

EFECTO DE DIFERENTES DERIVADOS DE LA QUITINA SOBRE EL CRECIMIENTO *In Vitro* DEL HONGO *Rhizoctonia solani* Kuhn

Yanet Parra[✉] y M. A. Ramírez

ABSTRACT. In «Los Palacios» Rice Research Station, the *in vitro* effect of different chitin derivatives (QC, HMK-70, Q-63, HQ-63, D-glucosamine and N-acetil-glucosamine) was studied on the growth of fungus *Rhizoctonia solani* Kuhn. Colony diameter was evaluated after two, four and six days, and the inhibition percentage of fungal micelial growth was determined. Results showed a marked inhibitory effect of the strain evaluated in presence of the chitosan HMK-70, Q-63 and its corresponding enzymatic hydrolysate HQ-63; this effect increased with product concentration, standing out both last, with an inhibition of 100 % at the concentration of 1mg.mL⁻¹. On the other hand, D-glucosamine and N-Acetil-Glucosamine did not show micelial growth inhibition, while the colloidal chitin (QC) showed a slight inhibitory effect on the fungus studied.

Key words: chitin, *Rhizoctonia solani*, growth inhibitors

RESUMEN. En la Estación Experimental del Arroz «Los Palacios», se estudió el efecto *in vitro* de diferentes derivados de la quitina (QC, HMK-70, Q-63, HQ-63, D-glucosamina y N-acetil-glucosamina) sobre el crecimiento del hongo *Rhizoctonia solani* Kuhn. Para ello se evaluó el diámetro de la colonia a los dos, cuatro y seis días, determinándose el porcentaje de inhibición del crecimiento del hongo. Los resultados mostraron un marcado efecto inhibitorio de la cepa evaluada en presencia de las quitosanas HMK-70, Q-63 y su correspondiente hidrolizado enzimático HQ-63; dicho efecto aumentó con la concentración de los productos, destacándose los dos últimos, con una inhibición del 100 % a la concentración de 1 mg.mL⁻¹. Por su parte, la D-glucosamina y la N-Acetil-Glucosamina no mostraron inhibición del crecimiento micelial, mientras que la quitina coloidal (QC) presentó un ligero efecto inhibitorio sobre el hongo en estudio.

Palabras clave: quitina, *Rhizoctonia solani*, inhibidores del crecimiento

INTRODUCCIÓN

El uso de productos ecológicamente inocuos y biodegradables es uno de los principales retos en la agricultura moderna. En ese sentido, la utilización de la quitina y sus derivados representa una alternativa muy promisoría debido a sus múltiples y diversos usos (1).

La quitosana, derivado desacetilado de la quitina, ha sido ampliamente utilizada en la inducción de mecanismos defensivos en las plantas. Este producto tiene la doble propiedad de inhibir el crecimiento micelial de una amplia variedad de hongos fitopatógenos (2) e inducir mecanismos defensivos que provocan resistencia en los cultivos, tales como el tomate y el pepino, llegándose a obtener niveles de protección elevados, incluso a escala comercial (3).

Estas propiedades de la quitosana unidas a su carácter de polisacárido natural, biocompatible y completamente inocuo (4), lo convierten en un sustituto ideal de los actuales productos fitosanitarios, altamente nocivos para el medio ambiente (5).

Yanet Parra, Investigadora y Ms.C. M. A. Ramírez, Investigador Agregado de la Estación Experimental del Arroz «Los Palacios», Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, Gaveta Postal 1, San José de las Lajas, La Habana, CP 32 700.

✉ palacios@inca.edu.cu

En el presente trabajo se evaluaron las potencialidades de inhibición de diferentes derivados de la quitina sobre el crecimiento micelial del hongo *Rhizoctonia solani* Kuhn, agente patógeno causante del tizón de la vaina en el cultivo del arroz, considerada actualmente como la segunda enfermedad de importancia en este cultivo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Este trabajo es el resultado de tres ensayos realizados en el Laboratorio de Fitopatología de la Estación Experimental del Arroz «Los Palacios», perteneciente al Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA).

Las quitosanas Q-63 y HMK-70 se obtuvieron en el Laboratorio de Oligosacarinas del INCA a partir de la quitina de langosta, procedente de los Laboratorios Farmacéuticos «Mario Muñoz» mediante hidrólisis básica en condiciones homogéneas con tiempos de reacción de seis y ocho días respectivamente (6). El hidrolizado de quitosana HQ-63 se obtuvo por hidrólisis enzimática de la quitosana Q-63 con el preparado enzimático CELLUCLAST (7). La quitina coloidal fue preparada a partir de quitina de langosta (8). La D-glucosamina (G) y N-Acetilglucosamina (NAG) fueron compradas a la firma Sigma. Las principales características de los productos en estudio se muestran en la Tabla I.

Tabla I. Características químicas de los productos evaluados

Productos	Grado de acetilación (%)	Grado de polimerización
QC	88.0	nd
Q-63	36.5	278
HMK-70	25.8	576
HQ-63	36.5	2-7

QC: quitina coloidal

Q-63: quitosana

HMK-70: quitosana

HQ-63: hidrolizado enzimático de quitosana Q-63

Ensayo de actividad antifúngica. Se utilizó la cepa 201-8-3 de *Rhizoctonia solani* Kuhn aislada de muestras de arroz con síntomas característicos de la enfermedad. Se cultivó en medio papa-dextrosa-agar (PDA) (BIOCEN), a pH 5.6 con alternancia de luz y oscuridad (16 y 8 h respectivamente) a una temperatura de 26 a 28°C durante seis días.

El ensayo se inició adicionando disoluciones de los diferentes productos a evaluar a 50 mL del medio PDA, de forma tal de obtener concentraciones finales de 0.5 y 1 mg.mL⁻¹. Posteriormente el medio fue distribuido en placas Petri, que se inocularon a continuación con un disco de micelio del hongo de 0.8 cm de diámetro. Como control se utilizó medio papa dextrosa agar solo y las evaluaciones fueron realizadas a los dos, cuatro y seis días posteriores a la inoculación. Se determinó el crecimiento micelial del hongo, midiendo el diámetro de cada colonia. Con los resultados obtenidos se determinó el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial según la fórmula: % de inhibición = (1-tratado/control)x100.

Los tratamientos fueron distribuidos en un diseño completamente aleatorizado con tres repeticiones. El análisis estadístico se realizó transformando los datos originales según la fórmula $\arcsen\sqrt{\%}$. Las medias de los tratamientos se compararon por la prueba de rangos múltiples de Duncan con un nivel de significación de 0.05 %.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La Figura 1 muestra el porcentaje de inhibición de los diferentes tratamientos sobre el crecimiento del hongo *Rhizoctonia solani* Kuhn, a la concentración de 0.5 mg.mL⁻¹.

Como se puede apreciar, de los productos evaluados, las quitosanas Q-63, HMK-70, el hidrolizado de quitosana (HQ-63) y en menor medida la quitina coloidal (QC) redujeron el crecimiento del hongo *Rhizoctonia solani* con diferencias significativas respecto al tratamiento control, comportamiento que coincide con lo obtenido por varios autores acerca de la efectividad de estos compuestos en la reducción del crecimiento micelial de diferentes hongos (2, 9). Como se refleja en el gráfico, los productos antes mencionados mostraron un efecto inhibitorio que se incrementó con el tiempo, no observándose diferencias estadísticamente significativas entre la quitosana

HMK-70 y el hidrolizado de quitosana (HQ-63) en los diferentes momentos evaluados y sí entre estos y los demás compuestos en estudio. La quitosana Q-63 fue la de mejor comportamiento, llegando aproximadamente en el sexto día, a un 60 % de inhibición; por su parte, la D-glucosamina (G) y la N-acetilglucosamina (NAG) no tuvieron efecto inhibitorio sobre el crecimiento fúngico.

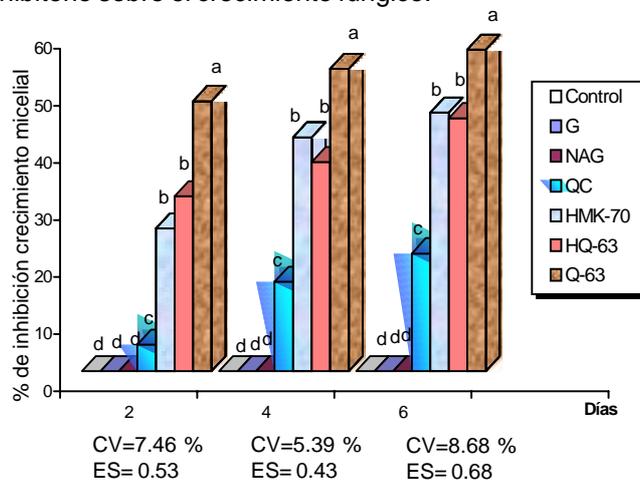


Figura 1. Efecto de diferentes derivados de quitina sobre el crecimiento del hongo *Rhizoctonia solani* (0.5 mg.mL⁻¹)

Con el propósito de buscar un mayor efecto de los productos sobre el crecimiento micelial del hongo, estos se evaluaron a una concentración de 1 mg.mL⁻¹, mostrándose los resultados en la Figura 2.

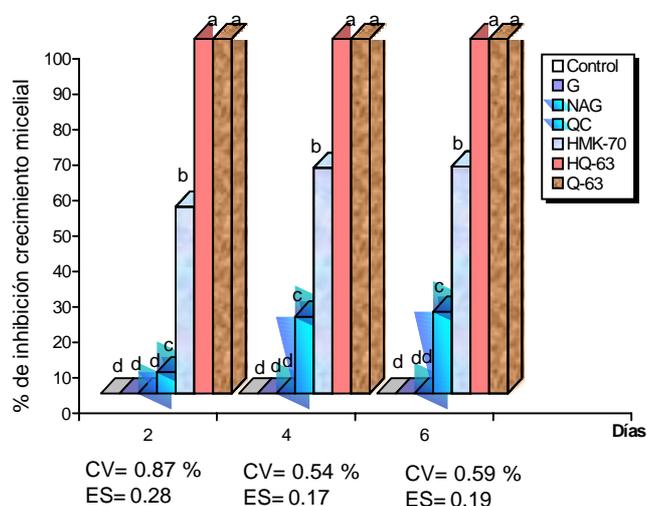


Figura 2. Efecto de diferentes derivados de quitina sobre el crecimiento del hongo *Rhizoctonia solani* (1 mg.mL⁻¹)

Como se observa, el incremento de la concentración provocó un aumento, en el tiempo, del efecto inhibitorio de las quitosanas Q-63, HMK-70, el hidrolizado de quitosana (HQ-63) y en menor grado de la QC sobre el crecimiento micelial fúngico. Para el caso de la quitosana Q-63 y su hidrolizado (HQ-63), se obtuvo un 100 % de inhibición en los diferentes momentos evaluados. Este

comportamiento del hidrolizado de quitosana de igualar su efecto inhibitorio al del polisacárido de partida, coincide con lo informado por otros autores que al trabajar con especies del género *Phytophthora* han encontrado que hidrolizados de quitosana a la concentración de 1 mg.mL⁻¹ presentan un comportamiento similar al del polímero de partida (2). Al igual que para la concentración anterior, la D-glucosamina y N-acetilglucosamina se mantuvieron sin inhibir el crecimiento micelial.

Como refleja la Tabla I, existe una apreciable diferencia en las características de los productos evaluados. El grado de acetilación oscila desde el 25.8 % de la quitosana HMK-70 hasta el 88 % de la quitina, mientras el grado de polimerización se presenta desde oligómeros de dos unidades hasta polímeros con gran número de unidades enlazadas.

Pudiera esperarse que estas diferencias de grado de acetilación y polimerización de los derivados de quitina influyan significativamente en la actividad antifúngica, según lo publicado por diferentes autores, quienes han relacionado las variaciones de esta actividad con la mayor naturaleza catiónica (o sea menor grado de acetilación) y con el tamaño del polímero (10, 11).

Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que, en efecto, las quitosanas que son los compuestos de menor grado de acetilación exhiben la mayor inhibición del crecimiento fúngico, mientras que la quitina coloidal con un alto grado de acetilación tuvo una actividad mucho menor. Esto sugiere la importancia que tiene la cantidad de grupos aminos cargados a lo largo de la cadena polimérica.

Por su parte, el efecto del grado de polimerización de los compuestos evaluados en la inhibición del crecimiento fúngico fue confirmado en este estudio por la ausencia de actividad inhibitoria de la D-glucosamina y la N-Acetil-Glucosamina, comparada con las quitosanas. En ese sentido, se ha demostrado que es necesaria la presencia de oligómeros de siete monómeros o más para lograr una actividad antifúngica efectiva en *Fusarium solani*, mientras que los monómeros o dímeros no muestran este tipo de actividad (12).

Teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto, debiera esperarse que la quitosana HMK-70 (que tiene menor grado de acetilación y mayor grado de polimerización) tuviera un mayor efecto inhibitorio comparada con los demás compuestos; sin embargo, la quitosana Q-63 fue la que tuvo mejor comportamiento. Esto pudiera deberse a que el mayor grado de polimerización de HMK-70 provoca una mayor viscosidad de las disoluciones de esta quitosana, lo cual pudiera afectar su interacción con las membranas del hongo como ha sido informado anteriormente (13). Además, se ha encontrado que el método de obtención y la fuente de origen de la quitina afectan considerablemente sus características principales: grado de desacetilación, masa molecular (6) y sus respectivas actividades biológicas (12).

De modo general se puede concluir que, de los productos evaluados, la quitosana Q-63 y su hidrolizado enzimático fueron los que mostraron un mayor efecto inhibitorio del crecimiento micelial a la concentración de 1 mg.m⁻¹.

REFERENCIAS

1. Muzarelli, R. Chitin, Oxford : Pergamon Press, 1977. p. 61-62.
2. Nápoles M. C.; Cabrera, J. C.; Cabrera, G. y Varela, M. Efecto de diferentes polisacáridos sobre el crecimiento de algunos hongos fitopatógenos. *Cultivos Tropicales*, 1997, vol. 18, no. 3, p. 27-29.
3. Paz-Lago, D.; Cabrera, G.; Ramírez, M. A.; Pombo, R. y Gutiérrez, A. Influencia de derivados de quitina en la interacción tomate-*Fusarium oxysporum fsp licopersicii* a nivel de bioensayo. *Cultivos Tropicales*, 1999, vol. 20, no. 3, p. 59-61.
4. Struszczyk, M. H./et al./ Biodegradation of chitosan, H. Struszczyk ed., Progress on chemistry and application of chitin and its derivatives, Monograph. *Polish Chitin Soc.*, 1998, vol. 4, p. 65-78.
5. Struszczyk, H. y Pospieszny, H. New application of chitin and its derivatives in plant protection. Application of Chitin and Chitosan, Technomic Publishing, 1997, 184 p.
6. Ramírez, M. A.; Cabrera, G.; Gutiérrez, A. y Rodríguez, T. Metodología para la obtención de quitosana a bajas temperaturas a partir de quitina de langosta. *Cultivos Tropicales*, 2000, vol. 21, no. 1, p. 81-84.
7. Hirano, Shigehiro Applications of chitin and chitosan in the ecological and environmental fields. Appl. Chitin Chitosan, Lancaster. Mattheus F. A. Technomic. 1997. 54 p.
8. Rodríguez, Y.; Noval, B. de la; Ramírez, M. A. y Rodríguez, P. Efecto de dos fuentes de quitina sobre la germinación, el crecimiento y desarrollo de plántulas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Cultivos Tropicales*, 1998, vol. 19, no. 3, p. 11-13.
9. Morimoto, M. y Shigemasa, Y. Characterization and bioactivities of chitin and chitosan regulated their degree of deacetylation. *Kobunshi Ronbunshu*, 1997, vol. 54, no. 10, p. 621-631.
10. Ben, Shalom /et al./ Composition and method for controlling fungal diseases in plants. US patente WO/5 965 545, 1999.
11. Pombo, R. Relación estructura-actividad de la quitosana y sus hidrolizados ácidos. [Tesis de grado], ISCAH, 1996.
12. Hadwiger, L. A. Chitosan polymer sizes effective in inducing phytoalexin accumulation and fungal suppression are verified with synthesized oligomers. *Mol. Plant-Microbe Interaction*, 1994, vol. 7, no. 4, p. 531-533.
13. Hirano, S. y Nagao, N. Effect of chitosan, pectic acid on pathogenic fungi. *Agri. Biol. Chem.*, 1989. vol. 58, no. 1, p. 24-26.

Recibido: 1 de octubre del 2001

Aceptado: 11 de diciembre del 2001