

Análisis de la actividad de las enzimas catalasa y superóxido dismutasa en respuesta al tratamiento antifúngico con oligoquitosano en el hongo *Ustilago maydis*

Analysis of catalase and superoxide dismutase enzymes activity in response to antifungal treatment with oligochitosan in the fungus *Ustilago maydis*

Olicón-Hernández Dario Rafael, Pineda Rojas Omar, Guerra-Sánchez Guadalupe

Instituto Politécnico Nacional. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Departamento de microbiología. Carpio y plan de Ayala s/n Col. Sato Tomás. Alcaldía Miguel Hidalgo. CP 11340, Ciudad de México, México.

Autor de correspondencia: mguerras@ipn.mx

RESUMEN

El oligoquitosano es un derivado de bajo peso molecular del quitosano constituido por unidades de glucosamina y n-acetil glucosamina intercaladas y unidas por enlaces β (1,4) que presenta interesantes aplicaciones biotecnológicas. Como antifúngico, el oligoquitosano inhibe el crecimiento de hongos fitopatógenos y se ha propuesto que su mecanismo de acción está asociado a su internalización en las células que podría generar desorden a nivel endomembranal. En *Ustilago maydis*, un basidiomiceto que ha cobrado auge como modelo bioquímico y de biología molecular de fitopatógenos, se ha encontrado que el oligoquitosano es capaz de triplicar la respiración de las células, sugiriendo afectaciones a nivel mitocondrial. Este aumento en la respiración también puede estar asociado con la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS). El objetivo de este trabajo fue analizar el efecto del oligoquitosano sobre el crecimiento, viabilidad celular y la actividad de las enzimas catalasa y superóxido dismutasa, involucradas en la eliminación de ROS en levaduras de *U. maydis* durante el tratamiento con este antifúngico. Se encontró que esta molécula inhibe el crecimiento de las levaduras de *U. maydis* hasta en un 90%, causando un aumento significativo en la actividad total de catalasa y superóxido dismutasa lo que sugiere un desbalance de compuestos oxidantes como parte del mecanismo de acción de este compuesto antifúngico.

Palabras clave:

Oligoquitosano, *Ustilago maydis*, especies reactivas de oxígeno, catalasa, peroxidasa

INTRODUCCIÓN

El quitosano es un polisacárido lineal, producto de la desacetilación de la quitina, formado por monómeros de D-glucosamina y N-acetil-D-glucosamina unidos mediante enlaces β -1,4 glucosídicos. Es un polímero con elevada viscosidad y alto peso molecular (310000-375000 Da) que limitan su aplicación, además su solubilidad se restringe a

ABSTRACT

Oligochitosan is a low molecular weight derivative of chitosan that has interesting biotechnological applications. As an antifungal, oligochitosan inhibits the growth of phytopathogenic fungi, and it was suggesting that its mechanism of action is associated with internalization of cells that could generate disorders at endomembrane levels. In *Ustilago maydis*, a basidiomycete that has gained popularity as a biochemical and molecular biology model of phytopathogens, it has been found that oligochitosan is capable of tripling cell respiration, suggesting damage at the level of mitochondria. This increase in respiration may also be associated with the formation of reactive oxygen species (ROS). The objective of this work was to analyze the effect of oligochitosan on growth, cell viability and the activity of catalase and superoxide dismutase enzymes, involved in the elimination of reactive oxygen species in *U. maydis* yeasts during treatment with this antifungal compound. This molecule was found to inhibit the growth of *U. maydis* yeasts by up to 90%, causing a significant increase in total catalase-peroxidase and superoxide dismutase activity, which suggests an imbalance of oxidant compounds as part of the mechanism of action of this antifungal compound.

Keywords:

Oligochitosan, *Ustilago maydis*, reactive oxygen species, catalase, peroxidase

INTRODUCTION

Chitosan is a linear polysaccharide derived from the deacetylation of chitin, formed by monomers of D-glucosamine and N-acetyl-D-glucosamine linked by β -1,4 glycosidic bonds. It is a polymer with high viscosity and molecular weight (310000-375000 Da) that limit its application, in addition its solubility is only in acidic solutions with pH less than 4.6 (Olicón-Hernández et al.,

soluciones ácidas con pH menor de 4.6 (Olicón-Hernández et al., 2017). El oligoquitosano es un derivado de bajo peso molecular originado de la hidrólisis del quitosano por medios químicos o enzimáticos que carece de las limitantes de viscosidad y baja solubilidad de la molécula original (Hosseinnejad & Jafari, 2016). Tiene un peso molecular entre 5 a 8 kDa y un elevado grado de desacetilación, por lo que está formado mayoritariamente por monómeros de D-glucosamina (Grande-Tovar et al., 2018). Los radicales estructurales de la molécula de oligoquitosano se encuentran más expuestos debido al menor peso molecular dando como resultado un compuesto con mayor polaridad y solubilidad en agua a pH neutro, lo que le permite tener diversas aplicaciones en la industria, destacando su uso como agente antifúngico (Verlee et al., 2017).

Aunque se desconoce el mecanismo exacto por el cual el oligoquitosano ejerce su acción antimicrobiana, su efecto antagonico se ha asociado al desequilibrio de los sistemas endomebrales, daño a moléculas intracelulares como el ADN y ARN y alteraciones en la respiración celular (Chakraborty et al., 2020; Grande-Tovar et al., 2018; Olicón-Hernández et al., 2015). En relación a este último, el aumento en el consumo de oxígeno podría conducir a la formación de radicales tóxicos, cuya producción en exceso causaría daños en la célula a nivel estructural condicionando la supervivencia del microorganismo ante los daños producidos.

Las especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) son un complejo y variado conjunto de moléculas derivadas del oxígeno, con una elevada capacidad de reacción e inestabilidad química, debido a que varios de ellos poseen un electrón desapareado lo que los hace altamente reactivos (Li et al., 2016). En moderadas concentraciones, las ROS son moléculas que pueden actuar como segundos mensajeros en cascadas de señalización celular y cumplen con funciones metabólicas de oxidación (Mittler, 2017). Sin embargo, en condiciones de estrés oxidativo, en donde la oxidación excede los sistemas antioxidantes seguido de una pérdida en el equilibrio de la producción de radicales, se genera un desbalance entre la velocidad de formación y neutralización, lo que origina severos daños celulares en diferentes biomoléculas como ADN, proteínas y lípidos (Srinivas et al., 2019; Wang et al., 2018).

Los efectos perjudiciales que resultan de la formación de ROS en la célula son impedidos por varios sistemas antioxidantes.

2017). Oligochitosan is a low molecular weight derivative, obtained by chemical or enzymatic hydrolysis of chitosan, improve the viscosity and solubility limitations (Hosseinnejad & Jafari, 2016). It has a molecular weight between 5 to 8 kDa and a high degree of deacetylation, so it is formed mostly by D-glucosamine monomers (Grande-Tovar et al., 2018). The structural functional groups of the oligochitosan molecule are more exposed due to the lower molecular weight resulting in a compound with greater polarity and solubility in water at neutral pH, which allows it to have various applications in the industry, highlighting its use as an antifungal agent (Verlee et al., 2017).

Although the exact mechanism for oligochitosan uses as an antimicrobial compound is unknown, its antagonistic effect has been associated with an imbalance of endomebranal systems, damage to intracellular molecules such as DNA and RNA, and alterations in cellular respiration (Chakraborty et al., 2020; Grande-Tovar et al., 2018; Olicón-Hernández et al., 2015). In relation to the last one, the increase in oxygen consumption could lead to the formation of toxic radicals, whose cause damage to the cell at the structural level, conditioning the survival of the microorganism.

Reactive oxygen species (ROS) are a complex and varied set of molecules derived from oxygen, with a high reaction capacity and chemical instability, because several of them have an unpaired electron which makes them highly reactive (Li et al., 2016). In moderate concentrations, ROS are molecules that can act as second messengers in cell signaling cascades and fulfill metabolic oxidation functions (Mittler, 2017). However, under conditions of oxidative stress, where oxidation exceeds the antioxidant systems followed by a loss in the balance of radical production, an imbalance is generated between the speed of formation and neutralization, which causes severe cellular damage in different biomolecules such as DNA, proteins and lipids (Srinivas et al., 2019; Wang et al., 2018).

The damage results as consequence of ROS formation in the cell are prevented by various antioxidant systems. Aerobic microorganisms have developed mechanisms to eliminate these species through specific enzymes that neutralize ROS, including superoxide dismutase (EC 1.15.1.1), peroxidase (EC 1.11.1.7) and catalase (EC 1.11.1.6) (Kapoor et al., 2019; Nowogórska & Patykowski, 2014; Zhang et al., 2015).

Los microorganismos aerobios, han desarrollado mecanismos para eliminar estas especies mediante enzimas específicas que neutralizan a las ROS entre las que destacan la superóxido dismutasa (EC 1.15.1.1), la peroxidasa (EC 1.11.1.7) y la catalasa (EC 1.11.1.6) (Kapoor et al., 2019; Nowogórska & Patykowski, 2014; Zhang et al., 2015). Un aumento en la actividad de estas enzimas sugeriría un desbalance en la formación de ROS lo que se puede considerar como una respuesta al estrés originado por la presencia del oligoquitosano.

Ustilago maydis es un biotrófo, agente causal de la enfermedad del carbón del maíz (*Zea mays*), conocido en México como huitlacoche. Presenta diferentes estadios durante su ciclo vital destacando su etapa levaduriforme de basidiosporas, el cual es un excelente modelo bioquímico y biotecnológico debido a la facilidad de su manejo microbiológico y genético (Olicón-Hernández et al., 2019). Previamente se ha estudiado el uso de oligoquitosano contra levaduras de *U. maydis*, encontrándose efectos inhibitorios en el crecimiento y un aumento de la respiración celular, lo que puede sugerir un aumento en la actividad respiratoria que provoca el oligoquitosano como antifúngico. En organismos de metabolismo aeróbico, las ROS son producidas como una consecuencia fisiológica normal en mitocondrias y peroxisomas. *U. maydis* es un organismo aerobio, y se ha descrito que produce ROS como parte del metabolismo en esos organelos, por lo que también se conoce su sistema enzimático de eliminación de estos radicales (Sierra-Campos & Pardo, 2009). Un análisis bioinformático *in silico* demostró la presencia de las enzimas superóxido dismutasa y catalasa-peroxidasa en el genoma de *U. maydis* junto con algunas isoenzimas, lo que sugiere su papel como parte del sistema de eliminación de ROS en este basidiomiceto, enzimas que pueden ser afectadas por el tratamiento con oligoquitosano como consecuencia del desbalance de ROS por el tratamiento antifúngico (Sierra-Campos & Pardo, 2009).

El objetivo de este trabajo fue analizar el efecto inhibitorio de diferentes concentraciones de oligoquitosano sobre levaduras de *U. maydis* para medir los efectos en la viabilidad celular, la respiración celular. Adicionalmente, se determinaron las afectaciones en la actividad y perfil electroforético de las enzimas antioxidantes como una medición indirecta de la formación de ROS como consecuencia del tratamiento con oligoquitosano. Cabe resaltar que en el presente trabajo solo se midió la capacidad de degradación del peróxido de hidrógeno de la enzima catalasa-peroxidasa de *U. maydis* y no se estudió su actividad como peroxidasa.

An increase in the activity of these enzymes would suggest an imbalance in the formation of ROS which can be considered as a response to stress caused by the presence of oligochitosan.

Ustilago maydis is a biotroph, etiological agent of corn (*Zea mays*) coal disease, known in Mexico as huitlacoche. It presents different stages during its life cycle, highlighting its basidiospore yeast form, which is an excellent biochemical and biotechnological model due to its microbiological and genetic management (Olicón-Hernández et al., 2019). Previously, the use of oligochitosan against *U. maydis* yeasts has been studied, finding inhibitory effects on growth and an increase in cellular respiration, which may suggest an increase in respiratory activity caused by oligochitosan as an antifungal. In organisms of aerobic metabolism, ROS are produced as a normal physiological consequence in mitochondria and peroxisomes. *U. maydis* is an aerobic organism, and it has been described that it produces ROS as part of the metabolism in these organelles, so its enzymatic system of elimination of these radicals is also known (Sierra-Campos & Pardo, 2009). An *in silico* bioinformatics analysis demonstrated the presence of the enzymes superoxide dismutase and catalase-peroxidase in the genome of *U. maydis* along with some isoenzymes, suggesting their role as part of the ROS elimination system in this basidiomycete, enzymes that may be affected by treatment with oligochitosan as a consequence of ROS imbalance by antifungal treatment (Sierra-Campos & Pardo, 2009).

The objective of this work was to analyze the inhibitory effect of different concentrations of oligochitosan on *U. maydis* yeasts to measure the effects on cell viability and cell respiration. Additionally, the effects on the activity and electrophoretic profile of antioxidant enzymes were determined as an indirect measurement of ROS formation as a result of treatment with oligochitosan. It should be noted that in the present work the degradation capacity of hydrogen peroxide of the enzyme catalase-peroxidase of *U. maydis* was measured and its activity as peroxidase was not assayed.

MATERIALS AND METHODS

MICRO-ORGANISMS AND CULTURE MEDIA

The commercial strain of *Ustilago maydis* ATCC201384 FB2 obtained from the American Type Culture Collection was used. The culture mediums used were: minimal medium [MM, glucose 10 g/L, KNO₃ 3 g/L and salt solution 62.5 mL/L] and YPD medium [glucose 10 g/L, NH₄NO₃ 1.5 g/L, peptone 2.5 g/L, yeast extract 10 g/L, and salt solution 62.5

MATERIALES Y MÉTODOS

Microorganismos y medios de cultivo

Se empleó la cepa comercial de *Ustilago maydis* ATCC201384 FB2 obtenida de la colección americana de cultivos tipo (American Type Culture Collection). Los medios de cultivo utilizados fueron: medio mínimo [MM, glucosa 10 g/L, KNO₃ 3 g/L y solución de oligoelementos 62.5 mL/L] y medio YPD [glucosa 10 g/L, NH₄NO₃ 1.5 g/L, peptona 2.5 g/L, extracto de levadura 10 g/L solución de sales 62.5 mL]. El pH de los medios de cultivo se ajustó a 6.5 y se esterilizaron por calor húmedo (121°C, 15lb/in², 15 min).

Solución concentrada de oligoquitosano

El oligoquitosano (lactato de oligoquitosano) fue proporcionado por Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA) con un peso molecular aproximado promedio de 5 kDa y grado de desacetilación >97%. Se preparó una solución concentrada de oligoquitosano de 10 mg/mL en solución acuosa pH 7 y se esterilizó por filtración utilizando una membrana de polietersulfona-nylon con tamaño de poro a 0.22 µm (Sigma Aldrich St. Louis, MO, USA) (Olicón-Hernández et al., 2015).

Efecto del quitosano sobre el crecimiento celular

Para determinar el efecto de la concentración del oligoquitosano sobre *U. maydis*, se inocularon matraces con MM adicionados de oligoquitosano a concentraciones finales de 0.5, 1 y 2 mg/mL con una concentración de levaduras de *U. maydis* de 50 unidades de densidad óptica/L, usando como testigo MM y YPD sin oligoquitosano. Estas concentraciones se escogieron con base en la concentración mínima inhibitoria que reportamos previamente (Olicón-Hernández et al., 2015). Se utilizó un medio rico como YPD para evaluar las limitantes del MM en el crecimiento de *U. maydis*. Los matraces se incubaron en agitación a 28°C por 24 h a 128 rpm. La densidad óptica de cada uno de los sistemas se midió en un espectrofotómetro Biomate® a 600nm para determinar las unidades de densidad óptica finales utilizando medio sin inocular como blanco para la calibración. Se calculó el número de células mediante densidad óptica de acuerdo a la siguiente relación: 1 unidad de D.O ≈ 5X10⁵ células de *U. maydis*/mL (Zavala-Moreno et al., 2014).

Viabilidad celular

Se utilizaron 50 µL de una suspensión celular de levaduras de *U. maydis* expuestas a oligoquitosano en MM por 24h que fue lavada 3 veces con agua destilada estéril.

mL/L] and YPD medium [glucose 10 g/L, NH₄NO₃ 1.5 g/L, peptone 2.5 g/L, yeast extract 10 g/L, and salt solution 62.5 mL]. The pH of the culture mediums was set to 6.5 and sterilized by autoclave (121°C, 15lb/in², 15 min).

Concentrated oligochitosan solution

Oligochitosan (oligochitosan lactate) was provided by Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA) with an approximate average molecular weight of 5 kDa and degree of deacetylation >97%. A concentrated oligochitosan solution of 10 mg/mL was prepared in aqueous solution pH 7 and sterilized by filtration using a polyethersulfone-nylon membrane with pore size at 0.22 µm (Sigma Aldrich St. Louis, MO, USA) (Olicón-Hernández et al., 2015).

Effect of chitosan on cell growth

To determine the effect of oligochitosan concentration on *U. maydis*, flasks were inoculated with MM added oligochitosan at final concentrations of 0.5, 1 and 2 mg/mL with a concentration of yeasts of *U. maydis* of 50 units of optical density/L, using MM and YPD without oligochitosan as controls. These concentrations were chosen based on the minimum inhibitory concentration that we previously reported (Olicón-Hernández et al., 2015). A rich medium such as YPD was used to assess the limitations of the MM in the growth of *U. maydis*. The flasks were incubated in stirring at 28°C for 24 h at 128 rpm. The optical density of each of the systems was measured on a Biomate® spectrophotometer at 600nm to determine the final optical density units, using uncultured medium as reactive blank. The number of cells was calculated by optical density according to the following relationship: 1 unit of D.O » 5X10⁵ cells of *U. maydis*/mL (Zavala-Moreno et al., 2014).

Cell viability

A volume of 50 µL of a cell suspension of *U. maydis* yeasts exposed to oligochitosan in MM for 24h washed 3 times with sterile distilled water were used. Untreated cells were used as a control. The cell suspension was mixed with an equal volume of a trypan blue solution and allowed to incubate for 15 min at room temperature. Yeasts dyed blue were considered non-viable, while those that were observed without color were considered viable. Viable and non-viable cells were counted using a Neubauer chamber by optical microscopy (40x) and the percentage of viability was determined using the untreated cells as a control and a calculation base of 100 cells.

Se utilizaron células sin tratamiento como control. La suspensión celular fue mezclada con un volumen igual de una solución de azul de tripano y se dejaron incubar por 15 min a temperatura ambiente. Las levaduras teñidas de color azul se consideraron no viables, mientras que aquellas que se observaron refringentes se consideraron viables. Se hizo el conteo de las células viables y no viables utilizando una cámara de Neubauer con un microscopio óptico con un aumento de 40x y se determinó el porcentaje de viabilidad utilizando las células sin tratamiento como control y una base de cálculo de 100 células.

Velocidad en el consumo de oxígeno

Se utilizó un electrodo tipo Clark marca YSI® (OHA, USA) con levaduras de *U. maydis* crecidas en MM con y sin oligoquitosano. En una cámara de reacción se adicionaron 1350 μL de buffer de respiración compuesto por KCl 20 mM, $\text{K}_2\text{H}_2\text{PO}_4$ 10 mM, MgCl_2 5mM, HEPES 10 mM, EGTA 1mM, ajustado a pH 7.0, y 1250 μL de agua destilada manteniendo la temperatura constante en 30 °C. Se realizó una suspensión celular al 50% de las células tratadas y las células control y 100 μL de esta suspensión se agregaron en la cubeta de reacción. La cámara de respiración se tapó inmediatamente, graficándose la disminución del porcentaje de oxígeno disuelto (O_2) en función del tiempo (t). Se determinó la velocidad de consumo de oxígeno para cada uno de los tratamientos usando la pendiente de la recta y se calculó la cantidad de oxígeno consumido en nmoles de O_2 por minuto y por mg de biomasa húmeda (Olicón-Hernández et al., 2015).

ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS

Obtención del extracto crudo

Las levaduras de *U. maydis* crecidas en MM con y sin oligoquitosano durante 24 h en las condiciones antes mencionadas. Las células se cosecharon por centrifugación y fueron lavadas 3 veces con agua destilada pH 7. A la biomasa compactada se le adicionaron 2 g de perlas de vidrio y 1.43 mL de buffer de fosfatos 0.01M pH 7 por gramo de biomasa húmeda. La mezcla se agitó en vórtex durante un minuto con descanso en baño de hielo otro minuto, este proceso se repitió 10 ciclos. La mezcla fue centrifugada a 1000 xg recuperando el sobrenadante. Se determinó la cantidad de proteína del sobrenadante por el método de Lowry (Felz et al., 2019; Lowry et al., 1951).

Determinación de la hidrólisis de peróxido de hidrógeno por la enzima catalasa-peroxidasa

En un tubo de ensayo se preparó la mezcla de reacción

Oxygen consumption rate

A Clark type electrode brand YSI® (OHA, USA) was used with yeasts of *U. maydis* grown in MM with and without oligochitosan. In a reaction chamber were added 1350 μL of respiration buffer composed of KCl 20 mM, $\text{K}_2\text{H}_2\text{PO}_4$ 10 mM, MgCl_2 5mM, HEPES 10 mM, EGTA 1mM, adjusted to pH 7.0, and 1250 μL of distilled water set the temperature constant at 30 °C. 100 μL of cell suspension (50%) with and without treatment were added in the reaction cuvette. The breathing chamber was immediately clogged, plotting the decrease in the percentage of dissolved oxygen (O_2) as a function of time (t). The rate of oxygen consumption for each of the treatments was determined using the slope of the line and the amount of oxygen consumed in nmoles of O_2 per minute and per mg of wet biomass was calculated (Olicón-Hernández et al., 2015).

ENZYMATIC ACTIVITIES

Obtaining the crude extract

U. maydis yeasts were grown in MM with and without oligochitosan for 24 h under the condition mentioned before. The cells were harvested by centrifugation and washed 3 times with distilled water pH 7. The compacted biomass was mixed with 2 g of glass beads and 1.43 mL of phosphate buffer 0.01M pH 7 per gram of wet biomass. The mixture was stirred in vortex for one minute with one-minute rest in ice bath, this process was repeated 10 cycles. The mixture was centrifuged at 1000 xg recovering the supernatant. The amount of supernatant protein was determined by the Lowry method (Felz et al., 2019; Lowry et al., 1951).

Determination of hydrogen peroxide hydrolysis by catalase-peroxidase enzyme

In a test tube the reaction mixture formed by 1mL of H_2O_2 5mM and 1.5 mL of phosphate buffer 0.01M pH 7 was prepared. Subsequently, 100 μL of the crude enzyme extract diluted to a concentration of 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ of protein were added. Immediately, the mixture was placed in a quartz cell and the difference in absorbance at 240 nm was determined in a Biomate spectrophotometer for 5 min. Enzyme activity was expressed as μg of hydrolyzed H_2O_2 per mg protein and per min using the molar extinction coefficient of H_2O_2 (20 $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) (Olicón-Hernández et al., 2017).

Determination of superoxide dismutase activity.

The activity of the enzyme was determined by a modification of the method of Paoletti et al. (1986). In a glass tube, the reaction mixture was prepared with 700 μL of

con 700 μL de trietanolamina 100mM pH 7.4, 40 μL de NADH 7.5mM, 25 μL solución EDTA/MnCl₂ 100mM/ 50 mM pH 7.0, 20 μL del extracto crudo enzimático diluido a una concentración de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ y 100 μL de una solución de β -mercaptoetanol. La mezcla se agitó e inmediatamente se depositó en una celda de vidrio, donde se leyó la disminución de la absorbancia en un espectrofotómetro Biomate a 340 nm durante 5 min. Se utilizó como testigo 700 μL de regulador (Trietanolamina 100mM pH 7.4, 25 μL solución EDTA/MnCl₂ 100mM/ 50 mM pH 7.0). La actividad enzimática se expresó en μg de NADH oxidado por mg de proteína por min utilizando el coeficiente de extinción molar del NADH oxidado ($6220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Perfil electroforético

Se realizó la electroforesis en un gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes con un gel empacador al 4% y un gel separador al 12.5%. En los carriles se colocaron muestras de los extractos crudos correspondientes al control y al tratamiento con oligoquitosano. La electroforesis fue llevada a cabo utilizando un amperaje de 15 mA durante 10 min, después fue cambiado a 35 mA durante 1 h. El gel fue retirado de la cámara y se tiñó con una solución de azul de coomassie por 1 h. Posterior a este tiempo se procedió a decolorar el gel, realizando 3 lavados con solución de decoloración lenta (10 mL de ácido acético glacial, 5 mL de metanol en 100 mL de agua destilada) e inmediatamente después se realizaron 3 lavados con solución de decoloración rápida (10 mL de ácido acético glacial, 50 mL de metanol, 40 mL de agua destilada) durante 30 min cada lavado en agitación manual para la visualización de las bandas (Olicón-Hernández et al., 2017).

Análisis estadístico

Los datos obtenidos se analizaron con el programa SigmaPlot 14 mediante un análisis de varianza unifactorial analizada por la prueba de Tukey con un intervalo del 95% de confianza. Todos los resultados cumplieron con la distribución normal para el uso de la prueba paramétrica.

RESULTADOS

Efecto del oligoquitosano en el crecimiento, viabilidad celular y morfología de *U. maydis*

Las levaduras testigo (Figura 1A-I) se muestran como células alargadas con dos o más núcleos distribuidos en la periferia a lo largo de la célula, divididos por la formación de septos característicos de esta levadura.

of triethanolamine 100mM pH 7.4, 40 μL of NADH 7.5mM, 25 μL EDTA/MnCl₂ solution 100mM/ 50 mM pH 7.0, 20 μL of the crude enzyme extract diluted to a concentration of 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ and 100 μL of a solution of β -mercaptoethanol. The mixture was stirred and immediately deposited in a glass cell, where the decrease in absorbance was read on a Biomate spectrophotometer at 340 nm for 5 min. 700 μL of regulator was used as a control (Triethanolamine 100mM pH 7.4, 25 μL EDTA/MnCl₂ solution 100mM/ 50 mM pH 7.0). Enzyme activity was expressed in μg of oxidized NADH per mg of protein per min using the molar extinction coefficient of oxidized NADH ($6220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

SDS-PAGE Electrophoretic profile

Electrophoresis was performed on a polyacrylamide gel under denaturing conditions with a 4% stacking gel and a 12.5% separator gel. Samples of crude extracts corresponding to control and treatment with oligochitosan were loaded in the stacking gel wells. Electrophoresis was performed using an amperage of 15 mA for 10 min, then changed to 35 mA for 1 h. The gel was removed from the chamber and stained with a solution of Coomassie blue for 1 h. After this time, the gel was discolored, performing 3 washes with slow discoloration solution (10 mL of glacial acetic acid, 5 mL of methanol in 100 mL of distilled water) and immediately after 3 washes were made with rapid discoloration solution (10 mL of glacial acetic acid, 50 mL of methanol, 40 mL of distilled water) for 30 min each wash in manual stirring for the visualization of the bands (Olicón-Hernández et al., 2017).

Statistical analysis

The data obtained were analyzed with the SigmaPlot 14 program using a unifactorial analysis of variance analyzed by Tukey's test with a 95% confidence interval. All the results presented a normal distribution for the use of the parametric test.

RESULTS

Effect of oligochitosan on growth, cell viability and morphology of *U. maydis*

The control yeasts (Figure 1A-I) are shown as elongated cells with two or more nucleus distributed in the periphery along the cell, the hyphae were divided by the formation of septa. Cells treated with oligochitosan show smaller size, with the presence of 1 to 2 nucleus and with inclusion similar as vacuoles in the cell cytoplasm (Figure 1A-II). With respect to cell viability, the absence of dye in viable cells is observed in contrast to cells stained without viability (Figure 1B). The viability percentage of cell in control reached 98.75% while

Las células tratadas con oligoquitosano muestran menor tamaño, con presencia de 1 a 2 núcleos y con estructuras similares a vacuolas en el citoplasma celular (Figura 1A-II). Con respecto a la viabilidad celular se aprecia la ausencia de colorante en las células viables en contraste con las células teñidas sin viabilidad (Figura 1B). El conteo realizado en levaduras crecidas en MM presentó un porcentaje de viabilidad del 98.75% mientras que el porcentaje de levaduras crecidas en MM con oligoquitosano con una concentración de 1 mg/mL (Figura 1C) mostró un porcentaje de viabilidad del 47.32%.

Finalmente, en la figura 1C se muestra el crecimiento de las levaduras de *U. maydis* a diferentes concentraciones de oligoquitosano a las 24 h. La cantidad de células durante el crecimiento en medio de YPD alcanzó el máximo valor a las 24 h, seguida del crecimiento en MM. El crecimiento de las levaduras en MM con oligoquitosano a una concentración 0.5 mg/mL no mostró diferencias significativas ($p>0.05$) con aquellas crecidas en MM. Sin embargo, en MM con oligoquitosano a una concentración de 1 mg/mL se mostró una reducción significativa en el número de células, lo que se reflejó en una disminución de más del 50% comprada con la del control. Las células crecidas en 2 mg/mL de oligoquitosano redujeron su número en más de 90%. Se decidió trabajar con la concentración de 1 mg/mL para los experimentos subsecuentes para tener suficiente biomasa para evaluar los cambios.

the viability cell percentage of yeasts grown in MM with oligochitosan with a concentration of 1 mg / mL (Figure 1C) was 47.32%.

Finally, Figure 1C shows the growth of *U. maydis* yeasts at different concentrations of oligochitosan at 24 h. The number of cells during growth in YPD medium reached the maximum value at 24 h, followed by growth in MM. The growth of yeasts in MM with oligochitosan at a concentration of 0.5 mg/mL showed no significant differences ($p>0.05$) with those grown in MM. However, in MM with oligochitosan at a concentration of 1 mg/mL a significant reduction in number of cells was shown, which was reflected in a decrease of more than 50% compared with control. Cells grown at 2 mg/mL of oligochitosan reduced their cells by more than 90%. We decided to work with the concentration of 1 mg/mL for subsequent experiments to have enough biomass to evaluated the effects of oligochitosan.

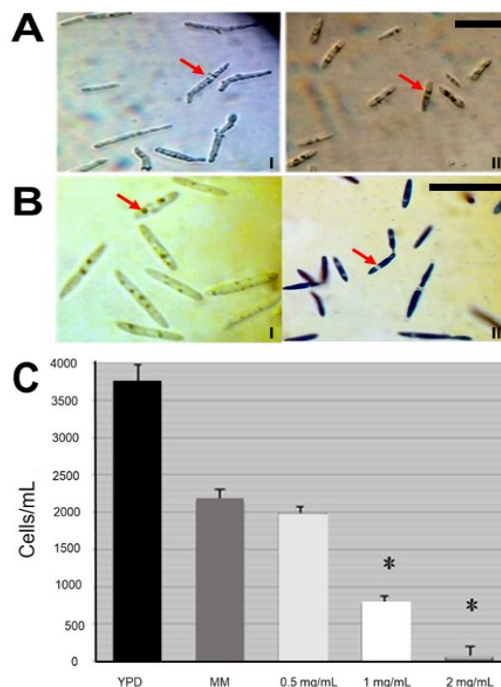


Figura 1. Modificaciones en el crecimiento, morfología y viabilidad de las levaduras de *U. maydis* en presencia de oligoquitosano. A) Micrografía (40x) de levaduras de *U. maydis* crecidas en ausencia (I) y presencia (II) de oligoquitosano. B) Viabilidad celular de levaduras de *U. maydis* crecidas en ausencia (I) y presencia (II) de oligoquitosano. C) Efecto sobre el crecimiento de *U. maydis* crecidas en diferentes concentraciones (0.5-2 mg/mL) de oligoquitosano. MM= Medio mínimo (Células control). (*) representan diferencias significativas ($p < 0.05$), no se hicieron comparaciones estadísticas con las levaduras crecidas en medio YPD. Las flechas destacan los hallazgos morfológicos mencionados en la sección 3.1. Barra= 20 μ m

Figure 1. Modifications on the growth, morphology and viability of *U. maydis* yeasts in the presence of oligochitosan. A) Micrograph (40x) of yeasts of *U. maydis* grown in the absence (I) and presence (II) of oligochitosan. B) Cell viability of yeasts of *U. maydis* grown in the absence (I) and presence (II) of oligochitosan. C) Effect on the growth of *U. maydis* grown in different concentrations (0.5-2 mg/mL) of oligochitosan. MM= Minimal medium (Control cells). (*) represent significant differences ($p < 0.05$), no statistical comparisons were made with yeasts grown in YPD medium. The arrows highlight the morphological findings mentioned in section 3.1. Bar= 20 μ m

Efecto en la tasa de consumo de oxígeno

La figura 2 muestra el consumo de oxígeno disuelto por las levaduras de *U. maydis* crecidas en MM usadas como control (Figura 2A I) y en MM con oligoquitosano a una concentración de 1 mg/mL (Figura 2A II) durante 24 h. La comparación de los trazos entre la respiración de las células sin tratamiento y las tratadas con oligoquitosano, claramente mostró una diferencia en las pendientes de la curva, sugiriendo una aceleración en la respiración. El cálculo de la velocidad en el consumo de oxígeno expresado en moles de oxígeno consumidos minuto^{-1} mg de células peso húmedo $^{-1}$, mostró que las levaduras de *U. maydis* crecidas en MM con oligoquitosano tuvieron una velocidad de 18.210×10^3 que representa más del triple del consumo de oxígeno que las células control (4.801×10^3) (Figura 2B)

Effect on oxygen consumption rate

Figure 2 shows the oxygen consumption by *U. maydis* yeasts grown in MM used as a control (Figure 2A I) and in MM with oligochitosan at a concentration of 1 mg/mL (Figure 2A II) for 24 h. The comparison of the traces between the respiration of the cells without treatment and those treated with oligochitosan, clearly showed a difference in the slopes of the curve, suggesting an acceleration in respiration. The calculation of the rate of oxygen consumption expressed in moles of oxygen consumed minute^{-1} mg of cells wet weight $^{-1}$, showed that the yeasts of *U. maydis* grown in MM with oligochitosan had a speed of 18.210×10^3 representing more than triple the oxygen consumption of the control cells (4.801×10^3) (Figure 2B)

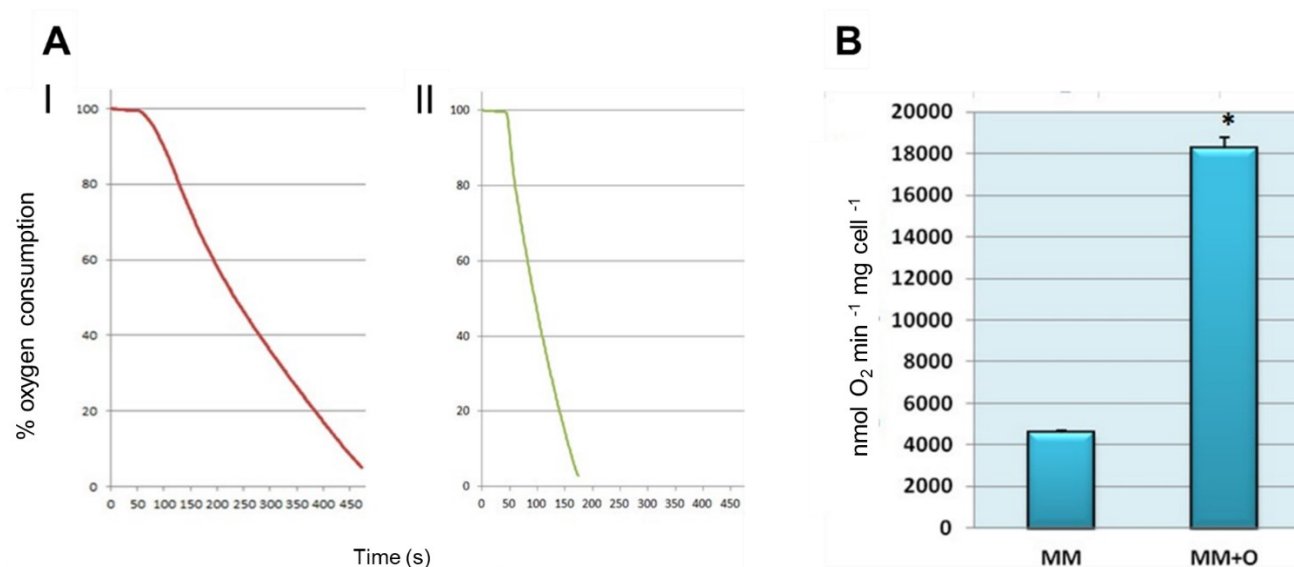


Figura 2. Efecto en el consumo de oxígeno por oligoquitosano en levaduras de *U. maydis*. A) Porcentaje de oxígeno disuelto en células control (I) y células tratadas con 1mg/mL de oligoquitosano (II). B) Diferencia en la tasa de consumo de oxígeno por levaduras crecidas en presencia de oligoquitosano (1 mg/mL). MM = Medio mínimo (células control); MM+O = Medio mínimo adicionado con oligoquitosano 1 mg/mL (células tratadas). (*) representan diferencias significativas (p<0.05).

Figure 2. Effect on oxygen consumption by oligochitosan in *U. maydis* yeasts. A) Percentage of dissolved oxygen in control cells (I) and cells treated with 1mg/mL of oligochitosan (II). B) Difference in the rate of oxygen consumption by yeasts grown in the presence of oligochitosan (1 mg/mL). MM = Minimal mean (control cells); MM+O = Minimal mean added with oligochitosan 1 mg/mL (treated cells). (*) represent significant differences (p<0.05).

Efecto del oligoquitosano sobre la hidrólisis del peróxido de hidrógeno por la enzima catalasa-peroxidasa de *U. maydis*

La actividad de la enzima en las levaduras crecidas en MM con oligoquitosano fue de 12.3 mU/mg de proteína y las levaduras control 0.9 mU/mg de proteínas (considerando 1 unidad enzimática a la cantidad de enzima necesaria para hidrolizar 1 µg de H₂O₂ por minuto). La determinación de la actividad de esta enzima en las células control y las tratadas mostró un aumento significativo (p<0.05) de 12 veces por la presencia de oligoquitosano (Figura 3).

Effect of oligochitosan on hydrolysis of hydrogen peroxide by the enzyme *U. maydis* catalase-peroxidase

The activity of the enzyme in yeasts grown in MM with oligochitosan was 12.3 mU/mg of protein and the control yeasts 0.9 mU/mg of proteins (considering 1 enzyme unit to the amount of enzyme needed to hydrolyze 1 µg of H₂O₂ per minute). The determination of the activity of this enzyme in control and treated cells showed a significant increase (p<0.05) of 12 times due to the presence of oligochitosan (Figure 3).

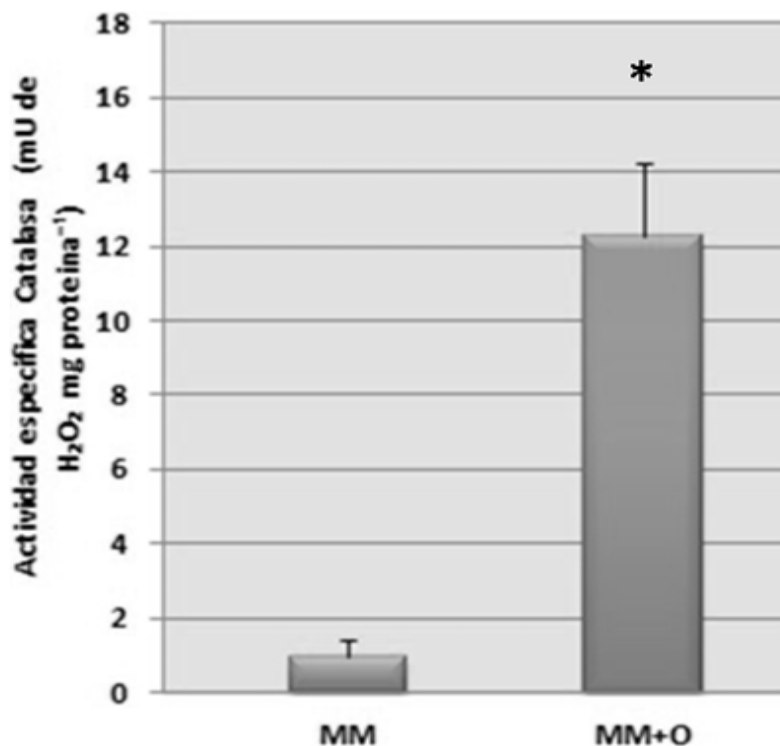


Figura 3. Hidrólisis del peróxido de hidrógeno por la enzima catalasa-peroxidasa de *U. maydis*. Se muestran las células control y las células tratadas con oligoquitosano a una concentración de 1 mg/mL. MM = Medio mínimo (células control); MM+O = Medio mínimo adicionado con oligoquitosano 1 mg/mL (células tratadas). (*) representan diferencias significativas (p<0.05).

Figure 3. Hydrolysis of hydrogen peroxide by the enzyme catalase-peroxidase of *U. maydis*. Control cells and cells treated with oligochitosan at a concentration of 1 mg/mL are shown. MM = Minimal mean (control cells); MM+O = Minimal mean added with oligochitosan 1 mg/mL (treated cells). (*) represent significant differences (p<0.05).

Efecto del oligoquitosano sobre la actividad enzimática de superóxido dismutasa (SOD) de *U. maydis*

La figura 4 muestra la actividad enzimática de la SOD de levaduras crecidas en MM, así como MM adicionado con oligoquitosano (1 mg/mL). Las células control tuvieron un valor de actividad específica de SOD de 25.04U/mg de proteína (considerando 1 unidad de actividad enzimática como la cantidad de enzima necesaria para oxidar 1 µg de NADH por minuto), mientras que las células tratadas con oligoquitosano presentaron una actividad de 49.16 U/mg de proteína, lo que representa un aumento del doble de la actividad debido a la presencia de oligoquitosano en la concentración ensayada. El análisis estadístico mostró una diferencia significativa entre ambos valores (p<0.05).

Effect of oligochitosan on the enzymatic activity of superoxide dismutase (SOD) of *U. maydis*

Figure 4 shows the enzymatic activity of the SOD of yeasts grown in MM, as well as MM added with oligochitosan (1 mg/mL). The control cells had a specific SOD activity value of 25.04U/mg of protein (considering 1 unit of enzyme activity as the amount of enzyme needed to oxidize 1 µg of NADH per minute), while the cells treated with oligochitosan had an activity of 49.16 U/mg of protein, which represents a two-fold increase in activity due to the presence of oligochitosan in the concentration tested. Statistical analysis showed a significant difference between both values (p<0.05).

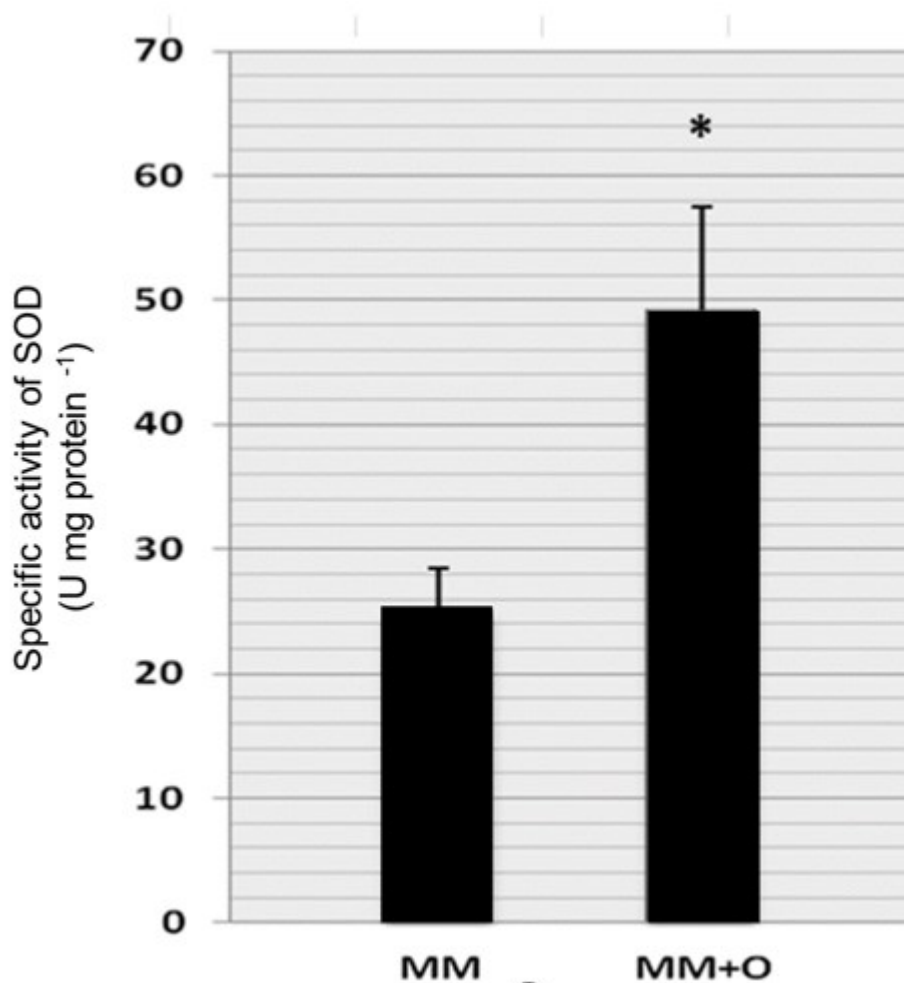


Figura 4. Actividad de la enzima SOD de *U. maydis*. Se muestran las células control y las células tratadas con oligoquitosano a una concentración de 1 mg/mL. MM = Medio mínimo (células control); MM+O = Medio mínimo adicionado con oligoquitosano 1 mg/mL (células tratadas). (*) representan diferencias significativas ($p < 0.05$).

Figure 4. Activity of the SOD enzyme of *U. maydis*. Control cells and cells treated with oligochitosan at a concentration of 1 mg/mL are shown. MM = Minimal mean (control cells); MM+O = Minimal mean added with oligochitosan 1 mg/mL (treated cells). (*) represent significant differences ($p < 0.05$).

Perfil electroforético

La figura 5 muestra el perfil electroforético del extracto crudo enzimático de las células control y las tratadas con oligoquitosano a una concentración de 1 mg/mL. Se puede apreciar la presencia de una banda de entre 97 y 116 kDa en las células control y las tratadas con oligoquitosano (Figura 5B), teniendo una mayor intensidad en las células tratadas con el derivado de quitosano. Esta banda se aproxima al peso molecular reportado para enzimas con actividad de hidrólisis de peróxido de hidrógeno de *U. maydis* (Passardi et al 2007), lo que puede sugerir un aumento en la expresión del gen que codifica para esta enzima. Bajo estas condiciones la enzima SOD no pudo ser observada.

SDS-PAGE Electrophoretic profile

Figure 5 shows the electrophoretic profile of the crude enzymatic extract of control cells and those treated with oligochitosan at a concentration of 1 mg/mL. The presence of a band between 97 and 116 kDa can be seen in control cells and those treated with oligochitosan (Figure 5B), having a greater intensity in cells treated with the chitosan derivative. This band approximates the molecular weight reported for enzymes with hydrogen peroxide hydrolysis activity of *U. maydis* (Passardi et al 2007), which may suggest an increase in the expression of the gene coding for this enzyme. Under these conditions the SOD enzyme could not be observed.

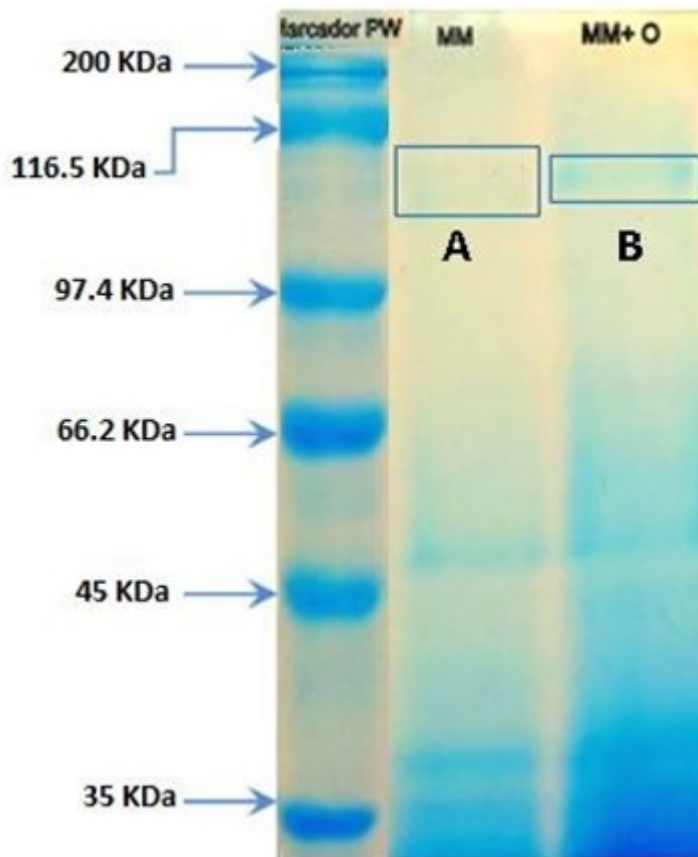


Figura 5. Electroforesis en condiciones desnaturalizantes de los extractos crudos de las levaduras de *U. maydis* tratadas en (MM) Medio mínimo, (MM+O) Medio mínimo más oligoquitosano 1 mg/mL. A) Banda correspondiente a la enzima catalasa-peroxidasa de *U. maydis* crecida en MM. B) Banda correspondiente a la enzima catalasa-peroxidasa de *U. maydis* crecida en MM con oligoquitosano a 1 mg/mL.

Figure 5. SDS-PAGE of crude extracts of *U. maydis* yeasts treated in (MM) Minimal medium, (MM+O) Minimal medium plus oligochitosan 1 mg/mL. A) Band corresponding to the enzyme catalase-peroxidase of *U. maydis* grown in MM. B) Band corresponding to the enzyme catalase-peroxidase of *U. maydis* grown in MM with oligochitosan at 1 mg/mL

DISCUSIÓN

Diversas investigaciones han reportado el uso del oligoquitosano como una alternativa para inhibir el crecimiento de agentes fitopatógenos, sin embargo, el mecanismo por el cual ejerce su efecto antifúngico sigue sin conocerse en su totalidad (Li et al., 2020). El efecto de la concentración del oligoquitosano sobre el crecimiento de *U. maydis*, demostró que este fitopatógeno es susceptible a la interacción con este compuesto a bajas concentraciones. Los resultados obtenidos en esta investigación son similares a los obtenidos en *Fusarium graminearum* en el cual se observó la inhibición del crecimiento del fitopatógeno en un 50%, a una concentración de 1.086 mg/mL de oligoquitosano, mientras que en *F. oxysporum* se observó una inhibición del

DISCUSSION

Several works have reported the use of oligochitosan as an alternative to inhibit the growth of phytopathogens, however, the mechanism by this activity remains not fully known (Li et al., 2020). The effect of oligochitosan concentration on the growth of *U. maydis*, showed that this phytopathogen is susceptible to interaction with this compound at low concentrations. The results obtained in this research are similar to those obtained in *Fusarium graminearum* in which inhibition of the growth of the phytopathogen was observed by 50%, at a concentration of 1.086 mg/mL of oligochitosan, while in *F. oxysporum* a growth inhibition was more than 90% at a concentration of 2 mg/mL (Xu et al., 2007). This results indicate that the effects of oligochitosan depend on

crecimiento en más del 90% a una concentración de 2 mg/mL (Xu et al., 2007). Los resultados anteriores indican que los efectos del oligoquitosano dependen de las características de cada hongo en estudio, como puede ser la configuración de su pared y membrana celular, la concentración y proporción de quitina y quitosano de la pared celular o el tiempo de enzimas hidrolíticas que pueda generar.

La presencia de oligoquitosano puede llevar a la muerte celular a una concentración de 2 mg/mL. La disminución en la viabilidad celular observada en *U. maydis* por la presencia de oligoquitosano podría estar asociada a cambios críticos en la morfología celular asociados a modificaciones en la pared celular. Experimentos realizados en *Candida albicans* (Kulikov et al., 2014) y *Rhizopus stolonifer* (Robles-Martínez et al., 2014) mostraron daños en la superficie celular y ensanchamiento de la pared celular similar a los observado en *U. maydis* mostrados en la figura 1 y que previamente ya se habían reportado (Olicón-Hernández et al., 2015). En contraste, otros hongos como *Trichophyton rubrum* parecen responder diferente al tratamiento con oligoquitosano denotándose un adelgazamiento en la pared celular, lo que resalta una vez más que el efecto depende de cada modelo de estudio (Liang et al., 2018).

El aumento en el consumo de oxígeno por parte de *U. maydis* durante su crecimiento en presencia de oligoquitosano ya ha sido reportado previamente (Olicón-Hernández et al., 2015). Sin embargo, no se determinó si el aumento en la velocidad de consumo de oxígeno estaba relacionado con la presencia de especies reactivas de oxígeno. El aumento en las actividades enzimáticas de la SOD y catalasa- peroxidasa, así como una mayor banda de peso molecular entre 97 y 116 kDa similar al peso molecular reportado para esta enzima en *U. maydis*, sugieren el aumento en la formación de ROS debido a la presencia de oligoquitosano (Olicón-Hernández et al., 2017; Sierra-Campos & Pardo, 2009). La producción de ROS está directamente relacionada con un incremento en las actividades de las enzimas detoxificadoras como la SOD, catalasa, peroxidasa, ascorbato peroxidasa, entre otras (Deng et al., 2015).

Este aumento en las concentraciones de ROS en plantas se ha asociado a la internalización del oligoquitosano, el cual transmite una cascada de señalizaciones, que, aunque no ha sido descrita en su totalidad, involucra la elevación de la concentración de Ca^{+2} , producción de ácido jasmónico, ácido salicílico y ácido abscísico 24 h después del tratamiento con oligoquitosano además de la producción de ROS y del óxido nítrico (NO) (Klusener et al., 2002).

Los resultados obtenidos en estos modelos proponen que el oligoquitosano estimula la formación de ROS con el

the characteristics of each fungi model, such as the configuration of its cell wall and membrane, the concentration and proportion of chitin and chitosan in the cell wall or the time of hydrolytic enzymes it can generate.

The presence of oligochitosan can lead to cell death at a concentration of 2 mg/mL. The decrease in cell viability observed in *U. maydis* due to the presence of oligochitosan could be associated with critical changes in cell morphology associated with modifications in the cell wall. Experiments performed in *Candida albicans* (Kulikov et al., 2014) and *Rhizopus stolonifer* (Robles-Martínez et al., 2014) showed cell surface damage and cell wall widening similar to those observed in *U. maydis* (Figure 1) and previously reported (Olicón-Hernández et al., 2015). In contrast, other fungi such as *Trichophyton rubrum* seem to respond differently to treatment with oligochitosan denoting a thinning in the cell wall, which highlights once again that the effect depends on each study model (Liang et al., 2018).

The increase in oxygen consumption by *U. maydis* during its growth in the presence of oligochitosan has already been previously reported (Olicón-Hernández et al., 2015). However, it was not determined whether the increase in the rate of oxygen consumption was related to the presence of reactive oxygen species. The increase in the enzymatic activities of SOD and catalase-peroxidase, as well as a higher molecular weight band between 97 and 116 kDa similar to the molecular weight reported for this enzyme in *U. maydis*, suggest the increase in the formation of ROS due to the presence of oligochitosan (Olicón-Hernández et al., 2017; Sierra-Campos & Pardo, 2009). The production of ROS is directly related to an increase in the activities of detoxifying enzymes such as SOD, catalase, peroxidase, ascorbate peroxidase, among others (Deng et al., 2015).

This increase in ROS concentrations in plants has been associated with the internalization of oligochitosan, which transmits a cascade of signals, which, although not fully described, involves the elevation of Ca^{+2} concentration, production of jasmonic acid, salicylic acid and abscisic acid 24 h after treatment with oligochitosan in addition to the production of ROS and nitrous oxide (NO) (Klusener et al., 2002).

The results obtained in these models propose that oligochitosan stimulates the formation of ROS with the resulting increase in the activity of detoxifying enzymes such as SOD and catalase-peroxidase. All these enzymes have been described as part of the protective system of *U. maydis* (Sierra-Campos & Pardo, 2009), against the stress generated by the oligochitosan.

resultante aumento de la actividad de enzimas detoxificantes como la SOD y catalasa-peroxidasa. Todas estas enzimas han sido descritas como parte del sistema protector de *U. maydis* (Sierra-Campos & Pardo, 2009), frente al estrés generado por el oligoquitosano.

CONCLUSIONES

U. maydis se ve afectado por la presencia del oligoquitosano reduciendo su biomasa y viabilidad celular. El estrés ocasionado por la presencia de este antifúngico natural podría estar relacionado con la presencia de ROS, lo que origina un aumento significativo en la actividad de la enzima SOD y la hidrólisis del peróxido de hidrógeno por la enzima catalasa-peroxidasa. Estos resultados contribuyen a conocer con mayor claridad el mecanismo del oligoquitosano utilizado como antifúngico.

AGRADECIMIENTOS

Al instituto politécnico nacional y a la escuela nacional de ciencias biológicas campus santo tomás por las facilidades para la realización de este trabajo. la presente investigación fue financiada por conacyt número de proyecto 256520 y por la secretaria de investigación y posgrado (sip-ipn) del instituto politécnico nacional a los proyectos 20220492 de droh y 20220487 de ggs.

CONCLUSIONS

U. maydis is affected by the presence of oligochitosan reducing its biomass and cell viability. The stress caused by the presence of this natural antifungal could be related to the presence of ROS, which causes a significant increase in the activity of the SOD enzyme and the hydrolysis of hydrogen peroxide by the enzyme catalase peroxidase. These results contribute to a clearer understanding of the mechanism of oligochitosan used as an antifungal.

ACKNOWLEDGEMENTS

To the IPN and ENCB Santo Tomás campus for the facilities for carrying out this work. This research was funded by CONACYT project number 256520 and by the Secretaría de Investigación y Posgrado (SIP-IPN) of IPN by the projects 20220492 of DROH and 20220487 of GGS.

Referencias

- Arthikala, M.-K., Montiel, J., Sánchez-López, R., Nava, N., Cárdenas, L. & Quinto, C. 2017. Respiratory Burst Oxidase Homolog Gene A Is Crucial for Rhizobium Infection and Nodule Maturation and Function in Common Bean. *Frontiers in Plant Science*, 8, 1-15. doi:10.3389/fpls.2017.02003. [10.3389/fpls.2017.02003](https://doi.org/10.3389/fpls.2017.02003)
- Chakraborty, M., Hasanuzzaman, M., Rahman, M., Khan, M. A. R., Bhowmik, P., Mahmud, N. U., Tanveer, M. & Islam, T. 2020. Mechanism of Plant Growth Promotion and Disease Suppression by Chitosan Biopolymer. *Agriculture*, 10, 624. <https://doi.org/10.3390/agriculture10120624>
- Deng, L., Zeng, K., Zhou, Y. & Huang, Y. 2015. Effects of postharvest oligochitosan treatment on anthracnose disease in citrus (*Citrus sinensis* L. Osbeck) fruit. *European Food Research and Technology*, 240, 795-804. <https://doi.org/10.1007/s00217-014-2385-7>
- Felz, S., Vermeulen, P., Van Loosdrecht, M. C. M. & LIN, Y. M. 2019. Chemical characterization methods for the analysis of structural extracellular polymeric substances (EPS). *Water Research*, 157, 201-208. [10.1016/j.watres.2019.03.068](https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.03.068)
- Grande-Tovar, C. D., Chaves-Lopez, C., Serio, A., Rossi, C. & Paparella, A. 2018. Chitosan coatings enriched with essential oils: Effects on fungi involved in fruit decay and mechanisms of action. *Trends in Food Science & Technology*, 78, 61-71. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.05.019>
- Hosseinnejad, M. & Jafari, S. M. 2016. Evaluation of different factors affecting antimicrobial properties of chitosan. *International Journal of Biological Macromolecules*, 85, 467-475. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.01.022>
- Kapoor, D., Singh, S., Kumar, V., Romero, R., Prasad, R. & Singh, J. 2019. Antioxidant enzymes regulation in plants in reference to reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS). *Plant Gene*, 19, 100182. <https://doi.org/10.1016/j.plgene.2019.100182>
- Klusener, B., Young, J. J., Murata, Y., Allen, G. J., Mori, I. C., Hugouvieux, V. & Schroeder. 2002. Convergence of calcium signaling pathways of pathogenic elicitors and abscisic acid in *Arabidopsis guard* cells. *Plant Physiology*, 130, 2152-2163. [10.1104/pp.012187](https://doi.org/10.1104/pp.012187)
- Kulikov, S. N., Lisovskaya, S. A., Zelenikhin, P. V., Bezrodnikh, E. A., Shakirova, D. R., Blagodatskikh, I. V. & Tikhonov, V. E. 2014. Antifungal activity of oligochitosans (short chain chitosans) against some *Candida* species and clinical isolates of *Candida albicans*: Molecular weight-activity relationship. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 74, 169-178. [10.1016/j.ejmech.2013.12.017](https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2013.12.017)
- Li, R., Jia, Z. & Trush. 2016. Defining ROS in biology and medicine. *React Oxyg Species (Apex)* 1, 9. [10.20455/ros.2016.803](https://doi.org/10.20455/ros.2016.803)
- Li, T., Zhang, Y., Xu, M., Liu, Y., Zhang, C., Zhang, Y., Peng, X., Li, Z., Qin, S. & Xing, K. 2020. Novel antifungal mechanism of oligochitosan by triggering apoptosis through a metacaspase-dependent mitochondrial pathway in *Ceratocystis fimbriata*. *Carbohydrate Polymers*, 245, 116574. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116574>
- Liang, S., Sun, Y. & Dai, X. 2018. A review of the preparation, analysis and biological functions of chitoooligosaccharide. *International Journal of Molecular Sciences*, 19, 2197. [10.3390/ijms19082197](https://doi.org/10.3390/ijms19082197)
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 193, 265-75.
- Mittler, R. 2017. ROS Are Good. *Trends in Plant Science*, 22, 11-19. [10.1016/j.tplants.2016.08.002](https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.08.002)
- Nowogórska, A. & Patykowski, J. 2014. Selected reactive oxygen species and antioxidant enzymes in common bean after *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola and *Botrytis cinerea* infection. *Acta Physiologiae Plantarum*, 37, 1725. doi:10.1007/s11738-014-1725-3.
- Olicón-Hernández, D. R., Araiza-Villanueva, M. G., Pardo, J. P., Aranda, E. & Guerra-Sánchez. 2019. New insights of *Ustilago maydis* as yeast model for genetic and biotechnological research: A review. *Current Microbiology*, 1, 1-10. [10.1007/s00284-019-01629-4](https://doi.org/10.1007/s00284-019-01629-4)
- Olicón-Hernández, D. R., Giraud, L. F. Z. & Guerra-Sánchez, G. 2017a. Current Applications of Chitosan and Chito-Oligosaccharides . A Review. *Journal of Drug Design and Research*.

- Olicón-Hernández, D. R., Hernández-Lauzardo, A. N., Pardo, J. P., Peña, A., Velázquez-Del Valle, M. G. & Guerra-Sánchez, G. 2015. Influence of chitosan and its derivatives on cell development and physiology of *Ustilago maydis*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 79, 654-660. [10.1016/j.ijbiomac.2015.05.057](https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.05.057)
- Olicón-Hernández, D. R., Uribe-Alvarez, C., Uribe-Carvajal, S., Pardo, J. P. & Guerra-Sánchez, G. 2017b. Response of *Ustilago maydis* against the Stress Caused by Three Polycationic Chitin Derivatives. *Molecules*, 22, 1745. [10.3390/molecules22121745](https://doi.org/10.3390/molecules22121745)
- Passardi, F., Theiler, G., Zamocky, M., Cosio, C., Rouhier, N., Teixeira, F., & Dunand, C. 2007. PeroxiBase: the peroxidase database. *Phytochemistry*, 68, 1605-1611. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2007.04.005>
- Paoletti, F., Aldinucci, D., Mocali, A. & Caparrini. 1986. A sensitive spectrophotometric method for the determination of superoxide dismutase activity in tissue extracts. *Analytical Biochemistry*, 154, 536-541. [10.1016/0003-2697\(86\)90026-6](https://doi.org/10.1016/0003-2697(86)90026-6)
- Robles-Martínez, L., Guerra-Sánchez, M. G., Hernández-Lauzardo, A. N., Pardo, J. P. & Velázquez-Del Valle, M. G.. 2014. Effects of chitosan and oligochitosan on development and mitochondrial function of *Rhizopus stolonifer*. *Journal of Basic Microbiology*, 54, S42-S49. [10.1002/jobm.201300790](https://doi.org/10.1002/jobm.201300790)
- Sierra-Campos, E. & Pardo, J. P. 2009. The relationship between the antioxidant system and the virulence in *Ustilago maydis*, a fungal pathogen. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 51, 7-17.
- Srinivas, U. S., Tan, B. W. Q., Vellayappan, B. A. & Jeyasekharan, A. D. 2019. ROS and the DNA damage response in cancer. *Redox Biology*, 25, 101084. [10.1016/j.redox.2018.101084](https://doi.org/10.1016/j.redox.2018.101084)
- Verlee, A., Mincke, S. & Stevens, C. V. 2017. Recent developments in antibacterial and antifungal chitosan and its derivatives. *Carbohydrate Polymers*, 164, 268-283. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.02.001>
- Wang, T.-S., Lin, C.-P., Chen, Y.-P., Chao, M.-R., Li, C.-C. & Liu, K.-L. 2018. CYP450-mediated mitochondrial ROS production involved in arecoline N-oxide-induced oxidative damage in liver cell lines. *Environmental Toxicology*, 33, 1029-1038. [10.1002/tox.22588](https://doi.org/10.1002/tox.22588)
- Xu, J., Zhao, X., Han, X., Du, Y. 2007. Antifungal activity of oligochitosan against *Phytophthora capsici* and other plant pathogenic fungi in vitro. *Biochemistry and Physiology*, 87, 220-228. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2006.07.013>
- Zavala-Moreno, A., Arreguin-Espinosa, R., Pardo, J. P., Romero-Aguilar, L., Guerra-Sánchez, G. 2014. Nitrogen source affects glycolipid production and lipid accumulation in the phytopathogen fungus *Ustilago maydis*. *Advances in Microbiology*, 4, 934. [10.4236/aim.2014.413104](https://doi.org/10.4236/aim.2014.413104)
- Zhang, Q., Zeng, G., Chen, G., Yan, M., Chen, A., Du, J., Huang, J., Yi, B., Zhou, Y., He, X. & He, Y. 2015. The Effect of Heavy Metal-Induced Oxidative Stress on the Enzymes in White Rot Fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 175, 1281-1293. [10.1007/s12010-014-1298-z](https://doi.org/10.1007/s12010-014-1298-z)