

Actividad antifúngica de sales de quitosana *in vitro* sobre hongos causantes de enfermedades poscosecha en papaya (*Carica papaya*)

Ingrid González Lemes, Tania Mulkay Vitón y Adrián Paumier Jiménez

Instituto de Investigaciones en Fruticultura Tropical. Ave 7.ª no. 3005 e/ 30 y 32, Playa, Cuba, poscosecha@iift.cu

RESUMEN

Las enfermedades causadas por hongos ocasionan las mayores pérdidas durante la poscosecha de la papaya (*Carica papaya* L.). Para su control una de las alternativas utilizadas son los productos químicos, lo cual ha despertado una gran preocupación en los consumidores por los niveles de residuos. En este sentido se buscan otros métodos no contaminantes que no generen residuos peligrosos en los frutos. Un ejemplo es el uso de productos bioactivos como la quitosana. El objetivo de este trabajo fue evaluar la actividad antifúngica de las sales de lactato y acetato de quitosana sobre *Colletotrichum gloeosporioides*, *Colletotrichum capsici* y *Alternaria alternata*. Las dos sales de quitosana (30 %) se probaron a 2500, 5000, 10 000 y 15 000 mg/L con un testigo sin aplicación. El efecto *in vitro* se determinó a través de la medición del diámetro de crecimiento de las colonias (cm) a los siete días de incubación a 27 ± 1 °C, la producción de conidios por la concentración (conidios/mL) y el porcentaje de germinación de los conidios a las cuatro, ocho y 24 h. Las sales de quitosana presentaron actividad antifúngica contra *C. gloeosporioides*, *C. capsici* y *A. alternata*. El acetato de quitosana a 15 000 mg/L redujo el crecimiento de las colonias de los tres hongos con valores de 0,47; 0,56 y 0,28 cm, respectivamente, y el lactato de quitosana inhibió el 100 % el crecimiento. La concentración y germinación de los conidios de los hongos disminuyó con las dos sales en comparación con el testigo.

Palabras claves: quitosana, patógenos, frutos

ABSTRACT

Fungal diseases cause the greatest losses during postharvest of papaya (*Carica papaya* L.). An alternative used for the control is with chemical products, but this method causes great preoccupation to consumers because possible residual levels. Thus other non-polluting methods that do not generate hazardous residues in the fruits are sought. An example is the use of bioactive products as chitosan. The aim of this study was to evaluate the antifungal activity of chitosan lactate and acetate salts on *Colletotrichum gloeosporioides*, *Colletotrichum capsici* and *Alternaria alternata*. Both chitosan salts (30%) were tested at 2500, 5000, 10000 and 15000 mg/L with a control without application. The effect *in vitro* was determined by measuring the colonies growth diameter (cm) after seven days of incubation at 27 ± 1 °C, the sporulation by the concentration (conidia/mL) and the conidia germination percent at four, eight and 24 hours. Chitosan salts showed antifungal activity against *C. gloeosporioides*, *C. capsici* and *A. alternata*. Chitosan acetate at 15000 mg/L reduced the growth of the three fungal colonies with values of 0.47, 0.56 and 0.28 cm, respectively, while the same lactate dose inhibited 100% of growth. Also, both salts reduced germination and sporulation of fungi compared to the control.

Key words: chitosan, pathogens, fruits

INTRODUCCIÓN

La quitina se considera el segundo polisacárido más abundante en la naturaleza. Se encuentra en el exoesqueleto de crustáceos y moluscos, y forma parte de la estructura de la pared celular de ciertos hongos e insectos [Vargas *et al.*, 2004]. Quitosana es un polímero natural derivado de la quitina; tiene propiedades bactericida, fungicida, antiviral, estimulante del crecimiento vegetal e induce reacciones de resistencia en algunas plantas [Lárez, 2008]; es biodegradable y no tóxico [Sandford, 1989, citado por Hernández *et al.*,

2005]; además, se ha demostrado su efecto en el control de varios patógenos causantes de enfermedades [Díaz *et al.*, 2010; Abdelbasset *et al.*, 2010].

Las enfermedades fungosas afectan severamente a los frutos de papaya (*Carica papaya* L.). Durante su conservación y comercialización ocasionan pérdidas entre el 5 y el 40 % de la producción total [Vázquez *et al.*, 2010]. La antracnosis causada por los hongos *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. y *Colletotrichum capsici* (Syd.) Bult. & Bisby, y la

mancha por *Alternaria* causada por *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler son dos de las enfermedades que inciden en la poscosecha de la papaya. La primera está considerada la enfermedad más importante y de incidencia mayor que la mancha por *Alternaria* [Mulkay *et al.*, 2011].

Para el control de las enfermedades poscosecha de la papaya se utilizan los métodos físicos y químicos o la combinación de ambos. La aplicación de aire forzado a 48,5 °C por 4 h y con una ligera inmersión de los frutos en tiabendazol (TBZ) controla la antracnosis [Pérez, 2004]. De igual manera resulta la inmersión de los frutos en agua caliente a 48 °C por 20 min más imazalil [Aranguren, 2011]. Otros fungicidas como el procloraz, azoxistrobin y trifloxystrobin están recomendados [Sánchez *et al.*, 2012].

Dadas las tendencias actuales del consumo de frutos sin residuos químicos se buscan otras alternativas para el control de las enfermedades poscosecha, como es la aplicación de los productos bioactivos. Diferentes estudios *in vitro* muestran que la quitosana tiene propiedades para inhibir el crecimiento micelial, reducir el porcentaje de germinación y disminuir la concentración de conidios en varios hongos fitopatógenos [Maqbool *et al.*, 2010; Echeverría *et al.*, 2012].

En Cuba, el Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos (CIDEM) produce diferentes formulaciones de quitosana para su empleo en la industria farmacéutica, alimentaria y cosmética; sin embargo, existen escasos estudios relacionados con el uso de las sales de quitosana para el control de patógenos que ocasionan enfermedades en los frutos. El objetivo de este trabajo fue evaluar la actividad antifúngica *in vitro* de sales de quitosana sobre hongos causantes de enfermedades poscosecha en papaya.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para el estudio se aislaron los hongos *C. gloeosporioides*, *C. capsici* y *A. alternata* de frutos de papaya con síntomas de antracnosis y pudrición por *Alternaria*, y se identificaron y se conservaron en el laboratorio de Patología Poscosecha del Instituto de Investigaciones en Fruticultura Tropical.

Las sales de lactato y acetato de quitosana (30 %) de masa molar al 46,56 % y al 48,86 %, respectivamente, grado de acetilación al 77,7 % y masa molar de la

quitosana 310 000 g/mol se obtuvieron en el CIDEM de Cuba. Las dos sales se probaron a las concentraciones 2500 mg/L, 5000 mg/L, 10 000 mg/L, 15 000 mg/L, y un testigo sin aplicación.

Las sales de quitosana se disolvieron en 50 mL de agua destilada estéril y se añadieron en enlarmeyers con 110 mL de medio papa dextrosa agar (PDA) previamente licuado. Para cada concentración se utilizó un volumen total de 160 mL. El PDA se extendió en placas Petri (cinco réplicas), y después de solidificado se ubicó en el centro de cada placa un disco de 0,5 cm de diámetro de la colonia de los hongos, tomados de la periferia de las colonias a partir de cultivos puros con siete días de edad.

Las placas Petri se incubaron a 27 ± 1 °C durante siete días, y el efecto de las sales de quitosana se determinó mediante las siguientes evaluaciones:

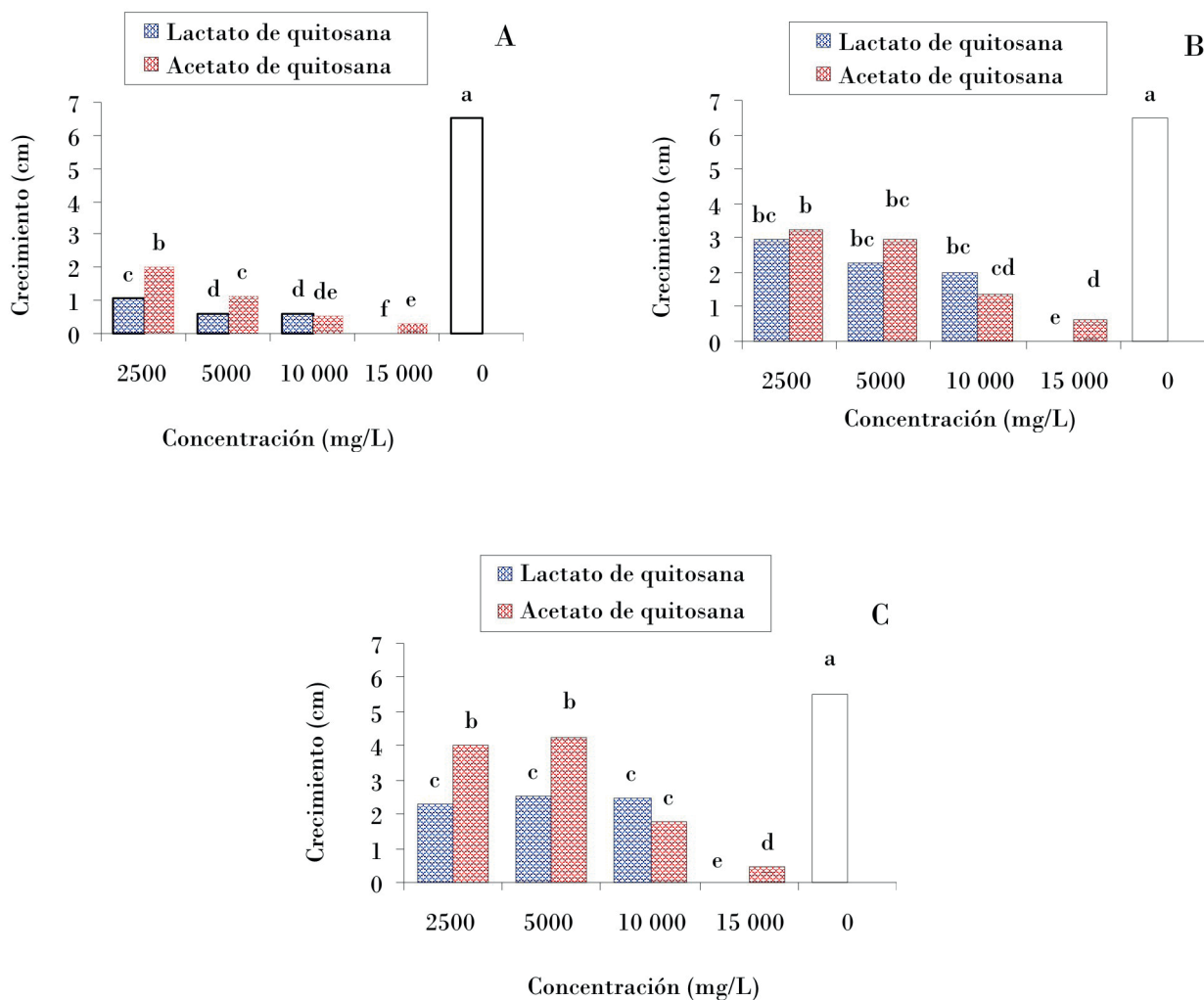
- La medición del diámetro de crecimiento de las colonias (cm) en forma diagonal con una regla acrílica graduada.
- Para la producción de conidios se tomaron cinco discos de 0,5 cm de diámetro de las colonias en la zona cercana al inóculo (cinco réplicas) y se realizaron diluciones cuantitativas de 10^{-2} . Con una cámara de Neubauer y un microscopio Olympus (40x) se efectuaron los conteos (conidios/mL).
- Para la germinación de los conidios se utilizó una concentración de 10^{-2} conidios/mL, se tomaron 100 µL y se extendieron en una película con PDA más sales de quitosana a 2500 mg/L, 5000 mg/L, 10 000 mg/L, 15 000 mg/L y 0 mg/L (testigo) sobre portaobjetos (cinco réplicas), y se incubaron a 27 ± 1 °C. El porcentaje de germinación se determinó sobre la base de 100 conidios con un microscopio Olympus (40x) a las cuatro, ocho y 24 h.
- Los experimentos se ejecutaron mediante un diseño completamente aleatorizado. Los datos se analizaron mediante un ANOVA bifactorial. Las medias se compararon por la Prueba de Tukey ($p \leq 0,05$). Se utilizó el programa estadístico Statistica versión 6.0 [Statsoft, Inc., 2001].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las sales de quitosana a las cuatro concentraciones mostraron actividad antifúngica sobre *A. alternata*, *C. gloeosporioides* y *C. capsici*. El crecimiento de los tres hongos fue inhibido totalmente con el lactato de quitosana a 15 000 mg/L, mientras que el acetato de

quitosana a esta concentración redujo el crecimiento de las colonias a 0,28 cm; 0,47 cm y 0,56 cm, lo cual representó el 96,0; el 93,2 y el 92 % de inhibición, respectivamente (Fig. 1 A, B, C). Resultados similares obtuvieron Sánchez *et al.* (2007) con la aplicación de quitosana Fluka, laboratorio Sigma Aldrich al 2,5 % en la inhibición en el 50,6 % del crecimiento de *A. alternata*. Por otro lado, Bautista *et al.* (2003) hallaron un control total del crecimiento micelial de *C. gloeosporioides* aislado de papaya con

concentraciones de quitosana Fluka, laboratorio Sigma Aldrich al 2,5 y al 3 % durante siete días de incubación; sin embargo, al 0,5 y al 1,5 % el hongo comenzó a crecer al segundo y quinto día, respectivamente. También Mattiuz *et al.* (2011) demostraron que con la aplicación de la quitosana al 1,5 % se inhibió en el 76,4 % el crecimiento micelial de *C. gloeosporioides*, y Madushani *et al.* (2012) observaron una reducción del crecimiento de *C. capsici* del 70 % con la aplicación de quitosana al 2%.



Las barras representan las medias de crecimiento de las colonias $\pm$ desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas por la Prueba de Tukey ($p \leq 0,05$).

Fig. 1. Efecto de las sales de quitosana en el crecimiento de las colonias de *A. alternata* (A), *C. gloeosporioides* (B) y *C. capsici* (C).

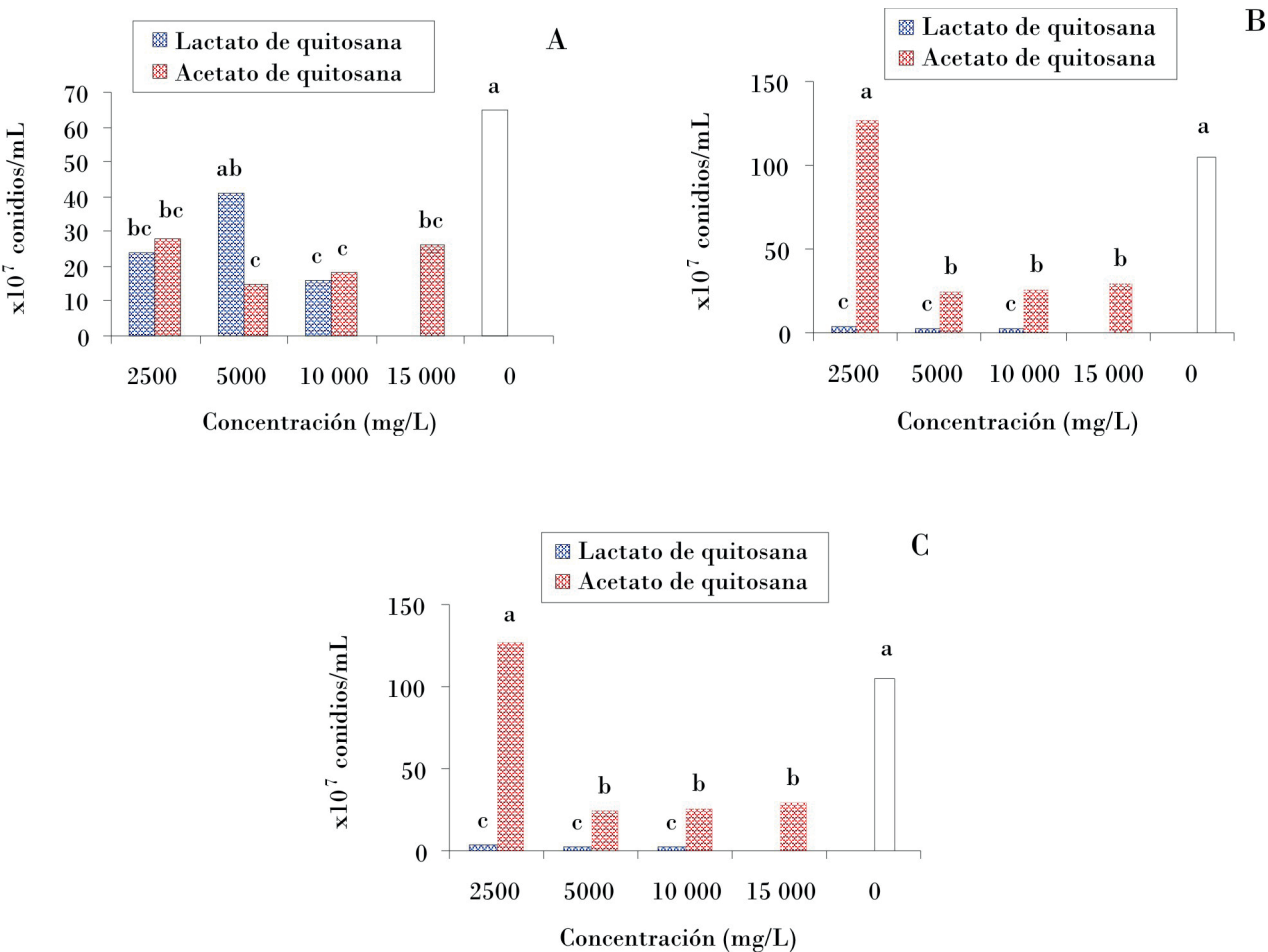
La producción de conidios de *A. alternata* mostró un comportamiento variable; se redujo significativamente para el acetato de quitosana a 5000 mg/L y el lactato de quitosana a 10 000 mg/L en comparación con el testigo; sin embargo, la conidiación se estimuló con

el acetato de quitosana a 15 000 mg/L y con el lactato a 5000 mg/L (Fig. 2 A), aunque no hubo diferencias significativas con las concentraciones más bajas en las dos sales, y sí con el testigo para el acetato. Los resultados en este estudio pudieran deberse al tipo de

quitosana utilizada. Sánchez *et al.* (2007) obtuvieron resultados semejantes con aislados de *A. alternata*, donde el uso de la quitosana al 0,5 y al 1,5 % estimuló la conidiación, y al 2,5 % no hubo conciliación. Esto pudiera deberse a una respuesta del patógeno ante una condición de estrés, como es la utilización de quitosana a concentraciones menores que la letal.

En las dos especies de *Colletotrichum* la esporulación fue significativamente menor con el lactato a 2500 mg/L en comparación con el acetato de quitosana y el testigo (*Fig. 2 B y C*). Con la lactato a

15 000 mg/L no hubo crecimiento de las colonias, por lo que no se produjo esporulación. Por otro lado, la producción de conidios entre las dos especies de *Colletotrichum* presentó un comportamiento diferente; con el acetato de quitosana para el *C. gloeosporioides* fue más baja a partir 5000 mg/L, y el *C. capsici* a 10 000 mg/L. Varios estudios han demostrado el efecto inhibitorio de la quitosana sobre la esporulación de *C. gloeosporioides* y de otros hongos causantes de enfermedades en las plantas [Bautista *et al.*, 2003; Saldívar *et al.*, 2006; Hernández *et al.*, 2007; González *et al.*, 2009].



Las barras representan las medias de la conidiación ± desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas por la Prueba de Tukey ($p \leq 0,05$).

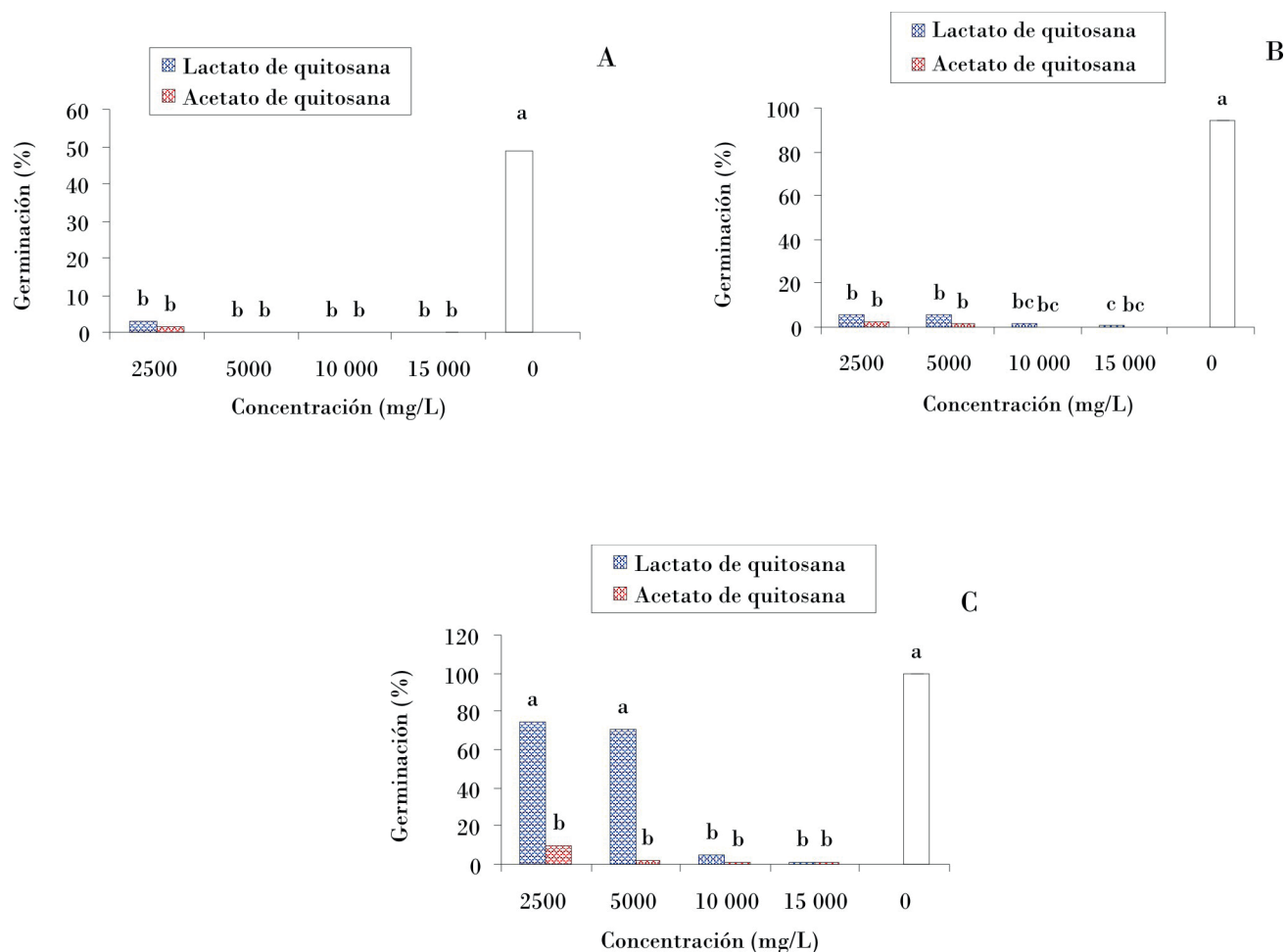
Figura 2. Efecto de las sales de quitosana en la conidiación de *A. alternata* (A), *C. gloeosporioides* (B) y *C. capsici* (C).

A las cuatro, ocho y 24 h, el lactato y acetato de quitosana a las cuatro concentraciones redujeron significativamente la germinación de los conidios de

A. alternata (*Fig. 3 A, B y C*). A las 24 h el porcentaje de germinación de los conidios fue bajo con el acetato a las cuatro concentraciones, y para el lactato fue

a 10 000 mg/L y 15 000 mg/L. Estos resultados no coinciden con los obtenidos por Sánchez *et al.* (2007), quienes encontraron que a las 4 h la germinación de

los conidios de *Alternaria* fue inferior al 50 %, sin considerar las concentraciones de quitosana, aunque a las 10 h se alcanzó el 100 % de conidios germinados.

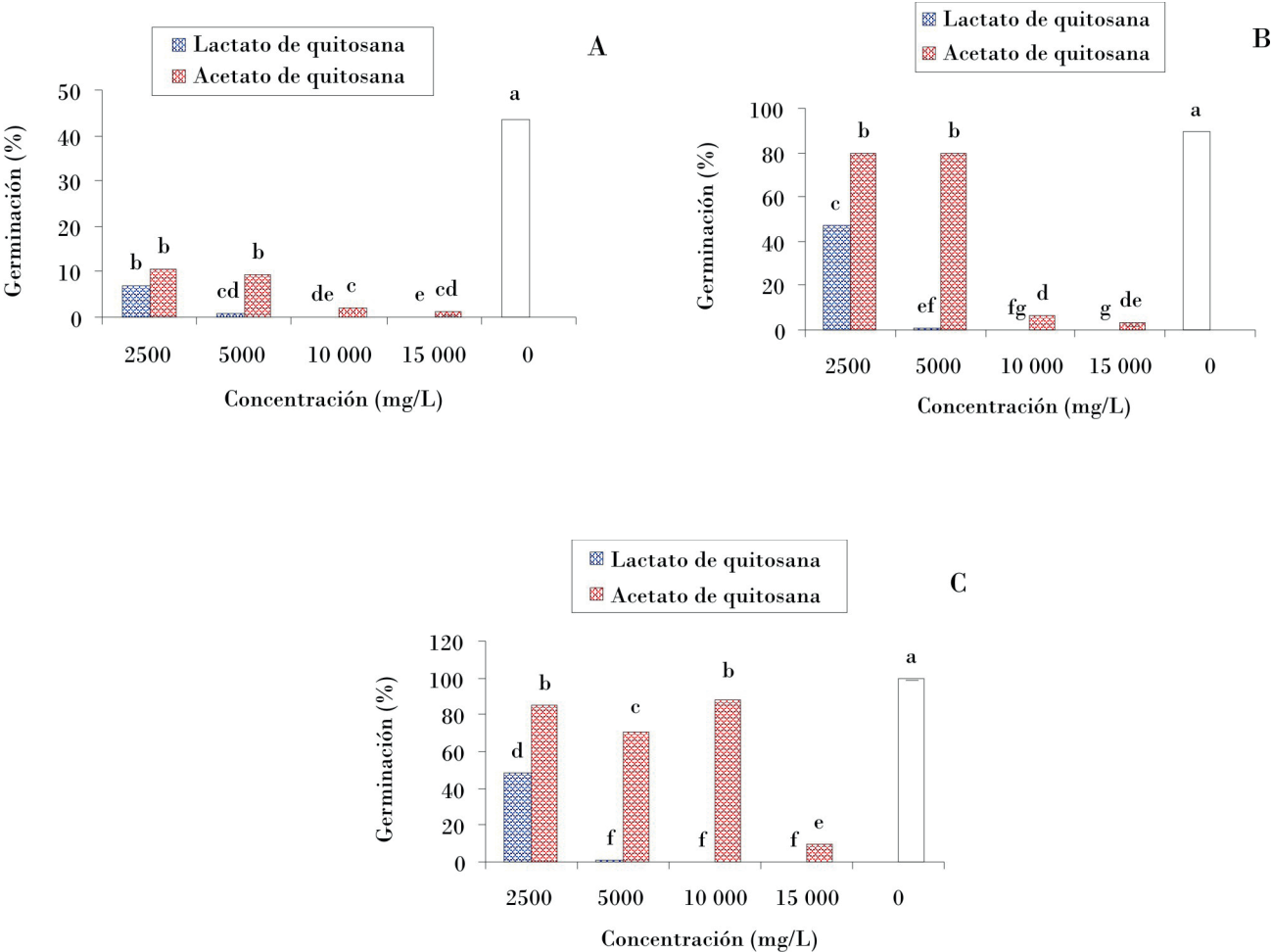


Las barras representan las medias de la germinación $\pm$ desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas por la Prueba de Tukey ($p \leq 0,05$).

Figura 3. Efecto de las sales de quitosana en la germinación de los conidios de *A. alternata* a las cuatro (A), ocho (B) y a las 24 h (C).

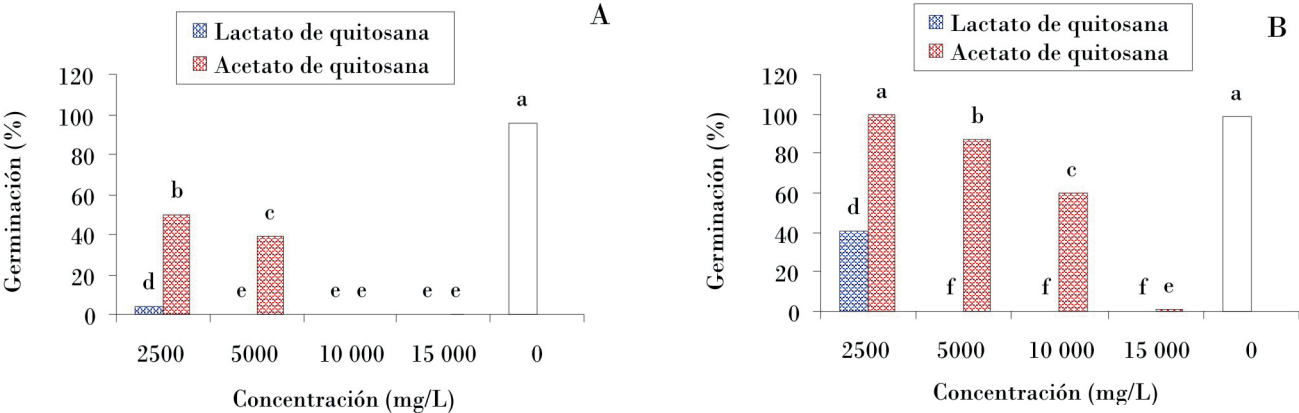
A las cuatro y ocho horas la germinación de los conidios de *C. gloeosporioides* y *C. capsici* fue significativamente menor con las dos sales de quitosana que en el testigo. (Fig. 4 A, B y Fig. 5 A y B). A las 24 h, con el acetato a las cuatro concentraciones, la germinación de los conidios de *C. capsici* fue superior al 60 %, igual que la de *C. gloeosporioides* a 2500, 5000 y 10 000 mg/L, mientras que a 15 000 mg/L fue del 10 %. Los mejores resultados en el control de la germinación se manifestaron con el lactato de

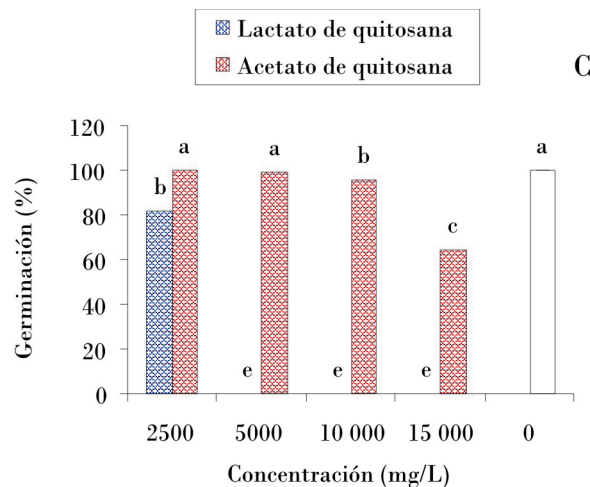
quitosana a 15 000 mg/L para el *C. gloeosporioides*, y para *C. capsici* a partir de 5000 mg/L (Fig. 4 C y Fig. 5 C). En este estudio se logró una disminución de la germinación de las especies de *Colletotrichum* a una concentración menor que la informada por Bautista *et al.* (2005 a), quienes alcanzaron una inhibición total de la germinación de los conidios de aislados de hongos de *C. gloeosporioides* con quitosana Fluka, laboratorio Sigma Aldrich al 2 %. Estas diferencias pudieran deberse al tipo de quitosana utilizadas en ambos estudios.



Las barras representan las medias de la germinación $\pm$ desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas por la Prueba de Tukey ($p \leq 0,05$).

Figura 4. Efecto de las sales de quitosana en la germinación de los conidios de *C. gloesporioides* a las cuatro (A), ocho (B) y a las 24 h (C).





Las barras representan las medias de la germinación. $\pm$ desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas por la Prueba de Tukey ($p \leq 0,05$).

Figura 5. Efecto de las sales de quitosana en la germinación de los conidios de *C. capsici* a las cuatro (A), ocho (B) y a las 24 h (C).

Estos resultados demuestran la especificidad de la quitosana de acuerdo con el género al que pertenecen los hongos y al tipo de quitosana. El solvente orgánico utilizado influye en la actividad antifúngica de la quitosana [Romanazzi *et al.*, 2009].

Varios factores influyen en la bioactividad de la quitosana como su peso molecular, grado de desacetilización, distribución y conformación del grupo acetyl en la cadena molecular de la quitosana, la concentración utilizada, naturaleza policatiónica de la quitosana, efecto inhibitorio en la síntesis de enzimas macerantes producidas por los hongos como la poligalacturonasa, pectil metil esterasa, pectato liasa y celulasa, producción de compuestos fenólicos [Hernández, 2004; Bautista *et al.*, 2005b; Ramos *et al.*, 2011].

Los resultados en este estudio relacionado con la actividad antifúngica de las dos sales de quitosana indican las perspectivas de este bioproducto en el control de los tres hongos causantes de enfermedades en frutos de papaya. Además, brindan una herramienta fundamental para el futuro manejo de estas enfermedades, dadas las exigencias de los mercados en cuanto al consumo de frutas sin residuos químicos.

CONCLUSIONES

- Las sales de quitosana mostraron actividad antifúngica sobre el crecimiento de las colonias, la concentración y la germinación de los conidios de *A. alternata*, *C. capsici* y *C. gloeosporioides*.

- El efecto de las sales de quitosana varía de acuerdo con el género, a la especie y estructura somática y reproductiva de los hongos.
- El lactato de quitosana a 15 000 mg/L presentó una mayor acción inhibitoria del crecimiento de las colonias, conidiación y germinación de los conidios de *C. gloeosporioides*, *C. capsici* y *A. alternata* a las 24 h.

REFERENCIAS

- Abdelbasset, E. H.; R. Lorne; I. El Hadrami; D. Fouad: «Chitosan in Plant Protection», *Mar. Drugs* 8 (4): 968-987, Suiza. 2010.
- Aranguren, M.; O. Herrera; T. Mulkay; M. E. García; J. Rodríguez: «Efecto de los tratamientos de acondicionamiento a frutos de papaya (*Carica papaya* L.) cv Maradol Rojo con destino al turismo en los niveles de pudriciones», XIII Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, sesión Frutas y Hortalizas, Zacatecas 26 y 27 de mayo de 2011. *Rev. Salud Pública y Nutrición*, RESPYN Ed. especial 12 (6): 555-565, México, 2011.
- Bautista, S.; M. Hernández; A. N. Hernández; J. L. Trejo; M. K. Bautista; G. E. Melo: «Effect of Chitosan on *in vitro* Development and Morphology of Two Isolates of *Colletotrichum Gloeosporioides* (Penz.) Penz. and Sacc.», *Revista Mexicana de Fitopatología* 23 (1): 62-67, México, 2005a.
- Bautista, S.; A. N. Hernández; M. G. Velázquez del Valle; E. Bosquez; D. Sánchez: «Quitosano: Una alternativa natural para reducir microorganismos postcosecha y mantener la vida de anaquel de productos hortofrutícola», *Rev. Iberoamericana de Tecnología Postcosecha* 7 (1): 1-6, México, 2005b.
- Bautista, C.; M. Hernández; E. Bosquez; C. Wilson: «Effects of Chitosan and Plant Extracts on Growth of *Colletotrichum gloeosporioides*, Anthracnose Levels and Quality of Papaya Fruit», *Crop Protection* 22 (9): 1087-1092, México, 2003.
- Díaz, R.; A. Casariego; J. Rodríguez; A. Martínez; M. García: «Coberturas de quitosana como método de envasado activo en vegetales enteros y cortados», *Ciencia y Tecnologías de Alimentos*, 20 (2): 31-36, Cuba, 2010.

- Echevarría, A.; M. C. Mirabal; A. Cruz; R. Cárdenas; D. Rivero; A. Rodríguez: «Actividad antifúngica de la quitosana en el crecimiento y esporulación del hongo *Pyricularia grisea* Sacc.», Memorias XVIII Congreso Científico INCA. Mayabeque, 6-9 de noviembre (PBA-O-04), p.102, Cuba, 2012.
- González, D.; A. Cruz; B. Martínez; M. Ramírez; P. Rodríguez: «Actividad antifúngica de la quitosana Sigma frente a hongos fitopatógenos causantes del manchado del grano en el cultivo de arroz (*Oryza Sativa* L.)», *Fitosanidad* 13 (2): 101-107, Cuba, 2009.
- Hernández, A. N.; S. Bautista; M. G. Velázquez; S. L. Rodríguez; M. L. Corona; A. Solano; E. Bósquez: «Potencial del quitosano en el control de las enfermedades postcosecha», *Revista Mexicana de Fitopatología* 23 (2): 198-205, México, 2005.
- Hernández, A. N.; M. Hernández; M. G. Velázquez; M. G. Guerra; G. E. Melo: «Actividad antifúngica del quitosano en el control de *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb. Fr.) Vuill. y *Mucor* spp.», *Rev. Mexicana de Fitopatología* 25 (2): 109-113, México, 2007.
- Hernández, I.: «La quitosana: un producto bioactivo de diversas aplicaciones», *Cultivos Tropicales* 25 (3): 97-110, Cuba, 2004.
- Lárez, C.: «Algunas potencialidades de la quitina y el quitosano para usos relacionados con la agricultura en Latinoamérica», *Revista UDO Agrícola* 8 (1): 1-22, Venezuela, 2008.
- Madushani, E.; A. Ali; M. Maqbool; P. Alderson: «Chitosan Controls Postharvest Anthracnose in Bell Pepper by Activating Defense-Related Enzymes», *Journal of Science and Technology*, DOI 10.1007/s13197-012-0907-5, India, 2012.
- Maqbool, M.; A. Ali; S. Ramachandran; D. Smith; P. Alderson: «Control of Postharvest Anthracnose of Banana Using a New Edible Composite Coating», *Crop Protection*. 29: 1136-1141, EE. UU., 2010. DOI: 10.1016/j.cropro.2010.06.005.
- Mattiuz, B. H.; M. N. Ducamp; C. F. M. Mattiuz; M. Cissé: «Effects of Chitosan on Growth of *Colletotrichum gloeosporioides* and Quality of 'Kent' Mangoes», International Congress of Postharvest Pathology. 11-14 de abril, PC46: 146, España, 2011.
- Mulkay, T.; A. Paumier; M. Aranguren; O. Herrera; O. Alonso; J. González; N. Reyes; I. González: «Determinación y control de las enfermedades fungosas de mayor incidencia durante la poscosecha de la papaya (*Carica papaya* L.)», Memorias I Simposio Internacional de Raíces, Rizomas, Tubérculos, Plátanos, Bananos y Papaya, Recinto Ferial EXPOCENTRO, Complejo Recreativo Arco Iris. Carretera Central. Banda Placetas, Km 303, Santa Clara, Villa Clara, Cuba. 7-10 de noviembre de 2012, MP-0.05.PDF, Cuba, 2011.
- Perez, E.; E. M. Yahia: «Effect of Postharvest Hot Air and Fungicide Treatments on the Quality of "Maradol" Papaya (*Carica papaya* L.)», *J. Food Quality* 27 (2): 127-139, EE. UU., 2004.
- Ramos, L.; T. Montenegro; N. Pereira: «Perspectivas para o uso da quitosana na agricultura», *Revista Iberoamericana de Polímeros* 12 (4): 195-215, España, 2011.
- Romanazzi, G.; F. Mlikota; D. Margosan; B. Mackey; J. Smilanick: «Effect of Chitosan Dissolved in Different Acids on its Ability to Control Postharvest Gray Mold of Table Grape», *Phytopathology* 99 (9): 1028-1036, EE. UU., 2009.
- Saldívar, R.; M. Hernández; F. Hernández: «Activity of *Larrea tridentata* (D.C.) Coville L. Extracts and Chitosan Against Fungi that Affect Horticultural Crops», *Revista Chapingo*, serie Horticultura 12 (2): 211-216, México, 2006.
- Sánchez, B. M. A.; L. M. J. Zavala; N. M. C. López; B. F. Santamaría: «Fungicidas con aprobación internacional para el control postcosecha de la antracnosis en papaya (*Carica papaya* L.)», Memoria del XIV Congreso Nacional de Ciencias Agronómicas, 25 al 27 de abril de 2012. Chapingo, Estado de México, México, 2012.
- Sánchez, D.; S. Bautista; P. Castillo: «Efecto del quitosano en el desarrollo y morfología de *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl», *Anales de Biología* 29: 23-32, México, 2007.
- StatSoft. Inc. Statistica (Data analysis software system) version 6: WWW, StatSoft.com., 2001.
- Vargas, M.; M. Gillibert; C. González-Martínez; A. Albors; A. Chiralt: «Efecto de la aplicación de un film de quitosano en la calidad de fresas durante el almacenamiento», Actas del III Congreso Español de Ingeniería de Alimentos, Pamplona 15-17 de septiembre, España, 2004, pp. 746-753.
- Vázquez, E.; H. Mata; R. Ariza; F. Santamaría: *Producción y manejo postcosecha de papaya Maradol en la Planicie Huasteca*, Libro técnico, INIFAP-CIRNE/A, Campo Experimental Las Huastecas. INIFAP, México, 2010.