

Revisión bibliográfica

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

Aida Tania Rodríguez-Pedroso^{1*} 

Silvia Bautista-Baños² 

Miguel Ángel Ramírez-Arrebato¹ 

Maribel Plascencia-Jatomea³ 

Lázara Hernández-Ferrer¹ 

¹Unidad Científico Tecnológica de Base “Los Palacios”, Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA). Carretera La Francia km 1½, Los Palacios, Pinar del Río, Cuba. CP 22 900

²Centro de Desarrollo de Productos Bióticos, Instituto Politécnico Nacional, carretera Yautepec-Jojutla, km 6, San Isidro, CEPROBI 8, Yautepec, Morelos, México. CP 62731

³Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos, Universidad de Sonora, Blvd. Luis Encinas y Rosales s/n, Col. Centro, PO Box 1658, Hermosillo, Sonora, México. CP 83000

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

RESUMEN

El quitosano y sus derivados son compuestos naturales que tienen potencial en la agricultura con respecto a controlar 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*

Recibido: 02/07/2020

Aceptado: 24/03/2021

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).

Este compuesto ha demostrado tener actividad antifúngica sobre diferentes patógenos, entre ellos 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 y protegiendo a la planta del ataque del mismo patógeno ⁽⁵⁻⁸⁾.

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 líneal 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 contenido de nitrógeno (N) mayor que 7 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⁾. Al unirse los grupos amino del quitosano a los aminoácidos ácidos de las proteínas se produce las interacciones electrostáticas que conlleva a desórdenes celulares en los microorganismos.

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. En este sentido, respecto al grado de acetilación se puede plantear que mientras menor sea el grado de acetilación, mayor es la actividad antimicrobiana ^(10,11).

***Pyricularia oryzae* agente causal del añublo o quemazón del arroz**

Este patógeno de plantas es muy eficaz ya que puede reproducirse sexualmente (teleomorfo: *Magnaporthe grisea* Barr (It. Hebert) sin *Magnaporthe oryzae*) y asexualmente (anamorfo: *Pyricularia oryzae*). El Grupo de Trabajo *Pyricularia/Magnaporthe* ha establecido bajo los auspicios de la Comisión Internacional sobre la Taxonomía de Hongos (CITH) la posibilidad de conservar el nombre *Magnaporthe* sobre *Pyricularia*. Sin embargo, dicha conservación requiere un cambio en la especie tipo del género *Magnaporthe* y causaría numerosos cambios de nombres para esas especies actualmente ubicadas en *Pyricularia* ⁽¹²⁾.

El nombre 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 ⁽¹²⁾. 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 cuatro nombres: *Pyricularia oryzae*, *Magnaporthe oryzae*, *Pyricularia grisea* y *Magnaporthe grisea*.

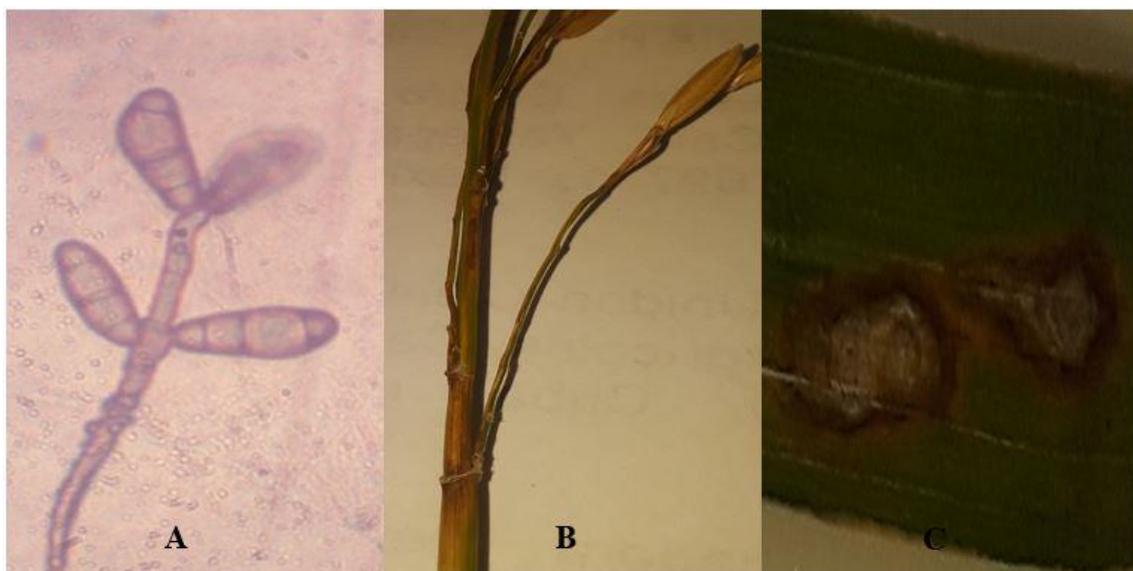
Pyricularia oryzae conocida como pirculariosis, añublo, quemazón, fallada, mancha, bruzone del arroz o tizón foliar es una de las enfermedades más serias del cultivo de arroz (*Oryza sativa* L.), la cual ha causado significantes pérdidas en los rendimientos a nivel mundial ⁽¹³⁾.

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 pirculariosis 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) ⁽¹⁴⁾. La pirculariosis ha causado significantes pérdidas, por ejemplo: en la India el 90 % ⁽¹⁵⁾,

en China el 70 % ⁽¹⁶⁾, en Tailandia fue afectada en 1987 solamente 1900 ha, ya en 1988 se incrementó a 490 000 ha, en España y en la zona del mediterráneo también ha causado daños ⁽¹⁷⁾. 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 donde ha causado daños este patógeno y cuando las condiciones son favorables se ha incrementado las pérdidas hasta un 70 % ⁽⁶⁾.

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. Los conidióforos nacen solitarios o en grupos de tres y en sus extremos llevan los conidios, los cuales son hialinos, fusiforme y están divididos por dos septos en forma equidistantes.



Imágenes de los autores

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

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 ⁽¹⁶⁾, que inhibe el crecimiento de los tejidos y los desorganiza. Ataca las partes aéreas de la planta como las hojas, tallos, nudos y espigas ⁽¹⁸⁾ (Figuras 1B,C). El hongo produce unas manchas o lesiones en las hojas de forma alargadas o elípticas a romboides y 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 ⁽¹⁹⁾. Su temperatura óptima de crecimiento está entre 22-29 °C y una elevada humedad relativa entorno al 90 %, 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 ⁽²⁰⁾.

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 ⁽²¹⁾. 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, cuestionando su uso comercial, siendo entonces prioritario 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 han 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*, *Drechstera sorokiana*, *Fusarium acuminatum*, *Fusarium graminearum*, *Micronectriella nivalis*, *Rhizoctonia solani*, *Alternaria alternata*, *Colletotrichum gloesporioides*, *Penicillium* spp., *Fusarium oxysporum* y *Bipolaris oryzae*, entre otros hongos ⁽²²⁻²⁶⁾.

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 ^(23,27,28). Algunos autores han comprobado el efecto fungicida de estos compuestos a diferentes concentraciones y aislamientos de *P. grisea* ^(5,7,29). 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 (30).

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 (31), N,N,N-trimetil quitosano (32) N,O-acyl quitosano (33), O-acyl quitosano (34,35), hidroxietil aril quitosano (36), dimetilpiperazina quitosano (37), carboximetil quitosano (38), acil urea tiourea quitosano (39), N-succinoil quitosano (40) y N-heterocíclico quitosano (41). Investigadores han notado que la N-alquilación o N-arilación del quitosano con aldehídos aromáticos o alifáticos aumentaron efectivamente su actividad antifúngica sobre *P. grisea* (42).

Con los mismos métodos y técnicas de obtención, pero utilizando diferentes tipos de aldehídos, otros científicos (31), 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 la 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 difeniletil) 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 y momilactonas B ante una infección con *P. grisea* en hojas de arroz a la concentración de 10 µg mL⁻¹ (43).

Un grupo de investigadores publicaron el efecto del quitosano en la estimulación de respuestas de defensa en hojas de arroz (44). 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 % (45). 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 determinó 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, en relación con el control. Además, de no observarse síntomas de la enfermedad en la concentración más elevada utilizada de ambos compuestos ⁽⁶⁾.

Actualmente, se investiga la aplicación de nanopartículas a base de quitosano con actividad antifúngica y para el control de enfermedades como la piriculariosis ^(8,46,47). Por su parte, estudiosos del tema 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) ⁽⁴⁶⁾. Sin embargo, otros científicos observaron que aplicando 500 µl de una solución de nanopartículas de quitosano al 0,1 % sobre hojas de arroz y 24 h más tarde inoculó una suspensión de esporas (1×10^5 esporas mL⁻¹) de *P. grisea* ⁽⁸⁾. A los 10 días no se observaron síntomas de la enfermedad, esto pudo deberse por la estimulación de algún mecanismo de defensa en las hojas y controló la infección ⁽⁸⁾.

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 policationica de la molécula, la cual está dada por los grupos NH₃⁺ de la glucosamina, que le confiere importantes propiedades biológicas y fisiológicas ^(48,49). En condiciones de pH, el quitosano se comporta como polielectrolito lineal, con un pK 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 ⁽⁵⁰⁾. Se plantea que cuando la carga positiva sobre el C-2 del monómero de glucosamina se encuentra por debajo de pH 6, del quitosano es más soluble y tiene una mejor actividad antimicrobiana que la quitina ^(31,51).

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 que conduce a la salida de proteínas y otros constituyentes intracelulares ⁽³¹⁾. El más abundante de los esfingolípidos es el manosildiinositolfosfato-ceramida (M(IP₂)C), el cual presenta dos cargas negativas. Estas cargas negativas correspondientes a la membrana plasmática (M(IP₂)C), pueden unirse a los grupos aminos de los residuos de glucosamina del quitosano. 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 ⁽⁵⁰⁾. Por su parte, un grupo de

trabajo analizaron 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 ^(52,53). 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 incrementan la fluidez de la membrana plasmática para hacer el hongo susceptible a biocompuestos 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 ⁽⁵⁴⁾. Además activa algunos procesos de defensa en los tejidos hospederos ⁽⁵⁵⁾ e inhibe varias enzimas. La unión del quitosano con el ADN y la inhibición de la síntesis de ARN_m y síntesis de proteínas ⁽⁵⁶⁾, provocando daños celulares y estructurales.

En el caso de las nanopartículas de plata (Ag) se basa en la posibilidad de que éstas se adhieran y penetren en la membrana celular ⁽⁵⁷⁾, causando desbalance osmótico en las esporas, siendo muy efectivas contra *Magnaporthe grisea* ⁽⁵⁸⁾.

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. Sin embargo, aún 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 los que estos compuestos actúan sobre el hongo y en la planta.

BIBLIOGRAFÍA

1. Harish Prashanth KV, Tharanathan RN. Chitin/chitosan: modifications and their unlimited application potential-an overview. Trends in Food Science and Technology. 2007;18(3):117–31. doi:doi:<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2006.10.022>

2. 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* [Internet]. 2010;28(1):44–57. Available from: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61214206005>
3. 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. doi:doi:<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.01.002>
4. Xing K, Zhu X, Peng X, Qin S. Chitosan antimicrobial and eliciting properties for pest control in agriculture: a review. *Agronomy for Sustainable Development* [Internet]. 2015;35(2):569–88. doi:<https://doi.org/10.1007/s13593-014-0252-3>
5. 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* [Internet]. 2003;24(2):85–8. Available from: <https://www.redalyc.org/pdf/1932/193218174015.pdf>
6. 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* [Internet]. 2007;89(3):206–15. doi:doi:10.1016/j.pestbp.2007.06.007
7. 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* [Internet]. 2004;25(4):89–93. Available from: <https://www.redalyc.org/pdf/1932/193225911012.pdf>
8. Manikandan A, Sathiyabama M. Preparation of chitosan nanoparticles and its effect on detached rice leaves infected with *Pyricularia grisea*. *International journal of biological macromolecules* [Internet]. 2016;84:58–61. doi:doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.11.083>
9. Muzzarelli RAA. Enzymatic synthesis of chitin and chitosan. Occurrence of chitin. In: Muzzarelli RAA, editor. *Chitin* [Internet]. Pergamon; 1977 [cited 28/08/2021]. p. 5–44. doi:10.1016/B978-0-08-020367-6.50007-6
10. Kong M, Chen X, Xue Y, Liu C, Yu L, Ji Q, et al. Preparation and antibacterial activity of chitosan microspheres in a solid dispersing system. *Frontiers of Materials Science in China* [Internet]. 2008;2(2):214–20. Available from: <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/s11706-008-0036-2.pdf>

11. Takahashi T, Imai M, Suzuki I, Sawai J. Growth inhibitory effect on bacteria of chitosan membranes regulated with deacetylation degree. *Biochemical Engineering Journal* [Internet]. 2008;40(3):485–91. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1369703X08000430>
12. Zhang N, Luo J, Rossman AY, Aoki T, Chuma I, Crous PW, et al. Generic names in Magnaporthales. *IMA fungus* [Internet]. 2016;7(1):155–9. doi:doi:<https://doi.org/10.5598/ima fungus.2016.07.01.09>
13. 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* [Internet]. 2008;21(2):51–8. Available from: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20093204367>
14. Rossman AY, Howard RJ, Valent B. *Pyricularia grisea* the correct name for the rice blast disease fungus. *Mycologia* [Internet]. 1990;82(4):509–12. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/00275514.1990.12025916?journalCode=umyc20>
15. 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* [Internet]. 2019;8(3):3749–53. Available from: <https://www.phytojournal.com/archives/2019/vol8issue3/PartBC/8-3-279-550.pdf>
16. Ou SH. Rice diseases [Internet]. IRRI; 1985. Available from: https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=k3mewv9nMoC&oi=fnd&pg=PR1&dq=Rice+Diseases&ots=Zmj_rBBc8i&sig=C413L03O2pB85A2EhfQhPD1KApU#v=onepage&q=Rice%20Diseases&f=false
17. 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* [Internet]. 2009;33(5):487–94. Available from: <https://journals.tubitak.gov.tr/agriculture/abstract.htm?id=10484>
18. 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* [Internet]. 2017;6(6):1154–60. doi:<https://doi.org/10.20546/ijcmas.2017.606.133>
19. Cárdenas RM, Pérez N, Cristo E, González MC, Fabr e 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* [Internet]. 2005;26(4):83–7. Available from: <https://www.redalyc.org/pdf/1932/193216160012.pdf>
20. Cárdenas RM, Polín CR, Pérez N, Cristo E, Mesa S, Fabr e 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 Arrocerero Los Palacios. *Cultivos Tropicales* [Internet]. 2010;31(1):00–00. Available from:

http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0258-59362010000100002

21. Manzo Sánchez G, Carrillo Madrigal H, Guzmán González S, Orozco Santos M. Análisis de la Sensibilidad *in vitro* de *Mycosphaerella fijiensis*, Agente Causal de la Sigatoka Negra del Banano a los Fungicidas Benomyl, Propiconazol y Azoxistrobin. *Revista mexicana de fitopatología* [Internet]. 2012 [cited 28/08/2021];30(1):81–5. Available from:

http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0185-33092012000100008&lng=es&nrm=iso&tlng=es

22. 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* [Internet]. 2019;246:700–9. Available from:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0304423818308197>

23. 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* [Internet]. 2011;99(3):250–5. Available from:

[https://d1wqtxts1xzle7.cloudfront.net/44367734/Cytological_and_biochemical_changes_indu20160403-12579-18vumyq.pdf?1459730343=&response-content-](https://d1wqtxts1xzle7.cloudfront.net/44367734/Cytological_and_biochemical_changes_indu20160403-12579-18vumyq.pdf?1459730343=&response-content-disposition=inline%3B+filename%3DCytological_and_biochemical_changes_indu.pdf&Expires=1631769785&Signature=IGGgjxkuWLCyHKJnBKWJkxGt1dhC3jDsalPwe033Zh69KP~oMc9leISiFCA0WSiKUCxKb1K~RCJkP0URuU~09UxsZWRx6yjMBZ~tCQYVGBefq4iuV~0LuAXIeh1ysKZ53HVKZb0Z2fVsYsTRC~FMcGsjqZbRwVPDq1mjM7VE43h3RvolAkQ4LLzRWs1KSSscUcUHoy-8cVMHx~zmJFU7DCf~ZGlzwERIsr7TgSW2w7xT7vzMf-OaiiFMda~v241ukzc5Vd6HBXZUxr1J16f266xhUCV5w6uDBnm4X3MHMaFFjIaf9XPSJdfnmDnR8TAzi11jPKfVHXjjuNPU0Y8Zg__&Key-Pair-Id=APKAJLOHF5GGSLRBV4ZA)

[disposition=inline%3B+filename%3DCytological_and_biochemical_changes_indu.pdf&Expires=1631769785&Signature=IGGgjxkuWLCyHKJnBKWJkxGt1dhC3jDsalPwe033Zh69KP~oMc9leISiFCA0WSiKUCxKb1K~RCJkP0URuU~09UxsZWRx6yjMBZ-](https://d1wqtxts1xzle7.cloudfront.net/44367734/Cytological_and_biochemical_changes_indu20160403-12579-18vumyq.pdf?1459730343=&response-content-disposition=inline%3B+filename%3DCytological_and_biochemical_changes_indu.pdf&Expires=1631769785&Signature=IGGgjxkuWLCyHKJnBKWJkxGt1dhC3jDsalPwe033Zh69KP~oMc9leISiFCA0WSiKUCxKb1K~RCJkP0URuU~09UxsZWRx6yjMBZ~tCQYVGBefq4iuV~0LuAXIeh1ysKZ53HVKZb0Z2fVsYsTRC~FMcGsjqZbRwVPDq1mjM7VE43h3RvolAkQ4LLzRWs1KSSscUcUHoy-8cVMHx~zmJFU7DCf~ZGlzwERIsr7TgSW2w7xT7vzMf-OaiiFMda~v241ukzc5Vd6HBXZUxr1J16f266xhUCV5w6uDBnm4X3MHMaFFjIaf9XPSJdfnmDnR8TAzi11jPKfVHXjjuNPU0Y8Zg__&Key-Pair-Id=APKAJLOHF5GGSLRBV4ZA)

[~tCQYVGBefq4iuV~0LuAXIeh1ysKZ53HVKZb0Z2fVsYsTRC~FMcGsjqZbRwVPDq1mjM7V](https://d1wqtxts1xzle7.cloudfront.net/44367734/Cytological_and_biochemical_changes_indu20160403-12579-18vumyq.pdf?1459730343=&response-content-disposition=inline%3B+filename%3DCytological_and_biochemical_changes_indu.pdf&Expires=1631769785&Signature=IGGgjxkuWLCyHKJnBKWJkxGt1dhC3jDsalPwe033Zh69KP~oMc9leISiFCA0WSiKUCxKb1K~RCJkP0URuU~09UxsZWRx6yjMBZ~tCQYVGBefq4iuV~0LuAXIeh1ysKZ53HVKZb0Z2fVsYsTRC~FMcGsjqZbRwVPDq1mjM7VE43h3RvolAkQ4LLzRWs1KSSscUcUHoy-8cVMHx~zmJFU7DCf~ZGlzwERIsr7TgSW2w7xT7vzMf-OaiiFMda~v241ukzc5Vd6HBXZUxr1J16f266xhUCV5w6uDBnm4X3MHMaFFjIaf9XPSJdfnmDnR8TAzi11jPKfVHXjjuNPU0Y8Zg__&Key-Pair-Id=APKAJLOHF5GGSLRBV4ZA)

[E43h3RvolAkQ4LLzRWs1KSSscUcUHoy-](https://d1wqtxts1xzle7.cloudfront.net/44367734/Cytological_and_biochemical_changes_indu20160403-12579-18vumyq.pdf?1459730343=&response-content-disposition=inline%3B+filename%3DCytological_and_biochemical_changes_indu.pdf&Expires=1631769785&Signature=IGGgjxkuWLCyHKJnBKWJkxGt1dhC3jDsalPwe033Zh69KP~oMc9leISiFCA0WSiKUCxKb1K~RCJkP0URuU~09UxsZWRx6yjMBZ~tCQYVGBefq4iuV~0LuAXIeh1ysKZ53HVKZb0Z2fVsYsTRC~FMcGsjqZbRwVPDq1mjM7VE43h3RvolAkQ4LLzRWs1KSSscUcUHoy-8cVMHx~zmJFU7DCf~ZGlzwERIsr7TgSW2w7xT7vzMf-OaiiFMda~v241ukzc5Vd6HBXZUxr1J16f266xhUCV5w6uDBnm4X3MHMaFFjIaf9XPSJdfnmDnR8TAzi11jPKfVHXjjuNPU0Y8Zg__&Key-Pair-Id=APKAJLOHF5GGSLRBV4ZA)

[8cVMHx~zmJFU7DCf~ZGlzwERIsr7TgSW2w7xT7vzMf-](https://d1wqtxts1xzle7.cloudfront.net/44367734/Cytological_and_biochemical_changes_indu20160403-12579-18vumyq.pdf?1459730343=&response-content-disposition=inline%3B+filename%3DCytological_and_biochemical_changes_indu.pdf&Expires=1631769785&Signature=IGGgjxkuWLCyHKJnBKWJkxGt1dhC3jDsalPwe033Zh69KP~oMc9leISiFCA0WSiKUCxKb1K~RCJkP0URuU~09UxsZWRx6yjMBZ~tCQYVGBefq4iuV~0LuAXIeh1ysKZ53HVKZb0Z2fVsYsTRC~FMcGsjqZbRwVPDq1mjM7VE43h3RvolAkQ4LLzRWs1KSSscUcUHoy-8cVMHx~zmJFU7DCf~ZGlzwERIsr7TgSW2w7xT7vzMf-OaiiFMda~v241ukzc5Vd6HBXZUxr1J16f266xhUCV5w6uDBnm4X3MHMaFFjIaf9XPSJdfnmDnR8TAzi11jPKfVHXjjuNPU0Y8Zg__&Key-Pair-Id=APKAJLOHF5GGSLRBV4ZA)

24. 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* [Internet]. 2019;5(5):e01776. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2405844019309806>

25. Sahariah P, Masson M. Antimicrobial chitosan and chitosan derivatives: a review of the structure–activity relationship. *Biomacromolecules* [Internet]. 2017;18(11):3846–68. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.biomac.7b01058>
26. Rodríguez Pedroso AT, Plascencia Jatomea M, Bautista Baños S, Cortez Rocha MO, Ramírez Arrebato MÁ. Actividad antifúngica in vitro de quitosanos sobre *Bipolaris oryzae* patógeno del arroz. *Acta Agronómica* [Internet]. 2016;65(1):98–103. Available from: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-28122016000100014
27. Živković S, Stevanović M, Đurović S, Ristić D, Stošić S. Antifungal activity of chitosan against *Alternaria alternata* and *Colletotrichum gloeosporioides*. *Pesticidi i fitomedicina* [Internet]. 2018;33(3–4):197–204. Available from: <https://plantarum.izbis.bg.ac.rs/bitstream/handle/123456789/543/541.pdf?sequence=1>
28. 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* [Internet]. 2011;2011. doi:<https://doi.org/10.1155/2011/460381>
29. 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* [Internet]. 2005;61(10):951–60. doi:<https://doi.org/10.1002/ps.1085>
30. 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.
31. Chen C-S, Liao W-Y, Tsai G-J. Antibacterial effects of N-sulfonated and N-sulfo benzoyl chitosan and application to oyster preservation. *Journal of Food Protection* [Internet]. 1998;61(9):1124–8. doi:<https://doi.org/10.4315/0362-028X-61.9.1124>
32. Jia Z, Xu W. Synthesis and antibacterial activities of quaternary ammonium salt of chitosan. *Carbohydrate research* [Internet]. 2001;333(1):1–6. doi:[https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(01\)00112-4](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(01)00112-4)
33. Sashiwa H, Kawasaki N, Nakayama A, Muraki E, Yamamoto N, Zhu H, et al. Chemical modification of chitosan. Synthesis of organosoluble, palladium adsorbable, and biodegradable chitosan derivatives toward the chemical plating on plastics. *Biomacromolecules* [Internet]. 2002;3(5):1120–5. doi:<https://doi.org/10.1021/bm0200478>
34. 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. doi:<https://doi.org/10.1007/s00289-005-0396-z>
35. Badawy M, Rabea E, Steurbaut W, Rogge T, Stevens C, Smagghe 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 [Internet]. 2005;70(3):215–8. Available from: <https://europepmc.org/article/med/16637180>
36. Ma G, Yang D, Tan H, Wu Q, Nie J. Preparation and characterization of N-alkylated chitosan derivatives. Journal of applied polymer science [Internet]. 2008;109(2):1093–8. doi:<https://doi.org/10.1002/app.28223>
37. Másson M, Holappa J, Hjálmarsdóttir M, Rúnarsson ÖV, Nevalainen T, Järvinen T. Antimicrobial activity of piperazine derivatives of chitosan. Carbohydrate polymers [Internet]. 2008;74(3):566–71. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0144861708001720>
38. 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 [Internet]. 2008;353(1–2):139–48. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18164151/>
39. 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 [Internet]. 2008;343(3):566–70. Available from: https://www.researchgate.net/profile/Shengbao-Cai/publication/5765859_Synthesis_of_acyl_thiourea_derivatives_of_chitosan_and_their_antimicrobial_activities_in_vitro/links/5fd7458745851553a0b591d5/Synthesis-of-acyl-thiourea-derivatives-of-chitosan-and-their-antimicrobial-activities-in-vitro.pdf
40. 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.
41. Stössel P, Leuba JL. Effect of chitosan, chitin and some aminosugars on growth of various soilborne phytopathogenic fungi. Journal of Phytopathology [Internet]. 1984;111(1):82–90. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/j.1439-0434.1984.tb04244.x>
42. Badawy ME, Rabea EI. Characterization and antimicrobial activity of water-soluble N-(4-carboxybutyryl) chitosans against some plant pathogenic bacteria and fungi. Carbohydrate polymers [Internet]. 2012;87(1):250–6. Available from: <http://damanhour.edu.eg/pdf/researches/1-s2.0-S014486171100645X-main.pdf>
43. 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* [Internet]. 2008;69(4):973–81. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0031942207006097?via%3Dihub>
44. 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.
45. 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* [Internet]. 2005;162(8):937–44. Available from: <http://sippe.ac.cn/gh/papers/caiweiming/Lin2005.pdf>
46. 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* [Internet]. 2018;18(8):5299–305. Available from: https://www.researchgate.net/profile/Dinh-Chuong-Pham/publication/321308729_Preparation_Characterization_and_Antifungal_Properties_of_Chitosan-Silver_Nanoparticles_Synergize_Fungicide_Against_Pyricularia_oryzae/links/5a35486245851532e82f1da0/Preparation-Characterization-and-Antifungal-Properties-of-Chitosan-Silver-Nanoparticles-Synergize-Fungicide-Against-Pyricularia-oryzae.pdf
47. 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* [Internet]. 2019;11(1):177. Available from: <file:///C:/Users/Casa/AppData/Local/Temp/polymers-11-00177-1.pdf>
48. Je J-Y, Kim S-K. Antimicrobial action of novel chitin derivative. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* [Internet]. 2006;1760(1):104–9. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0304416505003028?via%3Dihub>
49. El Hadrami A, Adam LR, El Hadrami I, Daayf F. Chitosan in plant protection. *Marine drugs* [Internet]. 2010;8(4):968–87. Available from: <file:///C:/Users/Casa/AppData/Local/Temp/marinedrugs-08-00968.pdf>
50. Zakrzewska A, Boorsma A, Brul S, Hellingwerf KJ, Klis FM. Transcriptional response of *Saccharomyces cerevisiae* to the plasma membrane-perturbing compound chitosan. *Eukaryotic Cell* [Internet]. 2005;4(4):703–15. Available from: <https://journals.asm.org/doi/pdf/10.1128/EC.4.4.703-715.2005>
51. Velásquez CL. Some potentialities of chitin and chitosan for uses related to agriculture in Latin America. *Revista Científica UDO Agrícola* [Internet]. 2008;8(1):1–22. Available from: <file:///C:/Users/Casa/AppData/Local/Temp/Dialnet-SomePotentialitiesOfChitinAndChitosanForUsesRelate-3094823.pdf>

52. 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* [Internet]. 2009;46(8):585–94. Available from: <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.458.5391&rep=rep1&type=pdf>
53. López Jiménez JÁ, Palma Guerrero J, Pérez Berná AJ, Huang IC, Jansson HB, Salinas J, et al. Membrane fluidity determines sensitivity of filamentous fungi to chitosan. *Molecular Microbiology*, n°75, vol. 4 [Internet]. 2010; Available from: <https://digitum.um.es/digitum/bitstream/10201/38147/1/Membrane%20fluidity%20determines%20sensitivity.pdf>
54. 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* [Internet]. 1991;117(2):165–9. Available from: <https://www.cambridge.org/core/journals/journal-of-agricultural-science/article/abs/aflatoxin-control-in-preharvest-maize-effects-of-chitosan-and-two-microbial-agents/BD8D14313D49649D683B711CE3F4DDE4>
55. 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* [Internet]. 1992;96(9):769–79. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0953756209804474?via%3Dihub>
56. Sudarshan NR, Hoover DG, Knorr D. Antibacterial action of chitosan. *Food Biotechnology* [Internet]. 1992;6(3):257–72. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0953756209804474?via%3Dihub>
57. Avila-Quezada GD, Espino-Solis GP. Silver nanoparticles offer effective control of pathogenic bacteria in a wide range of food products. *Pathogenic Bacteria* [Internet]. 2019; Available from: <https://www.intechopen.com/chapters/69239>
58. Jo Y-K, Kim BH, Jung G. Antifungal activity of silver ions and nanoparticles on phytopathogenic fungi. *Plant disease* [Internet]. 2009;93(10):1037–43. Available from: <https://apsjournals.apsnet.org/doi/abs/10.1094/PDIS-93-10-1037>