



H2020 Project 727624
Microbial Uptakes for Sustainable Management of Major Banana Pests and Diseases (MUSA2020): Chitosan Workshop

INFORME

elaborado por la Dra. Ana Piedra Buena Díaz (External advisor, ICIA, España)

Lugar y fecha de celebración: Universidad de Alicante, España (2-4 julio 2019)

Coordinadores del taller: Luis Vicente López-Llorca and Federico López-Moya (Universidad de Alicante, España)

Organizadores del taller (Universidad de Alicante, España): Ana Aragón, Omar Hernández, Raquel López, Ana Lozano, Jorge Martínez, Cristina Mingot, Ugo Picciotti, Marta Suarez, Lizeth Tabima, Rocío Tirado

Asistentes: Raffaella Balestrini (CNR, Italia), Aurelio Ciancio (CNR, Italia), María Durban (CULTESA, España), Carmen Gómez-Lama (CSIC, España), Daniel González (Universidad de Murcia, España), José Ángel López (Universidad de Murcia, España), Rosa H. Manzanilla-López (CEPROBI, México), Jesús Mercado (CSIC, España), Ana Piedra-Buena (ICIA, España), Luis Ernesto Pocasangre (Universidad Earth, Costa Rica), Jassmine Zorrilla (KU Leuven, Bélgica).

Lista de abreviaturas:

- CEPROBI - Centro de Desarrollo de Productos Bióticos
- CNR - Centro Nazionale di Ricerca
- COPLACA – Cooperativa Platanera de Canarias
- CULTESA - Cultivos y Tecnología Agraria de Tenerife
- CSIC - Consejo Superior de Investigaciones Científicas
- AECBs - Agentes Entomopatógenos de Control Biológico
- FOC TR4 - *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* Raza Tropical 4
- GC-MS - Gas Chromatography-Mass Spectrometry (Cromatografía de gases-Espectometría de masas)
- ICIA - Instituto Canario De Investigaciones Agrarias
- Pc - *Pochonia chlamydosporia*
- GFP - Green Fluorescence Protein (Proteína verde fluorescente)
- RKN - Root-Knot Nematodes (nematodos formadores de agallas)
- KU Leuven- Katholieke Universiteit Leuven
- PYME – Pequeña y mediana empresa

Introducción al tema del taller (en base a LÓPEZ-MOYA y LÓPEZ-LLORCA, 2016*)

Origen del quitosano: El quitosano es un polímero natural lineal de glucosaminas que se obtiene por desacetilación parcial de la quitina. La quitina es el segundo polímero más abundante en la naturaleza, después de la celulosa. Se encuentra formando parte de la cutícula de crustáceos e insectos, en la pared celular de los hongos verdaderos, y en algunas algas. La desacetilación que da lugar al quitosano a partir de la quitina puede producirse por procesos enzimáticos o químicos. La obtención de quitosano por métodos químicos consiste en el tratamiento de la quitina (generalmente proveniente de la cutícula de camarones u otros crustáceos marinos) con ácidos fuertes (ácido clorhídrico, HCl), seguido de un tratamiento con una base fuerte (hidróxido de sodio, NaOH). Si la obtención se realiza por método enzimáticos se utilizan deacetilasas de los oligosacáridos de la quitina.

Propiedades del quitosano: El quitosano se comporta de manera diferente en función de su peso molecular, que depende de las subunidades de N-acetil glucosamina de la molécula, y de su grado de desacetilación, que no suele superar el 90%. Las moléculas de quitosano de peso molecular medio y alto (70-100 kDa) son solubles en soluciones ácidas débiles, mientras que los oligosacáridos del quitosano (500 Da) son solubles en agua.

Cuando el quitosano está en solución, sus grupos amino generan cargas positivas lo cual, junto con su facilidad para sufrir cambios estructurales, le confieren numerosas propiedades biológicas.

Usos del quitosano: El quitosano se usa en la industria farmacéutica como soporte de medicamentos, y más recientemente en otras industrias para generar nanofibras o nanopartículas. En medicina, se ha demostrado su poder antifúngico para enfermedades causadas por hongos patógenos del ser humano. En agricultura, se ha demostrado su efecto estimulante de las defensas de las plantas, así como de la germinación y el crecimiento de plántulas en ornamentales. Pero sobre todo es interesante su efecto antimicrobiano, ya que afecta la germinación y el crecimiento de varios hongos patógenos de plantas, por lo cual se ha utilizado como agente protector de cultivos frente a hongos fitopatógenos,

En contrapartida, los hongos nematófagos y entomopatógenos (agentes de control biológico) son resistentes al quitosano, y son capaces de degradarlo. Esta resistencia se relaciona con la composición de ácidos grasos de las membranas, que en el caso de los hongos sensibles al quitosano son muy fluidas, con grandes cantidades de ácidos grasos poliinsaturados, mientras que en el caso de los hongos resistentes son mayormente ácidos grasos saturados, que dan lugar a membranas más rígidas. Esta propiedad permite la utilización de los hongos nematófagos y entomopatógenos como agentes de control biológico, formulados en combinación con el quitosano.

*LÓPEZ-MOYA, F.; LÓPEZ-LLORCA, L.V. 2016. Omics for investigating chitosan as antifungal and gene modulator. *Journal of Fungi* 2 (1): 11. Doi: 10.3390/jof2010011

Actividades desarrolladas en el taller

- **Reuniones:** el primer día se realizó una reunión preliminar para discutir propuestas de implementación del quitosano dentro del Proyecto MUSA, y perspectivas a futuro.
- **Trabajo de laboratorio:** el Segundo día del taller se dedicó enteramente a actividades prácticas en laboratorio, relacionadas con la manipulación del quitosano. Con el apoyo de los organizadores, coordinados por Federico López-Moya, y con la información y el equipamiento proporcionados, los asistentes trabajaron en grupos de tres personas, para desarrollar diferentes protocolos (Fig. 1). Algunos trabajos se completaron al día siguiente, pues requerían de un tiempo de evolución (observación de desarrollo de hongos y actividad de quitosano sobre huevos de nematodos, por ejemplo). Los trabajos realizados fueron:
 - Preparación de soluciones de quitosano
 - Preparación de medios con quitosano
 - Formulación de AECBs usando quitosano
 - Evaluación de la cinética de crecimiento de FOC TR4 y otras cepas de FOC, y de AECBs en combinación con quitosano
 - Efecto del quitosano en la germinación de FOC y AECBs
 - Evaluación del quitosano en la infección de huevos de nematodos por Pc
 - Evaluación de la colonización de Pc-GFP sobre huevos de RKN, al microscopio confocal.



Fig. 1. Federico López-Moya explica el trabajo de laboratorio con quitosano a los asistentes al taller

- **Charla/discusión:** Federico López-Moya (Universidad de Alicante) dio una charla acerca de “El quitosano como modulador génico en plantas y hongos” al inicio del tercer día. En esta presentación expuso aspectos generales del quitosano, sus propiedades y efectos tanto al utilizarlo solo como combinado con AECBs. Relató la experiencia y conocimientos adquiridos en este sentido por el grupo de trabajo de la

Universidad de Alicante, en colaboración con otros grupos de investigación. Por otra parte, señaló los aspectos críticos a superar para seguir avanzando en estas investigaciones, y adelantó los próximos trabajos a desarrollar.

Los asistentes comentaron los resultados presentados, proponiendo nuevos enfoques y señalando posibles relaciones o factores a tener en cuenta al trabajar con este material.

- **Visita a las instalaciones de investigación de la Universidad:** La actividad final consistió en una visita a algunos de los institutos de investigación y servicios de apoyo a la investigación, en el nuevo campus de la Universidad de Alicante (Fig. 2).



Fig. 2. Visita de los asistentes al Área de Instrumentación Científica de la Universidad de Alicante



Fig. 3. La Dra Cristina Almansa explicando al grupo las ventajas del microscopio de fuerza atómica

En el Área de Instrumentación Científica de la Universidad de Alicante (Fig. 3), el personal de apoyo a la investigación (Dra Cristina Almansa, Dra Pilar Blasco) mostró al grupo algunos de los principales servicios disponibles para los investigadores: microscopía confocal, microscopía de barrido, microscopía de transmisión de electrones, microscopía de fuerza atómica, unidades de cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS), y cámaras de crecimiento de plantas.

Posteriormente, se visitaron las cámaras de crecimiento e invernaderos de la Unidad de Experimentación Vegetal donde se mantienen las plantas de platanera para los ensayos del proyecto MUSA con picudo de la platanera, quitosano y AECBs (Figs 4 y 5).



Fig. 4. Unidad de Experimentación Vegetal

Fig. 5. La técnico Sara Alcañiz explica en panel de control de los sistemas de riego, fertilización y climatización de los invernaderos



La visita finalizó en el Edificio de Institutos a donde varios de los institutos de investigación de la Universidad se han trasladado recientemente. En el Instituto Multidisciplinario de Estudios Ambientales, Leticia Asensio enseñó a los asistentes los laboratorios del instituto y el auditorio del edificio.

---o0o---

*Santa Cruz de Tenerife, 08 de julio de 2019
Ana Piedra Buena Díaz.*