

# EFFECTO DE QUITOSANO EN EL CRECIMIENTO *IN VITRO* DE *THECAPHORA FREZII*

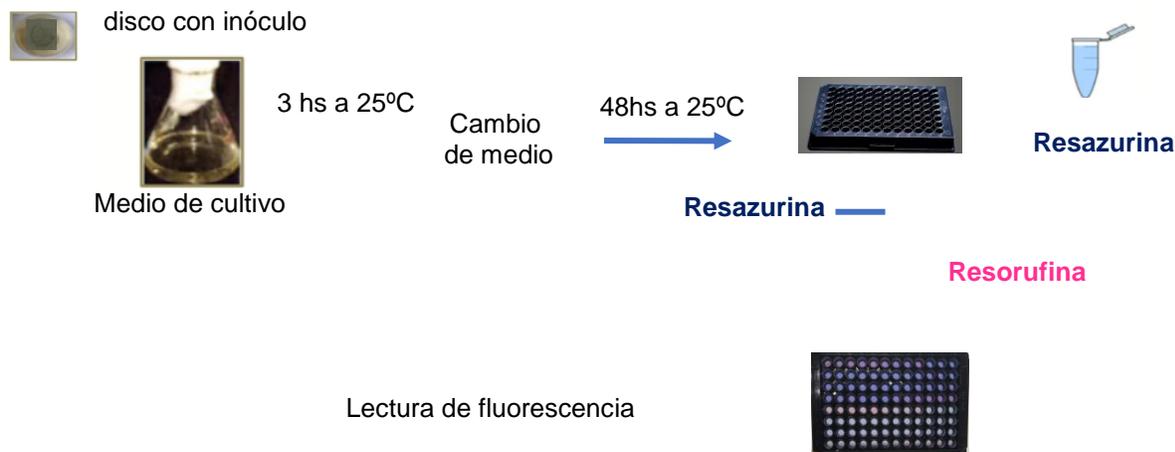
Merino M.C.<sup>1</sup>, Paccioretti M.A.<sup>1</sup>, Díaz M.S.<sup>2</sup>, Figueroa A.C.<sup>2</sup>, Paredes J.A.<sup>1</sup>, Rago A.M.<sup>3</sup>  
1-IPAVE - UFyMA. CIAP-INTA. 2-CEPROCOR. 3-CIAP-INTA  
merino.cecilia@inta.gob.ar

## Introducción

Quitosano es un biopolímero policatiónico obtenido a partir de la deacetilación parcial de la quitina, y presenta propiedades biológicas únicas que le otorgan un gran potencial de uso tanto en agricultura como en medicina. Este biopolímero no es tóxico para mamíferos y animales superiores, y estimula la respuesta de defensa de las plantas frente a estrés biótico y abiótico. Desde que Allan y Hadwiger en 1979, mostraron por primera vez el efecto antifúngico de quitosano, este biopolímero ha atraído la atención de numerosos investigadores con el propósito de evaluar la sensibilidad de diferentes hongos frente a este compuesto. Se ha visto que quitosano de bajo peso molecular y alto grado de deacetilación es más efectivo para inhibir el crecimiento de hongos patógenos. El objetivo del presente trabajo fue analizar el efecto de quitosano como inhibidor del crecimiento *in vitro* del hongo *Thecaphora frezii*, agente causal de la enfermedad del carbón del maní.

## Materiales y Métodos

Quitosano es insoluble en agua, por lo que previo a su uso en medio de cultivo se prepararon soluciones madres de quitosano de bajo peso molecular en ácido acético con pH 5,5. El cultivo puro de un aislamiento de *T. frezii* fue mantenido en placas de APD (Agar Papa Dextrosa), las que se prepararon vertiendo 5 ml de APD en placas petri de 60 mm X 15mm. Las placas con el hongo fueron mantenidas en oscuridad a 25 °C. Para realizar los inóculos en medio líquido, se tomaron discos de 4 mm de diámetro de micelio en activo crecimiento de las placas de APD con *T. frezii* de 7 días de cultivo, se colocaron en medio líquido CPD (Caldo Papa Dextrosa), se agregaron distintas concentraciones de quitosano de bajo peso molecular, y se incubó en agitación a 25°C por 3 hs (Figura 1). Al cabo de ese tiempo se eliminó el medio de cultivo, se realizó un lavado con CPD, se agregó medio CPD nuevo y se incubó por 48 hs en agitación a 25°C. En paralelo se procesaron controles a los que se les agregó el inóculo y ácido acético a la misma concentración que la empleada para diluir quitosano. Luego de 48hs, el medio líquido con el inóculo se colocó en tubos, se centrifugó, luego se descartó el sobrenadante, y se resuspendió en 2ml de CPD. De cada tubo se tomaron 150ul y se colocaron en placa de 96 pocillos aptas para análisis de fluorescencia. Luego se agregó, en cada pocillo de la placa, 50ul de resazurina previamente preparada de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La resazurina es un colorante redox que, en forma oxidada es de color azul no fluorescente, mientras que al reducirse a resorufina cambia su color a rosa fluorescente. Esta característica hace que resazurina sea de gran utilidad para evaluar actividad metabólica, y por lo tanto dar cuenta de la viabilidad celular. Este colorante tiene la ventaja de ser soluble en agua, no tóxica, y estable en el medio de cultivo. La lectura de la fluorescencia se realizó en un lector de microplacas a una longitud de excitación de 560 nm y una longitud de emisión de 600 nm. El efecto de quitosano para cada concentración se evaluó por triplicado. El análisis estadístico fue realizado mediante un modelo lineal, y la comparación entre tratamientos se hizo mediante test de Fisher ( $p < 0.05$ ).

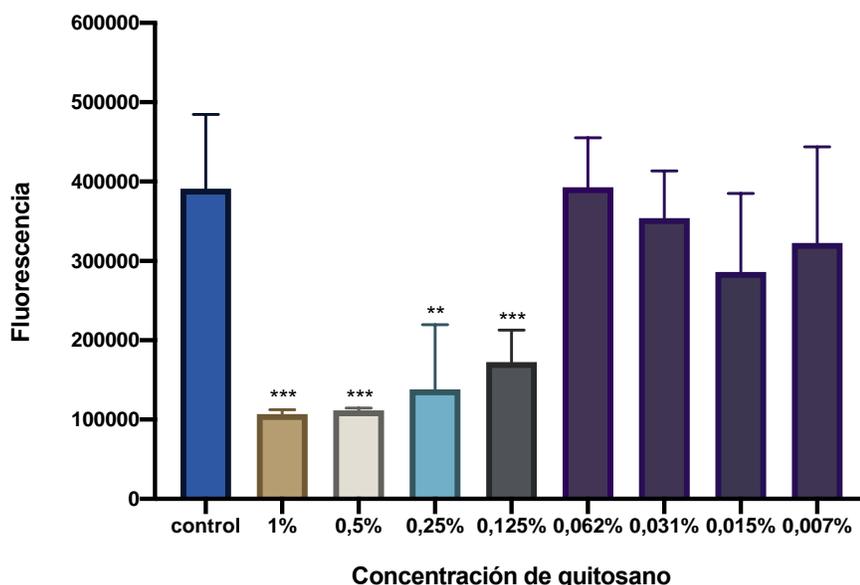


Adaptado de Chadke y Kale, 2015

Figura 1. Esquema experimental

## Resultados y discusión

Cuando se emplearon concentraciones de quitosano de 1%, 0,5%, 0,25%, y 0,125% se observó una disminución significativa en el crecimiento de *T. frezii* comparado con el control sin quitosano (Figura 2). No se observaron diferencias significativas cuando las concentraciones de quitosano utilizadas fueron menores a 0,125%. Teniendo en cuenta que la sensibilidad a este biopolímero depende de la fluidez de la membrana plasmática del patógeno (Palma-Guerrero *et al.*, 2010), el efecto inhibitorio de quitosano en el crecimiento del hongo *T. frezii* podría estar relacionado a la composición de la membrana de este patógeno. Es además importante destacar que, de acuerdo al diseño experimental que se empleó en el presente trabajo, es necesario un tiempo corto de contacto entre el hongo y quitosano para observar el efecto inhibitorio de este biopolímero sobre *T. frezii*. Si bien existen en el mercado formulaciones con quitosano para uso en agricultura como fertilizante y estimulante del sistema de defensas en plantas, los resultados obtenidos muestran el efecto inhibitorio directo de este biopolímero en el crecimiento de *T. frezii*.



**Figura 2.** Evaluación de la viabilidad celular de *T. frezii* frente a quitosano a través del análisis de fluorescencia en microplaca. Los datos se muestran como la media más la desviación estándar de tres réplicas. Los asteriscos indican diferencia significativa comparado con el control (\*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ )

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que quitosano de bajo peso molecular, y alto grado de deacetilación inhibe el crecimiento de *Thecaphora frezii in vitro*, aún a concentraciones menores a 1% , que es la concentración empleada previamente por otros investigadores frente a diferentes hongos patógenos. Estudios futuros sobre el mecanismo de acción de quitosano en *T. frezii* son de gran importancia para el empleo de este biopolímero como posible antifúngico.

### Bibliografía

Chadha, S., Kale, S. P. *Letters in applied microbiology*. 2015. 61(3), 238-244.

Palma-Guerrero, J., Lopez-Jimenez, J. A., *et al. Molecular microbiology*. 2010. 75(4), 1021-1032.

Financiamiento: Ministerio de Ciencia y Tecnología de Córdoba. Fundación Maní Argentino