

# Determinación de quitina en hongos postcosecha y de quitinasas en frutos de papaya “Maradol”

## Determination of chitin in postharvest fungi and chitinases in fruit of papaya “Maradol”

**Jesús Armando Lucas-Bautista, Silvia Bautista-Baños\***, Centro de Desarrollo de Productos Bióticos, Instituto Politécnico Nacional, Carretera Yautepec-Jojutla, Km 6, calle Ceprobi No. 8, CP 62731, Yautepec, Morelos, México. **Rosa Isela Ventura-Aguilar**, CONACYT-Centro de Desarrollo de Productos Bióticos, Instituto Politécnico Nacional, Carretera Yautepec-Jojutla, Km 6, calle Ceprobi No. 8, CP 62731, Yautepec, Morelos, México. **Marlenne Gómez-Ramírez**, Centro de Investigación de Ciencias Aplicadas y Tecnología Avanzada, Instituto Politécnico Nacional, Cerro Blanco No. 141 Colonia Colinas del Cimatario, C.P. 76090, Querétaro, México. \*Autor de correspondencia: sbautis@ipn.mx

**Recibido:** 19 de Febrero, 2019.

**Aceptado:** 29 de Marzo, 2019.

Lucas-Bautista JA, Bautista-Baños S, Ventura-Aguilar RI y Gómez-Ramírez M. 2019. Determinación de quitina en hongos postcosecha y de quitinasas en frutos de papaya “Maradol”. *Revista Mexicana de Fitopatología* 37 (No. Esp. 1): 1-7.

**DOI:** 10.18781/R.MEX.FIT.1902-3.

**Resumen.** La quitina es un biopolímero que conforma la pared celular de hongos filamentosos la cual se degrada por quitinasas mediante la hidrólisis de sus enlaces  $\beta$ -1,4. El fruto de papaya es afectado por hongos que ocasionan pérdidas en el almacenamiento. Para su control, la detección debe ser rápida y oportuna; en este sentido, los biosensores podrían ser una opción al reconocer el analito que esté involucrado con su presencia, por ejemplo, como quitina y quitinasas. En este trabajo se cuantificó la quitina presente en hongos fitopatógenos que afectan a la papaya obteniendo valores estadísticamente significativos ( $p \leq 0.05$ ) entre 13%

(*Alternaria alternata*) y 37% (*Penicillium* sp.) de quitina de su biomasa total; asimismo, se determinó el contenido de quitinasas presentes en cáscara del fruto en cuatro estados de madurez. Los valores fueron significativamente diferentes ( $p \leq 0.05$ ): entre 12473 (0-25% coloración amarilla) y 15514 (100% coloración amarilla) unidades de quitinasa  $g^{-1}$  en muestras congeladas y entre 21085 (0% coloración amarilla) y 29457 (25% coloración amarilla) unidades de unidades de quitinasa  $g^{-1}$  en muestras liofilizadas. Estos valores forman parte de una primera etapa de reconocimiento de indicadores biológicos para el diseño de un biosensor para su aplicación en papaya.

**Palabras clave:** *Carica papaya* L, madurez, biosensores, indicadores, enzimas.

**Abstract.** Chitin is a biopolymer synthesized that conforms the cell wall of filamentous fungi and it

is degraded by chitinases, which hydrolyze their  $\beta$ -1,4 bonds. The papaya fruit is affected by fungi that cause losses in storage. For their control, the detection must be fast and timely; in this sense, biosensors could be an option when recognizing the analyte that is involved with their presence, for example, as chitin and chitinases. In this work, the chitin obtained from phytopathogenic fungi that affects the papaya was quantified obtaining statistically significant values ( $p \leq 0.05$ ) of 13 (*Alternaria alternata*) and 37% (*Penicillium* sp.) of chitin from its total biomass; likewise, the content of chitinases present in the fruit's peel was determined in four stages of maturity. The values were significantly different ( $p \leq 0.05$ ) from 12473 (0-25% surface yellow color) to 15514 (100 % yellow color) units of chitinase g-1 in the frozen samples and from 21085 (0% yellow color) to 29457 (25% yellow color) units of chitinase g-1 in lyophilized samples. These values are part of a first stage of recognition of biological indicators for the design of a biosensor for application in papaya.

**Key words:** *Carica papaya* L, ripening, biosensors, indicators, enzyme.

La quitina es el segundo biopolímero más abundante en la naturaleza, después de la celulosa. Un gran número de organismos la sintetizan y se encuentra, entre otros, en la cutícula de insectos, huevos de nematodos, arácnidos y exoesqueleto de crustáceos e invertebrados. Es componente primordial en la pared celular de los hongos y está compuesto de moléculas de N-acetil-D-glucosamina unidas por enlaces  $\beta$ -1,4 (Hamid *et al.*, 2013). A pesar de su gran estabilidad química y térmica, la quitina es susceptible a la acción de enzimas quitinolíticas (Ramírez *et al.*, 2010). Las quitinasas (EC 3.2.1.14) son enzimas de tipo glucósido-hidrolasas

que catalizan la hidrólisis de los enlaces  $\beta$ -1,4 en quitina y quito-oligómeros de cadena corta (Seidl, 2008) y tienen diferentes funciones acorde al organismo de origen; en plantas forman parte de su mecanismos de defensa ante el ataque de fitopatógenos que, al entrar en contacto con la planta, generan una serie de señalizaciones que van hacia el núcleo de la célula donde se sintetizan quitinasas que degradan la quitina de la pared de los microorganismos y provocan su lisis (Kumar *et al.*, 2018). El fruto de papaya puede ser severamente afectado por complejos fúngicos, entre los que se han identificado a *Alternaria alternata*, *Aspergillus niger*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium solani*, *Penicillium digitatum* y *Rhizopus stolonifer*, entre otros (Bautista-Baños *et al.*, 2013) (Figura 1 a-d). Algunos de ellos mantienen sus esporas en estado latente durante la etapa de crecimiento del fruto y se desarrollan completamente cuando encuentran las condiciones adecuadas en la maduración, provocando pérdidas cuantiosas durante el almacenamiento y comercialización (Guédez *et al.*, 2014). Actualmente, el control de hongos fitopatógenos involucra que su detección sea rápida, eficaz y oportuna (Pinzón-Gutiérrez *et al.*, 2013); sin embargo, los métodos tradicionales para dicha acción no cumplen con las características para evitar pérdidas del producto. En este sentido, los biosensores son una opción para la predicción temprana de enfermedades ya que pueden ser capaces de detectar en tiempo real la presencia de microorganismos patógenos de manera eficaz. Los indicadores biológicos como enzimas, material genético y anticuerpos, entre otros, pueden asociarse a la presencia de patógenos que podrían ser de utilidad como biomarcadores del sensor, ya que éstos se componen de un analito biológico de reconocimiento asociado a un sistema de transducción que envía la señal obtenida de la interacción con el analito (Martinkova *et al.*, 2017). Ejemplo de ello, es el trabajo realizado

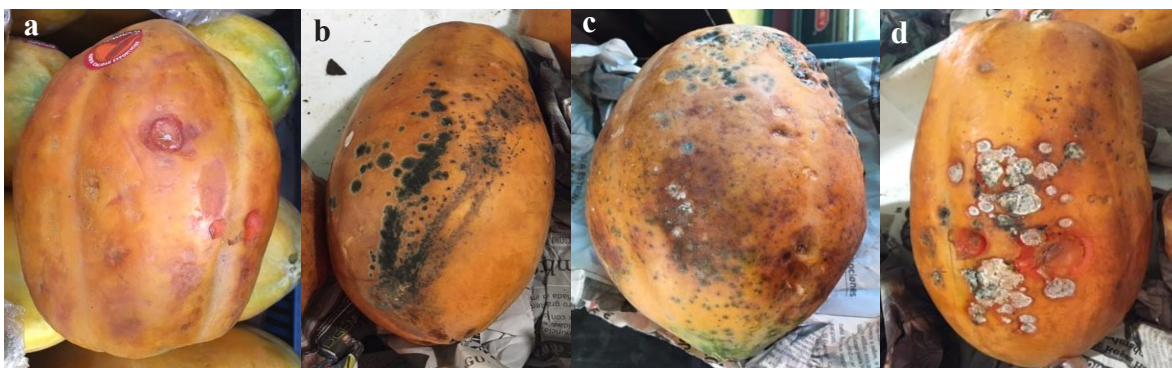


Figura 1. Principales microorganismos postcosecha de la papaya: a) *C. gloeosporioides*, b) *A. niger*, c) *Penicillium* sp., d) *A. alternata*.

por Wandermur *et al.* (2014) quienes fabricaron un biosensor de fibra óptica para detectar células de *Escherichia coli* en concentraciones de  $10^4$  y  $10^8$  UFC en menos de 10 min; asimismo, Khaledian *et al.* (2017) desarrollaron un biosensor a base de nanopartículas de oro para detectar el ADN genómico de *Ralstonia solanacearum* en suelo. Actualmente, no se conocen biosensores capaces de reconocer hongos fitopatógenos en frutos de papaya. El objetivo de este trabajo fue evaluar el contenido de quitina en los principales hongos postcosecha de la papaya y la presencia de quitinasas en frutos de diferentes estados de madurez, como parte de una primera etapa de reconocimiento de indicadores biológicos que permitan el diseño de un biosensor para su aplicación en papaya.

**Obtención del inóculo.** Los hongos evaluados fueron *Alternaria alternata*, *Aspergillus niger*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium solani*, *Penicillium* sp. y *Rhizopus stolonifer*; los cuales se obtuvieron del cepario del Laboratorio de Tecnología Postcosecha de Productos Agrícolas del Centro de Desarrollo de Productos Bióticos. Los hongos se incubaron en medio papa dextrosa agar (PDA) en cajas Petri de 10 cm a 20-25 °C de 4 a 12 días de crecimiento dependiendo del patógeno.

**Cuantificación de quitina de hongos presentes en frutos de papaya.** La cuantificación de quitina se realizó siguiendo las técnicas de Maghsoodi *et al.* (2009) y Kumaresapillai *et al.* (2011) con modificaciones, y consistió en los siguientes pasos:

**1. Cultivo de hongos.** Se obtuvo el micelio de 4 cajas de cada cepa de hongo previamente incubado, bajo condiciones estériles con un asa bacteriológica y se colocó en un tubo cónico Falcon™ con 40 mL de agua desionizada estéril. Cada solución se centrifugó a 4629 g (Eppendorf Centrifuge 5804 R, Eppendorf International, USA) durante 10 min. Se utilizó la pastilla de micelio al cual se le agregó 12.5 mL de agua desionizada sometiéndolo a agitación en un agitador orbital (Vortex-Genie-2) y se empleó perlas de vidrio para fragmentar el micelio. Posteriormente, se agregó el contenido del tubo ( $4 \times 10^4$  a  $2 \times 10^5$  células), en matraz Erlenmeyer de 1 L, conteniendo 450 mL de medio sacarosa (1 L de agua desionizada: 100 g de sacarosa, 1.5 g de  $\text{NaNO}_3$ , 0.5 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.025 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.025 g de KCl y 1.6 g de extracto de levadura) y se dejó en agitación a 140 rpm (labtron HZO 3:10, UK) durante 72 h a 32 °C.

**2. Obtención de micelio.** En cámara de flujo laminar, bajo condiciones estériles, se colectó el micelio

de cada hongo por filtración al vacío con ayuda de papel filtro Whatman No.1 y embudo de porcelana haciendo lavados continuos con agua desionizada hasta obtener un filtrado claro. La biomasa obtenida se colocó en una caja Petri y se dejó secar en estufa bacteriológica (Luzeren, modelo DHG9030A) a 63 °C hasta tener peso constante.

**3. Extracción de quitina.** Asépticamente, 0.1 g de micelio se transfirió a matraces con 5 mL de NaOH al 1M, llevándose a 110 °C durante 15 min en autoclave. El material alcalino resultante se colectó y centrifugó a 4629 g durante 10 min. Se lavó con agua desionizada hasta obtener un pH 7. Posteriormente, el material se enjuagó con etanol absoluto (marca CH, México) (1:20 p/v) y luego con acetona (Golden Bell, USA) (1:20). Finalmente, el material obtenido se secó en cajas Petri en estufa bacteriológica a 63 °C hasta obtener un peso constante. Los resultados obtenidos de la cuantificación de quitina de hongos en frutos de papaya se expresaron como el porcentaje de quitina presente en cada hongo.

**Determinación de quitinasas en cáscaras de papaya. Material biológico.** Se cosecharon frutos de papaya de la variedad Maradol en huertos de Teteman, Morelos, México, en 4 estados de madurez: 0% (ausencia de color amarillo), 25% (1/4 coloración amarillo), 50% (1/2 coloración amarillo) y 100% (totalmente amarillo) (Norma Mexicana NMX-FF-041-SCFI-2007). Se cosecharon 4 frutos por cada estado de madurez haciendo un total de 16 muestras. Se recuperó la cáscara de cada fruto y se cortó en porciones de 1-2 mm de espesor; la mitad se congeló a -72 °C y la restante se liofilizó almacenándose hasta su uso. La obtención del extracto enzimático se realizó siguiendo la técnica descrita por Glibota *et al.* (2000) con algunas modificaciones y la determinación de quitinasas por el método descrito por Gómez-Ramírez *et al.* (2001) y consistió en los siguientes pasos:

**1. Obtención de extracto enzimático.** Se maceraron en mortero 40 g de cáscara congelada agregándole 60 mL de buffer  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ -ácido cítrico (Fermont, México) 0.05 N a pH 7. La mezcla resultante se filtró con papel filtro Whatman No.1 y el sobrenadante se centrifugó a 1157 g durante 10 min. Adicionalmente, siguiendo el mismo protocolo de obtención de extracto enzimático y con el objetivo de determinar la diferencia entre el almacenamiento de muestras, 0.5 g de cáscara liofilizada se maceró con 20 mL de buffer fosfato-ácido cítrico.

**2. Reacción enzimática.** Se tomó como sustrato quitina coloidal comercial al 10% suspendida en buffer de fosfatos 0.2 M a pH 6.5. Se mezcló 1 mL del extracto enzimático con 1 mL de quitina coloidal en tubos cónicos Falcon™ para realizar la reacción dejándolos en incubación a 37 °C durante 1 h en estufa para después detener la reacción con 1 mL de NaOH al 1%. Posteriormente, la mezcla se centrifugó a 6300 g durante 10 min.

**3. Medición de la actividad enzimática.** De los sobrenadantes, se determinó el contenido de azúcares reductores tanto del extracto enzimático como de la reacción enzimática mezclando en tubo de ensayo 1 mL de muestra y 1 mL de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS, Sigma-Aldrich, USA) sometiéndose a baño María en ebullición durante 5 min para la reacción; transcurrido el tiempo, los tubos se colocaron en agua fría. Finalmente, se observó su absorbancia a 535 nm en espectrofotómetro (Thermo scientific Genesis 10S UV-VIS, USA). Las determinaciones de cada estado de madurez se hicieron por triplicado en cáscaras liofilizadas y congeladas. El valor de unidades quitinasa por gramo de muestra ( $\text{UQ g}^{-1}$ ), correspondientes a peso fresco en cáscaras congeladas y a peso seco en cáscaras liofilizadas, se calculó como una diferencia entre el contenido de azúcares reductores de la reacción enzimática y el contenido de azúcares reductores del extracto



enzimático y se cuantificaron mediante una curva estándar de N-acetilglucosamina (NAG, Sigma-Aldrich, USA) de 0 a 8 mmol mL<sup>-1</sup>. Una unidad de quitinasa se definió como la cantidad de enzima que catalizó la liberación de 1 mmol de NAG dentro de las condiciones experimentales usadas. Los datos se analizaron mediante un ANOVA y prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ ).

En el Cuadro 1 se muestra el porcentaje de quitina de cada uno de los hongos estudiados. Se obtuvieron diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) en el contenido de la quitina entre los hongos. En general, el valor promedio de quitina estuvo en el rango de 13% a 37%. El valor mínimo correspondió a *A. alternata* y el máximo a *Penicillium* sp. Con relación a la cantidad de quitinasas, hubo diferencias significativas entre los estados de madurez ( $p \leq 0.05$ ). En general, en promedio se observó mayor contenido en las cáscaras de los frutos que se liofilizaron (25632.82 UQ g<sup>-1</sup>) que en las cáscaras que fueron congeladas (14,040 UQ g<sup>-1</sup>). En la Figura 2a se muestra, a excepción del estado de madurez de 0% y 25%, aumento en el contenido de las quitinasas en los estados de mayor madurez del fruto (50 y 100%). Con relación a la Figura 2b, la mayor producción de quitinasas correspondió al estado de madurez de 25% (c.a 29,000 UQ g<sup>-1</sup>).

**Cuadro 1. Determinación de quitina en algunos hongos presentes en frutos de papaya durante el almacenamiento.**

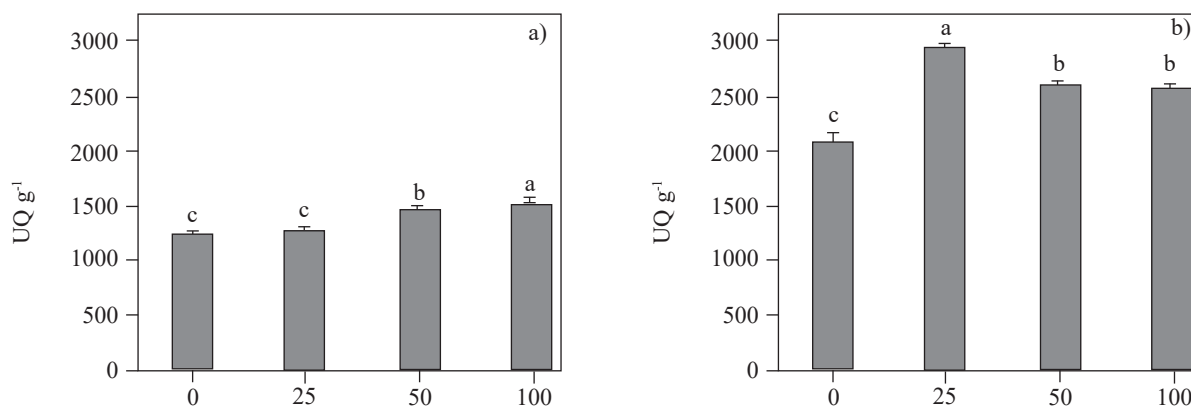
Hongo	Quitina (%) <sup>x</sup>
<i>Alternaria alternata</i>	13.0±3.6 <sup>c</sup>
<i>Aspergillus niger</i>	21.67±2.3 <sup>b</sup>
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	20.67±1 <sup>bc</sup>
<i>Fusarium solani</i>	24.0±3.4 <sup>b</sup>
<i>Penicillium</i> sp.	37.33±3 <sup>a</sup>
<i>Rhizopus stolonifer</i>	17.33±2.3 <sup>bc</sup>

<sup>x</sup>Letras diferentes en las columnas indican diferencias significativas. Prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ ); resultados expresados como media ± desviación estándar.

Existen pocas investigaciones asociadas con el contenido de quitina en hongos; sin embargo, los valores que se obtuvieron en este estudio concuerdan con los presentados por Blumenthal y Roseman (1957). Estos autores reportaron valores de 11.5% en el género *Alternaria* sp. y 22.4% en *Aspergillus flavus*. Por su parte, Arbia *et al.* (2013) reportaron en *Mucor rouxii* y *Lactarius vellereus* valores correspondientes a 44.5 y 19%, respectivamente.

Por otro lado, existe una diferencia de casi el doble en la cantidad de quitinasas presentes en la cáscara congelada respecto a la liofilizada. Esto puede deberse a que las muestras liofilizadas conservan mejor las propiedades fisicoquímicas de los alimentos (Ayala *et al.*, 2010); además, las muestras congeladas contienen más agua que las liofilizadas, presentando un menor contenido en materia seca, que es donde se localiza a la enzima y, en consecuencia, su cuantificación fue menor. Sobre este tema, Yabuki *et al.* (1986) reportaron actividad de quitinasas de 887 UI mg<sup>-1</sup> de proteína en la bacteria *Aeromonas hydrophila* cuando se incubó en caldo nutritivo y se analizó después de un proceso de congelación de la muestra, siendo este, un método favorable para mantener la actividad de esta enzima de acuerdo con los autores.

Por otra parte, en las muestras congeladas, el contenido de quitinasas aumentó de forma paralela al estado de madurez. Al respecto, Sánchez-García *et al.* (2012) reportaron que conforme el fruto madura, se promueve de igual forma el desarrollo de los hongos, los cuales pudieran encontrarse en estado latente y como un mecanismo de protección, se sintetizan quitinasas para protegerlo. A la fecha, no existen estudios asociados con la producción de quitinasas respecto a los dos métodos de obtención utilizados en este estudio. En las muestras liofilizadas, de las papayas con ¼ de coloración amarilla, se obtuvo el mayor contenido de quitinasas. Esto pudo deberse al mismo estado activo de crecimiento,



**Figura 2.** Contenido de quitinasas en cáscara de papaya variedad Maradol, a) congeladas y b) liofilizadas, de 4 estados de madurez: 0% = ausencia de color amarillo, 25% = 1/4 coloración amarillo, 50% = 1/2 coloración amarillo y 100% = totalmente amarillo. Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas. Prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ ); resultados expresados como media  $\pm$  desviación estándar. UQ  $g^{-1}$  = Unidades de quitinasa por gramo de muestra.

desarrollo y maduración del fruto (Bryant y Julkunen-Tiitto, 1995), además, a un posible proceso de infección por microorganismos (Xu *et al.*, 2016). Sobre este tema, Yan *et al.* (2008) reportaron que la actividad de quitinasa se correlaciona directamente con la microestructura y proporción de quitina en la pared celular de los hongos con los que interactúa.

En conclusión, en este estudio, los valores que se obtuvieron tanto de la quitina presente en los hongos fitopatógenos y de las quitinasas en el fruto de papaya podrían servir como indicadores biológicos de la presencia de hongos en la papaya para su uso como marcadores para el diseño de un biosensor. Sin embargo, aún es necesario realizar estudios similares en diferentes patosistemas de la papaya cubriendo sus diferentes estados fenológicos.

## LITERATURA CITADA

- Arbia W, Arbia L, Adour L and Amrane A. 2013. Chitin extraction from crustacean shells using biological methods—a review. *Food Technology and Biotechnology* 51: 12-25. <https://search.proquest.com/docview/1436089273?pq-origsite=gscholar>
- Ayala AA, Serna L y Mosquera E. 2010. Liofilización de pitahaya amarilla (*Selenicereus megalanthus*). *Vitae* 17: 121-127. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=169815396002>
- Bautista-Baños S, Sivakumar D, Bello-Pérez A, Villanueva-Arce R and Hernández-López M. 2013. A review of the management alternatives for controlling fungi on papaya fruit during the postharvest supply chain. *Crop Protection* 49: 8-20. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2013.02.011>
- Blumenthal HJ and Roseman S. 1957. Quantitative estimation of chitin in fungi. *Journal of Bacteriology* 74: 222-224. <https://jb.asm.org/content/jb/74/2/222.full.pdf>
- Bryant JP and Julkunen-Tiitto R. 1995. Ontogenic development of chemical defense by seedling resin birch: energy cost of defense production. *Journal of Chemical Ecology* 21: 883-896. <https://doi.org/10.1007/BF02033796>
- Glibota GS, Garro OA y Judis MA. 2000. Actividad proteolítica de restos del fruto de *Carica papaya*. *Comunicaciones Científicas y Tecnológicas-UNNE (Argentina)* 4p. [http://www.revistacyt.unne.edu.ar/unnevieja/Web/cyt/cyt/2000/8\\_exactas/e\\_pdf/e\\_022.pdf](http://www.revistacyt.unne.edu.ar/unnevieja/Web/cyt/cyt/2000/8_exactas/e_pdf/e_022.pdf)
- Gómez-Ramírez M, Rojas-Avelizapa LI and Cruz-Camarillo R. 2001. The chitinase of *Bacillus thuringiensis*. Pp: 273-282. In: Muzzarelli RAA (ed.). *Chitin Enzymology*. Atec, Ed. Italy. 614p.
- Guédez C, Cañizalez L, Avendaño L, Scorza J, Castillo C, Olivar R, Méndez Y y Sánchez L. 2014. Actividad antifúngica del aceite esencial de naranja (*Citrus sinensis* L.) sobre hongos postcosecha en frutos de lechosa (*Carica papaya* L.). *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología* 34: 81-85. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=199437912007>
- Hamid R, Khan MA, Ahmad M, Ahmad MM, Abdin MZ, Munsarrat J and Javed S. 2013. Chitinases: an update. *Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences* 5: 21-29. <https://doi.org/10.4103/0975-7406.106559>
- Khaledian S, Nikkhab M, Shams-Bakhsh M and Hoseinzadeh S. 2017. A sensitive biosensor based on gold nanoparticles to detect *Ralstonia solanacearum* in soil. *Journal of General Plant Pathology* 83: 231-239. <https://doi.org/10.1007/s10327-017-0721-z>

- Kumar M, Brar A, Yadav M, Chawade A, Vivekanand V and Pareek N. 2018. Chitinases—Potential candidates for enhanced plant resistance towards fungal pathogens. *Agriculture* 8: 88. <https://doi.org/10.3390/agriculture8070088>
- Kumaresapillai N, Basha RA and Sathish R. 2011. Production and evaluation of chitosan from *Aspergillus niger* MTCC strains. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research* 10: 553-558. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3813029/>
- Maghsoodi V, Razavi J and Yaghmaei S. 2009. Production of chitosan by submerged fermentation from *Aspergillus niger*. *Scientia Iranica. Transaction C, Chemistry, Chemical Engineering* 16: 145-148. <https://www.sid.ir/en/journal/ViewPaper.aspx?ID=164842>
- Pinzón-Gutiérrez YA, Bustamante SL y Buitrago-Hurtado G. 2013. Diagnóstico molecular diferencial *Colletotrichum gloeosporioides* y *Fusarium oxysporum* en ñame (*Dioscorea* sp.). *Revista Colombiana de Biotecnología* 15: 52-60. <http://bdigital.unal.edu.co/37763/>
- Ramírez MÁ, Rodríguez AT, Alfonso L y Peniche C. 2010. La quitina y sus derivados, biopolímeros con potencialidades de aplicación agrícola. *Biotecnología Aplicada* 27: 270-276. [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1027-28522010000400002](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1027-28522010000400002)
- Sánchez-García C, Cruz-Martín M, Alvarado-Capó Y, Rojas L, Leiva-Mora M, Acosta-Suarez M y Roque B. 2012. Detección y cuantificación de quitinasa en hojas de banano (*Musa* spp.) inoculadas con *Mycosphaerella fijiensis*. *Biotecnología Vegetal* 12: 119-124. <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/163>
- Seidl V. 2008. Chitinases of filamentous fungi: a large group of diverse proteins with multiple physiological functions. *Fungal Biology Reviews* 22: 36-42. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2008.03.002>
- Wandermur G, Rodrigues D, Allil R, Queiroz V, Peixoto R, Werneck M and Miguel M. 2014. Plastic optical fiber-based biosensor platform for rapid cell detection. *Biosensors and Bioelectronics* 54: 661-666. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2013.11.030>
- Xu J, Xu X, Tian L, Wang G, Zhang X, Wang X and Guo W. 2016. Discovery and identification of candidate genes from the chitinase gene family for *Verticillium dahliae* resistance in cotton. *Scientific Reports* 6: 1-12. <https://doi.org/10.1038/srep29022>
- Yabuki M, Mizushina K, Amatatsu T, Ando A, Jujii T, Shimada M and Yamashita M. 1986. Purification and characterization of chitinase and chitobiase produced by *Aeromonas hydrophila* subsp. *Anaerogene* A52. *The Journal of General and Applied Microbiology* 32: 25-38. <https://doi.org/10.2323/jgam.32.25>
- Yan R, Hou J, Ding D, Guan W, Wang C, Wu Z and Li M. 2008. *In vitro* antifungal activity and mechanism of action of chitinase against four plant pathogenic fungi. *Journal of Basic Microbiology* 48: 293-301. <https://doi.org/10.1002/jobm.200700392>