 % respectivamente.

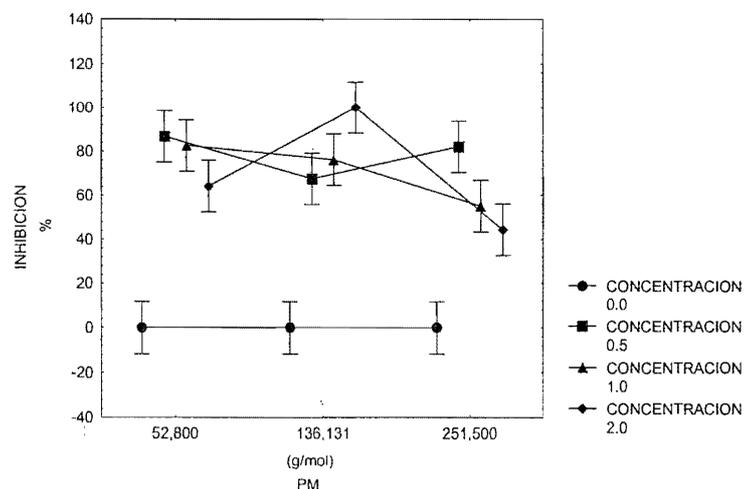
Para el peso molecular medio (136,131 g/mol) se puede observar que a medida que se incrementa la concentración de quitosán el porcentaje de inhibición del hongo aumenta, obteniendo un cien por ciento de inhibición solo para la concentración del 2.0 %.

Por el contrario en el peso molecular de 251,500 g/mol conforme aumenta la concentración de quitosán el porcentaje de inhibición disminuye, obteniendo el mayor porcentaje de inhibición para la concentración de 0.5 %.

Bhaskara y otros 1999, encontraron que el tratamiento con quitosán al 0.2% en semillas de trigo controló en un 75% la infección por *Fusarium graminearum*.

Muzzarelli 2001, reportó que el quitosán redujo la putrefacción de la corona de tomate ocasionada por *Fusarium*

***Rhizoctonia solani***



Gráfica 20. Efecto del peso molecular y concentración de quitosán sobre el porcentaje de inhibición del hongo *Rhizoctonia solani*.

En la gráfica 20 se muestra el porcentaje de inhibición del quitosán sobre el crecimiento de *Rhizoctonia solani*.

Para el peso molecular de 52,800 g/mol el porcentaje de inhibición es inversamente proporcional a la concentración, sin obtener inhibición total en ninguna de las concentraciones; siendo el mayor porcentaje de inhibición de noventa por ciento para las concentraciones de 0.5 y 1.0 por ciento.

Para el peso molecular de 136,131 g/mol aumenta la inhibición de dicho hongo a medida que se incrementa la concentración de quitosán, obteniendo una inhibición total para la concentración del 2.0 por ciento.

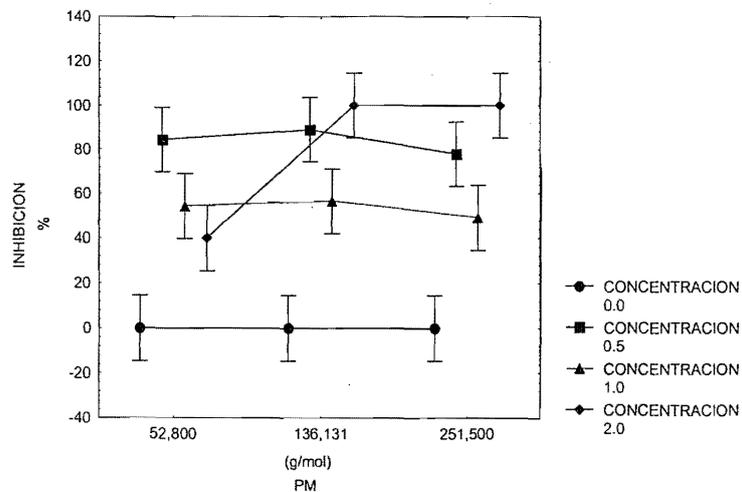
También se puede observar que para el peso molecular de 251,500 g/mol, se tiene el mismo efecto que en el peso molecular bajo 52,800 g/mol, y se reduce hasta el 80 por ciento para la concentración de 0.5 por ciento.

Es importante señalar que para la concentración del 2.0 por ciento en el peso molecular de 136,131 g/mol resulta ser la única donde se obtuvo una inhibición total y que este efecto se ve reducido en los pesos moleculares de los extremos ( 0.5 y 2.0 %) donde se observa un efecto campana.

Rabea y otros 2003, mencionan que el quitosán demostró tener efecto fungicida contra *Rhizoctonia solani* a una mínima concentración inhibitoria al 0.1 % con quitosán nativo.

**Hongos de Almacén**

*Aspergillus flavus*



Gráfica 21. Efecto del peso molecular y concentración de quitosán sobre el porcentaje de inhibición del hongo *Aspergillus Flavus*.

En la gráfica 21 se observa que a un peso molecular de 52,800 g/mol, conforme aumenta la concentración disminuye el porcentaje de inhibición, no obstante el peso molecular de 136,131 g/mol no se comportó de la misma forma, siendo que en la concentración del 2.0 por ciento se obtuvo el cien por ciento de inhibición y en la concentración del uno por ciento el menor porcentaje de inhibición para dicho peso molecular.

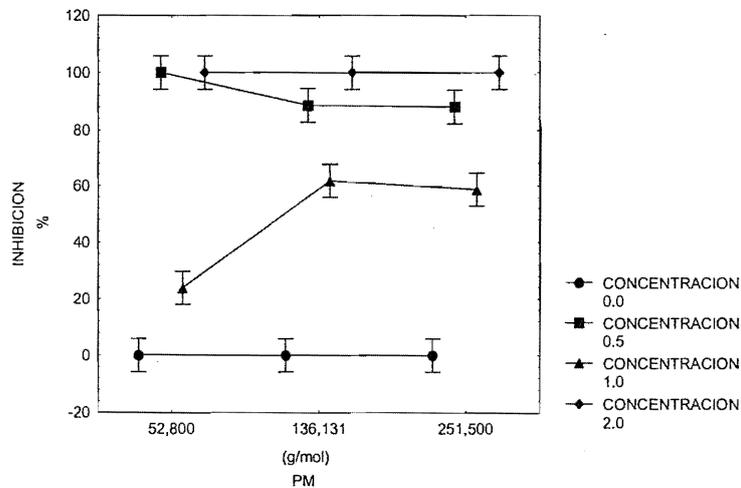
Por otro lado el comportamiento del peso molecular de 251,500 g/mol es muy semejante al peso molecular ya descrito anteriormente.

Rabea y otros 2003, reportan que el hongo *Aspergillus flavus* fue completamente inhibido durante el crecimiento de maíz en el campo así como en cacahuete.

Es importante mencionar que el quitosán a una concentración del dos por ciento a los pesos moleculares de 136,131 y 251,500 g/mol inhibió al cien por ciento al hongo de *A. flavus* en un período de 9 días.

Bhaskara y otros 1999, señalaron que el quitosán inhibió el crecimiento de *A. flavus* y la producción de aflatoxina en cultivo líquido en maíz precosechado y cacahuete.

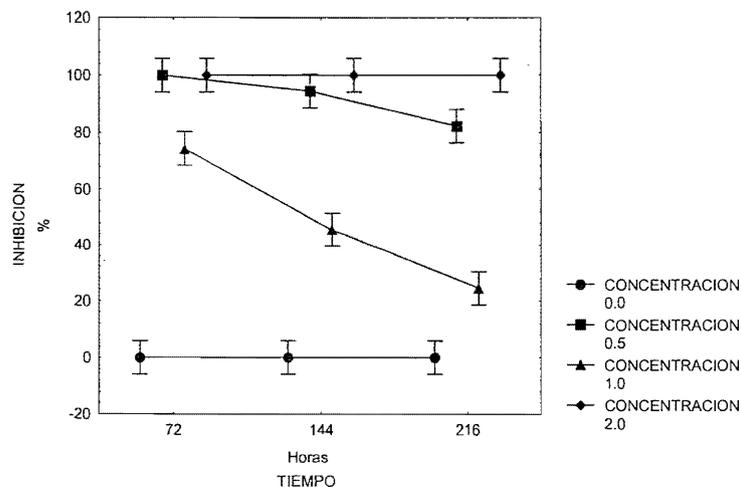
***Aspergillus chevalierii***



Gráfica 22. Efecto del peso molecular y concentración de quitosán sobre el porcentaje de inhibición del hongo *Aspergillus chevalierii*.

En la gráfica 22, en el peso molecular de 52.800 g/mol, se observó que a las concentraciones de 0.5 y 2.0 % existe una inhibición total, sin embargo el porcentaje de inhibición se ve reducido a la concentración del 1 %. En los pesos moleculares de 136.131 y 251.500 g/mol, aumento el porcentaje de inhibición y siguió siendo menor con respecto a las concentraciones de 0.5 y 2.0 %.

Es de importancia señalar que para la concentración del 2 % se encontró en este trabajo que en cualquier peso molecular la inhibición es total. Para la concentración de 0.5 el porcentaje de inhibición decrece conforme el peso molecular aumenta y en la concentración del 1.0 % fue la que presentó menor inhibición para este hongo.



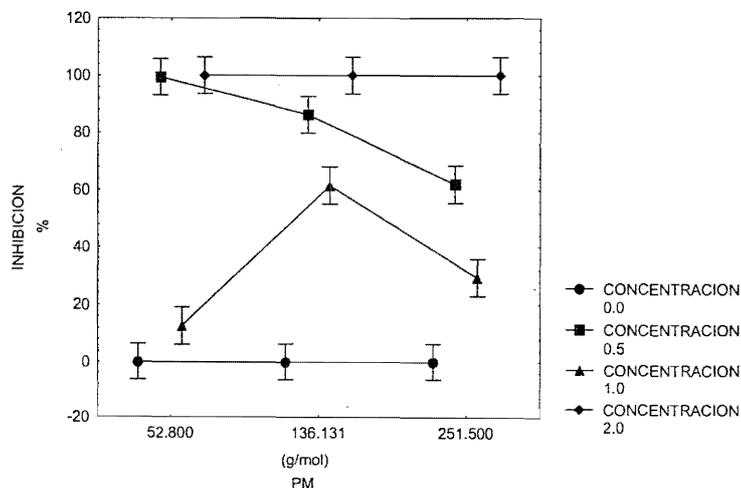
Gráfica 23. Efecto del tiempo y concentración de quitosán sobre el porcentaje de inhibición del hongo *Aspergillus chevalierii*.

Con respecto al tiempo se observó en la gráfica 23 que para la concentración de 0.5 %, el porcentaje de inhibición es inversamente proporcional al tiempo.

Lo mismo pasa para la concentración del 1 % por lo que su efecto es fungistático hasta los nueve días de incubación a las condiciones manejadas en este trabajo.

Para la concentración del 2.0 % el tiempo no tiene ningún efecto, por lo que se puede decir que el efecto del quitosán es fungicida a las condiciones ya mencionadas.

***Aspergillus nidulans***

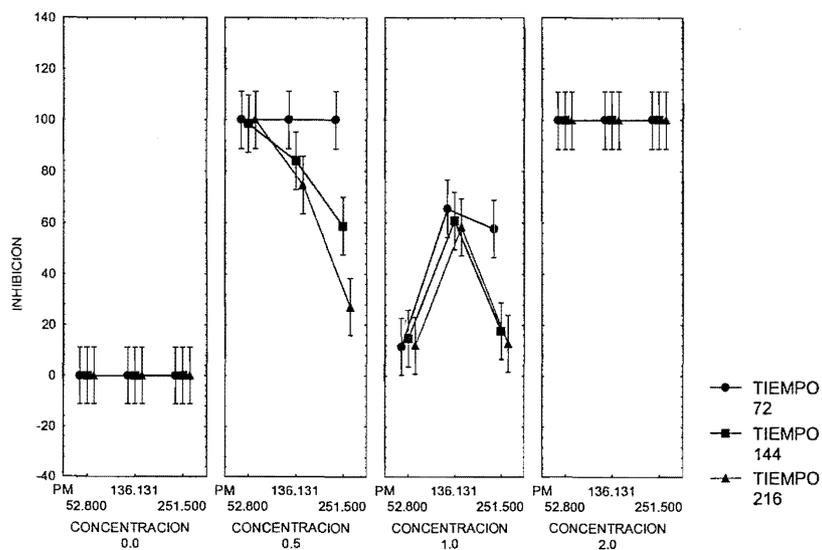


Gráfica 24. Efecto del peso molecular y la concentración de quitosán sobre el porcentaje de inhibición del hongo *Aspergillus nidulans*.

En la gráfica 24 se observó que a un peso molecular de 52.800 g/mol existe una inhibición total para las concentraciones de 0.5 y 2.0 %. También se encontró significancia para la concentración del 1.0 % y se notó una disminución en el porcentaje de inhibición.

En el peso molecular de 136.131 g/mol en la concentración de 2.0 % se observó una inhibición total y está disminuyó conforme aumentó la concentración.

En el caso de peso molecular de 251.500 g/mol se comportó de la misma forma que en el peso molecular del caso anterior.



Gráfica 25. Efecto del peso molecular, tiempo y concentración de quitosán sobre el porcentaje de inhibición del hongo *Aspergillus nidulans*.

En la gráfica 25 se observó que para las concentraciones del 2.0 % cualquier tiempo y peso molecular inhibe el crecimiento de *Aspergillus nidulans* en un 100 %.

Sin embargo para la concentración de 0.5 % la inhibición es inversamente proporcional al peso molecular y al tiempo.

Por otro lado, para la concentración del 1.0 % el efecto del peso molecular es el factor que tiene mayor peso en el análisis ya que a un peso molecular medio 136.131 g/mol se obtiene el 70 % de inhibición y este se ve reducido hasta un 20 % en los pesos moleculares de los extremos observando también un efecto tipo campana.

Rabea 2003, ha reportado que varias especies de *Aspergillus* son inhibidas por quitosán, entre las cuales se encuentra el *A. niger* que fue inhibido por la adición de quitosán al medio en una concentración de 0.1- 5 mg/ml.

En estudios similares el Rabea 2003, encontró que el quitosán redujo la producción de aflatoxinas en otras especies de *Aspergillus* tales como *parasiticus* y *flavus* en más del 90%, mientras el crecimiento del hongo se redujo a menos de la mitad.

Referente a las características macromorfológicas de hongos de campo y almacén estas se reportan en la tabla 3.

Tabla 3. Descripción de la macromorfología de los hongos de campo y almacén tratados con quitosán con diferentes pesos moleculares y concentraciones.

| Hongo                           | PM<br>(g/mol) | [QN]<br>(%) | Macromorfología   |
|---------------------------------|---------------|-------------|---|
| <i>Alternaria<br/>alternata</i> |               | 0.0         | Micelio afelpado de coloración verde olivo mismo que se torna de color negrusco resultado de una abundante esporulación. Crecimiento radial en forma de anillos concéntricos que cubren toda la superficie del medio de cultivo |

**CAPÍTULO VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

|                           |                              |     |   |
|---------------------------|------------------------------|-----|---|
|                           | 52,800                       | 0.5 | Micelio escaso, esférico al inicio y posteriormente poco crecimiento  |
|                           | 136,131                      |     | Se inhibe el crecimiento  |
|                           | 251,500                      |     | Micelio escaso, esférico al inicio y posteriormente poco crecimiento  |
|                           | 52,800<br>136,131            | 1.0 | Se inhibe el crecimiento  |
|                           | 251,500                      |     | Micelio con crecimiento escaso esférico   |
|                           | 52,800<br>136,131<br>251,500 | 2.0 | Se inhibe el crecimiento  |
| <i>Rhizoctonia solani</i> |                              | 0.0 | Micelio algodonoso de color blanco (cremoso al reverso del medio de cultivo). Crecimiento radial que ocupa las $\frac{3}{4}$ partes de la superficie del medio de cultivo a los 9 días. |
|                           | 52,800                       | 0.5 | Escaso micelio de crecimiento esférico algodonoso, contorno de color ámbar  |
|                           | 136,131<br>251,500           |     | Escaso micelio de crecimiento esférico algodonoso   |
|                           | 52,800<br>136,131            | 1.0 | Micelio con crecimiento escaso esférico.  |
|                           | 251,500                      |     | Micelio crecimiento escaso esférico contorno de color ámbar   |
|                           | 52,800<br>136,131            | 2.0 | Se inhibe el crecimiento.   |
|                           | 251,500                      |     | Micelio de muy poco crecimiento escaso esférico.  |

**CAPÍTULO VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

|                           |                              |     |  |
|---------------------------|------------------------------|-----|--|
| <i>Fusarium oxysporum</i> |                              | 0.0 | Micelio hialino algodonoso y de crecimiento radial con coloración blanquecina con fondo amarillo cremoso. Conforme envejece el micelio tiende a tornarse amarillento. Su crecimiento ocupa toda la superficie del medio de cultivo a los 9 días. |
|                           | 52,800<br>136,131<br>251,500 | 0.5 | Micelio con crecimiento moderado inicialmente, esférico y posteriormente radial.   |
|                           | 52,800<br>136,131            | 1.0 | Se inhibe el crecimiento   |
|                           | 251,500                      |     | Micelio crecimiento moderado radial.   |
|                           | 52,800                       | 2.0 | Micelio crecimiento escaso esférico  |
|                           | 136,131                      |     | Se inhibe el crecimiento   |
|                           | 251,500                      |     | Micelio con muy poco crecimiento esférico  |
| <i>A. flavus</i>          |                              | 0.0 | Micelio polvoso, borde filamentosos  |
|                           | 52.800<br>136.131<br>251.500 | 0.5 | Micelio algodonoso, borde filamentosos de entre 0.8 y 1.0 cm, centro con desarrollo de cabezuelas  |
|                           | 52.800                       | 1.0 | Micelio algodonoso en el centro y polvoso hacia el borde   |
|                           | 136.131<br>251.500           |     | Micelio algodonoso, borde filamentosos aéreo de entre 0.5 cm , centro con desarrollo de cabezuelas   |
|                           | 52.800                       | 2.0 | Micelio algodonoso en el centro y polvoso hacia el borde   |
|                           | 136.131<br>251.500           |     | Se inhibe el crecimiento   |

**CAPÍTULO VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

|                       |                              |     |   |
|-----------------------|------------------------------|-----|---|
| <i>A. chevalierii</i> |                              | 0.0 | Crecimiento con micelio algodonoso con micelio aéreo, cabezuelas de color marrón con hifas de color verde seco y borde de color amarillo intenso  |
|                       | 52.800                       |     | Se inhibe el crecimiento  |
|                       | 136.131                      | 0.5 | Micelio algodonoso cabezuelas de color café claro con borde de color amarillo y blanco  |
|                       | 251.500                      |     | Micelio no algodonoso, cabezuela de color café claro con borde de color amarillo y blanco   |
|                       | 52.800                       | 1.0 | Micelio algodonoso, cabezuelas de color café y borde amarillo claro   |
|                       | 136.131<br>251.500           |     | Micelio algodonoso, cabezuelas de color café oscuro, borde en forma de anillos de color marrón, amarillo y blanco   |
|                       | 52.800<br>136.131<br>251.500 | 2.0 | Se inhibe el crecimiento  |
| <i>A. nidulans</i>    |                              | 0.0 | Crecimiento con divisiones radiales irregulares poco definidos alternando la fase asexual con la sexual la fase asexual se observa un micelio seco y la fase sexual un micelio algodonoso   |
|                       | 52.800                       |     | Se inhibe el crecimiento  |
|                       | 136.131                      | 0.5 | Crecimiento radial con micelio algodonoso en la cabezuela de la colonia cubierto de hifas aéreas, se observa liberación de pigmentos de color ambar claro y marrón  |
|                       | 251.500                      |     | Crecimiento radial con micelio algodonoso en la cabezuela de la colonia con hifas aéreas en el margen de la colonia   |
|                       | 52.800                       | 1.0 | Crecimiento con divisiones radiales regulares bien definidas alternando la fase asexual con la sexual observándose en la fase asexual un micelio seco y en la sexual un micelio granular al margen de la colonia se observa liberación de pigmentos de color marrón |

|  |                              |     |   |
|--|------------------------------|-----|---|
|  | 136.131                      |     | Crecimiento radial con micelio algodonoso en la cabezuela de la colonia cubierto de hifas aéreas, se observa liberación de pigmentos de color ámbar claro y marrón                                  |
|  | 251.500                      |     | Crecimiento con divisiones radiales irregulares poco definidos alternando la fase asexual con la sexual la fase asexual predominando esta última, se observa liberación de pigmento de color marrón |
|  | 52.800<br>136.131<br>251.500 | 2.0 | Se inhibe el crecimiento  |

### **Efecto fungicida o fungistático**

Una vez terminado el experimento de las cajas inoculadas en los tratamientos de quitosán, se seleccionaron solo aquellas donde no se observó crecimiento de la colonia y se transfirió un inóculo a cajas con medio de cultivo PDA y MSA para hongos de almacén y campo respectivamente, incubándose por 9 días. Se utilizó el siguiente criterio para interpretar los resultados: Cajas con crecimiento radial, el quitosán tuvo un efecto fungistático, y cajas sin crecimiento radial, el quitosán tuvo un efecto fungicida.

Tabla 4. Efecto del quitosán en los hongos de campo y almacén en cultivos secundarios.

| <b>Hongo</b>                | <b>PM (g/mol)</b> | <b>[QN] (%)</b> | <b>Efecto Fungicida o Fungistático</b> |
|-----------------------------|-------------------|-----------------|--|
| <i>Alternaria alternata</i> | 52,800            | 0.5             | Fungistático                           |
|                             |                   | <b>1.0</b>      | <b>Fungicida</b>                       |
|                             |                   | 2.0             | Fungistático                           |
|                             | 136,131           | 0.5             | Fungistático                           |

**CAPÍTULO VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

|                           |                    |                  |                  |
|---------------------------|--------------------|------------------|------------------|
|                           |                    | 1.0              | Fungistático     |
|                           |                    | <b>2.0</b>       | <b>Fungicida</b> |
|                           | 251,500            | 0.5              | Fungistático     |
|                           |                    | 1.0              | Fungistático     |
| <i>Rhizoctonia solani</i> | 52,800             | 0.5              | Fungistático     |
|                           |                    | 1.0              | Fungistático     |
|                           | 136,131            | 1.0              | Fungistático     |
|                           |                    | <b>2.0</b>       | <b>Fungicida</b> |
| <i>Fusarium oxysporum</i> | 52,800             | 1.0              | Fungistático     |
|                           |                    | 2.0              | Fungistático     |
|                           | 136,131            | 1.0              | Fungistático     |
|                           |                    | <b>2.0</b>       | <b>Fungicida</b> |
| <i>A. flavus</i>          | 52.800             | 0.5              | Fungistático     |
|                           |                    | 1.0              |                  |
|                           |                    | 2.0              |                  |
|                           | 136.131            | 0.5              | <b>Fungicida</b> |
|                           |                    | <b>2.0</b>       |                  |
|                           | 251.500            | 0.5              | Fungistático     |
| <b>2.0</b>                |                    | <b>Fungicida</b> |                  |
| <i>A. chevalierii</i>     | 52.800             | 0.5              | Fungistático     |
|                           |                    | 2.0              |                  |
|                           | 136.131            | 0.5              |                  |
|                           |                    | 2.0              |                  |
|                           | 251.500            | <b>2.0</b>       | <b>Fungicida</b> |
|                           | <i>A. nidulans</i> | 52.800           | <b>0.5</b>       |
| <b>2.0</b>                |                    |                  |                  |
| 136.131                   |                    | 0.5              | Fungistático     |
|                           |                    | <b>2.0</b>       | <b>Fungicida</b> |
| 251.500                   |                    | <b>2.0</b>       | <b>Fungicida</b> |

**CAPÍTULO VII.**

**CONCLUSIONES**

**Y**

**RECOMENDACIONES**

**CONCLUSIONES**

1. Existe efecto insecticida a la concentración de 0.5 % de quitosán de bajo peso molecular 52,800 g/mol.
2. En las concentraciones de 0.5, 1.0 y 2.0 % de quitosán de alto peso molecular existe efecto insecticida.
3. El recubrimiento de frijol con quitosán de bajo PM (52.800 g/mol) a las concentraciones de 1.0, 2.0 y 4.0 % y tiempos de infestación (24, 48 y 96 horas) inhibe la oviposición.
4. A cualquiera de las concentraciones de quitosán de alto PM (136,131 g/mol) y tiempos de infestación estudiados se inhibe la oviposición de *Zabrotes subfasciatus* Boh.
5. Al inhibir la oviposición de *Z. subfasciatus* se controla el desarrollo de larvas por lo que no se presenta emergencia de insectos a las concentraciones y tiempos de infestación mencionados anteriormente.
6. Para frijol recubierto con quitosán de bajo PM (52.800 g/mol) el % de grano dañado a las 96 horas se redujo al 2% en cualquiera de las concentraciones estudiadas y para quitosán de alto PM fue de 0% en los tres tiempos de infestación a cualquier concentración de quitosán.
7. Debido a la propiedad hidrofílica del quitosán en cubierta, la diferencia de peso se ve aumentada por la absorción de humedad y disminuida a medida que aumenta la concentración.
8. El quitosán a la concentración de 1.0 a todos los PM inhibe al 100 % al hongo de *Alternaria alternata in-vitro* en un lapso de 9 días de incubación a 25 °C.
9. El quitosán a las siguientes concentraciones 1.0 y 2.0 % a los PM de 52.800 y 136.131 g/mol respectivamente inhiben al 100 % al hongo de *Fusarium oxysporum in-vitro* en un lapso de 9 días de incubación a 25 °C.

10. El quitosán a la concentración del 2.0 % al PM de 136.131 g/mol inhibe al 100 % al hongo de *Rhizoctonia solani in-vitro* en un lapso de 9 días de incubación a 25 °C.
11. El quitosán a la concentración del 2.0 % a los PM de 136.131 y 251.500 g/mol respectivamente inhiben al 100 % al hongo de *Aspergillus flavus in-vitro* en un lapso de 9 días de incubación a 25 °C.
12. El quitosán a la concentración de 2.0 % a todos los PM inhibe al 100 % al hongo de *Aspergillus chevalieri in-vitro* en un lapso de 9 días de incubación a 25 °C.
13. El quitosán a la concentración del 2.0 % en los tres PM utilizados, inhibe al 100 % al hongo de *Aspergillus nidulans in-vitro* en un lapso de 9 días de incubación a 25 °C.

## **RECOMENDACIONES**

- En base a los resultados obtenidos se sugiere utilizar la concentración de 1.0 y 0.5 % para bajo y alto PM respectivamente para facilitar el recubrimiento del grano de frijol debido a su fácil manejo a estas concentraciones para estudios posteriores en pruebas de libre elección.
- Investigar el efecto del recubrimiento de quitosán a diferentes tiempos de inmersión y el efecto que tiene en la inducción de defensas en la semilla.
- Investigar el comportamiento de absorción de humedad del grano recubierto con quitosán en las condiciones de almacenamiento del frijol.
- Continuar con este tipo de trabajos para enriquecer la tecnología del quitosán en el recubrimiento de granos y semillas e inducir el uso de quitosán como un método de control de insectos.
- Realizar el experimento de la actividad antifúngica *in-vivo* para conocer el comportamiento del quitosán.
- Investigar si el quitosán aplicado como fungicida en la semilla puede producir efectos fitotóxicos, que consisten en daños a la morfología y/o fisiología de las semillas y plántulas que de ellas surgen.

**REFERENCIAS  
CONSULTADAS**

## REFERENCIAS CONSULTADAS

---

---

1. Acosta G., J. y P. Pérez. Situación del cultivo de frijol común en México. producción e investigación. INIFAP. Chapingo. México.
2. Aguilera P., M. 1994. Pérdidas causadas por insectos al maíz almacenado para autoconsumo. Un método para su cuantificación. SARH-INIFAP. CIR- CENTRO. Chapingo, México. En: Memorias de la III reunión nacional de la problemática de postcosecha de granos y semillas. pp: 166-176.
3. Allan G.G. Altman, L.C. 2001. Chitin and chitosan. Biomedical applications of chitin and chitosan.
4. Arias C.A., H.E. Barahona. Y G. Valladares. 1994. Estudio de la eficacia de insecticidas comerciales y de origen vegetal en plagas de frijol (*Phaseolus vulgaris*) y de maíz (*Zea mays*) almacenado. Departamento de parasitología vegetal. Centro de tecnología agropecuaria. San Andrés, El Salvador. En: Memorias de la III reunión nacional de la problemática de postcosecha de granos y semillas. pp: 92-98.
5. Arias V., C. y H. Dell'Orto T. 1983. Distribución e importancia de los insectos que dañan granos y productos almacenados en Chile. Santiago. Chile. pp: 1-4
6. Barahona H. E., C. A. Arias. y G. Valladares. 1994. Evaluación de genotipos de maíz (*Zea mays*) y frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) ante el ataque de plagas primarias de almacén. Departamento de parasitología vegetal. Centro de tecnología agropecuaria. San Andrés, El Salvador. En: Memorias de la III reunión nacional de la problemática de postcosecha de granos y semillas. pp: 133-139.
7. Bautista R., J. E. 1988. Tasas de supervivencia y reproducción de *Zabrotes subfasciatus* Boheman en diferentes variedades de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). Tesis de Licenciatura. Departamento de Parasitología Agrícola. Universidad Autónoma de Chapingo. Chapingo, México. 63 p.
8. Becerra S.,S. 2001. Envase y embalaje de alimentos: bioenvases y películas comestibles de quitosán en tomate (*Lycopersicon esculentum mill*). Tesis de Licenciatura. Ingeniería en alimentos. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. UNAM.
9. Bhaskara R., J. Arul y L. Couture. 1999. Chitosan treatment of wheat seeds induces resistance to *Fusarium graminearum* and improves seed quality. J. Agric. Food Chem. 47: 1208- 1216.
10. Borboa F., J., W. Corral., F.J. Cortés R. y T.R. Rentería. 1994. Influencia de condiciones de almacenamiento sobre la germinación, vigor y rendimiento de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). Departamento de investigación y posgrado en alimentos de la Universidad de Sonora. Hermosillo, Sonora. En: Memorias de la III reunión nacional de la problemática de postcosecha de granos y semillas. pp: 10-14.

## REFERENCIAS CONSULTADAS

11. Camargo L., M.F. 1997. Preferencia, mortalidad y fertilidad de *Acanthoscelides obtectus* (Say) en seis líneas de frijol y la variedad Jamapa. *Agrociencia* 31: 253-257.
12. Campos A., J. 1997. Enfermedades del frijol. Editorial trillas. México. pp: 11-61.
13. Castaño Z. y Zepeda J. 1987. Microorganismos asociados con granos almacenados de arroz, maíz, frijol, soya y chile, y efectividad del tratamiento químico de la semilla. *CEIBA* 28: 59-65.
14. Christensen C., M. 1976. Contaminación por hongos en granos almacenados. Ed. Pax-México. México. pp: 15-55.
15. CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). 1986. Insectos del frijol almacenado y su control. Folleto 11,344. 4p.
16. Cortés R., M. O., G. García S., M. I. Villaescusa M. y R. I. Sánchez M. 1994. Evaluación de sustancia vegetales para el control de *Acanthoscelides obtectus* (Say) (Coleoptera: Bruchidae) en frijol. Departamento de investigación y posgrado en alimentos de la Universidad de Sonora. Hermosillo, Sonora. En: Memorias de la III reunión nacional de la problemática de postcosecha de granos y semillas. pp: 128-132.
17. Costa L., L. y V. M. Scussel. 1997. Toxigenic fungi in beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Agrociencia*. pp: 518.
18. Cruz C., C. y A. Pérez C. 1998. Evaluación del efecto conservador y antimicótico de la película de quitosán en la vida útil del mango (*Mangifera* L. Indica) variedad Haden. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Tesis: Ingeniería en Alimentos. UNAM. pp: 54-62.
19. Davies R. G., 1991. Introducción a la entomología. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, España.
20. De la Garza J.L., J. Leos., H. López. Y R. Flores. 1994. Estudio de la flora fúngica de maíz almacenado en 11 localidades del noroeste de Nuevo León y 14 del norte de Tamaulipas. Facultad de Agronomía. UANL. Marín, Nuevo León. pp: 174-188.
21. Dell'Orto T., H. 1985. Insectos que dañan granos y productos almacenados. Instituto de Investigaciones Agropecuarias, INIA. Santiago. Chile. pp: 3-46
22. Devlieghere F., A. Vermeulen., J. Debevere. 2004. Chitosan: antimicrobial activity, interactions with food components and applicability as a coating on fruit and vegetables. *Food microbiology* 21: 703-714.
23. Díaz P., C. 2003. Contribución al estudio de la microflora en semilla de *Phaseolus vulgaris* L. *Agronomía Tropical* 20(2): 97-107.
24. El Ghaouth A., C. Wilson., y M. Wisniewski. 2003. Control of postharvest decay of apple fruit with *Candida saitoana* and induction of defense responses. *Phytopathology*: Mar. 93(3): 344- 348.

## **REFERENCIAS CONSULTADAS**

25. Frijol azufrado. Peruano 87. Variedad de ciclo precoz. [www.sagarpa.gob.mx/Pronase/objetivos.html](http://www.sagarpa.gob.mx/Pronase/objetivos.html). Septiembre 2004.
26. Frijol. [www.consude.org.ni](http://www.consude.org.ni). Marzo 2004.
27. Gálvez V., M. C. 2001. El quitosano como agente de inhibición micótica en patógenos de pepino. Tesis: Ingeniero en alimentos. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. UNAM.
28. García L., S., A. J. Burt., J. A. Serratos., D. M. Díaz P., J. T. Arnason., y D. J. Bergvinson. 2003. Defensas naturales en el grano de maíz al ataque de *Sitophilus zeamais* (Motsch, Coleoptera: Curculionidae): Mecanismos y bases de la resistencia. *Rev.* 22(3): 138-145.
29. García P., M. A. 2004. Efecto del almacenamiento hermético del grano de frijol, sobre el desarrollo de los gorgojos *Zabrotes subfasciatus* Boh y *Acanthoscelides obtectus* Say. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Tesis: Ingeniero Agrícola. UNAM. México. 107 p.
30. Garduño H., L. y J. Gutiérrez D. 1994. Efecto del tiempo de exposición a -5°C sobre la biología de *Zabrotes subfasciatus* (Boheman) (Coleoptera: Bruchidae) en frijol almacenado. Centro de investigaciones ecológicas y agropecuarias de Morelos. Instituto nacional de investigaciones forestales y agropecuarias. SARH-INIFAP. pp: 145- 153.
31. Gennadios a., Séller C. L., Hanna M.A. y Froning G.W. 1996. Mechanical and Barrier Properties of Rice Bran Films. *Journal of Food Science*. Vol. 45 Núm 3
32. Hadwiger L.A., Fristensky B. y Riggelman R.C., 1984. Chitosan, a natural regulator in plant-fungal pathogen interactions increases crop yields. New York, Academic Press.
33. Hadwiger L.A., Kendra D.F., Fristensky B.W. y Wagner W., 1985. Chitosan both activate genes in plants and inhibits RNA synthesis in fungi. *Chitin in Nature and Technology*.
34. Herrera C., J. A. 1970. Los hongos en los granos almacenados. ANSA (Almacenes Nacionales de Depósito). Departamento de servicios laboratorio central. Folleto técnico No. 9. Junio.
35. Hongos fitopatogenos. Unidad de fitopatología. [www.fitopato@fagro.edu.uy](http://www.fitopato@fagro.edu.uy). Octubre 2004.
36. Hu K. J., J. L. Hu., K. P. Ho., y K. W. Yeung. 2004. Screening of fungi for chitosan producers, and copper adsorption capacity of fungal chitosan and chitosanaceous materials. *Carbohydrate polymers* 58: 45-52.
37. Imms. Richards O., Davies R. 1991. Tratado de entomología. Estructura fisiología y desarrollo. Ed. Omega. Vol. 1. p 8-17.
38. Inbar M., H. Doostdar., y R. Sonoda. 1998. Elicitors of plant defensive systems reduce insect densities and disease incidence. *J. of Chemical Ecology*. 24(1): 135-149.
39. Jiménez M., A. 1990. Semillas forrajeras para siembra. Universidad Autónoma de Chapingo. México. pp: 57-61.

40. Jones A., L. Phaseolus bean: Post-harvest operations. [www.cgiar.org/ciat/](http://www.cgiar.org/ciat/). Septiembre 2004.
41. Jonson, C., Kistler, R.A., 1987. Nutritional ecology of bruchid beetles. In: Slansky Jr., F., Rodrigues, J.G. (Eds), Nutritional Ecology of Insects, Mites, Spiders and related invertebrates. John Wiley, New York, pp. 259-276.
42. Kashiwaba K., N. Tomooka., A. Kaga., O. K Han. Y D. A. Vaughan. 2003. Characterization of resistance to three bruchid species (*Callosobruchus* spp., Coleoptera, Bruchidae) in cultivated rice bean (*Vigna umbellata*). J. of Economic Entomology 96(1): 207-213.
43. Khan T., A., K. K. Peh., H. S. Ch'ng. 2002. Reporting degree of deacetylation values of chitosan: the influence of analytical methods. J. Pharmaceut Sci. 5(3): 205-212.
44. Knorr Diethrich. 1984. Use of chitinous polymers in food technology. Food Technology. Pp 85-96.
45. Knorr Diethrich. 1991. Recovery and utilization of chitin and chitosan in food processing waste management. Food Technology. Pp 114-120.
46. Knorr Dietrich. 1991. Recovery and utilization of chitin and chitosan in food processing waste management. Food Technology. pp 114-120.
47. Koide S., S., M. D. y Ph. D. 1998. Chitin-Chitosan: Properties, benefits and risks. Nutrition Research 18 (6): 1091-1101.
48. Kramer J., K. y S. Muthukrishnan. 1997. Insect chitinases: Molecular biology and potencial use as biopesticides. Insect Biochem. Molec. Biol. 27(11): 887-900.
49. Krautsf. 1991. Tabla de composición de alimentos. Editorial Acribia. Pp 316,328.
50. Lagunas T., A. 1994. Extractos y polvos vegetales y polvos minerales para el combate de plagas del maíz y del frijol en la agricultura de subsistencias. Colegio de postgraduados. Memoria. Chapingo México. 32p.
51. Lagunes T. y C. Rodríguez. 1988. Búsqueda tecnológica apropiada para el combate de plagas del maíz almacenado en condiciones rústicas. Colegio Nacional de Ciencia y Tecnología y Colegio de Posgraduados. Chapingo. México. Pp: 3-87.
52. Leuba J.L. y Stossel P., 1985. Chitosan and other polimers antifungal activity and interaction with biological membranes. Chitina in Nature and Technology.
53. Leyba A. E, Ruíz E. I. 2004. Efecto del tratamiento de películas elaboradas a base de quitosán y aditivos, sobre aguacates variedad *Hass* (*Persea americana mill*) durante el almacenamiento. Tesis: Ingeniero en Alimentos. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. UNAM. pp:41-44

## REFERENCIAS CONSULTADAS

54. Lim S. H., y S. Hudson. 2003. Review of chitosan and its derivatives as antimicrobial agents and their uses as textile chemicals. *J. of Macromolecular science*. C 43 (2): 223-241.
55. Lindblad C. 1981. Enemigos del grano almacenado: Insectos. Ed. Concepto. México. pp: 130-172.
56. Loya R., J. G. 1977. Efecto de los rayos gamma sobre *Zabrotes subfasciatus* Boh. (Coleóptera: Bruchidae) y algunas observaciones sobre su comportamiento biológico. Tesis de Maestría en Ciencias. Esc. Nal Agric. Coleg. De post. Chapingo. Chapingo, México.
57. Maya H., J. Vera., y R. Garza. 2000. Parámetros poblacionales de *Empoasca kraemeri* Ross and Moore (Homóptera: Cicadellidae) en genotipos de frijol. *Agrociencia* 34: 603-610.
58. Moreno M., E., 1988. Manual para la identificación de hongos en granos y sus derivados. Universidad Autónoma de México. México. p. 9-33.
59. Moreno M., E.; A. Rivera R., M. E. Vázquez B., F. Cruz G. y R. Navarrete M. 1994. Estudio sobre la fototoxicidad y combate de los hongos de almacén con fungicidas en semilla de trigo almacenada bajo condiciones de baja y alta humedad. Unidad de investigación en granos y semillas. Pabellón, Ags. México. En: Memorias de la III reunión nacional de la problemática de postcosecha de granos y semillas. pp: 140-149.
60. Moreno M., E., M.E. Vázquez B., R. Navarrete M. y J. Ramírez G. 1994. Viabilidad de la semilla de diferentes variedades de frijol *Phaseolus vulgaris* L. almacenadas bajo condiciones de alta y baja humedad. Unidad de investigación en granos y semillas UNAM-UNIFAP. Pabellón, Ags. México. En: Memorias de la III reunión nacional de la problemática de postcosecha de granos y semillas. pp: 1190-1198.
61. Moreno-Martínez E. 1994. Análisis físico y biológico de semillas agrícolas, PUAL-UNAM, México.
62. Moreno-Martínez E. 1994. Tratamiento químico de las semillas para combate de los hongos. Instituto de Biología, Libro UNAM. México.
63. Morfología, anatomía y fisiología de la semilla [www.virtual.unal.edu.co/cursos/ciencias/2000024/lecciones/cap02/02\\_04\\_12.htm](http://www.virtual.unal.edu.co/cursos/ciencias/2000024/lecciones/cap02/02_04_12.htm).
64. Muñoz R., C. V. 2003. Alternativas para el abatimiento de las poblaciones de *Rhizoctonia solani* y *Fusarium spp.* del suelo. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Tesis: Doctor en Ciencias. UNAM. México. pp: 3-13.
65. Muzzarelli C., R. Muzzarelli. 2003. Chitin related food science today (and two centuries ago). *Agro Food industry hi-tech*. September/October. 39-41.
66. Muzzarelli R., C. Muzzarelli., y R. Tarsi. 2001. Fungistatic activity of modified chitosans against *Saprolegnia parasitica*. *Biomoleculas* 2: 165-169.

## REFERENCIAS CONSULTADAS

67. Nchimbi M., S., y R. Misangu. 2002. Seasonal distribution of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Bruchid species in selected areas in Tanzania. Bean Seed Workshop Arusha, Tanzania. January 12-14.
68. No, H.K., Lee, S.H., Park, N. Y. y Meyers, S.P. 2003. Comparison of physicochemical, binding, and antibacterial properties of chitosans prepared without and with deproteinization process. J. Agric. Food Chem. 51(26): 7659-7663.
69. Olivas E., E. 1970. Estudio sobre el control biológico de *Fusarium solani* f. *Phaseoli*. Tesis de Maestría en Ciencias. Universidad Autónoma de Chapingo. México. 63p.
70. Ortega M., L., J. Romero N., y A. Equihua M. 1989. Tasas de supervivencia y reproducción de *Acanthoscelides obtectus* Say en diferentes variedades de frijol *Phaseolus vulgaris* L. Agrociencia 76: 183-195.
71. Pabón R., I. A., C. J. Aguirre M., y J. A Reyes P. 1976. Resistencia de diecisiete variedades comerciales de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) en almacenamiento al ataque del gorgojo pinto de los granos (*Zabrotes subfasciatus* Boh.). Acta Agronómica Colombiana 26(1-2): 39-46.
72. Pachón R., C. E. y J. Castaño., Z. 1999. Identificación de hongos en semillas almacenadas de maíz y frijol. Fitipotología: 23. Enero.
73. Patente en trámite. Mayo 2000.
74. Producción vegetal. Frijol.  
[www.gro.itesm.mx/agronomía2/extensivos/CFrijolIndicedecultivo.html#Frijol](http://www.gro.itesm.mx/agronomía2/extensivos/CFrijolIndicedecultivo.html#Frijol). Octubre 2004.
75. Programa postcosecha. Insectos. [www.consude.org.ni](http://www.consude.org.ni). Abril 2004.
76. Rabea E., I., M. Bawy., C. Stevens., y W. Steurbaut. 2003. Chitosan as antimicrobial agent: Applications and mode of action. Biomacromoleculas Nov-Dic. 4 (6): 1457-1465.
77. Radman R., T. Saez., C. Bucke. y T. Keshavarz. 2003. Elicitation of plants and microbial cell systems. Biotechnol. Appl. Biochem. 37: 91-102.
78. Rentería G., T.R y J. Borboa F. 1994. Estudio sobre la presencia y distribución de *Zabrotes subfasciatus* (Boheman) y *Acanthoscelides obtectus* Say en precosecha de frijol en el estado de Sonora. Departamento de investigación y posgrado en alimentos de la Universidad de Sonora. Hermosillo, Sonora. En: Memorias de la III reunión nacional de la problemática de postcosecha de granos y semillas. pp: 1-9.
79. Rentería L., L., J. Vera G., y B. Domínguez R. 1997. Preferencia y tasas de fertilidad de *Zabrotes subfasciatus* (Boheman) en seis líneas de frijol. Agrociencia 31: 349-352.
80. Salazar H., M. 2003. El frijol, fuente de proteínas y fibra. Leguminosa básica. Unidad de Investigación de Granos y Semillas de la FESC.

## **REFERENCIAS CONSULTADAS**

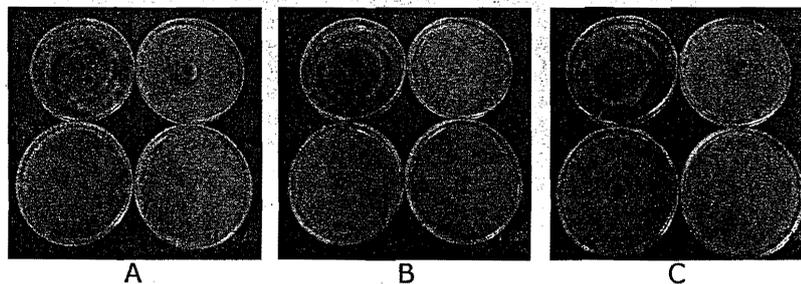
81. Salvador L., S. P. Miranda., N. Aragón y V. Lara. 1999. Recubrimiento de quitosán en aguacate. Rev. De la Sociedad Química de México. 43(1): 18-23.
82. Sánchez A., H. A. Lagunes, T. 1989. Actividad de polvos minerales para el combate de *Prostephanus truncatus* (horn) y *Sitophilus zeamais* Motschulsky, en maíz almacenado. Agrociencia 76: 47-58.
83. Sánchez R., A., B. Domínguez R., y J. Vera G. 1997. Resistencia de tres líneas de frijol al ataque de *Zabrotes subfasciatus* (Boh.). Agrociencia 31: 209-216.
84. Saucedo L., R. 1993. Suceptibilidad a insecticidas en dos poblaciones del gorgojo pinto del frijol *Zabrotes subfasciatus* Boh. (Coleoptera: Bruquidae) procedentes de Celaya, Gto., y Zacatepec, Mor. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Tesis: Ingeniero Agrícola. UNAM. México. 83p
85. Scussel V., O. Volpato., y L. L. F. Costa. 1997. Fungi and aflatoxin production in beans (*Phaseolus vulgaris* L.) from Brazil. Agrociencia. pp: 531.
86. Serrano C., L. M. 2004. Análisis del caso frijol. Universidad Autónoma Chapingo. Enero. 1-36 pp.
87. Servicio de información y estadística, agroalimentaria y pesquera. Secretaría de agricultura, ganadería, desarrollo rural, pesca y alimentación. 2004.
88. Shoonhoven A., V. 1985. Frijol: Investigación y Producción. Plagas que atacan granos de frijol almacenado. PNUD/CIAT. Calí, Colombia.
89. Sifuentes, J. A. 1981. Plagas de frijol en México. INIA-SARH. Folleto Técnico Núm. 69. México.
90. Striker, H.B. 1978. Manual de almacenamiento y conservación de granos básicos. San Salvador, El Salvador.
91. Taiatella L., S., C. Costa., P. Valle P. 2003. Aspectos biológicos de *Zabrotes subfasciatus* (Bohemann, 1833) (Coleoptera, Bruchidae) em *Phaseolus vulgaris* L., cv. Carioca (Fabaceae), sob condicoes de laboratorio. Rev. Brasileira de Entomología 47(4): 621-624.
92. Tamez; L. Galán y otros. 2004. Bioinsecticidas: su empleo, producción y comercialización en México. Ciencia UANL. Abril-Junio. 4 (2):143-152.
93. Teixeira I., F. S. Zucoloto. 2003. Seed suitability and oviposition behaviour of wild and selected populations of *Zabrotes subfasciatus* (Boheman) (Coleoptera: Bruchidae) on different hosts. J. Stored Prod. Res. 39: 131-140.
94. Tovar E., 1997. Determinación de los cambios estructurales relacionados con el fenómeno de la reversibilidad de endurecimiento en dos cultivares de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). Tesis Doctorado. Fac. Ciencias. UNAM. México, D.F. 80 páginas.

## **REFERENCIAS CONSULTADAS**

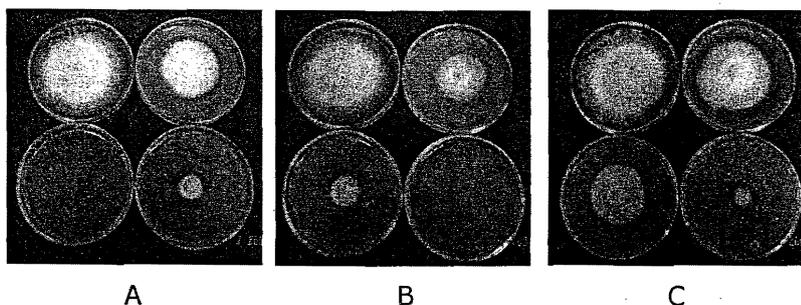
95. Utida Syunro. 1967. Collective oviposition and larval aggregation in *Zabrotes subfasciatus* (Boh.) (Coleoptera, Bruchidae). J. stored Prod. Res. 2: 315- 322.
96. Vázquez A., M. 2001. El ecosistema de granos almacenados. México. Avance y perspectiva 20: 407-413.
97. Villaseñor V., J.A y J. Vera G. 1992. La testa del frijol de la variedad Jamapa como defensa al ataque del gorgojo pinto *Zabrotes subfasciatus* (Boh). Agrociencia serie Protección Vegetal 3 (2): 29-49.
98. [www.qro.itesm.mx/agronomia2/granos\\_y\\_forrajes/frijol\\_morfologia.htm](http://www.qro.itesm.mx/agronomia2/granos_y_forrajes/frijol_morfologia.htm) . Mayo 2005.

**APÉNDICE**

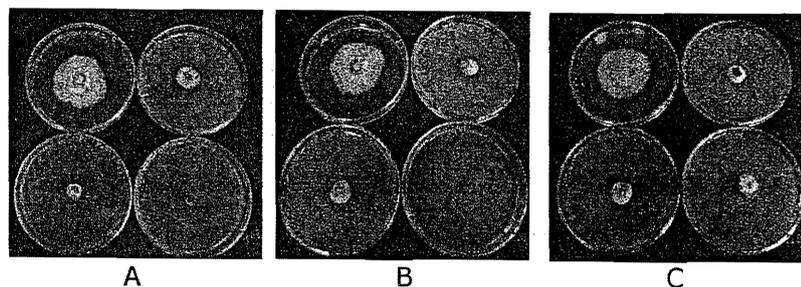
**HONGOS DE CAMPO EN FRIJOL**



Crecimiento de *Alternaria alternata* en: A) quitosán de bajo PM; B) quitosán de medio PM; C) quitosán de alto PM.\*

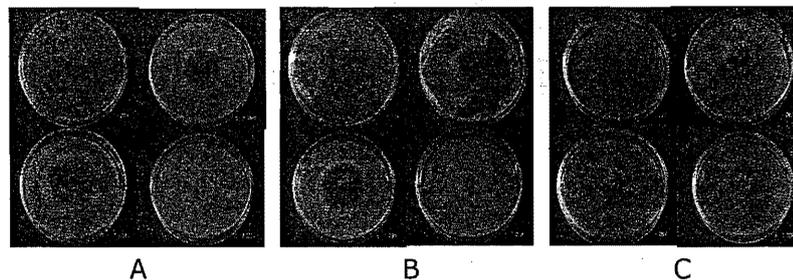


Crecimiento de *Fusarium oxysporum* en: A) quitosán de bajo PM; B) quitosán de medio PM; C) quitosán de alto PM.\*

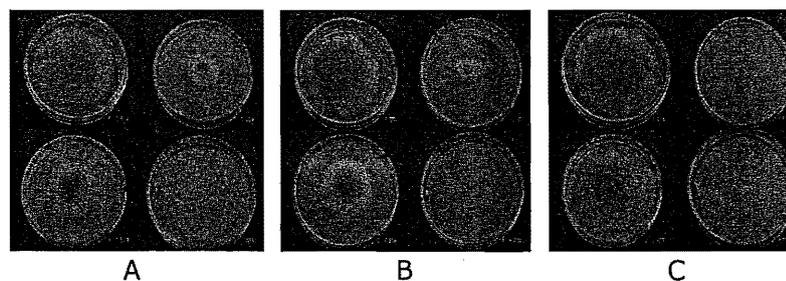


Crecimiento de *Rhizoctonia solani* en: A) quitosán de bajo PM; B) quitosán de medio PM; C) quitosán de alto PM.\*

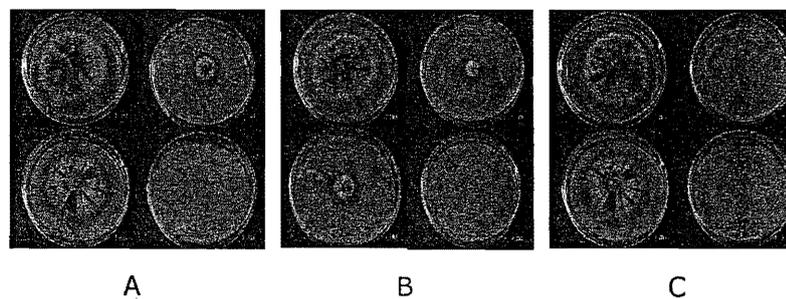
**HONGOS DE ALMACÉN EN FRIJOL**



Crecimiento de *Aspergillus flavus* en: A) quitosán de bajo PM; B) quitosán de medio PM; C) quitosán de alto PM.\*



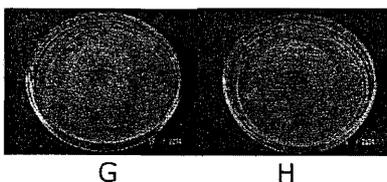
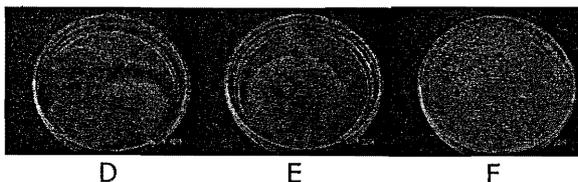
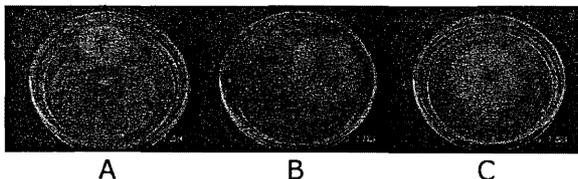
Crecimiento de *Aspergillus chevalierii* en: A) quitosán de bajo PM; B) quitosán de medio PM; C) quitosán de alto PM.\*



Crecimiento de *Aspergillus nidulans* en: A) quitosán de bajo PM; B) quitosán de medio PM; C) quitosán de alto PM.\*

## CULTIVOS SECUNDARIOS DE HONGOS DE CAMPO EN FRIJOL

### *Alternaria alternata*



Cultivos secundarios de *Alternaria alternata*.

En medio de cultivo MSA.

- A) 0.5 % de QN de bajo PM
- B) 1.0 % de QN de bajo PM
- C) 2.0 % de QN de bajo PM
- D) 0.5 % de QN de PM medio
- E) 1.0 % de QN de PM medio
- F) 2.0 % de QN de PM medio
- G) 0.5 % de QN de alto PM
- H) 1.0 % de QN de alto PM

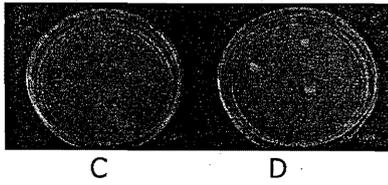
### *Fusarium oxysporum*



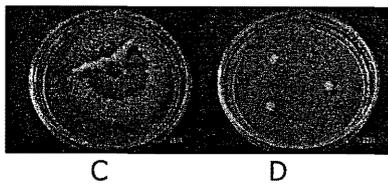
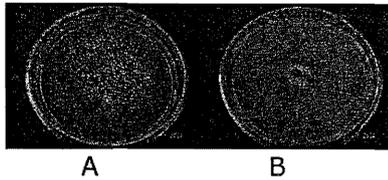
Cultivos secundarios de *Fusarium oxysporum*

En medio de cultivo MSA.

- A) 1.0 % de QN de bajo PM
- B) 2.0 % de QN de bajo PM
- C) 1.0 % de QN de PM medio
- D) 2.0 % de QN de PM medio



*Rhizoctonia solani*



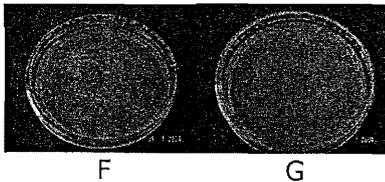
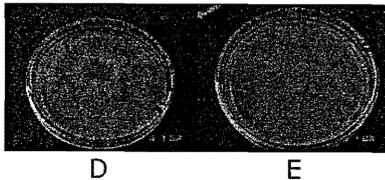
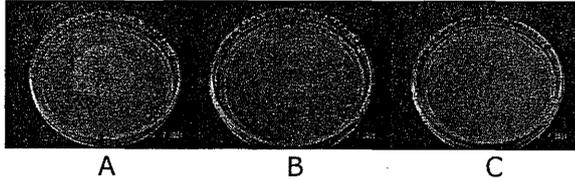
Cultivos secundarios de *Rhizoctonia solani*

En medio de cultivo MSA.

- A) 0.5 % de QN de bajo PM
- B) 1.0 % de QN de bajo PM
- C) 1.0 % de QN de PM medio
- D) 2.0 % de QN de PM medio

**CULTIVOS SECUNDARIOS DE HONGOS DE ALMACÉN EN FRIJOL**

*Aspergillus flavus*

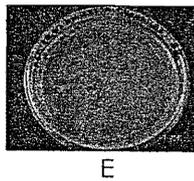
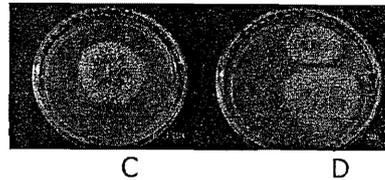
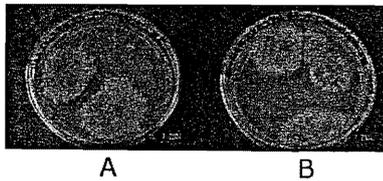


Cultivos secundarios de *A. flavus*

En medio de cultivo MSA.

- A) 0.5 % de QN de bajo PM
- B) 1.0 % de QN de bajo PM
- C) 2.0 % de QN de bajo PM
- D) 0.5 % de QN de PM medio
- E) 2.0 % de QN de PM medio
- F) 0.5 % de QN de alto PM
- G) 2.0 % de QN de alto PM

*Aspergillus chevalierii*

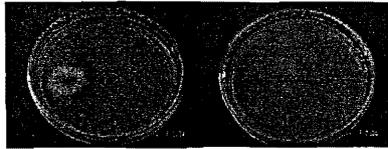


Cultivos secundarios de *A. chevalierii*

En medio de cultivo MSA.

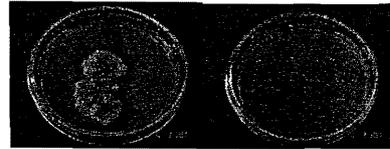
- A) 0.5 % de QN de bajo PM
- B) 2.0 % de QN de bajo PM
- C) 0.5 % de QN de PM medio
- D) 2.0 % de QN de PM medio
- E) 2.0 % de QN de alto PM

*Aspergillus nidulans*



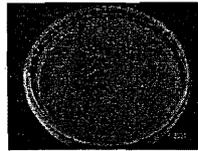
A

B



C

D



E

Cultivos secundarios de *A. nidulans*

En medio de cultivo MSA.

- A) 0.5 % de QN de bajo PM
- B) 2.0 % de QN de bajo PM
- C) 0.5 % de QN de PM medio
- D) 2.0 % de QN de PM medio
- E) 2.0,% de QN de alto PM