



EVALUACIÓN DE INDICADORES QUE CARACTERIZAN LA ACCIÓN PROTECTORA DEL QUITOSANO EN *Nicotiana tabacum* L. vs *Phytophthora nicotianae* Breda de Haan

Evaluation of indicators characterizing the protective action of chitosan in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) vs *Phytophthora nicotianae* Breda de Haan

Dianevis González-Peña Fundora[✉], Daimy Costales Menéndez y Alejandro Falcón Rodríguez

ABSTRACT. Chitosan is a glucosamine polymer with significant properties as antimicrobial compound and elicitor of defense response on plants, which emerges as an ecological alternative to pesticides uses. The aim of the research was to evaluate the effect of this polymer on the growth and sporulation of an isolate of *Phytophthora nicotianae* Breda de Haan; as well as in the glucanase activity on tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) plants infected with the pathogen. For this purposes, a disc with *P. nicotianae* mycelium was placed in Petri dishes with PDA-V8 culture medium and different chitosan concentrations. The inhibition of the mycelium growth was determined by the chitosan dissolvent and the concentrations used. A direct relationship between the inhibitory effect and the levels of the polymer in the culture medium was observed. In addition, *P. nicotianae* sporulation decreased when added up to 3,0 g L⁻¹ and there was a biostatic effect in the colony, but not biocide. In the other hand, tobacco plants of 30 days old, treated with chitosan and/or inoculated through the root with the SS-11 isolate, changed their protein concentration and glucanase activity over time. Moreover, a 26 % of plant protection was observed when 0,5 g L⁻¹ of the polymer was applied to tobacco plants. The results show the effect of the chitosan as inhibitor of *P. nicotianae* development and it's potential to increase glucanase activity and crop protection against this pathogen.

Key words: glucosamine, oomycete, glucanase, tobacco, priming

RESUMEN. El quitosano es un polímero de glucosamina con importantes propiedades como compuesto antimicrobiano e inductor de respuestas defensivas en plantas, el cual emerge como una alternativa ecológica al empleo de pesticidas. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto que ejerce este polímero en el crecimiento y la esporulación de un aislado de *Phytophthora nicotianae* Breda de Haan, así como en la actividad glucanasa en plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) infectadas con el patógeno. Para ello se inoculó un disco con micelio de *P. nicotianae* en placas Petri con medio de cultivo PDA-V8 y diferentes concentraciones de quitosano. La inhibición del crecimiento del micelio estuvo marcada por el tipo de ácido disolvente y las concentraciones empleadas. Se observó una relación directa entre el efecto inhibitorio y los niveles del polímero en el medio de cultivo. Además, disminuyó la esporulación de *P. nicotianae* al adicionar hasta 3,0 g L⁻¹ y hubo un efecto biostático del crecimiento de la colonia, pero no biocida. Por otra parte, las plantas de tabaco de 30 días de sembradas, tratadas con quitosano o inoculadas con el aislado SS-11 a través de la raíz, variaron la concentración de proteínas y la actividad glucanasa en el tiempo. También se alcanzó un 26 % de protección vegetal al aplicar 0,5 g L⁻¹ del polímero a plantas de tabaco. Los resultados muestran el efecto del quitosano como inhibidor del desarrollo de *P. nicotianae*, así como su potencialidad para incrementar la actividad glucanasa y la protección del cultivo ante la presencia de este patógeno.

Palabras clave: glucosamina, oomycete, glucanasa, tabaco, priming

INTRODUCCIÓN

El cultivo de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) a nivel de semillero es severamente afectado por la enfermedad conocida como pata prieta, causada por

¹ Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA), gaveta postal 1, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba, CP 32 700.

✉ dianevis@inca.edu.cu

el patógeno *Phytophthora nicotianae* Breda de Haan (1896). Esta se caracteriza por un necrosamiento de la región basal del tallo que avanza a todas las partes de la planta y provoca su muerte (1). En Cuba se combate con técnicas de manejo integrado, la selección de variedades de tabaco menos susceptibles y la aplicación de productos biológicos y químicos (2). No obstante, la incidencia de la enfermedad persiste, por lo que es necesario buscar nuevas alternativas al empleo de pesticidas, que en su mayoría constituyen contaminantes del ecosistema.

En este marco emerge el quitosano, un polisacárido de D-glucosamina, parcialmente acetilado, con enlaces β -1,4, que se obtiene en cantidades industriales a través de la desacetilación básica de la quitina que forma parte del exoesqueleto de los crustáceos. Su carácter policatiónico le confiere importantes propiedades antimicrobianas e inductoras de respuestas defensivas en plantas, las que varían en dependencia del grado de acetilación, polimerización y del pH (3, 4, 5). Aunque en la mayoría de las investigaciones se emplea el ácido acético como disolvente, algunos autores han demostrado que la utilización de otros ácidos como el ascórbico, clorhídrico y el láctico, etc., pudieran influir en las potencialidades de uso del polímero (6, 7).

Varios estudios muestran que el quitosano inhibe el crecimiento y la formación de estructuras vegetativas y reproductivas de algunos microorganismos patógenos de plantas y animales, a través de la desestabilización de las paredes y membranas celulares, induciendo la lisis celular; sin embargo, no afecta de igual manera a todos los organismos, aunque el mecanismo de acción no está completamente dilucidado (4, 8, 9, 10).

Algunos autores plantean además, que este compuesto puede inducir un estado de priming que le permite a la planta responder con mayor velocidad a la futura presencia de un estrés (11, 12). A su vez, se ha comprobado una mayor actividad de proteínas relacionadas con la patogénesis (Pathogenesis Related proteins, PRs, por sus siglas en inglés) cuya expresión disminuye la susceptibilidad de las plantas al ataque de agentes biológicos (13, 14). Entre las PRs se encuentran glucanasas (PR2), quitinasas (PR3, PR4, PR8 y PR11) y peroxidasas (PR9), por solo mencionar algunas (15).

Las glucanasas son esenciales en la protección del tabaco contra algunas de sus principales enfermedades, como el moho azul y la pata prieta, causadas por *Peronospora tabacina* y *P. nicotianae*, respectivamente, si se toma en cuenta que la enzima degrada polímeros de glucano y ambos microorganismos presentan este polisacárido en la pared celular (16).

Se ha demostrado que diferentes derivados de quitosano inducen respuestas defensivas en plantas de tabaco, aún sin estar en contacto con patógenos, y que estas varían en dependencia del

grado de acetilación, peso molecular, vía y momento de aplicación del compuesto (17); sin embargo, no ha sido evaluada la respuesta defensiva de la planta a la inoculación con este microorganismo, ni en combinación con plántulas elicidadas con quitosano.

A partir de lo anterior el trabajo tiene como objetivo determinar el efecto del quitosano en el crecimiento y formación de esporas de un aislado de *P. nicotianae*, así como evaluar la inducción de actividad glucanasa y la protección de plantas de tabaco inoculadas con este patógeno.

MATERIALES Y MÉTODOS

Polímero de quitosano. Se empleó un polímero de quitosano de masa molecular $1,35 \times 10^5$ (viscosimetría) y grado de acetilación 12 % (espectroscopía IR), obtenido mediante desacetilación básica de quitina de langosta cubana, suministrada por los laboratorios farmacéuticos Mario Muñoz. Se utilizaron tres ácidos por separado para comparar su efecto como disolvente, los cuales fueron: láctico, clorhídrico y acético al 1 %, mientras que en los demás experimentos solo se utilizó el ácido acético. El pH se ajustó con KOH a 5,6 en todos los casos.

Cultivo microbiano. Se utilizó un aislado de *Phytophthora nicotianae* (Pn) denominado SS-11, raza 0, grupo 1, proveniente del cultivar Habana 92, procedente del Instituto de Investigaciones del Tabaco (IIT). Para el cultivo del microorganismo se empleó el medio papa-dextrosa-agar (PDA), al cual se le adicionó carbonato de calcio ($2,0 \text{ g L}^{-1}$), Asparagina ($2,0 \text{ g L}^{-1}$), y V8 (jugo de verduras que contiene: tomate, apio, espinacas, remolacha, lechuga, perejil, berro y zanahoria) al 20 %, de la línea comercial Del Frutal (Guatemala). El pH se ajustó a 5,6 con KOH. El medio de cultivo se esterilizó en autoclave durante 15 minutos y se vertió en placas Petri de 90 mm de diámetro.

Las placas se inocularon con discos de 10 mm de diámetro con micelio de SS-11 y se incubaron a 27 °C en condiciones de oscuridad.

Cultivo de plantas de tabaco. Las semillas del cultivar Corojo 99 del IIT, se sembraron en un sustrato en la proporción 1:1(v/v) de suelo y turba ácida. Las plantas se mantuvieron en condiciones semicontroladas a temperatura de 25 °C y en régimen de 16/8 horas de luz/oscuridad. A los 30 días de germinadas, con aproximadamente 5 cm de altura y un par de hojas verdaderas desarrolladas, se removieron del sustrato, se lavaron varias veces con agua destilada y se colocaron en tubos Eppendorf de 2 ml que contenían 1 ml de solución nutritiva de Hoagland y quitosano a diferentes concentraciones, en dependencia de los experimentos. Se utilizaron 20 plantas por tratamiento.

Efecto del quitosano en el crecimiento micelial de *P. nicotianae*. Los ensayos se realizaron en placas Petri de vidrio (90 mm de diámetro) las cuales contenían 25 ml de medio de cultivo con diferentes concentraciones de quitosano. El medio y las soluciones se esterilizaron por separado en autoclave a 120 °C durante 15 minutos y luego se mezclaron antes de verter. En el centro de las placas se colocaron discos de 10 mm de diámetro con micelio de SS-11 de entre siete y nueve días de crecimiento. Las placas se incubaron a 27 °C en oscuridad. Se realizaron 10 réplicas por tratamiento.

Efecto de los disolventes del quitosano en el crecimiento micelial de *P. nicotianae*. El quitosano se disolvió en los ácidos acético, láctico y clorhídrico al 1 %. Se utilizaron las concentraciones de 0, 0,5 y 1,0 g L⁻¹ de quitosano, correspondientes a cada disolvente. Se establecieron controles para cada ácido que se empleó y se determinó el diámetro de la colonia cuando el control llegó al borde de la placa.

Los datos se procesaron mediante un diseño bifactorial con descomposición en los factores ácido disolvente y concentración, cada uno con tres niveles.

Efecto de la concentración de quitosano en el desarrollo de *P. nicotianae*. Los tratamientos consistieron en diferentes concentraciones de quitosano: 0, 0,25, 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5 y 3,0 g L⁻¹ y se determinó el crecimiento radial de SS-11 cuando las colonias alcanzaron el extremo de las placas. Se realizó además, un conteo de zoosporas en cámara de Neubauer. Para ello se adicionó 10 mL de agua destilada por placa y suavemente se maceró la colonia con espátula de Drygalski, sin destruir el agar. Las placas se incubaron a 4 °C durante dos horas, seguido de un choque térmico durante 30 minutos a 37 °C.

RESPUESTAS DEFENSIVAS EN PLANTAS DE TABACO

Activación de respuestas defensivas en hojas de tabaco ante la aplicación de quitosano. Las raíces de las plantas de tabaco se expusieron a las concentraciones 0,05, 0,5 y 1,0 g L⁻¹ de quitosano, mientras que los controles se sumergieron en agua a la cual se le ajustó el pH a 5,6. Transcurridas dos horas, se lavaron y se pusieron en los viales con la solución nutritiva. A las 72 horas de haber estado en contacto con las soluciones se hizo la extracción del material vegetal de las hojas para determinar la concentración de proteínas y la actividad glucanasa.

Dinámica de respuestas defensivas en hojas de plantas de tabaco inoculadas con *P. nicotianae*. Las raíces de las plantas de tabaco se expusieron durante 120 horas a discos de 10 mm de diámetro con micelio de SS-11 que se colocaron en los viales con solución nutritiva. Los controles se mantuvieron en igualdad de condiciones, excepto que no entraron en contacto con el patógeno. La extracción del material vegetal para evaluar la concentración de proteínas y la actividad glucanasa se realizó a las 24, 48, 72 y 120 horas de haber entrado en contacto con el patógeno.

Respuesta defensiva en hojas de plántulas de tabaco inoculadas con *P. nicotianae* y previamente tratadas con quitosano. Las plantas de tabaco se expusieron durante dos horas a 1,0 g L⁻¹ de quitosano, mientras que los controles se mantuvieron en agua destilada este tiempo. Las plantas se lavaron y excepto las que luego constituyeron el control positivo, las demás se colocaron en contacto con el microorganismo. La determinación de proteínas y la actividad glucanasa se realizó a los extractos que se obtuvieron del material vegetal a las 48 y 96 horas de interactuar las plantas con el patógeno.

Extracción del material vegetal. La extracción del material vegetal se realizó a razón de 1 g de foliolo/1,2 mL de buffer de extracción (Ac⁻Na⁺ 0,05M, pH 5,2 + NaCl 1M + EDTA 0,005M+ Mercaptoetanol 0,005M), al macerar en morteros de porcelana el primer par de hojas verdaderas.

El extracto se centrifugó durante 15 minutos a 5000 rpm a 5 °C, se desechó el pellet y el sobrenadante volvió a centrifugarse a 12000 rpm por 10 minutos. El sobrenadante se colectó y conservó a -20 °C hasta hacer las determinaciones proteicas y enzimáticas.

Determinación de proteínas y actividades enzimáticas. El contenido de proteínas se determinó mediante la metodología micro-Lowry, descrita por Sun^A, con el empleo de una curva patrón de BSA y se expresó como mg de proteína por gramo de tejido vegetal fresco.

La actividad β -1,3 glucanasa se evaluó de acuerdo a la metodología descrita por Falcón (18) y se cuantificó la liberación de azúcares reductores de laminarina (Sigma) como sustrato, por acción de las enzimas del extracto. El total de azúcares reductores se determinó por el método colorimétrico de Somogyi (19) y los resultados se expresaron como actividad específica (UAE min⁻¹ mg proteína⁻¹), definiéndose una unidad de actividad enzimática como la liberación de un microgramo de glucosa equivalente por minuto por mg de proteína. Para esto se empleó una curva patrón de glucosa a 520 nm.

Protección de plantas de tabaco contra *P. nicotianae* tratadas con quitosano. Las raíces de las plantas de tabaco se sumergieron en agua (pH-5,6), 0,05 g L⁻¹ y 0,5 g L⁻¹ de quitosano durante dos horas y luego de ser lavadas con agua destilada, se colocaron en viales con 1 mL de solución nutritiva. A las 16 horas, las plantas entraron en contacto con discos de 10mm de diámetro de micelio de SS-11. El grado de infección se evaluó a las 72 horas de exposición al patógeno, para lo cual se utilizó una modificación de la escala de infección empleada por Falcón (17) (Tabla I).

^A Sun, S.M. *Methods in plant molecular biology and agricultural biotechnology: A laboratory training manual*, Asian Research and Development Center, Shanhua, Tainan, Taiwan (ROC), 1994, p. 94.

Tabla I. Escala de infección de *P. nicotianae* en las plantas de tabaco.

Grado	Descripción
1	Planta sana
2	Raíces afectadas
3	Hipocotilos y cotiledones afectados
4	Primero y segundo par de hojas afectadas
5	Planta muerta

Los datos de la escala de infección se usaron para calcular el índice de infección de cada tratamiento según la fórmula $I.I. = [\sum (\text{grado de infección} \times \text{Nº de observaciones}) / N \times 5] \times 100$, donde N es el número total de plantas en el tratamiento y 5 es el máximo grado de afectación en la escala de invasión. A partir del índice de infección se calculó también el porcentaje de protección en los tratamientos con relación al control.

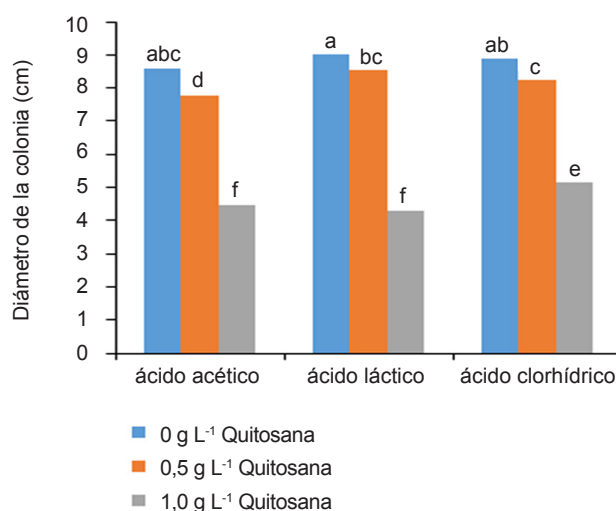
ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados se procesaron estadísticamente mediante un ANOVA bifactorial para evaluar el efecto de los disolventes de la quitosana en el crecimiento de las colonias de *P. nicotianae* y un ANOVA simple para los demás ensayos antimicrobianos. También se emplearon los intervalos de confianza en los ensayos con plantas y las medias se compararon mediante la prueba de Tukey para $p < 0,05$. Los datos del ensayo de protección se procesaron mediante la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis, y de Mann-Whitney de comparación de medias para $p < 0,05$. Se empleó el paquete estadístico SPSS 11.5 versión para Windows (20).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El crecimiento del aislado SS-11 de *P. nicotianae* en medio de cultivo se afectó por la presencia de quitosano. El análisis bifactorial reflejó que existe interacción significativa entre el ácido disolvente y la concentración utilizada. La mayor inhibición del patógeno se obtuvo con los ácidos acético y láctico (4,47 y 4,28 cm de crecimiento, respectivamente) sin diferencias entre ellos a $1,0 \text{ g L}^{-1}$. Con el empleo de $0,5 \text{ g L}^{-1}$ el acético resultó ser más efectivo en la contención del desarrollo del microorganismo, razón por la cual se continuó empleando como disolvente en los demás ensayos.

Los experimentos demostraron que la influencia de la concentración de quitosano y la acción sinérgica con el ácido empleado como disolvente, resulta significativa en la inhibición del microorganismo (Figura 1). Resultados similares obtuvieron Romannazi *et al.*, (6) al comprar el efecto de varios disolventes donde se obtuvo que el acético permitió mayor inhibición que otros como el clorhídrico, el L-ascórbico, fórmico, L-glutámico, láctico, maleico, málico, y succínico. La actividad antifúngica del quitosano debe entonces ser cuidadosamente comparada si se tiene en cuenta que sus potencialidades varían en dependencia del ácido en que se disuelva, entre otros factores.



Letras iguales no difieren estadísticamente en la prueba de Tukey, para $p \leq 0,05$. $ESx = 0,14$.

Figura 1. Efecto de diferentes disolventes de quitosano en el crecimiento de *P. nicotianae* (SS-11).

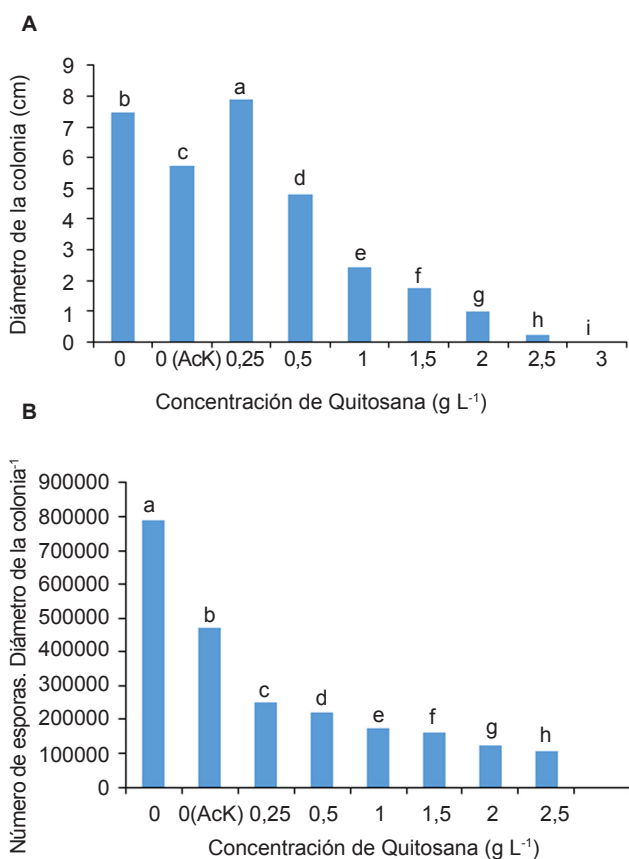
*Efecto de la concentración de quitosano en el desarrollo de *P. nicotianae*.* Durante el desarrollo de la colonia de *P. nicotianae* en presencia de quitosano se observó que el primer tratamiento en alcanzar el extremo de la placa fue el equivalente a la menor concentración ($0,5 \text{ g L}^{-1}$), seguida del control positivo (Figura 2A). Los valores de crecimiento disminuyeron a medida que aumentaron las concentraciones de quitosano. Entre todos los tratamientos hubo diferencias significativas y la concentración de $3,0 \text{ g L}^{-1}$ fue la que inhibió por completo el crecimiento de SS-11; sin embargo, al trasladarse los discos no crecidos a medio fresco sin quitosano el microorganismo desarrolló una nueva colonia con lo cual se corroboró el efecto biostático del polímero, pero no biocida.

El número de zoosporas por diámetro de la colonia disminuyó escalonadamente con el incremento de los niveles de quitosano, observándose diferencias significativas entre todos los tratamientos. El menor valor se obtuvo con la mayor concentración del polímero $2,5 \text{ g L}^{-1}$ ($1,1 \times 10^5$ esporas mL).

La actividad antimicrobiana del quitosano se informa contra una amplia variedad de microorganismos y se plantea que la concentración mínima necesaria para inhibir el crecimiento varía en dependencia de numerosos factores, tales como: grado de acetilación, polimerización, pH de la solución y organismo diana, entre otros (3, 10, 21).

Los resultados de este trabajo muestran que en presencia de $3,0 \text{ g L}^{-1}$ de quitosano se inhibe significativamente el crecimiento del aislado SS-11 de *P. nicotianae*, a diferencia de otros autores que han logrado similar disminución del crecimiento de aislados de esta especie con una concentración menor (22), lo que muestra la importancia del organismo diana

en la evaluación de las propiedades de este polímero (3). Esta concentración no ejerce una acción biocida, lo cual se comprobó al pasar el disco con micelio al medio PDA-V8 donde se formó una nueva colonia. Las diferencias existentes con el trabajo de Falcón (22), donde 2,0 g L⁻¹ de quitosano inhibió por completo el crecimiento de un aislado de *P. nicotianae*, puede deberse al empleo de aislados diferentes aun cuando sea la misma especie y la utilización de distintos de medios de cultivo.



Letras iguales no difieren estadísticamente en la prueba de Tukey, para $p \leq 0,05$.

Figura 2. Crecimiento del micelio (A) ESx=0,064 y la esporulación (B) ESx= 577,35 de *P. nicotianae* (SS-11) en diferentes concentraciones de quitosano.

El medio PDA suplementado con jugo V8 empleado en este trabajo permitió al microorganismo un mayor desarrollo y puede inducir una activación superior de enzimas para la degradación de sustratos y la absorción de nutrientes del medio. Debido a esto, la inhibición del crecimiento de SS-11 pudiera necesitar una concentración mayor del polímero, comparado con otros aislados de la misma especie.

Se han observado diferencias en el crecimiento de aislados de diversos hongos y oomicetes cuando se colocaron en diferentes medios de cultivo con

quitosano (23). En tal caso, el crecimiento en PDA fue superior al crecimiento en el medio agar agua, a la vez que la inhibición fue superior en este último, donde se observaba un micelio aéreo menos denso. En la mayoría de los casos coincidió la disminución del diámetro de la colonia con el aumento de las concentraciones de quitosano desde 0,5 g L⁻¹ hasta 2 g L⁻¹, en especial para *Pythium ultimum* Trow y *Fusarium oxysporum* Schldl., aunque para *Pochonia rubescens* Zare, W. Gams & López-Llorca y *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill. se observó un incremento del micelio, mostrando que el organismo diana es un factor determinante a la hora de evaluar el efecto de este polímero sobre el desarrollo microbiano.

Otros autores han evaluado el crecimiento de diferentes microorganismos y observaron también inhibición de su desarrollo, aunque con concentraciones diferentes de quitosano, que oscilan desde 0,01 mg L⁻¹ hasta 5 g L⁻¹, como muestran varias revisiones en la temática (3, 21, 24).

Una respuesta interesante que se obtuvo fue el hecho de que a la menor concentración empleada (0,25 g L⁻¹) el crecimiento superó al control (Figura 2A). Lo anterior puede deberse a que ante un estrés, como puede ser la presencia de quitosano, el microorganismo dirige su metabolismo a tratar de perpetuar la especie y acelera su crecimiento; sin embargo, cuando estas concentraciones son elevadas el daño celular puede ser mayor o el microorganismo pudiera detectar estos cambios como un ambiente muy adverso y a la vez, redirigir su metabolismo hacia un enlentecimiento hasta alcanzar un nuevo entorno con mejores condiciones.

Un comportamiento similar fue informado en investigaciones anteriores en el crecimiento de *Fusarium dimerium* cuando se emplearon concentraciones entre 500 y 2000 ppm de quitosano y en la esporulación de *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl. con dosis desde 5 hasta 15g.L⁻¹ en los que se observó un incremento del crecimiento por encima del control (25, 26).

La esporulación, evaluada a través de la liberación de zoosporas al medio, también se afectó al emplear el quitosano en el medio de cultivo. Los resultados mostraron que a medida que aumentaba la concentración de quitosano este proceso disminuía sustancialmente, incluso en el caso que el polímero favoreció el crecimiento del micelio de *P. nicotianae* (Figura 2B). Este hecho resulta de gran importancia, pues en particular las zoosporas se consideran el propágulo infeccioso más importante de los Oomicetes, ya que estas estructuras pueden alcanzar grandes distancias desplazándose a través del agua.

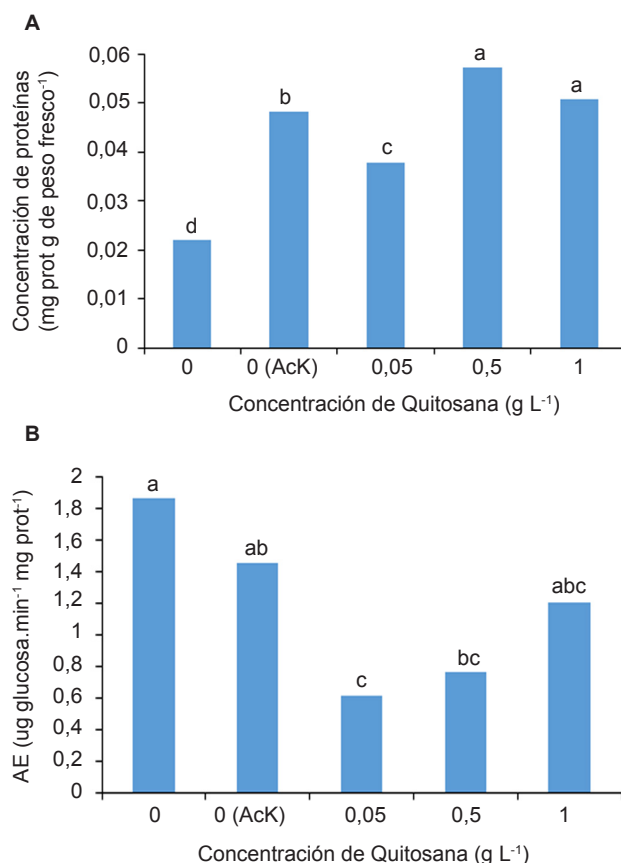
La inhibición de la esporulación de otros patógenos ha sido observada por varios autores, aunque los rangos de concentraciones de quitosano necesarias para disminuir los niveles de esporas varían

considerablemente en dependencia del organismo diana, de las concentraciones y las propiedades físico-químicas de este compuesto. En el caso de *A. alternata*, se comprobó que quitosanos de diferentes pesos moleculares podían afectar la esporulación y germinación de un aislado de esta especie (26). En dicha investigación se emplearon concentraciones superiores a las del presente trabajo ($5-25 \text{ g L}^{-1}$) y observaron que 25 g L^{-1} inhibía totalmente la esporulación de *A. alternata*. También se compararon el efecto de diferentes concentraciones ($1-2 \text{ g L}^{-1}$) y pesos moleculares de quitosano disminuyendo la esporulación de *Rizopus stolonifer* (Ehrenb.:Fr.) en el medio de cultivo (27), aunque en estos casos la inhibición dependió más del peso molecular del quitosano que de las concentraciones empleadas.

En general, tanto el crecimiento de la colonia como la esporulación *in vitro* del aislado SS-11 fueron dependientes de la concentración de quitosano. Esto parece estar dado por la naturaleza policatiónica de este polímero, ya que se sugiere que los grupos amino libres deben interactuar con las cargas negativas de la membrana y provocar desbalances iónicos que conllevan a la alteración del paso de nutrientes al microorganismo y, por tanto, a la lisis celular, como se ha observado con *Neurospora crassa* (8).

Activación de respuestas defensivas en hojas de tabaco ante la aplicación de quitosano. La concentración de proteínas en hojas de plantas de tabaco varió con las dosis de quitosano evaluadas (Figura 3A). En los tratamientos con quitosano se observó un aumento estadísticamente significativo de los niveles proteicos en relación al control después de 72 horas de haber sido embebidas las raíces en las soluciones del polímero, destacándose el efecto de las concentraciones $0,5$ y $1,0 \text{ g L}^{-1}$. La actividad glucanasa; sin embargo, disminuyó en relación al control para dichos tratamientos y con $0,05 \text{ g L}^{-1}$ se obtuvo los menores niveles de esta enzima (Figura 3B).

Los incrementos de las concentraciones de proteína en presencia de un elicitador como el quitosano pueden estar dados por la reorganización de las funciones del vegetal hacia la formación de compuestos que le permitan frenar el avance del supuesto patógeno. La enzima glucanasa no incrementó su actividad, aunque se puede crear un estado de priming que le facilite al vegetal responder con mayor velocidad y fortaleza al ataque de patógenos (28). Este consistiría en no aumentar necesariamente sus niveles de actividades enzimáticas cuando entre en contacto con el elicitador, pero sí dispararlos cuando la presencia de patógenos sea detectado, con lo cual se incrementaría la velocidad de reconocimiento, respuesta y la magnitud de la resistencia al nuevo estrés biótico.



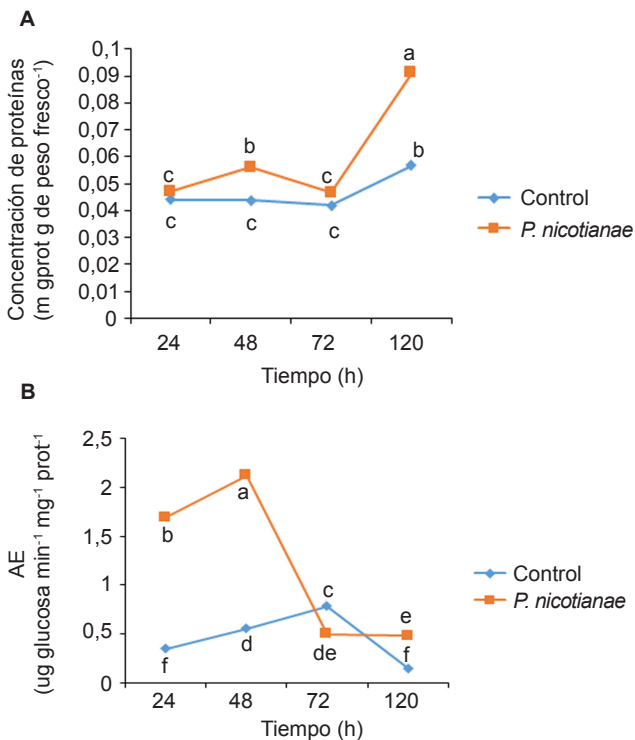
Letras iguales no difieren estadísticamente en la prueba de Tukey, para $p \leq 0,05$.

Figura 3. Variación de la concentración de proteínas (A) $ES_x = 0,0028$ y de la actividad glucanasa (B) $ES_x = 0,1382$ en hojas de plantas de tabaco después de embeber las raíces con soluciones de quitosano.

Dinámica de actividad glucanasa en hojas de plantas de tabaco inoculadas con *P. nicotianae*. Las concentraciones de proteínas en los tratamientos con y sin contacto con el aislado SS-11 se mostraron similares entre sí, excepto a las 120 horas en que hubo un incremento en las plantas infectadas en relación al control (Figura 4A).

La actividad glucanasa varió durante los momentos evaluados. En la mayor parte del tiempo, la actividad enzimática fue superior en las plantas inoculadas con SS-11 que en el control, observándose el máximo valor ($2,13 \text{ ug glucosa min}^{-1} \text{ mg prot}^{-1}$) a las 48 horas cuando se cuadruplicaron los valores en relación al testigo (Figura 4B).

La respuesta defensiva del tabaco ante *P. nicotianae* presenta pocos estudios y hasta el momento no se conoce que se hayan realizado dinámicas de la actividad glucanasa en respuesta a un aislado virulento de este patógeno.



Letras iguales no difieren estadísticamente según los intervalos de confianza para $\alpha=0,05$.

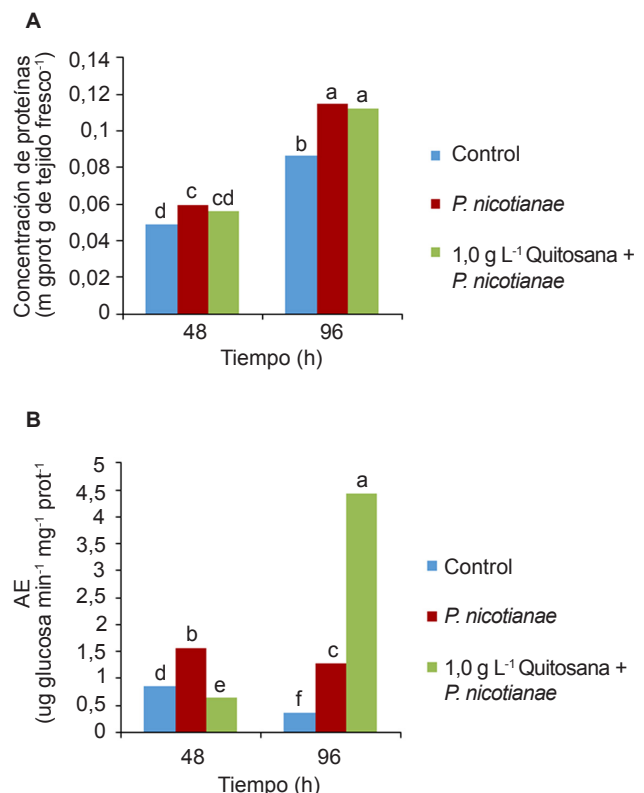
Figura 4. Variación de la concentración de proteínas (A) $ESx=0,0009$ y la actividad glucanasa (B) $=0,0035$ en hojas de plantas de tabaco al poner en contacto las raíces con *P. nicotianae* SS-11.

A las 120 horas hubo una elevada concentración de proteínas; sin embargo, el proceso infeccioso prosiguió (datos no mostrados). La actividad glucanasa, en ese instante, fue inferior a la observada a las 48 horas, lo que puede sugerir que otras enzimas y proteínas de diversos tipos pudieron estar involucradas en esa respuesta. Otra hipótesis puede estar relacionada con el estado de priming esperado, el cual pudo no ser suficiente en la magnitud y velocidad requeridas para inducir una resistencia capaz de detener el avance del patógeno, como señalan Balmer *et al.*, (29).

Por el contrario, la inducción de actividad glucanasa fue inmediata a la inoculación por SS-11 (Figura 4B) lo que demuestra un rápido reconocimiento del patógeno por la planta, puesto que las paredes celulares del microorganismo son de glucano, principalmente. No obstante, aunque la actividad enzimática se incrementó en los primeros dos días, disminuyó en los días subsiguientes. Este comportamiento podría deberse a un silenciamiento de la respuesta defensiva en la planta por el patógeno, debido a que los primeros niveles elevados de glucanasa no sean suficientes para detener la infección y a que otras respuestas defensivas necesarias para elevar la resistencia basal de la planta no sean rápida y suficientemente activadas.

*Respuesta defensiva en hojas de plántulas de tabaco inoculadas con *P. nicotianae* y previamente tratadas con quitosano.* Las plantas que estuvieron en interacción con SS-11 incrementaron estadísticamente la concentración de proteínas foliares por encima del control a las 48 y 96 horas de inoculadas con el patógeno (Figura 5A). Por otra parte, se observó que en el tratamiento que incluía la presencia de quitosano y *P. nicotianae*, aunque los valores no diferían del testigo a las 48 horas de tratadas las plantas, hubo un incremento de los niveles proteicos a las 96 horas, similares a los obtenidos con el tratamiento del patógeno solamente (Figura 5A).

La actividad glucanasa fue diferente para cada momento evaluado (Figura 5B). A las 48 horas las plantas en contacto con el microorganismo mostraban mayores niveles de actividad que los demás tratamientos. A las 96 horas los valores de actividad de los dos grupos de plantas inoculadas (con y sin quitosano) estuvieron por encima del control.



Letras iguales no difieren estadísticamente según los intervalos de confianza para $\alpha=0,05$.

Figura 5. Variación de la concentración de proteínas (A) $ESx=0,0033$ y la actividad glucanasa (B) $ESx=0,386$ en hojas de tabaco cuyas raíces estuvieron embebidas en quitosano y luego se pusieron en contacto con *P. nicotianae* SS-11.

Los incrementos de la actividad glucanasa observados en las plantas inoculadas y previamente tratadas con quitosano muestran que se pudo inducir un estado de *priming* que aún no había alcanzado su máximo potencial a las 48 horas pero que a las 96 incrementó los niveles de la enzima casi 10 veces. Estos resultados coinciden con los informados por Falcón *et al.*, (30) en plantas de tabaco cultivar Criollo 98, las que después de 72 horas de tratadas con $1,0 \text{ g L}^{-1}$ del mismo polímero de quitosano incrementaron al doble los valores de actividad glucanasa.

Protección de plantas de tabaco contra *P. nicotianae* tratadas con quitosano. El tratamiento previo con quitosano redujo el índice de infección de las plantas de tabaco inoculadas con *P. nicotianae* (Tabla II). La concentración más baja ($0,05 \text{ g L}^{-1}$) provocó una disminución del índice de infección en 17 % aunque sin diferencias con el control, mientras que la mayor concentración del polímero ($0,5 \text{ g L}^{-1}$) redujo la infección en 26 % y fue diferente estadísticamente del control.

Tabla II. Índice de infección y porcentaje de protección de plantas de tabaco inoculadas con *P. nicotianae* y tratadas previamente con quitosano, vía raíz.

Tratamientos	N	Índice de infección	Protección %
Control H ₂ O d	19	67,4 b	0
Q88 $0,05 \text{ g L}^{-1}$	20	56 ab	17
Q88 $0,5 \text{ g L}^{-1}$	19	50 a	26

Las diferencias de protección se reflejaron también en los porcentajes de frecuencia de los diferentes grados de infección, de acuerdo a la escala empleada (Figura 6). De esta forma, la concentración del polímero de $0,5 \text{ g L}^{-1}$ redujo el porcentaje de plantas muertas e infectadas hasta el nivel de las hojas e incrementó el porcentaje de plantas solo afectadas hasta el nivel de la raíz, lo que redundó en la reducción del índice de infección obtenido. Así mismo, la menor concentración del polímero redujo el porcentaje de plantas afectadas hasta el nivel de las hojas a costa de un incremento en el número de plantas afectadas hasta las raíces, hipocotilos y cotiledones (Figura 6).

Los resultados de la Figura 6 demuestran que concentraciones de quitosano de $0,5 \text{ g L}^{-1}$ reducen el índice de infección del patógeno en plántulas de tabaco en las condiciones del ensayo ejecutado y las protegen en un 26 % (Tabla II).

La protección del tabaco contra la infección por *P. nicotianae* observada está relacionada con la estimulación de resistencia sistémica inducida en la planta y no con la actividad antimicrobiana directa que estos derivados tienen sobre este patógeno, ya que la forma de aplicación del polímero no influyó directamente sobre el microorganismo.

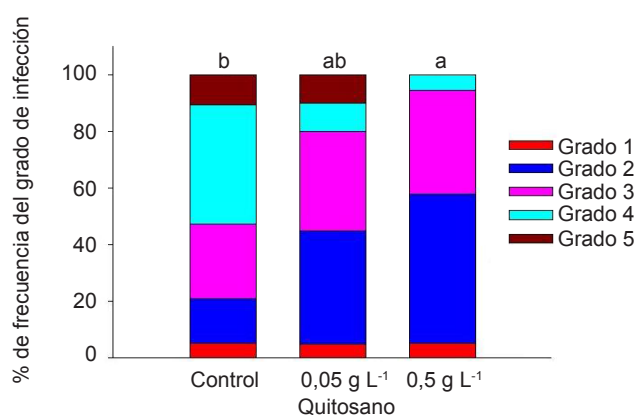


Figura 6. Porcentaje de frecuencia del grado de infección de *P. nicotianae* SS-11 en plantas de tabaco tratadas con quitosano.

La inclusión del quitosano en la interacción compatible del tabaco con *P. nicotianae* permitió corroborar que esta puede inhibir el crecimiento y esporulación de microorganismos e inducir resistencia sistémica en plantas susceptibles contra sus patógenos.

Los resultados permiten asumir que en condiciones naturales del cultivo del tabaco se pueden aprovechar las ventajas de los efectos biológicos del quitosano para lograr un alto nivel de protección contra *P. nicotianae* y otros patógenos del suelo. Se debe tomar en cuenta, además, que la combinación de diferentes solventes, formas y momentos de aplicación de los derivados de quitosano deben provocar una reducción de los niveles de microorganismos patógenos en la rizosfera, ya sea por acción antimicrobiana, como por estimulación de las respuestas defensivas y de crecimiento en plantas.

AGRADECIMIENTOS

Los autores quieren agradecer a la Fundación Internacional para la Ciencia (International Foundation for Science (IFS)) por su contribución a las investigaciones del Grupo de Productos Bioactivos del INCA que se recogen en esta publicación. El apoyo de esta organización se realizó a través del proyecto F-4446-2F, mediante financiamiento para equipamiento, reactivos, material informático e información científica.

BIBLIOGRAFÍA

- Erwin, D.C. y Ribeiro, O.K. *Phytophthora diseases worldwide*. [en línea], edit. The American Phytopathological Society, St Paul, Minnesota, USA, 1996, p. 562, ISBN 0-89054-212-0, CABDirect2, [Consultado: 21 de agosto de 2015], Disponible en: <<http://www.cabdirect.org/abstracts/19971001256.html;jsessionid=49B916D21F37512B0B7EB60CAC0A50C0>>.

2. Fernández Morales, A.A.; Martínez, M.L.; Ariosa, M.D. y Toledo, V. "Detección y prácticas de manejo de la enfermedad pata prieta causada por *Phytophthora Nicotianae* en el cultivo del tabaco", *Agroecología*, vol. 7, no. 1, 2012, p. 8, ISSN 1989-4686.
3. Badawy, M.E.I. y Rabea, E.I. "A Biopolymer Chitosan and Its Derivatives as Promising Antimicrobial Agents against Plant Pathogens and Their Applications in Crop Protection", *International Journal of Carbohydrate Chemistry*, vol. 2011, 19 de junio de 2011, p. e460381, ISSN 1687-9341, DOI 10.1155/2011/460381.
4. Hadwiger, L.A. "Multiple effects of chitosan on plant systems: Solid science or hype", *Plant Science*, vol. 208, julio de 2013, pp. 42-49, ISSN 0168-9452, DOI 10.1016/j.plantsci.2013.03.007.
5. Salachna, P. y Zawadzka, A. "Effect of chitosan on plant growth, flowering and corms yield of potted freesia", *Journal of Ecological Engineering*, vol. 15, no. 3, 2014, pp. 97-102, ISSN 2299-8993, DOI 10.12911/22998993.1110223.
6. Romanazzi, G.; Gabler, F.M.; Margosan, D.; Mackey, B.E. y Smilanick, J.L. "Effect of Chitosan Dissolved in Different Acids on Its Ability to Control Postharvest Gray Mold of Table Grape", *Phytopathology*, vol. 99, no. 9, 11 de agosto de 2009, pp. 1028-1036, ISSN 0031-949X, DOI 10.1094/PHTO-99-9-1028.
7. Rashid, N.; Rehman, M.S.U. y Han, J.-I. "Use of chitosan acid solutions to improve separation efficiency for harvesting of the microalga *Chlorella vulgaris*", *Chemical Engineering Journal*, vol. 226, 15 de junio de 2013, pp. 238-242, ISSN 1385-8947, DOI 10.1016/j.cej.2013.04.062.
8. Palma-Guerrero, J.; Huang, I.-C.; Jansson, H.-B.; Salinas, J.; Lopez-Llorca, L.V. y Read, N.D. "Chitosan permeabilizes the plasma membrane and kills cells of *Neurospora crassa* in an energy dependent manner", *Fungal Genetics and Biology*, vol. 46, no. 8, agosto de 2009, pp. 585-594, ISSN 1087-1845, DOI 10.1016/j.fgb.2009.02.010.
9. Kong, M.; Chen, X.G.; Xing, K. y Park, H.J. "Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review", *International Journal of Food Microbiology*, vol. 144, no. 1, 15 de noviembre de 2010, (ser. The 16th CBL (Club des Bactéries Lactiques) Symposium, May 2009, Toulouse, France), pp. 51-63, ISSN 0168-1605, DOI 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.09.012.
10. Younes, I. y Rinaudo, M. "Chitin and Chitosan Preparation from Marine Sources. Structure, Properties and Applications", *Marine Drugs*, vol. 13, no. 3, 2 de marzo de 2015, pp. 1133-1174, DOI 10.3390/md13031133.
11. Falcón-Rodríguez, A.B.; Costales, D.; Cabrera, J.C. y Martínez-Téllez, M.Á. "Chitosan physico-chemical properties modulate defense responses and resistance in tobacco plants against the oomycete *Phytophthora nicotianae*", *Pesticide Biochemistry and Physiology*, vol. 100, no. 3, julio de 2011, pp. 221-228, ISSN 0048-3575, DOI 10.1016/j.pestbp.2011.04.005.
12. Mahdavi, B. y Rahimi, A. "Seed priming with chitosan improves the germination and growth performance of ajowan (*Carum copticum*) under salt stress", *EurAsian Journal of BioSciences*, vol. 7, 2013, pp. 69-76, ISSN 1307-9867, DOI <http://dx.doi.org/10.5053/ejobios.2013.7.0>.
13. Hadrami, A. El.; Adam, L.R.; Hadrami, I. El. y Daayf, F. "Chitosan in Plant Protection", *Marine Drugs*, vol. 8, no. 4, 30 de marzo de 2010, pp. 968-987, ISSN 1660-3397, DOI 10.3390/md8040968.
14. Ashutosh Rai, P.U. "Differential Expression of Pathogenesis Related Protein Genes in Tomato during Inoculation with *A. Solani*", *Journal of Plant Pathology & Microbiology*, vol. 05, no. 01, 2014, ISSN 21577471, DOI 10.4172/2157-7471.1000217, [Consultado: 21 de agosto de 2015], Disponible en: <http://www.omicsonline.org/open-access/differential-expression-of-pathogenesis-related-protein-genes-in-tomato-during-inoculation-with-a-solani-2157-7471.1000217.php?aid=23433>.
15. Bengyella, L. y Pranab, R. "Engineered pathogenesis related and antimicrobial proteins weaponry against *Phytophthora infestans* in potato plant: A review", *Biotechnology and Molecular Biology Reviews*, vol. 5, no. 4, 2010, pp. 61-66, ISSN 1538-2273.
16. Lusso, M. y Kuć, J. "The effect of sense and antisense expression of the PR-N gene for β -1,3-glucanase on disease resistance of tobacco to fungi and viruses", *Physiological and Molecular Plant Pathology*, vol. 49, no. 4, octubre de 1996, pp. 267-283, ISSN 0885-5765, DOI 10.1006/pmpp.1996.0054.
17. Falcón, A.B.; Cabrera, J.C.; Costales, D.; Ramírez, M.A.; Cabrera, G.; Toledo, V. y Martínez-Téllez, M.A. "The effect of size and acetylation degree of chitosan derivatives on tobacco plant protection against *Phytophthora parasitica nicotianae*", *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, vol. 24, no. 1, 23 de junio de 2007, pp. 103-112, ISSN 0959-3993, 1573-0972, DOI 10.1007/s11274-007-9445-0.
18. Falcón-Rodríguez, A.B.; Cabrera, J.C.; Ortega, E.; Martínez-Téllez, M.A. y others "Concentration and physicochemical properties of chitosan derivatives determine the induction of defense responses in roots and leaves of tobacco (*Nicotiana tabacum*) plants.", *American Journal of Agricultural and Biological Sciences*, vol. 4, no. 3, 2009, pp. 192-200, ISSN 1557-4989.
19. Somogyi, M. "Notes on sugar determination", *Journal of biological chemistry*, vol. 195, no. 1, 1952, pp. 19-23, ISSN 0021-9258; 1083-351X.
20. *IBM SPSS Statistics* [en línea], versión 11.5, [Windows], edit. IBM Corporation, U.S, 2011, Disponible en: <http://www.ibm.com>.
21. González-Peña Fundora, D.; Falcón Rodríguez, A.; Gómez Izaguirre, G. y Fernández Morales, A. "La quitosana: potencialidades antimicrobianas contra hongos y Oomycetes", *Fitosanidad*, vol. 17, no. 2, 10 de enero de 2014, pp. 111-115, ISSN 1818-1686.

22. Falcón Rodríguez, A.; Rodríguez, A.T.; Ramírez, M.A.; Rivero, D.; Martínez, B.; Cabrera, J.C.; Costales, D.; Cruz, A.; González, L.G.; Jiménez, M.C.; Jiménez, L.; Hernández, I.; Gonzáles Peña, D. y Márquez, R. "Chitosans as bioactive macromolecules to protect economically relevant crops from their main pathogens", *Bioteología Aplicada*, vol. 27, no. 4, diciembre de 2010, pp. 305-309, ISSN 1027-2852.
23. Palma-Guerrero, J.; Jansson, H.-B.; Salinas, J. y Lopez-Llorca, L. v. "Effect of chitosan on hyphal growth and spore germination of plant pathogenic and biocontrol fungi", *Journal of Applied Microbiology*, vol. 104, no. 2, 1 de febrero de 2008, pp. 541-553, ISSN 1365-2672, DOI 10.1111/j.1365-2672.2007.03567.x.
24. Xing, K.; Zhu, X.; Peng, X. y Qin, S. "Chitosan antimicrobial and eliciting properties for pest control in agriculture: a review", *Agronomy for Sustainable Development*, vol. 35, no. 2, 15 de octubre de 2014, pp. 569-588, ISSN 1774-0746, 1773-0155, DOI 10.1007/s13593-014-0252-3.
25. Lam, N.D. y Diep, T.B. "A preliminary study on radiation treatment of chitosan for enhancement of antifungal activity tested on fruit-spoiling strains", *Nuclear Science and Technology*, vol. 2, no. 2, 2003, pp. 54-60, ISSN 0022-3131, 1881-1248.
26. Sánchez-Domínguez, D.; Bautista-Baños, S. y Castillo, P. "Efecto del quitosano en el desarrollo y morfología de *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl", *Anales de Biología*, vol. 28, 2006, pp. 23-32, ISSN 1989-2128.
27. Hernández-Lauzardo, A.N.; Bautista-Baños, S.; Velázquez-del Valle, M.G.; Méndez-Montealvo, M.G.; Sánchez-Rivera, M.M. y Bello-Pérez, L.A. "Antifungal effects of chitosan with different molecular weights on in vitro development of *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.:Fr.) Vuill", *Carbohydrate Polymers*, vol. 73, no. 4, 5 de septiembre de 2008, pp. 541-547, ISSN 0144-8617, DOI 10.1016/j.carbpol.2007.12.020.
28. Pastor, V.; Luna, E.; Mauch-Mani, B.; Ton, J. y Flors, V. "Primed plants do not forget", *Environmental and Experimental Botany*, vol. 94, octubre de 2013, (ser. Cross-stress tolerance and stress «memory» in plants), pp. 46-56, ISSN 0098-8472, DOI 10.1016/j.envexpbot.2012.02.013.
29. Balmer, A.; Pastor, V.; Gamir, J.; Flors, V. y Mauch-Mani, B. "The 'prime-ome': towards a holistic approach to priming", *Trends in Plant Science*, vol. 20, no. 7, julio de 2015, pp. 443-452, ISSN 1360-1385, DOI 10.1016/j.tplants.2015.04.002.
30. Falcón Rodríguez, A.; Costales Menéndez, D.; Martínez Téllez, M.Á. y Gordon, T.A. "Respuesta enzimática y de crecimiento en una variedad comercial de tabaco (*Nicotiana tabacum*, L.) tratada por aspersión foliar de un polímero de quitosana", *Cultivos Tropicales*, vol. 33, no. 1, marzo de 2012, pp. 65-70, ISSN 0258-5936.

Recibido: 27 de octubre de 2014

Aceptado: 4 de marzo de 2015

¿Cómo citar?

González-Peña, Dianevis; Costales Menéndez, Daimy y Falcón-Rodríguez, Alejandro. Evaluación de indicadores que caracterizan la acción protectora del quitosano en *Nicotiana tabacum* L. vs *Phytophthora nicotianae* Breda de Haan . [en línea]. *Cultivos Tropicales*, 2015, vol. 36, no. 3, pp. 144-153. ISSN 1819-4087. [Consultado: ____]. Disponible en: <-----/>.