

Actividad Antifúngica del Quitosano Contra *Alternaria tenuissima* *in vitro* y en Semilla de Cártamo

Antifungal Activity of Chitosan *in vitro* Against *Alternaria tenuissima* and Safflower Seeds

Eber Addí Quintana Obregón, Jaime López Cervantes, Luis Alberto Cira Chávez, Dalia Sánchez Machado, Departamento de Biotecnología y Ciencias Alimentarias, Instituto Tecnológico de Sonora, Calle Antonio Caso s/n, Col. Villa ITSON, Cd. Obregón, Son., CP 85130, México; Maribel Plascencia Jatomea y Mario Onofre Cortez Rocha, Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos Universidad de Sonora, Blvd. Luis Encinas y Rosales s/n, Col. Centro, Hermosillo, Son., CP 83000, México. Correspondencia: mcortez@guayacan.uson.mx

(Recibido: Enero 03, 2011 Aceptado: Marzo 09, 2011)

Quintana OEA, López CJ, Cira CLA, Sánchez MD, Plascencia JM y Cortez RMO. 2011. Actividad antifúngica del quitosano contra *Alternaria tenuissima in vitro* y en semilla de cártamo. Revista Mexicana de Fitopatología 29:168-171.

Resumen. Se evaluó el efecto de 3.4 g L⁻¹ de quitosano (46.31 kDa) sobre *Alternaria tenuissima* aislada de semillas de cártamo variedad S-518. El porcentaje de incidencia de semillas infectadas por *Alternaria* sembradas en PDA fue de 19.5%. El quitosano incorporado en PDA, inhibió la germinación de esporas en 90.2% a las 24 h con respecto al control ácido y el crecimiento radial de la colonia a las 216 h fue disminuido. La incidencia de *A. tenuissima* en semillas tratadas con quitosano por 30 min y cultivadas en PDA no mostró diferencia significativa (P<0.05) con respecto a los controles. El quitosano no disminuyó el porcentaje de germinación de semillas de cártamo con respecto al control.

Palabras clave adicionales: *Carthamus tinctorius*, *Alternaria tenuissima*, germinación de semilla.

La presencia del género *Alternaria* en cártamo es de ocurrencia natural; algunas especies utilizan semillas infectadas como medio de propagación, como es *A. carthami* la especie patógena de mayor importancia (Mortensen *et al.*, 1983). Este género se ha aislado en siembras comerciales de cártamo (*Carthamus tinctorius*) cultivado en el Valle del Yaqui, en Sonora; además, estudios recientes han demostrado la presencia de *Ramularia acroptili* y *A. tenuissima* (datos no publicados) en lesiones de hojas de cártamo infectadas con la falsa cenicienta. El objetivo de este estudio fue evaluar la actividad antifúngica del quitosano sobre el crecimiento de *Alternaria tenuissima in vitro* y en semilla de cártamo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Todos los ensayos se realizaron a 25°C y fotoperiodos de 12 h. El pH se ajustó con NaOH 1 N. Se

Abstract. The effect of 3.4 g L⁻¹ of chitosan (46.31 kDa) on *Alternaria tenuissima* isolated from safflower variety S-518. The incidence rate of seeds planted in *Alternaria* infected PDA was 19.5%. Chitosan incorporated in PDA inhibited the germination of spores in 90.2% at 24 h with respect to the acid and the control of the colony radial growth at 216 h was decreased. The incidence of *A. tenuissima* in seeds treated with chitosan for 30 min and cultured on PDA showed no significant difference (P<0.05) compared to controls. Chitosan did not decrease the percentage of safflower seed germination over control.

Additional key words: *Carthamus tinctorius*, *Alternaria tenuissima*, seed germination.

The presence of *Alternaria* in safflower is naturally occurring and some species use seeds as a means of spreading infection, such as *A. carthami* the most important pathogenic species (Mortensen *et al.*, 1983). This genus has been isolated from commercial plantings of safflower (*Carthamus tinctorius*) grown in the Yaqui Valley, Sonora, in addition, recent studies have demonstrated the presence of *Ramularia acroptili* and *A. tenuissima* (unpublished data) in safflower leaf lesions infected with false powdery mildew. The objective of this study was to evaluate the antifungal activity of chitosan on the growth of *Alternaria tenuissima in vitro* and safflower seed.

MATERIALS AND METHODS

All assays were performed at 25°C and photoperiod of 12 h. The pH was adjusted with 1 N NaOH were performed in triplicate, were obtained averages and standard deviation. Analyses of variance (ANOVA) with JMP statistical software version 5.0 (SAS Institute Inc., USA) and significance level of P<0.05.

Isolation. 200 safflower seeds (S-518) were disinfected from, crop of 2008 in the Yaqui Valley, Sonora Mexico with 0.5% NaOCl (v / v) for 2 min, water was drained, washed for 3 min and dried for 30 min in

Se realizaron por triplicado, se obtuvieron promedios y desviación estándar. Se hicieron análisis de varianza (ANOVA) con el programa estadístico JMP versión 5.0 (SAS Institute Inc., USA) y nivel de significancia $P < 0.05$.

Aislamiento. Se desinfectaron con NaOCl al 0.5% (v/v) por 2 min 200 semillas de cártamo (S-518) de cultivos del 2008 en el Valle del Yaqui, Sonora, México, se eliminó o decantó éste, se lavaron durante 3 min y secaron por 30 min en campana de flujo laminar. Las semillas se distribuyeron al azar en placas de Petri (10 semillas por placa) de 90 mm de diámetro con PDA y se incubaron a 25°C. Se identificaron las colonias desarrolladas sobre las semillas a las 96 h y se obtuvieron aislados de las colonias de mayor incidencia mediante resiembras en PDA hasta obtener colonias con características morfológicas idénticas; posteriormente se identificó el aislado con base a la descripción de Robert *et al.* (2005). La especie fue confirmada mediante alineamiento genómico de acuerdo a la base de datos del National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) a partir de un cultivo de 72 h en caldo papa dextrosa. El alineamiento fue realizado en el Centro de Biotecnología Genómica del Instituto Politécnico Nacional (Reynosa, Tam., México).

Germinación de esporas y crecimiento radial. Se trabajó con esporas suspendidas en solución Tween 20 (0.1% v/v) de cultivos de siete días. Se tomaron alícuotas de 25 µL de suspensión con 10^4 esporas para todos los ensayos. Se preparó solución de quitosano (Aldrich lote: 04924LH, 46.31 kDa) en ácido acético 0.05M, se esterilizó y dejó enfriar a 45°C. La solución se mezcló con PDA y se depositaron 10 mL de mezcla en placas de Petri de 60 mm de diámetro. La concentración final de quitosano fue de 3.4 g L^{-1} . Como controles se utilizó PDA (control H_2O) y PDA con ácido acético 0.05 M (control ácido). El pH final de los tratamientos fue de 5.6 ± 0.2 . Para germinación de esporas, se distribuyeron 10^4 esporas sobre la superficie del medio de cultivo y se incubaron. Se tomaron muestras aleatorias cada 24 h hasta llegar al 90-100% de esporas germinadas en controles. Se determinó el porcentaje inhibición de germinación de esporas con respecto al control ácido con la técnica descrita por Plascencia-Jatomea *et al.* (2003). En la técnica de crecimiento radial se hizo un pozo de 6 mm de diámetro en el centro de la placa de Petri con medio de cultivo y se inoculó con 10^4 esporas. Se incubó y midió manualmente el radio de la colonia a intervalos de tiempo (12 y 24 h) hasta que la colonia en los medios controles cubrió el 80-90% de la superficie de la placa.

Protección de semillas. Se preparó una solución con 3.4 g L^{-1} de quitosano-ácido acético (0.05M) y controles (agua destilada y solución de ácido acético 0.05M). Se ajustó el pH a 5.6 ± 0.2 , se agitaron por 30 min y se llevó a autoclave. Doscientas semillas seleccionadas al azar se sumergieron en la solución de quitosano por 3 min y se secaron a temperatura ambiente en campana de flujo laminar por 30 min. Las semillas fueron sembradas en placas de Petri con PDA (10 semillas por placa) y a las 96 h se determinó el porcentaje de incidencia de semillas infectadas por *Alternaria*. También se evaluó un tiempo de remojo de semillas de 30 min. Además, se calculó el porcentaje de

laminar flow hood. The seeds were randomly distributed in Petri dishes (10 seeds per plate) of 90 mm in diameter with PDA and incubated at 25°C. We identified the colonies developed on seeds at 96 h and isolated by reseeded higher incidence in PDA to obtain colonies with identical morphological features, the isolate was subsequently identified based on the description of Robert *et al.* (2005). The species was confirmed by genomic alignment according to the database of the National Center for Biotechnology Information from 72 h culture in potato dextrose broth. The alignment was performed at the Genomics Biotechnology Center, National Polytechnic Institute (Reynosa, Tam., Mexico).

Spore germination and radial growth (in vitro evaluation). We worked with spores suspended in solution Tween 20 (0.1% v/v) crop of seven days. Aliquots of 25 µl of spore suspension with 10^4 for all tests. Chitosan solution was prepared (Aldrich Lot: 04924LH, 46.31 kDa) in 0.05M acetic acid, sterilized and cooled to 45°C. The solution was mixed with PDA and deposited 10 mL of mixture in Petri dishes 60 mm in diameter. The final concentration of chitosan was 3.4 g L^{-1} . PDA was used as controls (control H_2O) and PDA with 0.05 M acetic acid (acid control). The final pH treatments was 5.6 ± 0.2 . For spore germination, 10^4 spores were distributed on the surface of the culture medium and incubated. Random samples were taken every 24 h until the spores germinated 90-100% in controls. We determined the percentage inhibition of spore germination with respect to control acid with the technique described by Plascencia-Jatomea *et al.* (2003). The radial growth technique was a well of 6 mm in diameter in the center of the Petri dish with culture medium and inoculated with 10^4 spores. Was incubated and manually measured radius of the colony at time intervals (12 and 24 h) until the colony covered in the media controls 80-90% of the surface of the plate.

Seed protection. A solution with 3.4 g L^{-1} of chitosan-acetic acid (0.05M) and controls (distilled water and 0.05M acetic acid solution). pH was adjusted to 5.6 ± 0.2 , stirred for 30 min and was autoclave. Two hundred randomly selected seeds were immersed in the chitosan solution for 3 min and dried at room temperature in laminar flow hood for 30 min. The seeds were sown in Petri dishes with PDA (10 seeds per plate) and 96 h was determined the percentage of infected seeds incidence of *Alternaria*. We also evaluated a seed soaking time of 30 min. In addition, we calculated the percentage of seed germination.

RESULTS AND DISCUSSION

The isolated from seed was identified and confirmed by genomic alignment with the *A. tenuissima* (NCBI:gb | FJ755240.1 |, gb | FJ755196.1 | and gb | FJ755194.1 |). The percentage of germination of spores at 24 h was 99 ± 1.32 , 60 ± 1.7 , and $5.83 \pm 1.2\%$ in H_2O control, acid control and chitosan, respectively (Figure 1), showing significant difference between treatments ($P < 0.05$). The percentage inhibition of spores in PDA-chitosan with respect to acid control was $90.2 \pm 2.1\%$ at 24 h. In radial growth (Figure 2), significant differences ($P < 0.05$) between treatments at 216 h, being the radius of the colony was 34 ± 0.21 ,

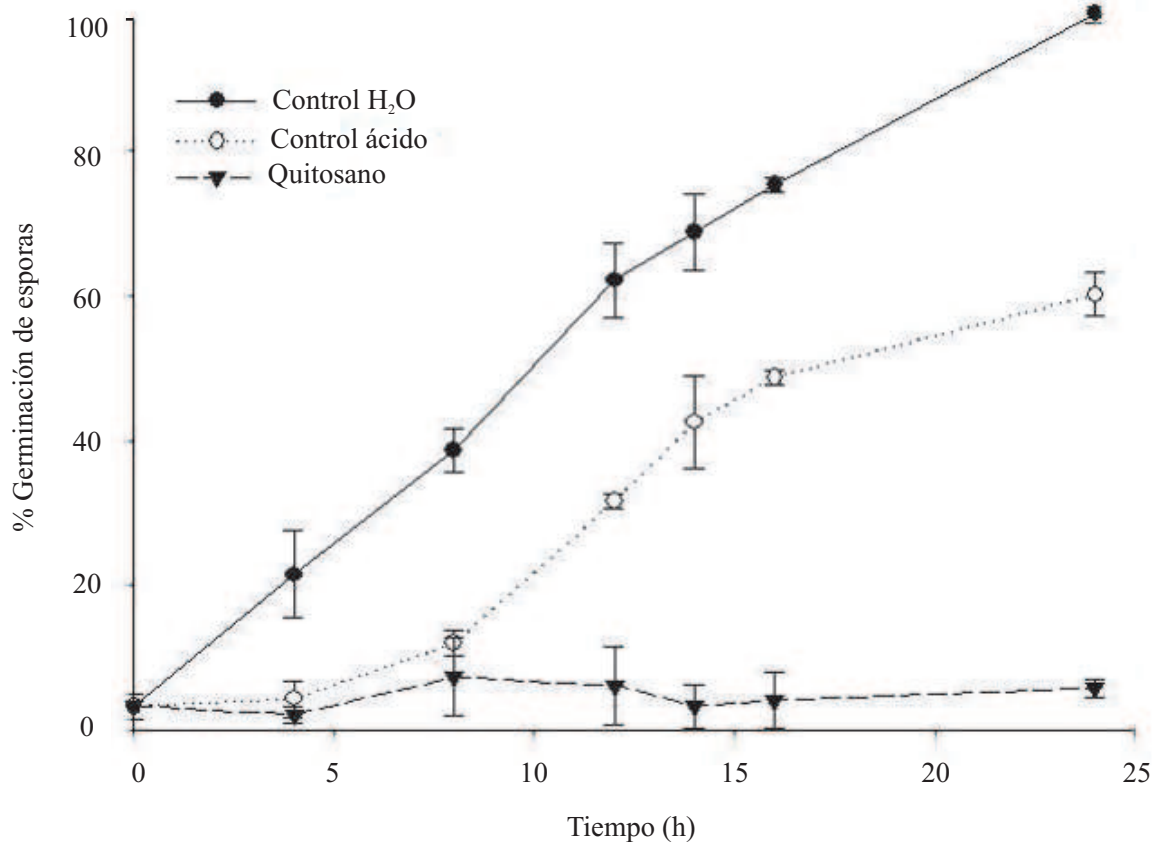


Figura 1. Porcentaje de germinación de esporas de *A. tenuissima* en medio PDA controles y PDA con quitosano (3.4 g L^{-1}) a 25°C y fotoperiodos de 12 h.

Figure 1. Germination of spores of *A. tenuissima* in controls and PDA medium with chitosan (3.4 g L^{-1}) at 25°C and photoperiod of 12 h.

germinación de semillas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El aislado de semillas fue identificado y confirmado por alineamiento genómico con la especie *A. tenuissima* (NCBI; gb|FJ755240.1|, gb|FJ755196.1| y gb|FJ755194.1|). El porcentaje de germinación de esporas a las 24 h fue de 99 ± 1.32 , 60 ± 1.7 y $5.83 \pm 1.2\%$ para control H_2O , control ácido y quitosano, respectivamente (Figura 1), mostrando diferencia significativa entre tratamientos ($P < 0.05$). El porcentaje de inhibición de germinación de esporas en PDA-quitosano con respecto al control ácido fue de $90.2 \pm 2.1\%$ a las 24 h. En crecimiento radial (Figura 2), se encontraron diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los tratamientos a las 216 h, siendo el radio de la colonia 34 ± 0.21 , 26 ± 0.63 y 2.81 ± 0.61 mm para control H_2O , control ácido y quitosano, respectivamente. El porcentaje de incidencia de semillas infectadas por *Alternaria* en control H_2O fue de $19.5 \pm 3\%$ y no se encontró diferencia ($P < 0.05$) entre controles y quitosano. Tampoco hubo diferencia significativa entre los tiempos de remojo de semillas. Con respecto a la

26 ± 0.63 , and 2.81 ± 0.61 mm in H_2O control, acid control chitosan, respectively. The percentage of infected seeds incidence of *Alternaria* in H_2O control was $19.5 \pm 3\%$ and there was no difference ($P < 0.05$) between controls and chitosan. There was also no significant difference between the times of soaking seeds. With regard to the germination of seeds, soak treatment with chitosan did not affect, significantly ($P < 0.05$), percentage of germination of $89.83 \pm 5.3\%$ in H_2O control.

CONCLUSIONS

Chitosan inhibited spore germination and radial growth *in vitro* of *A. tenuissima* and did not affect seed germination percentage. Moreover, chitosan can be used to control fungus on crops where this species is important pathogens.

LITERATURA CITADA

67:1187-1190.
Plascencia-Jatomea M, Viniegra G, Olayo R, Castillo-Ortega MM and Shirai K. 2003. Effect of chitosan and

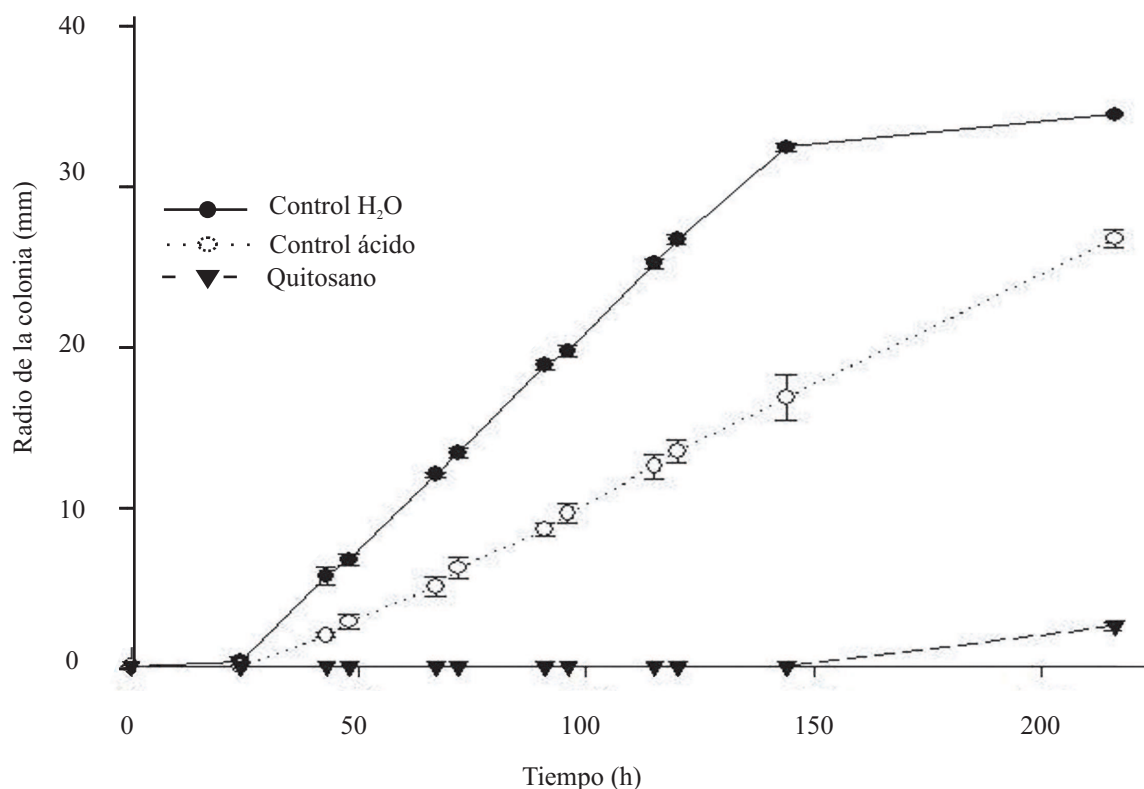


Figura 2. Crecimiento radial de colonias de *A. tenuissima* en medio PDA controles y PDA con quitosano (3.4 g L^{-1}) a 25°C y fotoperiodos de 12 h.

Figure 2. Radial growth of colonies of *A. tenuissima* in controls and PDA medium with chitosan (3.4 g L^{-1}) at 25°C and photoperiod of 12 h.

germinación de semillas, el tratamiento de remojo con quitosano no afectó significativamente ($P < 0.05$), con porcentaje de germinación de semillas de $89.83 \pm 5.3\%$ en control H_2O .

CONCLUSIONES

El quitosano inhibió la germinación de esporas y el crecimiento radial *in vitro* de *A. tenuissima* y no afectó el porcentaje de germinación de semillas. Por otra parte, es posible utilizar el quitosano para el control del hongo en cultivos donde esta especie sea de importancia fitopatógena.

temperature on spore germination of *Aspergillus niger*. *Macromolecules Bioscience* 3:582-586.

Robert V, Stegehuis G and Stalpers J. 2005. The MycoBank engine and related databases. <http://www.mycobank.org> (consulta, enero 2011).

Mortensen K, Bergman JW and Burns EE. 1983. Importance of *Alternaria carthami* and *A. alternata* in causing leaf spot diseases of safflower. *Plant Disease*