



Quitosano y sus derivados, polímeros naturales con potencial para controlar a *Pyricularia oryzae* (Cav.)

Chitosan and its derivatives, natural polymers with potential for control of *Pyricularia oryzae* (Cav.)

 Aida Tania Rodríguez-Pedroso^{1*},  Silvia Bautista-Baños²,  Miguel Ángel Ramírez-Arrebató¹,
 Maribel Plascencia-Jatomea³,  Lázara Hernández-Ferrer¹

¹Unidad Científico Tecnológica de Base "Los Palacios". Km 1½ carretera La Francia, Los Palacios, Pinar del Río, Cuba. CP 22900
²Centro de Desarrollo de Productos Bióticos, Instituto Politécnico Nacional, Carr. Yautepec-Jojutla km. 6, San Isidro, CEPROBI 8, Yautepec, Morelos. c.p. 62731, México
³Universidad de Sonora, Blvd. Luis Encinas y Rosales s/n, Col. Centro, PO Box 1658, Hermosillo, Sonora c.p. 83000, México

RESUMEN: El quitosano y sus derivados son compuestos naturales que tienen potencial en la agricultura, para el control de una de las enfermedades del arroz; la piriculariosis (*Pyricularia oryzae*), de gran importancia a nivel mundial. En general, esta enfermedad se controla con fungicidas sintéticos pertenecientes al grupo de los benzimidazoles; sin embargo, su uso ha generado resultados adversos al medio ambiente, aunado a la poca sensibilidad del hongo hacia ellos. En este artículo, se proporciona una revisión de investigaciones publicadas acerca del quitosano, sus características fisicoquímicas, generalidades del hongo *P. oryzae*, la acción fungicida del quitosano y sus derivados en investigaciones llevadas a cabo *in vitro* e *in situ* sobre este hongo, y en general, los posibles mecanismos de acción de este compuesto.

Palabras clave: antimicrobianos, biocompuestos, mecanismos de acción, Magnaporthe, *Oryza sativa* L.

ABSTRACT: Chitosan and its derivatives are natural compounds that have potential in agriculture for the control of one of the rice diseases, pyriculariosis (*Pyricularia oryzae*), of great importance worldwide. In general, this disease is controlled with synthetic fungicides belonging to the benzimidazole group; however, their use has generated adverse results to the environment, together with the low sensitivity of the fungus to them. This article provides a review of published research on chitosan, its physicochemical characteristics, general information on the fungus *P. oryzae*, the fungicidal action of chitosan and its derivatives in *in vitro* and *in situ* research on this fungus, and in general, the possible mechanisms of action of this compound.

Key words: antimicrobials, biocompounds, mechanisms of action, Magnaporthe, *Oryza sativa* L.

INTRODUCCIÓN

El polisacárido quitosano es una clase de macromolécula natural que tiene una tendencia extremadamente bioactiva y es derivado del exoesqueleto de crustáceos como langostas, cangrejos y camarones (1). El quitosano, polímero parcialmente desacetilado de la quitina, tiene la capacidad de ser biodegradable, biocompatible y no tóxico, por lo que se considera un compuesto muy atractivo. En la agricultura es empleado para estimular la germinación, modificar suelos, como agente fungicida y como elicitador de respuestas defensivas en plantas, entre otras. También, en el área de la tecnología de alimentos, se utiliza en la

elaboración de películas biodegradables y películas de empaque antimicrobianos (2,3).

Entre los patógenos que este compuesto ha demostrado tener actividad antifúngica se encuentra *Pyricularia oryzae* (Cav.). Este hongo produce la enfermedad piriculariosis, que es de gran importancia en el cultivo del arroz, la cual produce grandes daños y se encuentra ampliamente distribuida por todo el mundo (4). El quitosano y sus derivados han demostrado que actúan, directamente, sobre el hongo, inhibiendo su crecimiento micelial y, también, estimulando los mecanismos de defensa en el cultivo del arroz, protegiendo a la planta del ataque de este patógeno (5-8).

*Autor para correspondencia: atania@inca.edu.cu

Recibido: 16/12/2020
Aceptado: 21/05/2021

Este artículo se encuentra bajo los términos de la licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial (CC BY-NC 4.0).
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>



Quitosano. Características químicas y físicas

El quitosano es un polisacárido que se obtiene a partir de la quitina, segundo polisacárido más abundante en la naturaleza; es un copolímero lineal formado por residuos de unidades de D glucosamina, en mayor medida, y N-acetil D-glucosamina, en menor medida; distribuidos aleatoriamente y unidos por enlaces β 1,4. Según la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC), es 2 amino 2 desoxi-D-glucopiranososa (D-glucosamina GlcN) y 2 acetamida- 2 desoxi- D glucopiranososa N-acetil glucosamina (1). Tanto el contenido, como la secuencia de estas unidades, determinarán las propiedades físico-químicas y biológicas de este polímero. El quitosano tiene un alto contenido de nitrógeno (N) y posee una distribución regular de los grupos aminos libres, que pueden ser protonados por ciertos ácidos, cargándose positivamente y esto le da un carácter policatiónico. Este hecho permite explicar algunas de sus propiedades, como son, la habilidad de enlazarse con sustancias cargadas negativamente tales como lípidos, proteínas, colorantes entre otras; así como floculante, adherente y adsorbente, adicionales a las reacciones típicas de las aminas (9). Este biopolímero posee actividad antimicrobiana contra una amplia variedad de microorganismos, incluyendo hongos, algas y algunas bacterias. Su funcionalidad y actividad depende de sus características, como: masa molecular, grado de acetilación, célula huésped, presencia de nutrientes naturales, composición química o nutricional de los sustratos y condiciones ambientales.

Pyricularia oryzae, agente causal del añublo o quemazón del arroz

Pyricularia y *Magnaporthe* son, actualmente, nombres genéricos ampliamente utilizados, para el hongo que produce la quemazón del arroz. El Grupo de Trabajo *Pyricularia/ Magnaporthe* ha considerado la posibilidad de conservar el nombre *Magnaporthe* sobre *Pyricularia*. Sin embargo, dicha conservación requeriría un cambio en la especie tipo del género *Magnaporthe* y causaría numerosos cambios de nombre para aquellas especies actualmente ubicadas en *Pyricularia*.

El nombre genérico tipificado asexualmente, *Pyricularia*, es el nombre correcto para el hongo que produce la quemazón del arroz, que se corresponde bien con la patogenicidad y las características ecológicas y evolutivas. Por lo tanto, el nombre *Pyricularia oryzae* debe usarse para el hongo que produce esta enfermedad. Sin embargo, el sinónimo *Magnaporthe oryzae* puede seguir siendo mencionado en publicaciones como *Pyricularia oryzae* (syn. *Magnaporthe oryzae*). Esta práctica ayudará a cerrar una brecha potencial en la literatura y el conocimiento de esta importante especie (10). En cuanto a *grisea* y *oryzae*, son especies muy distintas. *Grisea* es para cepas de *Digitaria*, y *oryzae* para cepas de arroz, trigo y otras gramíneas; aunque en la literatura se consideran sinónimos y se utilizan los cuatros nombres: *Pyricularia oryzae*,

Magnaporthe oryzae, *Pyricularia grisea* y *Magnaporthe grisea*.

Pyricularia oryzae, conocida como piriculariosis, añublo, quemazón, fallada, mancha, bruzone del arroz o tizón foliar, es una de las enfermedades más serias del cultivo de arroz (*Oryza sativa* L.), la cual ha causado significantes pérdidas en los rendimientos, a nivel mundial (11). Se trata de un patógeno de plantas muy eficaz, ya que pueden reproducirse sexualmente (teleomorfo: *Magnaporthe grisea* Barr (lt. Hebert) sin. *Magnaporthe oryzae*) y asexualmente (anamorfo: *Pyricularia oryzae*). La distribución del añublo es mundial, ya que se encuentra en todos los agroecosistemas de los trópicos y de las zonas templadas en que se cultiva el arroz comercial. La piriculariosis genera grandes pérdidas en la producción del grano, tanto en el sistema de secano como en el de riego. Esta enfermedad se ha reportado en, al menos, 85 países de todo el mundo. Se descubrió en Italia, en 1560, y más tarde, fue encontrada en China (1637), Japón (1760), Estados Unidos (1960) y la India (1913) (12). La piriculariosis ha causado significantes pérdidas, por ejemplo: en la India el 90 % (13), en China el 70 % (14), en Tailandia fue afectada en 1987 solamente un área de 1900 ha y ya en 1988 se incrementó a 490 000 ha, en España y en la zona del mediterráneo también ha causado daños (15). México, por su parte, ha reportado un abatimiento de la producción hasta del 30 % en siembras de temporal. Cuba, ha sido otro de los países que ha sido afectado por este patógeno, y cuando las condiciones son favorables se ha incrementado las pérdidas hasta un 70 %.

Clasificación taxonómica, morfología y sintomatología de *Pyricularia oryzae*

El agente causal de la piriculariosis se clasifica taxonómicamente en la clase: Deuteromicetes, orden: Moniliales, familia: Dematiaceae, género: *Pyricularia*, especie: *Pyricularia oryzae*. *Pyricularia oryzae* posee conidióforos simples, tabicados y de color pardusco (Figura 1A). Los conidióforos nacen solitarios o en grupos de tres y en sus extremos llevan los conidios. Estos hialinos, fusiformes y están divididos en forma equidistante por dos septos. Sus medidas aproximadas son 22 a 24 μ m x 10 a 12 μ m. Más de un conidio puede formarse sobre el conidióforo, el número de conidios oscila entre 1 y 20.

Es una enfermedad compleja, debido a la variabilidad patogénica y a la rapidez con la que este hongo vence la resistencia de la planta de arroz. El micelio del hongo produce una sustancia tóxica conocida como piricularina, que inhibe el crecimiento de los tejidos y los desorganiza. Ataca las partes aéreas de la planta como las hojas, tallos, nudos y espigas (16) (Figuras 1B, C). El hongo produce unas manchas o lesiones en las hojas de forma alargada o elíptica a romboide, de color marrón uniforme, que más tarde cambiarán a un color grisáceo en la parte central, hecho que indica la esporulación del hongo; aunque su tamaño y color varían de acuerdo con las condiciones ambientales y con la susceptibilidad de las variedades (17).

Su temperatura óptima de crecimiento está entre 22-29 °C y una elevada humedad relativa, entorno al 90 %, las que coinciden plenamente con las condiciones climáticas de países tropicales. La presencia de elevadas concentraciones de nitrógeno en el agua favorece, también, el desarrollo del hongo y produce gran cantidad de esporas. Las esporas llegan desde los restos de cosecha de la temporada anterior o de malas hierbas, donde ha estado alojado el hongo durante el invierno (18).

Estrategias generales para el control de *Pyricularia oryzae*

El control de la enfermedad se basa, principalmente, en la aplicación de fungicidas químicos sistémicos; entre los que se cuentan, los del grupo de los benzimidazoles, como el procloraz, tebuconazol y propiconazol, entre otros. Sin embargo, su uso ha presentado varias desventajas, ya que ocasionan contaminación del manto freático y de los cuerpos de agua colindantes, generando efectos nocivos sobre diversos organismos. Además, es importante señalar, que estos fungicidas químicos están siendo vulnerados por el hongo, a causa del surgimiento de poblaciones con pérdida de sensibilidad a su modo de acción (19). Debido a esta situación, se viene presentando un número creciente de ciclos de fungicidas, por año, para proteger los cultivos contra esta enfermedad, lo cual implica un incremento en los costos de producción y en efectos negativos de los fungicidas convencionales sobre el ambiente, cuestionándose su uso comercial, siendo prioritaria la búsqueda de alternativas que permitan complementar al manejo integrado de las enfermedades.

Actividad *in vitro* e *in vivo* del quitosano y sus derivados sobre *Pyricularia oryzae*

La propiedad antimicrobiana del quitosano y sus derivados ha recibido considerable atención, en años recientes, debido al inminente problema asociado con los agentes químicos sintéticos. Estos compuestos han demostrado ser fungicidas y fungistáticos para el control de *Botrytis cinerea*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*, *Drechsteria sorokiana*, *Fusarium acuminatum*, *Fusarium graminearum*, *Miconectriella nivalis*, *Rhizoctonia solani*, *Alternaria alternata*, *Colletotrichum gloesporioides*, *Penicillium* spp., *Fusarium oxysporum* y *Bipolaris oryzae*, entre otros hongos (20-24).

Al respecto, la actividad antifúngica del quitosano y sus derivados ha sido observada en diferentes estados de desarrollo de los hongos, como la afectación al crecimiento y el desarrollo del agente patógeno, esporulación, viabilidad y germinación de las esporas y la producción de factores de virulencias fúngicos (21,25,26). Algunos autores han demostrado el efecto fungicida de estos compuestos a diferentes concentraciones y aislamientos de *P. grisea* (5,7,27). También, los oligómeros de quitosano han demostrado tener mejor efecto inhibitorio sobre este patógeno, logrando la concentración mínima inhibitoria a una concentración mayor de 2000 mg L⁻¹. (28).

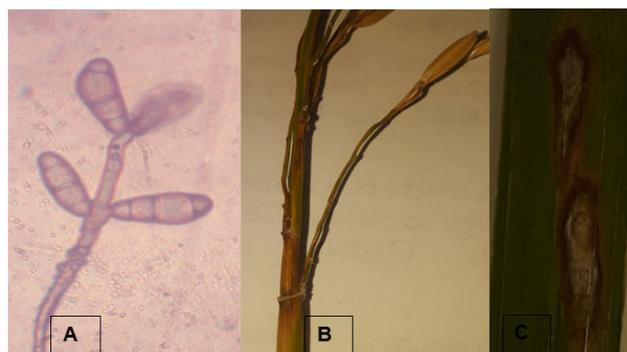


Figura 1. A) Conidios de *Pyricularia oryzae*, B) y C), tallo y hoja de arroz infectados por este hongo

Estudios, llevados a cabo en el laboratorio de Oligosacarinas del Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA), con *P. grisea* indican que el quitosano y sus oligómeros en el medio de cultivo, a la concentración de 1,000 mg L⁻¹ y pH 5.6, inhibieron totalmente el crecimiento micelial de este hongo (5). Sin embargo, es importante considerar el pH de la disolución resultante, que afecta la carga positiva de los grupos aminos; pues en otro ensayo, a pH 6, solo hubo una ligera afectación del crecimiento del hongo, aunque se mantuvo una inhibición total de la esporulación (7)

Algunos grupos de investigación han comenzado a modificar la molécula del quitosano con adición de grupos hidrofóbicos para aumentar su actividad biológica contra este patógeno. Por ejemplo, N-sulfonada N-sulfobenzoil quitosano (29), N,N,N-trimetil quitosano (30), N,O-acil quitosano (31), O-acil quitosano (32,33), hidroxietil aril quitosano (34), dimetilpiperazina quitosano (35), carboximetil quitosano (36), acil urea tiourea quitosano (37), N-succinil quitosano (38) y N-heterocíclico quitosano (39). Investigadores (40) han notado que la N-alkilación o N-arilación del quitosano con aldehídos aromáticos o alifáticos aumentaron, efectivamente, su actividad antifúngica sobre *P. grisea*.

Con los mismos métodos y técnicas de obtención, pero utilizando diferentes tipos de aldehídos, científicos (29) observaron actividad antifúngica de 24 nuevos derivados de quitosano (derivados N-benzil quitosanos), los cuales tuvieron mayor efecto inhibitorio que los quitosanos nativos sobre el crecimiento y formación de esporas de *P. grisea*; siendo N-(m-nitrobencil) quitosano quien logró el mayor efecto, a la concentración de 5 g L⁻¹. También, estos autores observaron que el derivado más activo fue N-(2,2 difeniletíl) quitosano, con una concentración mínima inhibitoria de 0,3 g L⁻¹, contra este patógeno. Por otra parte, grandes avances del quitosano y sus oligómeros sobre el control directo de enfermedades del arroz ha sido observada. Tanto la quitina como el quitosano han demostrado que inducen la acumulación producción de fitoalexinas, en este caso, de momilactonas A (41) y momilactonas B ante una infección con *P. grisea* en hojas de arroz a la concentración de 10 µg mL⁻¹.

Un grupo de investigadores (42) publicó el efecto del quitosano en la estimulación de respuestas de defensa en hojas de arroz. Después del tratamiento con quitosano al 0.1 % se observó, claramente, necrosis en la parte superior de la hoja de arroz. Sin embargo, al tratar plántulas de arroz con 5 mg L⁻¹ e inocularlas con *Magnaporthe grisea* 97-23-2D1 se demostró un mejor efecto y control de la enfermedad, en más de un 50 % (43). Sin embargo, en el año 2007 se evaluó, en condiciones semicontroladas, donde trataron semillas de arroz a diferentes concentraciones con dos quitosanos de diferente peso molecular (6). A los 18 días de germinada la semilla, las plantas obtenidas fueron inoculadas con esporas de *P. grisea*, se evaluó la actividad de enzimas relacionadas con la defensa, como PAL, glucanasa, quitinasa y quitosanasa, observándose un incremento en la actividad de las plantas tratadas con los elicitores, con respecto al control. Además, no se observaron síntomas de la enfermedad en la concentración más elevada utilizada, de ambos compuestos.

Actualmente, se investiga la aplicación de nanopartículas a base de quitosano con actividad antifúngica y para el control de enfermedades como la piriculariosis (8,44,45). Por su parte, estudiosos del tema (44) encontraron que nanopartículas de quitosano y plata (Ag) tuvieron una elevada actividad antifúngica sobre *Pyricularia oryzae*, a una concentración de Ag (2 ppm) y de quitosano (4000 ppm). Sin embargo, otros científicos (8) aplicaron 500 µl de una solución de nanopartículas de quitosano al 0,1 % sobre hojas de arroz, y 24 h más tarde, una suspensión de esporas (1x10⁵ esporas mL⁻¹) de *P. grisea*, y a los 10 días, no observaron síntomas de la enfermedad.

Mecanismos de acción del quitosano

Los mecanismos de acción del quitosano no han sido del todo establecidos, aunque existen algunas hipótesis al respecto. En general, las diversas propuestas para explicar la actividad antimicrobiana del quitosano consideran, como característica fundamental, la naturaleza policatiónica de la molécula, la cual está dada por los grupos NH₃⁺ de la glucosamina, que le confiere importantes propiedades biológicas y fisiológicas (46,47). En condiciones de pH, el quitosano se comporta como polielectrolito lineal, con un pH alrededor de 6.5, por lo tanto, a pH bajos los residuos de glucosamina están cargados positivamente debido a la protonación de sus residuos aminos, conteniendo una alta densidad de cargas positivas, lo que le permite unirse fuertemente a superficies cargadas negativamente (48). Se plantea que cuando la carga positiva sobre el C-2 del monómero de glucosamina se encuentra por debajo de pH 6, el quitosano es más soluble y tiene una mejor actividad antimicrobiana que la quitina (29,49).

Otro mecanismo propuesto es la interacción entre la carga positiva de la molécula de quitosano y la carga negativa de las células de la membrana microbiana, o que conduce a la salida de proteínas y otros constituyentes

intracelulares (29). El más abundante de los esfingolípidos es el manosildiinositolfosfato-ceramida (M(IP₂) C), el cual presenta dos cargas negativas. Sitios donde el quitosano podría unirse utilizando sus grupos amino de los residuos de glucosamina, los cuales son capaces de interactuar con los componentes negativos del (M(IP₂) C) de la membrana plasmática. En otros estudios se ha observado, que el quitosano forma canales de transporte de moléculas en bicapas lipídicas artificiales, lo que provee evidencia de que este compuesto puede desorganizar a la membrana celular (48). Por su parte, un grupo de trabajo (50,51) analizó el modo de acción del quitosano sobre las células fúngicas y observaron dos aspectos: que el quitosano permeabiliza la membrana plasmática del hongo y penetra a las células del hongo, proceso que es dependiente de ATP y, también, demostró que diferentes tipos de células (conidio, tubo germinativo e hifa) exhiben diferente sensibilidad al quitosano. En el año 2010, el mismo grupo de investigadores demostró, a través de técnicas biológicas, bioquímicas, genéticas y biofísicas que la actividad antifúngica del quitosano depende de la fluidez de la membrana plasmática del hongo, la cual está determinada por la composición de sus ácidos grasos polinsaturados y esto sugiere una nueva estrategia para la terapia antifúngica, que involucra tratamientos que incrementen la fluidez de la membrana plasmática para hacer el hongo más sensible a fungicidas, como el quitosano.

El quitosano, también, actúa como agente quelante que une, selectivamente, a trazas de metales y por consiguiente inhibe la producción de toxinas y el crecimiento micelial (52). Además, activa algunos procesos de defensa en los tejidos hospederos (53), actúa inhibiendo varias enzimas; la unión de la quitosana con el ADN y la inhibición de la síntesis de ARN_m y síntesis de proteínas (54).

En el caso de las nanopartículas de plata (Ag), se basa en la posibilidad de que estas se adhieran y penetren en la membrana celular causando desbalance osmótico en las esporas, siendo muy efectivas contra *Magnaporthe grisea* (55).

CONCLUSIONES

- En la literatura reportada, se demuestra que el quitosano y sus derivados son capaces de actuar sobre *P. oryzae*, ya sea de forma directa: inhibiendo el crecimiento micelial y la producción de esporas del mismo, o por inducción de los mecanismos de defensa en la planta de arroz, por lo que estos compuestos pudieran ser utilizados en la agricultura, haciéndola más sostenible.
- Es conveniente profundizar en otras líneas de investigación, como la evaluación de dichos compuestos en estudios de campo, la factibilidad de desarrollar productos comerciales a base de este compuesto, enfocándose, no sólo en el control, sino en los posibles mecanismos de acción por el cual estos compuestos actúan sobre el hongo y en la planta.

BIBLIOGRAFÍA

- Prashanth KV, Tharanathan RN. Chitin/chitosan: modifications and their unlimited application potential-an overview. *Trends in Food Science & Technology*. 2007;18(3):117-31. doi:10.1016/j.tifs.2006.10.022
- Ramos-García M de L, Bautista-Baños S, Barrera-Necha LL, Bosquez-Molina E, Alia-Tejacal I, Estrada-Carrillo M. Compuestos antimicrobianos adicionados en recubrimientos comestibles para uso en productos hortofrutícolas. *Revista mexicana de fitopatología*. 2010;28(1):44-57.
- Kumar S, Mukherjee A, Dutta J. Chitosan based nanocomposite films and coatings: Emerging antimicrobial food packaging alternatives. *Trends in Food Science & Technology*. 2020;97:196-209.
- Xing K, Zhu X, Peng X. Chitosan antimicrobial and eliciting properties for pest control in agriculture: a review. *Agronomy for Sustainable Development*. 2015;35(2):569-88.
- Rodríguez AT, Ramírez MA, Nápoles MC, Márquez R, Cárdenas RM. Antifungal activity of chitosan and one of its hydrolysates on *Pyricularia grisea*, Sacc. Fungus. *Cultivos Tropicales*. 2003;24(2):85-8.
- Rodríguez AT, Ramírez MA, Cárdenas RM, Hernández AN, Velázquez MG, Bautista S. Induction of defense response of *Oryza sativa* L. against *Pyricularia grisea* (Cooke) Sacc. by treating seeds with chitosan and hydrolyzed chitosan. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 2007;89(3):206-15.
- Cárdenas RM, Ramírez MA, Rodríguez AT, González LM. 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. *Cultivos Tropicales*. 2004;25(4):89-93.
- Manikandan A, Sathiyabama M. Preparation of chitosan nanoparticles and its effect on detached rice leaves infected with *Pyricularia grisea*. *International journal of biological macromolecules*. 2016;84:58-61.
- Muzzarelli RAA. Enzymatic synthesis of chitin and chitosan. Occurrence of chitin. *Chitin*. 1977;5:1-17.
- Zhang N, Luo J, Rossman AY, Aoki T, Chuma I, Crous PW, et al. Generic names in Magnaporthales. *IMA fungus*. 2016;7(1):155-9.
- Lugo L, Jayaro Y, González Á, Borges O. Identification of sources of partial resistance to *Pyricularia grisea* in rice cultivars and experimental lines. *Fitopatología Venezolana*. 2008;21(2):51-8.
- Rossman AY, Howard RJ, Valent B. *Pyricularia grisea* the correct name for the rice blast disease fungus. *Mycologia*. 1990;82(4):509-12.
- Manjunatha B, Krishnappa M. Morphological characterization of *Pyricularia oryzae* causing blast disease in rice (*Oryza sativa* L.) from different zones of Karnataka. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 2019;8(3):3749-53.
- Ou SH. *Rice Diseases: Commonwealth Mycological Institute*. 2nd ed. Kew Surrey, England; 1985. 380 p.
- Koutroubas SD, Katsantonis D, Ntanos DA, Lupotto E. Blast disease influence on agronomic and quality traits of rice varieties under Mediterranean conditions. *Turkish Journal of Agriculture and forestry*. 2009;33(5):487-94.
- Kulmitra AK, Sahu N, Sahu MK, Kumar R, Kushram T, Sanath Kumar VB. Growth of Rice blast fungus *Pyricularia oryzae* (Cav.) on different solid and liquid media. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 2017;6(6):1154-60.
- Cárdenas RM, Pérez N, Cristo E, González MC, Fabrè L. Estudio sobre el comportamiento de líneas y variedades de arroz (*Oryza sativa* Lin.) ante la infección por el hongo *Pyricularia grisea* Sacc. *Cultivos Tropicales*. 2005;26(4):83-7.
- Cárdenas RM, Polón CR, Pérez N, Cristo E, Mesa S, Fabrè L, et al. Relación entre la incidencia de la piriculariosis (*Pyricularia grisea* Sacc.) del arroz (*Oryza sativa* Lin.) y diferentes variables climáticas en el Complejo Agroindustrial Arrocero Los Palacios. *Cultivos Tropicales*. 2010;31(1):14-8.
- Patiño L. La resistencia a fungicidas, una continúa amenaza al control de la Sigatoka Negra. *Boletín Técnico Cenibanano*. 2003;4:2-5.
- Hua C, Li Y, Wang X, Kai K, Su M, Zhang D, et al. The effect of low and high molecular weight chitosan on the control of gray mold (*Botrytis cinerea*) on kiwifruit and host response. *Scientia Horticulturae*. 2019;246:700-9.
- Sánchez-Domínguez D, Ríos MY, Castillo-Ocampo P, Zavala-Padilla G, Ramos-García M, Bautista-Baños S. Cytological and biochemical changes induced by chitosan in the pathosystem *Alternaria alternata*-tomato. *Pesticide biochemistry and physiology*. 2011;99(3):250-5.
- Cortés-Higareda M, de Lorena Ramos-García M, Correa-Pacheco ZN, Del Río-García JC, Bautista-Baños S. Nanostructured chitosan/propolis formulations: characterization and effect on the growth of *Aspergillus flavus* and production of aflatoxins. *Heliyon*. 2019;5(5):e01776.
- Sahariah P, Masson M. Antimicrobial chitosan and chitosan derivatives: a review of the structure-activity relationship. *Biomacromolecules*. 2017;18(11):3846-68.
- Rodríguez Pedroso AT, Plascencia Jatomea M, Bautista Baños S, Cortez Rocha MO, Ramírez Arrebato MÁ. Actividad antifúngica *in vitro* de quitosanos sobre patógeno del arroz. *Acta Agronomica*. 2016;65(2):169-74.
- Živković S, Stevanović M, Đurović S, Ristić D, Stošić S. Antifungal activity of chitosan against *Alternaria alternata* and *Colletotrichum gloeosporioides*. *Pesticidi i fitomedicina*. 2018;33(3-4):197-204.
- Badawy ME, Rabea EI. A biopolymer chitosan and its derivatives as promising antimicrobial agents against plant pathogens and their applications in crop protection. *International Journal of Carbohydrate Chemistry*. 2011;2011.
- Rabea EI, Badawy ME, Rogge TM, Stevens CV, Höfte M, Steurbaut W, et al. Insecticidal and fungicidal activity of new synthesized chitosan derivatives. *Pest Management Science*. 2005;61(10):951-60.

28. Xu J, Zhao X, Han X, Du Y. Antifungal activity of oligochitosan against *Phytophthora capsici* and other plant pathogenic fungi *in vitro*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 2007;87(3):220-8.
29. Chen C-S, Liao W-Y, Tsai G-J. Antibacterial effects of N-sulfonated and N-sulfobenzoyl chitosan and application to oyster preservation. *Journal of Food Protection*. 1998;61(9):1124-8.
30. Jia Z, Xu W. Synthesis and antibacterial activities of quaternary ammonium salt of chitosan. *Carbohydrate research*. 2001;333(1):1-6.
31. Sashiwa H, Kawasaki N, Nakayama A, Muraki E, Yamamoto N, Zhu H, *et al*. Chemical modification of chitosan. 13. Synthesis of organosoluble, palladium adsorbable, and biodegradable chitosan derivatives toward the chemical plating on plastics. *Biomacromolecules*. 2002;3(5):1120-5.
32. Badawy ME, Rabea EI, Rogge TM, Stevens CV, Steurbaut W, Höfte M, *et al*. Fungicidal and insecticidal activity of O-acyl chitosan derivatives. *Polymer bulletin*. 2005;54(4):279-89.
33. Badawy M, Rabea E, Steurbaut W, Rogge T, Stevens C, Smaghe G, *et al*. Fungicidal activity of some O-acyl chitosan derivatives against grey mould *Botrytis cinerea* and rice leaf blast *Pyricularia grisea*. *Communications in agricultural and applied biological sciences*. 2005;70(3):215-8.
34. Ma G, Yang D, Tan H, Wu Q, Nie J. Preparation and characterization of N-alkylated chitosan derivatives. *Journal of applied polymer science*. 2008;109(2):1093-8.
35. Másson M, Holappa J, Hjálmarsson M, Rúnarsson ÖV, Nevalainen T, Järvinen T. Antimicrobial activity of piperazine derivatives of chitosan. *Carbohydrate polymers*. 2008;74(3):566-71.
36. Seyfarth F, Schliemann S, Elsner P, Hipler U-C. Antifungal effect of high- and low-molecular-weight chitosan hydrochloride, carboxymethyl chitosan, chitosan oligosaccharide and N-acetyl-D-glucosamine against *Candida albicans*, *Candida krusei* and *Candida glabrata*. *International Journal of Pharmaceutics*. 2008;353(1-2):139-48.
37. Zhong Z, Xing R, Liu S, Wang L, Cai S, Li P. Synthesis of acyl thiourea derivatives of chitosan and their antimicrobial activities *in vitro*. *Carbohydrate Research*. 2008;343(3):566-70.
38. Tikhonov VE, Stepnova EA, Babak VG, Yamskov IA, Palma-Guerrero J, Jansson H-B, *et al*. Bactericidal and antifungal activities of a low molecular weight chitosan and its N-(2-(3)-(dodec-2-enyl) succinoyl)-derivatives. *Carbohydrate polymers*. 2006;64(1):66-72.
39. Stössel P, Leuba JL. Effect of chitosan, chitin and some aminosugars on growth of various soilborne phytopathogenic fungi. *Journal of Phytopathology*. 1984;111(1):82-90.
40. Badawy ME, Rabea EI. Characterization and antimicrobial activity of water-soluble N-(4-carboxybutyryl) chitosans against some plant pathogenic bacteria and fungi. *Carbohydrate polymers*. 2012;87(1):250-6.
41. Shimizu T, Jikumaru Y, Okada A, Okada K, Koga J, Umemura K, *et al*. Effects of a bile acid elicitor, cholic acid, on the biosynthesis of diterpenoid phytoalexins in suspension-cultured rice cells. *Phytochemistry*. 2008;69(4):973-81.
42. Agrawal GK, Rakwal R, Tamogami S, Yonekura M, Kubo A, Saji H. Chitosan activates defense/stress response (s) in the leaves of *Oryza sativa* seedlings. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2002;40(12):1061-9.
43. Lin W, Hu X, Zhang W, Rogers WJ, Cai W. Hydrogen peroxide mediates defence responses induced by chitosans of different molecular weights in rice. *Journal of Plant Physiology*. 2005;162(8):937-44.
44. Nguyen TH, Thi TV, Nguyen T-T, Le TD, Vo DMH, Nguyen DH, *et al*. Investigation of chitosan nanoparticles loaded with protocatechuic acid (PCA) for the resistance of *Pyricularia oryzae* fungus against rice blast. *Polymers*. 2019;11(1):177.
45. Pham DC, Nguyen TH, Ngoc UTP, Le NTT, Tran TV, Nguyen DH. Preparation, characterization and antifungal properties of chitosan-silver nanoparticles synergize fungicide against *Pyricularia oryzae*. *Journal of nanoscience and nanotechnology*. 2018;18(8):5299-305.
46. Je J-Y, Kim S-K. Antimicrobial action of novel chitin derivative. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*. 2006;1760(1):104-9.
47. El Hadrami A, Adam LR, El Hadrami I, Daayf F. Chitosan in plant protection. *Marine drugs*. 2010;8(4):968-87.
48. Zakrzewska A, Boorsma A, Brul S, Hellingwerf KJ, Klis FM. Transcriptional response of *Saccharomyces cerevisiae* to the plasma membrane-perturbing compound chitosan. *Eukaryotic Cell*. 2005;4(4):703-15.
49. Velásquez CL. Some potentialities of chitin and chitosan for uses related to agriculture in Latin America. *Revista Científica UDO Agrícola*. 2008;8(1):1-22.
50. Palma-Guerrero J, Huang I-C, Jansson H-B, Salinas J, Lopez-Llorca LV, Read ND. Chitosan permeabilizes the plasma membrane and kills cells of *Neurospora crassa* in an energy dependent manner. *Fungal Genetics and Biology*. 2009;46(8):585-94.
51. Palma-Guerrero J, Lopez-Jimenez JA, Pérez-Berná AJ, Huang I-C, Jansson H-B, Salinas J, *et al*. Membrane fluidity determines sensitivity of filamentous fungi to chitosan. *Molecular microbiology*. 2010;75(4):1021-32.
52. Cuero RG, Duffus E, Osuji G, Pettit R. Aflatoxin control in preharvest maize: effects of chitosan and two microbial agents. *The Journal of Agricultural Science*. 1991;117(2):165-9.
53. El Ghaouth A, Arul J, Asselin A, Benhamou N. Antifungal activity of chitosan on post-harvest pathogens: induction of morphological and cytological alterations in *Rhizopus stolonifer*. *Mycological research*. 1992;96(9):769-79.
54. Sudarshan NR, Hoover DG, Knorr D. Antibacterial action of chitosan. *Food Biotechnology*. 1992;6(3):257-72.
55. Jo Y-K, Kim BH, Jung G. Antifungal activity of silver ions and nanoparticles on phytopathogenic fungi. *Plant disease*. 2009;93(10):1037-43.