

VALORACIÓN DE LA EFICACIA DE QUITOOLIGOSACÁRIDO PROVENIENTE DE RECURSOS DEL MAR ARGENTINO PARA EL CONTROL DE *FUSARIUM EUMARTII*

ASSESSMENT OF THE EFFECTIVENESS OF CHITTOOLIGOSACCHARIDE FROM THE ARGENTINE SEA RESOURCES TO CONTROL *FUSARIUM EUMARTII*

Andrea Yamila Mansilla (Universidad Nacional de Mar del Plata Instituto de Investigaciones Biológicas UE CONICET), **Julieta Renée Mendieta** (Universidad Nacional de Mar del Plata Instituto de Investigaciones Biológicas UE CONICET), **Claudia Virginia Tonón** (Universidad Nacional de Mar del Plata Instituto de Investigaciones Biológicas UE CONICET), **Liliana Albertengo** (Universidad Nacional del Sur UE INQUISUR CONICET), **María Susana Rodríguez** (Universidad Nacional del Sur UE INQUISUR CONICET) y **Claudia Anahí Casalongué** (Universidad Nacional de Mar del Plata Instituto de Investigaciones Biológicas UE CONICET) - Argentina

Resumen

El presente trabajo de investigación se refiere al estudio de la acción biológica del quitooligosacárido como fitosanitario de origen natural. Se analizó la acción protectora del oligómero en plántulas de tomate (*Solanum lycopersicum cultivar Platense*) inoculadas con el hongo patógeno *Fusarium solani f sp eumartii* (*F. eumartii*). Como modelo experimental se seleccionó un genotipo de tomate de interés hortícola en la provincia de Buenos Aires y un aislamiento fúngico de la misma región.

Nuestros resultados demostraron que las plántulas de tomate pretratadas con quitooligosacárido fueron protegidas contra la infección por *F. eumartii* y registraron una disminución significativa en el área de la lesión fúngica detectada en los cotiledones. Además, se demostraron propiedades antimicrobianas del quitooligosacárido a través de la reducción del crecimiento micelial de *F. eumartii* y la germinación de esporas. La pérdida de viabilidad de las esporas ejercida por la acción del quitooligosacárido reveló su efecto fungicida. Asimismo, se comprobó el efecto del quitooligosacárido como inductor de la respuesta de defensa en las plantas de tomate. En las plantas tratadas con quitooligosacárido 0,025 % (*m/v*) durante 6 horas, se midió un aumento de aproximadamente 40 % en la abundancia de quitinasa, proteína marcadora de la respuesta de defensa inducida contra estrés fúngico.

Finalmente, proponemos que el quitooligosacárido representa un compuesto natural que reúne actividades biológicas promisorias para su aplicación como agente antimicrobiano natural en el campo hortícola.

Palabras clave: Biopesticida, *Fusarium solani f sp. eumartii*, quitooligosacárido, tomate.

Abstract

Our specific aim was to study the properties of chitooligosaccharide as a natural agent. The protective action of chitooligosaccharide against the pathogenic fungus *Fusarium solani f sp eumartii* (*F. eumartii*) in seedlings of tomato (*Solanum lycopersicum cultivar Platense*) was analyzed. We selected a tomato genotype of horticultural interest in the Province of Buenos Aires and a fungal isolated from the same region. Our results showed that tomato seedlings pretreated with chitooligosaccharide were protected against infection by *F. eumartii*, resulting in a significant decrease in the area of the fungal lesion detected in cotyledons. Moreover, antimicrobial properties by the chitooligosaccharide were demonstrated through a reduction of the mycelial growth and spore germination. The loss of spore viability exerted by the action of chitooligosaccharide revealed its fungicidal effect. Furthermore, the effect of the chitooligosaccharide as elicitor of the plant defense response was also proved. When plants were treated with 0.025% (*m/v*) chitooligosaccharide during 6 hours, an increase of about 40% in the abundance of chitinase as a defense marker protein was measured. Finally, we propose that the chitooligosaccharide represents a natural compound that brings promising biological activities for its use as a natural antimicrobial agent in the horticultural field.

Keywords: Biopesticide, *Fusarium solani f sp. eumartii*, chitooligosaccharide, tomato.

Introducción

Fusarium solani f sp *eumartii* (*F. eumartii*) es un hongo patógeno de diferentes especies de solanáceas, particularmente papa y tomate (Romberg y Davis, 2007). Los síntomas de la fusariosis, causada por *F. eumartii*, son marchitamiento y puntillado cobrizo internerval en hojas, y, en el caso de los tubérculos de papa, este hongo produce el típico síntoma de podredumbre seca o *dry rot*. Dicha enfermedad es prácticamente universal y está presente en casi todos los tipos de suelos productivos. *F. eumartii* es endémico en diversas zonas productoras hortícolas de la Argentina, particularmente en el sudeste bonaerense. El hongo permanece en el suelo por largos períodos y se hace infectivo en zonas cálidas y húmedas. En el caso de los cultivos de hortalizas bajo cubierta, debido a las cambiantes condiciones ambientales, las enfermedades fúngicas aumentan considerablemente (Besoain, 1989). Entre el grupo de las hortalizas, el tomate (*Lycopersicon esculentum*) ocupa un lugar importante por el aporte de vitaminas, ácidos orgánicos y sales minerales para la salud humana. Desde el punto de vista fitosanitario, se han descripto alrededor de doscientas enfermedades que afectan el cultivo, cuyas etiologías son muy diversas. Si bien el hongo *F. eumartii* ha sido considerado históricamente un patógeno de papa, también se ha encontrado en plantas de tomate (Romberg *et al.*, 2007). Hasta la actualidad, el control de la fusariosis tanto en papa como en tomate ha sido abordado, fundamentalmente, por métodos químicos, la siembra de semillas sanas o a través de la selección de genotipos tolerantes (Guevara Black y Coello, 2008; Mantecón, 2015). Recientemente, el desarrollo de nuevos biopesticidas como productos agronómicos de bajo impacto ambiental, representó un valioso campo de estudio para contribuir a modelos productivos de mayor sustentabilidad ambiental.

La quitina es un polímero cuyo monómero principal es la N-acetilglucosamina y se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza. La quitina está presente en diversos grupos biológicos, crustáceos, insectos y hongos. En general, desde el punto de vista industrial, se extrae de exoesqueletos de crustáceos. Su derivado principal es el quitosano que representa una mezcla de polisacáridos que difieren fundamentalmente en su grado de polimerización, grado de desacetilación

y patrones de acetilación. Las diferentes fuentes biológicas y los métodos de extracción influyen en las características físicoquímicas de dichos polímeros (Younesy Rinaudo, 2015). Las propiedades biológicas del quitosano dependen de varios factores como el peso molecular, grado de desacetilación, solubilidad, densidad de cargas positivas, modificaciones químicas, pH, concentración, capacidad quelante, y tipo de microorganismo. El quitosano es de baja solubilidad en agua y, por lo tanto, se utiliza disuelto en soluciones débilmente ácidas (Badawy y Rabea, 2011). En general, la solubilidad aumenta con una disminución en la masa molecular. Se han realizado muchos intentos para mejorar su solubilidad en agua, debido a que la mayoría de las aplicaciones biológicas requieren que el material sea procesable y funcional a pH neutro. En consecuencia, la obtención de un derivado de quitosano soluble en agua es un paso importante hacia una mayor aplicación como material biofuncional (Badawy y Rabea, 2011).

Objetivos

El objetivo del presente trabajo es la puesta en valor de un quitosano de baja masa molecular o quitoooligosacárido biodegradable, altamente soluble en agua y aislado a partir de desechos pesqueros de origen nacional, para su aplicación en horticultura.

Materiales y métodos

Obtención y caracterización del quitoooligosacárido

El quitoooligosacárido altamente soluble en medio acuoso utilizado en el presente estudio se aisló a partir de exoesqueletos de camarones (*Pleoticus Mülleri*) provenientes del Mar Argentino. El quitosano se obtuvo por desacetilación heterogénea de la quitina con NaOH 19 M, tal como describen Rodríguez *et al.* (2008). Seguidamente, se obtuvo el quitoooligosacárido por degradación oxidativa del quitosano con H₂O₂ 12,5 % (v/v) bajo irradiación de microondas (700 W) durante cuatro minutos. La masa molecular del quitoooligosacárido es de aproximadamente 2.780 Da, determinada por viscosimetría y estimada según la ecuación Mark-

Houwink-Kuhn-Sakurada (Wagner, 1985). La muestra final contuvo 13,3 % (*m/v*) de humedad y 2,60 % (*m/v*) de ceniza.

Actividad antimicrobiana del quitooligosacárido

El hongo *Fusarium solani* f sp. *eumartii* aislamiento 3122 se obtuvo a partir de la colección disponible en el laboratorio de Fitopatología Unidad Integrada Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Mar del Plata, INTA, Argentina y ha sido mantenido en nuestro laboratorio (Olivieri *et al*, 2002).

Se analizó el efecto del quitooligosacárido sobre la capacidad de germinación de las esporas de *F. eumartii*. Para ello, se incubaron 5 µl de una suspensión de 2x10⁴ esporas/ml con diferentes concentraciones de quitooligosacárido en agua (desde 0,01 a 0,05 % *m/v*) y se cuantificó la inhibición de su germinación bajo cámara de Neubauer y microscopio óptico (Nikon Eclipse E2100). También se evaluó la acción del quitooligosacárido sobre el crecimiento radial de *F. eumartii*. Para dicho fin se colocaron discos de agar con micelio del patógeno y sin este, y se colocaron en el centro de placas de Petri con el medio de cultivo agar papa glucosado (PDA) suplementado o no con quitooligosacárido 0,025 % (*m/v*) o 5 % (*m/v*). Las placas de cultivo se mantuvieron a 25 °C en oscuridad y luego de siete días se cuantificó el crecimiento radial de *F. eumartii* a partir de fotos digitalizadas y el programa informático ImageJ (NIH, Maryland, EE. UU.).

Análisis de viabilidad celular de las esporas fúngicas

La viabilidad celular se evaluó mediante la sonda fluorescente de yoduro de propidio, la cual actúa coloreando las células muertas. Sintéticamente, la membrana de las células vivas posee una membrana semipermeable pero se pierde en las células muertas. Por lo tanto, la sonda fluorescente ingresa fácilmente a las células muertas y se intercala entre las bases del DNA y del RNA en una relación de una molécula de colorante cada cuatro o cinco pares de bases, tiñendo los núcleos de las células muertas. Las esporas de *F. eumartii* se trataron con quitooligosacárido 0,025 % (*m/v*) duran-

te cuatro horas en oscuridad y luego se incubaron con yoduro de propidio 120 µM durante veinte minutos. Finalmente, las esporas se observaron bajo microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse E200 equipado con un set de filtros G-2E/C, un filtro de excitación en 540/25 nm, un filtro supresor en 630/60 nm y espejo dicróico en 565 nm.

Bioensayos *in planta*

Las semillas de tomate (*Solanum lycopersicum* cultivar Platense) estériles se sembraron en cajas de Petri con medio Murashige y Skoog (MS-agar) bajo flujo laminar. Se hicieron germinar a 25 °C, con un fotoperíodo de dieciséis horas de luz y ocho horas de oscuridad (120 µmol fotones m⁻² s⁻¹) y humedad controlada. Las plántulas de cuatro días de edad se colocaron en placas MS-Agar suplementadas con quitooligosacárido 0,025 % (*m/v*) y luego de cuatro días se infectaron con una suspensión de 1 x 10⁷ esporas de *F. eumartii* tal como describe Terrile *et al.* (2015). Luego de cinco días, se observaron y cuantificaron los síntomas de infección y se estimó el porcentaje de área de lesión fúngica en función del área total de los cotiledones. Para ello, se tomaron fotos digitalizadas y el área de lesión se cuantificó con el programa ImageJ (NIH, Maryland, EE. UU.).

Cuantificación del inóculo fúngico remanente en los tejidos vegetales

El inóculo fúngico remanente en los cotiledones se cuantificó según describen Terrile *et al.* (2015). Dicho parámetro permitió estimar la cantidad de hongo presente en los tejidos vegetales tratados o no con quitooligosacárido.

Análisis electroforético en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Se obtuvieron extractos proteicos a partir de cotiledones de tomate tratados con quitooligosacárido

0,025 % (*m/v*) o agua como control durante seis o veinticuatro horas. Para ello, los cotiledones se

pesaron y se pulverizaron en N₂ líquido. Las proteínas solubles se extrajeron con 1,5 volúmenes de buffer acetato de sodio 50 mM, pH 5,2, con NaCl 0,5 M y β-mercaptoetanol 0,1 % (m/v). La electroforesis desnaturante en geles de poliacrilamida 12 % SDS-PAGE se realizó según Laemmli (1970), empleando el sistema de geles verticales Miniprotean II (BioRad, USA).

Ensayos inmunoquímicos

Las proteínas previamente separadas mediante SDS-PAGE se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (BioRad, USA), para ello se empleó un equipo de transferencia (BioRad, USA). La inmunodetección se realizó tal como describe Turner (1986), utilizando como anticuerpo primario el anticuerpo policlonal anti-quitina (Kombrink *et al.*, 1988). Las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario conjugado a la enzima fosfatasa alcalina (Sigma-Aldrich, USA) y se revelaron con los sustratos NBT (azul de tetrazolio) y BCIP (5-Bromo-4-Cloro-3-indolil fosfato), según indicaciones del proveedor (Sigma- Aldrich, USA).

Análisis estadístico

El análisis estadístico entre tratamientos para cada una de las variables analizadas, se realizó mediante un análisis de varianza o ANOVA de una vía. Los promedios se compararon utilizando el test de Tukey, con un p<0.001.

Resultados

Con el fin de evaluar la dosis óptima del quitooligosacárido se realizó una curva dosis respuesta en plántulas de tomate empleando quitooligosacárido en agua (0 a 5 % m/v). Para ello, las plántulas de tomate se trataron con las diferentes concentraciones del oligómero durante cuatro días y se inocularon o no con una suspensión de 1 x 10⁷ esporas/ml. Luego de cinco días, se analizó el grado de injuria o daño fúngico presente en los cotiledones de tomate y se cuantificó como porcentaje de área afectada en función al área total.

Se observó que la concentración de quitooligosacárido 0,025 % (m/v) redujo considerablemente los síntomas de infección producidos por *F. eumartii*. Se comprobó que dosis más altas producían acortamiento de raíces y efectos negativos en el crecimiento de las plántulas.

En la Figura 1, se observa un ensayo representativo de plántulas pretratadas con quitooligosacárido 0,025 % (m/v) inoculadas (panel inferior) o no (panel superior) con *F. eumartii*. La cuantificación del área de lesión indicó que el tratamiento con el quitooligosacárido redujo significativamente el daño fúngico en los cotiledones de tomate (Figura 1B). Con el objetivo de evaluar si el tratamiento con quitooligosacárido ejercía un efecto reductor sobre el inóculo fúngico remanente en los tejidos vegetales, se cuantificó el valor de unidades formadoras de colonia o UFC. Para ello, se extrajeron discos de tejido proveniente de cotiledones tratados con agua u quitooligosacárido y se colocaron en medio de cultivo fresco PDA para facilitar el crecimiento del hongo. Luego de dos días se cuantificó el valor de UFC y se observó que el inóculo fúngico remanente fue significativamente menor en los cotiledones pretratados con el oligómero respecto de los controles (Figura 1C).

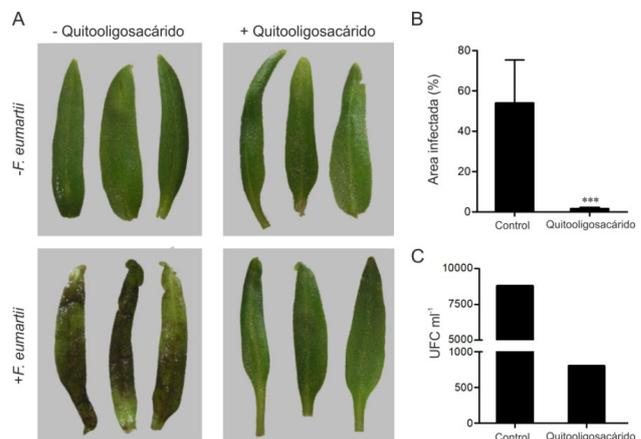


Figura 1: El quitooligosacárido contrarresta el daño fúngico producido por *F. eumartii* en plántulas de tomate. (A) Fenotipo de la enfermedad en plántulas pretratadas con quitooligosacárido 0,025 % (m/v) y luego infectadas con 1 x 10⁷ esporas del patógeno. (B) Cuantificación del área de la lesión fúngica. Los valores se expresaron como porcentaje del área total del cotiledón. Los asteriscos indican diferencias significativas (Test de Tukey, p<0.001). (C) Cuantificación del inóculo de *F. eumartii* remanente en los cotiledones luego de cinco días de inoculación.

Con la intención de validar las propiedades antimicrobianas o antifúngicas del quitooligosacárido se analizó su efecto *in vitro* sobre el crecimiento radial del hongo. El oligómero se agregó al medio de cultivo del hongo y luego de siete días se cuantificó el crecimiento radial (Figura 2).

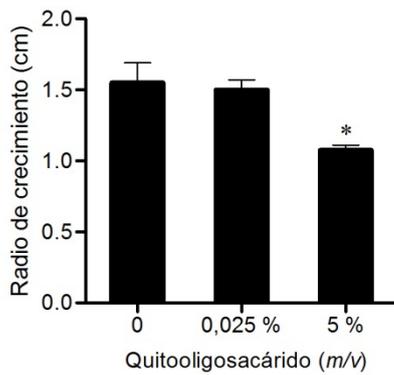


Figura 2: Acción antimicrobiana del quitooligosacárido en el crecimiento radial de *F. eumartii*. Se midió el crecimiento radial luego de siete días de cultivo en medios sólidos enriquecidos con diferentes concentraciones de quitooligosacárido

La adición de quitooligosacárido 5 % (*m/v*) al medio PDA redujo un 30 % el crecimiento radial del hongo. Dicha evidencia permitió extender el análisis sobre la acción del quitooligosacárido en la germinación de esporas del hongo (Figura 3). Cuando las esporas se trataron con diferentes dosis del oligómero 0,01 %; 0,02 % y 0,05 % (*m/v*) se observó una correlación negativa con el porcentaje de germinación de esporas, y se relevaron sus propiedades antimicrobianas. Luego se analizó si la acción antimicrobiana se manifestaba definitivamente como pérdida de viabilidad. Para ello, las esporas se trataron con quitooligosacárido 0,025 % (*m/v*) o agua durante cuatro horas y luego se incubaron con la sonda fluorescente de yoduro de propidio. En la Figura 4, se observa que las esporas pretratadas con quitooligosacárido poseen un color rojo intenso propio de la fluorescencia emitida por dicha sonda, mientras que no se observó tal fluorescencia en las esporas controles.

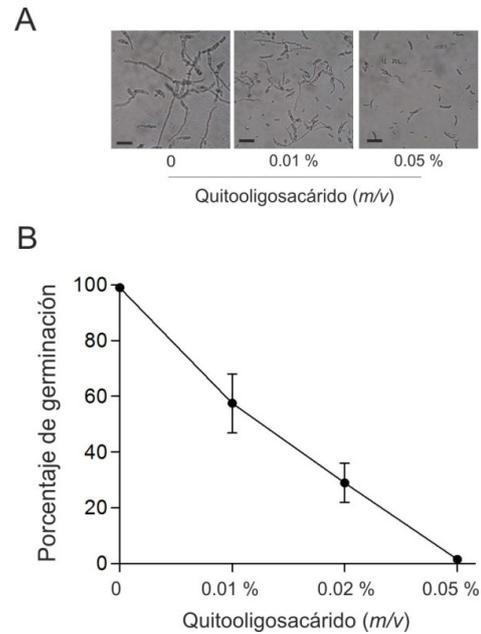


Figura 3: Efecto inhibitorio del quitooligosacárido sobre la germinación de esporas de *F. eumartii*. Las esporas del patógeno se incubaron con distintas concentraciones de quitooligosacárido a 25 °C en oscuridad y 100 % de humedad relativa. (A) Fotografías en el microscopio óptico luego de dieciséis horas de tratamiento. Barras: 25 µm. (B) Cuantificación del número de esporas germinadas. 100 % representa el número de esporas germinadas en presencia de agua.

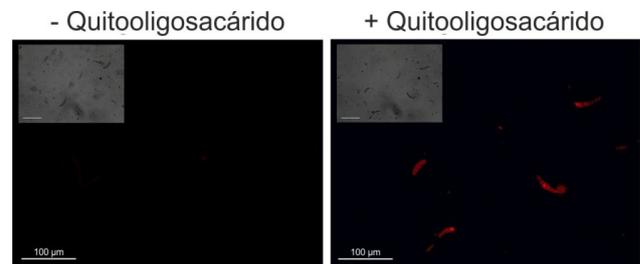


Figura 4: El quitooligosacárido inhibe la viabilidad de esporas de *F. eumartii*. Las suspensiones de esporas se incubaron con quitooligosacárido 0,025 % (*m/v*) o agua (- quitooligosacárido) durante cuatro horas y se incubaron con yoduro de propidio. Las fotografías se obtuvieron bajo microscopio de fluorescencia. Las imágenes insertas en cada uno de los paneles se obtuvieron bajo microscopio de campo claro con contraste de fases.

Con el fin de evaluar la acción inductora del quitooligosacárido sobre la respuesta de defensa, se analizaron los niveles de quitinasas como proteínas marcadoras. Para ello, se cosecharon cotiledones de plántulas tratadas con quitooligosacárido 0,025 % (*m/v*) y con agua y los niveles de quitinasas se detectaron inmunológicamente (Figura 5). Se observó un aumento del 40 % en los niveles de quitinasa en las plántulas de tomate tratadas durante seis horas con quitooligosacárido,

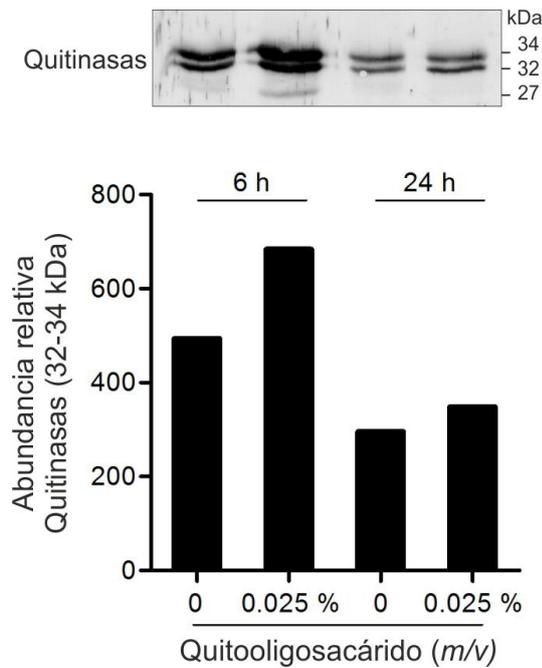


Figura 5: Análisis inmunoquímico de proteínas marcadoras de la respuesta de defensa. Los extractos proteicos se obtuvieron a partir de hojas de plantas de tomate tratadas durante seis o veinticuatro horas con quitooligosacárido 0,025 % (m/v) y agua como control. Las proteínas se analizaron por PAGE-SDS y transfirieron a una membrana de nitrocelulosa para su detección con el anticuerpo anti quitinasa. En el histograma, se expresa la abundancia relativa de las isoformas de quitinasas de 32 y 34 kDa mostradas en el panel superior.

Discusión y conclusiones

El quitooligosacárido estudiado en este trabajo actúa como *elicitor* o inductor de las respuestas de defensa en las plantas de tomate y, a su vez, ejerce un efecto antimicrobiano sobre el hongo fitopatógeno *F. eumartii*. A favor de nuestras evidencias se ha demostrado que en las plantas de palmeras pretratadas con quitosano e infectadas con *F. oxysporum* f. sp. *albedinis* se activan los mecanismos de defensa, además de ejercer toxicidad directa sobre el patógeno (El Hassni *et al.*, 2004). La acción inductora de defensa por parte del quitooligosacárido se evidenció por la inducción en los niveles de quitinasa y el control de la colonización fúngica por parte de la planta. En plantas de tomate tratadas con quitosano se demostró una protección parcial contra el hongo *Alternaria solani*, que se correlacionó con el aumento de la actividad enzimática de la glucanasa (Ge y Li, 1996). Las glucanasas y quitinasas han sido descritas como enzimas hidrolíticas fuertemente asociadas con los mecanismos de defensa de las plantas contra

estrés biótico (Ceasar y Ignacimuthu, 2012). Los quitosanos y sus derivados actúan como potenciadores del crecimiento en plantas, aumentando las respuestas de defensa, ya sea de manera localizada en el área de infección o de manera sistémica. Estas respuestas incluyen eventos de señalización temprana así como también la acumulación de metabolitos y proteínas relacionadas con la defensa (Burketová *et al.*, 2015). Se ha demostrado que diferentes quitosanos inhiben el crecimiento micelial de *F. oxysporum*, *Botrytis cinerea*, *Monilina laxa*, *Alternaria alternata* y *Pythium aphanidermatum* además de inhibir la germinación de las estructuras reproductivas de algunos de ellos (El Hassni *et al.*, 2004; Benhamou, 1992; El Ghaouth *et al.*, 1994; Romanazzi *et al.*, 2002; Ait Barka *et al.*, 2004). El efecto fungicida del quitooligosacárido sobre la germinación de las esporas de *F. eumartii* fue fuertemente revelado por su citotoxicidad celular o inhibición de la viabilidad celular. También se demostró que las hifas y esporas de *F. eumartii* tienen una sensibilidad diferencial hacia el quitooligosacárido. Ensayos realizados con un quitosano de baja solubilidad en agua y de mayor peso molecular (70 kDa) indicaron que las esporas de *F. eumartii* fueron más sensibles que las hifas frente al tratamiento con quitosano (Terrile *et al.*, 2015). Similarmente, las hifas y esporas de *F. oxysporum* y *Neurospora crassa* mostraron diferente sensibilidad al tratamiento con quitosano (Palma-Guerrero *et al.*, 2009).

Considerando también que las acciones biológicas de los quitosanos varían según sus diferentes propiedades físicoquímicas así como también de las fuentes biológicas y métodos de obtención que se utilizan (Youns y Rinaudo, 2015), se recomienda aplicar quitosanos finamente caracterizados. Asimismo, se deberá priorizar la optimización de sus dosis y formas de aplicación y los momentos de aplicación a lo largo de las etapas fenológicas del cultivo. Finalmente, interpretamos que nuestros resultados son altamente promisorios y permiten valorar el quitooligosacárido como un fitosanitario fácilmente manejable y con alto potencial de aplicación en horticultura.

Agradecimientos

Los autores agradecen el financiamiento recibido a través del CONICET, CIC, Universidad Nacional de Mar del Plata, Universidad Nacional del Sur, Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica, MINCyT y Senasa.

Bibliografía

- Ait Barka, E.; Eullaffroy, P.; Clément, C. y G. Vernet (2004), "Chitosan improves development, and protects *Vitis vinifera* L. against *Botrytis cinerea*", *Plant Cell Rep* n.º 22, pp. 608-614.
- Badawy, M. E. I. y E. I. Rabea (2011), "A Biopolymer Chitosan and Its Derivatives as Promising Antimicrobial Agents against Plant Pathogens and Their Applications in Crop Protection", *Int J Carbohydr Chem* [en línea]. Disponible en: <www.hindawi.com/journals/ijcc/2011/460381>.
- Benhamou, N. (1992), "Ultrastructural detection of β -1,3-glucans in tobacco root tissues infected by *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* using a gold-complexed tobacco β -1,3-glucanase", *Physiol Mol Plant Pathol* 41, pp. 351-357.
- Besoain, X. (1989), *Manejo de enfermedades bajo plástico. Uso de plástico en cultivos forzados de hortalizas y flores*, Chile, Universidad Católica de Valparaíso.
- Burketová, L.; Trdá, L.; Ott, P.G. y O. Valentová (2015), "Bio-based resistance inducers for sustainable plant protection against pathogens", *Biotechnology Advances* [en línea]. Disponible en: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.01.004>>.
- Cesar, S. A. y S. Ignacimuthu (2012), "Genetic engineering of crop plants for fungal resistance: role of antifungal genes", *Biotechnol Lett* 34, pp. 995-1002.
- El Hassni, M.; El Hadrami, A.; Daayf, F.; Chérif, M.; Ait Barka, E. e I. El Hadrami (2004), "Chitosan, antifungal product against *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* and elicitor of defence reactions in date palm roots", *Phytopathol Mediterr* 43, pp. 195-204.
- El Ghaouth, A.; Arul, J.; Wilson, C. y N. Benhamou (1994), "Ultrastructural and cytochemical aspects of the effect of chitosan on decay of bell pepper fruit", *Physiol Mol Plant Pathol* 44, pp. 417-432.
- Ge, Y. y D. A. Li (1996), "A molecular study on tomato induced resistance to *Alternaria solani*", *8th International Congress of Molecular Plant-Microbe Interaction*, Knoxville, TN, USA.
- Guevara Black, T. F. y N. M. Estrella Coello (2008), "Determinación y caracterización de enfermedades bacterianas del tomate riñón (*Lycopersicon sculentum*), cultivado bajo invernadero en doce áreas de la cordillera central del Ecuador", Ecuador, Facultad de Ingeniería de Ciencias Agropecuarias. ESPE-IASA Sangolquí.
- Kombrink, E.; Schroder, M. y K. Hahlbrock (1988), "Several pathogenesis-related proteins in potato are 1,3-beta-glucanases and chitinases", *Proc Natl Acad Sci USA* 85 (3), pp. 782-786.
- Laemmli, U. K. (1970), "Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4", *Nature* 227 (5259), pp. 680-685.
- Mantecón, J. D. (2015), "Fungicidas aplicados al suelo como estrategia de manejo integrado de enfermedades en papa, bajo escenarios de elevada infestación inicial y residual", *Revista Latinoamericana de la Papa* 19 (1), pp. 29-39.
- Olivieri F. P.; Zanetti, M. E.; Oliva, C. R.; Covarrubias, A. A. y C. A. Casalongué (2002), "Characterization of an extracellular serine protease of *Fusarium eumartii* and its action on pathogenesis related proteins", *Eur J of Plant Pathol* 108, pp. 63-72.

- Palma-Guerrero, J.; Huang, I. C.; Jansson, H. B. Salinas, J.; Lopez-Llorca, L. V. y N. D. Read (2009), "Chitosan permeabilizes the plasma membrane and kills cells of *Neurospora crassa* in an energy dependent manner", *Fungal Genet Biol* 46, pp. 585-594.
- Rodríguez, M. S.; Montero, M.; Staffolo, M.D.; Martino, M.; Bevilacqua, A. y L. Albertengo (2008), "Chitosan influence on glucose and calcium availability from yogurt: *In vitro* comparative study with plants fibre", *Carbohydr Polym* 74 (4), pp. 797-801.
- Romanazzi, G.; Nigro, F.; Ippolito, A.; Di Venere, D. y M. Salerno (2002), "Effects of pre-and postharvest chitosan treatments to control storage grey mold of table grapes", *J Food Sci* 67, pp. 1862-1867.
- Romberg, M. K. y R. M. Davis (2007), "Host Range and Phylogeny of *Fusarium solani* f. sp. *eumartii* from Potato and Tomato in California", *Plant Disease* 91 (5), pp. 585-592.
- Terrile, M. C.; Mansilla, A. Y.; Albertengo, L.; Rodriguez, M. S. y C. A. Casalongue (2015), "Nitric-oxide-mediated cell death is triggered by chitosan in *Fusarium eumartii* spores", *Pest Manag Sci* 71 (5), pp. 668-674.
- Turner, B. M. (1986), "Use of alkaline phosphatase-conjugated antibodies for detection of protein antigens on nitrocellulose filters", *Methods Enzymol* 121, pp. 848-855.
- Wagner, H. L. (1985), "The Mark-Houwink-Sakurada equation for the viscosity of atactic polystyrene", *J Phys Chem Ref Data* 14 (4), pp. 1101-1106.
- Younes, I. y M. Rinaudo (2015), "Chitin and chitosan preparation from marine sources. Structure, properties and applications", *Mar Drugs* 13 (3), pp. 1133-1174.