

ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA *in vitro* DE LAS QUITOSANAS K1 Y SIGMA FRENTE A *Bipolaris oryzae* (B. DE HAAN) SHOEM.

Deyanira Rivero*, A. Cruz*, B. Martínez**, Aida T. Rodríguez* y M.A. Ramírez*

*Estación Experimental de Arroz "Los Palacios", Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas. Carretera a Sierra Maestra, Km. 1 ½, Los Palacios, Pinar del Río, Cuba. **Grupo de Fitopatología, Dirección de Protección de Plantas, Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), Apartado 10, San José de las Lajas, La Habana, Cuba. Correo electrónico: deyanira@inca.edu.cu

RESUMEN: Con el objetivo de determinar la actividad antifúngica de la quitosana sobre *Bipolaris oryzae*, patógeno de mayor incidencia en el síndrome del manchado del grano de arroz y agente causal de la enfermedad de la mancha parda de la hoja, se estudió el efecto *in vitro* de diferentes concentraciones (300, 500, 700 y 1000 mg/L) de las quitosanas K1 (INCA) y SIGMA sobre el crecimiento micelial del hongo. Para ello se midió el diámetro de las colonias a los 3, 4, 5, 6 y 7 días, y se calculó el porcentaje de inhibición del crecimiento del hongo, con respecto al control no tratado. Para los tratamientos que mostraron total inhibición se determinó el efecto fungicida. Los resultados indicaron que ambos productos tienen un efecto inhibitorio del crecimiento del hongo a las concentraciones evaluadas. Se obtuvo una inhibición total a la concentración de 1000 mg/L de quitosana SIGMA, para la cual se mostró, además, un efecto fungicida.

(Palabras clave: quitosana; *Bipolaris oryzae*; actividad antifúngica)

In vitro ANTIFUNGAL ACTIVITY OF K1 AND SIGMA CHITOSANS AGAINST *Bipolaris oryzae* (B. DE HAAN) SHOEM

ABSTRACT: To determine the antifungal activity of chitosan against *Bipolaris oryzae*, which is a pathogen with the highest incidence in the rice spotted grain disease and the causal agent of brown leaf spot, the *in vitro* effect of different concentrations (300, 500, 700 and 1000 mg/L) of K1 (INCA) and SIGMA chitosans on fungal mycelial growth was studied. The colony diameter was measured after 3, 4, 5, 6 and 7 days, and the inhibition percentage of fungal mycelial growth compared with the non-treated control was calculated. The fungicide effect of the product for the treatment that totally inhibited the fungus was determined. The results indicated that both products had an inhibitory effect on fungal growth at all evaluated concentrations. SIGMA chitosan showed a total inhibition at 1000 mg/L, besides its fungicide effect.

(Key words: chitosan; *Bipolaris oryzae*; antifungal activity)

INTRODUCCIÓN

El cultivo del arroz (*Oryza sativa* L.) es afectado por numerosas enfermedades, entre las que se destacan las de origen fungoso. Algunos hongos se pueden encontrar asociados a varias enfermedades en diferentes etapas del ciclo del cultivo. Tal es el caso de *Bipolaris oryzae* (B. de Haan) Shoem., agente causal de la mancha parda de la hoja y uno de los principales patógenos involucrados en el síndrome del manchado del grano, debido a su alta incidencia en la mayoría de las regiones donde se siembra el cereal (4).

El hongo causa daños en el follaje de las plantas adultas, lo que ha desencadenado pérdidas severas como la que produjo la hambruna de 1943, debido a la reducción del rendimiento del cultivo entre el 40 y el 90% en 1942 (3). Puede transmitirse por semillas y causa pudriciones en las mismas, tizones, marchitez y amarillamiento en semilleros, manchas en las glumas, lesiones sobre la raíz, marchitez de la panícula, coloración oscura y manchado del grano (11). Este agente fitopatógeno produjo una epifitía en la India, que redujo el número de hijos de las plantas e inhibió el crecimiento de la raíz y

del tallo, con lo que el rendimiento decreció entre el 20 y 40% (3).

En Cuba existe una estrategia para el manejo del síndrome del manchado del grano y de la mancha parda (9); no obstante, esta se fundamenta en la aplicación repetida de fungicidas químicos en varias etapas del ciclo del cultivo, lo que incrementa la contaminación en los ecosistemas arroceros, y la enfermedad persiste en las áreas de producción. De ahí que resulte apremiante la búsqueda de productos naturales, como la quitosana, que es un polisacárido natural, biodegradable e inócua, eficiente en el control de algunos agentes fitopatógenos (8); y de esta forma se contribuya a disminuir la incidencia del patógeno y la carga contaminante debido a la aplicación de químicos nocivos. En este sentido, el objetivo del presente estudio consistió en evaluar la actividad antifúngica de las quitosanas K1 y SIGMA sobre el crecimiento micelial del patógeno *B. oryzae*.

MATERIALES Y MÉTODOS

En los diferentes ensayos se utilizó el aislamiento 2-01-05 de *B. oryzae* correspondiente al cepario del Laboratorio de Micología Vegetal del Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), obtenido a partir de granos de arroz manchados de la variedad INCA LP-5. La quitosana K1 se obtuvo, a partir de quitina de langosta en el Laboratorio de Oligosacarinas del Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA) (15) y presentó un 88 % de desacetilación. Se empleó, además, quitosana SIGMA, con 90,5 % de desacetilación.

Efecto de las quitosanas K1 y SIGMA sobre el crecimiento micelial de *B. oryzae*

Se empleó el método de envenenamiento del medio, para lo cual se adicionaron iguales volúmenes de medio de cultivo papa-dextrosa-agar (PDA) (BIOCEN) y soluciones madres de quitosanas K1 y SIGMA, de forma independiente, a las concentraciones de 600, 1000, 1400 y 2000 mg/L, de manera que se obtuvieron concentraciones efectivas de 300, 500, 700 y 1000 mg/L de ambos compuestos.

Posteriormente se sembraron discos de micelio de 0,5 cm de diámetro de *B. oryzae* en el centro de placas Petri con medio envenenado, ajustado a pH 5,2, a razón de un disco por placa (4 repeticiones). Los discos miceliales se obtuvieron de la periferia de las colonias, a partir de cultivos fungosos puros de 5 días de edad, en medio PDA, incubado en oscuridad, a una temperatura de 26±2°C. Se utilizó como control un tratamiento donde se añadió agua

destilada estéril en lugar de quitosana a igual volumen de medio PDA.

Se midió diariamente el diámetro de las colonias (cm) desde los 3 y hasta los 7 días, se restó el diámetro del disco sembrado y se determinó el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial mediante la fórmula:

$$\% \text{ Inhibición} = (1 - [\text{diámetro de la colonia tratada} / \text{diámetro de la colonia control}]) \times 100.$$

Se determinó, además, la velocidad de crecimiento del hongo (cm/h) a los 3, 4, 5, 6 y 7 días en todos los tratamientos, mediante la razón del crecimiento fúngico relativo (incremento del diámetro de la colonia en un intervalo de tiempo) sobre el intervalo de tiempo transcurrido.

Actividad fungicida de las quitosanas

En las variantes donde se obtuvo 100 % de inhibición del crecimiento, se verificó la actividad fungicida de los compuestos, para lo cual se sembraron en medio PDA sin quitosana, de manera invertida, los discos de micelio sin crecimiento, y se incubaron bajo las condiciones descritas anteriormente. Se midió diariamente el diámetro de cada colonia (cm) desde los 3 hasta los 7 días, se utilizó como control un cultivo del hongo crecido a partir de un disco de micelio no tratado con quitosana, sembrado e incubado en las mismas condiciones que los tratados.

Para el desarrollo de este trabajo se empleó un diseño completamente aleatorizado. Los datos de porcentajes de inhibición del crecimiento micelial, obtenidos en el primer ensayo, se transformaron mediante la expresión $2 \arcsen \sqrt{\%}$ y se realizó un ANOVA bifactorial, donde los factores fueron producto y concentración. La velocidad de crecimiento se analizó mediante un ANOVA simple. Las medias se compararon mediante la Prueba de Rangos Múltiples de Duncan ($p < 0,05$). Los datos correspondientes al diámetro de las colonias, en el ensayo de actividad fungicida, se analizaron a través de la Prueba *t* de Student para muestras independientes.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto de las quitosanas K1 y SIGMA sobre el crecimiento micelial de *B. oryzae*

En todos los tratamientos se obtuvo una reducción del crecimiento micelial del patógeno con respecto al control, en todos los momentos evaluados (Tabla 1). El efecto inhibitorio tanto de la quitosana K1

TABLA 1. Efecto de las quitosanas K1 y SIGMA sobre el crecimiento micelial de *Bipolaris oryzae*. / *Effect of K1 and SIGMA chitosans on Bipolaris oryzae mycelial growth*

Tratamientos	Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial por día				
	3	4	5	6	7
Control	0 h	0 h	0 g	0 f	0 g
K1-300 mg/L	5 g	4 g	10 f	13 e	13 f
K1-500 mg/L	18 f	16 f	16 e	14 e	15 e
K1-700 mg/L	50 e	44 e	47 d	45 d	46 d
K1-1000 mg/L	61 d	51 d	50 d	48 d	47 d
SIGMA-300 mg/L	58 de	46 de	51 d	46 d	44 d
SIGMA-500 mg/L	89 c	78 c	76 c	71 c	64 c
SIGMA-700 mg/L	98 b	91 b	89 b	85 b	80 b
SIGMA-1000 mg/L	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a
ESx	0.063	0.042	0.024	0.024	0.020

Medias con letras iguales, en la columna, no difieren significativamente ($p < 0,05$).

como de SIGMA se incrementó a medida que aumentó la concentración de ambos compuestos, excepto para las concentraciones de 700 y 1000 mg/L de K1 que no difirieron significativamente entre sí a partir del quinto día. Se alcanzó una alta inhibición a la concentración de 700 mg/L de quitosana SIGMA, y fue total (100% de inhibición) a 1000 mg/L del compuesto. En algunos tratamientos hubo una ligera reducción del porcentaje de inhibición final, pero estos siguieron la misma tendencia de incremento con respecto a la concentración y mostraron la potencialidad de ambos compuestos de inhibir el crecimiento micelial del patógeno.

Resultados similares se han obtenido contra los hongos patógenos del arroz *Rhizoctonia solani* Kuhn y *Pyricularia grisea* Sacc, cuando se trataron con quitosana a la concentración de 1000 mg/L, con un 100 % de inhibición del crecimiento (12, 16). Sin embargo, se ha observado un comportamiento diferente para otros hongos fitopatógenos, como *Sarocladium oryzae* (Sawada) donde solo se logró una inhibición de un 30%, mediante el empleo de un método donde el hongo se expone menos tiempo al producto (5); así como en ensayos de inhibición *in vitro* del hongo *Phytophthora parasitica* Dastur, mediante el empleo de quitosana y sus hidrolizados enzimáticos, donde se alcanzaron niveles inferiores al 90 % de inhibición (6). Para las especies *Rhizopus stolonifer* Ehrenberg ex Fr., *Phytophthora infestans* Mont. y *Fusarium oxysporum* Schlechtend., se requirieron elevadas concentraciones (hasta 4000 mg/L) para lograr una alta inhibición (14).

Por otra parte, en un estudio de actividad antimicrobiana de siete derivados de quitosana (hidroxipropil quitosana soluble en agua), se obtuvieron concentraciones mínimas inhibitorias de 310 y 550 mg/L con dos de estos compuestos contra los hongos

patógenos de frutos *Coniella diplodiella* (Speg.) Petrak y Sydow y *F. oxysporum*. Los restantes compuestos tuvieron efecto inhibitorio sobre *C. diplodiella* a las concentraciones mínimas de 1100, 5000 y 7500 mg/L y sobre *F. oxysporum* a 1100, 3800 y 10 000 mg/L. Sin embargo, no lograron inhibición de los hongos *Rhizopus nigricans* Ehrenberg. y *Gloeosporium fructigenum* Berk. a las concentraciones evaluadas (13).

De forma general, las velocidades de crecimiento de *B. oryzae* en los tratamientos con quitosana, para cada día, son menores que las del tratamiento control (Tablas 2 y 3).

En los tratamientos con quitosana K1, a pesar de mostrar diferencias estadísticas significativas respecto al control, excepto para las concentraciones de quitosana de 300 mg/L a los 3 y 4 días, y de 500 mg/L a los 4 y 6 días (Tabla 2), no existe una reducción marcada de la velocidad del crecimiento. Sin embargo, en los tratamientos con quitosana SIGMA (Tabla 3) se alcanzó la mitad, tercera y quinta parte de la velocidad de crecimiento del hongo en el control, y un valor nulo de velocidad para la mayor concentración.

Esto evidencia que, al parecer, la reducción final en el crecimiento de *B. oryzae* se debe a la acción de ambos productos (y más marcadamente de la quitosana SIGMA) sobre la velocidad de crecimiento del hongo.

Estos resultados son alentadores si se comparan con los obtenidos en ensayos donde se determinó el efecto de la quitosana sobre la levadura de uso industrial *Saccharomyces cerevisiae* Hansen, en los que se observó una disminución de la velocidad de crecimiento directamente proporcional a la concentración del polímero, con una reducción de la mitad respecto al testigo a la concentración de 6000 mg/L (7).

TABLA 2. Velocidad de crecimiento de *B. oryzae* frente a la quitosana K1./ *Bipolaris oryzae* growth velocity against K1 chitosan

Tratamientos	Velocidad de crecimiento de <i>B. oryzae</i> (cm/h) por día				
	3	4	5	6	7
Control	0.056 a	0.047 a	0.050 a	0.047 a	0.047 a
300 mg/L	0.053 a	0.047 a	0.032 c	0.033 b	0.042 b
500 mg/L	0.046 b	0.043 ab	0.042 b	0.046 a	0.035 c
700 mg/L	0.028 c	0.036 c	0.021 d	0.031 b	0.024 e
1000 mg/L	0.022 d	0.039 bc	0.028 cd	0.029 b	0.029 d
ES _x	0.001	0.002	0.002	0.002	0.002

Medias con letras iguales, en la columna, no difieren significativamente ($p < 0,05$).

TABLA 3. Velocidad de crecimiento de *B. oryzae* frente a la quitosana SIGMA./ *Bipolaris oryzae* growth velocity against SIGMA chitosan

Tratamientos	Velocidad de crecimiento de <i>B. oryzae</i> (cm/h) por día				
	3	4	5	6	7
Control	0.056 a	0.047 a	0.050 a	0.047 a	0.047 a
300 mg/L	0.024 b	0.044 a	0.015 b	0.036 b	0.035 b
500 mg/L	0.006 c	0.029 b	0.015 b	0.028 c	0.039 b
700 mg/L	0.001 d	0.015 b	0.010 b	0.018 d	0.026 c
1000 mg/L	0.000 d	0.000 c	0.000 b	0.000 e	0.000 d
ES _x	0.001	0.005	0.005	0.002	0.002

Medias con letras iguales, en la columna, no difieren significativamente ($p < 0,05$).

La actividad antifúngica de la quitosana y sus derivados se asocia a su porcentaje de desacetilación, pues se ha encontrado relación entre la naturaleza catiónica y la acción efectiva contra los agentes fitopatógenos; así como también se potencia dicha actividad en función del grado de sustitución del compuesto (17, 18).

Actividad fungicida de las quitosanas

El aislamiento de *B. oryzae* no presentó viabilidad al encontrar las condiciones óptimas de cultivo, mientras que el tratamiento control mostró un rápido crecimiento (7,4 cm de diámetro a los 7 días). Esto demuestra que la quitosana SIGMA, a la concentración de 1000 mg/L tuvo un efecto fungicida sobre el mismo; es decir, que las estructuras vegetativas y reproductivas del hongo pudieron haber sufrido cambios irreversibles que le impidieron al mismo sobrevivir y adaptarse a las condiciones en el medio no envenenado.

También se ha encontrado actividad fungicida de quitosana y diferentes derivados sobre algunos hongos fitopatógenos. Tal es el caso de una quitosana con 63 % de desacetilación y su hidrolizado, que mostraron actividad fungicida a las concentraciones de 1000 mg/L, y 500 y 1000 mg/L, respectivamente, frente a *P. grisea* (16). Por otra parte, distintos derivados

hidroxipropilados de quitosana lograron actividad biocida contra *C. diplodiella* y *F. oxysporum* en un rango de concentración entre 1100 y 10 000 mg/L (13). No obstante, existen otros hongos que han respondido ante la quitosana sin mostrar afectación de la ultraestructura de sus células hifales, por lo que no se afecta su normal desarrollo (5).

Se han propuesto diferentes mecanismos, por los que la quitosana puede actuar sobre los microorganismos e inhibir su crecimiento y desarrollo. Se plantea que la afectación puede ser sobre la permeabilidad de la membrana citoplasmática, mediante la interacción de sus grupos NH_3^+ con componentes fosfolípidicos cargados negativamente en las membranas bacterianas, con lo que se altera el intercambio con el medio, además de la formación de quelatos con los metales de transición y la inhibición de algunas enzimas (1, 10). El biopolímero puede actuar a nivel molecular, sobre los ácidos nucleicos y alterar sus funciones, mediante cambios transcripcionales específicos (19), o inducir alteraciones estructurales de las células fungosas como la presencia de vesículas en el micelio, células sin contenido citoplasmático, otras desorganizaciones celulares que abarcan la excesiva ramificación y ensanchamiento de la pared celular, la pérdida de la misma y hasta la desintegración del citoplasma (2).

De los resultados obtenidos puede concluirse que las quitosanas K1 y SIGMA ejercen un efecto inhibitor del crecimiento micelial de *B. oryzae*, que fue total a la mayor concentración (1000 mg/L) en la quitosana SIGMA y con efecto fungicida, lo que convierte a ambos compuestos en polisacáridos promisorios para el control de este patógeno.

REFERENCIAS

- Balicka-Ramisz, Aleksandra; Wojtasz, Anna; Pilarczyk, Bogumila; Ramisz, A. y Laurans, L. (2005): Antibacterial and antifungal activity of chitosan. *ISAH CAB Abstracts*, Warsaw, Poland. 2: 406-408.
- Barka, E.A.; Eullaffroy, P.; Clément, C. y Vernet, G. (2004): Chitosan improves development, and protects *Vitis vinifera* L. against *Botrytis cinerea*. *Plant Cell Reports*. 22(8): 608-614.
- CAB Internacional (2004): Crop Protection Compendium (CD). Londres, Edition. Wallingford, UK.
- Cordero, V. y Rivero, L.E. (2001): Principales enfermedades fungosas que inciden en el cultivo del arroz en Cuba. Instituto de Investigaciones del Arroz. MINAGRI. p: 29-32.
- Cruz, A.; Rivero, Deyanira.; Martínez, B.; Ramírez, M.A. y Rodríguez, Aida. T. (2004): Efecto de la quitosana sobre el crecimiento y desarrollo *in vitro* de *Sarocladium oryzae* Sawada. *Rev. Protección Veg.* 19(2): 133-136.
- Falcón, A.; Díaz, D. y Ramírez, M.A. (2004): Hidrólisis enzimática de quitosana. Actividad biológica del polímero y sus hidrolizados. *Cultivos Tropicales*. 25(2): 81-86.
- Gómez-Rivas, Leticia; Escudero-Abarca, Blanca I.; Aguilar-Uscanga, Guadalupe; Hayward-Jones, Patricia M.; Mendoza, Patricia y Ramírez, M. (2004): Selective antimicrobial action of chitosan against spoilage yeasts in mixed culture fermentations. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 31(1): 16-22.
- Hernández, I. (2004): La quitosana: un producto bioactivo de diversas aplicaciones. *Cultivos Tropicales*. 25(3): 97-110.
- IIA. (2006): Instructivo Técnico del Cultivo de Arroz. Instituto de Investigaciones del Arroz, Centro Nacional de Sanidad Vegetal, Ministerio de la Agricultura, 80 p.
- Liu, H.; Du, Y.; Wang, X. y Sun, L. (2004): Chitosan kills bacteria through cell membrane damage. *Int. J. Food Microbiol.* 95: 147-155.
- Neninger, L.H.; Hidalgo, E.; Barrios, L.M. y Puedo, M. (2003): Hongos presentes en semillas de arroz (*Oryza sativa* L.) en Cuba. *Fitosanidad*. 7(3): 7-11.
- Parra, Yanet y Ramírez, M.A. (2002): Efecto de diferentes derivados de la quitina sobre el crecimiento *in vitro* del hongo *Rhizoctonia solani* Kuhn. *Cultivos Tropicales*. 23(2): 73-75.
- Peng, Y.; Han, B.; Wanshun, L. y Xiaojuan, X. (2005): Preparation and antimicrobial activity of hydroxypropyl chitosan. *Carbohydrate Research*. 340(11): 1846-1851.
- Pombo, R. (1996): Relación estructura-actividad de la quitosana y sus hidrolizados solubles sobre algunos hongos fitopatógenos. *Tesis presentada en opción al grado académico de Master en Química Agrícola. UNAH.*
- Ramírez, M.A.; Cabrera, G.; Gutierrez, A. y Rodríguez, Aida T. (2000): Metodología para la obtención de quitosana a bajas temperaturas a partir de quitina de langosta. *Cultivos Tropicales*. 21(1): 81-84.
- Rodríguez, Aida T.; Ramírez, M.A.; Nápoles, María C.; Márquez, Ramona y Cárdenas, Regla M. (2003): Antifungal activity of chitosan and one of its hydrolysates on *Pyricularia grisea* Sacc. fungus. *Cultivos Tropicales*. 24(2): 85-88.
- Stepnova, E.A.; Tikhonov, V.E.; Babak, V.G.; Krayukhina, M.A.; Babiebskii, K.K. y Yamskov, I.A. (2005): Biologically Active Amphiphilic derivatives of chitosan. *Fibre Chemistry*. 37(6): 483-484.
- Torr, K.M.; Chittenden, Colleen; Franich, R.A. y Kreber, B. (2005): Advances in understanding bioactivity of chitosan and chitosan oligomers against selected wood-inhabiting fungi. *International Journal of Biology, Chemistry, Physics, and Technology of Wood*. 59(5): 559-567.
- Zakrzewska, Anna; Boorsma, A.; Brul, S.; Hellingwerf, K.J. y Klis, F.M. (2005): Transcriptional Response of *Saccharomyces cerevisiae* to the Plasma Membrane-Perturbing Compound Chitosan. *Eukaryotic Cell*. 4(4): 703-715.

(Recibido 27-3-2007; Aceptado 24-7-2007)