

INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO RADIAL “IN VITRO” DE LA *Fusarium verticillioides* EN PRESENCIA DE QUITOSANO

Eber A. Quintana-Obregón¹, Maribel Plascencia-Jatomea¹, Reyna I. Sánchez-Mariñez²,
Ema C. Rosas-Burgos¹, Mario Onofre Cortez-Rocha^{1*}

1) Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos (DIPA) Universidad de Sonora, Rosales y Luis Encinas s/n. Hermosillo, Sonora, México. C.P. 83000. P.O. Box 1658. Correo electrónico: mcortez@guayacan.uson.mx

2) Departamento de Ciencias Químico Biológicas. Universidad de Sonora, Rosales y Luis Encinas s/n. Hermosillo, Sonora, México. C.P. 83000.

Recibido: Agosto de 2009; Aceptado: Abril 2010

RESUMEN

Fusarium verticillioides (= *Fusarium moniliforme* Sheld.) Nirenberg es uno de los hongos más frecuentemente detectado en diversos granos y produce las micotoxinas conocidas como fumonisinas. Las fumonisinas generan una diversidad de efectos biológicos en animales. En humanos se han asociado con altas tasas de cáncer esofageal en lugares del mundo donde el maíz es la principal fuente de alimentos. El objetivo de este estudio fue determinar el efecto inhibitorio del quitosano sobre el crecimiento radial de la *Fusarium verticillioides*. El crecimiento radial fue evaluado utilizando agar papa dextrosa (PDA) con 1,0, 2,0, 3,0, y 4,0 g/L de quitosano de baja, media y alta viscosidad. Los resultados mostraron que el quitosano de baja viscosidad (4 g/L) ($P < 0,05$) presentó la mayor inhibición de crecimiento radial. La concentración requerida para retardar en un 50% (CQ₅₀) el crecimiento radial fue de 3,05 g/L de quitosano de baja viscosidad. Estos resultados indican que el quitosano puede ser una efectiva alternativa natural para el control de la *F. verticillioides*.

Palabras clave: *Fusarium verticillioides*, quitosano, viscosidad.

ABSTRACT

Background: *Fusarium verticillioides* (= *Fusarium moniliforme* Sheld.) Nirenberg is one of the most prevalent fungi which has been detected in commodities worldwide, produces the novel mycotoxins fumonisins. Fumonisins generate a wide range of biological effects in animals. In humans, they have been associated with high rates of esophageal cancer in areas of the world where corn is the main food source.

The aim of this work was to determine the inhibitory effect of chitosan on the radial growth of *Fusarium verticillioides*. The radial extension growth was evaluated using potato dextrose agar (PDA) amended with 1.0, 2.0, 3.0, and 4.0 g/L of commercial chitosan of low, medium and high viscosity. Results showed that low viscosity chitosan (4 g/L) had the highest inhibitory effect ($P < 0.05$) on radial extension growth (75.1%). The concentration required to delay 50% (CQ₅₀) of radial growth was 3.05 g/L of low viscosity chitosan.

These results indicate that chitosan might be a natural and effective alternative for the control of *F. verticillioides*.

Key words: *Fusarium verticillioides*, chitosan, viscosity.

INTRODUCCION

En México, dado el alto consumo de maíz se han realizado estudios sobre la incidencia de la *Fusarium verticillioides* (= *F. moniliforme*) y sus toxinas, donde se describen los riesgos del consumo de maíz contaminado con el hongo y sus metabolitos [1]. Esta situación obliga a la búsqueda de procedimientos que permitan inhibir el crecimiento de *F. verticillioides*. El quitosano representa una potencial alternativa al empleo de agentes químicos para preservar productos agropecuarios contra la contaminación fúngica, como se ha reportado para maíz, tomate y uvas,

entre otros [2-4]. Se ha observado que reduce el crecimiento radial en algunos hongos afectando su morfología y la ultraestructura. Mediante microscopia electrónica se ha demostrado que estas alteraciones ultracelulares están relacionadas con el aumento de la vacuolación, contracción y alteraciones de la membrana plasmática, espesamiento o engrosamiento de la pared celular e incluso agregación citoplasmática [5]. Por lo que en este estudio se evaluó la concentración *in vitro* adecuada para controlar el crecimiento radial *in vitro* de *F. verticillioides*.

PARTE EXPERIMENTAL

Se utilizó un cepa de *F. verticillioides* de la colección del Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos de la *Universidad de Sonora, México*. Se preparó un inóculo en matraces con agar papa dextrosa (PDA) y se incubó durante 5 días a 25°C. Posteriormente se adicionó al inóculo 20 mL de Tween-20 al 0,1% (v/v) estéril y se agitó con barra magnética por 5 minutos. Se determinó la concentración de las esporas suspendidas mediante conteo en una cámara de *Neubauer*.

Se preparó quitosano (*Fluka BioChemika, Japón*) de baja (200 mPa.s), media (200-400 mPa.s) y alta viscosidad (> 400 mPa.s) en ácido acético 0,1 M, con agitación a 25°C hasta disolver completamente y se esterilizaron a 121°C durante 15 minutos. Posteriormente, se prepararon medios de cultivo con agar papa dextrosa (PDA) acidificado con ácido acético 0,1 M estéril mezclado con quitosano y se obtuvieron soluciones de 1, 2, 3 y 4 g/L de quitosano para cada tipo de quitosano y control acidificado con ácido acético 0,1 M (medio PDA sin quitosano). Se vaciaron 20 mL de medio de cultivo en caja *Petri*. Con una pipeta *Pasteur* se hizo un pozo de 0,6 cm de diámetro en el centro de la caja y se depositó una concentración 1×10^5 esporas/mL de inóculo. Se incubó a 25°C y fotoperiodos de 12 horas luz-oscuridad y se midió manualmente dos diámetros de la colonia cada 24 horas por placa. Se calculó el porcentaje de inhibición de crecimiento radial con la ecuación descrita por *Plascencia-Jatomea et al.* [6]. El ensayo se hizo por triplicado.

Además, se determinó la concentración mínima de quitosano para retardar el crecimiento del hongo un 50%, con respecto al control (CQ₅₀) obtenida de crecimiento radial. Se analizaron los datos y obtuvieron curvas de crecimiento radial con el programa *Microsoft EXCEL 2000*. Así mismo, se realizaron análisis de varianza (ANOVA) y prueba de *Tukey* con el programa estadístico *SPSS 8.0*. El análisis *Probit* se realizó utilizando el programa estadístico *NCSS 2000* (NCSS Inc., USA) para obtener el valor CQ₅₀.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de la evaluación del crecimiento radial mostraron que los quitosanos de alta, media y baja viscosidad inhiben el crecimiento radial del hongo con respecto al control (PDA acidificado). Se encontró diferencia significativa ($P \leq 0,05$) entre los tratamientos con quitosano y el control en el crecimiento radial. En las Figuras 1-3 se presentan las cinéticas de crecimiento radial de *F. verticillioides* para cada tipo de quitosano.

Además, se encontró diferencia significativa ($P \leq 0,05$) en el porcentaje de inhibición del crecimiento radial en los tratamientos con quitosano de alta, media y baja viscosidad en todos los tratamientos con quitosano (Tabla 1).

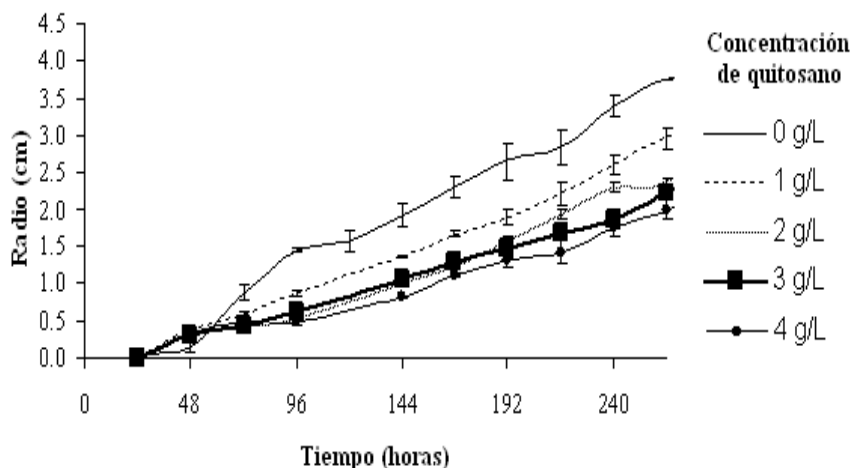


Figura 1. Efecto de la concentración de quitosano de alta viscosidad sobre el radio de la colonia de *Fusarium verticillioides* en PDA a 25°C.

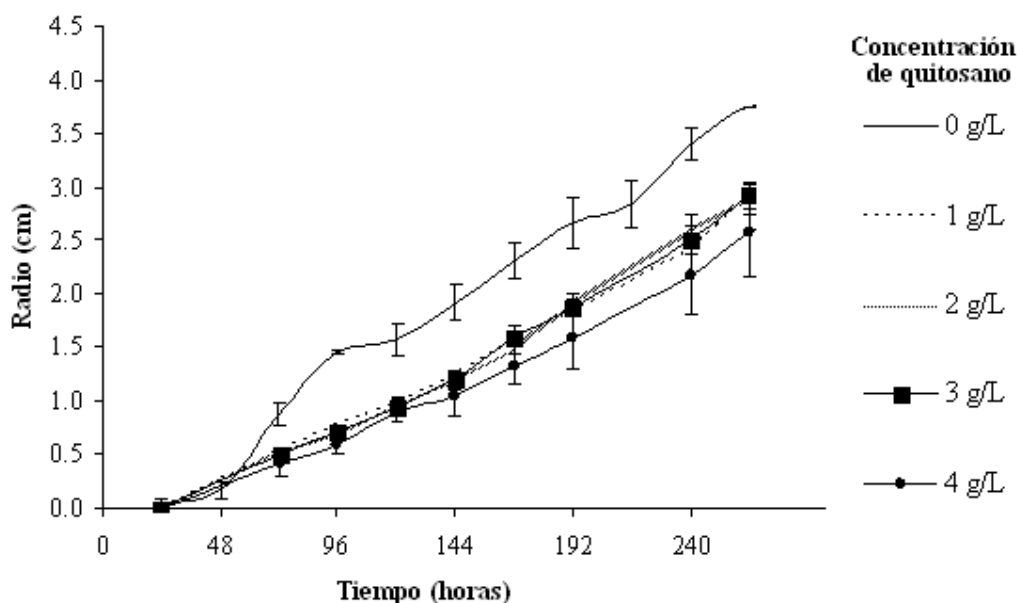


Figura 2. Efecto de la concentración de quitosano de media viscosidad sobre el radio de la colonia de *Fusarium verticillioides* en PDA a 25°C.

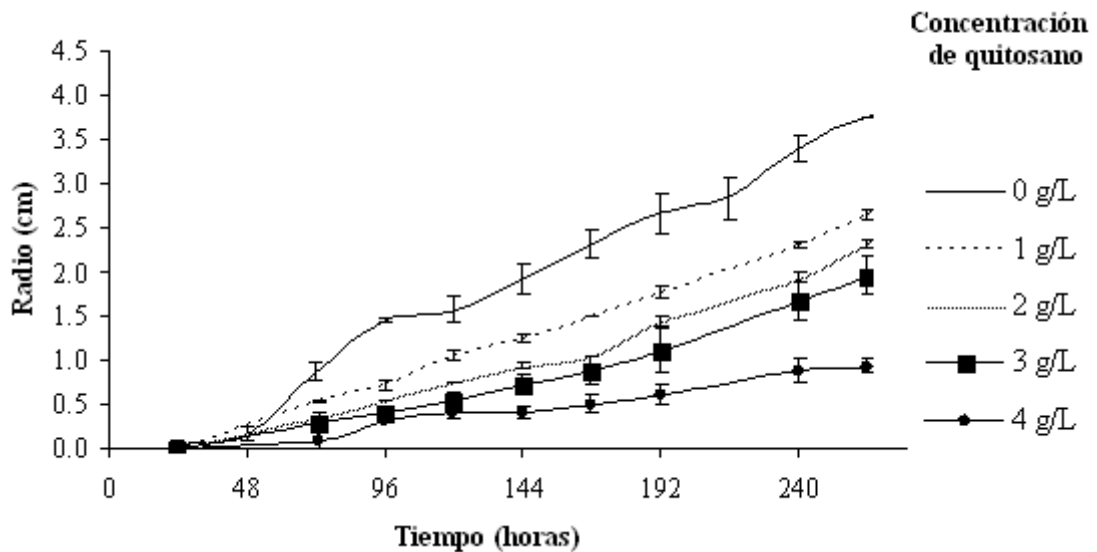


Figura 3. Efecto de la concentración de quitosano de baja viscosidad sobre el radio de la colonia de *Fusarium verticillioides* en PDA a 25°C.

Tabla 1. Efecto de la concentración de quitosano sobre la inhibición de crecimiento radial de *Fusarium verticillioides* en PDA con tratamientos de quitosano de alta, media y baja viscosidad a las 264 horas, con respecto a un control al 100% de crecimiento radial a 25°C.

<i>Concentración de quitosano en medio PDA</i>	<i>% inhibitorio</i>		
	<i>QAV</i>	<i>QMV</i>	<i>QBV</i>
0 g/L (PDA con ácido acético 0,1M)	0 ^a	0 ^a	0 ^a
1 g/L	21 ± 11 ^{ab}	38 ± 2 ^b	29 ± 1 ^a
2 g/L	37 ± 2 ^{bc}	29 ± 0 ^b	39 ± 1 ^b
3 g/L	40 ± 2 ^{bc}	29 ± 1 ^b	48 ± 6 ^b
4 g/L	47 ± 4 ^c	47 ± 13 ^b	75 ± 2 ^c

Valores promedio de tres replicas. QAV = quitosano de alta viscosidad, QMV = quitosano de media viscosidad, QBV = quitosano de baja viscosidad. Diferente superíndice (dentro de cada columna) indican diferente grupo estadístico ($P \leq 0,05$).

El tratamiento de mayor efectividad fue el quitosano de baja viscosidad a una concentración de 4 g/L, retardando el crecimiento radial del hongo un $75 \pm 2\%$ y su velocidad de extensión radial (obtenida de la pendiente de la recta de cinéticas de crecimiento radial) fue de 80 ± 20 micras/hora ($R = 0,974 \pm 0,011$), mientras que en el control se obtuvo una velocidad de 160 ± 10 micras/hora ($R = 0,990 \pm 0,002$). El quitosano de alta viscosidad en concentración de 1 g/L, fue el menos inhibitorio con una inhibición del $21 \pm 11\%$ y la velocidad de extensión radial fue de 100 ± 5 micras/hora ($R = 0,964 \pm 0,001$). Así mismo, las velocidades de extensión radial no presentaron diferencia

significativa ($P > 0,05$) entre los quitosanos (alta, media y baja viscosidad), pero sí hay diferencia significativa ($P \leq 0,05$) entre quitosanos y control.

Mediante análisis *Probit* se calculó la CQ_{50} para quitosanos de alta y baja viscosidad. Este indicó que el quitosano comercial más efectivo para controlar el crecimiento radial del hongo es el de baja viscosidad, en una concentración de 3,05 g/L cantidad con la cual es posible reducir en un 50% el crecimiento de *F. verticillioides* a las 264 horas con respecto a un control, mientras que para el quitosano de alta viscosidad la CQ_{50} fue de 4,056.

Estos resultados concuerdan con la inhibición encontrada en presencia de quitosano para otras especies de hongos. *Benhamou et al.* [7] reportan que en concentraciones menores a 1 g/L hay inhibición de crecimiento de *Fusarium oxysporum*. *Bautista-Baños et al.* [8] encontró inhibición en presencia de quitosano sobre el crecimiento de *Fusarium oxysporum*, *Penicillium digitatum* y *Rhizopus stolonifer*. Mientras que *Neven et al.* [9] reporta inhibición de crecimiento de *Fusarium oxysporum* conforme se incrementaba la dosis y encontraron que en *Trichoderma harzianum* causa mutaciones genéticas en la colonia, visibles en el cambio de la coloración de la colonia en medio PDA.

Por otra parte, *El Ghaouth et al.* [10] reportan inhibición en presencia de quitosano de jaiba mayor al 50%, a una concentración de 3 g/L a las 168 horas para *Botrytis cinerea* y para *Rhizopus stolonifer* a las 72 horas, reportan que altas concentraciones de quitosano inducen cambios morfológicos caracterizado por un excesivo engrosamiento de la hifa y atribuyen reducción de la inhibición a la propiedad fungistática del quitosano y no fungicida debido a la producción de enzimas de defensa.

Las variaciones sobre el crecimiento radial con respecto a las concentraciones de quitosano y tipo de quitosano, se pueden atribuir a la adaptación del hongo, por las diferencias de la viscosidad, grado de desacetilación y el tamaño molecular [4]. *Laflamme et al.* [5] reportaron mediante estudios microscópicos que el quitosano altera la morfología fúngica al estar el hongo en contacto con el quitosano.

Además, se ha propuesto que la interacción de las cargas positivas del quitosano con las cargas negativas de la membrana celular, causa aglutinaciones que alteran la permeabilidad de la célula [11,12]. Así mismo, el quitosano presenta propiedades quelantes que atrapan metales necesarios para el crecimiento. También persiste el modelo de que el quitosano interacciona con el DNA inhibiendo la síntesis de RNA mensajero y de proteínas [13].

Una vez adaptado el hongo, la viscosidad del quitosano no afecta la velocidad de crecimiento radial, lo que parece indicar que el quitosano afecta la fase inicial del crecimiento del hongo, es decir, durante la germinación de la espora [6].

CONCLUSIONES

El tratamiento más efectivo para controlar el crecimiento radial de *F. verticillioides in vitro* en medio PDA acidificado en un 50% es el quitosano de baja viscosidad. Además, se calculó la CQ_{50} de quitosano de baja viscosidad, que es de 3 g/L, la cual se recomienda utilizar para evaluar el efecto sobre germinación de esporas y producción de micotoxinas producidas por *F. verticillioides in vitro* y valorar el uso de quitosano para tratamiento preventivo de control.

Agradecimientos. Estudio apoyado con recursos del proyecto 58249 financiado por CONACYT: “Evaluación de la actividad antifúngica *in vitro* de extractos vegetales y quitosano y de su impacto en la producción de micotoxinas por *Fusarium verticillioides* y *Aspergillus flavus*”.

BIBLIOGRAFÍA

1. Cortez-Rocha MO, Gil-León ME, Suárez-Jiménez MG, Rosas-Burgos EC, Sánchez-Mariñez RI, Burgos-Hernández A, Lozano-Taylor J, Cinco Moroyoqui FJ “Occurrence of fumonisin B1 and hydrolyzed fumonisin B1 in Mexican nixtamalized cornmeal”, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **74**, 73 (2005)
2. Bhaskara RMV, Arul J, Angers P, Couture L “Chitosan treatment of wheat seeds induces resistance to *Fusarium graminearum* and improves seed quality”, *J. Agric. Food. Chem.*, **47**, 1208 (1999)
3. Cuero RG, Duffus E, Osuji G, Pettit R “Aflatoxin control in preharvest maize: effects of chitosan and two microbial agents”, *J. Agr. Sci.*, **117**, 165 (1991)
4. Romanazzi G, Nigro FA, Ippolito A, DiVenere D, Salerno M “Effects of pre-and postharvest chitosan treatments to control storage grey mold of table grapes”, *J. Food. Sci.*, **67**, 1862 (2006)
5. Laflame P, Benhamou N, Bussières G, Dessureault M “Differential effect of chitosan on root fungal pathogens forest nurseries”, *Can. J. Bot.*, **77**, 1460 (1999)
6. Plascencia-Jatomea M, Viniegra G, Olayo R, Castillo-Ortega MM, Shirai K “Effect of chitosan and temperature on spore germination of *Aspergillus niger*”, *Macromol. Biosci.*, **3**, 582 (2003)
7. Benhamou N, Lafontaine PJ, Nicole M “Induction of systemic resistance to *Fusarium* crown and root rot in tomato plants by seed treatment with chitosan”, *Phytopathology* **84**, 1432 (1994)
8. Bautista-Baños S, Hernández-López M, Bosquez-Molina E “Growth inhibition of selected fungi by chitosan and plant extracts”, *Rev Mexican de Fitopatología*, **22**, 178 (2004)
9. Neven AA, Abd-El-Aal S, Sahab AF “The mutagenic activity of chitosan and its effect on the growth of *Trichoderma harzianum* and *Fusarium oxysporum* F. sp. sesame”, *J. Appl. Sciences Research*, **3**, 450 (2007)
10. El Ghaouth A, Arul G, Asselin A “Antifungal activity of chitosan on two postharvest pathogens of strawberry fruits”, *Phytopathology*, **82**, 398 (1992)
11. Chan V, Mao H-Q, Leong KW “Chitosan-induced perturbation of dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine membrane bilayer”, *Langmuir*, **17**, 3749 (2001)
12. Fang N, Chan V, Mao H-Q, Leong KW. Interactions of phospholipids bilayer with chitosan: effect of molecular weight and pH”, *Biomacromol.*, **2**, 1161 (2001)
13. Rabea EI, Badawy MET, Stevens CV, Smaghe G, Steurbaut W “Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action”, *Biomacromolecules*, **4**, 1457 (2003)