

EFECTO DE LOS DERIVADOS DE QUITINA Y SU COMBINACIÓN CON SULFATO DE COBRE EN EL COMPORTAMIENTO DEL CRECIMIENTO MICELIAL Y ESPORULACIÓN DE UN AISLAMIENTO MONOSPÓRICO DEL HONGO *Pyricularia grisea* Sacc.

Regla M. Cárdenas[✉], M. A. Ramírez, Aida T. Rodríguez y Lázara M. González

ABSTRACT. In «Los Palacios» Rice Research Station, belonging to the National Institute of Agricultural Sciences (INCA), the effect of some chitin derivatives (chitosan and its hydrolysate) and its copper combinations on *in vitro* growth and sporulation of *Pyricularia grisea* fungus was studied. This fungus is the causal agent of Blast, the most important disease of rice crop in the world, whose conidia are the initial inoculum of such disease. One 8-mm-diameter mycelial disk was submerged for 15 minutes in each treatment and three, five and seven days later, the colony diameter was measured. Afterwards, conidial number was counted by a counting chamber and the colony sporulation distribution was observed. Results showed no significant effect of chitosan and its hydrolysate at 100 mg.L⁻¹ concentration nor their combination with copper on *Pyricularia grisea* mycelial growth; however, they inhibited pathogen sporulation between 70 and 85 %; the few sporulation of chitosans was dispersed to colony periphery, whereas in the control, it was grouped in the center. These results permit to lead the possibility of using chitosans at low concentrations in the initial disease inoculum reduction in the field.

RESUMEN. En la Estación Experimental del Arroz “Los Palacios”, perteneciente al Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA), se realizó el presente trabajo, donde se estudió el efecto de algunos derivados de quitina (quitosana y su hidrolizado) y su combinación con cobre al 0.01 %, en el crecimiento y la esporulación *in vitro* del hongo *Pyricularia grisea* Sacc., agente causal de la Piriculariosis, enfermedad limitante en la producción arrocerá a escala mundial, en la cual el inóculo inicial lo constituyen los conidios. Se sumergió durante 15 minutos un disco de micelio de 8 mm de diámetro en cada tratamiento y posteriormente se midió el diámetro de la colonia a los tres, cinco y siete días, al cabo de los cuales se contó el número de conidios con ayuda de una cámara de conteo; se observó, además, la distribución espacial de la esporulación en la colonia. Los resultados mostraron que tanto la quitosana como el hidrolizado de quitosana a una concentración de 100 mg.L⁻¹ y sus combinaciones con el cobre no ejercieron un efecto significativo sobre el crecimiento micelial de *P. grisea*, mientras que sí inhibieron la esporulación del patógeno entre 70 y 85 %; la escasa esporulación obtenida en los tratamientos correspondientes a las quitosanas se dispersaba hacia la periferia de la colonia, mientras que en el control se agrupaba hacia el centro. Estos resultados permiten inferir la posibilidad del empleo de las quitosanas a bajas concentraciones en la reducción del inóculo inicial de la enfermedad en el campo.

Key words: chitosan, *Pyricularia grisea*, rice, *Oryza*

Palabras clave: quitosana, *Pyricularia grisea*, arroz, *Oryza*

INTRODUCCION

El hongo *Pyricularia grisea* Sacc. es el agente causal de la Piriculariosis, enfermedad limitante en la producción arrocerá a escala mundial. En las lesiones de la enfermedad se pueden encontrar miles de conidios (que

constituyen el inóculo inicial de la enfermedad) de diferentes patotipos, lo cual hace difícil el control, que ha estado dirigido esencialmente al empleo de fungicidas (1) altamente tóxicos y contaminantes del ambiente. Entre los fungicidas inorgánicos que se han empleado durante mucho tiempo en la agricultura, se encuentran los formulados a base de cobre que tienen la propiedad de actuar sobre las esporas coagulando el protoplasma celular (2); este elemento se encuentra entre los iones de metales pesados que actúan como elicitores químicos (3).

El uso de productos ecológicamente inocuos y biodegradables es uno de los principales retos que enfrenta la agricultura en la actualidad; entre estos produc-

Ms.C. Regla M. Cárdenas y Ms.C. M. A. Ramírez, Investigadores Agregados; Aida T. Rodríguez, Investigador y Lázara M. González, Especialista de la Estación Experimental del Arroz “Los Palacios”, Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, Gaveta Postal 1, San José de las Lajas, La Habana, Cuba, CP 32 700.

✉ lospalacios@inca.edu.cu

tos se encuentran como alternativas promisorias los extractos vegetales (4), biopreparados a base de metabolitos activos de origen bacteriano (5) y el uso de productos bioactivos de origen animal como la quitosana (6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17), que es el derivado desacetilado de la quitina, un polímero de N-acetil glucosamina que se extrae del exoesqueleto de los crustáceos (6).

La quitosana y sus derivados han sido ampliamente usados como elicitores, por estimular mecanismos defensivos en las plantas (7, 8, 9, 10), debido a la inducción de compuestos de bajo peso molecular (fitoalexinas), barreras histológicas, enzimas y proteínas de resistencia a través de la interacción con receptores en las membranas celulares de las plantas (10). Tienen, además, la capacidad de inhibir el desarrollo de algunos hongos fitopatógenos (11), comprobándose su efectividad en aislados del cultivo del arroz (11, 12).

Teniendo en cuenta estos antecedentes se realizó el presente trabajo, con el objetivo de evaluar y comparar el comportamiento del crecimiento micelial y esporulación de un aislamiento monospórico del hongo *Pyricularia grisea* Sacc. en presencia de la quitosana, su hidrolizado enzimático y la combinación de ellos con el cobre.

MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Fitopatología de la Estación Experimental del Arroz «Los Palacios». Se empleó un aislamiento monospórico del hongo *Pyricularia grisea*, obtenido a partir de síntomas típicos de la Piriculariosis sobre hojas de la variedad de arroz J-104 colectadas en la Granja Caribe, perteneciente al Complejo Agroindustrial Arroceros «Los Palacios».

Para el montaje del experimento se sumergieron durante 15 minutos en los diferentes tratamientos discos de micelio de 8 mm de diámetro, que se colocaron posteriormente en el centro de placas Petri (75 x 15 mm de diámetro) con medio sólido ASHA (Agar pseudotallo de plátano y hojas de arroz) (13) pH 6.0 e incubados a temperatura de $26 \pm 2^\circ\text{C}$.

Tratamientos

1	Q -63 100 mg.L ⁻¹
2	HQ -9 100 mg.L ⁻¹
3	Q -63 100 mg.L ⁻¹ + CuSO ₄ 0.01 %
4	HQ -9 100 mg.L ⁻¹ + CuSO ₄ 0.01 %
5	CuSO ₄ 0.01 %
6	Control (agua destilada)

Q-63 (quitosana), HQ-9 (hidrolizado enzimático de quitosana Q-63) y CuSO₄ (sulfato de cobre)

Las formulaciones se prepararon en el Laboratorio de Oligosacarinas del Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA). La quitosana Q-63 se obtuvo a partir de la quitina de langosta, procedente de los laboratorios farmacéuticos «Mario Muñoz», según la metodología de obtención propuesta (14), mientras que el hidrolizado de

quitosana (dp2-7) se preparó por hidrólisis enzimática de la quitosana Q-63 con el preparado enzimático CELUCLAST durante 48 horas. El grado de acetilación se determinó por el método potenciométrico (18) y el grado de polimerización por el método viscosimétrico (19). Se empleó la sal CuSO₄ · 5H₂O (M= 249.69 g.mol⁻¹) procedente de la firma BDH al 0.01 %.

En la Tabla I se presenta el grado de acetilación y polimerización de los derivados de quitina empleados.

Tabla I. Grados de acetilación y polimerización de los derivados de quitina empleados

Derivados	Grado de acetilación (%)	Grado de polimerización
Hidrolizado de quitosana	36	2-7
Quitosana	36	720

Se determinó el crecimiento micelial del hongo a los tres, cinco y siete días midiendo el diámetro de la colonia con una regla graduada en milímetros y restando los 8 mm del disco sembrado. A los siete días se observó la distribución de la esporulación bajo un microscopio óptico con aumento de 40x, para lo cual se marcaron ocho puntos equidistantes en la colonia (cuatro en el centro y cuatro en la periferia); se realizó el conteo de conidióforos con conidios y se aplicó la escala recomendada (20), a la que se le reemplazaron los signos relativos a los grados por números.

Escala

Grado	Esporulación
0	Ninguna (cero conidios)
1	Poca (1-2 conidióforos con conidios)
2	Media (3-5 conidióforos con conidios)
3	Mucha (5 o más conidióforos con conidios)

Con ayuda de una cámara de conteo SMIEC (XB-K-25), se determinó el número de esporas por tratamiento y se calculó el porcentaje de inhibición mediante la fórmula:

$$\% \text{ inhibición} = 1 \times \frac{\text{tratado}}{\text{control}} \times 100$$

Los datos obtenidos para cada período evaluativo se procesaron mediante un Análisis de Varianza de Clasificación Simple con cinco repeticiones por tratamiento (tanto para crecimiento micelial como para esporulación), transformando los datos de porcentaje según la fórmula $\arcsen \sqrt{\%}$; las medias obtenidas se docimaron según la Prueba de Rangos Múltiples de Duncan al 5 % de probabilidad de error.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Al analizar el efecto de los productos sobre el crecimiento micelial de *Pyricularia grisea*, se pudo apreciar que no se presentaron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos correspondientes a cada día (Figura 1). Además, se observó un incremento progresivo en relación con los días evaluados. Esta tendencia

fue similar a la registrada en un estudio donde al cabo de siete días se caracterizaron morfológicamente diferentes aislamientos del patógeno en medio ASHA (13), resultado que evidencia ausencia de capacidad inhibitoria de los productos a esa concentración sobre el crecimiento micelial de *Pyricularia grisea*.

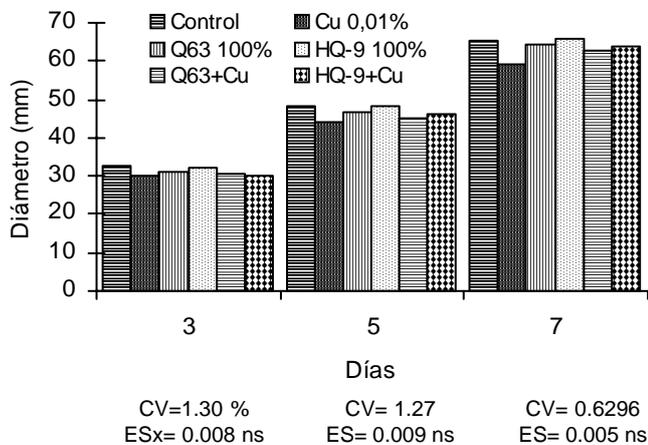


Figura 1. Efecto de diferentes derivados de quitina y el cobre en el crecimiento micelial del hongo *Pyricularia grisea*

Este comportamiento puede atribuirse a que las concentraciones estudiadas son bajas (100 mg.L^{-1}) y/o a que el tiempo de exposición del hongo al producto utilizado en este experimento no fue suficiente. No obstante, en un estudio donde se evaluó el efecto de la quitosana (100 mg.L^{-1}) sobre otro aislamiento monospórico de *Pyricularia grisea* utilizando este método de aplicación del producto, se detectó también ausencia de inhibición del crecimiento micelial del patógeno (15).

La explicación de este comportamiento puede coincidir con la de resultados de estudios mencionados (12), que demostraron que en otros hongos las hifas continuaron desarrollándose mientras se expusieron a medio fresco y que la ultraestructura celular de estas no se afectó totalmente en presencia de la quitosana. Colateralmente, se confirma que las quitosanas en bajas concentraciones no causan un efecto letal sobre el patógeno.

Experimentos realizados envenenando el medio de cultivo con concentraciones mayores (500 y 1000 mg.L^{-1}) de quitosana e hidrolizado de quitosana (12) revelaron una alta efectividad en la inhibición del crecimiento micelial de *Pyricularia grisea*; evidentemente en este método, el tiempo de exposición del hongo al producto duró toda la experiencia.

Adicionalmente, se ha demostrado el efecto antimicrobiano de la quitosana en 14 hongos fitopatógenos de importancia económica en el cultivo del arroz (16), dentro de los cuales se encontraba *Helminthosporium oryzae* y *Rhizoctonia solani*, con porcentajes de inhibición del crecimiento de más de 50 y 80 % respectivamente. Por otro lado, se comprobó la efectividad de estos compuestos (a la concentración de 1 mg.mL^{-1}) (17) en la reducción del crecimiento micelial de *Rhizoctonia solani*, al

mismo tiempo que se observó un incremento de este efecto con el tiempo de exposición del hongo al producto.

Resultados de estudios histoquímicos revelaron que la actividad antifúngica en algunos hongos es causada por la deposición de las moléculas de quitosana dentro de la célula fúngica, dificultando el crecimiento del patógeno (21).

Se ha demostrado que no existe correlación entre el crecimiento y la esporulación del patógeno (22), lo que sugiere la posibilidad de un comportamiento diferenciado en la respuesta a estos productos en ambas fases del desarrollo del hongo.

Los resultados mostraron que efectivamente los derivados de quitina, el cobre y la combinación de ambos fueron capaces de afectar la esporulación cuyos valores de inhibición se presentan en la Figura 2.

No se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre las quitosanas, el cobre y su combinación, pero sí entre estos y el control, lo que indica que las quitosanas tuvieron un efecto deletéreo sobre la esporulación del patógeno, coincidiendo con resultados anteriores (15) que mostraron un alto porcentaje de inhibición de la esporulación de *Pyricularia grisea*.

Al observar la distribución de los conidióforos al microscopio óptico, se pudo apreciar que mientras en el control el mayor número se agrupaba en el centro de la colonia, en los tratamientos correspondientes a los productos la escasa esporulación se dispersaba hacia la periferia. Este comportamiento confirma que la esporulación de *P. grisea* es un proceso sensible a la aplicación de las quitosanas y el cobre.

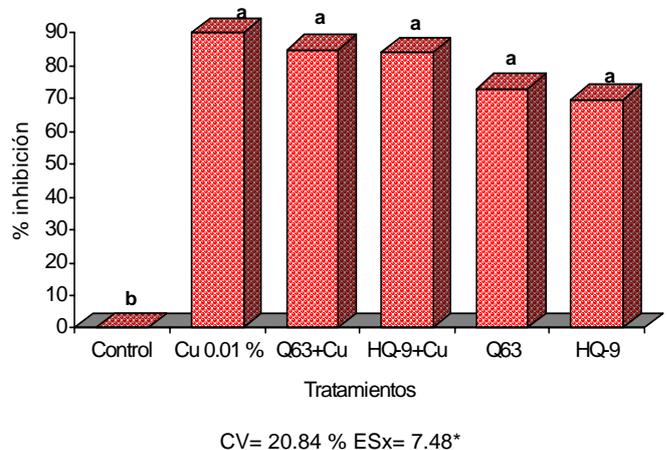


Figura 2. Comportamiento de la esporulación del hongo *Pyricularia grisea* bajo la influencia de los derivados de quitina y Cu

Aunque estadísticamente no se presentaron diferencias significativas entre las formulaciones, resulta interesante la ausencia de actividad sinérgica en las mezclas del CuSO_4 con las quitosanas. A primera vista, el efecto de la mezcla fue menor que cuando se aplicó el cobre y mayor que cuando se aplicaron las quitosanas solas.

En la Tabla II se presentan la distribución de la esporulación en los diferentes tratamientos.

Tabla II. Distribución de la esporulación del hongo *Pyricularia grisea* bajo el efecto de los tratamientos de quitosana y cobre

Tratamientos	Grado de la escala	
	Centro de la colonia	Periferia de la colonia
Q-63 100 mg.L ⁻¹	0	1
HQ-9 100 mg.L ⁻¹	0	1
Q-63 100 mg.L ⁻¹ + 0.01% CuSO ₄	0	1
HQ-9 100 mg.L ⁻¹ + 0.01% CuSO ₄	0	1
CuSO ₄ 0.01%	0	0
Control	3	2

En ninguno de los puntos evaluados se desarrolló esporulación en el centro de la colonia, mientras que en la periferia esta fue escasa, a excepción del CuSO₄ 0.01 % en que no se presentó esporulación, lo que indica que realmente hay un mayor efecto tóxico de este producto.

En este sentido, probablemente la actividad de las quitosanas se fundamenta en una de las hipótesis sugeridas en investigaciones citadas (12), que se basa en que la quitosana es capaz de penetrar en la célula fúngica e interactuar con el ADN, causando desorden en su estructura, así como inhibición en la síntesis de ARNm y proteínas. Como consecuencia, se afectaría el proceso esporulativo.

Haciendo un análisis integral de este estudio, era de esperar que particularmente la diferencia en el grado de polimerización de la quitosana y su hidrolizado (Tabla I) influyera en la actividad biológica de ellas, como ha sido informado por diferentes investigadores (16, 23), que han relacionado las variaciones en esta actividad con el tamaño del polímero, lo cual ha sido confirmado (17). Sin embargo, en este estudio no fue así, lográndose un efecto estadísticamente similar en ambos tipos de quitosana y sus respectivas combinaciones con sulfato de cobre en las diferentes evaluaciones realizadas. No se presentaron diferencias significativas en el crecimiento micelial desarrollado por el hongo *Pyricularia grisea*, en los diferentes tratamientos de quitosana, en las condiciones y concentración de 100 mg.L⁻¹ estudiadas cada día evaluado, pero estos productos sí inhibieron la esporulación con valores comprendidos entre 70 y 85 %. Teniendo en cuenta que el hongo en el campo se disemina por los conidios, la aplicación de formulaciones a base de quitosanas en bajas concentraciones, pudiera contribuir a la reducción del inóculo inicial de la enfermedad.

REFERENCIAS

1. Cuba. MINAGRI. Instructivo técnico del cultivo del arroz, 2002.
2. Patiño, M. R.; Hernández, P. y Suárez, R. Sanidad Vegetal. La Habana : Editorial Pueblo y Educación. 1987. 551 p.
3. Cornide, M. T.; Lima, H. y Surlí, J. La resistencia genética de las plantas cultivadas. La Habana : Editorial Científico-Técnica, 1994. 195 p.
4. Rodríguez, A. T.; Morales, D. y Ramírez, M. A. Efecto de extractos vegetales sobre el crecimiento *in vitro* de hongos fitopatógenos. *Cultivos Tropicales*, 2000, vol. 21, no. 2, p. 79-82.
5. Toledo, Y.; Hernández, A.; Alvarez, M.; Martí, G. M. y Márquez, R. Determinación del efecto antagónico de un biopreparado a partir de una cepa de *Burkholderia cepacia* ante *Fusarium sp.* en el cultivo del gladiolo (*Gladiolus sp.*) *Cultivos Tropicales*, 2002, vol. 23, no. 4, p.11-15.
6. Falcón, A. B. *et al.* Chitosan and its hydrolysate at tobacco-*Phytophthora parasitica* interaction. *Cultivos Tropicales*, 2002, vol. 23, no.1, p.62-66.
7. Paz-Lago, D. *et al.* Influencia de derivados de quitina en la interacción *Fusarium oxysporum fsp. lycopersicii* a nivel de bioensayo en plántulas de tomate. *Cultivos Tropicales*, 1999, vol. 20, no. 3, p. 59-61.
8. Paz-Lago, D. *et al.* Tomato *Fusarium oxysporum* interactions: II- Chitosan and MSB induced resistance against FOL in young tomato plant. *Cultivos Tropicales*, 2000, vol. 21, no. 4, p. 17-20.
9. Echemendía, A. L. y González, G. Estudio sobre el empleo de elicitors en la inhibición del virus del mosaico del tabaco en plantas de tomate. *Fitosanidad*, 2000, vol. 4, no. 1.2 p. 109-110.
10. Takeshi, Y.; Ito, Y. y Shibuya, N. Oligosaccharide elicitors and their receptors for plant defense responses. *Trend in Glycosc. and Glytotech*, 2000, vol. 12, no. 64. p. 113-120.
11. Rodríguez, A. T. Efecto de derivados de quitina en la inducción de mecanismos defensivos y en la protección del arroz contra *Pyricularia grisea*. [Tesis de Maestría]; Universidad Agraria de La Habana, 2003.
12. Rodríguez, A. T.; Ramírez, M. A.; Nápoles, M. C.; Márquez, R. y Cárdenas R. M. Antifungal activity of chitosan and one of its hydrolysates on *Pyricularia grisea* fungus. *Cultivos Tropicales*, 2003, vol. 24, no. 2, p. 85-88.
13. Cárdenas, R. M.; Rodríguez, A. T. y González, M. Selección de variedades de arroz resistentes a la Piriculariosis (*Pyricularia grisea*) usando métodos tradicionales y biotecnológicos. Informe final PTCT 0122. CITMA P. Río, 2003.
14. Ramírez, M. A.; Cabrera, G.; Gutierrez, A. y Rodríguez, T. Metodología para la obtención de quitosana a bajas temperaturas. *Cultivos Tropicales*, 2000, vol. 21, no.1, p. 79-82.
15. Echevarría, A. Estudio de la actividad antifúngica de la quitosana en el crecimiento y esporulación *in vitro* del hongo *Pyricularia grisea* Sacc. [Tesis de Grado]; Universidad de Pinar del Río, 2003, 42 p.
16. Pombo, R. Relación estructura-actividad de la quitosana y sus hidrolizados solubles sobre algunos hongos fitopatógenos. [Tesis de Maestría]; UNAH, 1996.
17. Parra, Y. y Ramírez, M. A. Efecto de diferentes derivados de la quitina sobre el crecimiento *in vitro* del hongo *Rhizoctonia solani* Kuhn. *Cultivos Tropicales*, 2002, vol. 23, no. 2, p. 73-75.
18. Robert, F. Chitin Chemistry. London : MacMillan, 1992.
19. Rinaudo, M.; Mi Milas y Pham Le Dung. Characterization of chitosan influence of ionic strength and degree of acetylation on chain expansion. *Int. J. Biol. Macromolecule*, 1993, vol 15.

20. Fabregat, M. Aspectos bioecológicos y control de *Pyricularia oryzae* Cav. en el arroz. [Tesis de grado]; UNAH, 1984.
21. Benhamou., N. Elicitor-induced resistance in tomato plants against fungal pathogens: ultrastructure and cytochemistry on the induced response. *Scanning Microscopy*, 1995, vol. 9, no. 3, p. 861-880.
22. Kandhari, J. y Kandhari, J. Studies on improving growth and sporulation of *Pyricularia grisea* causing leaf blight of pearl millet. *Journal of Mycopathological Research*, 1996, vol. 34, no. 2, p. 141-147.
23. Ben, S. /et al./ Composition and method for controlling fungal diseases in plants. US patenteWO/5 965 545, 1999.

Recibido: 28 de octubre de 2003

Aceptado: 18 de junio de 2004

Cursos de Verano

Precio: 320 USD

Biología

Coordinador: Dra.C. María M. Hernández Espinosa
Fecha: 1 al 5 de julio

SOLICITAR INFORMACIÓN

Dr.C. Walfredo Torres de la Noval
Dirección de Educación, Servicios Informativos
y Relaciones Públicas
Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA)
Gaveta Postal 1, San José de las Lajas,
La Habana, Cuba. CP 32700
Telef: (53) (64) 6-3773
Fax: (53) (64) 6-3867
E.mail: posgrado@inca.edu.cu