

Actividad antifúngica in vitro de quitosanos sobre *Bipolaris oryzae* patógeno del arroz

In vitro antifungal activity of chitosan on *Bipolaris oryzae*, rice pathogen

Aida Tania Rodríguez Pedroso^{1*}, Maribel Plascencia Jatomea², Silvia Bautista Baños³, Mario Onofre Cortez Rocha² y Miguel Ángel Ramírez Arrebato¹

¹ Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA), Cuba; ² Universidad de Sonora, Departamento de Investigaciones y Posgrado en Alimento (DIPA), México;

³ Instituto Politécnico Nacional (IPN), México; ² Universidad de Sonora, Departamento de Investigaciones y Posgrado en Alimento (DIPA), México.

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

Rec.:14.01.2015 Acep.: 27.03.2015

Resumen

En el presente trabajo se evaluó el efecto y la Concentración Media Inhibitoria (CMI₅₀) de quitosanos de diferentes masas moleculares en el crecimiento micelial, el diámetro de las hifas, los cambios estructurales, la germinación de esporas y la producción de biomasa del hongo *Bipolaris oryzae*. Los resultados mostraron que el quitosano de masa molecular media presentó mayor efecto inhibitorio ($P \leq 0.05$); sin embargo, el quitosano de masa molecular baja afectó más el diámetro de las hifas a la mayor concentración utilizada (4000 mg/l). Las observaciones de las hifas realizadas por Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) mostraron que el hongo tratado con quitosano a la concentración de 3000 mg/l presentó una alta producción de esporas. El quitosano de masa molecular media presentó el valor más bajo (2182.9 mg/l). La germinación de las esporas tratadas con CMI₅₀ y la producción de biomasa del hongo fueron afectadas por el quitosano.

Palabras clave: Biomasa, esporas, CMI₅₀, SEM.

Abstract

The aim of this study was to determine the effect and Media Inhibitory Concentration (MIC₅₀), of chitosans of different molecular masses on mycelial growth, hyphal diameter, structural changes, spore germination and fungal biomass production *B. oryzae*. The results indicated that the average molecular mass chitosan showed higher inhibitory effect ($p \leq 0.05$); however, the low molecular weight chitosan affected more hyphal diameter at the highest concentration used (4000 mg/l). Observations of hyphae through the scanning electron microscopy (SEM) showed that the fungus treated with chitosan at the concentration of 3000 mg/l achieved a high spore production. The average molecular mass chitosan had the lowest MIC value was 2182.9 mg/l. The germination of spores treated with CMI₅₀ was affected and biomass production of the fungus.

Keywords: Biomass, spores, CMI₅₀, SEM.

Introducción

La enfermedad ‘grano manchado’ es una de las más importantes del arroz (*Oryza sativa* L.), aunque ocurre en la mayor parte de las regiones productoras, es de especial importancia en países de Asia, África y América (Hossain, Dey, y Hossain, 2011; Ibrahim y Abo El-Dahab, 2014). Las investigaciones muestran que la causa determinante de esta enfermedad es principalmente de origen fúngico, ya que se ha logrado identificar en semillas afectadas por hongos, comprobándose experimentalmente que varios de ellos reproducen el síndrome de grano manchado (Rivero, Cruz, Rodríguez, Echevarría, y Martínez, 2012). Entre los hongos identificados como agentes causales de la enfermedad se encuentran: *Alternaria padwickii*, *Curvularia* sp., *Fusarium* spp., *Phoma* sp., *B. oryzae*.

El grano manchado afecta componentes del rendimiento debido al alto porcentaje de vaneos, disminución del poder germinativo, vigor y tamaño de las plántulas, reducción del número de granos por panículas y de la calidad industrial del grano de arroz lo que afecta el índice de granos enteros. Igualmente aumenta los índices de granos quebradizos en el proceso de molinado, la proporción de granos yesosos y la presencia de coloraciones anormales. Además, en los campos de producción de semillas la incidencia de esta enfermedad obliga al descarte de lotes productivos (Ibrahim y Abo El-Dahab, 2014).

Para el control se usan métodos como la siembra de cultivares tolerantes y la aplicación de fungicidas químicos convencionales (Hossain *et al.* 2011). Debido a los efectos negativos residuales de estos últimos, actualmente se investiga en la aplicación de quitosanos, un producto biológico biodegradable y compatible con la actividad antimicrobiana (Falcón *et al.*, 2010). Li *et al.* (2013) concluyen que factores como concentración y tipo, grado de polimerización, grado de acetilación, naturaleza del hospedero, composición de los nutrientes, condiciones del medio ambiente y periodo de incubación influyen en la efectividad del quitosano. Los hongos en contacto con este compuesto presentan cambios morfológicos en las hifas provocando hinchazón, bifurcación y distorsión (Sánchez-Domínguez *et al.*, 2011). No obstante aún no se ha evaluado el efecto de estos productos de diferentes masas moleculares sobre el hongo *B. oryzae*. Por tanto, en este trabajo mediante la técnica de MEB se evaluó el efecto in vitro de tres quitosanos de diferentes masas moleculares sobre *B. oryzae*, en especial los daños ocasionados en la morfología de las hifas.

Materiales y métodos

Actividad antifúngica

Se utilizaron tres quitosanos con masas moleculares de 121.6, 152.6 y 211.6 KDa, denominados quitosano de masa molecular baja (QMMB),

quitosano de masa molecular media (QMMM) y quitosano de masa molecular alta (QMMA), respectivamente, de la firma Sigma- Aldrich con un grado de desacetilación de 90%. Estos fueron disueltos en una solución de ácido acético (1% v/v) a pH 5.6, usando hidróxido de sodio 2M.

La cepa empleada fue previamente identificada como *Cochliobolus miyabeanus* (Ito & Kuribayasi) Drechsler ex Dauster [Anamorfo: *B. oryzae* (Breda de Haan) Shoemaker], aislada de granos de arroz manchados del cultivar mexicano Morelos A98. La cepa de *B. oryzae* (M-2) fue cultivada en medio papa-dextrosa-agar (PDA) en platos Petri, a temperatura entre 26 y 28 °C, con alternancia de 16 h luz y 8 de oscuridad (16/8). Los quitosanos y el medio de cultivo fueron esterilizados por separado en autoclave durante 15 min a 121 °C. Seguidamente, fueron combinados para obtener los tratamientos siguientes: 1000, 3000 y 4000 mg/l y un control con solo PDA. En placas Petri se adicionaron 10 ml en el medio de cultivo que contenía cada tratamiento y fueron inoculadas con un disco de micelio de *B. oryzae* de 5 mm de diámetro.

Las evaluaciones de los diámetros de las colonias formadas fueron realizadas manualmente con una escala graduada, cada 24 h por 5 días y comparadas con el crecimiento del hongo en el medio control (sin quitosano), con el objetivo de calcular el crecimiento radial y el porcentaje de inhibición sobre la colonia (Ecuación 1).

$$\text{Inhibición radial (\%)} = [(T_c - T_i) / T_c] \times 100 \quad (1)$$

Dónde: T_c =radio promedio de la colonia control, T_i =radio de la colonia en medio con quitosano.

Los resultados de inhibición del crecimiento micelial fueron analizados en un diseño completamente aleatorizado con cinco repeticiones por tratamiento, utilizando el programa NCSS 2001 para el análisis de varianza y comparación de medias con la prueba de rango múltiple de Tukey ($P \leq 0.05$). Posteriormente, se realizó un análisis bifactorial (concentración y masa molecular de quitosano) completamente aleatorizado para el porcentaje de inhibición del crecimiento radial del micelio.

Diámetro de hifas

El efecto de los tratamientos con quitosanos sobre la diferenciación estructural en las regiones distales de *B. oryzae* se determinó mediante la medición de los parámetros morfométricos, utilizando análisis de procesamiento de imágenes. De cada tratamiento se tomaron 50 mediciones de los diámetros de las hifas con objetivo 40X. Las imágenes del micelio desarrollado sobre la placa de agar, 72 horas después de la inocula-

ción, fueron capturadas moviendo manualmente el campo del microscopio y empleando las funciones predeterminadas del programa (Larralde *et al.*, 1997).

Microscopía electrónica de barrido (MEB)

Las observaciones de microscopía electrónica se realizaron en la fase de crecimiento apical, donde se inocularon las placas con discos de agar (5 mm) que contenían el micelio del hongo. Para las observaciones se cortaron trozos de agar de 0.5 x 0.5 cm, tomadas 72 h después de la inoculación, en medio control y con quitosano. Las muestras fueron fijadas por inmersión total en solución de glutaraldehído a 5% (v/v) durante 24 h a 4 °C, continuando con una post-fijación en solución de tetróxido de osmio a 1% (p/v) durante 2 h a 4 °C. A continuación las muestras fueron deshidratadas utilizando una serie de soluciones de acetona (30, 40, 50, 70, 80, 90 y 100%) y cubiertas con oro antes de su observación en el microscopio electrónico de barrido (SEM) (Jeol JSM-5410LV, Scanning microscope).

Determinación de la concentración media inhibitoria (CMI₅₀)

Esta determinación se hizo para retardar el crecimiento del hongo 50% en relación con el control y fue realizada en el crecimiento radial, mediante el análisis Probit utilizando el programa estadístico NCSS 2000 (NCSS Inc., USA) para obtener el valor CQ₅₀.

Germinación de esporas

Para esta medición, en placas Petri se inocularon 10 µl de una suspensión de esporas a una concentración de 1.4 x 10⁵ esporas/ml, la cual se dispersó con ayuda de una varilla de vidrio sobre una superficie delgada de medio de cultivo (PDA) combinada con la menor CMI₅₀ de quitosano obtenida en la evaluación anterior e incubadas a 27 °C. Después de 2 h de incubación fueron contadas 50 esporas (germinadas y no germinadas) utilizando un microscopio óptico (Olympus CX 31, Japón) con un objetivo 40X. Se consideró como espора germinada aquella cuya longitud del tubo germinativo alcanzaba el doble del diámetro total de la espора (Paul *et al.*, 1993).

Producción de biomasa

La producción de biomasa fue cuantificada como el peso seco de la colonia, realizando muestreos a 12, 24, 48 y 72 h en tubos de ensayos de 150 x 20 mm que contenían 10 ml de PDA líquido y ajustadas a la CMI₅₀ de quitosano de masa molecular media determinada para la cepa M-2. Los tubos de ensayos fueron colocados en incu-

badora giratoria a 120 r.p.m. a 27 °C. Una vez se tomaron las muestras fueron filtradas a vacío utilizando papel filtro Whatman. Finalmente, el papel filtro con el micelio fue secado en estufa a 105 °C durante 2 h y enfriado en el desecador, antes de registrar el peso. Cada tratamiento fue realizado por triplicado y el peso seco de la colonia fue expresado en miligramo (mg).

Resultados y discusión

Los porcentajes de inhibición del crecimiento micelial aparecen en las Tablas 1, 2 y 3. Se observa que la concentración 1000 mg/l en quitosanos de masas molecular media y alta no mostraron inhibición del crecimiento micelial. En el caso del quitosano de masa molecular baja a medida en la medida que el tiempo avanza, disminuye el porcentaje de inhibición hasta que alcanza el valor 0%, al igual que el tratamiento control. En contraste, en todas las evaluaciones en las concentraciones de 2000 y 3000 mg/l el porcentaje de inhibición aumentó con el tiempo para los tres quitosanos.

Tabla 1. Porcentaje de inhibición del quitosano de masa molecular baja sobre la cepa M-2 con respecto al control al 100% de crecimiento radial.

Tratamientos	Horas de medición						
	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	144 h	168 h
Control	0 e*	0 e	0 e	0 e	0 e	0 e	0 d
1000	26.7 b	21.8 c	19.1 d	15.3 d	5.6 d	3.2 d	0 d
2000	18.3 c	23.4 b	22.7 c	42.2 c	46.4 c	41.3 c	40.8 c
3000	11.1 d	17.6 d	38.9 b	49.4 b	58.0 b	61.7 b	63.0 b
4000	100 a	100 a	44.1 a	58.7 a	66.5 a	70.6 a	72.4 a
ESx	0.031	0.180	0.157	0.204	0.17	0.147	0.133

* Letras diferentes dentro de la misma columna indican diferencias significativas de acuerdo al test de Rango Múltiples de Tukey (P ≤ 0.05).

Tabla 2. Porcentaje de inhibición del quitosano de masa molecular media sobre la cepa M-2 con respecto al control al 100% de crecimiento radial.

Tratamientos	Horas de medición						
	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	144 h	168 h
Control	0 d*	0 d	0 d	0 d	0 d	0 d	0 d
1000	0 d	0 d	0 d	0 d	0 d	0 d	0 d
2000	4.1 c	17.8 c	31.6 c	47.3 c	55.6 c	59 c	60.2 c
3000	28.9 b	27.7 b	44.1 b	53.9 b	61.4 b	64.3 b	65.2 b
4000	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	94 a
ESx	0.034	0.048	0.143	0.153	0.151	0.126	0.092

* Letras diferentes dentro de la misma columna indican diferencias significativas de acuerdo al test de Rango Múltiples de Tukey (p ≤ 0.05)

Tabla 3. Porcentaje de inhibición del quitosano de masa molecular alta sobre la cepa M-2 con respecto al control al 100% de crecimiento radial.

Tratamientos	Horas de medición						
	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	144 h	168 h
Control	0 c*	0 c	0 d	0 d	0 d	0 d	0 d
1000	0 c	0 c	0 d	0 d	0 d	0 d	0 d
2000	0 c	0 c	18 c	19.0 c	20.3 c	21.3 c	22.6 c
3000	17.8 b	20.1 b	28.3 b	36.8 b	40.9 b	45.9 b	50 b
4000	100 a	100 a	95.2 a	90.3 a	87.5 a	78.1 a	74.7 a
ESx	0.039	0.106	0.112	0.113	0.142	0.129	0.094

* Letras diferentes dentro de la misma columna indican diferencias significativas de acuerdo al test de Rango Múltiples de Tukey (p ≤ 0.05)

En las primeras evaluaciones, la concentración de 4000 mg/l tanto el quitosano de masa molecular bajo como el de masa molecular alta alcanzaron 100% de inhibición del crecimiento micelial. A partir de las 72 h, el hongo comenzó a crecer y a reducir el porcentaje de inhibición. Para la misma concentración, pero en el quitosano de masa molecular media en la última evaluación a 168 h, el porcentaje de inhibición disminuyó hasta 94%; por tanto se evidenció un efecto fungistático de los tres quitosanos en las diferentes masas moleculares utilizadas. Quintana-Obregón *et al.* (2010) encontraron que un quitosano en la concentración de 4 g/l presentó la mayor inhibición del crecimiento radial de una cepa de *Fusarium verticillioides*. En la Figura 1 aparecen los resultados de porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de la cepa M-2 hasta 168 h.

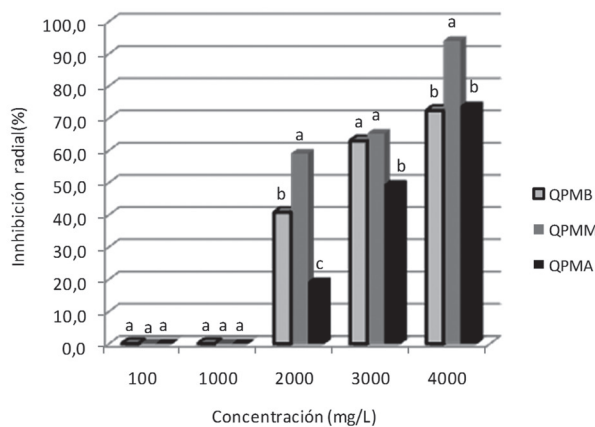


Figura 1. Efecto de la masa molecular de los quitosanos a las diferentes concentraciones sobre la inhibición del crecimiento radial del hongo M-2.

En general, se observó que a medida que se incrementa la concentración de quitosano aumenta el porcentaje de inhibición sobre el crecimiento radial del hongo, con respecto al tratamiento control. En ese sentido, Rivero, Cruz, Martínez, Rodríguez, y Ramírez (2008) obtuvieron similares resultados con un quitosano comercial (Sigma) sobre una cepa del mismo hongo (*B. oryzae*) pero obtenida del grano de arroz, donde la concentración más elevada (1000 mg/l) utilizada presentó el mayor porcentaje de inhibición del crecimiento. Bautista-Baños, Hernández-López, y Bozquez (2004) encontraron que la actividad antifúngica del quitosano depende de la masa molecular, del grado de desacetilación, de la concentración y del microorganismo con el que se trabaja.

El análisis de superficie de respuesta corroboró los resultados que aparecen en la Figura 1 anterior; en este análisis se consideraron los factores: concentración, tipo de quitosano y diámetro de la colonia. Se observa que el quitosano de masa molecular media presentó menor diámetro de la

colonia en la mayor concentración utilizada (4000 mg/l) (Figura 2). Plascencia-Jatomea, Viniegra, G., Olayo, R., Castillo-Ortega, M. M., y Shirai (2003) encontraron igualmente que el quitosano de masa molecular media en concentraciones de 3 y 5 g/l inhiben el crecimiento radial de *A. niger* en un 73%.

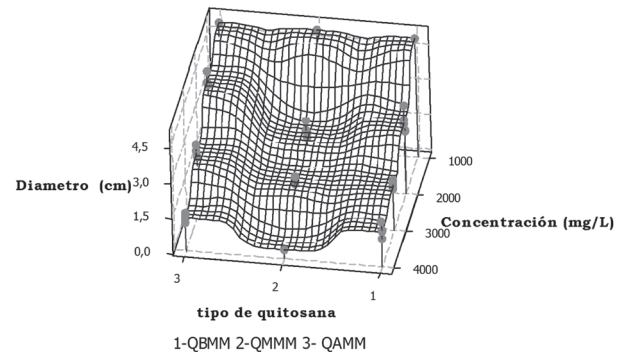


Figura 2. Superficie de respuesta que muestra el efecto del tipo de quitosano y la concentración sobre el crecimiento de la cepa M-2.

Diámetro de las hifas

En la Tabla 4 se observa que la presencia de quitosano en el medio de cultivo afectó el diámetro de las hifas ($P < 0.05$). El quitosano de masa molecular baja y la mayor concentración utilizada ocasionaron un hinchamiento de éstas, lo que puede ser debido a alteraciones de la pared celular, o bien, a cambios en la presión y en la tensión de la pared, lo cual origina el incremento del diámetro de la región subapical.

Tabla 4. Diámetro promedio de las hifas de la cepa M-2 inoculada en medio de cultivo sólido de papa-dextrosa-agar con diferentes concentraciones y tipos de quitosanos.

Tratamientos	Diámetro (μm)	Diámetro (μm)	Diámetro (μm)
	QMMB	QMMM	QMMA
Control	55.89 b*	55.89 b	55.89 a
1000	47.06 d	57.49 a	54.06 b
2000	36.42 e	49.11 d	49.81 c
3000	52.98 c	51.88 c	56.12 a
4000	90.15 a	40.98 e	34.14 d
ESx	2.088	1.825	1.662

* Letras diferentes dentro de la misma columna indican diferencias significativas de acuerdo al test de Rango Múltiples de Tukey ($p \leq 0.05$)

Microscopía electrónica de barrido (MEB)

Las micrografías electrónicas de *B. oryzae* durante la fase de crecimiento apical revelaron cambios ocasionados por el quitosano, caracterizados por una alta producción de esporas y daños en las hifas áreas (Figura 3b), sin embargo en el trata-

miento control (Figura 3a) hubo ausencia total de esporas. Esto es debido a que el hongo produce esporas ante la presencia de una sustancia extraña como respuesta defensiva.

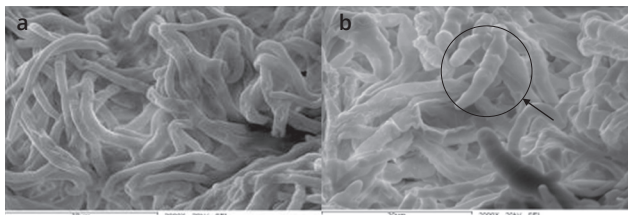


Figura 3. Micrografía de la cepa M-2 de *B. oryzae* durante el crecimiento apical, a 27 °C: (a) hifa en medio control y (b) hifas periféricas en contacto con medio y quitosano.

Se observaron distorsiones principalmente en las hifas periféricas del micelio. Resultados similares encontraron Sánchez-Domínguez *et al.* (2006) con el hongo *A. alternata* cuando fue tratado con un quitosano de masa molecular media; además, fue posible detectar que el hongo desarrolló hifas aéreas en presencia de quitosano, tendiendo a crecer lejos de la superficie de agar, lo que sugiere una respuesta estructural a estrés fisiológico debido a que la producción de hifas aéreas está involucrada con la etapa inicial de diferenciación y la producción de esporas.

Concentración media inhibitoria (CMI₅₀)

Mediante análisis Probit se calculó la CMI₅₀ para quitosanos de masa molecular baja, media y alta, a partir de los datos experimentales obtenidos 168 h después de la inoculación, cuando el control alcanzó el máximo de crecimiento en la placa Petri (Tabla 5)

Tabla 5. Concentración mínima inhibitoria de la cepa M-2 a las tres concentraciones evaluadas.

Cepa	Quitosano, masa molecular (mg/l)		
	Baja	Media	Alta
M-2	2594.2±46.9	2182.9±34.6	3010.3±48.3

El análisis de varianza muestra que el quitosano comercial más efectivo en el control del crecimiento radial del hongo fue el de masa molecular media a una concentración 2182.9 mg/l, cantidad con la cual se redujo un 50% el crecimiento de *B. oryzae* a 168 horas, en comparación con el control; mientras que para los quitosanos de masas molecular baja y alta, la CMI₅₀ fue de 2594.2 y 3010.3 mg/l, respectivamente, (Tabla 5).

Los valores de las concentraciones media inhibitoria (CMI₅₀) de quitosano en varios organismos fungosos (*Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*, *Fusarium verticillioides* *Ramolaria cercosporelloides*) se encuentran en el rango de

concentración desde 0.0018% hasta 1.0%, siendo afectado por factores como pH del medio y grado de polimerización del quitosano (Oliveira *et al.*, 2013, Quintana-Obregón *et al.*, 2010, Quintana-Obregón *et al.*, 2011).

Germinación de esporas

Los resultados muestran que el 50% de las esporas de la cepa *B. oryzae* no tratadas con quitosano germinaron 2 h después de iniciado el tratamiento y 100% después de 4 h. El 50% de las esporas tratadas con la CMI₅₀ de quitosano germinaron a 30 h y 100% en todos los tratamientos a 38 h (Figura 4).

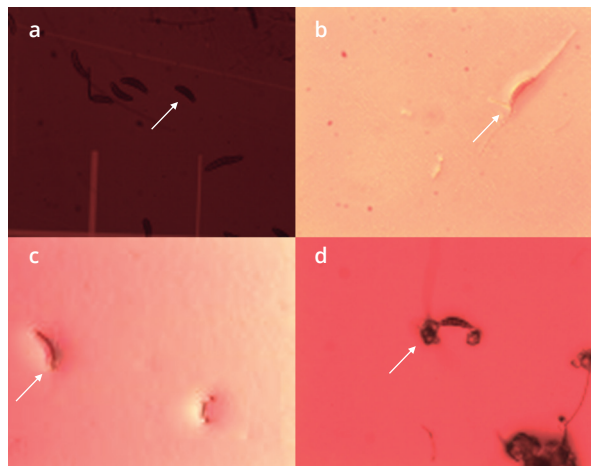


Figura 4. Esporas de la cepa M-2 de *B. oryzae*, tomadas en microscopio óptico 10x: (a) No germinadas, (b) Control germinada a las 4 h, (c) Germinadas y tratadas con quitosano a las 14h y (d) Germinadas y tratadas con quitosano a las 38 h.

Las esporas de *B. oryzae* en proceso de germinación que se encontraban en el medio de cultivo con quitosano a CMI₅₀ (Figura 4d) mostraron hinchamiento en el tubo germinativo lo que provocó un acortamiento de su longitud con respecto a lo que ocurre en el medio control (Figura 4a). El quitosano retardó la germinación de las esporas, lo que resultó en una alteración en el proceso natural de elongación de los túbulos germinales del hongo, siendo evidentes las anomalías morfológicas en su estructura relacionadas con el hinchamiento de las hifas (Figura 4d). El Ghaouth, Arul, y Asselin (1992) encontraron que el quitosano a concentraciones entre 750 y 6000 mg/l fue efectivo en la inhibición de la germinación de esporas y la elongación del tubo germinativo de *B. cinerea* y *R. stolonifer*. Además este biopolímero a concentraciones mayores que 1500 mg/l indujo cambios morfológicos en *R. stolonifer*.

Producción de biomasa

La producción de biomasa fue cuantificada como el peso seco de la colonia desarrollada en los tubos de ensayos en medio líquido (Tabla 6).

Tabla 6. Efecto de la CMI₅₀ de la QMMM sobre la producción de biomasa de la cepa M-2 inoculado en medio líquido, a 27 °C.

Tratamientos	Horas de medición				
	12	24	36	48	72
Control (mg)	5.06b*	9.43b	10.33b	12.83b	15.4b
CMI50 (mg)	11.53a	12.07a	17.17a	21.9a	48.47a
ESx	1.23	1.52	1.33	1.58	1.45

* Letras diferentes dentro de la misma columna indican diferencias significativas de acuerdo al test de Rango Múltiples de Tukey (p<0.05).

Los datos de peso seco del micelio demostraron que el hongo presentó una producción de biomasa significativamente mayor en presencia de quitosano, desde las 12 hasta las 72 h. Esto se debió a que el hongo produce esporas cuando entra en contacto con el quitosano y como respuesta defensiva aumenta el grosor de las paredes celulares. Estos resultados son contrarios a los obtenidos por autores como El Ghaouth *et al.* (1992) y Bautista-Baños, Hernández-López, y Bozquez (2004) cuando utilizaron quitosanos de diferentes masas moleculares y concentraciones con microorganismos como: *Rhizopus stolonifer* y *Botrytis cinerea*.

En este estudio se encontró que el quitosano produce alteraciones directas sobre el hongo *B. oryzae*. La concentración de 3000 mg/l produjo deformaciones en las hifas y en los tubos germinativos de las esporas del hongo.

Agradecimientos

Al Convenio de Cooperación Bilateral de la SEP (México)/MES (Cuba) por el apoyo financiero, al Centro de Desarrollo de Productos Bióticos (CEPROBI) perteneciente al Instituto Politécnico Nacional (IPN) y al Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos (DIPA) de la Universidad de Sonora. A la Dra. C. Marian Guadalupe Hernández y al Dr. C. Edwin Javier Barrios del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) de Zacatepec en el Estado de Morelos.

Referencias

Bautista-Baños, S., Hernández-López, M., y Bozquez, M. (2004). Growth inhibition of selected fungi by chitosan and plant extracts. *Rev. Mex. Fitopat.* 22, 178 - 186.

El Ghaouth, A., Arul, J. G., y Asselin, A. (1992). Antifungal activity of chitosan on two postharvest pathogens of strawberry fruits. *Phytop.* 82, 398 - 402.

Falcón, A., Rodríguez, A. T., Ramírez, M. A., Rivero, R., Cruz, A., y Martínez, B. (2010). Chitosan as bioactive macromolecules to protect economically relevant crops from the main pathogen. *Biotech. Apl.* 27, 305 - 309.

Hossain, I., Dey, P., y Hossain, M. Z. (2011). Efficacy of Bion, Amistar and Tilt in controlling brown spot and narrow brown spot of rice cv. BR11 (Mukta). *J. Bangladesh Agric. Univ.* 9(2), 201 - 204.

Ibrahim, E., y Abo El-Dahab, M. S. (2014). Seed discoloration and their effect on seedlings growth of egyptian hybrid rice. *Res. J. Seed Sci.* 7, 63 - 74

Laralde, C. C., López, I. F., y Viniegra, G. G. (1997). Morphometric evaluation of the specific growth rate of *Aspergillus niger* grown in agar plates at high glucose levels. *Biotech. Bioeng.* 56(3), 287 - 294.

Li, B., Liu, B., Shan, C., Ibrahim, M., Lou, Y., y Wang, Y. (2013). Antibacterial activity of two chitosan solutions and their effect on rice bacterial leaf blight and leaf streak. *Pest Manag. Sci.* 69, 312 - 320.

Oliveira Pedro, R., Takaki, M., Castilho Gorayed, T.C., Luiz Del Bianchi, V., Cláudio Thomeo, J., José Tiera, M., y Oliveira Tiera, V. (2013). Synthesis, characterization and antifungal activity of quaternary derivatives of chitosan on *Aspergillus flavus*. *Microb. Res.* 168 (1),50 - 55.

Paul, G.C., Kent, C. A., y Thomas, C. R. (1993). Viability testing and characterization of germination of fungal spores by automatic image analysis. *Biotech. Bioeng.* 42,11 - 23.

Plascencia-Jatomea, M., Viniegra, G., Olayo, R., Castillo-Ortega, M. M., y Shirai, K. (2003). Effect of chitosan and temperatura on spore germination of *Aspergillus niger*. *Macromol. Biosci.* 3(10),582 - 586.

Quintana-Obregón, E., Plascencia-Jatomea, M., Sánchez-Mariñez, R., Rosas-Burgos, E.C., y Cortez-Rocha, M. (2010). Inhibición del crecimiento radial in vitro de la *Fusarium verticillioides* en presencia de quitosano. *Rev. Iberoam. Pol.* 11(6), 386 - 391.

Quintana-Obregón, E., Plascencia-Jatomea, M., Sánchez-Mariñez, R. I., Burgos-Hernández, A., González-Aguilar, G. A., Lizardi-Mendoza, J., y Cortez-Rocha, M. O. (2011). Effects of middle-viscosity chitosan on *Ramolaria cercosporoides*. *Crop Prot.* 30 (11), 88 - 90.

Rivero, D., Cruz, A., Martínez, B., Rodríguez, A. T., y Ramirez, M. A. (2008). Actividad antifúngica in vitro de las quitosanas K1 y Sigma frente a *B. oryzae* (B. de Haan) Shoem. *Rev. Prot. Veg.* 23(1), 43 - 47.

Rivero, D., Cruz, A., Rodríguez, A. T., Echevarría, A. y Martínez, B. (2012). Hongos asociados al manchado del grano en la variedad de arroz INCA LP-5 (*Oryza sativa* L) en Cuba. *Rev. Soci. Ven. Microb.* 32(2), 131 - 138.

Sánchez-Domínguez D., Ríos, M. Y., Castillo-Ocampo, P., Zavala-Padilla, G., Ramos-García, M., and Bautista-Baños, S. (2011). Cytological and biochemical changes induced by chitosan in the pathosystem *Alternaria alternata*-tomato. *Pest. Bioch. Phys.* 99, 250 - 255.

Sánchez-Domínguez, D., Bautista-Baños, S., y Castillo-Ocampo, P. (2006). Efecto del quitosano en el desarrollo y morfología de *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl. *An. Biol.* (28), 23 - 33.