

## PROTECCIÓN CONTRA ESTRÉS BIÓTICO INDUCIDA POR QUITOSÁN EN PLÁNTULAS DE MAÍZ (*Zea mays* L.)\*

### BIOTIC-STRESS PROTECTION INDUCED BY CHITOSAN IN MAIZE (*Zea mays* L.) SEEDLINGS

Eva Guadalupe Lizárraga-Paulín<sup>1</sup>, Irineo Torres-Pacheco<sup>2</sup>, Ernesto Moreno-Martínez<sup>3</sup> y Susana Patricia Miranda-Castro<sup>1§</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Biotecnología. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. UNAM. Campo 1, Av. Primero de Mayo s/n. Cuautitlán Izcalli, Estado de México, México. C. P. 54740. <sup>2</sup>Facultad de Ingeniería. Ingeniería de Biosistemas. Universidad Autónoma de Querétaro. Cerro de las Campanas s/n. Col. Las Campanas, Querétaro, México. C. P. 76010. <sup>3</sup>Unidad de Investigación en Granos y Semillas. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. UNAM. Av. Jorge Jiménez Cantú s/n, Cuautitlán Izcalli, Estado de México, México. C. P. 54740. <sup>§</sup>Autora para correspondencia: spmcunam55@gmail.com.

#### RESUMEN

El maíz (*Zea mays* L.) es un cultivo importante en México, que es a menudo afectado por la presencia de hongos patógenos. El objetivo de este estudio fue determinar el efecto protector del quitosán en plántulas de maíz sometidas a estrés biótico. El experimento se llevó a cabo en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM, durante 2008. Para cumplir el objetivo, después de algunas pruebas de calidad, tres grupos de semillas fueron sometidos por separado a los ataques de *Aspergillus flavus* y *Fusarium moniliforme*. Un primer grupo fue considerado como testigo positivo, otro fue recubierto con solución de quitosán y un último grupo fue dañado mecánicamente antes de la aplicación del biopolímero. Durante cinco semanas, el crecimiento de las plántulas se evaluó midiendo la longitud total, longitud de las hojas, de los tallos y el grosor de estos. No hubo incremento significativo en el tamaño de las plántulas, provenientes de semillas recubiertas con quitosán al compararse con el resto de los grupos; sin embargo, la ausencia de enfermedades en las plántulas tratadas con el biopolímero fue evidente. En la quinta semana de crecimiento, las estructuras foliares de las plántulas se sembraron en agar PDA, para determinar la presencia de los hongos estresantes. Se encontró que las hojas provenientes de las semillas tratadas con quitosán, desarrollaron carga

#### ABSTRACT

Maize (*Zea mays* L.) is an important crop in Mexico, which is often affected by the presence of pathogenic fungi. The objective of this paper was to determine the protective effect of chitosan in maize seedlings subjected to biotic stress. The experiment was conducted at the School of Advanced Studies Cuautitlán, UNAM, in 2008. In order to achieve the aim, after some quality tests, three groups of seeds were separately subjected to attacks by *Aspergillus flavus* and *Fusarium moniliforme*. A first group was considered as a positive control, another was coated with chitosan solution and, a final group was mechanically damaged before application of the biopolymer. For five weeks, the seedling growth was evaluated by measuring the total length, length of leaves, stems and, their thickness. There was no significant increase in the size of seedlings from seeds coated with chitosan when compared to the other groups, but, the absence of diseases in the seedlings treated with the biopolymer was quite evident. In the fifth week of growth, leaf structures of the seedlings were planted in agar PDA in order to determine the presence of stressful-fungi. It was found that, leaves from the seeds treated with chitosan developed no fungal burden, suggesting that,

\* Recibido: enero de 2011  
Aceptado: septiembre de 2011

fúngica nula, lo que sugiere que el quitosán actúa como un activador de mecanismos de defensa en plántulas de maíz, impidiendo la infección por los hongos patógenos utilizados.

**Palabras clave:** *Aspergillus flavus*, *Fusarium moniliforme*, *Zea mays* L., biopolímero.

## INTRODUCCIÓN

El maíz (*Zea mays* L.) es el cereal más abundante en el mundo. Su importancia a nivel nacional y mundial radica en las grandes áreas de tierra cultivada y la gran cantidad de empleos directos e indirectos generados por la cadena de producción, procesamiento industrial y comercialización de dicho cereal, desde que es cultivado hasta que es consumido por los seres humanos y los animales (Jeglay, 2006). A nivel mundial, Estados Unidos de América es el mayor productor de maíz, generando 307 383 552 toneladas al año, seguido de China que produce 166 035 097 toneladas. México ocupa el tercer lugar produciendo 24 320 100 toneladas por año (FAOSTAT, 2009).

Con el fin de hacer frente a la desnutrición y mejorar la productividad de maíz, los investigadores han trabajado con maíz QPM (maíz de alta calidad proteica, por sus siglas en inglés), el cual tiene un alto valor nutritivo ya que contiene hasta 100% más lisina y triptófano que el maíz común, siendo equivalente su calidad proteica a la leche (Bressani, 1994; Cuevas *et al.*, 2003; Huang *et al.*, 2004; Espinosa *et al.*, 2005). Sin embargo, este cereal es más susceptible a ser atacado por bacterias y hongos que el maíz ordinario debido a su alto contenido de proteína, que lo convierte en una buena fuente de carbohidratos para el crecimiento microbiano (Badu y Fontem, 2010).

En México, los cultivos de maíz son mayormente afectados por la presencia de *Aspergillus flavus* y *Fusarium moniliforme*. Estos hongos crecen produciendo deterioro al vegetal y generando metabolitos secundarios tóxicos para las plantas y sus consumidores (tanto humanos como animales), que pueden tener efectos graves sobre la salud hasta provocar la muerte (Keeler y Anthony, 1983; Fandohan *et al.*, 2005; Denli y Pérez, 2006; Bennet *et al.*, 2007).

*Aspergillus flavus* se encuentra a menudo en las semillas o en los productos de la planta después de la cosecha y durante el almacenamiento, por lo que también se encuentra en la harina, los granos del cereal y otros productos vegetales

chitosan acts as an activator of defense mechanisms in maize seedlings, preventing infection by the pathogenic fungi.

**Key words:** *Aspergillus flavus*, *Fusarium moniliforme*, *Zea mays* L., biopolymer.

## INTRODUCTION

Maize (*Zea mays* L.) is the most abundant cereal in the world. Its importance to national and international level lies in the large areas of cultivated-land and, the many direct and indirect jobs generated by the production, industrial processing and marketing of the cereal, from the moment it's grown until it is consumed by humans and animals alike (Jeglay, 2006). Worldwide, the United States of America is the largest producer of maize, producing about 307 383 552 tons per year, followed by China, which produces around 166 035 097 tons. Mexico ranks third, producing 24.3201 million tons per year (FAOSTAT, 2009).

In order to address malnutrition and improve maize productivity, researchers have worked with QPM (quality protein maize high), which has a high nutritional value and, containing up to 100% more lysine and tryptophan than regular maize, being equivalent in protein quality to milk (Bressani, 1994; Cuevas *et al.*, 2003; Huang *et al.*, 2004; Espinosa *et al.*, 2005). However, rice is more susceptible to being attacked by bacteria and fungi than regular corn, because of its high protein content, making it a good source of carbohydrates for microbial growth (Badu and Fontem, 2010).

In Mexico, maize crops are most affected by the presence of *Aspergillus flavus* and *Fusarium moniliforme*. These fungi grow causing deterioration to the crop and generate secondary toxic metabolites for consumers (both, human and animal), which can have serious health effects that may lead to death (Keeler and Anthony, 1983; Fandohan *et al.*, 2005; Denli and Pérez, 2006, Bennet *et al.*, 2007).

*Aspergillus flavus* is often found in seeds or plant products after the harvest and during storage, so that is also found in flour, cereal grains and other processed vegetables. *Aspergillus flavus* is a pathogen and is an opportunistic fungus that causes diseases to humans and animals due to the production of some mycotoxins called aflatoxins. The

procesados. *Aspergillus flavus* es un patógeno de plantas y es un hongo oportunista que causa enfermedades a humanos y animales debido a la producción de algunas micotoxinas llamadas aflatoxinas. Las aflatoxinas B1, B2, B2a, G1, G2 y M1 son cancerígenas, hepatotóxicas, teratogénicas y moléculas inmunosupresoras (Widstrom, 1996; Bolet y Socarrás, 2005; Bennet *et al.*, 2007). *Fusarium moniliforme* también produce metabolitos secundarios nocivos conocidos como fumonisinas, incluyendo las B1 y B2, que son los más importantes debido a sus efectos en la salud del consumidor (Reid *et al.*, 1999; Fandohan *et al.*, 2005).

Las plantas cuentan con una gran cantidad de mecanismos de defensa a nivel celular y molecular para combatir el ataque de organismos patógenos o condiciones medioambientales adversas. Los genes de resistencia proveen mecanismos por los cuales la planta reconoce al patógeno y desencadena respuestas de defensa en contra de este (Boyes *et al.*, 1996). Sin embargo, algunos mecanismos también pueden ser estimulados por la adición de otras moléculas que favorecen el desarrollo de respuestas de defensa, tal es el caso de los “elicitors”, que son agentes inductores de mecanismos de defensa que promueven la percepción y transducción de señales biológicas para activar respuestas a nivel celular (Hahn, 1999; Angelova *et al.*, 2006).

El quitosán es uno de los elicitors más importante dentro del grupo de los oligosacáridos, porque es un biopolímero que se encuentra naturalmente en las paredes celulares de algunos hongos; sin embargo, su principal fuente de obtención es la hidrólisis de quitina en medio alcalino a altas temperaturas (Muzzareli y Muzzareli, 2005). El quitosán es muy conocido por sus propiedades antimicrobianas, y puede ser utilizado en forma de solución, películas, esferas, hidrogeles, nanopartículas, fibras y recubrimientos, por lo que es útil para muchas aplicaciones en diferentes áreas, tales como la química de alimentos, mediante el recubrimiento de frutas y vegetales para su conservación (Lárez, 2003; Devlieghere *et al.*, 2004; Miranda, 2004).

El quitosán constituye una promesa en la preservación de semillas (destinadas tanto al consumo como a la siembra), ya que algunos investigadores han encontrado efectos favorables como producto de su aplicación. Por ejemplo, Guan *et al.* (2009) encontraron un incremento en la germinación de semillas de maíz estresadas por modificaciones en la temperatura del entorno y recubiertas con quitosán, así como mayores dimensiones en las plantas provenientes de las semillas tratadas comparadas con

aflatoxins B1, B2, B2a, G1, G2 and M1 are carcinogenic, hepatotoxic, teratogenic and immunosuppressive molecules (Widstrom, 1996; Bolet and Socarrás, 2005, Bennet *et al.*, 2007). *Fusarium moniliforme* also produces harmful secondary metabolites known as fumonisins, including the B1 and B2, which are the most important because of their effects on the consumer’s health (Reid *et al.*, 1999; Fandohan *et al.*, 2005).

The plants have a lot of defense mechanisms at cellular and molecular levels to engage the attack of pathogens or adverse environmental conditions. The resistance genes provide mechanisms by which the plant recognizes the pathogen and triggers defense responses against it (Boyes *et al.*, 1996). However, some mechanisms can also be stimulated by the addition of other molecules that promote the development of defense responses, as in the case of “elicitors”, which are agents that induce defense mechanisms that promote the perception and, signal transduction to activate biological responses at cellular level (Hahn, 1999; Angelova *et al.*, 2006).

The chitosan is one of the most important elicitors in the group of oligosaccharides, it is a biopolymer that it’s found naturally in the cell walls of some fungi, but their main source of production is the hydrolysis of chitin in alkaline medium to high temperatures (Muzzareli and Muzzareli, 2005). Chitosan is well known for its antimicrobial properties and, can be used in solution, films, spheres, hydrogels, nanoparticles, fibers and coatings, making it useful for many applications in different areas, such as food chemistry by coating fruits and vegetables for their conservation (Lárez, 2003; Devlieghere *et al.*, 2004; Miranda, 2004).

Chitosan is a promise in the preservation of seeds (for both consumption and sowing), as some researchers have found positive effects as a result of its application. For example, Guan *et al.* (2009) found an increase in seed germination of maize stressed by changes in ambient temperature and coated with chitosan, as well as larger plants from the treated seeds, compared to those without treatment, while Reddy *et al.* (1999) found years before, that wheat seeds previously treated with the biopolymer were resistant to certain diseases and increased its quality and germination capacity.

Other similar work, reported a favorable decrease in the number of pathogenic fungi in stored-seeds previously coated with the biopolymer, as well as a decrease in the

aquellas sin tratamiento alguno; mientras que Reddy *et al.* (1999) encontraron años antes que las semillas de trigo, previamente tratadas con el biopolímero, presentaban resistencia a ciertas enfermedades propias del cereal e incrementaban su calidad y capacidad de germinación.

Otros trabajos similares, reportan una disminución favorable en la cantidad de hongos patógenos en las semillas almacenadas previamente recubiertas con el biopolímero, así como también un decremento en la cantidad de micotoxinas desarrolladas en el grano incluso bajo condiciones de alta humedad (Bhaskara *et al.*, 1999; Rivero *et al.*, 2004; Rodríguez *et al.*, 2006).

Una de las necesidades más importantes en la agricultura no es sólo la protección de las semillas, sino también de las plántulas contra las enfermedades causadas por hongos patógenos. Se cree que el quitosán tiene la capacidad de inducir la acumulación masiva de sustancias fungitóxicas en el lugar de aplicación, y también actúa como una barrera para impedir el flujo de nutrientes al patógeno. Además, la aplicación de quitosán ha mostrado efectos positivos en la capacidad germinativa de las semillas y en el crecimiento de las raíces y hojas de las plantas (Bhaskara *et al.*, 1999; Rivero *et al.*, 2004; Rodríguez *et al.*, 2006).

El objetivo de este estudio fue determinar el efecto protector del quitosán en plántulas de maíz sometidas a estrés biótico. Para precisar la viabilidad de esta investigación, primeramente se evaluó (*in vitro*), el efecto del biopolímero como recubrimiento en las semillas de maíz sobre su crecimiento, germinación, vigor y humedad. Posteriormente, se evaluó (*in vivo*) el efecto del quitosán como recubrimiento en las semillas sobre la germinación y el crecimiento (grosor de tallos, longitud total, longitud de hojas y tallos) de las plántulas bajo condiciones de invernadero. Por último, se evaluó cualitativamente (*in vitro*) el efecto potencial del quitosán como protector en las hojas de las plántulas de maíz durante su crecimiento, para determinar si desarrolla mecanismos de defensa contra el estrés biótico impuesto mediante la presencia de *Aspergillus flavus* y *Fusarium moniliforme*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Para este experimento, se emplearon semillas de maíz QPM (LM8M L-8) originarias de Celaya, Guanajuato, México, con un contenido de humedad 11.7% y un porcentaje

amount of mycotoxins in grain developed even under conditions of high humidity (Bhaskara *et al.*, 1999; Rivero *et al.*, 2004; Rodríguez *et al.*, 2006).

One of the most important needs in agriculture is not only the protection of seeds or seedlings, but also against diseases caused by pathogenic fungi. It is believed that, chitosan has the ability to induce massive accumulation of fungitoxic substances at the site of application and, also acts as a barrier to prevent the flow of nutrients to the pathogen. Furthermore, the application of chitosan has shown positive effects on seed germination and growth of roots and leaves of the plants (Bhaskara *et al.*, 1999; Rivero *et al.*, 2004; Rodríguez *et al.*, 2006).

The objective of this paper was to determine the protective effect of chitosan in maize seedlings subjected to biotic stress. To clarify the feasibility of this research, the effect of the biopolymer as a coating on maize seeds growth, germination, vigor and moisture were first evaluated (*in vitro*). Subsequently, we evaluated (*in vivo*) the effect of chitosan as a coating on the seeds on germination and growth (stem thickness, total length, length of leaves and stems) of seedlings under regular greenhouse conditions. Finally, we assessed qualitatively (*in vitro*) the potential effect of chitosan as a protector in the leaves of maize seedlings during their growth, to determine if it develops defense mechanisms against biotic stress imposed by the presence of *Aspergillus flavus* and *Fusarium moniliforme*.

## MATERIALS AND METHODS

For this experiment we used QPM maize seeds (LM8M L-8) from Celaya, Guanajuato, Mexico, with a moisture content of 11.7% and a germination rate of 100%. For the coating of the seeds, chitosan obtained from shrimps' exoskeletons was used, with a molecular weight of 1 836 277 g mol<sup>-1</sup> and a degree of deacetylation of 95%, which was produced and characterized in our laboratory without further purification (Miranda, 2000).

In order to establish the conditions of biotic stress in seeds of maize, we used two fungal species: *Aspergillus flavus* strain UNIGRASASP68 (aflatoxin-producing species) obtained from corn cobs in El Bajío area and, the strain of *Fusarium moniliforme* UNIGRASFUS44

de germinación de 100%. Para el recubrimiento de las semillas, se empleó quitosán obtenido de exoesqueletos de camarón, con un peso molecular de  $1\ 836\ 277\ \text{g mol}^{-1}$  y un grado de desacetilación de 95%, el cual fue producido y caracterizado en nuestros laboratorios sin mayor purificación (Miranda, 2000).

Para establecer las condiciones de estrés biótico en las semillas de maíz, se emplearon dos especies fúngicas: la cepa de *Aspergillus flavus* UNIGRASASP68 (especie productora de aflatoxinas) obtenida de mazorcas de maíz procedentes de la zona del Bajío, y la cepa de *Fusarium moniliforme* UNIGRASFUS44 (especie productora de fumonisinas) obtenida de mazorcas de maíz procedentes del Estado de Michoacán, México. Ambas cepas fueron proporcionadas por la Unidad de Investigación en Granos y Semillas (UNIGRAS) de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM.

### Preparación del recubrimiento

Se preparó una solución de quitosán (QN) al 2%, disolviendo 10g del biopolímero en 500 mL de agua acidificada con ácido acético (Química Meyer S. A de C. V, Tláhuac, D. F., México). El pH se ajustó a 5 con una solución de hidróxido de sodio al 12% (JT Baker, Xalostoc, Estado de México, México), y se mantuvo con agitación constante durante 24 h. Cabe mencionar que el quitosán fue empleado a ésta concentración de acuerdo a pruebas previas hechas a nivel *in vitro* en nuestro laboratorio, en donde se encontró que, a una concentración de 2% p/v, se lograba la total inhibición de los hongos bajo estudio (Miranda *et al.*, 2007).

### Pruebas *in vitro*

**Recubrimiento de las semillas.** Se dividieron las semillas en cinco grupos; el primer grupo fue el testigo. El segundo grupo de semillas se sumergió en la solución de quitosán durante cinco minutos con agitación constante, se filtró y se secó a temperatura ambiente ( $25\ ^\circ\text{C} \pm 1$ ). Los grupos tres y cuatro, fueron sumergidos en una mezcla de quitosán al 2% y Polietilenglicol (PEG) 4 000 al 0.3% y al 0.6% respectivamente (Droguería Cosmopolita, Naucalpan, Estado de México, México); después de 5 min, también fueron filtrados y secados a temperatura ambiente. El quinto grupo de semillas fue tratado igual que el segundo grupo, pero éste último fue secado en estufa a  $29\ ^\circ\text{C}$  durante 24 h.

(fumonisin-producing species) obtained from corn cobs in the State of Michoacán, Mexico. Both strains were provided by the Research Unit of Grains and Seeds (UNIGRAS) of the School of Advanced Studies Cuautitlán, UNAM.

### Preparation of the coating

A solution of chitosan (QN) 2% was prepared, dissolving 10g of the biopolymer in 500 mL of water acidified with acetic acid (Química SA de C. V. Meyer, Tláhuac, City Mexico). The pH was adjusted to 5 with a sodium hydroxide solution 12% (JT Baker, Xalostoc, State of Mexico, Mexico) and, kept under constant stirring for 24 h. It is noteworthy that, chitosan was used at this concentration, according to the tests made at a previous *in vitro* experiment in our laboratory, where it was found that, a concentration of 2% w/v, achieved complete inhibition of the fungi under study (Miranda *et al.*, 2007).

### *In vitro* tests

**Seeds coating.** The seeds were divided into five groups: the first one was control. The second one was immersed in a chitosan solution for five minutes with constant stirring, filtered and dried at room temperature ( $25\ ^\circ\text{C} \pm 1$ ). The groups three and four were immersed in a mixture of 2% chitosan and polyethylene glycol (PEG) 4 000 at 0.3% and 0.6% respectively (Drugstore Cosmopolitan, Naucalpan, Estado of Mexico, Mexico); after 5 min, they were also filtered and dried at room temperature. The fifth group of seeds was treated like the second one, but the latter was dried in an oven at  $29\ ^\circ\text{C}$  for 24 h.

**Quality testing of seeds.** The first test consisted to determine the moisture content in the seed by the oven drying method (ISTA, 1986; ISTA, 1993). The second one was standard germination (ISTA, 1986; ISTA, 1993), where each treatment was used for groups of 50 seeds of corn, which were incubated at  $25\ ^\circ\text{C}$  for four days and, then count the total seed germinated, normal plants, abnormal plants, dead seeds and hard seeds. Then, it was performed a germination and vigor test to determine the length of the plumules (ISTA, 1986; ISTA, 1993), in which groups of 25 seeds were incubated at  $25\ ^\circ\text{C}$  for seven days to get the average length of the plumule. All the tests were performed in triplicate.



**Pruebas de calidad de las semillas.** La primera prueba consistió en determinar el contenido de humedad en la semilla por el método de secado en estufa (ISTA, 1986; ISTA, 1993). La segunda prueba fue de germinación estándar (ISTA, 1986; ISTA, 1993), en donde para cada tratamiento se emplearon grupos de 50 semillas de maíz, los cuales fueron incubados a 25 °C durante cuatro días y finalmente contar el total de las semillas germinadas, de plantas normales, anormales, semillas muertas y semillas duras. Después se llevó a cabo una prueba de germinación y vigor para determinar la longitud de las plúmulas (ISTA, 1986; ISTA, 1993), en la cual se emplearon grupos de 25 semillas que fueron incubados a 25 °C durante siete días para obtener los promedios de longitud de las plúmulas. Todas las pruebas se realizaron por triplicado.

### Pruebas *in vivo*

**Recubrimiento de las semillas.** El tratamiento aplicado a las semillas en esta parte del experimento, consistió en sumergir las semillas en la solución de quitosán al 2% por 5 min y secarlas a 29 °C en estufa por 24 h. Este estudio se realizó en el invernadero de la Unidad de Investigación en Granos y Semillas de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM, previo saneamiento para llevar a cabo la siembra bajo condiciones protegidas (ISTA, 1986; ISTA, 1993; Albajes *et al.*, 1999; Sonneveld y Voogt, 2009).

**Establecimiento de las condiciones de estrés biótico.** Las suspensiones de esporas de los hongos *Aspergillus flavus* y *Fusarium moniliforme* fueron preparadas según lo descrito por Gilchrist *et al.* (1995), a una concentración de 10 000 esporas mL<sup>-1</sup>. Para establecer las condiciones de estrés biótico, se sembraron 10 semillas por maceta y se aplicó una alícuota de 10 mL de suspensión de esporas por semilla para asegurar la infección. Las macetas fueron divididas en cuatro diferentes grupos como se muestra en el Cuadro 1.

### Cuadro 1. Tratamientos aplicados a las semillas de maíz cultivadas en invernadero.

**Table 1. Treatments applied to maize seeds grown in a greenhouse.**

Grupo	Tratamiento
Testigo (-)	Semillas sin estrés y sin recubrimiento
Testigo (+)	Semillas estresadas sin recubrimiento
Tratamiento 1	Semillas estresadas con recubrimiento de quitosán
Tratamiento 2	Semillas estresadas, dañadas mecánicamente y con recubrimiento de quitosán

El objetivo de dañar mecánicamente las semillas estresadas y aplicarles un recubrimiento posterior (tratamiento 2), fue para observar el efecto protector del QN en las mismas,

### *In vivo* test

**Coating of seeds.** The treatment applied to the seeds in this part of the experiment, consisted of immersing the seeds in the 2% chitosan solution for 5 min and, dried at 29 °C in an oven for 24 h. This study was conducted in the greenhouse of the Research Unit of Grain and Seed School of Advanced Studies Cuautitlán, UNAM, prior sanitation to planting was carried out under protected conditions (ISTA, 1986; ISTA, 1993; Albajes *et al.*, 1999; Sonneveld and Voogt, 2009).

**Establishment of biotic stress conditions.** The suspension of *Aspergillus flavus* and *Fusarium moniliforme*'s spores were prepared as described by Gilchrist *et al.* (1995), at a concentration of 10 000 spores mL<sup>-1</sup>. To establish the biotic conditions, 10 seeds per pot were sown and, it was applied a 10 mL aliquot of spore-suspension from the seeds in order to ensure the infection. The pots were divided into four different groups as shown in Table 1.

The purpose of damaging the seeds, mechanically stressed and then applying a coating (treatment 2) was to observe the protective effect of QN, considering that the mechanical damage (bites, cuts, etc.) enabled the pathogenic fungi parasites to easily infect the plant material, so we would expect an attenuated phenological development of the seedling and, the presence of a greater fungal burden for microbiological testing.

**Evaluation of the growth of maize plants.** This test was conducted for five weeks by observing the physical aspects of the plant and, the weekly measurements of the number of sprouts, leaf length, stem length, stem thickness and the total length of the plant.

**Presence of stressful fungal in foliar structures.** In the fifth week of growth, we cut small pieces of leaf structure of the plants, washed them with a solution of sodium hypochlorite

considerando que los daños mecánicos (picaduras, cortes, etc.) permiten que los hongos patógenos parasiten más fácilmente el material vegetal en cuestión, por lo que se esperaría un desarrollo fenológico atenuado de la plántula, así como la presencia de una mayor carga fúngica en las pruebas microbiológicas correspondientes.

**Evaluación del crecimiento de las plantas de maíz.** Esta prueba se llevó a cabo durante cinco semanas mediante la observación de los aspectos físicos de la planta y las mediciones semanales del número de semillas germinadas, longitud de las hojas, longitud de los tallos, grosor de los tallos y la longitud total de la planta.

**Presencia de los hongos estresantes en las estructuras foliares.** En la quinta semana de crecimiento, se cortaron pequeñas porciones de las estructuras foliares de las plantas, se lavaron con una solución de hipoclorito de sodio al 0.01% (Química Meyer S. A de C. V, Tláhuac, D. F., México) y se colocaron por triplicado en cajas petri con agar dextrosa papa (PDA, MCD Lab, Tlalnepantla Estado de México, México). Posteriormente fueron incubadas a 28 °C durante ocho días para observar el crecimiento microbiano.

**Análisis de datos.** El experimento se realizó por triplicado. Para las pruebas *in vitro*, las diferencias entre tratamientos se analizaron mediante ANOVA para experimentos con un factor y diseño completamente aleatorio. Las mediciones obtenidas a partir del estudio *in vivo* se evaluaron mediante ANOVA para experimentos con observaciones repetidas con un análisis *post hoc* mediante pruebas de Tukey empleando el programa computacional Statistica Release 7 (StatSoft, Inc., USA). Los valores de las medias con diferencia estadística de  $p < 0.05$  fueron considerados como significativos.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Pruebas de calidad de las semillas (*in vitro*)

**Humedad.** En el Cuadro 2 se observa que las semillas recubiertas con QN presentaron una humedad promedio superior al testigo en 5.6%. No existe diferencia significativa entre las medias de los tratamientos con respecto a dicho testigo. El recubrimiento con QN al 2% no se consideró un tratamiento viable, ya que la semilla, con un porcentaje de humedad tan elevado (14.49%) es susceptible para ser atacada por hongos patógenos (Paterson y Lima, 2010).

0.01% (Química S. A. de C. V. Meyer, Tláhuac, City Mexico) and placed them in triplicate in Petri dishes with potato dextrose agar (PDA, MCD Lab, Tlalnepantla Estado de Mexico, Mexico). Then they were incubated at 28 °C for eight days and, were observed for microbial growth.

**Data analysis.** The experiment was performed in triplicate. For the *in vitro* tests, the differences between treatments were analyzed by ANOVA for experiments with a completely random factor and design. The measurements obtained from the studies *in vivo* were evaluated by ANOVA for repeated measures experiments with a *post hoc* Tukey test of analysis, using the computer program Statistica Release 7 (StatSoft, Inc., USA). The mean values with statistical difference of  $p < 0.05$  were considered significant.

## RESULTS AND DISCUSSION

### Seed quality tests (*in vitro*)

**Humidity.** The Table 2 indicates that, the seeds coated with QN showed an average humidity greater than the control at 5.6%. No significant difference between the treatment means with respect to this control. Coating with 2% QN was not considered a viable treatment, as the seed with a moisture content that high (14.49%) is susceptible to be attacked by pathogenic fungi (Paterson and Lima, 2010).

In the case of the treatments where PEG was used as a moisture suppressant chemical, QN-PEG combination 0.6% was effective, because the moisture decreased even more than that for the control. The coating of seeds with QN and, then dried at 29 °C for 24 h, proved to be the best treatment for getting the minimum amount of moisture, showing a significant difference of 7.57% compared with the humidity measured for QN coated-seeds without any drying.

**Standard germination.** In all cases, the percentage of germination of seeds with different treatments was close to 100%. In no case there was any significant difference ( $p = 0.48112$ ) in the participation rate compared with the control (Table 2), therefore, the treatments used give high germination results.

**Germination and vigor (length of the plumule).** This test was crucial to define the treatment to be used to coat the seeds in regular conditions (Table 2). The lowest lengths were for

En el caso de los tratamientos en los que se empleó PEG como supresor de humedad de carácter químico, la combinación QN-PEG al 0.6% resultó efectiva, pues la humedad disminuyó incluso más que la correspondiente al testigo. El recubrimiento de las semillas con QN y su posterior secado a 29 °C durante 24 h, resultó ser el mejor tratamiento para lograr la mínima cantidad de humedad en las semillas, presentando una diferencia significativa de 7.57% al compararse con la humedad medida para las semillas recubiertas con QN sin secado posterior.

**Germinación estándar.** En todos los casos, el porcentaje de germinación de las semillas con diferentes tratamientos se aproximó al 100%. En ningún caso existió diferencia significativa ( $p= 0.48112$ ) en el porcentaje presentado comparado con el testigo (Cuadro 2); por lo tanto, los tratamientos usados darán resultados de germinación altos.

**Germinación y vigor (longitud de la plúmula).** Esta prueba fue determinante para definir el tratamiento a utilizar para recubrir las semillas *in vivo* (Cuadro 2). Las menores longitudes correspondieron a las semillas tratadas con QN-PEG a diferentes concentraciones, mientras que la mayor longitud correspondió a las semillas tratadas y secadas a 29 °C durante 24 h, las cuales rebasaron al testigo en 1.6 cm. El testigo y las semillas recubiertas con QN presentaron longitudes semejantes entre sí. Por esta razón, se descartó el secado químico con PEG a distintas concentraciones, como un posible tratamiento para las semillas de maíz en estudio; mientras que el secado en estufa (después del tratamiento de las semillas con QN), fue adoptado como el tratamiento ideal para su aplicación a nivel invernadero.

**Cuadro 2. Resultados de las pruebas de calidad de las semillas *in vitro*.**

**Table 2. Results of tests of seed quality *in vitro*.**

Tratamiento	Humedad (%)		Germinación (%)	Longitud de plúmula (cm)	
Testigo	8.87	a b	99.5	12.41	b
QN 2%	14.49	b	100	11.99	b
QN 2% + PEG 0.3%	10.18	a b	100	9.29	a
QN 2% + PEG 0.6%	7.97	a	98.66	7.67	a
QN 2%, T= 29°C, t= 24h	6.92	a	100	14.01	b
Probabilidad ( $p$ )	0.028*		0.481	0*	

Los valores  $p < 0.05$  (\*) fueron considerados como significativos.

### Prueba de germinación *in vivo*

La mayoría de las semillas estresadas (con o sin tratamiento), presentaron un porcentaje de germinación cercano al 100%, lo cual indica que el tratamiento

de las semillas tratadas con QN-PEG a diferentes concentraciones, mientras que las más largas correspondieron a las tratadas y luego secadas a 29 °C por 24 h, que excedieron al control por 1.6 cm. El control y las semillas recubiertas con QN tuvieron medidas similares. Por esta razón, se descartó el secado químico con PEG a diferentes concentraciones; mientras que el secado en estufa (después del tratamiento con QN), fue adoptado como el tratamiento ideal.

### Germinación tests *in vivo*

Most of the stressed seeds (with or without treatment) showed a germination rate close to 100%, indicating that the treatment applied to the seeds and, the conditions under which they were cultivated did not interfere with the germination capacity.

### Biotic-stress by *Aspergillus flavus*

The seedlings infected with *A. flavus* that had more foliage and an intense green color, were those from the seeds coated with QN, while the mechanically damaged seedlings produced seedlings with just a few small and chlorotic leaves. There was no significant difference between the thickness of the stems of seedlings from control seeds and those coated with QN, while the thinner stems corresponded to the seedlings emerged from seeds with mechanical damage, stress and coating.

The seedlings from the coated-seeds (Treatment 1) presented during the first few weeks, a larger size than the positive control, but for the fifth week, the negative control

seedlings had greater length than the other groups (Figure 1). There was no significant difference between the lengths of the seedlings under stress and coating (treatments 1 and 2), compared with those without any treatment (positive control). This indicates that the fungus,



aplicado a las semillas y las condiciones bajo las cuales fueron cultivadas no interfieren en su capacidad germinativa.

### Estrés biótico por *Aspergillus flavus*

Las plántulas infectadas con *A. flavus* que presentaron más follaje y coloración verde intensa fueron aquellas provenientes de semillas recubiertas con QN, mientras que las dañadas mecánicamente produjeron plántulas con hojas escasas, pequeñas y cloróticas. No hubo diferencia significativa entre los grosores de los tallos de las plántulas provenientes de las semillas testigo y aquellas recubiertas con QN, mientras que los tallos más delgados correspondieron a las plántulas emergidas de semillas con daño mecánico, estrés y recubrimiento.

Las plántulas provenientes de semillas recubiertas (tratamiento 1), presentaron durante las primeras semanas mayor longitud que el testigo positivo; sin embargo, para la quinta semana, las plántulas del testigo negativo presentaron mayor longitud que el resto de los grupos (Figura 1). No existió diferencia significativa entre las longitudes de las plántulas sometidas a estrés y recubrimiento (tratamientos 1 y 2), comparadas con aquellas sin tratamiento alguno (testigo positivo). Esto indica que la presencia del hongo, independientemente del tratamiento, disminuye la velocidad de crecimiento de la plántula respecto a la no estresada, por efecto de la infección.

Se puede observar que el recubrimiento con QN tuvo efectos positivos durante la segunda semana, pero después, el crecimiento de las plantas con el tratamiento 1 se detuvo. Este comportamiento sugiere que el QN debe ser aplicado periódicamente en la planta, posiblemente mediante la aspersión de la solución a sus estructuras en crecimiento con el fin de asegurar la absorción constante del biopolímero por la planta, y evitar su degradación debido a su naturaleza de hidrocarbonada.

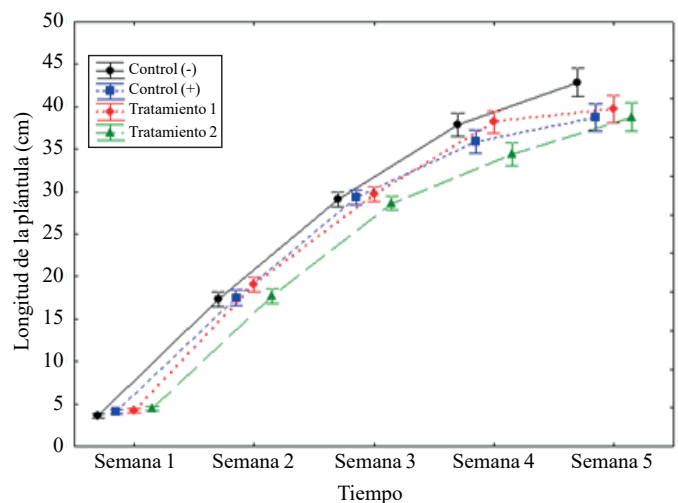
El testigo (-) corresponde a las semillas sin estrés tampoco tratamiento; el testigo (+) son las semillas estresadas; el tratamiento 1 son las semillas estresadas y recubiertas, y el tratamiento 2 son las semillas con daño mecánico, estrés y recubrimiento.

### Estrés biótico por *Fusarium moniliforme*

Las plántulas provenientes de semillas recubiertas presentaron hojas más gruesas y con coloración más intensa que el resto. Algunas manchas cloróticas se observaron

respectivamente del tratamiento, will slow the seedling's growth compared to the non-stressed, because of the effect of infection.

It can be seen that, the QN coating had a positive effect during the second week, but then, the growth of the plants in treatment 1 was stopped. This behavior suggests that the QN must be applied periodically on the ground, possibly by spraying the solution to their growing structures in order to ensure a constant absorption by the plant biopolymer and, prevent degradation due to the nature of hydrocarbon.



**Figura 1. Longitud total de las plántulas de maíz infectados por *A. flavus* de acuerdo al tratamiento ( $p=0.01767$ ).**  
**Figure 1. Total length of maize seedlings infected with *A. flavus* according to the treatment ( $p=0.01767$ ).**

The control (-) corresponds to the stress-treatment-free seeds; the control (+) are stressed seeds, treatment 1 are stressed and coated seeds, and treatment 2 are the seeds with mechanical damage, stress and coating.

### Biotic-stress by *Fusarium moniliforme*

The seedlings from the coated seeds presented thicker leaves and more intense color than the rest. Some chlorotic spots were observed on the surface of the leaves of most of the untreated seedlings after the third week of growth, a symptom indicative of attack by the pathogen involved, associated with poor assimilation of nutrients by the plant. In regard to the length of the leaves, stems and seedlings in general, the time-treatment interaction was statistically significant, while for the thickness of the stems there was no difference at all.

en la superficie de las hojas de la mayoría de las plántulas no tratadas después de la tercera semana de crecimiento, síntoma indicativo del ataque por el patógeno involucrado, asociado a una escasa asimilación de nutrientes por parte de la planta. En lo que se refiere a la longitud de las hojas, los tallos y las plántulas en general, la interacción tiempo-tratamiento fue estadísticamente significativa, mientras que para el grosor de los tallos no existió diferencia.

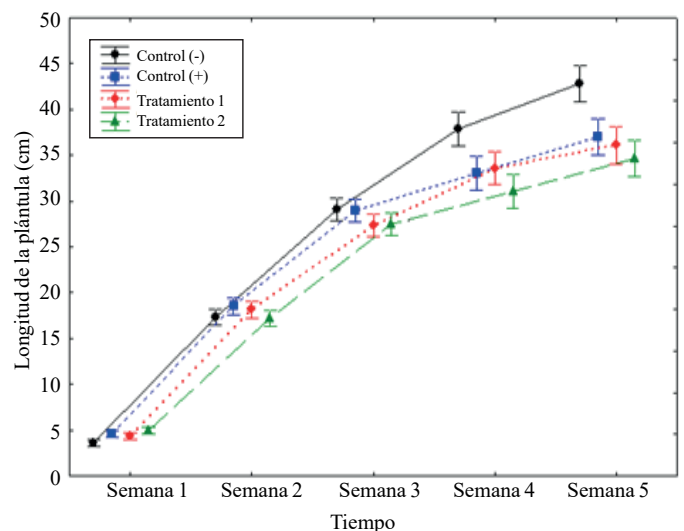
Se observó que la presencia de *F. moniliforme* altera el crecimiento normal de las hojas del cultivo a partir de la quinta semana de desarrollo pese al tratamiento con QN. Igualmente, pudo observarse que *F. moniliforme* afecta al cultivo de maíz atacando directamente a los tallos e impidiendo su desarrollo normal desde la segunda semana de crecimiento. Los promedios de las longitudes de las plántulas (Figura 2), no presentaron diferencia significativa durante las tres primeras semanas de crecimiento; sin embargo, a partir de la cuarta semana, el testigo negativo registró mayor longitud que el resto de los estreses, pero las medias de las longitudes de las plántulas correspondientes al testigo positivo y los tratamientos 1 y 2 no presentaron diferencias significativas entre sí.

El testigo (-) corresponde a las semillas sin estrés ni tratamiento; el testigo (+) son las semillas estresadas; el tratamiento 1 son las semillas estresadas y recubiertas, y el tratamiento 2 son las semillas con daño mecánico, estrés y recubrimiento.

Los beneficios que tiene el quitosán como protector de las semillas, es un biopolímero que se emplea con fines comestibles debido a su nula toxicidad. Este hecho contrasta con otros experimentos de protección de maíz, ya que algunos sistemas de control biológico (Bacon *et al.*, 2001), utilizan bacterias endofíticas (*Bacillus subtilis*); en donde el mecanismo inhibitorio de acción opera en el principio de exclusión competitiva y se ha convertido en un microorganismo muy importante para diferentes usos en el medio ambiente, ya que este ayuda a la descomposición de residuos vegetales.

Para usos agrícolas es excelente en la fabricación de fertilizantes, evita enfermedades y además ayuda al crecimiento de los cultivos; no obstante, su efectividad es variable debido a la influencia de diversos aspectos bióticos y abióticos asociados al entorno.

It was observed that, the presence of *F. moniliforme* alters the regular growth of the crop leaves from the fifth week of development, despite the treatment with QN. Similarly, it was concluded that, *F. moniliforme* affects the maize crop, by directly attacking the stems and preventing its normal development from the second week of growth. The average lengths of the seedlings (Figure 2) showed no significant difference during the first three weeks of growth, but from the fourth week, the negative control showed greater length than the rest of the stresses, but average lengths of the seedlings for the positive control and treatments 1 and 2 did not differ significantly from each other.



**Figura 2. Longitud total de las plántulas de maíz infectados por *F. moniliforme* de acuerdo al tratamiento ( $p=0.00004$ ).**

**Figure 2. Total length of maize seedlings infected with *F. moniliforme* according to the treatment ( $p=0.00004$ ).**

The control (-) corresponds to the stress-treatment-free seeds; the control (+) are stressed seeds, treatment 1 are stressed and coated seeds, and treatment 2 are the seeds with mechanical damage, stress and coating.

The benefits that chitosan as a protector of the seeds, is a biopolymer that is used for edible purposes due to no toxicity. This contrasts with other experiments for the protection of maize, with some biological control systems (Bacon *et al.*, 2001), using endophytic bacteria (*Bacillus subtilis*), in which the inhibitory mechanism of action operates on the principle of competitive exclusion,

### Presencia de los hongos estresantes en las estructuras foliares

En la Figura 3, se muestran los resultados de la siembra en PDA de las estructuras foliares de las plántulas, provenientes de las semillas sometidas a estrés biótico por *Aspergillus flavus* y *Fusarium moniliforme*; ahí, puede observarse una considerable reducción en la infección de las semillas recubiertas, lo cual tiene dos posibles explicaciones: 1) el quitosán pudo haber funcionado como una barrera física contra el hongo y su ataque a la planta y 2) el quitosán del recubrimiento se pudo haber introducido de manera sistémica a la planta y despertar mecanismos de defensa en ella, manifestándose como inhibición del crecimiento fúngico.

A pesar que desde el inicio de la experimentación el manejo del testigo negativo, se hizo bajo condiciones de total asepsia y lejos de las semillas inoculadas, en los análisis microbiológicos correspondientes se observó la presencia de *A. flavus* en las hojas, lo cual indica que pese su alta calidad de origen, la semilla se encontraba contaminada naturalmente. En el testigo positivo, fue evidente la presencia no solo de *A. flavus*, sino también de *A. niger*, el cual es un hongo potencialmente dañino cuando es consumido por humanos o animales (Abarca *et al.*, 2000; Bolet y Socarrás, 2005).

En las placas correspondientes al tratamiento 1 (con recubrimiento biopolimérico), no se observó carga microbológica alguna. En lo que respecta a *F. moniliforme*, pudo apreciarse su existencia en las placas de agar correspondientes al testigo negativo, la cual se manifestó con una coloración blanca de aspecto algodonoso, indicando la contaminación de origen pese a las condiciones asépticas de manejo. No obstante, hojas provenientes de las semillas recubiertas con QN (tratamientos 1 y 2), no presentaron crecimiento fúngico, pero sí crecimiento bacteriano.

Estos resultados sugieren que el QN no sólo actúa como un agente preventivo de enfermedad en la planta por infección de hongos patógenos, sino que también puede ser usado como un agente correctivo de semillas contaminadas, lo cual genera la posibilidad de usar dicho biopolímero en plántulas enfermas, para evaluar su capacidad y revertir o detener el avance de la enfermedad fúngica generada por la presencia de *A. flavus* y *F. moniliforme*.

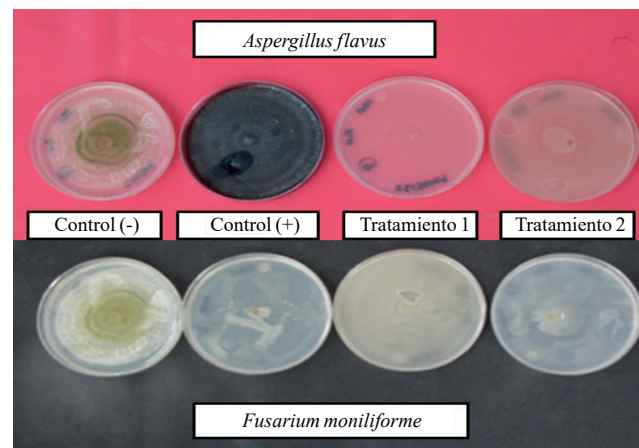
Los resultados obtenidos fueron similares a El Ghaouth *et al.* (1992), quienes han reportado que el tratamiento del suelo con quitosán, impide el desarrollo de *A. flavus* en semillas de

becoming an important organism for different uses in the environment, as this helps the breakdown of the plant's residues.

For agriculture is excellent in the manufacture of fertilizers, as it prevents disease and helps the growth of crops; however, its effectiveness is variable due to the influence of various biotic and abiotic aspects associated with the environment.

### Presence of stressful fungal in foliar structures

The Figure 3 shows the results of PDA planting in the seedling's foliar structures from seeds subjected to biotic-stress by *Aspergillus flavus* and *Fusarium moniliforme*; there, it can be seen a considerable reduction of the infection in the coated seeds, which has two possible explanations: 1) the chitosan may have functioned as a physical barrier against the fungus and its attack on the plant; and 2) the chitosan coating may have been introduced systemically to the plant and waking mechanisms in her defense, manifested as the inhibition of fungal growth.



**Figura 3. Siembra en agar PDA de las estructuras foliares en la quinta semana de crecimiento de las plántulas infectadas por *A. flavus* y *F. moniliforme*.**

**Figure 3. Planting on PDA agar foliar structures in the fifth week of growth of seedlings infected with *A. flavus* and *F. moniliforme*.**

Although, the beginning of the experiment of the negative control management was performed under aseptic conditions and, away from all inoculated seeds, in the microbiological analysis the presence of *A. flavus* in the leaves was observed, indicating that, despite its high

maíz; mientras que Rabea *et al.* (2003) y sus colaboradores obtuvieron resultados semejantes al atacar el hongo *F. moniliforme*, mediante la adición del biopolímero al suelo. Por otra parte, también se ha demostrado que el tratamiento de semillas de maíz con quitosán, aumenta su porcentaje de germinación y se producen plántulas muy vigorosas con altos valores de peso seco (Shao *et al.*, 2005; Guan *et al.*, 2009).

Los dos trabajos referidos anteriormente se limitan a hacer un estudio fenológico de las plantas, además de que llevaron a cabo sin involucrar estreses bióticos en el cultivo en estudio. Por el contrario, Guan *et al.* (2009) también reportaron que las plantas tratadas con quitosán, presentaron mayores dimensiones en algunas de sus estructuras; por ejemplo, en las raíces; contrario a lo encontrado en esta investigación, ya que las plántulas tratadas registraron incluso mediciones más bajas que los respectivos testigos. Este comportamiento sugiere que el metabolismo de la planta puede ser desviado, para dar lugar a la producción de metabolitos de defensa, que permiten combatir el daño por patógenos en la planta, o bien, para crear barreras de protección y así generar actividad antifúngica.

### **El quitosán como protector de semillas de maíz contra estrés biótico**

En el caso del maíz, el combate contra las especies fúngicas se ha centrado principalmente después de la cosecha; donde a través de procesos como la nixtamalización, se logra la eliminación de las fumonisinas que están presentes en el producto (Méndez y Moreno, 2009) o mediante la adición de bajas concentraciones de NaOH se logra la eliminación de un gran cantidad de aflatoxinas (Carrillo, 2003). Aunque estos tratamientos han tenido éxito para la eliminación o inactivación de las micotoxinas en los productos finales, el problema que debe ser resuelto de raíz es la protección de las semillas contra la infección, tanto en el campo como durante el almacenamiento.

A pesar de que no existen estudios semejantes reportados en los que se haya aplicado quitosán a semillas de maíz, existe evidencia del funcionamiento de este biopolímero sobre algunos otros cultivos, tal es el caso del arroz, cuyas semillas se han recubierto y expuesto a su principal patógeno (*Pyricularia grisea*), observando como resultado una menor severidad de la enfermedad provocada por el hongo con respecto a las plantas testigo (Ruan y Xue, 2002; Rodríguez *et al.*, 2006).

Este comportamiento se fundamenta debido que el quitosán es activador de algunas enzimas relacionadas con la defensa de las plantas contra patógenos, tales como la glucanasa, la

quality of origin, the seed was naturally contaminated. In the positive control, was evident not only the presence of *A. flavus*, but also of *A. niger*, a fungus which is potentially harmful when consumed by humans or animals alike (Abarca *et al.*, 2000; Bolet and Socarrás, 2005).

In the plates for treatment 1 (biopolymer-coated), there was no microbiological load observed at all. With respect to *F. moniliforme*, it could be appreciated in the agar plates for the negative control, which is expressed with a cottony-looking white color, indicating also the sources of pollution despite the aseptic conditions of use. However, the leaves from the coated seeds with QN (treatments 1 and 2) showed no fungal growth, but only bacterial growth.

These results suggest that, QN not only acts as a preventive agent for pathogenic fungus infection diseases in the plant, but can also be used as a corrective agent of contaminated seeds, which creates the possibility of using the biopolymer in diseased seedlings to evaluate their capacity and, to reverse or at least pause the progression of fungal disease caused by the presence of *A. flavus* and *F. moniliforme*.

The results were similar to El Ghaouth *et al.* (1992), whom reported that, soil treatment with chitosan, prevents the development of *A. flavus* in maize seeds, while Rabea *et al.* (2003) and his colleagues obtained similar results in the attacking of fungus *F. moniliforme*, when adding the biopolymer to the ground. On the other hand, it has also been shown that, the treatment of maize seeds with chitosan increases their percentage of germination and produce very vigorous seedlings with high values of dry weight (Shao *et al.*, 2005; Guan *et al.*, 2009).

The two works just mentioned are limited to a study of plant phenology and were carried out without involving biotic-stress in the culture. By contrast, Guan *et al.* (2009) also reported that, the plants treated with chitosan presented higher dimensions in some of its structures, for example, the roots, contrary to the findings of this research, since the seedlings treated measurements showed even lower numbers than the respective control's. This behavior suggests that, the metabolism of the plant can be diverted to make way for the production of defense metabolites that allow combat damage in the plant pathogens, or to create protective barriers and generate antifungal activity.



quitinasa y la quitosanasa, las cuales se encuentran activadas una vez que el patógeno llega al hospedero, por lo que las enzimas son capaces de reconocer los componentes de la pared celular del patógeno y comienzan a degradarlos afectando su crecimiento y desarrollo en el cultivo, constituyendo un método de combate efectivo contra éste, sin afectar el desarrollo de la planta (Lineart *et al.*, 1983).

## CONCLUSIONES

El quitosán, aplicado a las semillas de maíz, promueve que las plántulas que emergen de ellas manifiesten ausencia de carga fúngica propia de la especie en las estructuras foliares. Estos hallazgos son prometedores, ya que son la pauta para implementar nuevas técnicas de control microbiológico en los cultivos de maíz y otros cereales en nuestro país.

Aún se precisa de más estudios para profundizar sobre los mecanismos de activación de las defensas promovidas por el quitosán; por esta razón, actualmente se están llevando a cabo estudios genético-moleculares, para confirmar si el quitosán tiene la capacidad de activar mecanismos de defensa, que promuevan el encendido de genes relacionados con las respuestas contra estrés; no obstante, los resultados obtenidos en este trabajo indican que el quitosán constituye una alternativa biotecnológica, que promete producir cultivos sanos provenientes de semillas protegidas; donde los productos no desarrollen enfermedades que se manifiestan desde el campo hasta el consumo, logrando disminuir las pérdidas ocasionadas como consecuencia de la contaminación por factores bióticos.

## AGRADECIMIENTOS

Al programa PAPIIT Núm. IT220411-3 por el apoyo en el financiamiento del proyecto.

## LITERATURA CITADA

Abarca, M. L.; Bragulat, M. R.; Castellá, G.; Accensi, F. y Cabañes, F. J. 2000. Hongos productores de micotoxinas emergentes. *Rev. Iberoam. Micol.* 17:563-568.

## Chitosan as a maize's seeds protectant against biotic-stress

In the case of maize, combating fungal species has focused mainly after the harvest, where through the processes such as nixtamalization is achieved by the elimination of fumonisin present in the product (Méndez and Moreno, 2009) or by the addition of low concentrations of NaOH is achieved elimination of a large amount of aflatoxins (Carrillo, 2003). Although, these treatments have been successful in the removal or inactivation of mycotoxins in finished products, the problem to be solved is the root seed protection against infection, both in the field and during storage.

Even though there are no similar studies reported that, chitosan has been applied to maize's seed, there is evidence of how this biopolymer on some other crops, such is the case of rice, whose seeds have been coated and exposed to the main pathogen (*Pyricularia grisea*), noting as a result a lower severity of illness caused by the fungus with respect to the control plants (Ruan and Xue, 2002; Rodríguez *et al.*, 2006).

This behavior is based because that chitosan is an activator of some enzymes involved in the plant's defense against pathogens such as glucanase, chitinase and chitosanase, which are activated once the pathogen reaches the host, so, the enzymes are capable of recognizing the cell's wall components of the pathogen and, starts to degrade, affecting their growth and development in culture, forming an effective method of fighting against it, without affecting the plant's development (Lineart *et al.*, 1983).

## CONCLUSIONS

The chitosan applied to maize seeds, allows that the seedlings emerge without fungal species that are characteristic of the foliar structures. These findings are promising, since it is the pattern to implement new techniques for microbiological control in corn and other cereals in our country as well.

Even more research is needed to understand more deeply on the triggering mechanisms of defenses promoted by chitosan and, for this reason we are currently carrying out molecular genetic studies to confirm if the chitosan has the ability to activate the defense mechanisms that would promote the awakening of the genes related to



- Albajes, R.; Gullino, M.; Lodovica, L.; Lenteren, J. C. and Elad, Y. 1999. Integrated pest and disease management in greenhouse crops. *Developments in Plant Pathology*. Vol. 14. Kluwer Academic Publishers. Print ISBN: 0-7923-5631-4.
- Angelova, Z.; Georgiev, S. and Ross, W. 2006. Elicitation of plants. *Biotechnol. Biotec Eq.* 20:72-83.
- Bacon, C. W.; Yates, I. E.; Hinton, D. M. and Meredith, F. 2001. Biological control of fusarium moniliforme in maize. *Environ. Health Persp.* 109(2):325-332.
- Badu, A. B. and Fontem, L. A. 2010. The pattern of grain yield response of normal and quality protein maize cultivars in stress and nonstress environments. *Agron. J.* 102:381-394.
- Bennett, J. W.; Kale, S. and Yu, J. 2007. Aflatoxins: background, toxicology, and molecular biology. *In: infectious disease: Foodborne Diseases*. Humana Press Inc, Totowa, N. J. 355-373 pp.
- Bhaskara, M. V.; Arul, J.; Angers, P. and Couture, L. 1999. Chitosan treatment of wheat seeds induces resistance to fusarium graminearum and improves seed quality. *J. Agr. Food Chem.* 47:208-216.
- Bolet, A. M. and Socarrás, M. M. 2005. Micotoxinas y cáncer. *Rev. Cubana Invest. Bioméd.* 24(1):54-59.
- Boyes, D. C.; McDowell, J. M. and Dangl, J. L. 1996. Many roads led to resistance. *Curr. Biol.* 6(6):634-637.
- Boyes, D. C.; McDowell, J. M. and Dangl, J. L. 1996. Many roads led to resistance. *Curr. Biol.* 6(6):634-637.
- Bressani, R. 1994. Opaque 2 corn in human nutrition and utilization. *In: quality protein maize: 1964-1994 Proc. The International Symposium on Quality Protein Maize*. Embrapa/CNPMS. Sete Lagoas, M. G., Brasil. 41-63 pp.
- Carrillo, L. 2003. Microbiología agrícola. *In: los hongos de los alimentos y forrajes*. Universidad Nacional de Salta. Argentina. 6:1-7.
- Cuevas, E. O.; Milán, C. J.; Mora, E. R.; Cárdenas, O. G. and Reyes, M. C. 2003. Quality protein maize (*Zea mays* L.) tempeh flour through solid state fermentation process. *Lebensm-Wiss Technol.* 37:59-67.
- Denli, M. y Pérez, J. F. 2006. Contaminación por micotoxinas en los piensos: efectos, tratamiento y prevención. XXII Curso de Especialización. FEDNA. 1-18 pp.
- Devlieghere, F.; Vermeulen, A. and Debevere, J. 2004. Chitosan: antimicrobial activity, interactions with food components and applicability as a coating on fruit and vegetables. *Food Microbiol.* 21:703-714.
- the stress responses; however, the results obtained in this study suggest that, chitosan is a bio-technologic alternative, which promises to produce healthy crops from protected seeds, where the products would not develop any diseases, decreasing losses due to biotic contamination.

*End of the English version*



- El Ghaouth, A.; Arul, J.; Asselin, A. and Benhamou, N. 1992. Antifungal activity of chitosan on post-harvest pathogens: induction of morphological and cytological alterations in *Rhizopus stolonifer*. *Mycol. Res.* 96:769-779.
- Espinosa, C. A.; Gómez, M. N.; Sierra, M. M.; Betanzos, M. E.; Caballero, H. F.; Coutiño, E. B.; Palafox, C. A.; Rodríguez, M. F.; García, B. A. y Cano, R. O. 2005. Los maíces de calidad proteínica y la producción de semillas en México. *Revista Ciencia y Desarrollo Electrónica*. URL: <http://www.conacyt.gob.mx>.
- Fandohan, P.; Gnonlonfin, B.; Hell, K.; Marasas, W. F. and Wingfield, M. J. 2005. Natural occurrence of *Fusarium* and subsequent fumonisin contamination in preharvest and stored maize in Benin, West Africa. *Int. J. Food Microbiol.* 99(2):173-183.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations Statistics (FAOSTAT). 2009. Maize crop production. (Updated 16 December 2009). Food and Agriculture Organization of the United Nations. Reviewed on March 2010.
- Gilchrist, L.; Fuentes, G. y Martínez, C. 1995. Guía práctica para la identificación de algunas enfermedades de trigo y cebada. CIMMYT. D. F., México. 19-22 pp.
- Guan, Y. J.; Hu, J.; Wang, X. J. and Shao, C. X. 2009. Seed priming with chitosan improves maize germination and seedling growth in relation to physiological changes under low temperature stress. *J. Zhejiang Univ. Sci. B.* 10:427-433.
- Hahn, M. 1999. Microbial elicitors and their receptors in plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* 34:87-412.
- Huang, S.; Whitney, R. A.; Zhou, Q. and Kathleen, P. M. 2004. Improving nutritional quality of maize proteins by expressing sense and antisense zein genes. *J. Agr. Food Chem.* 52(7):1958-1964.
- International Seed Testing Association (ISTA). 1986. Handbook on seed sampling. Publicado por la Asociación Zurich, Suiza. 61 p.

- International Seed Testing Association (ISTA). 1993. International rules for seed testing. Rules 1993. *Seed Sci. Technol.* 21:1-288.
- Jeglay, Y. y Cruz, H. 2006. Relación suelo-planta-hombre en el cultivo del maíz (*Zea mays* L.). Universidad Central de Venezuela, Facultad de Agronomía, Posgrado en Ciencias del Suelo. Cátedra de Relación Suelo-Planta. 1-7 pp.
- Keeler, F. R. and Anthony, T. T. 1983. Plant and fungal toxins. *In: handbook of natural toxins*. Vol. 1, EUA. 299-323 pp.
- Lárezm, C. 2003. Algunos usos del quitosano en sistemas acuáticos. *Rev. Iberoam. Pol.* 4(2):91-109.
- Lienart, I.; Driguez, H. and Domard, A. 1983. Chitosan as elicitor of  $\beta$ -D-glycanases from rhus cells. *In: chitin and chitosan. Sources, chemistry, biochemistry, physical properties and applications*. Elsevier Applied Science. 225-231 pp.
- Méndez, A. y Moreno, E. 2009. Las micotoxinas: contaminantes naturales de los alimentos. *Revista Ciencia.* 61:1-7.
- Miranda, S. P. 2000. La quitina y su potencial aplicación industrial. *Revista Investigación y Desarrollo. Periodismo de Ciencia y tecnología.* URL: <http://www.invides.com.mx>.
- Miranda, S. P. 2004. Proceso para la extracción de quitina a partir de crustáceos y su conversión a quitosán. Patente en trámite. Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial, México. Núm. de expediente 005444. No de folio 1175930-5.
- Miranda, S. P.; Miranda, E. and Serrano, J. 2007. Chitosan and gamma irradiated chitosan against *aspergillus flavus* in maize. *Asian Chitin Journal.* 3:37-47.
- Muzzarelli, A. A. and Muzzarelli, C. 2005. Chitosan chemistry: relevance to the biomedical sciences. *Adv. Polym. Sci.* 186:151-209.
- Paterson, R. M. and Lima, N. 2010. How will climate change affect mycotoxins in food? *Food Res. Int.* 43(7):1902-1914.
- Rabea, E. I.; El Badawy, M. T.; Stevens, C. V.; Smagghe, G. and Steurbaut, W. 2003. Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action. *Biomacromolecules.* 4:1457-1465.
- Reddy, M. V.; Arul, J.; Angers, P. and Couture, L. 1999. Chitosan treatment of wheat seeds induces resistance to *Fusarium graminearum* and improves seed quality. *J. Agric. Food Chem.* 47:1208-1216.
- Reid, L. M.; Nicol, R. W.; Ouellet, T.; Savard, M.; Miller, J. D.; Young, J. C.; Stewart, D. W. and Schaafsma, W. 1999. Interaction of *F. graminearum* and *F. moniliforme* in maize ears: disease progress, fungal biomass, and mycotoxin accumulation. *Phytopathology.* 89(11):1028-1037.
- Rivero, D.; Cruz, A.; Martínez, B.; Ramírez, M. A.; Rodríguez, A. T. y Cárdenas, R. M. 2004. Efecto protector de la quitosana en semillas de arroz frente a *Fusarium* sp. *Revista de Protección Vegetal,* 19(2):140-144.
- Rodríguez, P. A.; Ramírez, M. A.; Cárdenas, R. M.; Falcón, R. A. y Bautista, S. 2006. Efecto de la quitosana en la inducción de la actividad de enzimas relacionadas con la defensa y protección de plántulas de arroz (*Oryza sativa* L.) contra *pyricularia* grisea Sacc. *Rev. Mex. Fitopatol.* 24(1):1-6.
- Ruan, S. L. and Xue, Q. Z. 2002. Effects of chitosan coating on seed germination and salt-tolerance of seedlings in hybrid rice (*Oryza sativa* L.). *Acta Agron. Sinica,* 28:803-808.
- Shao, C. X.; Hu, J.; Song, W. J. and Hu, W. M. 2005. Effects of seed priming with chitosan solutions of different acidity on seed germination and physiological characteristics of maize seedling. *J. Zhejiang Univ. Agric. Life Sci.* 1:705-708.
- Sonneveld, C. and Voogt, W. 2009. Plant nutrition of greenhouse crops. Springer, DOI 10.1007/978-90-481-2532-6.
- Widstrom, N. W. 1996. The aflatoxin problem with corn grain. *Adv. Agron.* 56:219-280.