

**UNIVERSIDAD DE LA HABANA**

**FACULTAD DE BIOLOGÍA**

**INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS AGRÍCOLAS**

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGIA Y BIOQUÍMICA VEGETAL

**QUITOSANAS EN LA INHIBICIÓN IN VITRO DE  
*Phytophthora nicotianae* Breda de Haan Y EN LA  
INDUCCIÓN DE RESISTENCIA EN PLANTAS DE TABACO  
(*Nicotiana tabacum* L.) CONTRA ESTE PATÓGENO**

Tesis presentada en opción al grado científico de  
Doctor en Ciencias Biológicas

Autor: MSc. Alejandro B. Falcón Rodríguez

Tutores: Investigador Titular, Ondina León Díaz, Dr. C.  
Profesor Titular, Eduardo Ortega Delgado, Dr. C.

**La Habana  
2009**

## AGRADECIMIENTOS

Siento placer al escribir esta parte de la tesis porque me da una oportunidad única para expresar mi gratitud a colegas, amigos y familiares que me dieron su aliento, apoyo, amistad y amor durante todos estos años del trabajo.

Con particular énfasis debo agradecer la colaboración de mis tutores la Dra C. Ondina León Díaz y el Dr C. Eduardo Ortega Delgado, a quienes jamás podré valorar lo suficiente su dedicación y el tiempo que me dedicaron, las excelentes revisiones y críticas del documento, su aliento y el optimismo con que encausaron esta obra conjunta.

Mi sincera gratitud al Dr. Miguel Ángel Martínez-Téllez y a través de él a la dirección del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD) de Hermosillo, México por aceptarme y colaborar en mi tesis y por financiar viajes, estancias de investigación y experimentos que constituyeron el 70% del trabajo de la tesis.

Quiero extender mis agradecimientos a investigadores y técnicos del Dpto. de Coordinación de Tecnología de los Alimentos de Origen Vegetal y otras dependencias del CIAD por sus consejos y apoyo técnico en la ejecución de experimentos con plantas, enzimas y microorganismos, particularmente, a Olivia Briceño, Gabriela Romo, Francisco Soto, Irasema Vargas y Socorro Vallejo. Agradezco igualmente en ellos su sincera amistad y la gran cantidad de atenciones que tuvieron conmigo y que me hicieron las estancias mucho más llevaderas.

Agradezco a la dirección del INCA y a las organizaciones de mi dpto. por el apoyo que me dieron para la realización de las estancias de investigación.

En el Inca debo agradecer muy en especial a todos los compañeros del dpto. de Fisiología y Bioquímica Vegetal por su ayuda técnica, por el apoyo moral, por la paciencia conmigo y por el aliento que me entregaron; en particular, agradezco a la comisión científica del dpto. que con sus críticas y sugerencias enrumbo y supervisó la experimentación y preparación del documento. Gracias también a la fuerza técnica, especialmente, a Daysi de Armas, Maritza Mora y Juan H. Hernández que tanto me ayudaron en la ejecución experimental.

Agradezco a todos los colegas que realizaron las oponencias del documento desde que comencé en el departamento.

Un agradecimiento sincero a los fundadores del grupo Fitomel, devenido laboratorio de Oligosacarinas y ahora grupo de Productos bioactivos, particularmente a los que quedamos, pero también a los que ya no están porque aún se dejan sentir con su apoyo técnico y aliento, les agradezco por sembrar en mí un tema de investigación que no me dejó escapar de esta forma precaria de ganarse la vida que se llama investigación científica en Cuba.

Mi más sincera gratitud a mi amigo Gerardo Torres, mexicano de pura cepa que la colaboración científica quiso que lo conociera. A él en especial le debo las estancias de investigación que me permitieron terminar el trabajo, por haber intercedido con el Dr. Martínez, pero lo que más le agradezco es la amistad, protección y cariño que junto a su esposa Alma y familia, y al resto de los amigos de su congregación católica en Hermosillo me entregaron todo el tiempo que estuve allí. Nunca podré recompensar todo lo bien que me trataron, quedaron en mí para siempre.

Quiero agradecer profundamente a mis dos amigos queridos, Tere y JC, que además de regalarme su amistad por casi 20 años me han ayudado, alentado, empujado y sacado las castañas del fuego para que yo siguiera adelante. Sé que ellos compartirán mi felicidad en este momento.

A mis padres, en especial a mi madre, porque se han esforzado toda mi vida para que nada me falte y para que todo lo logre, y que aún lo hacen.

A Daimy por ser mi principal crítica y mi mejor apoyo, por quererme sobre todas las cosas y a pesar del sacrificio; por hacerme el mejor regalo de mi vida: Mi María Alejandra y, por supuesto, a M. Alejandra por regalarme felicidad con su sola presencia durante este último año y medio de mi vida.

Agradezco, además, a todos los colegas y amigos que no he nombrado, y que no son pocos, ni menos importantes, y que estuvieron conmigo y me apoyaron de alguna manera en este período de mi vida.

Muchas gracias.

*A Teresa, Daimy y María Alejandra*

*El conocimiento es la virtud y solo si se sabe se puede divisar el bien*  
*Sócrates*

*... “Algún día, quizás los vegetales puedan ser asperjados con oligosacarinas específicas (o sus análogos), para manipular los genes que controlan la liberación y el metabolismo de las oligosacarinas y para transmitir de esta forma mensajes a fin de que las plantas florezcan, formen semillas y frutas o tubérculos, adquieran resistencia a una enfermedad o a un insecto, para permitir la caída de la fruta, para crecer más rápido o ser más frondoso. Las oligosacarinas están llamadas a ejecutar, con seguridad, un sobresaliente papel en la agricultura.”*

*Dr. Peter Albersheim*

## Abreviaturas de la tesis

AJ:	Ácido jasmónico
AS:	Ácido salicílico
dds:	Días después de sembrada
Da:	Daltons
EDTA:	Ácido etilen diamino tetra-acético
DCA	Diseño completamente aleatorizado
$\beta$ 1-3 Glc	Actividad $\beta$ 1-3 glucanasa
GrA:	Grado de acetilación
GrP:	Grado de polimerización
HAc:	Ácido acético
H <sub>2</sub> O <sub>d</sub> :	Agua destilada
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> :	Peróxido de hidrógeno
KAc:	Ácido acético parcialmente neutralizado con KOH
KOH:	Hidróxido de potasio
MM:	Masa molar
MAPK:	Proteínas quinasas activadores de mitógenos, en inglés.
MAMPs/PAMPs	Patrones moleculares asociados a microorganismos o patógenos, en inglés.
NaAc:	Acetato de sodio
NO:	Óxido nítrico
PAL:	Fenil-alanina amonio liasa, en inglés.
PDA:	Agar papa dextrosa, en inglés
POD:	Peroxidasa
PR:	Proteínas relacionadas con la patogénesis, en inglés.
ROS:	Especies reactivas de oxígeno, en inglés.
RSI:	Resistencia sistémica inducida
SAR	Resistencia sistémica adquirida, en inglés
TMV:	Virus del mosaico del tabaco, en inglés.

## Síntesis

El tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) en el estadio de semillero es susceptible al ataque de *Phytophthora nicotianae*, un patógeno del suelo que causa gran mortalidad entre las plántulas. La quitosana es un polímero natural formado por residuos de glucosamina unidos por enlaces  $\beta$  1-4, cuyos aminos pueden estar parcialmente acetilados. Inhibe el crecimiento de microorganismos e induce respuestas defensivas y resistencia en varios cultivos contra patógenos. Se evaluó el efecto inhibitorio de compuestos de quitosana con diferente grado de acetilación (GrA) y masa molar (MM) sobre el crecimiento del micelio y la viabilidad de zoosporas de *P. nicotianae* en condiciones *in vitro*. Todos los compuestos de quitosana utilizados causaron un efecto inhibitorio sobre el desarrollo *in vitro* del patógeno que dependió de la concentración empleada, de las características físico-químicas de cada uno, del tiempo de incubación del patógeno con el compuesto y de la concentración de zoosporas utilizada en los ensayos. El trabajo también evaluó el efecto de la concentración, las características físico-químicas de la quitosana y las formas de aplicación sobre indicadores defensivos en plántulas de tabaco. Se observó influencia de la concentración y del GrA de los compuestos sobre la inducción de los indicadores defensivos ( $\beta$  1-3 glucanasa, PAL y POD), principalmente sobre el órgano directamente elicitado en las plántulas, dependiendo de la forma de aplicación. El mayor GrA en el polímero incrementó la actividad PAL mientras que el menor GrA incrementó la actividad POD. Todas las formas de aplicación de los compuestos redujeron el índice de infección de *P. nicotianae* en las plántulas mediante activación de resistencia inducida. La aspersión foliar causó los mayores niveles de reducción de este índice. Un análisis de regresión lineal permitió comprobar que la actividad enzimática PAL fue la que más estuvo relacionada con la disminución del índice de infección en cada forma de aplicación. Se recomienda la inclusión de los compuestos de quitosana dentro del manejo integrado de *Phytophthora nicotianae* en el cultivo del tabaco.

## I- Introducción

*Phytophthora nicotianae* Breda de Haan, un representante de los Oomycetes, es el agente causal de una enfermedad del tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) de alcance mundial, que se caracteriza por una afectación primaria de las raíces y de la región basal del tallo que posteriormente avanza acropetalmente a todas las partes de la planta provocando su muerte. Es la principal enfermedad del tabaco en semilleros, toda vez que las plántulas jóvenes son altamente susceptibles (Erwin y Ribeiro, 1996). En Cuba se conoce como “Pata prieta” y se combate con la aplicación de productos biológicos y químicos (Muiño *et al.*, 2001; García y Andino, 2002) y con la selección de variedades de tabaco resistentes (García *et al.*, 2002; Espino, 2003a; López *et al.*, 2003; Espino, 2006). A pesar de las medidas aplicadas, en la actualidad, tanto en semilleros como en campo, se han informado afectaciones y pérdidas por “Pata prieta” a escala nacional e internacional en porcentajes que han sobrepasado el 40% de incidencia en plantaciones comerciales (Melton y Broadwell, 2003; Espino, 2003b; Espino, 2006; Li *et al.*, 2006; CNSV, 2007). La planta de tabaco (como el resto de las plantas superiores) es capaz de responder al ataque de patógenos mediante la activación de respuestas defensivas a nivel local y sistémico. Las membranas de las células atacadas pueden detectar proteínas, lípidos y fragmentos de polisacáridos (oligosacarinas) que son secretados por el patógeno o son constituyentes de las paredes celulares de la planta o del microorganismo, que se liberan por enzimas de ambos cuando se establece la interacción (Agrios, 2005b y c; García-Brugger *et al.*, 2006). La velocidad con que la planta detecte esos compuestos y movilice su potencial defensivo es esencial para la contención o no de la infección (Esquerré-Tugayé *et al.*, 2000; Klarzynski y Fritig, 2001; Agrios, 2005c; van Loon *et al.*, 2006). Algunas de las respuestas que se activan en el tabaco ante el ataque de patógenos sirven como indicadores defensivos, tomando en cuenta la importancia que tienen en la protección de la planta. La fenil-alanina amonioliasa (PAL) no tiene actividad antimicrobiana *per se*, pero es una enzima clave a partir de la cual divergen rutas metabólicas que producen estructuras antimicrobianas, como el ácido clorogénico, y barreras químicas como la lignina (Blount *et al.*, 2000; Dixon *et al.*, 2002). En tabaco, se informó la inducción de PAL por elicitores extraídos de *P. nicotianae* y la reducción de la

infección con este patógeno cuando se clonó de forma constitutiva un gen de esta enzima (Way *et al.*, 2002; Desender *et al.*, 2007).

La actividad peroxidasa (POD) también es un indicador de resistencia a patógenos en tabaco ya que estas enzimas actúan en la formación y metabolismo del  $H_2O_2$  a partir de radicales superóxidos, la polimerización de compuestos fenólicos, la síntesis de radicales fenoxi que forman ligninas y la unión entre diferentes compuestos de la pared celular (Resende *et al.*, 2003; Torres *et al.*, 2006). En esta especie se han detectado y asociado peroxidasas aniónicas con la resistencia al Moho azul (*Peronospora hyoscyamym* fsp. *tabacina*), otro patógeno del grupo de los Oomycetes (Ye *et al.*, 1990).

Las  $\beta$  1-3 glucanasas son esenciales en la protección del tabaco contra el moho azul y la pata prieta (Lusso y Kuć, 1996), tomando en cuenta que esta enzima degrada polímeros de  $\beta$  1-3 glucano (van Loon *et al.*, 2006) y los oomycetes que causan esas enfermedades presentan este polisacárido en la constitución de su pared celular.

La quitosana es un polímero formado por residuos de glucosamina unidos por enlaces  $\beta$  1-4, cuyos grupos aminos pueden estar parcialmente acetilados. Varios autores han informado que promueve el crecimiento de las plantas, inhibe el desarrollo de microorganismos e induce resistencia en plantas contra patógenos (Rabea *et al.*, 2003; Bautista-Baños *et al.*, 2006).

Tanto la actividad antimicrobiana directa como la inducción de algunas respuestas defensivas están afectadas por características físico-químicas de la quitosana como el grado de acetilación (GrA) y la masa molar (MM) (Vander *et al.*, 1998; Bautista-Baños *et al.*, 2006). A menor GrA en el polímero de quitosana mayor es su actividad inhibidora del crecimiento microbiano (Park *et al.*, 2002; Bautista-Baños *et al.*, 2006), mientras que la reducción de su MM puede provocar incremento o disminución de la inhibición del crecimiento de acuerdo con la especie (Kendra y Hadwiger, 1984; Rabea *et al.*, 2003; Hernández-Lauzardo *et al.*, 2008). Estudios de este tipo son escasos en los Oomycetes y no se dispone de trabajos publicados donde se evalúe la influencia de ambas variables en la inhibición del crecimiento de estos microorganismos.

En plantas se ha estudiado el efecto del GrA y la MM de la quitosana sobre algunas respuestas defensivas. Se demostró que una acetilación parcial del polímero de quitosana, así como su fragmentación, es indispensable para la inducción de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) en hipocótilos de pepino (*Cucumis sativus* L.) (Kauss *et al.*, 1997) y en

la inducción de actividad PAL y POD en hojas de plantas de trigo (*Triticum aestivum* L.) (Vander *et al.*, 1998). Más recientemente, se informaron similares estudios comparativos con oligoquitosanas en *Arabidopsis thaliana* (Cabrera *et al.*, 2006). Los trabajos anteriores sobre el papel del GrA y la MM de las quitosanas en la inducción de respuestas defensivas se realizaron en suspensiones celulares (Cabrera *et al.*, 2006), en partes de plantas (Vander *et al.*, 1998) o partes de plantas pre-acondicionadas (Kauss *et al.*, 1997), pero no en plantas completas, ni en presencia de patógenos. No se conoce la influencia del GrA y la MM de la quitosana, ni el efecto que diferentes formas de aplicación de estos compuestos causan en la inducción de respuestas defensivas en plantas de tabaco.

Aunque existen trabajos que informan la protección de cultivos contra patógenos con diferentes tipos de quitosanas (Molloy *et al.*, 2004; Bautista-Baños *et al.*, 2006; Trotel-Aziz *et al.*, 2006), este compuesto no había sido estudiado en la interacción *Nicotiana tabacum-Phytophthora nicotianae*. En tabaco sólo se ha informado la protección parcial contra el TMV con mezclas de oligoquitosanas (Struszczyk *et al.*, 1999; Iriti *et al.*, 2006; Zhao *et al.*, 2007 a y b). No hay información conocida sobre la inducción de resistencia con quitosana en plantas de tabaco contra otros patógenos diferentes al TMV.

De lo anterior, el **problema científico** de este trabajo fue conocer si las quitosanas protegen las plantas de tabaco, en la fase de semillero, contra el oomicete *P. nicotianae*, responsable de la enfermedad Pata prieta; y si las características físico-químicas GrA y MM influyen sobre su actividad antimicrobiana e inductora de resistencia dentro de la interacción compatible *P. nicotianae*-tabaco

Por tanto, el trabajo propone como **hipótesis** que: La quitosana inhibe el crecimiento y la viabilidad *in vitro* de *Phytophthora nicotianae* Breda de Haan e induce resistencia en plántulas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) contra este patógeno.

Para aceptar o refutar dicha hipótesis se propusieron los siguientes objetivos:

- Determinar el efecto de diferentes quitosanas sobre el crecimiento radial y la viabilidad de zoosporas *in vitro* de *P. nicotianae*.
- Conocer el efecto de diferentes quitosanas y sus formas de aplicación en la inducción de enzimas de defensa en plantas de tabaco, variedad Corojo.

- Establecer la relación entre las respuestas defensivas evaluadas y la resistencia inducida en las plantas contra *Phytophthora nicotianae*.

**Novedades:** Por primera vez a nivel internacional:

- Se demuestra el efecto inhibitorio *in vitro* de diferentes quitosanas sobre el crecimiento del micelio y la viabilidad de zoosporas de *Phytophthora nicotianae*.
- Se demuestra la activación de resistencia sistémica inducida en plantas de tabaco, variedad Corojo, con diferentes quitosanas contra *Phytophthora nicotianae*.
- Se evalúa en plántulas de tabaco el comportamiento de los indicadores defensivos PAL, POD y  $\beta$  1-3 glucanasa como respuesta a varios compuestos de quitosana y se demuestra su contribución a la resistencia de esta especie contra *Phytophthora nicotianae*.

**Aporte práctico** del trabajo de tesis:

- Se aportan evidencias que demuestran las potencialidades de polímeros de quitosana, quitosana parcialmente hidrolizada y oligoquitosanas, desarrolladas en Cuba, en la protección del cultivo del tabaco contra *Phytophthora nicotianae*. Estas evidencias sustentan la potencial introducción de estos compuestos en el control ecológico del patógeno en la producción tabacalera. Los resultados de la tesis también contribuyen al aprovechamiento de una gran cantidad de exoesqueleto de langosta, que de otra forma se desecharían, como fuente para la obtención de quitina y quitosana, compuestos de alto valor agregado. Lo anterior permitiría, además, evitar contaminaciones por vertimiento al ambiente.
- Los resultados de la tesis se pueden utilizar en el proceso docente de pre y post grado en las carreras con perfil biológico y agrícola.

**Aporte teórico** del trabajo:

- Se demuestra el efecto inhibitorio de polímeros de quitosana y sus derivados de menor masa molar sobre el crecimiento *in vitro* del oomycete *Phytophthora nicotianae*.
- Se contribuye al conocimiento de las bases teóricas de la inducción de resistencia en tabaco contra *P. nicotianae* y se demuestra el potencial de diferentes compuestos de quitosana como elicitores de resistencia inducida en esta especie.
- Se analiza la contribución de las actividades de diferentes enzimas del metabolismo vegetal a la reducción del índice de infección de las plántulas de tabaco.

## II- Revisión bibliográfica

### 2.1 La interacción planta-patógeno y la resistencia inducida en la planta

#### 2.1.1 Interacción planta-patógeno

Las plantas son resistentes a la mayoría de sus patógenos potenciales; de hecho, la susceptibilidad de una planta a un patógeno es la excepción y no la regla en la interacción de las plantas con los microorganismos en su medio ambiente (Agrios, 2005 a; Ferreira *et al.*, 2006).

Estas interacciones pueden ser de dos formas de acuerdo a la complementariedad entre ambos contendientes y al desarrollo exitoso o no del proceso de patogénesis. Cuando el patógeno logra penetrar las barreras defensivas de la planta, establecerse parasíticamente y la infección se extiende por todo el vegetal, ya que este no logra reconocer al patógeno o lo hace muy lentamente; se está en presencia de una interacción *compatible*. A su vez, se le llama interacción *incompatible* a aquella donde el microorganismo es rechazado por las defensas inducidas en la planta y por tanto no logra establecerse en el vegetal (Agrios, 2005 a; García-Brugger *et al.*, 2006).

En la actualidad se conoce que el establecimiento o no de la enfermedad está relacionado con la velocidad con que la planta pone en marcha su maquinaria defensiva contra el microorganismo que pretende establecerse (Tao *et al.*, 2003; Agrios, 2005 a). Es decir, si las reacciones defensivas ocurren tarde o son suprimidas por el patógeno, el proceso de infección continuará exitosamente (Somssich y Hahlbrock, 1998; van Loon *et al.*, 2006). Es por tanto, de gran importancia para la planta detectar de forma temprana la presencia de patógenos y enviar tal información intra e intercelularmente para activar su maquinaria defensiva.

Las plantas tienen dos formas de reconocer las infecciones por patógenos que constituyen la base de su sistema inmune. La primera es el reconocimiento y respuesta a moléculas comunes para muchas clases de microorganismos, incluyendo los no patógenos, como son proteínas, glicoproteínas, glicanos, etc, que causa la resistencia de toda una especie contra determinado patógeno y se conoce como resistencia basal, inespecífica o no hospedero (Cunha *et al.*, 2006; Ferreira *et al.*,

2006; García-Brugger *et al.*, 2006). La segunda es el reconocimiento específico de factores de virulencia de los patógenos a través del producto de genes de resistencia en la planta, que constituyen la base de un reconocimiento controlado genéticamente y le brinda resistencia a determinados cultivares de una especie (pero no a la especie completa) a un patógeno en particular (Agrios, 2005 a; Cunha *et al.*, 2006; García-Brugger *et al.*, 2006). Todo lo descrito en esta revisión y el trabajo realizado en esta tesis está relacionado con la primera forma de reconocimiento mencionada.

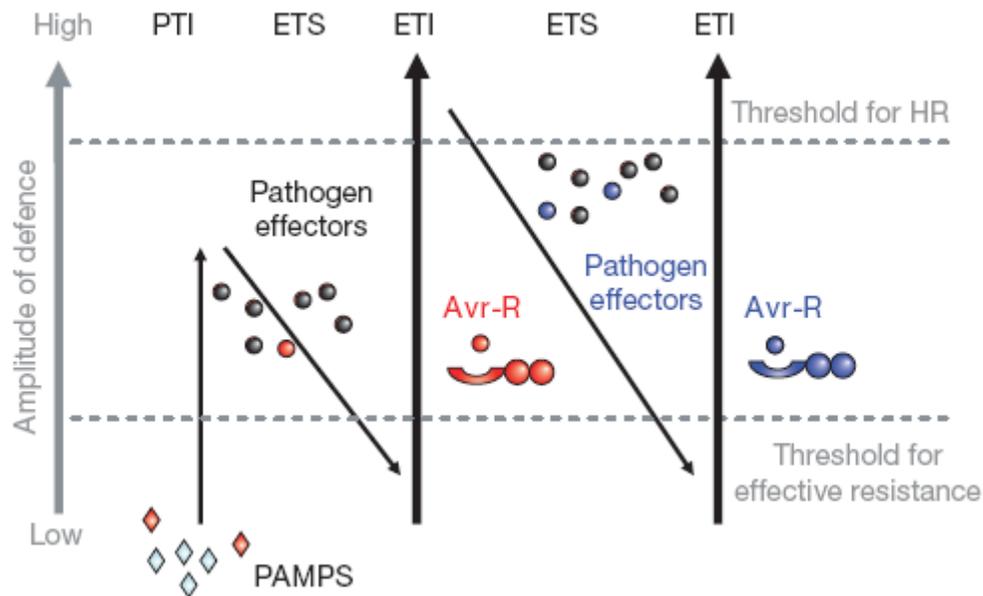
Las paredes celulares de las plantas son la vanguardia de la interacción. Debido a que es la primera barrera encontrada por la mayoría de los patógenos, tienen que degradarla con el fin de lograr la penetración y colonización de la planta. Para tal efecto, los microorganismos cuentan con un variado arsenal de enzimas que degradan la pared celular de la planta entre las que se destacan grupos de celulasas, pectinasas y xilanasas (Esquerré-Tugayé *et al.*, 2000; Agrios, 2005 b).

A su vez, las plantas han evolucionado desarrollando un sistema de reconocimiento de la presencia del patógeno a través de la detección primaria de los oligosacáridos de la pared celular vegetal que se desprenden como resultado del ataque. Tras la detección, la planta responde entonces, con un primer arsenal enzimático y químico que, entre otras cosas, ataca y degrada la pared celular del microorganismo volviendo a liberarse oligosacáridos, que una vez más son reconocidos por la célula vegetal, amplificando la señal defensiva y el número y magnitud de sus respuestas (Esquerré-Tugayé *et al.*, 2000; Klarzynski y Fritig, 2001; Agrios, 2005 c).

A partir de los resultados más recientes en estudios de interacción planta-patógeno se elaboró el modelo Zig-zag que explica la interacción desde el punto de vista evolutivo (Jones y Dangl, 2006). De acuerdo con el modelo, la resistencia o susceptibilidad en la planta es proporcional a la suma de varias fases en la evolución de cada interacción (Figura 1).

En una primera fase, las plantas detectan los patrones moleculares asociados con microorganismos y patógenos (MAMPs/PAMPs, en inglés), entre los que se encuentran una gran parte de los elicitores inespecíficos de resistencia, lo cual causa la inmunidad activada por PAMPs (PTI, en inglés) que eleva la resistencia basal de la

planta hasta valores intermedios de la amplitud defensiva de la especie (Jones y Dangl, 2006).



**Figura 1:** Modelo Zig-zag de evolución de la interacción planta-patógeno. Tomado de Jones y Dangl, 2006.

En una segunda fase, los patógenos expresan y liberan efectores que reducen o suprimen la resistencia por PTI o mejoran la nutrición y dispersión del patógeno, lo que causa una susceptibilidad activada por efectores (ETS, en inglés). En la tercera fase, los efectores causantes de la ETS son reconocidos por proteínas de la planta codificadas por genes de resistencia (R) que causan en ella una inmunidad activada por efectores (ETI, en inglés) que es una versión amplificada del PTI que alcanza mayores niveles de resistencia que la fase PTI. Con la selección evolutiva, los patógenos pueden perder el efector reconocido en la tercera fase o ganar nuevos efectores que pueden suprimir nuevamente el ETI. La selección evolutiva en las plantas se dirige, entonces, a la expresión de nuevos alelos de proteínas R que reconozcan los nuevos efectores adquiridos y causen la ETI en un proceso de Zig-zag continuo (Jones y Dangl, 2006).

### 2.1.2 La Resistencia Sistémica Inducida en plantas

### 2.1.2.1 Concepto y ocurrencia

La resistencia sistémica inducida (RSI) es un fenómeno natural donde se induce resistencia en la planta contra patógenos como resultado de anteriores infecciones localizadas, del tratamiento previo de la planta con compuestos o productos microbianos o con un diverso grupo de compuestos orgánicos e inorgánicos no relacionados entre ellos. La actividad de resistencia es debida no a una acción antimicrobiana "per se" de los compuestos activadores sino a la inducción por estos, de componentes antimicrobianos en la planta (Oostendorp *et al.*, 2001; Walters *et al.*, 2005).

La resistencia inducida contra patógenos se ha documentado en decenas de especies de plantas, que incluyen mono y dicotiledóneas, en los últimos 20 años y, muy especialmente, en la última década dando lugar a la aparición de nuevos productos de protección agrícola basados en la explotación de éste mecanismo de las plantas (Cohen *et al.*, 1993; Benhamou *et al.*, 1994; Oka y Cohen, 2001; Oostendorp *et al.*, 2001; Latunde-Dada y Lucas, 2001; Sharathchandra *et al.*, 2004).

### 2.1.2.2 Respuestas y mecanismos defensivos en la planta

La respuesta de resistencia basal de la planta a patógenos o elicitores es multicomponente y consiste en la síntesis de novo o el reforzamiento de mecanismos defensivos que pueden ser constitutivos o inducibles, y que incluyen barreras histológicas, enzimas y compuestos del metabolismo secundario (Agrios, 2005 c; Ferreira *et al.*, 2006).

#### 2.1.2.2.1 Resistencia local y sistémica

Las respuestas defensivas ocurren tanto en los órganos de la planta atacados originalmente (respuesta local), como en las partes distantes del ataque (respuesta sistémica). La respuesta local o respuesta hipersensible (RH) se caracteriza por la formación de lesiones necróticas en los sitios de entrada del patógeno y la acumulación de compuestos defensivos dentro y alrededor de las células infectadas, lo cual provoca primero la restricción del patógeno y posteriormente su destrucción (Hammerschmidt, 1999 a y b; Kombrick y Schmelzer, 2001). En esta respuesta, conocida también como muerte celular programada, se movilizan y sacrifican un

número limitado de células en contacto con el agresor mediante la síntesis y acumulación en ellas de estructuras con acción antimicrobiana intensa con el objetivo de aislar al patógeno y evitar que se extienda por las partes no infectadas de la planta (Kombrick y Schmelzer, 2001; Zuppini *et al.*, 2003).

Mientras se desarrolla la RH, ocurre la síntesis de una amplia variedad de proteínas en las hojas no inoculadas, a partir del sitio de infección, entre las que se incluyen varias enzimas hidrolíticas, inhibidores de proteinasas y varias familias de proteínas relacionadas con la patogénesis (Hammerschmidt, 1999 a; Klarzynsky y Fritig, 2001). Esta respuesta sistémica involucra, en algunos casos, síntesis de novo de fitoalexinas y proteínas PR. Sin embargo, las fitoalexinas son más características en la respuesta local, mientras las proteínas PR se presentan tanto en la respuesta local como en la sistémica (Hammerschmidt, 1999b, van Loon, 1999; van Loon *et al.*, 2006).

#### 2.1.2.2.2 Mecanismos defensivos vinculados a la resistencia inducida

Existen evidencias que permiten generalizar las respuestas defensivas de la planta dentro de tres grupos de modificaciones metabólicas, una vez percibida la presencia o entrada de un patógeno, sea una infección por virus, bacteria u hongo, o incluso el daño mecánico causado por un herbívoro.

Primeramente, ocurre una intensa estimulación de las vías metabólicas secundarias que conducen a la producción de los antibióticos vegetales (las fitoalexinas), dentro y alrededor de los sitios de infección (Hammerschmidt, 1999b). Estos compuestos secundarios consisten en pequeñas moléculas orgánicas que se sintetizan de novo fundamentalmente en la vía del Acetil CoA (Ej. Terpenos y Sesquiterpenos), la vía de la desaminación de la L-fenil-alanina (Ej. Fenil-propanoides y Cumarinas) o a partir de diferentes vías (Ej. Los Estilbenos y los Isoflavonoides). En algunos casos, el papel defensivo de las fitoalexinas ha podido ser demostrado utilizando la transgénesis (Hammerschmidt, 1999b; He y Dixon, 2000).

En segundo lugar, ocurre un reforzamiento de las barreras mecánicas naturales de las células vegetales, por ejemplo de la pared celular, mediante la deposición de macromoléculas como proteínas y glicoproteínas ricas en prolina (Bradley *et al.*, 1992), polisacáridos como la calosa (Kauss *et al.*, 1989) y polímeros aromáticos del tipo de la lignina (Bruce y West, 1989). La deposición y reticulación de los polímeros

mencionados, confieren a la matriz extracelular una gran resistencia contra la acción de enzimas microbianas que degradan la pared celular y que constituyen elementos claves de su potencial de ataque (Bruce y West, 1989; Dixon *et al.*, 2002).

El tercer grupo de modificaciones metabólicas, comprende la producción de una gran gama de péptidos y proteínas defensivas, la mayor parte de ellas conocidas como proteínas relacionadas con la patogénesis (PR), debido a que se descubrieron y estudiaron como proteínas que se inducían o sintetizaban de novo como resultado de la interacción de la planta con determinados patógenos (van Loon, 1999). Dentro de las proteínas PR se incluyen enzimas hidrolíticas como quitinasas y glucanasas (Leubner-Metzger y Meins, 1999; Neuhaus, 1999), taumatinas (Velazhahan *et al.*, 1999) e incluso algunas cuya función en la patogénesis aún no ha sido dilucidada (Buchel y Linthorst, 1999). Sin embargo, de forma general, se ha establecido por diversos autores el carácter antimicrobiano directo o indirecto de estas proteínas como degradantes de las paredes celulares de algunos patógenos (Mauch *et al.*, 1988; Fritig *et al.*, 1998) y la inhibición de proteasas y poligalacturonasas microbianas (Cervone *et al.*, 1993; Heitz, *et al.*, 1999; van Loon *et al.*, 2006), enzimas estas relacionadas con el arsenal de ataque del patógeno. La síntesis y acumulación de éstas proteínas debe considerarse un hecho general en el reino vegetal, ya que su actividad ha sido informada en decenas de especies (van Loon, 1999; van Loon *et al.* 2006).

#### 2.1.2.3 Mensajeros secundarios y transducción de la señal defensiva.

El primer cambio que ocurre después del ataque de un patógeno a la planta o la aplicación de una señal elicitora es la despolarización de la membrana. Este evento está relacionado con la transducción de la señal defensiva y puede ser percibido segundos después de la elicitación cuando se trabaja con células en suspensión. Provoca apertura de canales iónicos en la membrana con entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{H}^+$  al citoplasma en equilibrio con la salida de  $\text{K}^+$  y  $\text{Cl}^-$  causando la acidificación del citoplasma y la basificación de la región del apoplasto (Zhao *et al.*, 2005; García-Brugger *et al.*, 2006).

Lo anterior da lugar a varios eventos de fosforilación y desfosforilación de proteínas donde están involucradas conocidas MAP kinasas. Resultados obtenidos mediante tratamiento de células en suspensión con elicitores demostraron que el sistema señal MAP kinasa actúa posterior a la apertura de canales iónicos en la membrana y su información se trasloca al núcleo en cuestión de minutos después del tratamiento elicitador (Ligterink *et al.*, 1997; García-Brugger *et al.*, 2006). Estudios recientes con varios miembros de estas proteínas demuestran su papel positivo en la regulación transcripcional de genes defensivos y resistencia a enfermedades en tabaco y *Arabidopsis thaliana*, así como en la transducción de la señal para la muerte celular programada (Kim y Zhang, 2004; García-Brugger *et al.*, 2006).

El catión  $\text{Ca}^{2+}$  funciona como una señal secundaria y su acumulación en el citoplasma permite también la producción e incremento de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la ulterior expresión de genes defensivos. Este hecho es conocido como explosión oxidativa y ocurre a las pocas horas de detectado el patógeno o señal inductora por la planta (Lamb y Dixon, 1997; Zhao *et al.*, 2005; García-Brugger *et al.*, 2006).

Los principales componentes que se forman en esta reacción oxidativa son los radicales de hidroxilo ( $\bullet\text{OH}$ ), especies reactivas de oxígeno ( $\text{O}_2^-$ ) y el peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), como resultado de mecanismos enzimáticos que incluyen enzimas NADPH-oxidasa ligadas a la membrana plasmática, peroxidasas de pared celular, lipoxigenasas y por las transferencias de electrones de las mitocondrias o los cloroplastos (Lamb y Dixon, 1997; Resende *et al.*, 2003; Torres *et al.*, 2006).

El aumento de ROS constituye una señal para la activación de genes involucrados en la detoxificación de ROS y en la producción de sustancias antimicrobianas, como fitoalexinas y de material para el entrecruzamiento de proteínas de la pared celular y la biosíntesis de ligninas, lo cual resulta en la construcción de barreras físicas contra la entrada del patógeno. Sin embargo, también se ha informado el efecto antimicrobiano directo de las ROS, por lo que, además de señales constituyen defensas de la planta (Álvarez *et al.*, 1998; Resende *et al.*, 2003; Torres *et al.*, 2006).

#### 2.1.2.4 Señales mediadoras sistémicas y locales

Las señales defensivas de la RSI están también mediadas por diferentes vías enzimáticas. Estos mediadores de la señal defensiva varían entre los diferentes tipos de interacción planta-patógeno y compuestos elicitores e incluyen el ácido salicílico, el ácido absísico, el óxido nítrico, el ácido jasmónico y el etileno, como los fundamentales.

El ácido salicílico (AS) juega un importante papel en la vía de señalización que provoca la RSI en la planta. Después de ocurrido el proceso de infección, los niveles endógenos de AS se incrementan tanto de forma local como sistémica. La síntesis de novo de AS en partes no infectadas de la planta contribuye, por consiguiente, al establecimiento de la RSI (Heil y Bostock, 2002). El papel clave del AS en este proceso se demostró al utilizar plantas transgénicas que codificaban para un gen bacteriano capaz de degradar el AS formado. Tales plantas no pudieron acumular AS y bloquearon su respuesta RSI. Sin embargo, estudios posteriores donde se combinó la dinámica de inducción y aparición del AS con ensayos donde se separaron partes de la planta (hojas) a determinado tiempo posterior a la inducción, pusieron en duda que el AS fuera la señal sistémica inductora de RSI y sugirieron la posibilidad de que otras señales estuvieran implicadas (Dempsey *et al.*, 1999 y Heil y Bostock, 2002).

Similarmente, se demostró la regulación por ácido jasmónico (o metil jasmonato) de la inducción y expresión de diferentes respuestas y genes defensivos, que incluyen proteínas PR, fitoalexinas y varios componentes del metabolismo secundario como resultado del ataque de ciertos patógenos, la colonización de las raíces de algunas especies por bacterias rizosféricas y la aplicación de oligosacarinas de diferente origen (Rickauer *et al.*, 1997; Veronesi *et al.*, 1999; Shores *et al.*, 2005; Zhao *et al.*, 2005).

Como resultado de infección microbiana, ataque de herbívoros o inducción con oligosacarinas se forma el ácido jasmónico (AJ) en la vía de los Octadecanoides (también llamada de las Oxilipinas). La señal elicitora activa en la membrana una lipasa que desprende ácido linolénico, precursor que es oxidado por acción de lipoxigenasas (LOX) que constituyen las enzimas clave de la vía, y tras un proceso de ciclización y posterior reducción de la molécula mediante degradación lipídica en la  $\beta$ -oxidación, se sintetiza el ácido jasmónico que es la señal directa para la expresión de genes defensivos (Howe y Schillmiller, 2002).

Estudios recientes demostraron la importancia de la lipoxigenación celular en la planta, no solamente en la síntesis de AJ y la señalización defensiva, sino además como precursor de diversas estructuras derivadas de ácidos grasos con actividad antimicrobiana, inducidas en respuesta al ataque de patógenos y elicitores, lo cual, hace que la actividad LOX sea considerada un importante indicador defensivo en plantas (Blée, 2002).

La importancia de la actividad LOX y el AJ en el cultivo del tabaco se demostró cuando plantas transgénicas conteniendo el gen LOX en forma antisentido, perdieron su resistencia a *Phytophthora nicotianae* y fueron más susceptibles a *Rhizoctonia solani* (Rancé *et al.*, 1998).

Existe actualmente el consenso de que las vías dependientes del AS y AJ son las fundamentales en la señalización defensiva. Ambas vías señales son independientes una de la otra, median para vías defensivas diferentes e incluso se plantea que protegen contra diferentes tipos de patógenos (Thomma *et al.*, 1998), lo cual, podría justificar que determinados elicitores protejan contra un grupo determinado de patógenos y no contra todos. Adicionalmente, varios autores documentaron un efecto antagónico entre ambas vías de forma tal que la activación de una llevaba implícito el silenciamiento de la otra (Niki *et al.*, 1998; Preston *et al.*, 1999; Rojo *et al.*, 2003), probablemente por inhibición de la síntesis del mediador contrario.

Por consiguiente, en los últimos años se informaron interacciones cruzadas entre la vía dependiente de AS y la dependiente de AJ a diferentes niveles o momentos de cada una, en dependencia del estímulo elicitador (Heil y Bostock, 2002; Rojo *et al.*, 2003). En la actualidad, algunos autores abogan por el atractivo práctico de la combinación de las resistencias activadas por AS y AJ al demostrarse aumentos de resistencia con la simultánea activación de las vías del AS y AJ en *Arabidopsis thaliana* (van Wees *et al.*, 2000). De hecho, se ha demostrado en el tabaco que, algunas proteínas PR inducidas por TMV que se acumulan en el apoplasto, están reguladas por AS con la acción sinérgica, algunas veces, de AJ y/o etileno (van Loon *et al.*, 2006).

La producción de etileno se estimula en los tejidos afectados de la planta como resultado de heridas o ataque de patógenos, a partir de los cuales, el gas difunde hacia las capas celulares circundantes extendiendo la señal de estrés recibida antes de

escapar a la atmósfera. El efecto estimulador del etileno en la percepción, transmisión e inducción de respuestas defensivas, quedó plenamente establecido en experimentos con mutantes de tabaco insensibles a este gas que le provocó a dichas plantas una reducción de la resistencia contra hongos del suelo (Knoester *et al.*, 1998).

Sin embargo, el efecto del etileno parece estar vinculado, además, a la vía del AJ ya que se obtuvieron resultados de acción sinérgica o, al menos, conjunta de ambas señales en la activación de resistencia inducida (Rojo *et al.*, 2003; Shores *et al.*, 2005). El propio hecho de que ambas vías señalizadoras medien la resistencia contra casi el mismo rango de patógenos, indica que ambos pueden estar activando respuestas defensivas comunes. Parece ser que ambas señales pueden actuar de forma secuencial, cooperativa o sinérgica en dependencia del agente infeccioso de que se trate (Rojo *et al.*, 2003).

Estudios de la última década informan que el óxido nítrico (NO) es otra señal que activa respuestas defensivas como resultado del ataque de patógenos en plantas. Se han detectado incrementos de la enzima NO sintasa en plantas de tabaco resistentes (y no en las susceptibles) después de la infección con TMV, observándose que la activación de algunas proteínas PR (PR-1) están asociadas con el incremento de actividad de la enzima mencionada (Klessig *et al.*, 2000).

Recientemente, se demostró que los incrementos de NO en tabaco relacionados con la muerte celular programada eran dependientes de incrementos en los niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de la respuesta defensiva (de Pinto *et al.*, 2006). Igualmente, se demostró que esta señal estaba implicada en la activación de la explosión oxidativa en células de tabaco elicidadas con proteínas y liposacáridos, siendo el incremento intracelular de NO dependiente del influjo de iones Ca<sup>2+</sup> (García-Brugger *et al.*, 2006). Finalmente, la relación de la inducción previa de NO con rápidos y posteriores incrementos de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y actividad PAL, quedaron claramente demostrados en experimentos con células epidérmicas de tabaco elicidadas con oligoquitosanas en presencia de donadores y extractores de NO (Zhao *et al.*, 2007b).

#### 2.1.2.5 Especificidad de la resistencia sistémica inducida

La RSI es una respuesta no específica de la planta. Esta inespecificidad es evidente tanto por la inducción multicomponente de respuestas defensivas como por la inducción de resistencia en determinada especie, como resultado de la elicitación por diferentes microorganismos y compuestos orgánicos e inorgánicos químicamente no relacionados entre ellos (Kuc, 2000; van Loon y Bakker, 2005).

La no especificidad de esta resistencia puede analizarse tomando en cuenta el efecto de cada respuesta defensiva sobre el patógeno. No todos los compuestos defensivos son igualmente efectivos contra determinados patógenos. Por ejemplo, las quitinasas no deben tener un papel importante contra los Oomycetes, que no contienen quitina en sus paredes celulares, sin embargo, los patógenos de este grupo elicitán esta actividad enzimática en plantas hospedantes. Igualmente, algunos virus inducen fitoalexinas, quitinasas y glucanasas y resulta poco probable que esas enzimas tengan un papel antiviral. Lo anterior justifica que la inducción defensiva multicomponente no ocurre para un patógeno determinado (Kuc, 2000; van Loon y Bakker, 2005).

La causa de que diferentes compuestos, e incluso interacciones planta-patógeno raza específicos, activan RSI por igual no está totalmente dilucidada. Es evidente, que ambas rutas, específica y no específica, comparten el mismo iniciador de resistencia y el incremento de ROS como señal y/o actividad defensiva, por lo que cabe preguntarse si este incremento de ROS tiene un papel en la regulación del disparador común de RSI (Kuc, 2000).

#### 2.1.2.6 Costos de distribución de la resistencia sistémica inducida en la planta.

Comparado con una resistencia constitutiva, la RSI tiene la desventaja de que las hojas de la planta están desprotegidas hasta que la resistencia se expresa. La ventaja es que una resistencia permanente causa un desvío de recursos metabólicos en dirección a la resistencia, que provoca un menor rendimiento de la planta tanto en crecimiento como en productos para cosecha. No obstante, es evidente que hay un costo energético, incluso cuando se induce la resistencia de la planta justo previo a la infección, algo que deviene más importante si se hacen aplicaciones previas con elicitors para evitar el ataque de patógenos (Walters y Boyle, 2005).

Resultados de experimentos realizados con Bion (producto sintético que simula la acción del AS) fueron consistentes con el hecho de que la expresión de RSI bajo condiciones libres de patógenos tenía efectos negativos sobre la planta en condiciones de baja disponibilidad de nutrientes (Heil *et al.*, 2000; Dietrich *et al.*, 2004) o en condiciones ambientales adversas (Dietrich *et al.*, 2005). El costo negativo que la síntesis de proteínas defensivas provoca en los rendimientos de la planta fue demostrado en experimentos dónde se estudió el efecto de la expresión constitutiva e inducida de inhibidores de proteinasas sobre la producción de semillas y el crecimiento en general (Zavala *et al.*, 2004).

Sin embargo, no todos los compuestos que inducen RSI en plantas provocan costos negativos sobre el crecimiento y los rendimientos. La aplicación del Bion en *Phaseolus vulgaris* no afectó la eficiencia del fotosistema II o los rendimientos y calidad del grano (Iriti y Faoro, 2003), aunque la diferencia entre ambos resultados pudiera deberse no a distinción entre especies, sino a diferentes condiciones ambientales entre los experimentos (Iriti y Faoro, 2003; Walters y Boyle, 2005).

Estudios recientes en este tema han permitido concluir que el pre-tratamiento inductor en las plantas puede provocar una de las tres respuestas siguientes:

- Que las defensas sean activadas por el pre-tratamiento y posteriormente sus magnitudes sean incrementadas como resultado del reto con el patógeno (Schenk *et al.*, 2003).
- Que algunas defensas sean activadas con el pre-tratamiento y después del reto con el patógeno, esas defensas y otras adicionales se incrementen (Heil y Bostock, 2002).
- Que no sean activadas las defensas de la planta hasta que el reto con el patógeno ocurra (Heil y Bostock, 2002; Walters y Boyle, 2005).

Cualquiera sean los eventos anteriores que siga determinada especie de planta en respuesta a un pre-tratamiento con elicitores o patógenos atenuados, incurrirá en un posterior costo energético en la planta que puede reflejarse o no en el crecimiento o los rendimientos de la misma. Por tanto, los estudios dirigidos a cuantificar los costos energéticos asociados con la RSI contra patógenos son obligatorios y deben tomar en cuenta la cantidad, momentos y formas de pre-tratamientos de la planta para cada caso en estudio.

### 2.1.3 Interacción *Phytophthora nicotianae*-Tabaco

#### 2.1.3.1 Apuntes en la taxonomía actual de *Phytophthora nicotianae*.

J. van Breda de Haan fue el primero en describir este patógeno en 1896 en Indonesia como *Phytophthora nicotianae*, pero hizo una descripción inexacta del microorganismo y la especie, debido también a la presencia de contaminantes en la muestra, probablemente *Pythium*. Dastur describió la especie en la India en 1913 y le dio el nombre de *Phytophthora parasitica*. Tucker en 1931 eligió el nombre *P. parasitica* var. *nicotianae* para designar aislados basado en la patogenicidad al tabaco, pero esto no debe ser usado para diferenciar variedades, sino que el estatus de variedad debe basarse en diferencias morfológicas. Tampoco varios estudios posteriores han logrado diferenciar subespecies (Erwin y Ribeiro, 1996).

Aunque una buena parte de la comunidad científica utiliza *P. parasitica* para referirse a este patógeno, lo que está aceptado por el Código Internacional de Nomenclatura Botánica, que es rector hasta la fecha, de la nomenclatura de las especies de *Phytophthora*, es el nombre *Phytophthora nicotianae* Breda de Haan, aunque la controversia taxonómica continua (Erwin y Ribeiro, 1996; Farr y Rossman, 2009).

Por otra parte, investigaciones de los últimos 20 años han permitido reubicar el grupo taxonómico al que pertenece el patógeno. De esta forma *P. nicotianae* pertenece al Reino Chromista, Phylum Oomycota y Clase Oomycete. Dentro de esta clase se ubica en el Orden Pythiales, Familia Pythiaceae y Género *Phytophthora* (Erwin y Ribeiro, 1996). Más recientemente, una parte de los investigadores que trabajan con los Oomycetes los sitúan dentro del reino Straminopila al demostrar que están filogenéticamente relacionados con varios tipos de algas como las crisofitas y las diatomeas (Cooke *et al.*, 2000) y consideran la subclase Peronosporomycetidae que comprende el orden Peronosporales y Pythiales, con el género *Phytophthora* dentro de la familia Pythiaceae (van West *et al.*, 2003).

Los oomycetes fueron considerados durante largo tiempo como una clase dentro del reino Fungi debido, fundamentalmente, a su crecimiento filamentoso y formación de micelio en su estado vegetativo, así como a la formación de esporas para la

reproducción sexual y asexual. Ambos grupos comparten, además, similares estrategias de infección en las plantas y como los hongos, los oomycetes comprenden géneros biótrofos (*Plasmopara*), necrótofos (*Pythium*) y hemibiótrofos (*Phytophthora*) (Latijnhouwers *et al.*, 2003; Agrios, 2005 d; Judelson y Blanco, 2005). También son similares las respuestas que elicitán en las plantas, los patógenos de ambos grupos (Kamoun *et al.*, 1999; Ferreira *et al.*, 2006).

Sin embargo, análisis filogenéticos moleculares, principalmente sobre las secuencias génicas mitocondriales y ribosomales, demostraron que los oomycetes comparten una baja afinidad taxonómica con los hongos filamentosos y están más estrechamente relacionados con las algas pardas y el grupo de las heterokontes, como son las crisófitas y las diatomeas (Cooke *et al.*, 2000; Cavalier-Smith, 2004; Greenville-Briggs y van West, 2005).

De esta forma, entre las principales características que distinguen a los oomycetes de los hongos verdaderos están que los primeros poseen una hifa vegetativa diploide, mientras que en los hongos es haploide o dicariótica; la composición de la pared celular de los oomycetes es de celulosa (glucosas con uniones  $\beta$  1-4) y glucano (glucosa con uniones  $\beta$  1-3 y  $\beta$  1-6), mientras que en los hongos es de quitina ( $\beta$  1-4 N-acetil glucosamina) o quitosana ( $\beta$  1-4 glucosamina) y glucano. Para la reproducción asexual los oomycetes casi universalmente producen zoosporas biflagelas, mientras que estas son poco comunes entre los hongos y cuando se presentan (Chitridiomycetes) son monoflageladas. Estas zoosporas de los oomycetes utilizan a diferencia de las esporas de los hongos, micolaminarina ( $\beta$  1-3 glucano) como la principal reserva de energía. Contrario a los hongos que producen ergosterol, los oomycetes contienen poco o ningún esteroles en las membranas, de hecho, *Phytophthora* carece del paso de la epoxidación del escualeno para formar esteroides, por lo que necesitan adquirirlo del hospedero durante la infección (van West *et al.*, 2003; Greenville-Briggs *et al.*, 2005; Judelson y Blanco, 2005).

### 2.1.3.2 Incidencia de la Pata prieta en el tabaco

*Phytophthora nicotianae* es el agente causal de una enfermedad de amplia distribución mundial en el tabaco, conocida como Pata prieta. Los principales

síntomas se caracterizan por una afectación primaria de las raíces y de la región basal del tallo de la planta que con el tiempo devienen necróticos formándose un anillo de necrosis en la zona del tallo inmediatamente por encima del sustrato. Posteriormente, la infección avanza acropetalmente a todas las partes de la planta provocando su muerte (Erwin y Ribeiro, 1996).

Las plantas de tabaco en todos los estadios de crecimiento, tanto en semilleros como en el campo, son susceptibles al ataque de este patógeno, siendo las plantas jóvenes altamente susceptibles, especialmente, cuando la humedad y la temperatura son elevadas en el entorno (Shew, 1991; Erwin y Ribeiro, 1996). Aunque varios controles culturales, biológicos y químicos se han establecido para disminuir la incidencia de la enfermedad (English *et al.*, 1988; Erwin y Ribeiro, 1996; García y Andino, 2002), en la actualidad, la mayoría de los fungicidas fallan en la protección contra *P. nicotianae* (Staub y Sozzi, 1981; Toledo, 2001; Thakur y Mathur, 2002).

El mayor control se logra a través del uso de cultivares que posean genes dominantes para la resistencia contra el patógeno, pero en general, los genotipos de tabaco cultivado no tienen resistencia efectiva contra todas las razas del patógeno (Maronek *et al.*, 1978; Erwin y Ribeiro, 1996; Díaz *et al.*, 2001). Lo anterior, unido a la aparición de razas del patógeno resistentes contra químicos (Metalaxyl) utilizados en su control (Toledo, 2001) ha contribuido al incremento de las afectaciones en semilleros y plantaciones comerciales a escala nacional que en algunos casos han sobrepasado el 40% de incidencia (Espino, 2003b; CNSV, 2007).

#### 2.1.3.3 Las respuestas defensivas contra patógenos en el tabaco

Estudios bioquímicos y moleculares de los últimos 20 años demostraron la respuesta sistémica y no específica de resistencia del tabaco, tanto a infecciones como a elicitores derivados de *P. nicotianae* (Rickauer *et al.*, 1989; Meins y Ahl, 1989). Así mismo, plantas de tabaco susceptibles y que finalmente devienen infectadas por el patógeno, también son capaces de responder con ciertos niveles defensivos (Benhamou y Côté, 1992; Agrios, 2005). Debe tomarse también en cuenta, que la habilidad de las plantas para resistir los patógenos está relacionada no solo con su capacidad para activar genes defensivos, sino que es también altamente dependiente

de la coordinación, velocidad y magnitud de esta respuesta (Klarzynski y Fritig, 2001; Agrios, 2005; van Loon *et al.*, 2006).

Lo anterior justifica la manipulación de la expresión defensiva en plantas de tabaco con el objetivo de protegerla contra *P. nicotianae* u otros patógenos potenciales mediante la aplicación previa de elicitores o la preinoculación con TMV o razas avirulentas del patógeno (Pan *et al.*, 1991; Ye *et al.*, 1992; Klarzynski y Fritig, 2001).

Se ha informado en esta especie la presencia constitutiva o inducida de una variedad de respuestas contra el ataque de microorganismos. Los primeros resultados de respuestas defensivas frente a la infección por patógenos se obtuvieron contra el virus del mosaico del tabaco (TMV en inglés) y datan de la década del 70 (van Loon, 1975). Se informó que las proteínas relacionadas con la patogénesis (PR) se acumulaban en hojas de plantas de tabaco posterior a la infección con TMV (van Loon, 1975; Ye *et al.*, 1990). Esta acumulación de proteínas PR estaba asociada con la resistencia a enfermedades (van Loon, 1999; van Loon *et al.*, 2006) y con la resistencia inducida por compuestos químicos (van Loon y Antoniew, 1982; Ohashi *et al.*, 1986).

#### 2.1.3.3.1 Las $\beta$ -1,3-glucanasas

En tabaco varias proteínas PR fueron identificadas como  $\beta$ -1,3-glucanasas (Kauffmann *et al.*, 1987), un tipo de hidrolasa que se caracteriza por degradar el componente  $\beta$ -1,3-glucano en la pared celular de varios hongos que lo contienen (Bartnicki-García y Wang, 1983). Existen evidencias directas de la acción antimicrobiana de las  $\beta$ -1,3-glucanasas a través de la degradación de los componentes de la pared celular de patógenos y en acción coordinada con enzimas quitinasas (Mauch *et al.*, 1988; Leubner-Metzger y Meins, 1999; van Loon *et al.*, 2006).

También hay evidencias indirectas que apoyan el papel de las  $\beta$ -1,3-glucanasas como defensas de las plantas. Estas enzimas son inducidas en tabaco por procesos infecciosos o elicitores de las paredes celulares fungosas. Pan *et al.* (1991) observaron incrementos más rápidos de actividad  $\beta$ -1,3-glucanasa en plantas de tabaco inoculadas con *Peronospora hyoscyamy* fsp. *tabacina* que en las plantas controles. También fue informada la activación de  $\beta$ -1,3-glucanasas cuando se trataron células en suspensión de *N. tabacum* con elicitores de la pared celular de *Phytophthora*

*nicotianae* (Oelofse y Dubery, 1996). Recientemente fue demostrada la expresión de un gen de  $\beta$ -1,3-glucanasa (PR-2d) en tabaco, asociado con la inducción de respuesta SAR por *P. hyoscyamy* (Funnell *et al.*, 2004).

Sin embargo, las demostraciones más directas de la implicación de determinadas proteínas en una función concreta se obtienen por manipulación de los genes que codifican esas proteínas para demostrar incremento o reducción de sus funciones en las plantas. Así, la expresión en tabaco de un gen de  $\beta$ -1,3-glucanasa de soya incrementó la resistencia de las plantas transgénicas contra el patógeno *P. nicotianae* y *Alternaria alternata* (Yoshikawa *et al.*, 1993). Más preciso aún, la expresión constitutiva de un gen de  $\beta$ -1,3-glucanasa en plantas de tabaco incrementó los niveles de actividad de esta enzima y la resistencia del follaje de las líneas transgénicas regeneradas, contra *P. hyoscyamy* y *P. nicotianae*, patógenos que contienen glucano y celulosa como componentes principales de su pared celular (Lusso y Kuć, 1996). A su vez, la resistencia contra ambos patógenos disminuyó en las líneas donde se insertó un gen antisentido de la  $\beta$ -1,3-glucanasa.

#### 2.1.3.3.2 La actividad PAL y la vía fenil propanoides

Los fenilpropanoides son compuestos naturales formados por desaminación del aminoácido L-fenilalanina con la enzima L-Fenilalanina amonioliasa (PAL del inglés). Constituye la primera enzima clave en una serie de vías enzimáticas que dan origen a grupos de compuestos, entre los que se cuentan Flavonoides, Isoflavonoides, Estilbenos, Cumarinas, Ácidos benzoicos y Ligninas, estando cada grupo más representado en determinadas especies de acuerdo a las familias de plantas a que pertenecen (Dixon *et al.*, 2002). Una gran parte de los compuestos fenilpropanoides funcionan como defensas de las plantas, que incluyen desde barreras físicas y químicas contra la infección hasta moléculas señales (como el ácido salicílico) involucradas en la señalización local y sistémica de la inducción de genes defensivos, de la explosión oxidativa y de la muerte celular inducida por patógenos (Dempsey *et al.*, 1999; Dixon *et al.*, 2002).

La PAL es considerada un indicador defensivo de gran importancia en las plantas y una enzima clave en la formación de estructuras antimicrobianas en tabaco, como la

producción de ácido clorogénico que está involucrado en la resistencia contra microorganismos e insectos (Blount *et al.*, 2000; Dixon *et al.*, 2002). Se ha informado la activación de la PAL y otras enzimas de los fenilpropanoides en células de tabaco, inducidas por enzimas microbianas capaces de liberar oligosacarinas de las paredes celulares vegetales (Negrel y Javelle, 1995).

La acción indirecta de esta enzima y de la vía, fue reconocida al determinar la inducción de actividad PAL y acumulación de estructuras defensivas que se forman en dicha vía en tabaco activadas por elicitores de *Phytophthora nicotianae* (Desender *et al.*, 2007). Se ha teorizado que la deposición de lignina y su entrecruzamiento covalente con carbohidratos y proteínas en la pared celular durante el proceso de polimerización de esta estructura interfieren la hidrólisis enzimática y la penetración mecánica de los tejidos de la planta por patógenos fungosos (Bruce y West, 1989). En adición, se informó la reducción de los síntomas de infección con *P. nicotianae* y *Cercospora nicotianae* en tallos y hojas de plantas de tabaco inoculadas con ambos patógenos, respectivamente, y donde se había expresado, de forma constitutiva, un gen de PAL (Way *et al.*, 2002).

#### 2.1.3.3.3 Las peroxidasas

Las peroxidasas (POD) son enzimas que intervienen en el metabolismo del peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), la síntesis de suberina, la síntesis de lignina y la reticulación intramolecular de los compuestos de la pared vegetal (Chittoor *et al.*, 1999; Resende *et al.*, 2003). Como respuesta a la invasión, las plantas producen, local y sistémicamente, radicales superóxidos que devienen  $H_2O_2$  por acción de enzimas POD, como la superóxido dismutasa y este a su vez es metabolizado a  $H_2O + O_2$  por acción de enzimas catalasas (Chittoor *et al.*, 1999; Resende *et al.*, 2003).

La suberización ocurre bajo control del desarrollo de la planta, pero puede también ser inducida en caso de infección, creando así una barrera mecánica defensiva. Las POD aniónicas polimerizan los compuestos fenólicos para formar el esqueleto aromático que constituye la suberina (Agrios, 2005c; Passardi *et al.*, 2005).

Por su parte, la síntesis de lignina en plantas elicitadas ocurre por acción de las peroxidasas cuando estas enzimas transforman los alcoholes cinamílicos, resultado de la activación vía fenilpropanoides, en radicales fenoxi que podrían entonces asociarse

de manera no enzimática para formar la lignina (Chittoor *et al.*, 1999). Se ha informado que la dinámica de activación de enzimas PAL y POD coincide cronológicamente con la acumulación y/o polimerización fenólica en plantas de tomate elicidadas con quitosana (Benhamou, 1995).

Las uniones entre diferentes compuestos de la pared celular están bajo control de las POD cuya expresión varía con el estadio de crecimiento del vegetal, pero puede además ser inducido por infección con patógenos. Los sustratos esenciales de las POD para estas uniones intramoleculares son las tirosinas presentes, principalmente, en las glicoproteínas ricas en hidroxiprolinas que se encuentran en la pared y en los derivados del ácido p-cumárico (grupos cumaroil, ferulatos y p-hidroxibenzoatos), que son los más frecuentemente asociados a las pectinas de la pared (Passardi *et al.*, 2005). La eficacia de la respuesta defensiva dependerá del nivel de peroxidasas parietales, la disponibilidad de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y el grado de ferulación de las pectinas en la pared celular.

Se ha informado la inducción local y sistémica de POD en tabaco como resultado de preinoculación e inmunización con patógenos. Así, la inoculación con TMV permitió observar la expresión de POD en coordinación con otras enzimas defensivas (Matsuoka y Ohashi, 1986). Por otro lado, Ye y colaboradores (1990) detectaron el incremento de dos peroxidasas aniónicas presentes en los espacios intercelulares e ionicamente unidas a las paredes celulares de plantas de tabaco. Ambas enzimas fueron asociadas a la respuesta inmune contra *Peronospora hyoscyamy* fsp. *tabacina*, patógeno biótrofo de los oomycetes que se desplaza por los espacios intercelulares de los tejidos.

## **2.2 Las Oligosacarinas**

### **2.2.1 Conceptos: Elicitores y Oligosacarinas.**

La respuesta defensiva es el resultado del reconocimiento por la planta de diversos compuestos liberados de los patógenos y de la propia planta durante el proceso de patogénesis, cuando enzimas excretadas por ambos adversarios degradan las paredes celulares del contrario (Ebel y Mithofer, 1998; Esquerré-Tugayé *et al.*, 2000; Ridley *et*

*al.*, 2001). Las estructuras liberadas y reconocidas por la planta se denominan elicitores.

Los **Elicitores** son sustancias que pueden inducir respuestas defensivas cuando se aplican en tejidos o en células de plantas. Son compuestos de diversa estructura y origen: Oligosacáridos, glicoproteínas, péptidos, lípidos, entre otros. Se ha demostrado que los elicitores de tipo oligosacárido tienen importantes funciones en las interacciones planta-patógeno (Ebel y Mithofer, 1998).

Los componentes polisacáridos y glicoproteicos de las paredes celulares constituyen una fuente de oligosacáridos, que además de ser elicitores de respuestas defensivas en la planta, algunos ejercen efectos en el crecimiento y desarrollo de la misma a bajas concentraciones. El término **Oligosacarinas** se refiere, por tanto, a oligosacáridos de diferente origen con efectos biológicos en las plantas. Están constituidos por una cadena de residuos glicósidos unidos por enlaces glicosídicos (Coté *et al.*, 1998; Shibuya y Minami, 2001).

### **2.2.2 Tipos, clasificación, localización y estructura.**

Las Oligosacarinas se denominan de tipo endógena o exógena, de acuerdo a que sean obtenidas o liberadas de las paredes celulares de la planta o del patógeno, respectivamente. De cada origen hay diferentes tipos.

Oligosacarinas endógenas: Oligogalacturónidos (Oligosacáridos pécticos) y Xiloglucanos.

Los *Oligogalacturónidos* consisten en una cadena lineal de moléculas de ácido galacturónico unida por enlaces  $\alpha$ -1-4. El número de restos de D-galacturonatos que contiene el oligosacárido define su grado de polimerización (Ridley *et al.*, 2001). Se localizan en la porción péctica que constituye la pared celular de las plantas y en condiciones naturales se liberan de la pectina mediante hidrólisis enzimática por acción de la planta o como resultado del ataque de patógenos (Esquerré-Tugayé *et al.*, 2000; Ridley *et al.*, 2001).

Por su parte, los polímeros de *Xiloglucanos* son los principales polisacáridos hemicelulósicos que componen la estructura de la pared celular primaria de las plantas dicotiledóneas y monocotiledóneas no poáceas. También forman parte de los

polisacáridos de reserva en semillas de dicotiledóneas. Consisten en un esqueleto de residuos de glucosa unidos por enlaces  $\beta$ -1-4, algunos de estos residuos pueden estar sustituidos por  $\alpha$ -Xilosa,  $\beta$ -Galactosa y  $\alpha$ -Fucosa (Hayashi, 1989). La fragmentación de estos polímeros con hidrólisis química o enzimática libera oligosacáridos de xyloglucanos con actividad biológica en plantas (Cutillas-Iturralde *et al.*, 1998; Marry *et al.* 2003). Específicamente, el fenómeno de crecimiento y extensión a nivel celular está estrechamente relacionado con el metabolismo de los polímeros de Xiloglucanos y su degradación enzimática, además de liberar los fragmentos mencionados, provoca el debilitamiento de la pared celular de la planta (Cutillas-Iturralde y Lorences, 1997; Kaku *et al.*, 2002)

Oligosacarinas exógenas: Oligoglucanos, Oligoquitinas, Poli y Oligoquitosanas y Lipoquito-oligosacáridos.

Entre las oligosacarinas de tipo exógeno, los derivados de quitina y los oligoglucanos son liberados de la pared celular de diversos patógenos que los contienen, mediante degradación enzimática por enzimas glucanasas y quitinasas que se excretan por la planta como respuesta al ataque del patógeno en el proceso de patogénesis (Esquerré-Tugayé *et al.*, 2000; Shibuya y Minami, 2001). A su vez, los conocidos como factores Nod (Lipo-oligo-quitinas) son sintetizados de novo y excretados por bacterias de la familia Rizobiaceae, como respuesta a señales químicas liberadas por la planta y percibidas por el microorganismo (Spaink, 2000).

### **2.2.3 Función biológica de las Oligosacarinas en plantas**

Las Oligosacarinas fueron primeramente reconocidas como polisacáridos y oligosacáridos que inducían respuestas defensivas y resistencia en plantas. Sin embargo, estudios posteriores desarrollados en la década de los 90 las implicaron, además, en varias respuestas relacionadas con el crecimiento y desarrollo del vegetal (Marfa *et al.*, 1991; Côté *et al.*, 1998). El descubrimiento de la estructura del principal esqueleto carbonado de los factores de nodulación y su efecto en la morfogénesis de las raíces de las leguminosas contribuyó a establecer a las oligosacarinas como una nueva jerarquía de hormonas en las plantas, cuya acción precede la síntesis y

acumulación de las conocidas hormonas tradicionales (Côté *et al.*, 1998; Prithiviraj *et al.*, 2000)

#### 2.2.3.1 Regulación del crecimiento y desarrollo

En la actualidad es reconocido que diferentes estructuras de oligosacarinas endógenas y exógenas juegan un papel en diferentes estadios del desarrollo de las plantas como son la división, el crecimiento y la morfogénesis celular (McDougall y Fry, 1990; Vargas-Rechia *et al.*, 1998; Plana *et al.*, 2003; Nieves *et al.*, 2006; Cid *et al.*, 2006), el crecimiento radical y vegetativo (Chibu *et al.*, 2002; Falcón *et al.*, 2005; Falcón y Cabrera, 2007) y el acortamiento y mejoramiento del período de floración y fructificación (Utsunomiya *et al.*, 1998; Ohta *et al.*, 2004). Adicionalmente, las oligosacarinas sintetizadas y excretadas por rizobacterias fijadoras de nitrógeno de la familia Rhizobiaceae provocan la germinación de algunas plantas y están involucradas en los eventos primarios de las raíces que conllevan al establecimiento de la simbiosis entre las leguminosas y las bacterias mencionadas (Prithiviraj *et al.*, 2000; Lhuissier *et al.*, 2001; Prithiviraj *et al.*, 2003)

#### 2.2.3.2 Inducción de respuestas defensivas

##### 2.2.3.2.1 Oligosacáridos de $\beta$ -Glucanos

Los oligosacáridos derivados de los polímeros de  $\beta$ -glucanos que conforman la pared celular de patógenos del género *Phytophthora* han sido bien documentados como inductores de respuestas defensivas en plantas. Así, un hepta- $\beta$ -glucósido ramificado, obtenido del glucano de la pared de *Phytophthora sojae* por hidrólisis ácida, demostró ser un elicitador muy activo de la síntesis de la fitoalexina gliceolina en células cotiledonales de soja (Sharp *et al.*, 1984), demostrándose, además, que la hidrólisis parcial del glucano de *Phytophthora sojae* libera fragmentos con actividad elicitora en diferentes plantas de la familia *Fabaceae* (Cosio *et al.*, 1996), lo que indica un sistema similar de percepción en esta familia de plantas.

En células de tabaco, el hepta- $\beta$ -glucósido no actuó como elicitador, sin embargo, una cadena lineal de  $\beta$  1-3 glucano (laminarina), extraída del alga *Laminaria digitata*

mostró ser un elicitador activo de respuestas defensivas (Klarzynski *et al.*, 2000) e incluso causó la reducción de la infección fungosa en hojas de vid (Aziz *et al.*, 2003).

#### 2.2.3.2.2 Oligosacáridos pécticos u Oligogalacturónidos

Los oligogalacturónidos derivados de los polisacáridos pécticos de las paredes celulares de las plantas han sido descritos como inductores de una gran variedad de respuestas defensivas en células, órganos y plantas completas de numerosas especies, entre las que se encuentran la inducción de fitoalexinas, inhibidores de proteinasas, proteínas PR y el proceso de lignificación (Ridley *et al.*, 2001; Shibuya y Minami, 2001). Los oligogalacturónidos se pueden generar de las sustancias pécticas de la pared celular primaria de la planta por hidrólisis ácida parcial o por acción de enzimas pectinasas o pectato liasas de patógenos. Es conocido además que, sin importar el método de generación, son dependientes del grado de polimerización (GrP) para la inducción de respuestas defensivas, siendo los GrP entre 10 y 12 los más activos (Ridley *et al.*, 2001; Shibuya y Minami, 2001). Solo recientemente se informó la protección de un cultivo contra un patógeno por inducción de resistencia con oligogalacturónidos (Aziz *et al.*, 2004).

#### 2.2.3.2.3 Oligosacáridos de quitina y quitosana

La quitina, un polímero de N-acetil-glucosamina unido por enlaces  $\beta$  1-4, es un componente común de las paredes celulares de varias familias de hongos (Bartnicki-García y Wang, 1983). Sus fragmentos (N-acetil quitooligosacáridos) han sido implicados en la inducción de una gran variedad de respuestas vinculadas a la defensa de la planta, como son la inducción de fitoalexinas, lignificación, proteínas PR, la expresión de genes defensivos, etc, fundamentalmente, en especies del grupo de las monocotiledóneas y especialmente en suspensiones celulares de arroz (Shibuya y Minami, 2001).

Se estudió también, la activación de respuestas secundarias vinculadas a la transducción de la señal defensiva por fragmentos de quitina, entre las que se destacan cambios en el flujo iónico y fosforilación de proteínas, depolarización de la membrana plasmática y eflujo de iones  $\text{Cl}^-$  y  $\text{K}^+$ , acidificación citoplasmática,

generación de especies reactivas de oxígeno y biosíntesis de ácido jasmónico (Nishizawa *et al.*, 1999; Shibuya y Minami, 2001; Zhao *et al.*, 2005).

La quitosana es un polímero de  $\beta$  1-4 glucosamina componente natural de las paredes celulares de los hongos Zygomycetos (Wessels y Sietsma, 1981). Tanto el polímero como sus oligómeros son potentes inductores de respuestas defensivas como las mencionadas y de resistencia en la planta contra patógenos. Sin embargo, las concentraciones requeridas para la activación de las respuestas defensivas son notablemente superiores que aquellas necesarias para inducir dichas actividades con los oligómeros de quitina (Shibuya y Minami, 2001; Bautista-Baños *et al.*, 2006).

Como en el caso de los oligogalacturónidos, los fragmentos de quitina (y también los de quitosana) son dependientes del grado de polimerización (GrP) de la molécula en la activación de las respuestas antes mencionadas, siendo los tamaños por encima de GrP 4 y principalmente son el heptámero y el octámero los que inducen las respuestas a las menores concentraciones (Shibuya y Minami, 2001; Khan *et al.*, 2003).

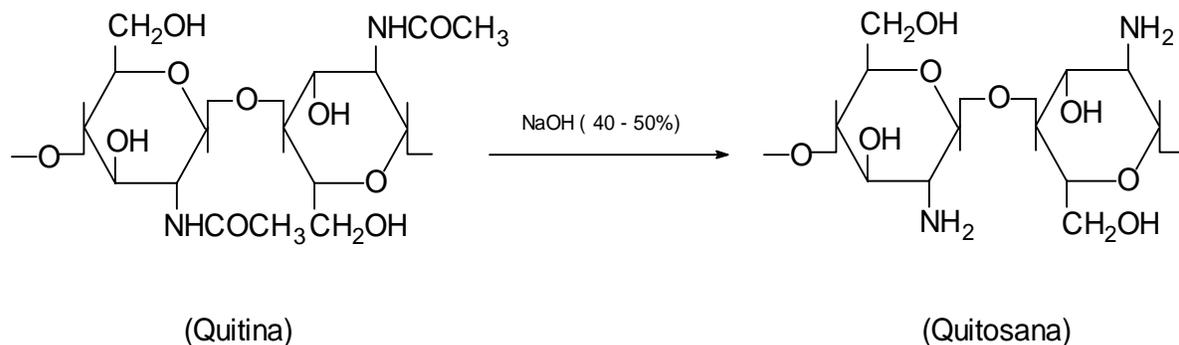
## **2.3 Los derivados de Quitina en la protección de las plantas contra patógenos**

La quitina es un polisacárido lineal compuesto de residuos de 2-acetamida-2-deoxy-D-glucopiranosido unidos por enlaces  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4). Es el segundo polisacárido más común en la naturaleza después de la celulosa y difiere de ésta por el contenido de nitrógeno presente en cada residuo de glucosa en el caso de la molécula de quitina. Este polímero está presente de manera natural en las paredes celulares de varios grupos de hongos, así como en el exoesqueleto de insectos y artrópodos. La producción de quitina a partir del exoesqueleto de los crustáceos, su principal fuente mundial, se incrementó substancialmente en los últimos 20 años como resultado de la versatilidad y las múltiples aplicaciones de este polímero y sus derivados en los campos de la medicina, la nutrición, la industria, la cosmética, el cuidado del medio ambiente y la agricultura (Majeti y Kumar, 2000; Hague *et al.*, 2005; Bautista-Baños *et al.*, 2006).

### **2.3.1 La quitosana y sus características químicas**

La Quitosana es el principal derivado de la quitina y se obtiene por desacetilación parcial o total de esta última, por lo que está fundamentalmente compuesta por residuos de glucosamina, 2-amino-2-deoxi- $\beta$ -D-glucosa (Figura 2). Este proceso produce un polímero soluble en ácidos diluidos, lo cuál, es una de las principales ventajas de la quitosana para su uso en agricultura.

Las cargas positivas presentes en el grupo amino de la quitosana le confieren a la molécula un carácter policationico y determinan numerosas y únicas propiedades biológicas de gran importancia y uso en la industria, en la cosmetología (aditivos del pelo, cremas faciales y para el cuerpo), la nutrición (preservantes, antioxidantes y antimicrobianos), la biotecnología (quelador, emulsificador, floculante), farmacología y medicina (fibras, drogas, membranas, órganos artificiales) y en la agricultura (modificadores de suelo, películas, fungicidas y elicitores), entre otras aplicaciones (Majeti y Kumar, 2000; Hague *et al.*, 2005; Bautista-Baños *et al.*, 2006).



**Figura 2:** Estructura monomérica y enlaces que conforman los polímeros de quitina y quitosana. Formación de quitosana mediante desacetilación básica del grupo amida de la quitina.

Teóricamente, la quitosana se refiere al polímero de quitina carente de grupos N-acetililos. Sin embargo, usualmente los polímeros de quitosana que se obtienen y se aplican con distintos fines, poseen una acetilación parcial de los grupos aminos dependiente del método y las condiciones en que se obtuvieron a partir de la quitina.

Debido a la reactividad biológica de las cargas positivas del grupo amino, los polímeros de quitosana tendrán más o menos actividad biológica, en dependencia del

número y distribución de cargas positivas en la molécula. Esto también afecta la solubilidad del polímero en ácidos débiles o soluciones acuosas aciduladas.

La masa molecular del polímero también juega un papel importante en sus efectos biológicos. Aunque varias metodologías pueden aplicarse para determinar la masa molecular de la quitosana, la viscosimetría es un método rápido y simple para la determinación de este parámetro (Maghami y Roberts, 1988; Majeti y Kumar, 2000). La conversión de quitina en quitosana reduce la masa molar promedio del polímero de  $1-2,5 \times 10^6$  a  $1-5 \times 10^5$  (Majeti y Kumar, 2000).

#### 2.3.1.1 Métodos de obtención de quitosana

La producción mundial de quitosana a partir de quitina de crustáceos sobrepasa los 1000 millones de toneladas, siendo Japón, EUA y la India los mayores productores, aunque también Noruega, Polonia, China y Australia tienen producciones elevadas (Tsigos *et al.*, 2000; Majeti y Kumar, 2000).

Los métodos de obtención de quitosana son fundamentalmente químicos y consisten en desacetilaciones básicas (NaOH) del grupo N-acetilo de la quitina que puede ejecutarse en condiciones de alta temperatura y concentración de NaOH (Método heterogéneo) o en condiciones más suaves de ambas variables (Método homogéneo). La diferencia de métodos redundan en las características de la quitosana obtenida que resulta mucho más desacetilada en condiciones heterogéneas, donde también el polímero estará más degradado (Tsigos *et al.*, 2000).

Sin embargo, la desacetilación básica, que es hasta el momento la forma de preparación más sencilla y utilizada, puede tener desventajas en las características del producto obtenido, como pueden ser la dispersión de masas moleculares y la distribución de la desacetilación del amino en la molécula resultante, en relación con algunas de las aplicaciones farmacéuticas e industriales de la quitosana (Tsigos *et al.*, 2000).

Una alternativa para estas desventajas de la forma química de obtención puede ser la desacetilación enzimática a través de quitinas desacetilasas. Este tema ha sido de gran interés en los últimos 10 años y se han estudiado un grupo de enzimas de microorganismos con diferentes tipos de quitina (Tsigos *et al.*, 2000). Los resultados demuestran que las enzimas desacetilan con una velocidad adecuada solo un 10% de

la molécula de quitina, debido a impedimentos estéricos relacionados con la conformación del polímero. Resulta necesario aplicar métodos alternativos que causan cambios en las propiedades físicas del polímero previo a la aplicación de las desacetilasas para lograr porcentajes mayores de desacetilación (Tsigos *et al.*, 2000). Por lo anterior, no se ha informado aún de la preparación comercial de quitosana por vía enzimática.

#### 2.3.1.2 Preparación de derivados de quitosana de menor masa molar

La reducción de la masa molar del polímero de quitosana ofrece las ventajas de incrementar la solubilidad en agua de los fragmentos resultantes y de aumentar las potencialidades biológicas de este compuesto (Jeon *et al.*, 2000; Bautista-Baños *et al.*, 2006). Lo anterior ha justificado los numerosos estudios realizados de degradación del polímero por diferentes métodos, pero fundamentalmente, por hidrólisis químicas y enzimáticas (Jeon *et al.*, 2000; Jin y Shen, 2002; Kittur *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2004; Cabrera y Van Cutsem, 2005; Xing *et al.*, 2005; Einbu *et al.*, 2007). En la actualidad se prefiere la hidrólisis enzimática en lugar de la química para la preparación de quito-oligómeros debido a tener la ventaja de ser más específica y a que se ha demostrado una inusual susceptibilidad de la quitosana a diferentes clases de enzimas como glicanasas, lipasas y proteasas (Pantaleone *et al.*, 1979), lo que ha permitido encontrar interesantes candidatos entre enzimas y complejos enzimáticos de bajo costo (Shin-Yaa *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2004; Falcón *et al.*, 2005; Cabrera y Van Cutsem, 2005).

#### **2.3.2 Actividad antimicrobiana directa de la quitosana y sus derivados**

La actividad antimicrobiana de la quitosana ha sido documentada tanto en experimentos *in vitro* como *in situ* (Rabea *et al.*, 2003 y Bautista-Baños *et al.*, 2006). La literatura informa que la inhibición del desarrollo de muchos patógenos está altamente correlacionada con el incremento de la concentración de quitosana en el medio de crecimiento, indicando que en la medida en que aumenta la concentración se incrementa la inhibición, existiendo diferencias entre acción fungistático y fungicida de acuerdo a las concentraciones probadas (Bautista-Baños *et al.*, 2006).

Es aceptado entre los investigadores del tema que el carácter policationico de la quitosana es la clave de sus propiedades antimicrobianas. Allan y Hadwiger (1979) informaron que los grupos aminos cargados positivamente inhibían el crecimiento de hongos y bacterias, a través de la formación de complejos polielectrolitos con los grupos carboxilos cargados negativamente presentes en las paredes celulares de los microorganismos probados (Rabea *et al.*, 2003; Raafat *et al.*, 2008). Investigaciones posteriores confirmaron estos primeros resultados sugiriendo que mientras mayor sea el número de grupos aminos no acetilados en la molécula de quitosana mayor será su actividad antimicrobiana (Park *et al.*, 2002; Bautista-Baños *et al.*, 2006). Sin embargo, no se han encontrado en la literatura consultada estudios que demuestren el efecto de este parámetro sobre la germinación de esporas de hongos y oomycetes.

Estudios más recientes demuestran que la quitosana no solo es efectiva en inhibir el crecimiento del patógeno, sino que también provoca importantes cambios morfológicos, alteraciones estructurales y desorganizaciones moleculares dentro de la propia célula del patógeno (Bautista-Baños *et al.*, 2006).

Los eventos de desorganización celular, mayormente visibles al microscopio, incluyen excesiva ramificación micelial, forma anormal, engrosamiento y reducción del tamaño de la hifa (El Gaouth *et al.*, 1992; Cheah *et al.*, 1997). A nivel celular ocurre la aparición de largas vesículas o de células desprovistas de citoplasma (Ait Barka *et al.*, 2004) vacuolación, retracción y alteración de la membrana plasmática, adelgazamiento de la pared celular, distorsión de las hifas y ocurrencia de agregación citoplasmática (Benhamou, 1996; El Gaouth *et al.*, 1999; Laflamme *et al.*, 1999).

Diferentes estudios han informado también la reducción de la esporulación y la inducción con quitosana de afectaciones morfológicas (área, longitud y forma), en esporas y conidios de varios patógenos como son *Colletotrichum gloeosporioides*, *Rhizopus stolonifer*, *Penicillium digitatum*, *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus niger* entre otros (Bautista-Baños *et al.*, 2003; 2004; Plascencia-Jatomea *et al.*, 2003; Eweis *et al.*, 2005; Pacheco *et al.*, 2008; Hernández-Lauzardo *et al.*, 2008; Palma-Guerrero *et al.*, 2008).

Según resultados de algunos autores, el tamaño de la cadena polimérica (masa molar) es otro factor importante en la inhibición del crecimiento de muchos patógenos. La

reducción o incremento del tamaño inhibe diferencialmente el crecimiento de diferentes especies bacterianas (Rhoades y Roller, 2000; Zheng y Zhu, 2003). Mientras que en hongos hay pocos informes en este tema, que evidencian que la inhibición del crecimiento varía con las diferentes MM de compuestos de quitosana y con el tipo de hongo con que se trabaje (Chien y Chou, 2006; Hernández-Lauzardo *et al.*, 2008), en oomycetes estos trabajos son muy escasos y recientes (Xu *et al.*, 2007). Por consiguiente, resulta necesario aumentar el número de trabajos que precisen el efecto sobre hongos y oomycetes, cuando varía la masa molecular de la quitosana.

### **2.3.3 Resistencia inducida activada por quitosana y derivados**

Numerosos estudios han demostrado que la quitosana y sus fragmentos constituyen elicitores exógenos de respuestas defensivas en varias plantas, principalmente dicotiledóneas (Shibuya y Minami, 2001; Bautista-Baños *et al.* 2006). Entre las respuestas se incluyen enzimas defensivas o involucradas en rutas metabólicas que conllevan a la producción de compuestos tóxicos al patógeno o al reforzamiento de las paredes y cubiertas de la planta para evitar la entrada de estos.

Se ha documentado la activación de la biosíntesis de fitoalexinas en vainas de chícharo (*Pisum sativum* L.) (Hadwiger y Beckman, 1980), la inducción de inhibidores de proteinasas en hojas de tomate (*Solanum lycopersici* Mill.) (Walker-Simmons y Ryan, 1984) y de proteínas relacionadas con la patogénesis (glucanasas y quitinasas) y enzimas claves del metabolismo secundario y la transducción de la señal defensiva como la PAL, la POD y las lipoxigenasas en hojas de maní (*Arachis hypogaea*), vid (*Vitis vinifera* L.) y pepino (*Cucumis sativus* L.) (Sathiyabama y Balasubramanian, 1998; Ben-Shalom *et al.*, 2003; Trotel-Aziz *et al.*, 2006).

También se informó en varios trabajos la inducción por quitosana de barreras defensivas como la lignina y la callosa para sellar la entrada o contener la expansión de los patógenos en los tejidos (Kauss *et al.*, 1989; Benhamou *et al.*, 1998). Estudios para determinar el orden de inducción de barreras defensivas en la planta por quitosana, demostraron la activación *de novo* de compuestos fenólicos como la primera línea defensiva para inhibir el crecimiento de hongos fitopatógenos y los  $\beta$ -1-

3 glucanos como la segunda barrera mecánica para detener la invasión de otras células (Benhamou *et al.*, 1994; Lafontaine y Benhamou, 1996).

Tanto la inducción de marcadores defensivos como de resistencia contra patógenos están influidos por diversos factores cuando se utilizan derivados de este polímero. Obviamente, la concentración de los derivados de quitosana ejerce un papel. Sin embargo, en experimentos para inducir la enzima hidrolítica quitinasa en semillas de soya (*Glycine max* L.), la activación fue influenciada decisivamente por el tiempo de exposición a la quitosana (inmersión de semillas), más que a las propias concentraciones de quitosanas empleadas (Tejchgraber *et al.*, 1991).

La inducción de protección parcial o total de la planta por quitosana o sus oligómeros en diversos sistemas planta-patógeno ha sido ampliamente documentada en la última década (Struszczyk *et al.*, 1999; Romanazzi *et al.*, 2002; Bhaskara Reddy *et al.*, 2000; Bautista-Baños *et al.*, 2003; Ben-Shalom *et al.*, 2003; Molloy *et al.*, 2004), constituyendo en la actualidad estas oligosacarinas principios activos en varios agroquímicos de nuevo tipo destinados a la protección de los cultivos (Ait Barka *et al.*, 2004; Sharathchandra *et al.*, 2004).

Varios autores demostraron que la inducción de respuestas defensivas y de protección en las plantas contra patógenos puede lograrse con diferentes formas de aplicación de derivados de quitosana como son su adición a la rizosfera de la planta, la aspersión foliar o la inmersión de semillas previo a la siembra (Benhamou *et al.*, 1998; Ben-Shalom *et al.*, 2003; Sharathchandra *et al.*, 2004). Sin embargo, no siempre es suficiente la inducción de resistencia por quitosana en la planta para lograr la protección total de la planta contra el patógeno, sino que debe también jugar un papel la acción antimicrobiana directa del polímero (Ben-Shalom *et al.*, 2003).

Tanto las formas de aplicación de los derivados de quitosana como el grado de protección que se alcanza mediante la inducción de resistencia o su combinación con la actividad antimicrobiana directa del polímero, necesitan ser estudiados con mayor profundidad tomando en cuenta cada patosistema.

#### 2.3.3.1 Influencia de las características físico-químicas de la quitosana en la activación de resistencia.

El grado de acetilación (GrA) y la masa molar (MM) o grado de polimerización (GrP) de los derivados de quitosana influyen en la activación de respuestas defensivas en plantas. Kauss *et al.* (1997) demostraron que era necesario una acetilación parcial y fragmentación de la quitosana para la inducción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en pepino (*Cucumis sativus* L.); mientras que los resultados de Vander *et al.* (1998) demuestran que un GrA por encima de 35% en polímeros de quitosana activaba los mayores valores de PAL y peroxidasas (POD) en hojas de trigo (*Triticum aestivum* L.). El efecto de ambos parámetros sobre la inducción de la síntesis de calosa también fue estudiado en suspensiones celulares y protoplastos de *Catharanthus roseus* (Kauss *et al.*, 1989).

Más recientemente, Cabrera *et al.* (2006) comparando el efecto del GrA y el GrP en mezclas de oligosacáridos de quitosana en la inducción de PAL y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, encontraron menor actividad inductora para ambas respuestas con los menores GrP (3-6) y además cuando los oligos estaban menos acetilados. Sin embargo, la actividad PAL no se afectó al aumentar el GrA hasta 65%, algo que sí ocurrió con el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Los trabajos anteriores tienen el factor común de haberse realizado en complejos bioensayos, suspensiones celulares o partes de plantas, nunca con plantas completas.

Una revisión profunda de la literatura en el tema evidencia que no existen estudios sobre el efecto del GrA sobre la inducción de resistencia en plantas contra patógenos, mientras que son pocos y recientes aquellos trabajos donde se compara la inducción de resistencia por quitosana polímero y parcialmente degradada (Molloy *et al.*, 2004) contra patógenos post-cosecha. En tabaco solo se ha informado de estudios de protección antiviral con quitosana parcialmente degradada y una mezcla de oligosacáridos (Struszczyk *et al.*, 1999; Zhao *et al.*, 2007).

## **2.4 Resistencia inducida y quitosana en el contexto del Manejo Integrado de Plagas.**

En Cuba, la protección del cultivo del tabaco se realiza dentro del contexto de un manejo integrado de plagas. Este manejo incluye la selección adecuada de sustratos y tecnologías para la obtención de posturas sanas y con características de trasplante óptimas (Pérez *et al.*, 2002; García y Andino, 2002), la aplicación de productos

biológicos y químicos (Muiño *et al.*, 2001; García y Andino, 2002) y la selección y siembra de variedades menos susceptibles que mantengan altos rendimientos (Díaz *et al.*, 2001; García *et al.*, 2002; Espino, 2003; López *et al.*, 2003). A lo anterior, se debe añadir estudios de variabilidad en la virulencia de patógenos aislados en las zonas de producción y su potencial resistencia contra los químicos utilizados para combatirlos (Toledo, 2001 y 2002; Toledo y Rivas, 2001), con el objetivo de sustituir dichos productos por otros más efectivos y menos agresivos al ambiente (Muiño *et al.*, 2001; García y Andino, 2002).

La resistencia sistémica inducida (RSI) debe jugar un papel importante dentro del contexto del Manejo Integrado de Plagas, ya que posee ventajas que la convierten en una forma de protección necesaria en la agricultura actual, como son, la activación de resistencia contra patógenos incluso en plantas susceptibles, la inmunización de la planta contra un gran número de estos que incluyen hongos, virus y bacterias y la compatibilidad con la sostenibilidad de los cultivos y la protección del medio ambiente (Heil y Bostock, 2002). La RSI puede ser activada por compuestos químicos, rizobacterias no patógenas, patógenos avirulentos y elicitores derivados de estos (van Loon *et al.*, 2005; Zhao *et al.*, 2005). Sin embargo, en la actualidad solo unos pocos de estos compuestos químicos están siendo comercializados (Bounaurio *et al.*, 2002; Agostini *et al.*, 2003; Decapdiville *et al.*, 2003).

A pesar de las numerosas bondades de la quitosana demostradas en decenas de trabajos y del incremento en el número de patentes de aplicación en los últimos 15 años, puede considerarse que este polímero todavía no es muy explotado en el contexto agrícola mundial. De hecho, la mayoría de los productos agrícolas con base quitosana (Elexa®, Chitogel®, Aminogro®) comenzaron a aparecer hace menos de una década y no tienen todavía una demanda o producción elevada (Majeti y Kumar, 2000; Sharathchandra *et al.*, 2004; Walker *et al.*, 2004). Actualmente, se ha notado un impulso de las evaluaciones de quitosana en condiciones controladas, no controladas y de invernadero (Agostini *et al.*, 2003; Ait Barka *et al.*, 2004; Sharathchandra *et al.*, 2004; Walker *et al.*, 2004) e incluso su extensión y evaluación como resultado de decisiones gubernamentales (Walker *et al.*, 2004). En la actualidad

este polímero es reconocido dentro de los biopesticidas como un "activador de la defensa de las plantas derivado de crustáceos" (The Biopesticide Manual, 2001).

Dentro de la agricultura cubana actual, la quitosana tiene grandes perspectivas por ser un producto no tóxico que se puede manufacturar a partir de materias primas de producción nacional (Ramírez *et al.*, 2000) y posee el valor agregado de promover el crecimiento y desarrollo vegetativo. En el caso particular del cultivo del tabaco, la combinación de diferentes formas y momentos de aplicación permitiría reducir el inóculo de un gran número de patógenos del suelo mediante su acción antimicrobiana directa, permitiéndole a la planta un tiempo adicional para elaborar su propia estrategia defensiva, además de activar en ella resistencia inducida contra inóculos que arriben por vía aérea.

### III- Materiales y métodos

#### Materiales empleados

##### Compuestos de quitosanas

Los compuestos de quitosana empleados en la tesis fueron desarrollados por el grupo de productos bioactivos del Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas como parte de un PNCT en la rama de Biotecnología agropecuaria (Falcón *et al.*, 2005).

##### 1. Polímeros Q-63 y Q-88.

Ambos polímeros, de similar masa molar y diferente grado de acetilación, se obtuvieron separadamente mediante desacetilación básica (NaOH) de quitina de langosta (*Panulinus argus*), calidad farmacéutica, a escala de banco (Falcón *et al.*, 2005). Las características principales de ambos polímeros se presentan en la Tabla 1.

##### 2. Quitosana hidrolizada HQ-24.

Se empleó un hidrolizado crudo (HQ-24) que se obtuvo por hidrólisis enzimática del polímero Q-63 con el complejo enzimático Pectinex Ultra SP-L (Novozymes), rico en actividades pectinolíticas y otras enzimas hidrolíticas (Mutlu *et al.*, 1999; Roy *et al.*, 2003). La reacción se ejecutó con una proporción enzima-sustrato de 1:100 v/v, a 37°C, por 24 horas, a partir de una disolución de quitosana al 1% en KAc. La mezcla hidrolizada mostró una reducción del 80% en la viscosidad y un incremento de 25 veces en la presencia de azúcares reductores con respecto a la solución del polímero de origen.

##### 3. Mezcla de oligosacáridos de quitosana OLG.

La mezcla OLG se obtuvo por hidrólisis del polímero Q-88 con el complejo enzimático Pectinex Ultra SP-L (Novozymes) en la proporción enzima-sustrato 10: 100 v/v, a 37°C, por 24 horas, a partir de una disolución de quitosana al 1% en tampón de acetato y posterior precipitación de los oligosacáridos de interés con metanol 90% (v/v). De acuerdo a la caracterización por MALDI-TOF-MS (Bahrke *et al.*, 2002) del precipitado, se obtuvo una mezcla de oligoquitosanas con grado de polimerización (GrP) entre 5 y 9 (Tabla 1), donde cada oligosacárido coexistió entre una forma N-

acetilada y otra no acetilada, excepto el oligómero con GrP= 5 que solo presentó la forma no acetilada (Cabrera *et al.*, 2006).

**Tabla 1:** Características físico-químicas de los polímeros y oligómeros de quitosana empleados.

Tipo de quitosana	Abreviatura	Porcentaje del grado de acetilación	Masa molar (g.mol <sup>-1</sup> )	Grado de polimerización
Polímero	Q-88	12 <sup>a</sup>	1,35 x 10 <sup>5c</sup>	813 <sup>d</sup>
Polímero	Q-63	36,5 <sup>a</sup>	1,4 x 10 <sup>5c</sup>	794 <sup>d</sup>
Oligómeros	OLG	0-1 <sup>b</sup>	---	5-9 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> Determinado por espectroscopía infrarroja (Roberts, 1992)

<sup>b</sup> Determinado por MALDI-TOF (Cabrera *et al.*, 2006)

<sup>c</sup> Masa molar promedio determinado por viscosimetría (Maghami y Roberts, 1988).

<sup>d</sup> Grado de polimerización promedio calculado a partir de la masa molar viscosimétrica y la masa molar del monómero.

#### Preparación de las disoluciones de los compuestos de quitosana.

Se prepararon disoluciones madres al 1% de quitosanas y sus derivados con el siguiente procedimiento. Se disolvieron los compuestos con agitación en ácido acético al 1% y se ajustó el pH de la disolución con hidróxido de potasio (KOH) 2N hasta pH 5.5, completándose con H<sub>2</sub>O hasta el volumen correspondiente. Como control de los experimentos biológicos se preparó una disolución de HAc neutralizado con KOH, a partir de ácido acético al 1% por similar procedimiento de ajuste de pH. Tanto las disoluciones de los compuestos como el control se diluyeron con H<sub>2</sub>O hasta las concentraciones deseadas en cada experimento.

#### Material biológico

Patógeno empleado: *Phytophthora nicotianae*, Breda de Haan, cepa 227, caracterizada previamente como patógena en la variedad Corojo (Toledo, 2001 y 2002). Procedencia: Cepario del Instituto de Investigaciones del Tabaco, La Habana.

#### Cultivo de *P. nicotianae*

Se cultivó en medio sintético Papa-dextrosa-Agar (PDA) (Difco) (39 g.L<sup>-1</sup>) o PDA + Jugo V8 (Herdez, México) (20%) + Carbonato de calcio (5 g.L<sup>-1</sup>), pH 5.5 (denominado en lo adelante PDA-V8) para el crecimiento y experimentos *in vitro* con *P. nicotianae*.

Material vegetal: *Nicotiana tabacum* L., variedad cubana Corojo, susceptible a *P. nicotianae*, cepa 227 (Toledo, 2001 y 2002). Procedencia: Instituto de Investigaciones del Tabaco, La Habana.

#### Cultivo de plántulas de tabaco

Las plantas de tabaco se cultivaron, a partir de semillas botánicas, en dos sustratos diferentes ricos en componentes aconsejados para este cultivo (García y Andino, 2002; Pérez *et al.*, 2002), según se describe en los experimentos. Las plantas crecieron en cámara de crecimiento en condiciones controladas de luz/oscuridad 16/8 horas y de temperatura 28°C/22°C, con iluminación artificial de  $1 \times 10^4$  mol.m<sup>2</sup>.s<sup>-1</sup>.

## Metodologías y experimentos realizados

### **3.1. Efecto de quitosanas y derivados de menor masa molar sobre el crecimiento y la viabilidad *in vitro* de *P. nicotianae*.**

#### **3.1.1** Quitosana y quitosana hidrolizada sobre el crecimiento *in vitro* del micelio de *P. nicotianae*.

En placas Petri de 90 mm de diámetro se vertieron 20 mL de medio PDA contentivo de los compuestos de quitosana (Q-63 y HQ-24) a las concentraciones de 0,25, 0,5 y 1 g.L<sup>-1</sup> y como solución control KAc. El medio de cultivo y las soluciones de quitosana se esterilizaron por separado en autoclave a 120°C, 152 KPa, por 15 minutos y se mezclaron previo a su adición en las placas. En el centro de cada placa se colocó un disco de agar de 6 mm de diámetro con micelio, tomado de los márgenes de un cultivo de *P. nicotianae* crecido en PDA por 7 a 9 días. Las placas se incubaron en oscuridad a 28 °C hasta que el tratamiento control alcanzó el borde de la misma.

En un diseño completamente aleatorizado (DCA), se determinó el crecimiento radial de *P. nicotianae* midiendo el diámetro de cada colonia por placa, cuando el control alcanzó el borde de la misma (Laflamme *et al.*, 1999; Park *et al.*, 2002). Se utilizaron cuatro réplicas por tratamiento y el experimento se repitió dos veces. Se calculó el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial con respecto al control y se transformaron los datos mediante la función  $\text{Arcsen}\sqrt{x}$ . Previa verificación del

cumplimiento de las premisas del ANOVA, los resultados se procesaron estadísticamente mediante un análisis de varianza bifactorial cuyos factores fueron el Compuesto y la Concentración, y las medias se compararon mediante la prueba de Tukey para  $p \leq 0.05$  en el programa Statgraphics Plus, versión 5.0 (Statistical Graphics Corporation, 2000).

### **3.1.2** Quitosanas y oligoquitosanas sobre el crecimiento *in vitro* del micelio de *P. nicotianae*.

El experimento se realizó como se describe en el epígrafe anterior (3.1.1). El medio utilizado fue PDA-V8 tanto en el ensayo, como para el crecimiento previo del microorganismo. Los compuestos de quitosana ensayados fueron Q-63, Q-88 y OLG a las concentraciones de 0,5, 1, 1,5 y 2,0 g.L<sup>-1</sup>. En un DCA, se realizaron ocho réplicas por tratamiento y se repitió dos veces el ensayo. El procesamiento de los datos fue como en el epígrafe anterior.

### **3.1.3** Quitosanas y oligoquitosanas sobre la viabilidad *in vitro* de zoosporas de *P. nicotianae*.

Para la obtención de zoosporas se cultivó *P. nicotianae* en placas de 90 mm durante 15 días en el medio PDA-V8, a 24 °C bajo luz constante a 40 cm de dos tubos fluorescentes de 40w. Se adicionaron 10 mL de H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> por placa y suavemente se maceró el micelio con espátula de Drigalsky contra el agar. Las placas se incubaron a 4°C por una hora, seguido de un choque térmico por 30 minutos a 37°C (Hugot *et al.*, 1999) para la liberación de las zoosporas. Se colectó la suspensión y se filtró por papel Whatman estéril de 40 µm. Se realizó el conteo de zoosporas del filtrado en los cuadrantes secundarios de la cámara de Neubauer para el cálculo de su concentración por mL (French y Hebert, 1982).

Los ensayos de viabilidad se realizaron en microtubos eppendorf estériles por imbibición directa de las zoosporas con los polímeros y las oligoquitosanas (OLG), disueltos en H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> a diferentes concentraciones y tiempos de imbibición, de acuerdo con cada ensayo. Después de la imbibición a 28°C se tomaron 250 µL de la

suspensión y se adicionaron en placas Petri (10 por tratamiento) con medio PDA-V8, extendiéndose sobre la superficie. Las placas se incubaron a 28°C y luz constante por siete días para permitir la germinación de las zoosporas. Se consideraron con zoosporas viables (+) aquellas placas donde ocurrió formación y crecimiento de colonias, independientemente de la velocidad de crecimiento o el volumen de micelio en la misma.

Se realizaron dos ensayos para establecer las condiciones de concentración de zoosporas y el tiempo de imbibición de éstas con el compuesto de quitosana antes de realizar un tercer ensayo de comparación de los compuestos. En el primer ensayo se evaluó el polímero Q-88 a la concentración que causó la inhibición total del crecimiento del micelio de *P. nicotianae* en el experimento 3.1.2, sobre la viabilidad de zoosporas a la concentración de  $10^3$ ,  $10^4$  y  $10^5$  esporas.mL<sup>-1</sup>, para un tiempo de imbibición de dos horas. En el segundo ensayo se evaluó el mismo polímero a las concentraciones de 0,5, 1, 1,5 y 2 g.L<sup>-1</sup> sobre la viabilidad de las zoosporas a la mayor concentración del primer ensayo donde no ocurrió crecimiento de micelio en las placas, para los tiempos de imbibición 2, 4 y 6 horas. En un tercer ensayo se compararon los compuestos Q-63, Q-88 y OLG a las concentraciones de 0,5, 1, 1,5, 2 y 2,5 g.L<sup>-1</sup> sobre la viabilidad de zoosporas de *P. nicotianae* a la concentración de zoosporas seleccionada en el primer ensayo y para el mejor tiempo de imbibición zoosporas-quitosana seleccionado en el segundo ensayo.

### **3.2 Efecto de quitosanas y derivados de menor masa molar en la inducción de respuestas defensivas y resistencia en plántulas de tabaco.**

**3.2.1** Quitosanas y quitosana hidrolizada en la inducción de resistencia en plántulas de tabaco contra *P. nicotianae* mediante inmersión de semillas y aspersión foliar.

Se realizaron dos ensayos de inducción de resistencia en plántulas de tabaco crecidas en el siguiente sustrato: Suelo, cachaza, turba ácida, turba rubia en proporción 2:4:2:0.5 (v/v), pH= 6,0. En el primer ensayo se evaluó el efecto de Q-63, Q-88 y HQ-

24 mediante aspersión foliar (0,5 mL/planta) e inmersión de semillas (4 horas), previo a la siembra a la concentración de 0,5 g.L<sup>-1</sup>. Las plántulas tratadas, de aproximadamente 5 cm de altura (32-35 dds) que tenían la primera hoja verdadera bien desarrollada y la segunda hoja en crecimiento, fueron removidas suavemente del sustrato para evitar daños en las raíces, que se lavaron con H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> estéril. Se colocaron en microtubos eppendorf con las raíces sumergidas en solución nutritiva (Hoagland y Arnon, 1950) y en contacto con un disco de agar de 6 mm con micelio de *P. nicotianae* (reto). Como control se asperjaron las plántulas o embebieron las semillas de tabaco en una disolución diluida de KAc, de acuerdo a cada forma de aplicación.

Las plantas (12 por tratamiento), a las 120 horas de la aspersión foliar y a los 32 días (15 plantas por tratamiento) de la inmersión de las semillas, se colocaron y mantuvieron en contacto vía raíz con el patógeno durante cinco días, con régimen de luz/oscuridad similar al de crecimiento. Al cabo de este período, se determinó el grado de infección en las plántulas siguiendo la escala establecida por Ricci *et al.* (1992), modificada de acuerdo a la Tabla 2.

En el segundo ensayo se evaluaron diferentes concentraciones (0,1, 0,5 y 1 g.L<sup>-1</sup>) del polímero Q-88 en las formas de aplicación antes mencionadas y similar tiempo de incubación entre los tratamientos y el reto de las plantas con el patógeno.

**Tabla 2:** Escala de infección del patógeno *P. nicotianae* en las plantas de tabaco.

Grado	Descripción
1	Planta sana
2	Raíces afectadas <sup>1</sup>
3	Hipocotilo, cotiledones y tallo afectados <sup>1</sup>
4	Primero y segundo par de hojas afectadas <sup>1</sup>
5	Planta muerta

<sup>1</sup> El grado de afectación descrito en la tabla se refiere al crecimiento acropetal de *P. nicotianae* dentro de la plántula desde las raíces, que se visualiza mediante el avance de la necrosis en el interior de los tejidos y que puede observarse a simple vista incluso hasta llegar a la nervación central de las hojas sin causar la muerte de la plántula.

### 3.2.1.1 *Análisis estadístico de los resultados de infección*

- Los datos obtenidos en la escala de infección se procesaron con el test no paramétrico de Kruskal Wallis y las medias resultantes se compararon con la prueba de Mann-Whitney con la corrección de Bonferroni, para  $p \leq 0.05$ , usando el programa

estadístico para Windows SPSS, versión 11.5 (Achuó *et al.*, 2004; SPSS, Inc. USA, 2002).

- Los mismos datos se utilizaron también para calcular el Índice de infección de cada tratamiento, según la fórmula  $I.I. = [\sum (G \times F)/N \times 5] \times 100$ , donde G es el grado de infección alcanzado en la escala, F es su frecuencia, N es el número total de plantas en el tratamiento y 5 es el grado máximo en la escala de infección (Romanazzi *et al.*, 2002). Para una mejor comprensión, los resultados también se presentan como el porcentaje de protección de cada tratamiento con quitosana respecto al índice de infección del control.

### **3.2.2** Quitosanas y oligoquitosanas en la activación de respuestas defensivas en hojas y raíces de plantas de tabaco por aplicación vía raíz.

Con un DCA se comparó el efecto de Q-63, Q-88 y la mezcla OLG en la inducción de respuestas defensivas en hojas y raíces de plántulas de tabaco crecidas en sustrato Pro-Mix® (Canadá), que contiene turba 75-85%, vermiculita, perlita, agente humectante y piedra caliza para ajuste del pH (5.5-5.7). Las plántulas de 25 dds se colocaron por una hora, vía raíz, en disoluciones contentivas de los compuestos a las concentraciones de 0,1, 1 y 2,5 g.L<sup>-1</sup> y seguidamente se incubaron durante 72 horas en disolución nutritiva (Hoagland y Arnon, 1950) antes de realizar su extracción.

#### **3.2.2.1** Extracción de proteínas solubles de hojas y raíces de plántulas de tabaco

Se colectó el primer par de hojas verdaderas (2 g) y las raíces (1 g) de las plántulas de tabaco en cada tratamiento y se maceraron con Nitrógeno líquido en morteros de porcelana. El material pulverizado se homogenizó en solución de Acetato de sodio 0.05 mol.L<sup>-1</sup> pH 5.2 + Cloruro de sodio 1 mol.L<sup>-1</sup> + EDTA 0.005 mol.L<sup>-1</sup> + Mercaptoetanol 0.005 mol.L<sup>-1</sup>, a razón de 1 mL por gramo de raíces y 2 mL por gramo de hojas.

El extracto se centrifugó por 15 minutos a 12000g a 5°C, se descartó el precipitado y se centrifugó nuevamente por 5 min. Seguidamente se colectó el sobrenadante y se congeló por debajo de -10 °C hasta las determinaciones enzimáticas.

### **3.2.2.2** Cuantificación de proteínas

Se determinó en el sobrenadante del extracto de hojas y raíces siguiendo una metodología micro Lowry, descrita por Sun (1994) y se utilizó albúmina de suero bovino como estándar para la curva de calibración y cálculo de las concentraciones. El contenido de proteínas se expresó como mg de proteínas por gramo de tejido fresco.

### **3.2.2.3** Determinación de actividades enzimáticas

- Para la determinación de actividad  $\beta$  1-3 *Glucanasa* se siguió la metodología descrita por Boudart *et al.* (1998). Los componentes del ensayo se ajustaron proporcionalmente para dar un volumen final de 0.5 mL. En el ensayo se cuantificó la liberación de azúcares reductores a partir de Laminarina (5 mg.mL<sup>-1</sup>) calidad reactivo (Sigma), por acción de las enzimas del extracto (0.05 mL). La mezcla de reacción fue incubada por una hora a 50°C. El total de azúcares reductores liberado en el ensayo fue determinado por el método colorimétrico de Somogyi (1952) y los resultados se expresaron como actividad específica ( $\mu$ g de glucosa.min<sup>-1</sup>.mg proteína<sup>-1</sup>), para lo cual se determinó previamente la pendiente en una curva de azúcares reductores para un patrón de glucosa.

- La determinación de actividad *Fenilalanina-Amonio Liasa* (PAL) se realizó según la metodología de Vander *et al.* (1998). El ensayo se incubó por dos horas. Se cuantificó la formación de ácido trans-cinámico por acción de las enzimas PAL presentes en el extracto (0.1 mL), usando L-Fenilalanina (0.006 mol.L<sup>-1</sup>) como sustrato (Sigma). La actividad enzimática fue expresada como actividad específica ( $\mu$ g ácido trans-cinámico.min<sup>-1</sup>.mg proteína<sup>-1</sup>), para lo cual se determinó previamente la pendiente de una curva de ácido trans-cinámico a 290nm.

- La determinación de actividad *Peroxidasa* (POD) se realizó por la metodología de Vander *et al.* (1998) en ensayo continuo usando Guayacol (0.018 mol.L<sup>-1</sup>) como sustrato (Sigma) y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.008 mol.L<sup>-1</sup>) como oxidante. La mezcla de reacción (1 mL) se incubó por tres minutos a 40 °C, con lecturas de absorbancia cada cinco segundos a 470 nm (zona del espectro donde absorbe el guayacol oxidado). La actividad enzimática fue expresada como actividad específica ( $\mu$ moles producto.min<sup>-1</sup>.mg proteína<sup>-1</sup>).

En los tres casos se verificó previamente que las enzimas estuvieran en velocidad inicial de reacción.

#### **3.2.2.4 Análisis estadístico de la actividad enzimática**

En los experimentos se utilizó un DCA. En todas las determinaciones de proteínas y enzimas los datos resultantes se sometieron a la verificación de las premisas del ANOVA antes de realizar un análisis de varianza de clasificación simple en cuatro réplicas por tratamiento. Las medias resultantes se compararon con el test de Tukey para  $p \leq 0.05$  en el programa Statgraphics, versión 5.0 (Statistical Graphics Corporation, 2000).

#### **3.2.2.5 Análisis de correlación estadística entre actividades enzimáticas**

Con el objetivo de conocer la relación entre los comportamientos enzimáticos en hojas y raíces, se determinaron en el experimento los coeficientes de correlación de Pearson de las medias resultantes de cada tratamiento, para las variables de actividad enzimática determinadas en ambos órganos, con el programa estadístico para Windows SPSS, versión 11.5 (SPSS, Inc. USA, 2002).

#### **3.2.3 Efecto de diferentes formas de aplicación de quitosanas y oligoquitosanas sobre la activación enzimática y la inducción de resistencia en plantas de tabaco contra *P. nicotianae*.**

Se realizaron tres ensayos (uno por cada forma de aplicación) de inducción de resistencia en plantas de 25 dds crecidas en sustrato Pro-Mix® (Canadá). Se utilizaron los compuestos Q-63, Q-88 y OLG a las concentraciones de 0,1, 1 y 2,5 g.L<sup>-1</sup>. Se aplicaron por aspersion foliar, adición a la rizosfera de plantas crecidas y por adición al sustrato en el momento de la siembra. El tiempo entre las aplicaciones a las plantas y las determinaciones enzimáticas foliares (realizadas como se describe en el epígrafe 3.2.2.4) fue de 72 horas en el caso de las dos primeras formas de aplicación y de 25 días para la adición en el momento de la siembra. Al mismo tiempo que se tomaron las muestras para las determinaciones enzimáticas, se colocaron plantas en contacto con el patógeno (como se describe en el epígrafe 3.2.1) en número de 15 por cada

tratamiento. El análisis estadístico y el cálculo del índice de infección se realizaron como se describe en el epígrafe 3.2.1.1.

### **3.2.3.1 Análisis de regresión lineal múltiple estandarizada**

El análisis se realizó con el objetivo de conocer la relación entre las enzimas medidas en las hojas con el índice de infección obtenido en las plántulas. Se realizó un análisis de regresión lineal múltiple estandarizada para cada forma de aplicación de los compuestos, usando como variables independientes las medias de las tres actividades enzimáticas y como variable dependiente, el índice de infección alcanzado por los tratamientos. Se calcularon y compararon los coeficientes de regresión.

## IV- Resultados

### **4.1 Efectos de quitosanas y derivados de menor masa molar sobre el crecimiento y la viabilidad *in vitro* de *P. nicotianae*.**

#### 4.1.1 Quitosana y quitosana hidrolizada sobre el crecimiento *in vitro* del micelio de *P. nicotianae*.

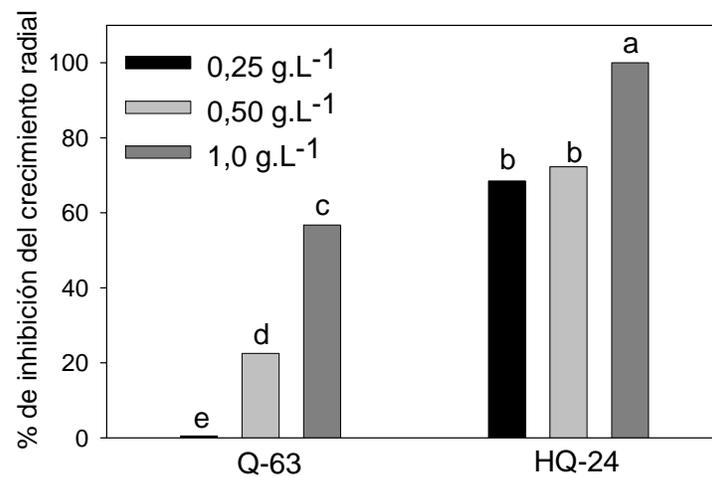
Tanto el polímero (Q-63) como su hidrolizado enzimático (HQ-24) inhibieron el crecimiento del micelio de *P. nicotianae in vitro* (Figura 3). La disminución de la masa molar del polímero de quitosana como resultado de la hidrólisis enzimática incrementó la inhibición del crecimiento radial del patógeno con las tres concentraciones evaluadas. La mayor diferencia de inhibición entre ambos productos se obtuvo a la concentración más baja ( $0,25 \text{ g.L}^{-1}$ ), ya que mientras que el polímero casi no inhibió al patógeno a esta concentración el hidrolizado lo hizo en más de un 60%.

El resultado demuestra que la degradación del polímero de quitosana en fragmentos diversos de menor masa molar incrementa la acción inhibitoria sobre el crecimiento del patógeno, hasta el punto que el hidrolizado ( $1 \text{ g.L}^{-1}$ ) inhibió totalmente el crecimiento del micelio del patógeno, lo que representa más de un 40% de inhibición por encima del polímero de origen a la misma concentración.

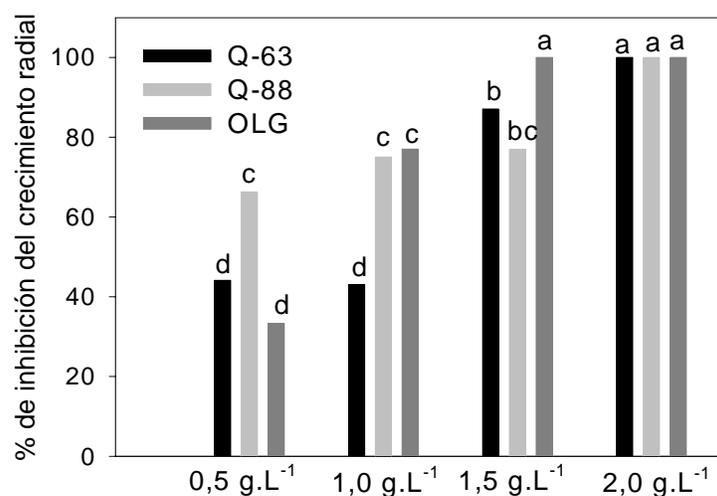
#### 4.1.2 Quitosanas y oligoquitosanas sobre el crecimiento *in vitro* del micelio de *P. nicotianae*.

Tanto los polímeros como la mezcla de oligoquitosanas inhibieron el crecimiento del micelio de *P. nicotianae* en todas las concentraciones probadas (Figura 4). El polímero de mayor grado de acetilación (Q-63) inhibió en menor medida el crecimiento radial del patógeno, comparado con el polímero menos acetilado (Q-88) a las concentraciones más bajas probadas en el experimento ( $0,5$  y  $1 \text{ g.L}^{-1}$ ), efecto que no se observó con el incremento de la concentración de los derivados.

La mezcla de oligoquitosanas causó las mayores inhibiciones del crecimiento del patógeno a  $1,5$  y  $2 \text{ g.L}^{-1}$ , por encima estadísticamente que el polímero menos acetilado



**Figura 3:** Efecto de un polímero de quitosana (Q-63) y quitosana hidrolizada (HQ-24) sobre el crecimiento *in vitro* del micelio de *P. nicotianae* en medio PDA. El resultado del ANOVA bifactorial en 4 réplicas por tratamiento arrojó interacción entre los factores para  $p \leq 0.05$  (ES= 0,024). Se muestran los porcentos de inhibición de los datos originales. En la comparación de medias por la prueba de Tukey, letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos para  $p \leq 0.05$ .



**Figura 4:** Efecto de quitosanas (Q-63, Q-88) y oligoquitosanas (OLG) sobre el crecimiento *in vitro* del micelio de *P. nicotianae* en medio PDA-V8. El resultado del ANOVA bifactorial en 8 réplicas por tratamiento arrojó interacción entre los factores para  $p \leq 0.05$  (ES= 0,06). Se muestran los porcentos de inhibición de los datos originales. En la comparación de medias por la prueba de Tukey, letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos para  $p \leq 0.05$ .

(Q-88) en la primera de ambas concentraciones. No hubo diferencias de inhibición entre los tres compuestos a la mayor concentración.

#### 4.1.3 Quitosanas y oligoquitosanas sobre la viabilidad *in vitro* de zoosporas de *P. nicotianae*.

Para establecer las condiciones de concentración de zoosporas y tiempo de incubación zoosporas-quitosanas se escogió al polímero Q-88 por ser el polímero que mostró mejor inhibición del crecimiento en el ensayo anterior.

Primer ensayo: Efecto del polímero de quitosana Q-88 sobre la viabilidad *in vitro* de diferentes concentraciones de zoosporas de *P. nicotianae* (2 horas de imbibición).

El polímero menos acetilado (Q-88), a la concentración que provocó la inhibición total del micelio en el experimento anterior (2 g.L<sup>-1</sup>), inhibió la viabilidad de zoosporas (10<sup>3</sup> y 10<sup>4</sup> zoosporas.mL<sup>-1</sup>) sembradas en medio PDA-V8 (Figura 5), por lo que se decidió continuar los experimentos a la concentración de 10<sup>4</sup> esporas por mL.

Segundo ensayo: Efecto de diferentes concentraciones del polímero de Q-88 sobre la viabilidad *in vitro* de zoosporas de *P. nicotianae* a diferentes tiempos de imbibición.

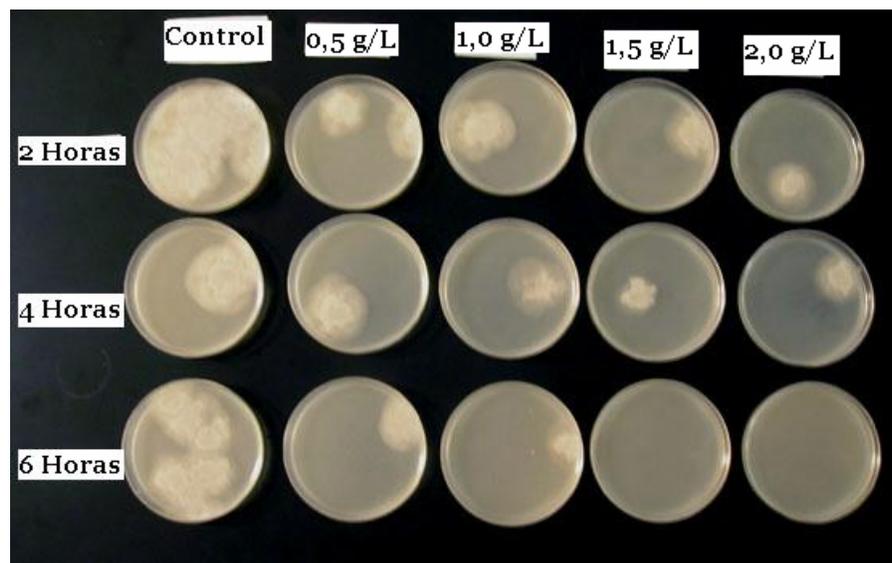
Las zoosporas (1,9 x10<sup>4</sup> zoosporas.mL<sup>-1</sup>) embebidas por dos y cuatro horas en todas las concentraciones de Q-88 empleadas (0 a 2 g.L<sup>-1</sup>) causaron crecimiento micelial cuando se extendieron sobre PDA-V8 (Figura 6). Cuando la imbibición con Q-88 se extendió hasta seis horas antes de su siembra en el medio de crecimiento sólo se observó crecimiento de micelio hasta la concentración de 1 g.L<sup>-1</sup>. Se escogió el tiempo de imbibición de seis horas para comparar el efecto de tres compuestos de quitosana sobre la viabilidad de las zoosporas.

Tercer ensayo: Efecto de diferentes compuestos de quitosana en la viabilidad *in vitro* de zoosporas de *P. nicotianae* (2,1 x10<sup>4</sup> esporas.mL<sup>-1</sup>).

Los tres compuestos de quitosana inhibieron diferencialmente la viabilidad de las zoosporas en el medio PDA-V8 a las concentraciones igual o mayores que 1,5 g.L<sup>-1</sup> (Tabla 3). Los resultados de la comparación presentan al polímero menos acetilado (Q-88) como el mayor inhibidor de la viabilidad de zoosporas de *P. nicotianae* a partir



**Figura 5:** Efecto del polímero de quitosana Q-88 ( $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) sobre la viabilidad de zoosporas de *P. nicotianae* (2 horas de imbibición esporas-polímero) a  $10^3$ ,  $10^4$  y  $10^5$  zoosporas. $\text{mL}^{-1}$ .



**Figura 6:** Efecto de diferentes concentraciones del polímero Q-88 sobre la viabilidad de zoosporas ( $1,9 \times 10^4$  esporas. $\text{mL}^{-1}$ ) de *P. nicotianae* a diferentes tiempos de imbibición con el polímero de quitosana (2, 4 y 6 horas).

de 1,5 g.L<sup>-1</sup>. El polímero más acetilado (Q-63) lo hizo sólo a la concentración de 2,5 g.L<sup>-1</sup>.

La mezcla OLG inhibió más la viabilidad de las zoosporas que el polímero más acetilado aunque sus efectos fueron inferiores que los del menos acetilado lo que demuestra, por primera vez, el poder inhibitorio de oligosacáridos de quitosanas sobre la viabilidad de zoosporas de *P. nicotianae*.

**Tabla 3:** Efecto de quitosanas y oligoquitosanas sobre la viabilidad *in vitro* de zoosporas de *P. nicotianae* (2,1 x10<sup>4</sup> esporas.mL<sup>-1</sup>). El signo + indica crecimiento micelial en la placa en los siguientes siete días posterior a la imbibición con los tratamientos (6 horas de imbibición).

Compuestos de Quitosana	Concentración de los compuestos g.L <sup>-1</sup>				
	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5
<b>Q-63</b>	+	+	+	+	-
<b>Q-88</b>	+	+	-	-	-
<b>OLG</b>	+	+	+	-	-

#### ***4.2 Efecto de quitosanas y derivados de menor masa molar en la inducción de respuestas defensivas y resistencia en plántulas de tabaco.***

4.2.1 Quitosanas y quitosana hidrolizada en la inducción de resistencia en plántulas de tabaco contra *P. nicotianae* mediante inmersión de semillas y aspersión foliar.

##### ***Primer ensayo***

###### ***- Aspersión foliar de los compuestos de quitosana***

El índice de infección en las plantas al cabo de cinco días de interacción planta-patógeno fue reducido en todos los tratamientos con relación al control (Tabla 4), lo que demuestra un efecto elicitor de la quitosana en la inducción de resistencia en plántulas de tabaco contra *P. nicotianae*. El polímero menos acetilado (Q-88) no tuvo diferencias estadísticas con el control a diferencia del polímero más acetilado y el hidrolizado de 24 horas, los cuáles a su vez, no se diferenciaron entre ellos.

Los tratamientos de quitosana diferentes del control causaron una reducción del índice de infección entre un 38 y 42 %, mientras el polímero menos acetilado lo hizo en menos del 20%. La degradación enzimática del polímero más acetilado (HQ-24) provocó la mayor protección de las plantas en el experimento sin encontrarse diferencias estadísticas con el polímero de origen (Q-63).

**Tabla 4:** Efecto de compuestos de quitosana ( $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ ) sobre la infección por *Phytophthora nicotianae* en plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.). Los tratamientos se aplicaron por aspersion foliar de las plantas ( $0,5 \text{ mL/planta}$ ). Se presenta la media de los rangos en el análisis de Kruskal Wallis. Tratamientos con letras iguales no difieren en el test de Mann Whitney con la corrección de Bonferroni para  $p \leq 0.05$ . Se muestra, también, el índice de infección calculado en cada tratamiento.

Tratamientos	n	Media de Rangos	Índice de Infección
Control	12	36.5 <b>b</b>	78.3
Q-88	12	29.17 <b>b</b>	64,0
Q-63	12	16,88 <b>a</b>	48.3
HQ-24	12	15.46 <b>a</b>	45,0

#### - Inmersión de las semillas en los compuestos de quitosana

Cuando los tratamientos se aplicaron por inmersión de las semillas previo a la siembra se obtuvo nuevamente reducción del índice de infección en las plantas tratadas con HQ-24 (Tabla 5), lo que demuestra una inducción de resistencia en el tiempo que equivalió a la reducción de casi el 25% de la infección.

**Tabla 5:** Efecto de compuestos de quitosana ( $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ ) sobre la infección por *Phytophthora nicotianae* en plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.). Tratamientos por inmersión de las semillas (4 horas) previo a la siembra. Se presenta la media de los rangos en el análisis de Kruskal Wallis. Tratamientos con letras iguales no difieren en el test de Mann Whitney con la corrección de Bonferroni para  $p \leq 0.05$ . Se muestra, también, el índice de infección calculado en cada tratamiento.

Tratamientos	n	Media de Rangos	Índice de Infección
Control	15	38.6 <b>b</b>	97.3
Q-63	15	34.2 <b>b</b>	90.7
Q-88	15	28.8 <b>b</b>	88,0
HQ-24	15	20.4 <b>a</b>	73.3

El resultado muestra un efecto positivo de la reducción de la masa molar de la quitosana en la inducción de resistencia temporal en las plántulas de tabaco.

A partir de los resultados de ambos ensayos, y con el fin de conocer si otras concentraciones del polímero Q-88 podrían inducir resistencia contra el patógeno, se decidió evaluar este polímero en las dos formas de aplicación anteriormente ensayadas, tomando en consideración concentraciones descritas por otros autores con otras especies (Ben-Shalom *et al.*, 2003; Sharathchandra *et al.*, 2004; Trotel-Aziz *et al.*, 2006).

### Segundo ensayo

#### *- Dosis respuesta del polímero Q-88 mediante Aspersión foliar e Inmersión de semillas*

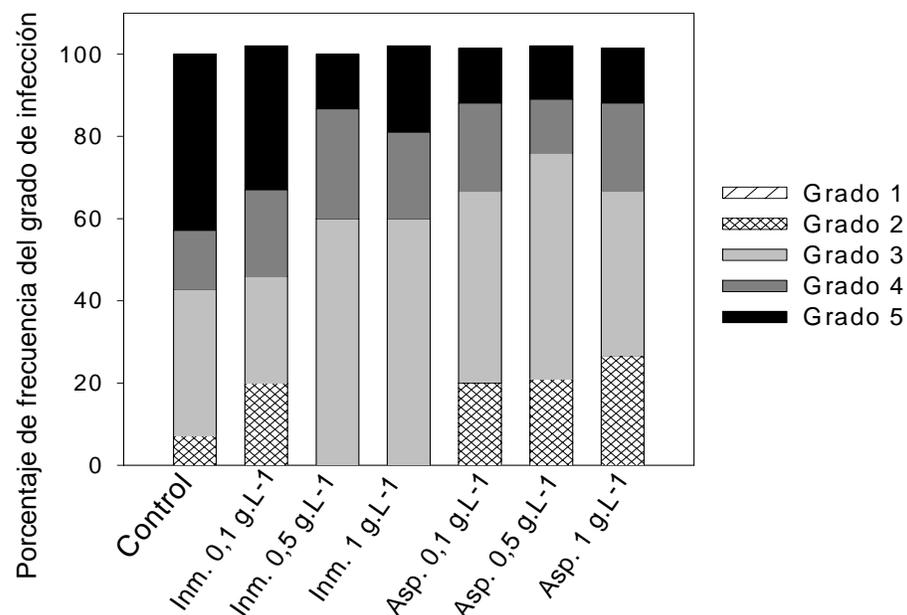
El polímero Q-88 no indujo resistencia significativa en ninguna de las dos formas de aplicación y concentraciones evaluadas (Tabla 6), aunque se observó cierta reducción de la infección ( $\approx 12\%$ ) con la aspersión foliar del polímero. Lo anterior demuestra que el polímero menos acetilado no induce resistencia contra *P. nicotianae* en las condiciones de ensayo y formas de aplicación evaluadas.

Aunque los tratamientos no difieren del control, si redujeron el índice de infección, fundamentalmente en los tratamientos de aspersión foliar, dónde el porcentaje de plantas muertas se redujo desde un 40% en el control hasta menos del 20% en los tratamientos (Figura 7). No se obtuvieron plantas sanas en ningún tratamiento del experimento, aunque la aspersión foliar incrementó el número de plantas con menores grados de infección.

Por lo anterior, y con el fin de dilucidar si la no inducción de resistencia con el polímero Q-88 se debían a sus características intrínsecas y no a las condiciones de ensayo probadas hasta el momento, se decidió continuar los experimentos comparativos con los compuestos de quitosana ampliando el intervalo de concentraciones hasta  $2,5 \text{ g.L}^{-1}$ , utilizando otras formas de aplicación de los compuestos (aplicación vía raíz y adición al sustrato) y reduciendo el tiempo entre el tratamiento y la determinación de resistencia de 120 a 72 horas (Molloy *et al.*, 2004; Sharathchandra *et al.*, 2004).

**Tabla 6:** Efecto del polímero de quitosana Q-88 sobre la infección por *Phytophthora nicotianae* en plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.). Tratamientos por inmersión de las semillas (4 horas) previo a la siembra y aspersión foliar (0,5 mL/ planta). Se presentan las medias de los rangos en el análisis de Kruskal Wallis. Tratamientos con letras iguales no difieren en el test de Mann Whitney con la corrección de Bonferroni para  $p \leq 0.05$ . Se presenta, también, el índice de infección calculado en cada tratamiento.

Polímero Q-88	n	Media de Rangos	Índice de Infección
Control	14	64.7 ns.	73.3
Inmersión de las semillas			
0.1 g.L <sup>-1</sup>	15	57.4 ns.	73.3
0.5 g.L <sup>-1</sup>	15	54.9 ns.	70.7
1 g.L <sup>-1</sup>	15	56.3 ns.	72,0
Aspersión foliar			
0.1 g.L <sup>-1</sup>	15	46.4 ns.	65.3
0.5 g.L <sup>-1</sup>	15	44.2 ns.	64,0
1 g.L <sup>-1</sup>	15	44.4 ns.	64,0



**Figura 7:** Porcentajes de frecuencia de infección de *P. nicotianae* en plántulas de tabaco durante el experimento de inmersión de semillas previo a la siembra y aspersión foliar del polímero Q-88. Se graficó el porcentaje de frecuencia de cada grado de infección, de acuerdo a la escala de 1 a 5, en cada tratamiento.

Una vez demostrado que la reducción de la masa molar beneficia la inducción de resistencia en las formas de aplicación empleadas, se incluyó en los siguientes experimentos el derivado oligomérico (OLG) de quitosana (Cabrera *et al.*, 2006).

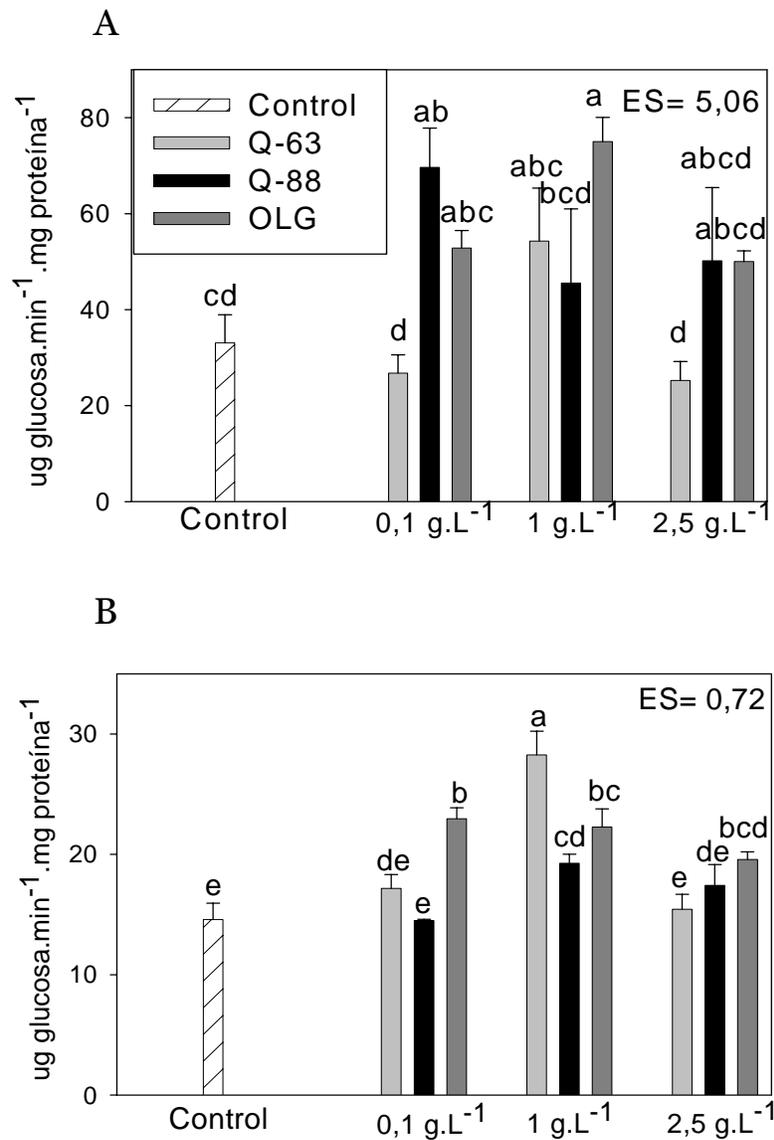
#### 4.2.2 Quitosanas y oligoquitosanas en la activación de respuestas defensivas en hojas y raíces de plantas de tabaco por aplicación vía raíz.

La actividad  $\beta$  1-3 glucanasa fue inducida por varios tratamientos en ambos órganos (Figura 8). Los valores absolutos de actividad fueron menores en la raíz que en las hojas. En la raíz, se obtuvieron valores de actividad enzimática superiores al control con los tres compuestos a la concentración de 1 g.L<sup>-1</sup>, mientras que con las concentraciones extremas solamente la mezcla de oligoquitosanas (OLG) difirió estadísticamente del control. En este órgano se destacó el polímero Q-63 a 1 g.L<sup>-1</sup> sobre el resto de los tratamientos. En la respuesta a nivel de las hojas solo el polímero Q-88 y la mezcla OLG a 0,1 y 1 g.L<sup>-1</sup> respectivamente, activaron la respuesta enzimática por encima y diferente del control. Lo anterior sugiere una dependencia de esta actividad enzimática de la concentración de los compuestos.

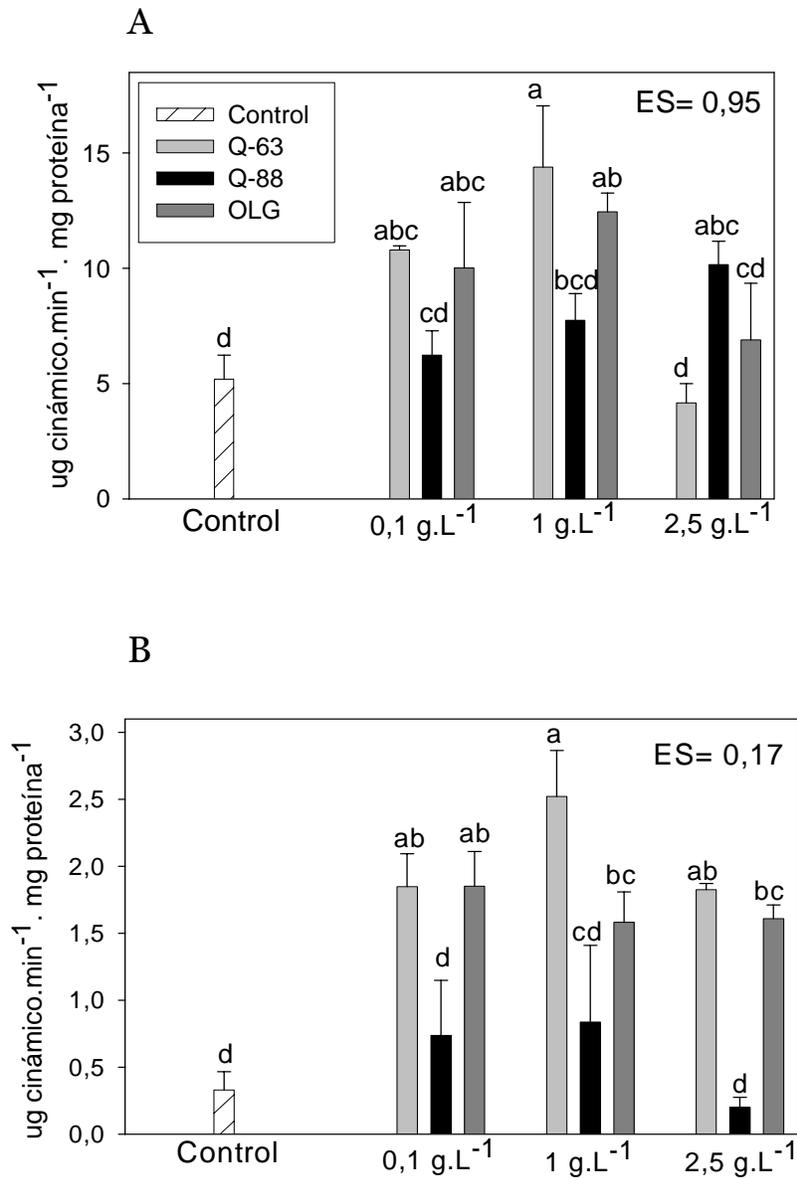
En la respuesta enzimática PAL los valores absolutos de actividad fueron nuevamente menores en la raíz que en las hojas, pero las diferencias de nivel enzimático entre los tratamientos inducidos que difirieron del control y este último fueron más marcadas en la raíz (Figura 9). A nivel de la raíz, el polímero Q-88 no difirió del control con ninguna de las concentraciones evaluadas, mientras que los otros dos compuestos sí lo hicieron por encima del control con las tres concentraciones, obteniéndose la mayor inducción con el polímero Q-63 a 1 g.L<sup>-1</sup>. Lo anterior sugiere un efecto del grado de acetilación sobre la inducción de esta actividad enzimática.

En las hojas, la inducción de actividad PAL con el polímero Q-63 y la mezcla OLG se benefició a las concentraciones menores (Figura 9), mientras que la acción del polímero Q-88 solo estuvo por encima y diferente del control a la mayor concentración (2,5 g.L<sup>-1</sup>).

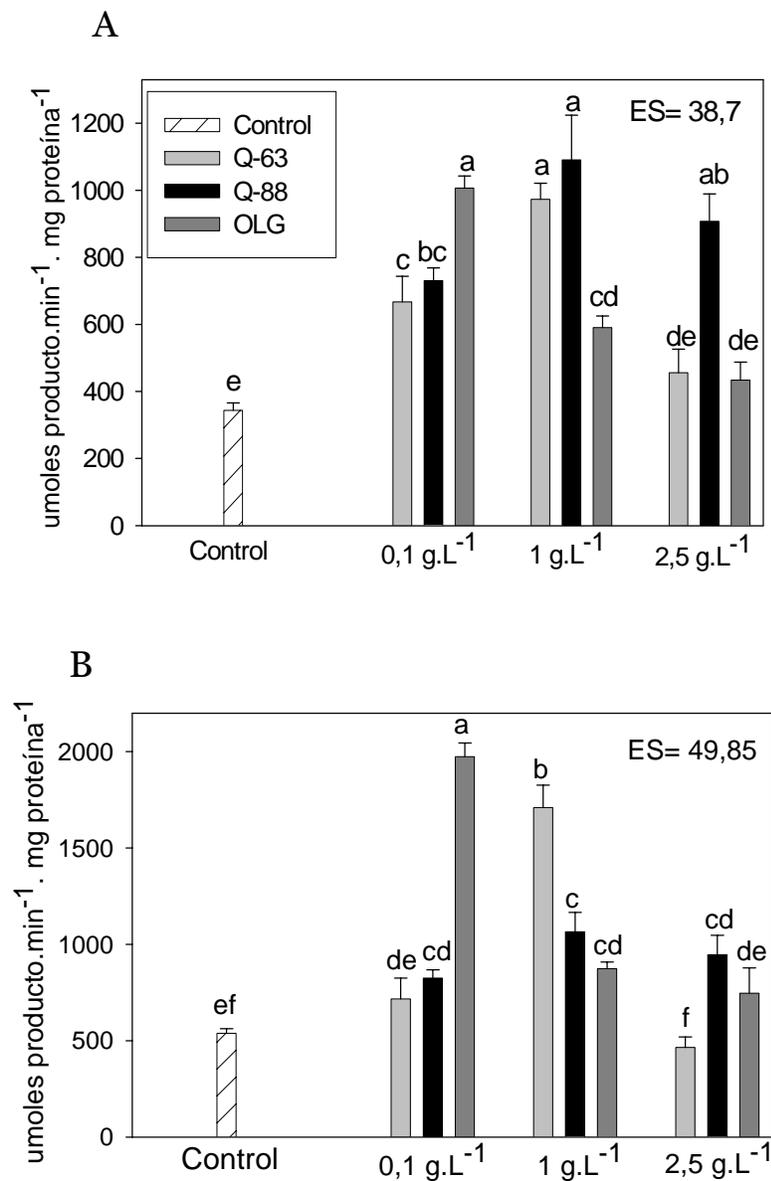
La activación de la enzima POD tuvo diferencias entre tratamientos y control, tanto en hojas como en raíces de las plántulas de tabaco (Figura 10). Los valores absolutos de actividad, a diferencia de la  $\beta$  1-3 glucanasa y la PAL, no mostraron diferencias



**Figura 8:** Variación de la actividad enzimática  $\beta$  1-3 glucanasa en hojas (A) y raíces (B) de plántulas de tabaco tratadas vía raíz a los 25 dds. Se realizó un análisis de varianza en 4 réplicas por tratamiento. Se muestran los resultados de la comparación de medias por la prueba de Tukey,  $p \leq 0.05$ . Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos.



**Figura 9:** Variación de la actividad enzimática PAL en hojas (A) y raíces (B) de plántulas de tabaco tratadas vía raíz a los 25 dds. Se realizó un análisis de varianza en 4 réplicas por tratamiento. Se muestran los resultados de la comparación de medias por la prueba de Tukey,  $p \leq 0.05$ . Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos.



**Figura 10:** Variación de la actividad enzimática POD en hojas (A) y raíces (B) de plántulas de tabaco tratadas vía raíz a los 25 dds. Se realizó un análisis de varianza en 4 réplicas por tratamiento. Se muestran los resultados de la comparación de medias por la prueba de Tukey,  $p \leq 0.05$ . Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos.

marcadas entre ambos órganos. La activación de la enzima en la raíz estuvo por encima del control en todos los tratamientos, excepto con la aplicación del polímero Q-63 a 0,1 y 2,5 g.L<sup>-1</sup> y la mezcla de oligos a 2,5 g.L<sup>-1</sup>, mientras que en las hojas todos los tratamientos, excepto Q-63 y la mezcla OLG a la mayor concentración (2,5 g.L<sup>-1</sup>), activaron valores de POD por encima y diferentes del control.

En ambos órganos la actividad POD se redujo con el incremento de la concentración de la mezcla OLG y fue máxima para el polímero Q-63 cuando este se aplicó a la concentración intermedia (1 g.L<sup>-1</sup>). El polímero Q-88 elevó los niveles de actividad por encima del control con las tres concentraciones en los dos órganos estudiados.

La determinación de los coeficientes de correlación de las tres variables enzimáticas entre los dos órganos de la planta mostró una correlación positiva solo para la actividad POD (Tabla 7), lo que corrobora un comportamiento similar inducido por los compuestos de quitosana en ambos órganos para esta enzima.

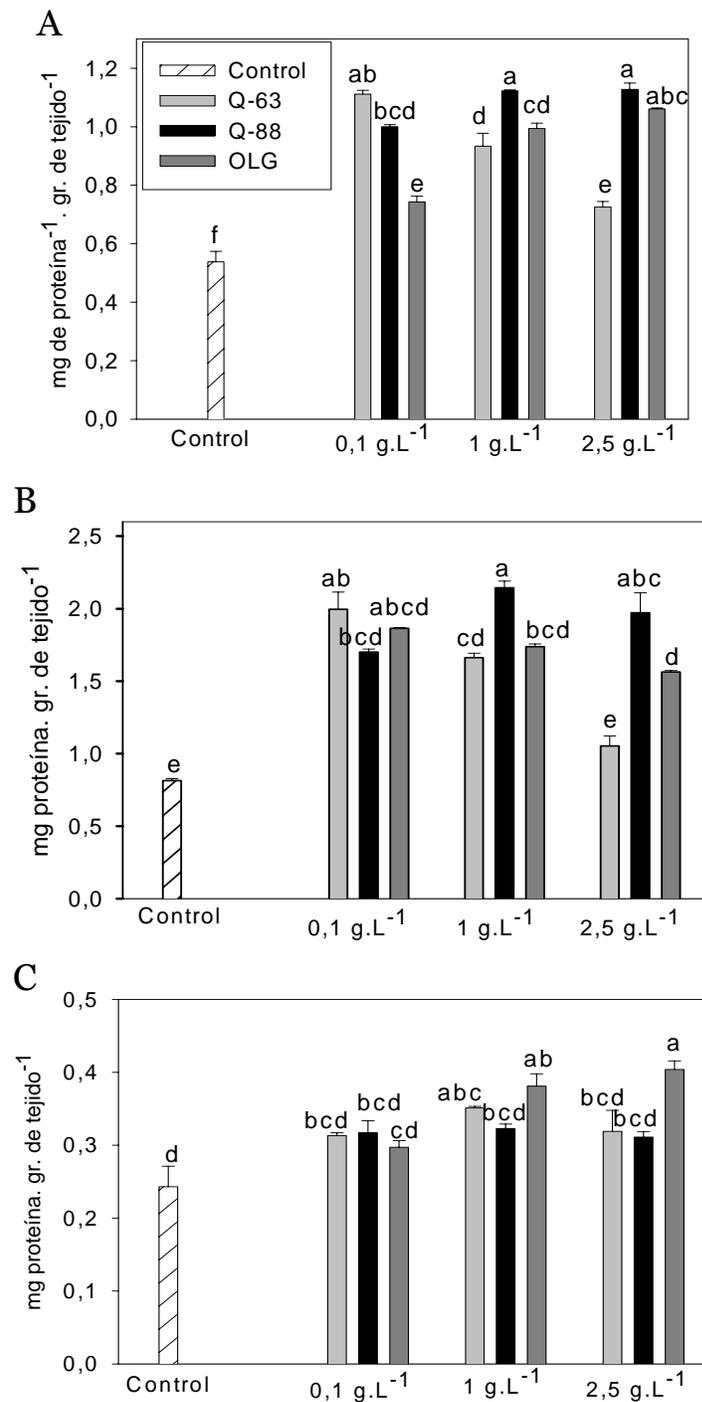
**Tabla 7:** Determinación de los coeficientes de correlación de Pearson entre las variables de actividad enzimática determinadas en hojas y raíces de las plántulas, previamente aplicadas vía raíz con los compuestos de quitosana.

Variables comparadas	Coeficientes de correlación de Pearson		
	Hojas		
Raíces	$\beta$ 1-3 Glc	PAL	POD
$\beta$ 1-3 Glc	0,387 ns.	----	----
PAL	----	0,467 ns.	----
POD	----	----	<b>0,764 *</b>

4.2.3 Diferentes formas de aplicación de quitosanas y oligoquitosanas en la activación enzimática y la inducción de resistencia en plantas de tabaco contra *P. nicotianae*.

Inducción de la acumulación de proteínas y el incremento de actividades enzimáticas en hojas de plántulas de tabaco

La *aspersión foliar* de los tres compuestos de quitosana provocó incrementos de concentración de proteínas solubles que en algunos casos llegaron a duplicar los valores del control (Figura 11A). Todos los tratamientos estuvieron por encima del



**Figura 11:** Acumulación de proteínas solubles en hojas de plántulas de tabaco a los 25 dds. Los tratamientos se aplicaron por Aspersión foliar (A) (ES= 0,0131), Adición a la rizosfera (B) (ES= 0,0373) de las plantas 72 horas antes de la extracción foliar y por Adición al sustrato al momento de la siembra de las semillas (C) (ES= 0,0092). Se realizó un análisis de varianza en 4 réplicas por tratamiento. Se muestran los resultados de la comparación de medias por la prueba de Tukey,  $p \leq 0.05$ . Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos.

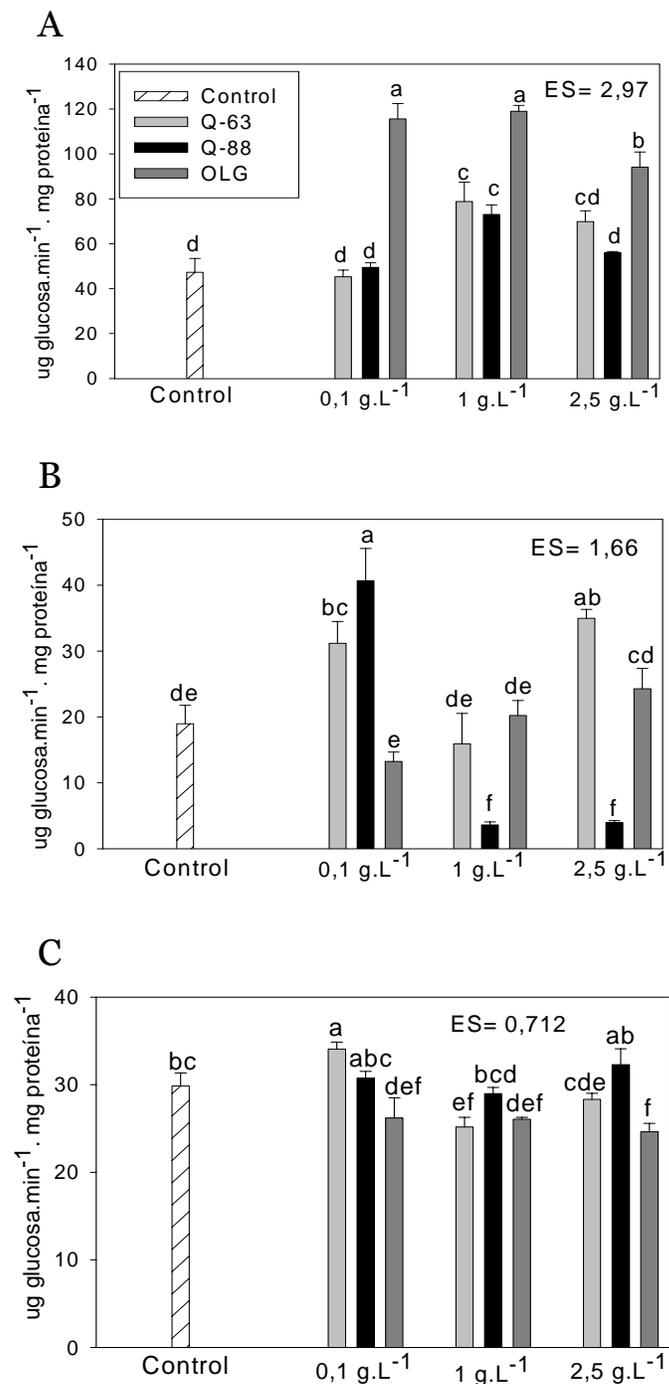
control. Los mayores incrementos de la concentración de proteínas en los tejidos foliares ocurrieron con las dos concentraciones mayores del polímero Q-88.

El aumento de los niveles de proteína soluble en hojas de plántulas de tabaco, a cuya rizosfera se le adicionaron los tratamientos 72 horas antes del muestreo foliar fue similar al experimento anterior (Figura 11B). Se obtuvo hasta más del doble de incrementos de los valores de concentración de proteínas con la aplicación de la mayoría de los tratamientos con quitosanas, con respecto al control. El comportamiento de acumulación proteica en los tratamientos con los dos polímeros fue similar al caso anterior, los mayores valores de proteína soluble se encontraron al aplicar las dos concentraciones mayores del polímero menos acetilado (Q-88) y la menor del más acetilado (Q-63). La mezcla de oligoquitosanas tuvo un comportamiento similar con las tres concentraciones evaluadas.

La adición de los compuestos de quitosana al sustrato en el momento de la siembra provocó incrementos discretos de la concentración de proteínas solubles en las hojas verdaderas de las plántulas a los 25 días de sembradas (Figura 11C). El mayor incremento de proteínas se obtuvo con las oligoquitosanas (OLG) a  $2,5 \text{ g.L}^{-1}$ , resultado que casi duplicó los niveles del control seguido sin diferencias estadísticas por la misma mezcla OLG y el polímero más acetilado (Q-63), ambos a  $1 \text{ g.L}^{-1}$ . Estos tratamientos fueron los únicos que difirieron del control.

La aspersión foliar de los tratamientos provocó aumentos de la actividad enzimática  $\beta$  1-3 glucanasa con relación al control a las 72 horas (Figura 12A). Los mayores incrementos se obtuvieron con la mezcla OLG en las tres concentraciones evaluadas. Las dos concentraciones más bajas probadas de la mezcla ( $0,1$  y  $1 \text{ g.L}^{-1}$ ) fueron las mejores (duplicando los niveles del control) y difirieron de la mayor concentración ( $2,5 \text{ g.L}^{-1}$ ). Solo se obtuvieron incrementos de actividad por encima y diferente del control con ambos polímeros (Q-63 y Q-88) a la concentración de  $1 \text{ g.L}^{-1}$ .

La adición de disoluciones contentivas de los compuestos de quitosana en la rizosfera de las plántulas de 25 dds afectó la actividad enzimática  $\beta$  1-3 glucanasa en las hojas de las plantas (Figura 12B). El polímero Q-63 ( $0,1$  y  $2,5 \text{ g.L}^{-1}$ ) y el polímero Q-88 a la menor concentración ( $0,1 \text{ g.L}^{-1}$ ) indujeron valores por encima del control. El resto de los tratamientos no difirieron de este o lo hicieron por reducción de los niveles de



**Figura 12:** Variación de la actividad enzimática  $\beta$  1-3 Glucanasa en hojas de plántulas de tabaco a los 25 dds. Los tratamientos se aplicaron por *Aspersión foliar* (A), *Adición a la rizosfera* de las plantas (B) 72 horas antes de la extracción foliar y por *Adición al sustrato* al momento de la siembra de las semillas (C). Se realizó un análisis de varianza en 4 réplicas por tratamiento. Se muestran los resultados de la comparación de medias por la prueba de Tukey,  $p \leq 0.05$ . Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos.

actividad enzimática por debajo del control como fue el caso del polímero Q-88 en las dos concentraciones mayores.

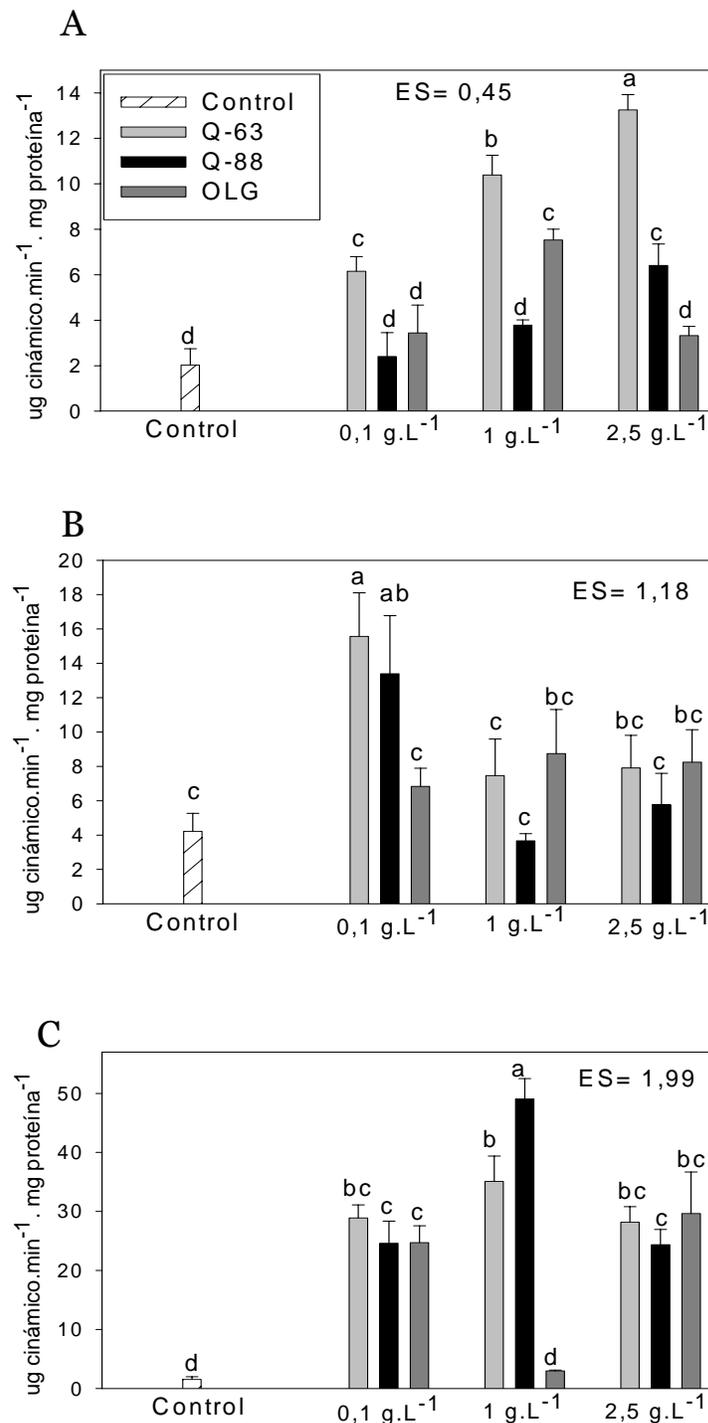
La adición de los compuestos de quitosana al sustrato en el momento de la siembra causó una reducción de los valores absolutos de actividad en relación con el valor del control (Figura 12C), causado esta vez con la mezcla OLG en las tres concentraciones evaluadas y el polímero Q-63 a la concentración intermedia, pero con una diferencia mucho menos marcada que en el ensayo de aplicación a la rizosfera. El polímero Q-63 a la concentración más baja ( $0,1 \text{ g.L}^{-1}$ ) causó el único incremento por encima del control en el ensayo.

Los resultados anteriores demuestran que las quitosanas causan activación diferencial de la enzima  $\beta$  1-3 glucanasa influida por la forma de aplicación, las características del compuesto y la concentración evaluada.

Los niveles de actividad PAL en hojas de tabaco se incrementaron por la aspersión foliar con las concentraciones mayores del polímero más acetilado (Q-63), obteniéndose los mayores niveles (4 ó 5 veces mayores) y diferencias con respecto al control en todos los casos (Figura 13A). Con este polímero la actividad enzimática se incrementó conforme aumentó la concentración del compuesto. El polímero Q-88 y la mezcla OLG indujeron actividad PAL por encima del control a la concentración mayor ( $2,5 \text{ g.L}^{-1}$ ) e intermedia ( $1 \text{ g.L}^{-1}$ ), respectivamente y no difirieron del control con el resto de las concentraciones probadas.

No hubo inducción de actividad PAL cuando las quitosanas fueron aplicados a la rizosfera de las plantas (Figura 13B), excepto cuando se aplicaron los polímeros (Q-63, Q-88) a la concentración más baja ( $0,1 \text{ g.L}^{-1}$ ), sin que el uso de uno u otro causara diferencias de actividad y con un incremento de esta tres veces respecto al control.

La aplicación de los compuestos al sustrato al momento de la siembra provocó niveles muy elevados y diferentes del control en todos los tratamientos, excepto la mezcla de oligoquitosanas en la concentración de  $1 \text{ g.L}^{-1}$  (Figura 13C). La concentración intermedia del polímero menos acetilado (Q-88) incrementó la actividad más de 30 veces respecto al nivel de actividad enzimática del control, seguido por las plantas que recibieron la mezcla de oligos a la concentración más alta y el polímero Q-63 a  $1 \text{ g.L}^{-1}$ , que alcanzaron unas 20 veces la actividad detectada en el control.



**Figura 13:** Variación de la actividad enzimática PAL en hojas de plántulas de tabaco a los 25 dds. Los tratamientos se aplicaron por Aspersión foliar (A), Adición a la rizosfera de las plantas (B) 72 horas antes de la extracción foliar y por Adición al sustrato previo al momento de la siembra de las semillas (C). Se realizó un análisis de varianza en 4 réplicas por tratamiento. Se muestran los resultados de la comparación de medias por el test de Tukey,  $p \leq 0.05$ . Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos.

Los resultados de actividad PAL están claramente influenciados por el grado de acetilación de la quitosana cuando se aplicó por aspersión foliar (Figura 13A), los mayores niveles de actividad en todas las concentraciones se obtuvieron con el polímero más acetilado (Q-63). Es interesante el incremento generalizado de la actividad PAL en el experimento de aplicación de las quitosanas al momento de la siembra, lo que pudiera ser resultado de una activación enzimática de larga duración en las plantas de tabaco.

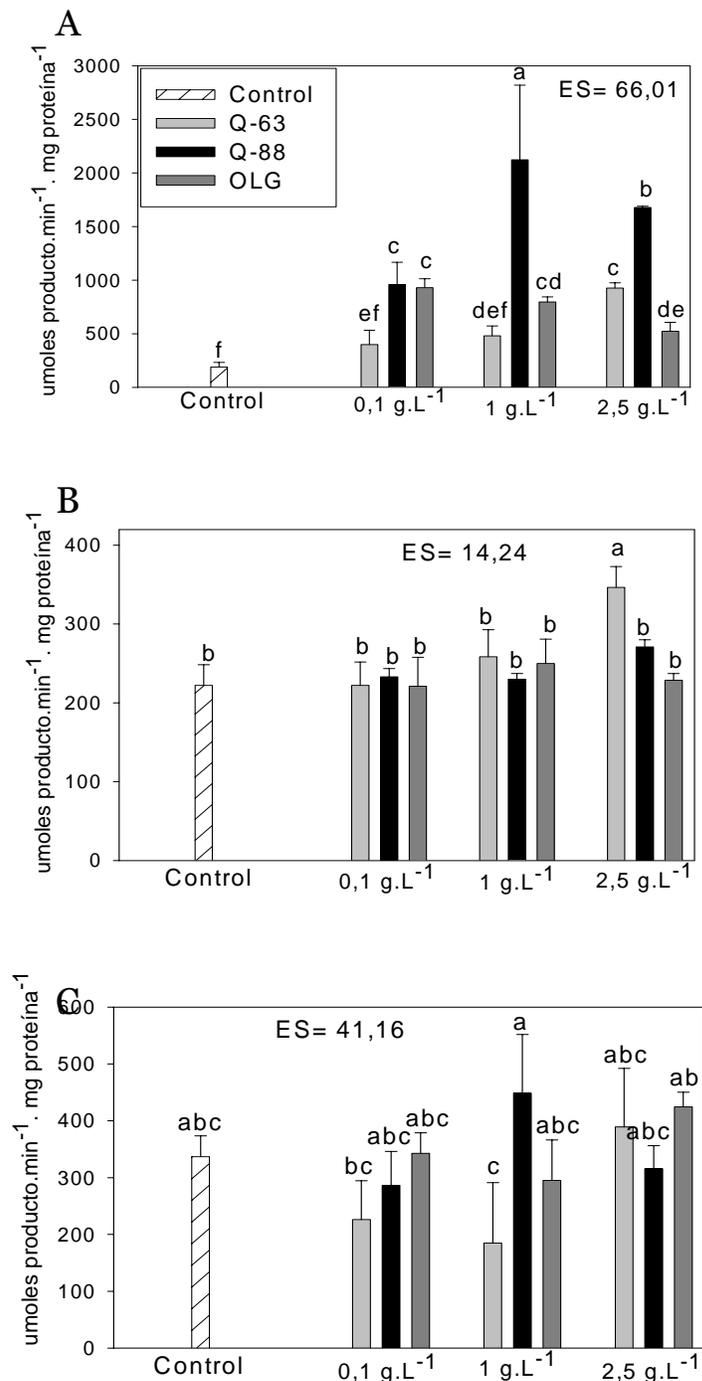
La actividad peroxidasa (POD) foliar se incrementó por la aspersión foliar de las tres concentraciones del polímero de menor grado de acetilación (Q-88), las dos mayores concentraciones aplicadas activaron los niveles más altos de actividad POD (Figura 14A). Q-88 a 1 g.L<sup>-1</sup> elevó la actividad enzimática más de diez veces por encima del control, seguido por su concentración más alta. El resto de los tratamientos indujeron valores intermedios y diferentes del control, excepto las dos concentraciones más bajas del polímero más acetilado (Q-63) que no difirieron de éste.

Al adicionar los compuestos de quitosana a la rizosfera de las plantas (Figura 14B), sólo Q-63 provocó aumento de actividad POD por encima del control a la mayor concentración evaluada. El resto de los tratamientos no provocaron cambios de actividad enzimática diferentes del control.

Cuando los tratamientos con quitosana se adicionaron al sustrato al momento de la siembra, no se detectaron diferencias de actividad POD entre los tratamientos y el control en las hojas de las plántulas de tabaco (Figura 14C).

#### *Inducción de resistencia en plántulas de tabaco contra P. nicotianae.*

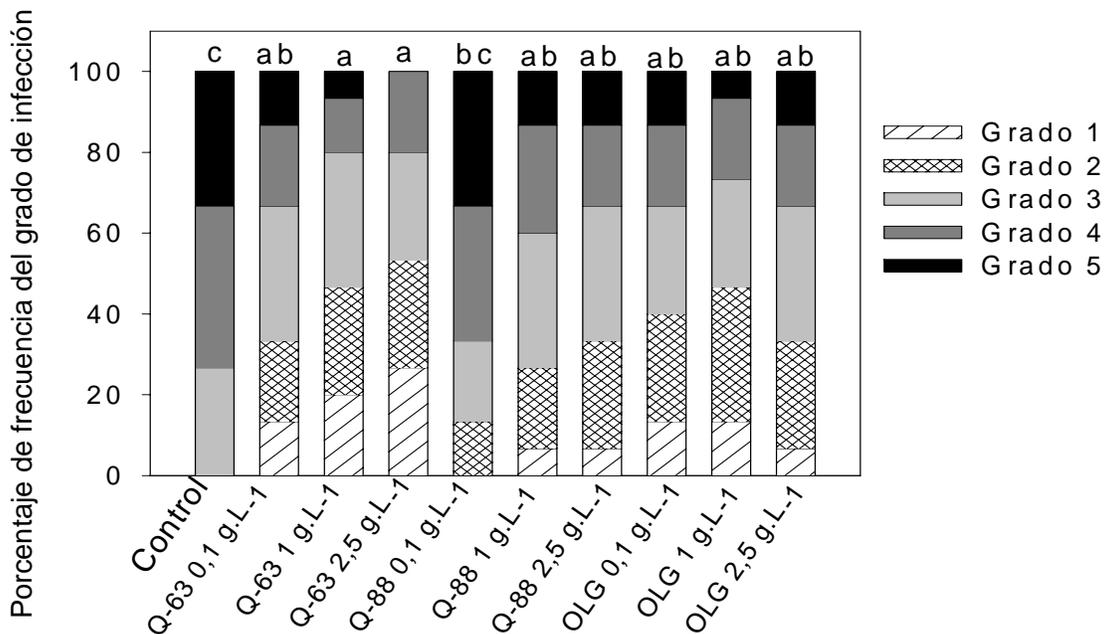
La aspersión foliar de los compuestos de quitosana en plantas de tabaco de 25 dds contra *P. nicotianae* provocó la reducción del índice de infección del patógeno en las plántulas con casi todos los tratamientos asperjados (Tabla 8). Solamente la concentración más baja del polímero Q-88 no difirió del control. Los mayores valores de protección se obtuvieron con el polímero más acetilado (Q-63) a la concentración de 1 y 2,5 g.L<sup>-1</sup>, con un nivel de 36 a 41 % respecto al control. La mezcla de oligoquitosanas a 0,1 y 1 g.L<sup>-1</sup> causó un efecto protector contra el patógeno de entre 27 y 33 %.



**Figura 14:** Variación de la actividad enzimática POD en hojas de plántulas de tabaco a los 25 dds. Los tratamientos se aplicaron por Aspersión foliar (A), Adición a la rizosfera de las plantas (B) 72 horas antes de la extracción foliar y por Adición al sustrato al momento de la siembra de las semillas (C). Se realizó un análisis de varianza en 4 réplicas por tratamiento. Se muestran los resultados de la comparación de medias por la prueba de Tukey,  $p \leq 0.05$ . Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos.

**Tabla 8:** Efecto de los compuestos de quitosana aplicados por aspersión foliar sobre la infección por *Phytophthora nicotianae* en plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) de 25 dds. Se presentan las medias de los rangos en el análisis de Kruskal Wallis. Tratamientos con letras iguales no difieren en la prueba de Mann Whitney con la corrección de Bonferroni para  $p \leq 0.05$ . Se presenta, también, el índice de infección calculado en cada tratamiento.

Tratamientos	Conc. (g.L <sup>-1</sup> )	Media de rangos	Índice de infección
Control	-----	109,97 <b>c</b>	81.33
Q-63	0.1	72,37 <b>ab</b>	60
	1	58,43 <b>a</b>	52
	2.5	52,33 <b>a</b>	48
	0.1	102,20 <b>bc</b>	77.3
Q-88	1	79,20 <b>ab</b>	64
	2.5	74,00 <b>ab</b>	61.3
	0.1	69,80 <b>a</b>	58.7
OLG	1	62,70 <b>a</b>	54.7
	2.5	74,00 <b>ab</b>	61.3



**Figura 15:** Porcentajes de frecuencia de infección del patógeno *P. nicotianae* en las plantas de tabaco durante el experimento de *aspersión foliar*. Se presentan los diferentes grados de infección alcanzados con cada tratamiento y las diferencias entre ellos, según la prueba de Mann Whitney con la corrección de Bonferroni para  $p \leq 0.05$ .

El mayor porcentaje de plantas sanas (Grado 1) se obtuvo con las concentraciones mayores del polímero más acetilado (Q-63). Con este polímero a 2,5 g.L<sup>-1</sup> no hubo plantas muertas (Grado 5). Contrariamente, el control no presentó plantas sanas (Figura 15).

Al utilizar el análisis de regresión lineal múltiple con las tres actividades enzimáticas y el índice de infección, las variables actividad  $\beta$  1-3 glucanasa y PAL están relacionadas de forma inversa con el índice de infección (Tabla 9), es decir, los mayores valores de actividad enzimática  $\beta$  1-3 glucanasa (OLG a 0,1 y 1 g.L<sup>-1</sup>) y de PAL (Q-63 a 1 y 2,5 g.L<sup>-1</sup>) corresponden con los menores valores en el índice de infección de las plantas, por tanto fueron las plantas de mayor resistencia frente al patógeno. No se obtuvieron coeficientes de regresión significativos para la POD, incluso tampoco cuando se repitió el análisis de regresión con la eliminación paso a paso del efecto de las otras variables enzimáticas.

**Tabla 9.** Coeficientes de regresión entre las variables enzimáticas y el índice de infección (variable dependiente) en las plántulas de tabaco ( $R^2$  corregida = 0,811), previamente aplicadas por aspersión foliar con los compuestos de quitosana.

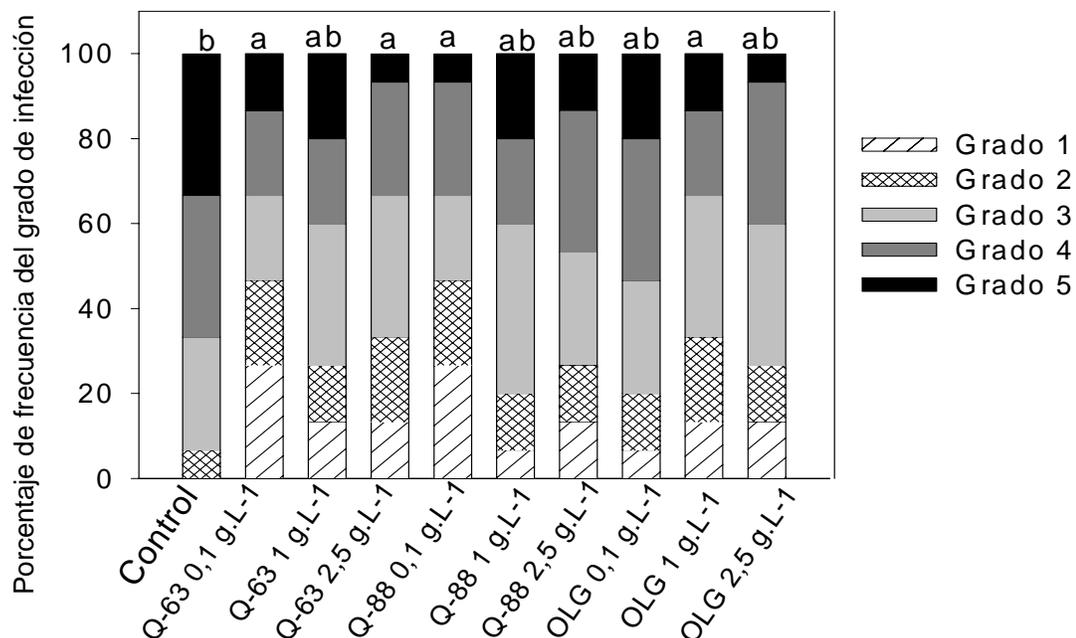
<b>Variables del modelo de regresión</b>	<b>Coefficientes estandarizados</b>	<b>t</b>	<b>Significación</b>
$\beta$ 1-3 glucanasa	- 0,43	- 2,953	0,026
PAL	- 0,786	- 5,395	0,002
POD	- 0,111	- 0,767	0,472

La aplicación de los tratamientos por adición a la rizosfera de las plántulas causó la reducción significativa del índice de infección de *P. nicotianae* con el polímero más acetilado (Q-63, 0,1 y 2,5 g.L<sup>-1</sup>), el menos acetilado (Q-88, 0,1 g.L<sup>-1</sup>) y las oligo-quitosanas (OLG, 1 g.L<sup>-1</sup>) (Tabla 10). En los casos señalados la protección en relación con el control estuvo entre 24 y 32 %, por debajo de los mejores resultados de protección en la aplicación por aspersión foliar de las plantas.

En esta forma de aplicación los mejores resultados de protección (Q-63 y Q-88, 0,1 g.L<sup>-1</sup>) coincidieron con los menores porcentajes de plantas muertas (Grado 5) y los mayores de plantas sanas (Figura 16).

**Tabla 10:** Efecto de los compuestos de quitosana aplicados por adición a la rizosfera de las plantas sobre la infección por *Phytophthora nicotianae* en plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) de 25 dds. Se presentan las medias de los rangos en el análisis de Kruskal Wallis. Tratamientos con letras iguales no difieren en la prueba de Mann Whitney con la corrección de Bonferroni para  $p \leq 0.05$ . Se presenta, también, el índice de infección calculado en cada tratamiento.

Tratamientos	Conc. (g.L <sup>-1</sup> )	Media de rangos	Índice de infección
Control	-----	101.77 <b>b</b>	78.7
Q-63	0.1	62.33 <b>a</b>	54.7
	1	76.8 <b>ab</b>	64
	2.5	67.57 <b>a</b>	58.7
	0.1	60.23 <b>a</b>	53.3
Q-88	1	80.47 <b>ab</b>	66.7
	2.5	77.5 <b>ab</b>	64
	0.1	86.07 <b>ab</b>	69.3
OLG	1	69.67 <b>a</b>	60
	2.5	72.60 <b>ab</b>	61.3



**Figura 16:** Porcentajes de frecuencia de infección del patógeno *P. nicotianae* en las plantas de tabaco durante el experimento de *adición a la rizosfera*. Se presentan los diferentes grados de infección alcanzados con cada tratamiento y las diferencias entre ellos, según la prueba de Mann Whitney con la corrección de Bonferroni para  $p \leq 0.05$ .

**Tabla 11.** Determinación de los coeficientes de regresión entre las variables enzimáticas y el índice de infección (variable dependiente) en las plántulas de tabaco ( $R^2$  corregida = 0,705), previamente aplicadas por adición a la rizosfera con los compuestos de quitosana.

<b>Variabes del modelo de regresión</b>	<b>Coefficientes estandarizados</b>	<b>t</b>	<b>Significación</b>
$\beta$ 1-3 glucanasa	- 0,290	0,940	0,384
PAL	<b>- 1,076</b>	<b>- 3,544</b>	<b>0,012</b>
POD	- 0,428	- 2,104	0,080

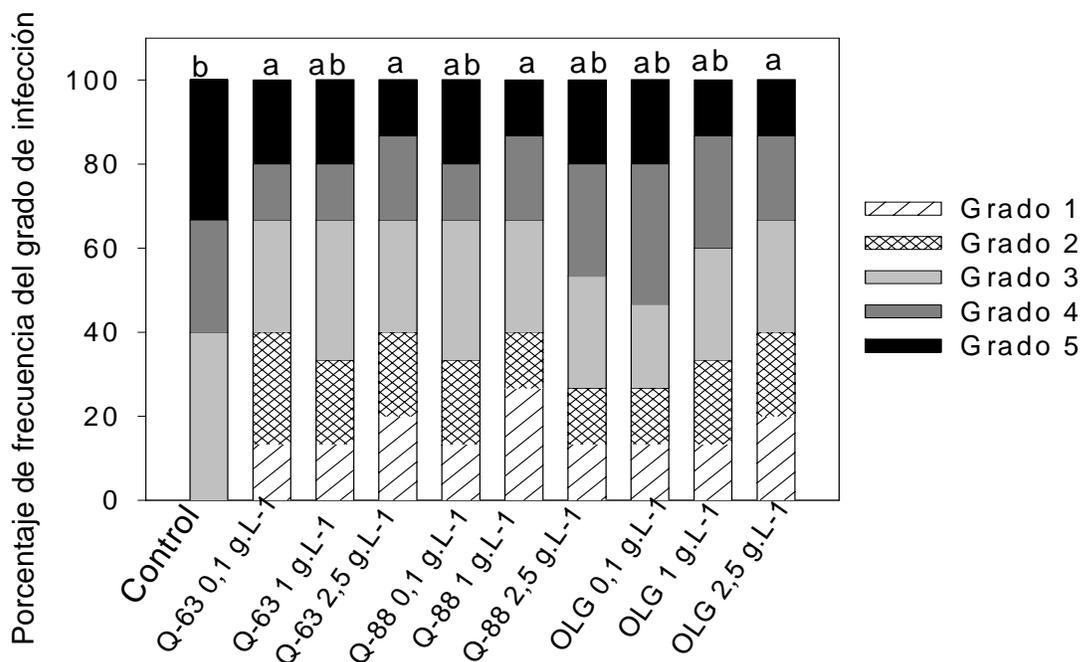
En el análisis de regresión lineal entre las tres variables de actividad enzimática y el índice de infección, las variables actividad enzimática PAL e índice de infección resultaron inversamente correlacionados (Tabla 11). Los mayores valores de actividad PAL (Q-63 y Q-88 a 0,1 g.L<sup>-1</sup>) corresponden con los menores valores en el índice de infección de las plantas. Estos son también los tratamientos con mayores niveles de resistencia. Cuando se analizó la regresión previa eliminación paso a paso del efecto de las variables enzimáticas no se obtuvieron coeficientes de regresión significativos para la actividad  $\beta$  1-3 glucanasa, ni para la POD.

Al añadir los compuestos de quitosana en el momento previo a la siembra, se obtuvo reducción significativa de la infección de las plántulas de tabaco a los 25 dds con varios de los tratamientos (Tabla 12). Estos fueron el polímero Q-63 a 0,1 y 2,5 g.L<sup>-1</sup>, el Q-88 a 1 g.L<sup>-1</sup> y la mezcla OLG a 2,5 g.L<sup>-1</sup>. Los mayores valores de protección estuvieron aproximadamente entre 24 y 29 %, similares a los que se obtuvieron con la adición a la rizosfera y menor que los obtenidos con la aplicación por aspersión foliar. El mayor porcentaje de plantas totalmente sanas (Grado 1) se obtuvieron por tratamiento con el polímero más acetilado a 2,5 g.L<sup>-1</sup>, el menos acetilado a 1 g.L<sup>-1</sup> y los oligos de quitosana a 2,5 g.L<sup>-1</sup> (Figura 17).

La determinación de los coeficientes de regresión lineal entre las variables enzimáticas y el índice de infección no mostraron valores significativos de estos para ninguna de las tres enzimas determinadas cuando los compuestos se aplicaron al momento de la siembra. Sin embargo, al realizar el análisis de regresión con la eliminación de la actividad POD (Tabla 13), que no mostró incrementos significativos de actividad enzimática en esta forma de aplicación (Figura 14C) se obtuvo un

**Tabla 12:** Efecto de los compuestos de quitosana aplicados por adición al sustrato previo a la siembra sobre la infección por *Phytophthora nicotianae* en plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) de 25 dds. Se presentan las medias de los rangos en el análisis de Kruskal Wallis. Tratamientos con letras iguales no difieren en la prueba de Mann Whitney con la corrección de Bonferroni para  $p \leq 0.05$ . Se presenta, también, el índice de infección calculado en cada tratamiento.

Tratamientos	Conc. (g.L <sup>-1</sup> )	Media de rangos	Índice de infección
Control	-----	101.5 <b>b</b>	78.7
Q-63	0.1	70.77 <b>a</b>	60
	1	73.03 <b>ab</b>	61.3
	2.5	67.2 <b>a</b>	57.3
	0.1	73.03 <b>ab</b>	61.3
Q-88	1	65.83 <b>a</b>	56
	2.5	80.3 <b>ab</b>	65.3
	0.1	82.8 <b>ab</b>	66.7
OLG	1	73.53 <b>ab</b>	61.3
	2.5	67.2 <b>a</b>	57.3



**Figure 17:** Porcentajes de frecuencia de infección del patógeno *P. nicotianae* en las plantas de tabaco durante el experimento de *Adición al sustrato en el momento de la siembra*. Se presentan los diferentes grados de infección alcanzados con cada tratamiento y las diferencias entre ellos, según la prueba de Mann Whitney con la corrección de Bonferroni para  $p \leq 0.05$ .

coeficiente de regresión significativo para la actividad enzimática PAL con relación inversa con el índice de infección, pero debido al valor tan bajo del  $R^2$  (0,360) del análisis, no hay una contribución importante de la enzima a la reducción del índice de infección.

**Tabla 13.** Coeficientes de regresión entre las variables enzimáticas  $\beta$  1-3 glucanasa y PAL y el índice de infección (variable dependiente) en las plántulas de tabaco ( $R^2$  corregida = 0,360), aplicadas por adición al sustrato al momento de la siembra con los compuestos de quitosana.

<b>Variables del modelo de regresión</b>	<b>Coefficientes estandarizados</b>	<b>t</b>	<b>Significación</b>
$\beta$ 1-3 glucanasa	0,164	0,617	0,557
PAL	- 0,689	- 2,584	0,036

## V- Discusión

### ***5.1 Quitosanas y derivados de menor masa molar sobre el crecimiento y la viabilidad in vitro de Phytophthora nicotianae.***

Todos los compuestos de quitosana utilizados en este trabajo causaron un efecto inhibitorio sobre el crecimiento y la viabilidad *in vitro* de *P. nicotianae*. Su acción dependió de la concentración del compuesto de quitosana empleado, de las características físico-químicas de cada uno y del tiempo de interacción del patógeno con la quitosana (Figuras 2, 3, 4 y 5; Tabla 3).

Las investigaciones sobre el efecto de la masa molar de la quitosana en la inhibición del desarrollo microbiano son de gran actualidad (Zheng y Zhu, 2003; Bautista-Baños *et al.*, 2006; Chien y Chou, 2006; Xu *et al.*, 2007; Hernández-Lauzardo *et al.*, 2008). De lo informado por diversos autores, el efecto de la MM sobre la inhibición del crecimiento de patógenos fungosos depende también del tipo de hongo de que se trate. En algunas especies la reducción de la MM hasta oligoquitosanas disminuye la actividad antimicrobiana y en otras la aumenta (Kendra y Hadwiger, 1984; Jeon *et al.*, 2000; Xu *et al.*, 2007).

En este trabajo, la degradación enzimática del polímero de quitosana Q-63 incrementó el poder de inhibición de la mezcla resultante (HQ-24) sobre *Phytophthora nicotianae* en comparación con el polímero nativo (Figura 2). El aumento del número de fragmentos de quitosana con un tamaño y características físico-químicas apropiadas para la inhibición del patógeno en la solución hidrolizada fue, probablemente, responsable de este efecto (Jeon *et al.*, 2000). La reducción de un 80% de la viscosidad y el incremento en 25 veces del valor de azúcares reductores evidencia que el hidrolizado crudo (HQ-24) obtenido a partir de la quitosana parcialmente acetilada (Q-63) contiene una importante gama de fragmentos que difieren del polímero nativo, no solamente por la disminución de la MM con respecto a éste, sino también por la variedad de tamaños y diferentes grados de acetilación en los fragmentos presentes, todo lo cuál influye en la actividad antimicrobiana de la quitosana (Jeon *et al.*, 2000; Park *et al.*, 2002; Rabea *et al.*, 2003).

Al comparar el efecto antimicrobiano de la mezcla de oligosacáridos de quitosana (OLG) con los polímeros analizado por el crecimiento micelial de *P. nicotianae*, se evidencia que a las mayores concentraciones evaluadas la mezcla OLG provocó una inhibición del crecimiento del micelio similar o mayor a la provocada por los polímeros (Figura 3). Lo anterior demuestra, por primera vez en *Phytophthora nicotianae*, la inhibición del crecimiento por oligosacáridos de quitosana.

Kendra y Hadwiger (1984) demostraron que la actividad antifúngica de quitosana contra *Fusarium solani* ocurría solo con quitosanas de un GrP por encima de 7 restos de glucosamina. A diferencia, otros autores informaron que oligómeros entre 2 y 8 residuos de glucosamina, así como quitosanas parcialmente hidrolizadas con baja MM poseían un mayor efecto inhibitorio que polímeros de alta MM contra varios fitopatógenos que incluyeron *Fusarium oxysporum*, *Phomopsis fukushi*, y *Alternaria alternata*, entre otros (Hirano y Nagao, 1989; Jeon *et al.*, 2000). Los resultados de este trabajo demuestran que para *P. nicotianae* es posible obtener una inhibición similar o mayor con oligosacáridos de 5 a 9 restos de glucosamina, que con polímeros de quitosana, en dependencia de la concentración utilizada.

Tomando en cuenta lo informado por varios autores, la generalidad de la acción antimicrobiana de la quitosana, independientemente de las particularidades de cada especie, parece estar favorecida por la acción de oligosacáridos de alta MM o polímeros de baja MM (Uchida *et al.*, 1989; Ueno *et al.*, 1997; Jeon *et al.*, 2000; Hernández-Lauzardo *et al.*, 2008). En este sentido, las diferencias de inhibición del crecimiento entre el hidrolizado HQ-24 y la mezcla OLG con sus polímeros de origen (Q-63 y Q-88, respectivamente) apoyan la posibilidad de que los mayores porcentajes de inhibición que se obtienen con HQ-24 sean debido a un mayor contenido de oligoquitosanas de alta MM o de fragmentos de polímeros de quitosana de baja MM en esta mezcla.

La inhibición con quitosana de la formación, germinación y desarrollo de zoosporas de *Phytophthora nicotianae* no ha sido evaluada con anterioridad. Los resultados de este trabajo demostraron una clara inhibición de la viabilidad de las zoosporas de este patógeno por la acción de los tres compuestos de quitosana evaluados. La inhibición fue dependiente del tiempo de imbibición zoosporas-compuesto de quitosana (Figura

5) y de la concentración de ambos componentes en el ensayo (Figuras 4 y 5). Con el aumento de la concentración de las quitosanas se redujo la posterior viabilidad de las esporas en medio de cultivo sin quitosana, mientras que el aumento de la concentración de zoosporas en el ensayo aumentó la aparición de nuevas colonias. A su vez, mientras mayor fue el tiempo de interacción quitosanas-zoosporas menor fue el ulterior crecimiento de nuevo micelio en las placas sin quitosana.

En hongos, se informó la afectación por quitosana de la viabilidad de esporas en distintos géneros como *Fusarium*, *Rhizopus*, *Colletotrichum*, *Botrytis*, *Alternaria*, *Rhizoctonia*, *Sclerotium*, *Penicillium* y *Aspergillus* (Bautista-Baños *et al.*, 2003, 2006; Ben-Shalom *et al.*, 2003; Plascencia-Jatomea *et al.*, 2003; Eweis *et al.*, 2005; Chien y Chou, 2006), pero los informes en el tema dentro del grupo de los Oomycetes son escasos y recientes (Xu *et al.*, 2007). En hongos se demostró la reducción de la germinación de esporas y del crecimiento del tubo germinativo, así como afectaciones en el área, longitud y forma de los conidios en dependencia de la especie de hongo y el tiempo de exposición a la quitosana (Bautista-Baños *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2007; Pacheco *et al.*, 2008; Hernández-Lauzardo *et al.*, 2008).

Este trabajo demostró la inhibición *in vitro* de la viabilidad de las zoosporas de *P. nicotianae* por polímeros y por oligómeros de quitosana (Tabla 3), ocurriendo la mayor inhibición con el polímero Q-88. No existen similares estudios comparativos dentro del grupo de los Oomycetes, al cuál pertenece *P. nicotianae*, sin embargo, recientemente fue demostrado que polímeros de quitosana de mayor MM causaban una mayor afectación de la germinación y la forma de esporas de *Rhizopus stolonifer* que aquellos polímeros de MM menor (Hernández-Lauzardo *et al.*, 2008). Esto coincide con lo obtenido en este trabajo contra *P. nicotianae*, por lo que los resultados de esta tesis unido a lo informado en la literatura apuntan hacia una posible regularidad biológica: las quitosanas favorecen la inhibición de la viabilidad de esporas de hongos y oomycetes en la medida que es mayor su masa molar.

No obstante, la diferencia de MM entre las quitosanas no explica qué factor o elemento químico en la molécula es el que causa, y como provoca, la inhibición del crecimiento de estos microorganismos. Se considera que la naturaleza policatiónica del polímero es la principal responsable de la actividad antimicrobiana, por tanto, la

cantidad de grupos aminos libres (no acetilados) en la cadena polimérica, en adición al tamaño del polímero, ejercen un papel importante en dicha actividad (Jeon *et al.*, 2000; Rabea *et al.*, 2003).

En este estudio, al comparar la influencia de ambos polímeros sobre el crecimiento del micelio se detecta un efecto del grado de acetilación; ocurre una mayor inhibición con el polímero menos acetilado (Q-88), o sea, el polímero con mayor número de cargas positivas libres en el grupo amino del residuo monomérico de glucosamina. Este efecto se observó solo a las concentraciones más bajas probadas, probablemente, porque el incremento de quitosana en el medio de crecimiento a 1.5 g.L<sup>-1</sup>, resulta un exceso del producto en el medio que enmascara el efecto causado por la acetilación. Este problema del enmascaramiento ha sido anteriormente informado por otros autores que han estudiado el efecto del GrA en otras especies (Park *et al.*, 2002; Rabea *et al.*, 2003; Bautista-Baños *et al.*, 2006).

Después de un amplio análisis de revistas científicas y bases de datos nacionales e internacionales, se evidencia que este es el primer informe del efecto del grado de acetilación sobre el crecimiento del micelio y la viabilidad de zoosporas en el género *Phytophthora*.

La influencia de la concentración en la actividad antimicrobiana de la quitosana está documentada en estudios *in vitro* e *in situ* y se ha informado que la inhibición directa de diversos patógenos, diferentes de *P. nicotianae*, está bien correlacionada con los incrementos de concentración de este compuesto (Ait Barka *et al.*, 2004; Chien y Chou, 2006; Trotel-Aziz *et al.*, 2006; Bautista-Baños *et al.*, 2006). Este estudio profundiza en la acción antimicrobiana de este compuesto sobre *P. nicotianae* y demuestra que el aumento de la concentración de diferentes quitosanas incrementa la inhibición del crecimiento micelial y la viabilidad de zoosporas de este patógeno.

El mecanismo de acción de la quitosana sobre el crecimiento y desarrollo del género *Phytophthora* no tiene antecedentes en la literatura, pero puede analizarse comparativamente a partir de resultados informados en hongos (Rabea *et al.*, 2003, Bautista-Baños *et al.*, 2006), utilizando modelos que se han considerado para explicar los diferentes estadios del ciclo de vida de este género (Wessels y Sietsma, 1981; Grenville-Briggs y van West, 2005; Hardham, 2007) y apoyados en los primeros

resultados de la acción de quitosanas en este género (Atiam *et al.*, 2005; Xu *et al.*, 2007).

De los resultados experimentales con hongos, algunos autores plantearon que la naturaleza policatiónica de la quitosana puede inducir alteraciones en la permeabilidad de la membrana plasmática de estos y promover desbalances osmóticos internos que conlleve a agregaciones citoplasmáticas y desregulación de enzimas unidas a la membrana, afectándose entonces la quitina sintasa, principal enzima en la formación de nueva pared celular en los hongos, que provoque acumulaciones de quitina en lugares inadecuados y perjudique la formación de la nueva pared (Benhamou, 1995 y 1996; El Gaouth *et al.*, 1999; Laflamme *et al.*, 1999).

*Phytophthora*, como representante de los Oomycetes, no contiene quitina en su pared celular, sino que este polímero está reemplazado en este grupo por celulosa (Wessels y Sietsma, 1981; Grenville-Briggs y van West, 2005). Es probable que estos oomycetes sufran alteraciones de la membrana plasmática como resultado de interacciones de los grupos cargados positivamente en el polímero de quitosana con las cargas negativas de residuos de macromoléculas expuestas en su superficie celular que le provoquen pérdida de electrolitos, aminoácidos, quelación de nutrientes esenciales y la desregulación de enzimas importantes en los procesos de crecimiento y desarrollo, como se ha informado que ocurre en hongos (Rabea *et al.*, 2003; Bautista-Baños *et al.*, 2006).

Siguiendo los estadios del ciclo de vida de *Phytophthora*, es conocido que las zoosporas de este género carecen de pared celular, por lo que el mantenimiento del volumen y la homeostasis celular se realiza a través de la entrada y salida de agua a una vacuola contráctil que posee una especie de vejiga central (Hardham, 2007; Walker y van West, 2007). La entrada de agua a la vejiga ocurre siguiendo un gradiente quimo-osmótico facilitado por entrada de solutos unido a bombas ATPasas de membrana, mientras la salida de agua ocurre por fusión de la membrana de la vejiga a la membrana plasmática (Hardham, 2007; Walker y van West, 2007).

El proceso anterior, esencial en el funcionamiento y el proceso infeccioso de *P. nicotianae* debe afectarse fuertemente cuando se aplica quitosana sobre órganos y el medio circundante de crecimiento del tabaco. La interacción de las cargas positivas de

la quitosana con los fosfolípidos y proteínas expuestas en la membrana plasmática e incluso en la vacuola cuando se funden ambas membranas, puede causar los desbalances iónicos, de permeabilidad y el adelgazamiento visto en las membranas, todo lo cual eventualmente provoca la ruptura de las zoosporas, como ha sido demostrado en *P. capsici* (Xu *et al.*, 2007).

Puede inhibirse también la respuesta de las zoosporas de *P. nicotianae* a diferentes estímulos que le permiten la autogregación y la quimiotaxis hacia los sitios de infección. Este movimiento direccional responde a la detección de compuestos químicos como el ácido fosfatídico y el  $\text{Ca}^{2+}$  a concentraciones mili molares (Hardham, 2007; Walker y van West, 2007) y otras señales de atracción a través de sensores proteicos transmembranas (Latijnhouwers *et al.*, 2004). La inhibición de estos estaría causada por la capacidad de los polímeros de quitosanas de secuestrar compuestos de carga opuesta a través de interacciones electrostáticas y de formar complejos con metales mediante enlaces de coordinación (Rhazi *et al.*, 2002; Schatz *et al.*, 2004). Ambas características del polímero pueden causar tanto el secuestro y reducción de componentes señalizadores del movimiento de las zoosporas como afectar la detección de los mismos por sensores proteicos expuestos en membrana.

De igual manera puede afectarse el proceso de enquistamiento de las zoosporas de *P. nicotianae*. Al adherirse la zoospora al hospedante, el enquistamiento se consolida mediante el vertimiento de material mucilaginoso y proteínas desde vesículas periféricas que pegan la zoospora al hospedante y la protegen de la desecación (Hardham, 2007; Walker y van West, 2007). El proceso de enquistamiento podría afectarse con quitosana tanto por el acomplejamiento del catión  $\text{Ca}^{2+}$ , necesario en concentraciones elevadas en este proceso (Walker y van West, 2007), como por interacción directa de las cargas positivas del polímero con las membranas de las vesículas excretoras causando su ruptura, algo que fue recientemente demostrado para el patógeno *P. capsici* (Xu *et al.*, 2007).

Sin embargo, es posible considerar, que las afectaciones sobre la síntesis de nueva pared celular son críticas para causar la inhibición por quitosana de *P. nicotianae* debido a la importancia funcional de este proceso en la consolidación del

enquistamiento que garantiza el éxito de la infección y en el proceso de crecimiento de la hifa (Hardham, 2007; Walker y van West, 2007; Grenville-Briggs *et al.*, 2008).

Se plantea que tanto el crecimiento de nueva pared desde el citoplasma de una hifa en crecimiento, como su formación en el tubo germinativo de la nueva hifa que germina a partir de la zoospora enquistada, requieren de un coordinado balance entre la síntesis y excreción de enzimas líticas encargadas de degradar los componentes nutritivos que ayudan a formar los polímeros de la pared y las enzimas que deben sintetizar los polímeros que forman las microfibrillas de la pared (Wessels y Sietsma, 1981; Walker y van West, 2007).

Las quitosanas pueden romper el coordinado balance antes mencionado e inhibir el proceso de formación de nueva pared a través de su interacción de cargas con diversas estructuras, macromoléculas y el acomplejamiento de metales que funcionan como cofactores de enzimas claves. Recientemente, se demostró que las enzimas celulasas responsables de la síntesis coordinada de celulosa en la formación de la pared de *Phytophthora* se localizan en forma transmembrana en las zonas de crecimiento de la hifa y su funcionamiento normal es esencial para el establecimiento del patógeno en la planta (Mach, 2008; Grenville-Briggs *et al.*, 2008); por tanto, el efecto de la quitosana sobre estas y otras enzimas, como también la  $\beta$  1-3 glucano sintasa, a través de interacciones directas con ellas, reducción por quelación de sus cofactores de actividad o la alteración de los sistemas membranosos que las contienen inhibiría el primer paso en el crecimiento y la infección de este género. Resultados recientes indican que el proceso mencionado, puede estar muy afectado en este género en presencia de cantidades crecientes de quitosana (Xu *et al.*, 2007).

La inhibición de la síntesis de pared puede afectarse también por interacción directa de la membrana plasmática con las cargas positivas del polímero que cause una alteración conformacional, liberación de electrolitos y proteínas y un desbalance iónico, que además conlleve a la afectación del paso de nutrientes hacia el citoplasma y por tanto a la ruptura del balance enzimático necesario entre la lisis y síntesis de polímeros de la pared, como ha sido informado en varios hongos (Leuba y Stosel, 1985; Rabea *et al.*, 2003).

La afectación de la síntesis de pared podría reforzarse mediante quelación de iones y nutrientes esenciales por el polímero, sobretodo al disponerse en forma de película alrededor de la hifa en crecimiento, algo que especialmente ocurre con las quitosanas de mayor masa molar. Lo anterior causaría un caso de inanición en la hifa en crecimiento como ya ha sido informado en otros patógenos (Laflamme *et al.*, 1999; Rabea *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2007; Xu *et al.*, 2007). Este efecto podría ser particularmente letal después de la germinación de zoosporas de *Phytophthora*, cuando la célula deja de ser energéticamente autosuficiente y comienza a depender del transporte de carbono y nitrógeno del hospedante (Grenville-Briggs y van West, 2005).

La síntesis de nueva pared puede ser perjudicada también por la interacción de quitosana con los contenidos de otros sistemas membranosos como las vesículas excretoras apicales que se encuentran en el ápice de la hifa. Dichas vesículas contienen enzimas que degradan las cubiertas vegetales y la pared celular de las plantas hospedantes por lo que se vinculan al proceso de colonización y son abundantes entre la membrana plasmática y la pared celular (Hardham, 2007). Recientemente se demostró la afectación de estas vesículas por oligoquitosanas en el crecimiento *in vitro* de *P. capsici* (Xu *et al.*, 2007).

La afectación o ruptura de otros sistemas endomembranosos como la vacuola puede ocurrir con fragmentos menores de quitosana (oligosacáridos) que penetren la membrana plasmática (Xu *et al.*, 2007). Debe tomarse en cuenta que este organelo celular juega un importante papel en el mantenimiento de la presión de turgencia que beneficia la forma y el crecimiento de la hifa, algo esencial en el proceso de crecimiento del micelio de los oomycetes aseptados, como es el caso de *Phytophthora* (Grenville-Briggs y van West, 2005).

Es probable que también la fragmentación del polímero incremente el número de moléculas en contacto con la superficie de la membrana y su posible entrada a la célula del patógeno, hecho que provocaría además la penetración del núcleo y su interacción con el ADN (molécula cargada negativamente), como ha sido propuesto para patógenos fúngos (Rabea *et al.*, 2003).

Varios autores han demostrado la formación de complejos polielectrolitos entre el ADN y la quitosana (Liu *et al.*, 2005; Strand *et al.*, 2005), lo que sugiere que fragmentos de baja masa molar de quitosana pueden causar la muerte celular de *P. nicotianae*, al penetrar las células y crear interferencias en el proceso de transcripción y síntesis de proteínas. Esto podría ser un factor de mayor importancia en la inhibición de hifas de *Phytophthora* en crecimiento, aunque no debe descartarse la evidencia encontrada de distorsión y ruptura de vacuolas en este grupo en presencia de oligoquitosanas (Xu *et al.*, 2007).

Tomando en cuenta todo lo anteriormente descrito sobre el posible modo de acción de las quitosanas sobre *P. nicotianae* y los resultados de inhibición demostrados en este trabajo se puede sugerir que polímeros de alta masa molar de quitosana capaces de formar películas debido a su viscosidad, inhiben el crecimiento y desarrollo de *P. nicotianae* mediante interacción y desbalance en la membrana e inhibición del funcionamiento de enzimas esenciales, pero también al impedir el paso de nutrientes hasta la hifa o célula microbiana, mientras que fragmentos de menor masa molar y oligosacáridos tienen además mayor posibilidad de acceso a la membrana y a través de ella al interior celular afectando los sistemas membranosos e incluso el ADN celular.

### **5.2 Quitosanas y derivados de menor masa molar en la inducción de resistencia en plantas de tabaco.**

Las formas de aplicación de los compuestos de quitosana (epígrafe 4.2.3) causaron un aumento diferenciado de la acumulación de proteínas solubles en las hojas de las plantas de tabaco. El tiempo de incubación entre la aplicación de los tratamientos y la determinación proteica resultó crucial tanto para los niveles proteicos alcanzados como para los incrementos de la concentración de proteínas en los tratamientos con compuestos de quitosana con relación al control. Los mayores niveles de proteína con todos los tratamientos y los mayores incrementos con tratamientos de quitosana respecto al control se obtuvieron cuando las determinaciones se realizaron a las 72 horas de aplicados los tratamientos independientemente que la aplicación fuera por aspersión foliar o adición a la rizosfera (Figura 11).

La razón por la cuál los niveles de proteína, incluso con los controles, son mayores a las 72 horas puede deberse a las aplicaciones realizadas. Debe recordarse que se empleó una solución de KAc como control debido a que la quitosana no es soluble en H<sub>2</sub>O. El contenido de acetato de potasio en la solución control puede haber causado los incrementos de proteína en los tratamientos controles de la aspersión foliar y adición a la rizosfera en comparación con el control de la forma de aplicación al sustrato al momento de la siembra (Figura 11), donde el KAc adicionado debe haber sido lavado por las aplicaciones acuosas frecuentes que se hicieron para mantener la humedad que requirió el cultivo en su crecimiento. Se ha informado el incremento de proteínas y respuestas enzimáticas, e incluso la inducción de resistencia en plantas contra patógenos con varias sales químicas y fertilizantes foliares (Manandhar *et al.*, 1998; Bécot *et al.*, 2000; Reuveni *et al.*, 2000).

A su vez, los mayores incrementos de proteína, respecto al control, obtenidos con varios de los tratamientos con quitosana en las respuestas determinadas a las 72 horas, con relación a la determinada a los 25 días (adición al sustrato en la siembra) demuestran el carácter temporal de la inducción de respuestas defensivas que se incluyen dentro de la resistencia inducida, hecho que se manifiesta más en la medida que aumenta el lapso de tiempo entre que las plantas son pre-tratadas y que entran en contacto con un patógeno (Heil y Bostock, 2002; van Loon y Bakker, 2005; Zhao *et al.*, 2005; van Loon *et al.*, 2006).

Es probable que después de un tiempo de aplicado el tratamiento se reduzcan los niveles de muchas proteínas relacionadas con la respuesta defensiva hasta niveles basales por el costo energético que constituye su inducción y/o porque ya cumplieron su función señalizadora, catalítica o defensiva (Heil y Bostock, 2002; Zhao *et al.*, 2005; Walter y Boyle, 2005).

La inducción de actividad enzimática  $\beta$  1-3 glucanasa, PAL y POD en plántulas de tabaco con diferentes formas de aplicación de quitosana y derivados no tiene antecedentes en la literatura científica revisada. Con anterioridad, la activación de estas enzimas o sus genes en tabaco han sido el resultado de la estimulación previa de las plantas con agentes patógenos como TMV (Matsuoka y Ohashi, 1986), *Peronospora hyoscyamym* fsp. *tabacina* (Ye *et al.*, 1990; Funnell *et al.*, 2004); o sus

enzimas patogénicas (Negrel y Javelle, 1995); o por la aplicación de químicos como ácido salicílico o jasmónico (Niki *et al.*, 1998; Leubner-Metzger y Meins, 1999); elicitores de pared celular de patógenos (Oelofse y Dubery, 1996) o mediante clonaje de los genes evaluados para conocer sus efectos sobre posteriores ataques de fitopatógenos (Lusso y Kuć, 1996). Recientemente, se informó la inducción de actividad PAL, pero en suspensiones celulares de tabaco elicitadas por oligosacáridos de quitosana (Zhao *et al.*, 2007a).

Un análisis general de los resultados permite afirmar que los compuestos de quitosana utilizados causaron la inducción de las tres enzimas defensivas evaluadas (Figuras 8, 9, 10, 12, 13 y 14). La inducción enzimática estuvo determinada, principalmente, por las concentraciones de los compuestos y por la forma en que estos fueron aplicados a las plantas. Adicionalmente, en algunos casos se demostró un efecto del grado de acetilación del polímero y del tipo de quitosana aplicada, al encontrarse diferencias de activación entre los polímeros y la mezcla de oligoquitosanas.

El efecto de la concentración de los compuestos de quitosana sobre la respuesta defensiva se reflejó en las tres enzimas evaluadas en dependencia de la forma de aplicación de los productos. Los órganos que recibieron de forma directa la aplicación de las quitosanas (la raíz cuando la aplicación fue vía raíz y las hojas cuando la aplicación fue por aspersión foliar) respondieron con una inducción enzimática dependiente de la concentración de los compuestos, es decir, cuando se aplicó la mezcla OLG a hojas y raíces, tanto la actividad  $\beta$  1-3 glucanasa (Figuras 8B y 12A) como la actividad POD (Figuras 10B y 14A) tuvieron sus mayores incrementos a la concentración más baja ( $0,1 \text{ g.L}^{-1}$ ) y este nivel enzimático se mantuvo o se redujo con el aumento de la concentración de la mezcla de oligoquitosanas. Mientras que los polímeros tuvieron sus mayores incrementos de actividad  $\beta$  1-3 glucanasa (Figuras 8B y 12A) y POD en la raíz (Figura 10B) a la concentración intermedia ( $1 \text{ g.L}^{-1}$ ).

El análisis del comportamiento enzimático como resultado del efecto de la concentración sobre los órganos directamente aplicados, debe hacerse tomando en cuenta la diferencia de MM entre OLG y los polímeros aplicados. La diferencia de inducción de actividad enzimática entre ambos compuestos parece estar relacionada

con la facilidad de acceso que tiene cada uno a los centros receptores y transmisores de la señal defensiva al nivel de la membrana plasmática y a la diferencia de percepción que ambos compuestos tengan en ella (Kauss *et al.*, 1989; Vander *et al.*, 1998; Shibuya y Minami, 2001). Esta afirmación será discutida más adelante.

Los resultados de este trabajo también muestran un incremento de la actividad  $\beta$  1-3 glucanasa y PAL por encima del control con los polímeros Q-63 y Q-88 cuando se aplicaron a la rizosfera de las plantas a la concentración más baja (Figuras 12B y 13B). Lo anterior demuestra un efecto inductor de la concentración más baja de los polímeros para la actividad de las dos enzimas. La causa de este comportamiento puede ser diversa y no está demostrada en el trabajo, pero queda claro de los resultados, que concentraciones mayores de los polímeros afectan la inducción de ambas enzimas pudiendo incluso, bajar los niveles enzimáticos significativamente por debajo del control, como se evidencia con Q-88 para la  $\beta$  1-3 glucanasa.

Las diferencias en el grado de acetilación entre los polímeros de quitosana influyó la respuesta de actividad enzimática PAL y POD en los órganos directamente aplicados con los polímeros, es decir, hojas y raíces aplicadas por aspersión foliar y vía raíz, respectivamente, algo similar a lo ocurrido para el efecto de la concentración entre OLG y polímeros.

La inducción de la actividad PAL fue mayor en hojas y raíces con el polímero más acetilado (Q-63) en comparación con el menos acetilado (Q-88) en las tres concentraciones evaluadas (Figuras 9B y 13A), mientras que la actividad POD estuvo por encima del control con las tres concentraciones con el polímero menos acetilado (Figura 10B y 14A). Lo anterior demuestra que en los órganos directamente aplicados ambas enzimas respondieron de forma contraria a la influencia del GrA de los polímeros.

Trabajos anteriores informaron que el aumento del GrA del polímero de quitosana hasta valores intermedios (35-40%) benefició la inducción de actividad PAL y POD en hojas de *Triticum aestivum* y suspensiones celulares de *Arabidopsis thaliana* (Vander *et al.*, 1998; Cabrera *et al.*, 2006), por lo que los resultados de esta tesis coinciden solo para el caso de la enzima PAL. Las diferencias pueden deberse tanto a la especie trabajada como al tipo de material biológico usado en el ensayo. Este trabajo de tesis

estudia, por primera vez, el efecto del GrA sobre plantas completas de tabaco en diferentes formas de entrada a la planta y se valora la posible influencia de las cubiertas de los órganos en la percepción de las características de la quitosana.

La determinación enzimática en hojas y raíces del experimento donde las quitosanas se aplicaron vía raíz, permitió conocer si el comportamiento enzimático inducido al nivel de la raíz se correspondía con el inducido al nivel de las hojas. El incremento de la actividad  $\beta$  1-3 glucanasa en las hojas de las plántulas tratadas de esta forma (Figura 8) no sigue el comportamiento observado en las raíces. Esto fue corroborado estadísticamente (Tabla 7), por tanto este resultado podría apoyar la idea de que el efecto de la concentración de los compuestos sobre la respuesta de la actividad  $\beta$  1-3 glucanasa al nivel local no necesariamente se transmite a otras partes de la planta.

El comportamiento de la actividad PAL en las raíces tampoco estuvo relacionado con el de las hojas de las plantas de tabaco tratadas vía raíz (Figura 9; Tabla 7); por lo que el efecto del grado de acetilación encontrado al nivel de las raíces no fue transmitido a las hojas de las plántulas. Tampoco se observó un efecto del GrA en las hojas con la adición de los compuestos a la rizosfera de las plantas (Figura 13B). Por lo anterior, se puede sugerir que la transducción de la señal defensiva en la planta de tabaco no transmite de forma sistémica el efecto causado por el GrA al nivel de la respuesta local para la actividad PAL.

Solamente el comportamiento de la actividad POD tuvo un carácter sistémico si se toma en cuenta el valor de correlación obtenido con el análisis estadístico (Tabla 7). Esto justifica el comportamiento sistémico de la influencia del GrA (Figura 10), ya que en ambos órganos hubo incrementos de actividad enzimática por encima del control con los tres tratamientos del polímero menos acetilado (Q-88). Lo anterior indica que una exposición directa y no prolongada de las raíces a los compuestos puede causar el mismo comportamiento de actividad POD del órgano tratado en otro órgano de la planta, cuya inducción es el resultado de la transducción sistémica de la señal defensiva.

Los resultados del efecto del GrA demuestran, por primera vez, que el comportamiento de componentes enzimáticos de la respuesta defensiva en plantas completas de tabaco puede estar modulado por este parámetro químico de las

quitosanas. La inducción defensiva en la planta por polímeros de quitosana es el resultado de la interacción de las cargas positivas de este con las cargas negativas expuestas al apoplasto por fosfolípidos de la membrana (Kauss *et al.*, 1989; Vander *et al.*, 1998; Shibuya y Minami, 2001) que causan cambios en la integridad de la misma y desencadenan la señalización defensiva hacia el núcleo celular (Zhao *et al.*, 2005); los resultados de este trabajo indican que en dependencia del nivel policationico del polímero ocurrirá una respuesta diferente cuantitativa y cualitativamente en componentes del sistema defensivo, lo cual podría explicar la resistencia de la planta contra patógenos, cuando es previamente tratada con quitosana.

Se puede sugerir entonces que un mayor carácter policationico del polímero (Q-88) debe causar una mayor interacción de cargas del polímero con la membrana que a su vez, aumente las afectaciones de los flujos iónicos a través de ella y por tanto incrementa la aparición de ROS y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, principales sustratos de la actividad POD encontrada (Figura 10 y 14A) y señales y componentes de la respuesta defensiva (Bindschedler *et al.*, 2006; García-Brugger *et al.*, 2006; Rouet *et al.*, 2006). Esta mayor interacción de cargas en la membrana y sus consecuencias podría ser negativa para la inducción de actividad PAL.

La inducción de las tres actividades enzimáticas fue influida también por las diferentes formas de aplicación de las quitosanas a las plantas. Como se explicó anteriormente, las determinaciones enzimáticas en los órganos directamente aplicados con los compuestos, permitió observar regularidades en las tres enzimas, relacionadas con el efecto de la concentración y del GrA de las quitosanas, sin embargo, la interacción indirecta de las plantas con los compuestos a través de las aplicaciones al sustrato, también mostró resultados interesantes.

La adición de quitosanas y oligoquitosanas a la rizosfera y al sustrato en el momento de la siembra causó la reducción de los niveles de actividad  $\beta$  1-3 glucanasa con varios de los tratamientos por debajo del control, algo que no ocurrió con las otras dos enzimas (Figura 12 B y C). No existen antecedentes en la literatura para explicar el comportamiento anterior, no obstante, si se toma en cuenta que las reducciones de actividad  $\beta$  1-3 glucanasa por debajo del control coinciden con los tratamientos de mayores incrementos de proteína para las dos mayores concentraciones de Q-88

aplicadas (Figura 11B y 12B), se podría atribuir el comportamiento de la actividad  $\beta$  1-3 glucanasa al resultado de un balance de energía y de la síntesis de precursores en la planta como respuesta a la inducción de algunos otros componentes involucrados con el sistema defensivo. El resultado enzimático y de acumulación de proteínas para la forma de adición al sustrato al momento de la siembra podría corroborar la idea de un balance de la síntesis de estructuras carbonadas, ya que la disminución de los niveles de proteína hasta valores basales (Figura 11C) con los mismos tratamientos de Q-88 (1 y 2.5 g.L<sup>-1</sup>) coincide con valores de actividad  $\beta$  1-3 glucanasa similares o algo mayores que el control (Figura 12C).

La resistencia inducida es un proceso activo y multicomponente que causa un importante gasto energético y dónde ocurre una intensa síntesis *de novo* de gran número de proteínas y enzimas que no están presentes hasta que ocurre la estimulación o se encuentran en niveles basales (Heil *et al.*, 2000; Walters y Boyle, 2005; van Loon *et al.*, 2006). Si se toma en cuenta que en los experimentos de esta tesis, las determinaciones enzimáticas y de proteínas se realizaron posterior a la estimulación con quitosanas y justo antes del reto con el patógeno, se podría sugerir que hasta este momento es posible obtener un balance en la distribución de estructuras carbonadas en la planta de tabaco mediante la reducción del nivel de algunas respuestas a favor del incremento de otros componentes de la resistencia inducida en la planta.

La reducción de actividad  $\beta$  1-3 glucanasa, más de tres veces por debajo del control, ocurrió con las mayores concentraciones del polímero menos acetilado (Figura 12B), por lo que este efecto pudiera estar vinculado al mayor carácter policationico de esta molécula (Q-88) respecto a las otras, como ya se explicó anteriormente. Una mayor presencia de cargas positivas interaccionando con la membrana citoplasmática (Kauss *et al.*, 1989; Shibuya y Minami, 2001), causado también por concentraciones más altas del polímero, puede provocar cambios en la integridad de la misma que activen diferente calidad de respuestas defensivas en relación con los otros compuestos, lo cuál, podría necesitar de un balance de energía y precursores en la planta, que conlleve a la reducción de algunas de las respuestas, en este caso la  $\beta$  1-3 glucanasa.

El comportamiento anterior varió grandemente cuando la misma aplicación se realizó en el momento de la siembra y la determinación enzimática se ejecutó a los 25 dds (Figura 12 C). El resultado demuestra que un contacto prolongado de las raíces de las plantas con los compuestos disminuye la afectación de los niveles enzimáticos de  $\beta$  1-3 glucanasa provocado por el polímero Q-88 a las mayores concentraciones en el ensayo de aplicación a la rizosfera de las plantas (Figura 12B), pero reduce los valores de actividad con la mezcla OLG por debajo del control.

No hay información previa en la literatura que compare el efecto de quitosanas de diferente MM sobre el comportamiento de inducción enzimática en interacción con la forma de aplicación de los compuestos. La explicación a este comportamiento puede estar relacionada con las diferencias de acceso de quitosanas de diferente MM a la membrana celular y las diferencias de percepción a ambos compuestos en la misma. Los oligosacáridos deben llegar con mayor facilidad que quitosanas polímero a la membrana debido a su menor MM y por tanto pueden necesitar una menor concentración para inducir sus efectos biológicos. Se debe tomar en consideración que en esta forma de aplicación las plantas crecen sobre el sustrato tratado con los compuestos, por lo que la presencia del inductor puede considerarse permanente.

Contrariamente la actividad PAL en esta forma de aplicación (Figura 13C), incrementa sus niveles en casi todos los tratamientos muy por encima de los valores absolutos obtenidos en todos los ensayos de este trabajo, especialmente con la concentración de  $1 \text{ g.L}^{-1}$ . Lo anterior demuestra un efecto de la concentración, de la forma de aplicación del compuesto a las plantas, así como del momento de detección de la actividad enzimática.

Las grandes diferencias entre los niveles de actividad PAL en los tratamientos de quitosana con relación al control para la forma de adición previo a la siembra pueden estar relacionadas con el comportamiento bifásico informado para esta enzima (Martínez *et al.*, 2001; Trotel-Aziz *et al.*, 2006). Estos autores informan que existe un primer pico de actividad menor, que para este estudio puede corresponder a los resultados de las primeras 72 horas (Figura 13B) (adición a la rizosfera de las plantas) y que está relacionado con la biosíntesis de ácido salicílico y un segundo pico de actividad mucho mayor y prolongado, que se encarga de reforzar las respuestas

defensivas en la planta, y que podría estar relacionado con los elevados niveles encontrados a los 25 días en las plantas tratadas en el momento de la siembra (Figura 13C). Este análisis debe ser demostrado en el futuro ya que el comportamiento bifásico antes informado fue experimentado en hojas de vid (*Vitis vinifera* L.) inducidas vía pecíolo con quitosana (Trotel-Aziz *et al.*, 2006), mientras que los resultados del presente trabajo se determinaron en hojas de plantas de tabaco cuyo sustrato fue aplicado con quitosanas de diferentes características por 72 horas e incluso 25 días después de sembradas. Resulta necesario estudiar una dinámica del comportamiento de esta enzima en tabaco bajo estas condiciones.

La actividad POD en las hojas de los dos ensayos de aplicación de los compuestos al sustrato no difirió del control en ningún tratamiento, excepto el polímero Q-63 a la mayor concentración añadido a la rizosfera. Si se comparan estos resultados con la inducción de POD en las hojas de las plantas aplicadas vía raíz, se puede concluir, que aunque en los tres casos los compuestos entran en contacto con la planta por la raíz, la actividad POD se afecta cuando ocurre un contacto prolongado de la interacción elicitor-sustrato-raíz. Se debe descartar que no exista interacción entre los compuestos y la raíz debido a impedimento estérico del propio sustrato, cuando se aplican a la rizosfera y al sustrato en la siembra, ya que la actividad  $\beta$  1-3 glucanasa y PAL, e incluso la POD con el polímero Q-63 (2,5 g.L<sup>-1</sup>) respondieron al tratamiento con inducción enzimática diferente del control.

No abunda literatura anterior (Paz-Lago *et al.*, 1999) que informe sobre el efecto en la actividad POD con la aplicación de quitosana y derivados al sustrato de las plantas, generalmente, los trabajos que han evaluado esta forma de aplicación lo han hecho solo para detectar posible protección contra patógenos (Benhamou *et al.*, 1994; Bautista-Baños *et al.*, 2006), por tanto, el comportamiento enzimático en la planta de tabaco mediante esta forma de aplicación de quitosana constituye una novedad de esta tesis.

Este trabajo demostró que la elicitación de plantas de tabaco con quitosana provoca incrementos de los niveles de proteínas y enzimas defensivas en la planta previo a la interacción con el patógeno, algo que no necesariamente ocurre cuando se realizan pre-tratamientos de las plantas con elicitores, ya que se ha demostrado que plantas

pre-tratadas con elicitores pueden no inducir ni aumentar los niveles defensivos hasta que un segundo estímulo, fundamentalmente la presencia de un patógeno dispara la respuesta defensiva (Heil y Bostock, 2002; Walters y Boyle, 2005). Es posible que los incrementos enzimáticos inducidos por la quitosana en tabaco y detectados en este trabajo, se eleven aún más cuando la planta interactúe posteriormente con el patógeno, como ha sido ya demostrado con otras especies y elicitores (Schenk *et al.*, 2003; Walters y Boyle, 2005).

En este trabajo se demuestra la protección de plántulas de tabaco con quitosana y sus derivados contra la infección vía raíz del patógeno *Phytophthora nicotianae* a escala de bioensayo. Este es un resultado novedoso que puede contribuir en la lucha contra este patógeno.

La protección encontrada en las plantas de tabaco contra la infección por *P. nicotianae* es el resultado de la estimulación de resistencia sistémica inducida en la planta y no como resultado de la actividad antimicrobiana directa que estos compuestos tienen sobre este patógeno. Tal afirmación es posible si se tiene en cuenta la forma de aplicación de los compuestos de quitosana: Aspersión foliar de las plántulas, adición a la rizosfera y adición al sustrato previo a la siembra, y el posterior bioensayo realizado al llevar a cabo el proceso de interacción con *P. nicotianae* (reto), donde la planta se pone en contacto con el patógeno vía raíz fuera del sustrato de crecimiento (ver Materiales y métodos, epígrafe 3.2.1). Este bioensayo permitió separar el efecto antimicrobiano intrínseco de la quitosana del efecto de inducción de resistencia en la planta y dejó que se manifestara solamente este último, debido a que el compuesto de quitosana nunca estuvo en contacto con el microorganismo. Por tanto, la protección demostrada con el bioensayo se debió, únicamente, a la activación de resistencia inducida en la planta contra *P. nicotianae*.

Se puede descartar un posible movimiento de la quitosana a través de los haces conductores de la planta, ya que se conoce que los receptores de la acción de estos compuestos, como del resto de las oligosacarinas conocidas, se encuentran al nivel de la membrana plasmática y es conocida la transmisión y posterior amplificación de la respuesta defensiva a las células adyacentes (Shibuya y Minami, 2001; Shibuya *et al.*, 2002; Zhao *et al.*, 2005). Además, fue demostrado con anterioridad la imposibilidad

de traslocación en la planta de oligosacarinas de GrP intermedio y alto (Baydoun y Fry, 1985).

Tanto los resultados de inducción de indicadores defensivos como la inducción de resistencia demuestran el comportamiento elicitor que los compuestos de quitosana empleados tienen sobre plántulas de tabaco. En realidad no son muchos los informes, y más bien recientes, concernientes a la protección con quitosana de cultivos contra sus patógenos, donde la protección observada sea solo el producto de la inducción de resistencia local y sistémica en la planta (Molloy *et al.*, 2004; Sharathchandra *et al.*, 2004; Trotel-Aziz *et al.*, 2006). En la mayoría de los casos consultados la actividad antifúngica es la principal responsable de la protección observada en la planta (Bautista-Baños *et al.*, 2003; Ben-Shalom *et al.*, 2003) o la inducción de resistencia en la planta no fue suficiente para su protección contra la infección (Romanazzi *et al.*, 2002; Ben-Shalom *et al.*, 2003; Molloy *et al.*, 2004).

La inducción sistémica de la señal defensiva quedó también demostrada en el bioensayo de activación de respuestas enzimáticas mediante aplicación de los compuestos vía raíz, ya que se obtuvieron diferencias estadísticas entre los tratamientos y el control en la hojas de las plántulas con más del doble de la actividad del control en algunos tratamientos (Figuras 8, 9 y 10).

El trabajo demuestra que tanto la activación de respuestas defensivas en la planta como la inducción de resistencia contra *P. nicotianae* son posibles mediante diferentes formas de aplicación de los elicitores de quitosana a las plántulas y que estas formas influyen los niveles de resistencia obtenidos (epígrafe 4.2.3). Las formas de aplicación de quitosanas a las plántulas evaluadas en esta tesis (aspersión foliar, inmersión de semillas, adición a la rizosfera de las plantas y adición al sustrato previo a la siembra) fueron seleccionadas de resultados anteriores de protección con otras especies de plantas y patógenos (El Ghaouth *et al.*, 1997; Cheah y Page, 1997; Bell *et al.*, 1998; Benhamou *et al.*, 1998; Sharathchandra *et al.*, 2004; Walker *et al.*, 2004).

La estimulación de resistencia inducida en las plántulas con los compuestos de quitosana, mediante diferentes formas de aplicación, demostró las potencialidades de este polímero y sus derivados en la protección del tabaco contra infecciones con *P. nicotianae*. Con la aplicación por aspersión foliar de los compuestos se obtuvo la

mayor protección (Tablas 5 y 8) entre las diferentes formas de aplicación empleadas, lo que sugiere una mejor percepción y/o transmisión de la señal defensiva que culmina en la activación de resistencia contra el patógeno en toda la planta.

La diferencia en los niveles de resistencia encontrados en las plantas con las distintas formas de aplicación muestra una percepción diferencial de los compuestos entre hojas y raíces que puede tener diferentes causas. La adición de los compuestos al sustrato de las plantas o previo a la siembra puede interferir el acceso directo del compuesto activo a las raíces en comparación con la aspersión foliar, debido a que la aplicación no es directamente en las raíces sino que existe la interferencia del propio sustrato. Otra causa podría estar relacionada con las diferencias en capacidad metabólica y de respuesta a estímulos entre ambos órganos que deben influir también en la respuesta observada. Las características anatómico-fisiológicas de ambos órganos justificarían un menor paso a través de las hojas que se caracterizan por tener cutículas. No obstante, al ser la hoja un órgano metabólicamente muy activo, podría tener una respuesta más pronta y definida a la percepción de compuestos que pueden actuar como elicitores y a su transducción defensiva.

Lo anterior podría justificar los resultados obtenidos de mayores niveles de resistencia contra *P. nicotianae* y de activación de algunas enzimas defensivas (epígrafe 4.2.3, Tabla 8), así como una clara respuesta a la influencia del grado de acetilación de la quitosana sobre la actividad PAL y POD (Figura 13 A y 14 A), cuando se utilizó la aspersión foliar.

Los tratamientos con compuestos de quitosana de diferente masa molar mostraron importantes resultados de protección en dependencia de la forma de aplicación. Algunos autores han estudiado cómo influye la disminución de la MM de la quitosana en la protección de los cultivos contra otros patógenos. De forma general se ha informado que la degradación del polímero de quitosana beneficia la protección de las plantas contra el ataque de patógenos fúngicos y virales (Struszczyk *et al.*, 1999; Molloy *et al.*, 2004), sin embargo, también se ha descrito la protección de frutos de tomate contra la pudrición causada por el hongo *Rhizopus* independientemente de la MM del compuesto de quitosana utilizado (Bautista-Baños y Bravo-Luna, 2004).

En tabaco no se había estudiado el efecto de la diferencia de masa molar de la quitosana sobre la inducción de resistencia en la planta contra patógenos. Sólo recientemente, se demostró que una mezcla de oligosacáridos de quitosana (GrP 3-9) provocó una alta actividad antiviral contra TMV cuando se asperjó en hojas de tabaco (Zhao *et al.*, 2007a). Este trabajo estudia por primera vez el efecto de quitosana polímero, parcialmente hidrolizada y de oligoquitosanas (GrP 5-9) en la inducción de resistencia en tabaco contra un patógeno del grupo de los Oomycetes.

En todos los casos donde se obtuvo diferencias de resistencia en las plantas contra *P. nicotianae* entre los derivados de menor masa molar y sus polímeros de origen (Tablas 4, 8, 10, 12), esta diferencia fue más dependiente de la concentración y de la forma de aplicación del compuesto, por lo que se puede considerar que la respuesta de resistencia contra *P. nicotianae* en tabaco puede abarcar un rango amplio de masas molares de quitosana.

Lo anterior puede estar relacionado también, como en el caso del comportamiento enzimático, con la percepción de ambos compuestos al nivel de la membrana plasmática, dónde se encuentra el primer punto de detección de la actividad inductora de resistencia y dónde se desencadenan los eventos de transducción de la señal defensiva. Hay diferencias de recepción de la señal inductora en la membrana para oligoquitosanas y polímeros de quitosana (Kauss *et al.*, 1989; Shibuya y Minami, 2001) relacionada con la presencia de receptores independientes, sin embargo, ya que a diferencia de trabajos anteriores el estudio se realiza sobre plantas completas, debe tomarse en cuenta además, la influencia de la MM de los compuestos en el paso a través de las cubiertas de la planta hasta su arribo a las zonas de percepción en la membrana celular.

Las respuestas fisiológicas defensivas en la planta, provocadas por la diferencia de MM de las quitosanas deben estar relacionadas con dos causas fundamentales. En primer lugar la diferencia de masa molar entre polímeros y oligómeros debe afectar el paso de los mismos a través de las cutículas de las hojas ya que la movilidad de los solutos a través de este órgano decrece exponencialmente con el incremento de los volúmenes molares (Buchholz, 2006), esto justificaría que la mezcla OLG pase más fácilmente a través de la cutícula y necesite una menor concentración para inducir

incrementos de actividad enzimática, sin embargo, esto solo justifica la respuesta de aspersión foliar para la  $\beta$  1-3 glucanasa, ya que las otras enzimas están más claramente influidas por el grado de acetilación (Figuras 12A, 13A y 14A).

La segunda causa se apoya en la idea especulada por otros autores de que la inducción de respuestas defensivas en las plantas por polímeros de quitosana responde a la percepción de estas macromoléculas en la membrana celular no a través de un receptor concreto para el polímero, sino que esto ocurre como resultado de la interacción de las cargas positivas de éste con los fosfolípidos negativamente cargados de la membrana, que desencadenan cambios en la integridad y permeabilidad de la misma que conducen a la activación y transducción de la señal defensiva (Kauss *et al.*, 1989; Vander *et al.*, 1998; Shibuya y Minami, 2001).

Por otro lado, se conoce la presencia de receptores específicos en la membrana para oligoquitinas (Shibuya y Minami, 2001; Shibuya *et al.*, 2002; Zhao *et al.*, 2005), sin embargo, esto no había sido igualmente informado para oligoquitosanas parcial o totalmente desacetiladas, como es el caso de OLG. Recientemente, se demostró la interacción específica entre oligoquitosanas (GrP= 3-9) y la membrana y pared celular de células epidérmicas de tabaco (Zhao *et al.*, 2007b). Se informó que la unión de las oligoquitosanas a la membrana no era iónica, mientras que sí lo era la interacción con la pared celular, lo anterior sugiere un posible candidato receptor en la membrana para oligoquitosanas responsable de la señalización defensiva hacia el interior celular. La demostración o no de receptores de oligoquitosanas en la membrana de células epidérmicas es un tema de gran actualidad.

Lo discutido hasta ahora indica que, tanto la diferencia de receptores para polímeros y oligómeros, como la diferencia de MM entre ambos compuestos deben afectar la concentración necesaria de cada uno para activar la respuesta defensiva en la membrana, todo lo cual, debe influir en calidad, en cantidad y en duración la subsiguiente respuesta defensiva que generará la planta. De esta forma, se puede sugerir que la disminución de la actividad POD en los órganos directamente elicitados con el aumento de la concentración, para el caso de OLG, puede deberse a un efecto de retroalimentación negativa que reduce el nivel de respuesta de la enzima como resultado de un arribo excesivo de oligosacáridos a los receptores de membrana,

mientras que el aumento de la actividad enzimática a mayores concentraciones (1 g.L<sup>-1</sup>) del polímero Q-88 puede deberse a un menor arribo del compuesto activo a sus receptores de membrana por su mayor MM que justifique la necesidad de aumentar las concentraciones del compuesto para lograr mayores niveles de actividad enzimática.

La necesidad de una mayor concentración para el polímero tiene que ver con la dificultad de su paso a través de las cutículas, pero también a su posible estancamiento por interacción electrostática con la propia pared celular (Zhao *et al.*, 2007b); sin embargo, no se puede descartar la posibilidad de una degradación del polímero de quitosana por enzimas de origen vegetal una vez que estas moléculas interactúan con los diferentes órganos de la planta. Esto es probable que ocurra por la presencia extracelular de quitinasas (Collinge *et al.*, 1993) y posiblemente quitosanas (Grenier y Asselin, 1990) en tejidos de plantas, que como se mencionó, podría causar degradación a nivel de la pared y el apoplasto de los polímeros que logren alcanzar este espacio. El enlace glucosídico de la quitosana, incluso en moléculas con cierto grado de acetilación, es susceptible a la degradación con varias clases de enzimas como lipasas, pectinasas, celulasas y hasta proteasas (Pantaleone *et al.*, 1979; Shin-Yaa *et al.*, 2001; Kittur *et al.*, 2003).

Por lo anterior, se puede pensar que una vez que los polímeros de quitosana atraviesan las cutículas de la planta o penetran por los estomas, pueden ser enzimáticamente hidrolizados en el apoplasto de las células epidérmicas, en fragmentos con diferentes características físico-químicas que pueden repercutir tanto en la activación defensiva en la membrana de la célula vegetal (sea a través o no de receptores de la misma) como sobre la duración de dicha activación defensiva. El conocimiento preciso de lo que ocurre entre el polímero de quitosana y la membrana de las células vegetales está por estudiarse y constituye un aspecto de gran interés en la comunidad científica internacional.

Un análisis de los resultados de este trabajo y de lo informado por la literatura científica actual permite proponer un modelo de cómo ocurriría la inducción por quitosana de resistencia en tabaco contra patógenos. En primer lugar se conoce que las células epidérmicas de las hojas de las plantas son capaces de percibir elicitores de

quitosana (Ben Shalom *et al.*, 2003; Ait Barka *et al.*, 2004; Sharathchandra *et al.*, 2004), ya sea por acción de receptores o por interacción de componentes de sus membranas con las cargas positivas del elicitador (Shibuya y Minami, 2001). Los resultados de esta tesis demuestran que esto también ocurre en las hojas de *Nicotiana tabacum* (epígrafe 4.2.3).

Los primeros eventos después del reconocimiento de oligosacarinas por la membrana celular son la despolarización de la misma, como resultado de la ocurrencia de alteraciones en los flujos iónicos a través de ella y la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Shibuya y Minami, 2001; Aziz-Aziz *et al.*, 2003; Aziz-Aziz *et al.*, 2004; García-Brugger *et al.*, 2006). En células de tabaco ocurren rápidos cambios del potencial de membrana debido a la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{H}^+$  y salida de  $\text{K}^+$  y  $\text{Cl}^-$  lo que provoca la acidificación del citoplasma y la alcalinización de la zona extracelular (Shibuya y Minami, 2001, García-Brugger *et al.*, 2006). Este proceso está regulado por la acción de proteínas quinasas y fosfatasas, en eventos de fosforilación y desfosforilación una vez percibido el elicitador en la membrana (Mathieu *et al.*, 1996; García-Brugger *et al.*, 2006).

La actividad POD encontrada en este trabajo, principalmente en las plantas que recibieron aspersión foliar y aplicación vía raíz de los compuestos sugiere la aparición e incremento de ROS local y sistémico en las primeras 72 horas y como resultado del tratamiento de las plantas con los elicitores (Figuras 10 y 14A). Trabajando con suspensiones celulares, se ha informado el influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  en células de tabaco como resultado de la aplicación de oligosacáridos de quitina y quitosana en estrecha relación con la producción de ROS que eventualmente devienen  $\text{H}_2\text{O}_2$  por acción de peroxidasas activadas por la alcalinidad extracelular y que provocan la elevación de los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (Kawano *et al.*, 1999; Bolwell, 2007). Resultados recientes demuestran que la actividad POD es activada desde momentos muy tempranos de la respuesta defensiva por su papel cardinal en la formación y metabolismo de los ROS, lo que apoya tanto una función reguladora de la señal defensiva como de protección celular a los efectos deletéreos que puedan causar altos niveles de ROS (Bindschedler *et al.*, 2006; Davies *et al.*, 2006; Rouet *et al.*, 2006; Torres *et al.*, 2006).

Tanto los ROS como el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, que se mueve libremente a través de la membrana plasmática, juegan un importante papel como señales para la activación defensiva y por su acción tóxica directa sobre microorganismos (Resende *et al.*, 2003; Torres *et al.*, 2006), lo cuál es esencial para el control de patógenos que avanzan por el apoplasto. Es conocida la inducción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en células de tabaco como resultado de la interacción incompatible de esta planta con *P. nicotianae* (Able *et al.*, 2000), por lo que el incremento de esta molécula o de actividad enzimática (POD) conducente a su formación como resultado del tratamiento previo con elicitores de quitosana puede indicar transducción defensiva y/o un estado de resistencia en la planta.

En *Nicotiana tabacum*, la acidificación del citoplasma provoca la activación rápida y transiente de enzimas MAP-Kinasas (Zhang *et al.*, 1998; Shibuya y Minami, 2001) y la inducción de actividad PAL (Lapous *et al.*, 1998; Shibuya y Minami, 2001). La rápida inducción de actividad PAL en relación directa con una temprana activación de proteínas MAP-Kinasas ha sido previamente demostrada en tabaco (Chen *et al.*, 2005).

Ambas respuestas están, a su vez, vinculadas a la señalización sinérgica y/o antagónica de las rutas del ácido jasmónico (AJ)/etileno y del ácido salicílico (AS) (Niki *et al.*, 1998; van Wees *et al.*, 2000; Heil y Bostock, 2002), que son las responsables esenciales de la activación defensiva en la planta. En el modelo que se propone en el sistema planta-patógeno *Nicotiana tabacum-Phytophthora nicotianae*, estas rutas defensivas deben estar plenamente activadas, si se tiene en cuenta los elevados niveles de respuesta PAL detectados con varios tratamientos de quitosana en las diferentes formas de aplicación y su estrecha vinculación con la resistencia obtenida en las plántulas contra el patógeno (Tablas 9, 11 y 13). Se ha planteado que cualquier factor que provoque la despolarización de las membranas, la acumulación interna de Ca<sup>2+</sup> y la elevación del nivel de ROS debe repercutir en la activación parcial o total de ambas rutas defensivas (Heil y Bostock, 2002).

En el caso particular del tabaco es posible que las rutas del AJ/Etileno y del AS actúen de forma sinérgica o cooperada frente a algunos patógenos (van Loon *et al.*, 2006). Los rápidos y sostenidos incrementos en la vía de los fenil-propanoides (Blount *et al.*, 2000), claramente corroborados con los resultados de este trabajo, unido a evidencias

como la disminución en la resistencia del tabaco contra *P. nicotianae* cuando se afectan intermediarios de la formación del AJ (Rancé *et al.*, 1998) o cuando se afectan la expresión de genes PAL en la planta (Way *et al.*, 2002) apoyan la hipótesis de la activación sinérgica de ambas vías en la inducción de resistencia en tabaco contra *P. nicotianae*.

Los incrementos de actividad PAL y su vinculación con la reducción del índice de infección en las plántulas (Tablas 9, 11 y 13) justifica además, la transmisión de la señal defensiva hacia las células adyacentes e incluso a otros órganos de la planta, ya que este hecho está vinculado a una rápida respuesta en la vía de los fenil propanoides que eleve el nivel de AS tanto en las células elicidadas como en las adyacentes (Ogawa *et al.*, 2006), previa difusión de una señal sistémica entre las células y entre órganos de la planta que aún no es conocida para la resistencia sistémica inducida (Heil y Bostock, 2002).

De acuerdo al análisis de regresión múltiple realizado en el trabajo se pudo conocer la contribución de cada sistema enzimático evaluado a la reducción del índice de infección de las plantas. A las 72 horas de aplicados los tratamientos, tanto por aspersión foliar, como por adición a la rizosfera, la PAL fue la principal enzima vinculada a la resistencia de las plántulas contra *P. nicotianae*, por lo que podrían ser esenciales en la protección del tabaco contra este patógeno, las defensas sintetizadas por la vía de los fenil-propanoides, tales como la síntesis de ácidos cumáricos, el ácido clorogénico y la síntesis de ligninas, a partir de la condensación de alcoholes derivados de los ácidos cumárico, ferúlico y sinápico (Blount *et al.*, 2000; Dixon *et al.*, 2002). Los compuestos del metabolismo secundario mencionados actúan como antibióticos y barreras tóxicas contra la entrada de patógenos y han sido informados en tabaco como respuestas defensivas al ataque de oomycetes (Blount *et al.*, 2000; Dixon *et al.*, 2002). De hecho, se informó la reducción de los síntomas de la infección con *P. nicotianae* en plantas de tabaco cuando se clonó de forma constitutiva un gen de PAL en la planta (Way *et al.*, 2002).

Incluso, en la forma de aplicación por adición al sustrato al momento de la siembra, determinado a los 25 dds de aplicados los tratamientos, un análisis de regresión con la eliminación de la influencia de la variable POD, que por demás, no fue diferente del

control en este ensayo, mostró como significativo (-0,689) el coeficiente para la variable PAL (Tabla 13) en relación inversa con el índice de infección, aunque para esta forma de aplicación su contribución a la reducción de la infección no fue importante debido a un bajo porcentaje de influencia de las variables enzimáticas sobre la variable índice de infección ( $R^2= 0,36$ ).

Lo antes mencionado demuestra que la actividad enzimática PAL, de las tres evaluadas, fue la de mayor contribución a la resistencia de las plántulas contra *P. nicotianae* en las tres formas de aplicación probadas. Esto no significa que las otras dos enzimas e incluso otras respuestas defensivas no evaluadas en este trabajo no tengan un papel en la resistencia contra este patógeno, ya que es conocido que la resistencia inducida en las plantas es una respuesta multicomponente que se encarga de elevar la resistencia basal u horizontal de la planta más allá de los niveles basales (Klarzynski y Fritig, 2001; Heil y Bostock, 2002; van Loon y Bakker, 2005). Sin embargo, esto tampoco descarta que haya respuestas defensivas específicas con una mayor relevancia que otras en determinadas especies de plantas y contra algún patógeno en concreto (Way *et al.*, 2002; Funnell *et al.*, 2004).

En la forma de aplicación por aspersión foliar de los compuestos, además de la PAL, la actividad  $\beta$  1-3 glucanasa también tuvo un coeficiente de regresión lineal significativo, aunque menor que el de la primera (Tabla 9). La contribución de ambas enzimas a la resistencia de las plántulas puede haber sido la causa de que esta forma de aplicación presentara los mayores niveles de protección encontrados contra el patógeno (Tabla 8) entre las tres formas de aplicación probadas. Con anterioridad, se informó la inducción de enzimas y la expresión de genes de  $\beta$  1-3 glucanasas en tabaco en respuesta al ataque de microorganismos del grupo de los oomycetes (Ye *et al.*, 1990; Funnell *et al.*, 2004), donde se incluyen *P. nicotianae* y los principales patógenos del tabaco.

Los resultados enzimáticos de esta tesis abren la perspectiva de un estudio isoenzimático de los indicadores estudiados, ya que además de la relevancia en los incrementos de los niveles de actividad, es importante conocer si existen variaciones en la calidad enzimática de la respuesta, es decir, cuáles isoenzimas de los indicadores evaluados se incrementan o reducen como resultado de la elicitación con quitosana,

tomando en cuenta que se conoce que diferentes grupos de isoenzimas (por ejemplo PODs) están implicadas en respuestas defensivas del tabaco contra patógenos (Mäder y Amberg-Fisher, 1982), incluyendo los oomycetes (Ye *et al.*, 1990).

El peso de la actividad POD en la reducción de la infección en tabaco en estos experimentos puede estar enmascarado como resultado de la propia multifuncionalidad de esta enzima en la inducción de resistencia contra patógenos y por la acción de otras peroxidases no determinadas en este trabajo encargadas de reducir los niveles de  $H_2O_2$  y de regular la homeostasis de ROS en las células de la planta (Resende *et al.*, 2003; Passardi *et al.*, 2005).

Debido a la amplia especificidad de las POD conocidas como guaiacol peroxidases, estas podrían estar vinculadas a dos procesos fundamentales relacionados con la interacción con patógenos. Primeramente, pueden participar de la producción temprana de  $H_2O_2$  extracelular a través de PODs de la pared celular que se activan como resultado del ataque por patógenos o la alcalinización del apoplasto o en este caso por la aplicación de elicitores de quitosana que igualmente causan alcalinización apoplástica (Davies *et al.*, 2006; Bindschedler *et al.*, 2006; Rouet *et al.*, 2006). En tabaco también se ha informado que grupos de PODs de la pared celular pueden ser responsables adicionales en la biosíntesis de ligninas y del entrecruzamiento de glicoproteínas de la pared con los ácidos ferúlicos asociados a las pectinas (Mäder y Amberg-Fisher, 1982; Passardi *et al.*, 2005). Ambas funciones provocan el refuerzo de la pared celular contra la entrada de patógenos (Resende *et al.*, 2003). Indirectamente, la propia producción y regulación de cantidades subletales de  $H_2O_2$  puede provocar una inducción defensiva en tabaco que conlleve al incremento de su tolerancia contra patógenos (Chamnongpol *et al.*, 1998).

Las actividades enzimáticas evaluadas incrementaron sus niveles en hojas y raíces de las plantas por acción de los tratamientos con quitosanas y sus derivados. Este efecto inductor estuvo influido por el tipo de quitosana, las concentraciones en que fueron aplicados, las formas de aplicación a las plantas que se utilizaron y por características intrínsecas de los compuestos como el grado de acetilación. Sin embargo, las tres actividades enzimáticas no fueron activadas por igual como resultado de los factores antes mencionados, sino que la inducción varió con cada una.

A modo de resumen, quitosanas de diferente MM causaron incrementos de actividad enzimática cuyos máximos se alcanzaron con 1 g.L<sup>-1</sup> con los polímeros y desde 0.1 g.L<sup>-1</sup> con los oligómeros en los órganos que fueron directamente aplicados, excepto cuando se impuso el efecto del GrA. Este efecto de la concentración se reflejó también en la protección contra *P. nicotianae* en la forma de aspersión foliar de las quitosanas. El GrA de los polímeros influyó la respuesta PAL y POD de forma contraria entre ellas en los órganos directamente aplicados y provocando, el polímero de mayor GrA, la mayor protección contra el patógeno, debido a que causó la mayor inducción de actividad PAL, variable enzimática que estuvo inversamente relacionada con el índice de infección. Cuando la aplicación de quitosanas se hizo al sustrato los dos polímeros causaron la mayor inducción de actividad PAL (0.1 g.L<sup>-1</sup>) y estos tratamientos causaron la mayor protección de las plantas contra *P. nicotianae*.

Con independencia de las influencias antes mencionadas y demostradas con diferentes resultados de la tesis, las variaciones en los niveles enzimáticos pueden además, estar relacionados con el costo energético y de precursores que causa en la planta el desvío de recursos de actividades importantes como el crecimiento hacia la actividad de inducción de resistencia y la necesidad de mantener un balance energético que no afecte actividades primarias de la planta (Walters y Boyle, 2005).

Varios autores han informado que por ser la resistencia inducida una forma de manifestación defensiva que se expresa en toda o la mayor parte de la planta en anticipación a un futuro ataque de patógenos, esta expresión puede resultar en un costo adicional para la planta (Hammerschmidt, 2005; Walters y Boyle, 2005). Existen evidencias de que el crecimiento y los rendimientos de algunas especies de plantas se han visto afectados cuando son previamente pre-tratadas con elicitores (Heil *et al.*, 2000; Zavala *et al.*, 2004).

Si las respuestas defensivas envueltas en la protección de la planta contra subsecuentes infecciones fueran las únicas que se expresaran durante la inducción o pre-tratamiento, quizás no sería necesario analizar su efecto sobre el crecimiento y la productividad de la planta, sin embargo, se ha demostrado en diferentes sistemas planta-patógeno, que se expresan otras proteínas y defensas tanto después del pre-tratamiento, como en el reto posterior con patógenos (Hammerschmidt, 2005;

Walters y Boyle, 2005). Los resultados de este trabajo podrían apuntar a favor de la idea anterior, ya que se obtuvieron importantes incrementos de proteínas con los tratamientos de quitosana en el experimento con diferentes formas de aplicación, que en varios de los tratamientos duplicaron los niveles del control (Figura 11).

En el ensayo de adición de los compuestos al sustrato al momento de la siembra, aunque no fue objeto de esta tesis, no se observó afectación del crecimiento de las plantas entre los tratamientos a los 25 dds, momento en que se determinaron las actividades enzimáticas y se ejecutó el ensayo de resistencia contra el patógeno. Por tanto, se podría sugerir que se obtuvo una inducción defensiva y de resistencia contra *P. nicotianae* en las plantas sin afectar su crecimiento, lo que implica que la inducción no significó un gasto energético elevado en la planta como para afectar este proceso. Con anterioridad varios autores informaron de la protección de algunos cultivos mediante la inducción de resistencia con elicitores (no oligosacarinas) sin causar afectaciones en el crecimiento y los rendimientos del cultivo, sobretodo si las condiciones ambientales y la disponibilidad de nutrientes eran favorables al cultivo (Hammerschmidt, 2005; Iriti y Faoro, 2003; Walters y Boyle, 2005).

Si se toma en cuenta el análisis de regresión múltiple realizado en el experimento de formas de aplicación, se podría considerar que las plantas de tabaco pudieron haber realizado un balance de precursores y por tanto de energía después de tratadas con los inductores a costa de aumentar los niveles de actividad de determinada enzima con la reducción de los niveles de otras (Tablas 9, 11 y 13). En la aspersion foliar, por ejemplo, los dos valores mayores de actividad POD ocurrieron con el polímero Q-88 a 1 y 2,5 g.L<sup>-1</sup> y corresponden a valores no significativos de actividad PAL (1 g.L<sup>-1</sup>) y glucanasa (2,5 g.L<sup>-1</sup>), respectivamente. A su vez, en el ensayo de adición de los elicitores previo a la siembra, que fue donde los compuestos pudieron tener un mayor efecto sobre el crecimiento de las plántulas, ya que crecieron bajo la influencia de los compuestos en el sustrato, los mayores valores de actividad PAL (Q-63 y Q-88 1 g.L<sup>-1</sup>) corresponden con valores no significativos o estadísticamente por debajo del control de POD y glucanasa (Figuras 12c, 13c y 14c).

De lo anterior, se podría pensar que las plantas de tabaco pre-tratadas con compuestos de quitosana son capaces de inducir resistencia sistémica contra *P.*

*nicotianae* y mantener un balance energético que no comprometa otros procesos esenciales en la planta como el crecimiento. La relación entre el gasto de precursores y energía y la protección de la planta estaría dada por la regulación del aumento de determinadas respuestas defensivas a costa de la reducción de otras. De esta forma, los incrementos de actividad PAL parecen esenciales en la resistencia del tabaco contra *P. nicotianae* tanto en la respuesta inmediata, local y sistémica, como en el mantenimiento temporal de esta resistencia, por lo que los mayores incrementos de esta enzima en el experimento de aplicación al sustrato previo a la siembra pueden estar vinculados a la reducción de los niveles de actividad  $\beta$  1-3 glucanasa y POD obtenidos (Figuras 12c, 13c y 14c).

### **5.3 Consideraciones finales de la tesis**

En esta tesis se demostraron las potencialidades de diferentes quitosanas en la protección del tabaco contra *Phytophthora nicotianae*. En la primera parte se estudió la capacidad de cada compuesto para inhibir directamente el crecimiento y la viabilidad de este patógeno, mientras que en la segunda se demostró la capacidad de estos compuestos para inducir respuestas de resistencia en la planta contra este patógeno. Ambas formas de acción biológica pueden ponerse de manifiesto en la interacción natural de *P. nicotianae*-tabaco cuando se apliquen quitosanas.

La inclusión de la quitosana en la interacción compatible del tabaco (*N. tabacum* L.), variedad Corojo, con *P. nicotianae* permitió corroborar que las Oligosacarinas son capaces de activar resistencia sistémica inducida en plantas susceptibles contra sus patógenos, un principio de la activación de resistencia inducida con elicitores (Kùc, 2000). Por lo anterior, un requisito de la tesis fue trabajar con una variedad de tabaco susceptible y un aislado de *P. nicotianae* virulento a dicha variedad (Toledo, 2001, 2002 y 2008) que permitiera demostrar las potencialidades de las quitosanas para activar resistencia inducida.

Corojo, otrora una importante variedad comercial de tabaco en Cuba por sus altos rendimientos y gran calidad de sus hojas, dejó de sembrarse comercialmente hace algo más de 10 años (Cigar Envy, 2006) por la creciente susceptibilidad a varios oomycetes, principalmente, *Peronospora hyoscyamym* fsp. *tabacina* y *Phytophthora*

*nicotianae* y por la aparición de nuevas variedades comerciales menos susceptibles y resistentes a éste y a otros patógenos, que en varios casos son descendientes por cruzamientos de la variedad Corojo (Espino, 2006; Toledo, 2008). La utilización de quitosanas dentro del manejo integrado del cultivo del tabaco podría permitir la valoración del rescate de esta variedad de gran interés comercial internacional (Cigar Envy, 2006).

Además de lo dicho, los resultados de esta tesis permiten asumir que en condiciones naturales del cultivo del tabaco se pueden aprovechar las ventajas de las características intrínsecas de cada compuesto de quitosana para lograr un alto nivel de protección del cultivo contra *P. nicotianae* e incluso, otros patógenos, si se toma en cuenta además, lo informado por varios autores en otras especies que son potencialmente patógenas del tabaco (Rabea *et al.*, 2003; Bautista-Baños *et al.*, 2006; Zhao *et al.*, 2007a).

La utilización de elicitores con las características físico-químicas adecuadas y la combinación de diferentes formas y momentos de aplicación de estos compuestos de quitosana deben provocar tanto una reducción de los niveles de microorganismos patógenos en la rizosfera de las plántulas por acción antimicrobiana directa, como la inducción de resistencia sistémica en la planta en una estrategia defensiva que evite por igual la entrada de inóculos de patógenos foliares y del suelo.

## VI- Conclusiones

1. Los compuestos de quitosana Q-63, Q-88, HQ-24 y OLG incrementan la protección de plantas de tabaco, variedad Corojo en edad de semillero, contra el ataque de *Phytophthora nicotianae* mediante activación de resistencia inducida, lo que demuestra la capacidad elicitora de estos compuestos en una variedad susceptible a este patógeno.
2. El grado de acetilación, la masa molar, la concentración y el tiempo de incubación de las quitosanas con las zoosporas, determinan el nivel de la inhibición del crecimiento del micelio y la viabilidad de zoosporas de *Phytophthora nicotianae*.
3. La inducción de la actividad  $\beta$  1-3 glucanasa, fenil-alanina amonioliasa y peroxidasa en plantas de tabaco, dependió de la concentración, el grado de acetilación, la masa molar de las quitosanas evaluadas y de la forma en que estos compuestos fueron aplicados a las plantas, lo cual indica que las variables mencionadas modulan el nivel de las respuestas defensivas a través de una posible percepción diferencial de estas por la planta.
4. La reducción del índice de infección de *P. nicotianae* en las plantas de tabaco estuvo inversamente relacionado con el valor de actividad fenil-alanina amonioliasa en los tejidos de las hojas, con las formas de aplicación de los compuestos de quitosana por aspersión foliar y adición a la rizosfera y también a la actividad  $\beta$  1-3 glucanasa cuando la aplicación se realizó por aspersión foliar, lo que evidencia la importancia de ambas respuestas defensivas y de la forma de aplicación por aspersión foliar en la inducción de resistencia del tabaco por quitosanas, contra *Phytophthora nicotianae*.

## VII- Recomendaciones

1. Profundizar en el estudio de los mecanismos involucrados en el modo de acción de las quitosanas en la inhibición de los diferentes estadios del desarrollo de *Phytophthora nicotianae*.
2. Profundizar en la investigación de otros factores involucrados en la activación por quitosana de respuestas defensivas en tabaco, como la inducción de isoenzimas, la expresión de genes defensivos y el conocimiento de los componentes y vías señalizadoras que conllevan al establecimiento de la resistencia sistémica inducida contra *Phytophthora nicotianae*
3. Ampliar los estudios de protección del tabaco contra *Phytophthora nicotianae* en condiciones *in vivo* mediante diferentes formas de aplicación de los compuestos de quitosana y combinando la acción antimicrobiana directa con la inducción de resistencia en las plantas. Lo anterior permitiría usar elicitores de quitosana, compuestos no tóxicos y biodegradables, en el manejo integrado de *Phytophthora nicotianae* en el cultivo del tabaco.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Able**, A.J., Guest, D.I., Sutherland, M.W. (2000) Hydrogen peroxide yields during the incompatible interaction of tobacco suspension cells inoculated with *Phytophthora nicotianae*. ***Plant Physiol.***, 124: 899-910.
2. **Achuo**, E.A., Audenaert, K., Meziane, H., Höfte, M. (2004) The salicylic acid-dependent defense pathway is effective against different pathogens in tomato and tobacco. ***Plant Pathol.***, 53: 65-72.
3. **Agostini**, J.P., Bushong, P.M., Timmer, L.W. (2003) Greenhouse evaluation of products that induce host resistance for control of Scab, Melanose and Alternaria brown spot of citrus. ***Plant Dis.***, 87: 69-74.
4. **Agrios**, G.N. (2005 a) Genetics of plant diseases (Chapter four). ***En: Plant Pathology***. 5th ed. Academic Press, New York, USA, page 125.
5. **Agrios**, G.N. (2005 b) How pathogens attack plants (Chapter five). ***En: Plant Pathology***. 5th ed. Academic Press, New York, USA, page 177.
6. **Agrios**, G.N. (2005 c) How plants defend themselves against pathogens (Chapter six). ***En: Plant Pathology***. 5th ed. Academic Press, New York, USA, page 208.
7. **Agrios**, G.N. (2005 d) Plant diseases caused by fungi (Chapter eleven). ***En: Plant Pathology***. 5th ed. Academic Press, New York, USA, page 386.
8. **Ait Barka**, E., Eullaffroy, P., Clément, C., Vernet, G. (2004) Chitosan improves development, and protects *Vitis vinifera* L. against *Botrytis cinerea*. ***Plant Cell Rep.***, 22: 608–614.
9. **Allan**, C.R., Hadwiger, L.A. (1979) The fungicidal effect on fungi of varying cell wall composition. ***Expt. Mycol.***, 3: 285–287.
10. **Álvarez**, M.E., Pennell, R.I., Meijer, P.J., Ishikawa, A., Dixon, R.A., Lamb, C. (1998) Reactive oxygen intermediates mediate a systemic signal network in the establishment of plant immunity. ***Cell***, 92: 1-20.
11. **Atia**, M. M. M., Buchenauer, H., Aly, A. Z., Abou-Zaid, M. I. (2005) Antifungal activity of chitosan against phytophthora infestans and activation of defence mechanisms in tomato to late blight. ***Biol. Agric. Hort.*** 23: 175-197.

12. **Aziz, A.,** Poinssot, B., Daire, X., Adrian, A., Bézier, A., Lambert, B., Joubert, J-M., Pugin, A. (2003) Laminarin Elicits Defense responses in Grapevine and Induces Protection against *Botrytis cinerea* and *Plasmopara viticola*. ***Mol. Plant Microb. Interact.***, 16: 1118–1128.
13. **Aziz, A.,** Heyraud, A., Lambert, B. (2004) Oligogalacturonide signal transduction, induction of defense-related responses and protection of grapevine against *Botrytis cinerea*. ***Planta***, 218: 767–774.
14. **Bahrke, S.,** Einarsson, J.M., Gislason, J., Haebel, S., Letzel, M.C., Peter-Katalinić, J., Peter, M.G. (2002) Sequence analysis of chitooligosaccharides by matrix-assisted laser desorption Ionization postsorce decay mass spectrometry. ***Biomacromolecules***, 3: 696-704.
15. **Bartnicki-García, S.,** Wang, M.C. (1983) Biochemical aspects of morphogenesis in *Phytophthora*. ***En: Phytophthora: Its Biology, Taxonomy, Ecology and Pathology*** (Edited by Erwin, D.C., Bartnicki-García, S. and Tsao, P.H.) pp. 121-138. The American Pathological Society, U.S.A.
16. **Bautista-Baños, S.,** Hernández-López, M., Bosquez-Molina, E., Wilson, C.L. (2003) Effects of chitosan and plant extracts on growth of *Colletotrichum gloeosporioides* anthracnose levels and quality of papaya fruit. ***Crop Prot.***, 22: 1087–1092.
17. **Bautista-Baños, S.,** Bravo-Luna, L. (2004) Evaluación del quitosano en el desarrollo de la pudrición blanda del tomate durante el almacenamiento. ***Rev. Iberoamer. Tecnol. Postcosecha***, 1: 63 –67.
18. **Bautista-Baños, S.,** Hernández-López, M., Bosquez-Molina, E. (2004) Growth inhibition of selected fungi by chitosan and plant extracts. ***Mexican J. Phytopathol.***, 22: 178–186.
19. **Bautista-Baños, S.,** Hernández-Lauzardo, A.N., Velázquez-del Valle, M.G., Hernández-López, M., Ait Barka, E., Bosquez-Molina, E., Wilson, C.L. (2006) Chitosan as a potential natural compound to control pre and postharvest diseases of horticultural commodities. ***Crop Prot.***, 25: 108-118.

20. **Baydoun**, E.A.-H., Fry, S.C. (1985) The immobility of pectic substances in injured tomato leaves and its bearing on the identity of the wound hormone. *Planta*, 165: 269-276
21. **Bécot**, S., Pajot, E., Le Corre, D., Monot, C., Silué, D. (2000) Phytogard® (K<sub>2</sub>HPO<sub>3</sub>) induces localized resistance in cauliflower to downy mildew of crucifers. *Crop Protection*, 19: 417-425
22. **Bell**, A.A., Hubbard, J.C., Liu, L. (1998) Effects of chitin and chitosan on the incidence and severity of *Fusarium* yellows of celery. *Plant Dis.*, 82: 322-328.
23. **Benhamou**, N., Côté, F. (1992) Ultrastructure and Cytochemistry of Pectin and Cellulose degradation in tobacco roots infected by *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*. *Phytopathol.*, 82: 468-478.
24. **Benhamou**, N., Lafontaine, P.J., Nicole, M. (1994) Induction of systemic resistance to *Fusarium* crown and root rot in tomato plants by seed treatment with chitosan. *Phytopathol.*, 84: 1432–1444.
25. **Benhamou**, N. (1995) Elicitor-induced resistance in tomato plants against fungal pathogens: Ultrastructure and cytochemistry of the induced response. *Scann. Microscopy*, 9: 861-880.
26. **Benhamou**, N. (1996) Elicitor-induced plant defence pathways. *Trends Plant Sci.*, 1: 233 –240.
27. **Benhamou**, N., Kloepper, J.W., Tuzun, S. (1998) Induction of resistance against *Fusarium* wilt of tomato by combination of chitosan with an endophytic bacterial strain: ultrastructure and cytochemistry of the host response. *Planta*, 204: 153–168.
28. **Ben-Shalom**, N., Ardi, R., Pinto, R., Aki, C., Fallik, E. (2003) Controlling gray mould caused by *Botrytis cinerea* in cucumber plants by means of chitosan. *Crop Prot.*, 22: 285-290.
29. **Bhaskara Reddy**, M.V., Belkacemi, K., Corcuff, F., Castaigne, F., Arul, J. (2000) Effect of pre-harvest chitosan sprays on post-harvest infection by *Botrytis cinerea* and quality of strawberry fruit. *Postharv. Biol. Technol.*, 20: 39–51.
30. **Bindschedler**, L.V., Dewdney, J., Blee, K.A., Stone, J.M., Asai, T., Plotnikov, J., Denoux, C., Hayes, T., Gerrish, C., Davies, D.R., Ausubel, F.M., Bolwell, G.P.

- (2006) Peroxidase dependent apoplastic oxidative burst in Arabidopsis required for pathogen resistance. *Plant J.*, 47: 851-863.
31. **Blée**, E. (2002) Impact of phyto-oxylipins in plant defense. *TRENDS Plant Sci.*, 7: 315-321.
  32. **Blount**, J.W., Korth, K.L., Masoud, S.A., Rasmussen, S., Lamb, C., Dixon, R.A. (2000) Altering expression of cinnamic acid 4-hydroxylase in transgenic plants provides evidence for a feedback loop at the entry point into the phenylpropanoid pathway. *Plant Physiol.*, 122: 107-116
  33. **Bolwell**, P. Reactive oxygen species and basal resistance in plants. Conferencia magistral, *VI Congreso Internacional de Biotecnología Vegetal* (Bioveg), 7-11 de Mayo, 2007, Ciego de Ávila, Cuba.
  34. **Boudart**, G., Lafitte, C., Barthe, J.P., Frasez, D., Esquerré-Tugayé, M-T. (1998) Differential elicitation of defence responses by pectic fragments in bean seedlings. *Planta*, 206: 86-94.
  35. **Bounaurio**, R., Scarponi, L., Ferrera, M., Sidott, P., Bertona, A. (2002) Induction of systemic acquired resistance in acibenzolar-s-methyl against bacterial spot disease. *Eur. J. Plant Pathol.*, 108: 41-49.
  36. **Bradley**, D.J., Kjellbom, P., Lamb, C.J. (1992) Elicitor and wound-induced oxidative cross-linking of a proline-rich plant cell wall protein: a novel, rapid defense response. *Cell*, 70: 21-30.
  37. **Bruce**, R.J., West, C.A. (1989) Elicitation of lignin biosynthesis and isoperoxidase activity by pectic fragments in suspension cultures of castor bean. *Plant Physiol.*, 91: 889-897.
  38. **Buchel**, A.S., Linthorst, H.J.M. PR-1: A group of plant proteins induced upon pathogen infection. *En: Pathogenesis-related proteins in plants*. CRC Press, 1999. p. 21-47.
  39. **Buchholz**, A. (2006) Characterization of the diffusion of non-electrolytes across plant cuticles: properties of the lipophilic pathway. *J. Exp. Botany*, 57: 2501–2513

40. **Budde**, A.D., Helgeson, J.P. (1981) Phytoalexins in tobacco callus tissue challenged by zoospores of *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*. (Abstract) ***Phytopathol.***, 71: 206
41. **Cabrera**, JC, Van Cutsem P (2005) Preparation of chitooligo-saccharides with degree of polymerization higher than 6 by acid or enzymatic degradation of chitosan. ***Biochem. Eng. J.***, 25: 165–172
42. **Cabrera**, J.C., Messiaen, J., Cambier, P., Van Cutsem, P. (2006) Size, acetylation and concentration of chitooligosaccharide elicitors determine the switch from defence involving PAL activation to cell death and water peroxide production in *Arabidopsis* cell suspensions. ***Physiol. Plantarum***, 127: 44–46.
43. **Cavalier-Smith**, T. (2004) Only six kingdoms of life. ***Proc. R. Soc. Lond. B***, 271: 1251-1262.
44. **Cervone**, F., De Lorenzo, G., Caprari, C., Clark, A.J., Desiderio, A., Devoto, A., Leckie, F., Nuss, L., Salvi, G., Toubart, P. (1993) The interaction between fungal endopolygalacturonases and plant cell wall PGIP (polygalacturonase-inhibiting protein). ***En: Mechanisms of plant defense responses***. Fritig, B., Legrand, M. (Eds.), Kluwer, Dordrecht, pp. 64-67
45. **Chai**, H.B., Doke, N. (1987) Systemic activation of O<sub>2</sub>-generating reaction, superoxide dismutase, and peroxidase in potato plants in relation to induction of systemic resistance to *Phytophthora infestans*. ***Annals Phytopathol. Soc. of Japan***, 53: 585-590.
46. **Chamnongpol**, S., Willekens, H., Moeder, W., Langebartels, C., Sandermann, H., Van Montagu, M., Inzé, D., Van Camp, W. (1998) Defense activation and enhanced pathogen tolerance induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in transgenic tobacco. ***Proc. Nat. Acad. Sciences***, 95: 5818-5823
47. **Charron**, D., Pingret, J.L., Chabaud, M., Journet, E.P., Barker, D.G. (2004) Pharmacological evidence that multiple phospholipid signaling pathways link *Rhizobium* nodulation factor perception in *Medicago truncatula* root hairs to intracellular responses, including Ca<sup>2+</sup> spiking and specific *ENOD* gene expression. ***Plant Physiol.***, 136: 3582-3593.

48. **Cheah**, L.H., Page, B.B.C. (1997) *Trichoderma* spp. for potential biocontrol of clubroot of vegetable brassicas. **Proc. 50<sup>th</sup> N.Z. Plant Protec. Conf:** 150-153
49. **Cheah**, L.H., Page, B.B.C., Sheperd, R. (1997) Chitosan coating for inhibition of sclerotina carrots. **N.Z.J. Crop Hort. Sci.**, 25: 89 –92.
50. **Chen**, Y., Feng, B., Zhao, X., Bai, X., Du, Y. (2005) PAL activity and TMV inhibition ability in transformed antisense MAPK tobacco induced by oligochitosan. **Chin. J. Appl. Environ. Biol.**, 11: 665-668.
51. **Cheong**, J.J., Alba, R., Côté, F., Enkerli, J., Hahn, M.G. (1993) Solubilization of functional plasma membrane-localized hepta- $\beta$ -glucoside elicitor binding proteins from soybean. **Plant Physiol.**, 103: 1173-1182.
52. **Chibu**, H., Shibayama, H., Arima, S. (2002) Effects of chitosan application on the shoot growth of rice and soybean. **Japanese J. of Crop Sci.**, 71: 206-211.
53. **Chien**, P-J., Chou, C-C. (2006) Antifungal activity of chitosan and its application to control post-harvest quality and fungal rotting of Tankan citrus fruit (*Citrus tankan Hayata*). **J. Science Food Agric.**, 86: 1964-1969
54. **Chittoor**, J.M., Leach, J.E., White, F.F. (1999) Induction of peroxidase during defense against pathogens. **En: Pathogenesis-related proteins in plants.** Datta y Muthukrishnan Eds. CRC Press. p. 171-193.
55. **Cid**, M., González-Olmedo, J.L., Lezcano, Y., Nieves, N. (2006) Influencia del Pectimorf sobre la calidad de la semilla artificial de caña de azúcar (*Saccharum* spp). **Cultivos Trop.**, 27: 31
56. **Cigar Envy** (2006) [whats-so-special-about-cuban-corojo-cigar-wrappers] Disponible en: <http://www.cigarenvoy.com>. Consultado en: [Julio, 2006]
57. **CNSV**: Registro e Información Estadística Fitosanitaria de los Cultivos. Centro Nacional de Sanidad Vegetal, MINAG, La Habana, 2007.
58. **Collinge** D.B., Kragh K.M., Mikkelsen J.D., Nielsen K.K., Rasmussen U., Vad K. (1993) Plant chitinases. **Plant J.**, 3: 31-40.
59. **Cooke**, D.E.L., Drenth, A., Duncan, J.M., Wagesl, J., Brassier, C.M. (2000) A molecular phylogeny of *Phytophthora* and related oomycetes. **Fungal Genet. Biol.**, 30: 17-32

60. **Cosio**, E.G., Feger M., Miller C.J., Antelo L., Ebel J. (1996) High-affinity binding of fungal  $\beta$ -glucan elicitors to cell membranes of species of the plant family Fabaceae. ***Planta***, 200: 92-99.
61. **Côté**, F., Ham, K.-S., Hahn, M.G., Bergman, C.W. (1998) Oligosaccharide elicitors in host-pathogen interactions: Generation, perception and signal transduction. ***En***: Biswas, B.B., Das, H. (Eds.), Subcellular biochemistry, Vol.29, Plant-microbe interactions. Plenum Press, New York, pp.385–431.
62. **Cunha**, L., Mc Fall, A.J., Mackey, D. (2006) Innate immunity in plants: A continuum of layered defenses. ***Microbes and Infect.***, 1-10.
63. **Cutillas-Iturralde**, A., Lorences, E.P. (1997) Effect of xyloglucan oligosaccharides on growth, viscoelastic properties, and long-term extension of pea shoots. ***Plant Physiol.*** 113: 103-109
64. **Cutillas-Iturralde**, A., Fulton, DC., Fry, SC. & Lorences, E.P. (1998) Xyloglucan-derived oligosaccharides induce ethylene synthesis in persimmon (*Diospyros kaki* L.) fruit. ***J. Exp. Botany***, 49: 701-706.
65. **Davies**, D.R., Bindschedler, L.V., Strickland, T.S., Bolwell, G.P. (2006) Production of reactive oxygen species in *Arabidopsis thaliana* cell suspension cultures in response to an elicitor from *Fusarium oxysporum*: implications for basal resistance. ***J. Exp. Botany***, 57: 1817-1827
66. **Day**, R.B., Okada, M., Ito, Y., Tsukada, K., Zaghouani, H., Shibuya, N., Stacey, G. (2001) Binding site for chitin oligosaccharides in the soybean plasma membrane. ***Plant Physiol.*** 126: 1162-73.
67. **de Pinto**, M.C., Paradiso, P., Leonetti, P., De Gara, L. (2006) Hydrogen peroxide, nitric oxide and cytosolic ascorbate peroxidase at the crossroad between defence and cell death. ***The Plant J.***, 48: 784–795.
68. **Decapdiville**, G., Beer, S.V., Watkins, C.B., Charles, L. Wilson, C.L., Luis, O., Tedeshi, L.O. (2003) Pre and post harvest harpin treatment of apples induce resistance to blue mold. ***Plant Dis.***, 87: 39-44.
69. **Desender**, S., Andrivon, D., Val, F. (2007) Activation of defense reactions in *Solanaceae*: where is the specificity? ***Cell. Microbiol.***, 9: 21-30.

70. **Dempsey**, D.A., Shah, J., Klessig, D.F. (1999) Salicylic acid and disease resistance in plants. ***Critical Rev. in Plant Sci.***, 18: 547-575.
71. **D'Haese**, W., Holsters, M. (2002) Nod factor structures, responses, and perception during initiation of nodule development. ***Glycobiology***, 12: 79R-105R.
72. **Díaz**, C.L., Spaink, H.P. and Kijne, J.W. (2000) Heterologous rhizobial lipochitin oligosaccharides and chitin oligómeros induce cortical cell divisions in red clover roots, transformed with the pea lectin gene. ***Mol. Plant-Microbe Interact.***, 13: .
73. **Dietrich**, R., Ploss, K., Heil, M. (2004) Constitutive and induced resistance to pathogens in *Arabidopsis thaliana* depends on nitrogen supply. ***Plant, Cell and Environ.***, 27: 896.
74. **Dietrich**, R., Ploss, K., Heil, M. (2005) Growth responses and fitness costs after induction of pathogen resistance depend on enviromental conditions. ***Plant, Cell and Environ.***, 28: 211.
75. **Dixon**, R.A., Achnine, L., Kota, P., Liu, Ch-J., Reddy, M.S.S. & Wang, L. (2002) The phenylpropanoid pathway and plant defence-a genomics perspective. ***Mol. Plant Pathol.***, 3: 371-390.
76. **Duzan**, H. (2004) Nod factor perception and response by Soybean (*Glycine max* L. Merr.) under abiotic and biotic stress conditions. ***Ph.D. Thesis***. McGill University, Montreal, QC, Canadá.
77. **Ebel**, J., Mithöfer, A. (1998) Early events in the elicitation of plant defence. ***Planta***, 206: 335-348.
78. **Einbu**, A., Grasdalen, H., Varum, K.M. (2007) Kinetics of hydrolysis of chitin/chitosan oligomers in concentrated hydrochloric acid. ***Carbohydr. Research***, doi:10.1016/j.carres.2007.02.022
79. **El Ghaouth**, A., Arul, J., Asselin, A., Benhamou, N. (1992) Antifungal activity of chitosan on post-harvest pathogens: induction of morphological and cytological alterations in *Rhizopus stolonifer*. ***Mycol. Res.*** 96: 769-779.

80. **El Ghaouth**, A., Arul, J., Wilson, C., Benhamou, N. (1997) Biochemical and cytochemical aspects of the interactions of chitosan and *Botrytis cinerea* in bell pepper fruit. ***Postharvest Biol. Technol.*** 12: 183-194.
81. **El Ghaouth**, A., Smilanick, J.L., Brown, G.E., Wisniewski, M., Wilson, C.L. (1999) Application of *Candida saitoana* and glycol-chitosan for the control of postharvest diseases of apple and citrus fruit under semicommercial conditions. ***Plant Dis.*** 84: 243-248.
82. **English**, J.T., Mitchell, D.J. (1988) Influence of an introduced composite of microorganisms on infection on tobacco by *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*. ***Phytopathol.***, 78: 1484-1490.
83. **Erwin**, D.C., Ribeiro O.K. (1996) *Phytophthora nicotianae* = *Phytophthora parasitica*. ***En***: Erwin DC, Ribeiro OK, (eds). *Phytophthora* diseases worldwide, pp. 391-407. The American Phytopathological Society, St Paul, Minnesota, USA.
84. **Espino**, M. (2003a) Obtención de líneas promisorias de tabaco negro (*Nicotiana tabacum* L.) resistentes a *P. hyoscyami* F. Sp. *Tabacina* (Moho azul) y *P. parasitica* var. *nicotianae* (Pata prieta). ***Cuba Tabaco***, 4: 49-50.
85. **Espino**, E. (2003b) Informe de las incidencias negativas en la fase agrícola del tabaco durante la temporada 2002-2003, Instituto de Investigaciones del Tabaco, ***Taba Cuba***, 2003.
86. **Espino**, E. (2006) Características de las variedades comerciales. ***En***: Manual práctico del supervisor agrícola del tabaco. 2º Edición, Agrinfor, La Habana, Cuba, 60 págs.
87. **Esquerré-Tugayé**, M-T., Boudart, G., Dumas, B. (2000) Cell wall degrading enzymes, inhibitory proteins and oligosaccharides participate in the molecular dialogue between plants and pathogen. ***Plant Physiol. Biochem.***, 38: 157-163
88. **Esseling**, J.J., Lhuissier, F.G., Emons, A.M. (2003) Nod factor-induced root hair curling: continuous polar growth towards the point of nod factor application. ***Plant Physiol***, 132: 1982-1988.
89. **Eweis**, M., Elkholy, S.S., Elsabee, M.Z. (2005) Antifungal efficacy of chitosan and its thiourea derivatives upon the growth of some sugar-beet pathogens. ***Int. J. Biol. Macromol.***, 38: 1-8

90. **Falcón**, A.B., Cabrera, J.C., Reinaldo, I.M., Nuñez, M.N. (2005) Desarrollo de activadores de las plantas de amplio espectro de acción. **Informe Final del PNCT 00100191**, CITMA, Cuba.
91. **Falcón**, A.B., Cabrera, J.C. (2007) Actividad enraizadora de una mezcla de oligogalacturonidos en pecíolos de violeta africana. **Cultivos Trop.**, 28: 87-90.
92. **Farr**, D.F., Rossman, A.Y. Fungal Databases, Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, ARS, USDA., Disponible en [<http://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases>] Actualizada en [Junio, 8, 2006], Consultada en [Marzo, 2009].
93. **Ferreira**, R.B., Monteiro, S., Freitas, R., Santos, C.N. Chen, Z., Batista, L.M., Duarte, J., Borges A., Teixeira, A.R. (2006) Fungal pathogens: The battle for plant infection. **Crit. Rev. Plant Sci.** 25: 505-524.
94. **French**, E.R., Hebert, T.T. Métodos de investigación fitopatológica. Ediciones IICA, 1982, primera edición, San José, Costa Rica, 290 páginas.
95. **Fritig**, B., Heitz, T., Legrand, M. (1998) Antimicrobial proteins in induced plant defense. **Curr. Opin. Immunology**, 10: 16-22
96. **Funnell**, D.L., Lawrence, C.B., Pedersen, J.F., Schardl, C.L. (2004) Expression of the tobacco  $\beta$ -1,3-glucanase glucanase gene, PR-2d, following induction of SAR with *Peronospora tabacina*. **Physiol. Mol. Plant Pathol.** 65: 285-296.
97. **García**, M., Andino, V. (2002) Tecnología de bandejas flotantes en la producción de plántulas de tabaco en Cuba. **Cuba Tabaco**, 3: 30-33.
98. **García**, V., Mena, EC., Santana, N., Hernández, B. (2002) Nuevas variedades de tabaco negro, productores de capas y capotes, resistentes a las principales enfermedades. **Cuba Tabaco**, 3: 48-53.
99. **Garcia-Brugger**, A., Lamotte, O., Vandelle, E., Bourque, S., Lecourieux, D., Poinssot, B., Wendehenne, D., Pugin, A. (2006) Early signaling events induced by elicitors of plant defenses. **Mol. Plant-Microbe Inter.** 19: 711-724.
100. **Grenier**, J., Asselin, A. (1990) Some pathogenesis-related proteins are chitosanases with lytic activity against fungal spores. **Mol Plant-Microbe Interact.**, 3: 401-407.

101. **Grenville-Briggs**, L.J., van West, P. (2005) The biotrophic stages of Oomycete-Plant interactions. ***Adv. in Applied Microbiol.***, 57: 217-243.
102. **Grenville-Briggs**, L.J., Anderson, V.L., Fugelstad, J., Avrova, A.O., Bouzenzana, J., Williams, A., Wawra, S., Whisson, S.C., Birch, P.R.J., Bulone, V., van West, P. (2008). Cellulose synthesis in *Phytophthora infestans* is required for normal appressorium formation and successful infection of potato. ***The Plant Cell***, 20: 720–738.
103. **Hadwiger**, L.A., Beckman, J. (1980) Chitosan as a component of pea-*Fusarium solani* interactions. ***Plant Physiol.***, 66: 205-211.
104. **Hadwiger**, L.A., Loschke, D.C. (1981) Molecular communication in host-parasite interactions: Hexosamine polymers (chitosan) as regulator compounds in race-specific and other interactions, ***Phytopathol.***, 71: 756-762.
105. **Hague**, T., Chen, H., Ouyang, W., Martoni, C., Lawuyi, B., Urbanska, A.M. (2005) Superior cell delivery features of poly(ethylene glycol) incorporated alginate, chitosan and poly-L-lysine microcapsules. ***Molec. Pharmac.***, 2: 29-36.
106. **Hammerschmidt**, R. (1999a) Induced disease resistance: how do induced plants stop pathogens? ***Physiol and Mol. Plant Pathol.***, 55: 77-84
107. **Hammerschmidt**, R. (1999b) Phytoalexins: What have we learned after 60 years? ***Annu. Rev. Phytopatol.***, 37: 285-306.
108. **Hammerschmidt**, R. (2005) To challenge or not to challenge: Determining the cost of induced resistance. ***Physiol. Mol. Plant Pathol.***, 66: 1-2
109. **Hardham**, A.R. (2007) Cell biology of plant–oomycete interactions. ***Cellular Microbiol.*** 9: 31–39
110. **Hayashi**, T. (1989) Xyloglucans in the primary cell wall. ***Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*** 40: 139-168.
111. **He**, X.Z., Dixon, R.A. (2000) Genetic manipulation of isoflavone 7-O-Methyltransferase enhances biosynthesis of 4'-O-Methylated isoflavonoids phytoalexins and disease resistance in alfalfa. ***Plant Cell.***, 12: 1689-1702.

112. **Heil**, M., Hilpert, A. Kaiser, W., Linsenmair, K.E. (2000) Reduced growth and seed set following chemical induction of pathogen defence: does systemic acquired resistance (SAR) incur allocation costs? **J. Ecol.** 88: 645-654.
113. **Heil**, M., Bostock, R. (2002) Induced systemic resistance (ISR) against pathogens in the context of induced plant defenses. **Ann. of Botany**, 89: 503-512
114. **Heitz**, T., Geoffroy, P., Fritig, B., Legrand, M. (1999) The PR-6 family: proteinase inhibitors in plant-microbe and plant-insect interactions, **En: Pathogenesis-related proteins in plants**, Datta, S.K. and Muthukrishnen, S. (Eds.), CRC Press, Boca Raton, pp. 131-135.
115. **Hernández-Lauzardo**, A.N., Bautista-Baños, S., Velásquez-del Valle, M.G. Méndez-Montealvo, M.G., Sánchez-Rivera, M.M., Bello-Pérez, L.A. (2008) Antifungal effects of chitosan with different molecular weights on in vitro development of *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.:Fr.) Vuill. **Carbohydr. Polymers**, 73: 541-547.
116. **Hirano**, A., Nagao, N. (1989) Effects of chitosan, pectic acid, lysozyme and chitinase on the growth of several phytopathogens. **Agric. Biol. Chem.**, 11: 3065-3066
117. **Hoagland**, D.R., Arnon, D.I. (1950) The water culture method of growing plants without soil. California Agriculture Experiment Station Circular, pp 347.
118. **Howe**, G.A., Schillmiller, A.L. (2002) Oxylin metabolism in response to stress. **Curr. Opinion in Plant Biol.**, 5: 230-236.
119. **Hugot**, K., Aimé, S., Conrod, S., Poupet, A., Galiana, E. (1999) Developmental regulated mechanism affect the ability of a fungal pathogen to infect and colonize tobacco leaves. **The Plant J.**, 20: 163-170
120. **Iriti**, M., Faoro, F. (2003) Does benzothiadiazole-induced resistance increase fitness cost in bean? **J. Plant Pathol.**, 85: 265-270.
121. **Iriti**, M., Sironi, M., Gomarasca, S., Casazza, A.P., Soave, C., Faoro, F. (2006) Cell death-mediated antiviral effect of chitosan in tobacco. **Plant Physiol. Biochem.**, 44: 893-900

122. **Jeon**, Y-J. Shahidi, F., Kim, S-K. (2000) Preparation of chitin and chitosan oligomers and their applications in physiological functional foods. ***Food Rev. Int.***, 16: 159–176
123. **Jin**, Z., Shen, D. (2002) Effect of reaction temperature and reaction time on the preparation of low-molecular weight chitosan using phosphoric acid. ***Carbohydr. Polym.***, 49: 393–396
124. **Jones**, J.D.G., Dangl, J.L. (2006) The plant immune system. ***Nature***, 444: 323-329
125. **Judelson**, H.S., Blanco, F.A. (2005) The spores of Phytophthora: weapons of the plant destroyer. ***Nature Reviews***, 3: 47-58.
126. **Kaku**, T., Tabuchi, A., Wakabayashi, K., Kamisaka, S., Hoson, T. (2002) Action of xyloglucan hydrolase within the native cell wall architecture and its effect on cell wall extensibility in azuki bean epicotyls. ***Plant Cell Physiol.***, 43: 21-26.
127. **Kamoun**, S., Huitema, E., Vleeshouwers, V.G.A. (1999) Resistance to oomycetes: a general role for the hypersensitive response? ***Trends Plant Sci.*** 4: 196-200.
128. **Kauffmann**, S., Legrand, M., Geoffroy, P., Fritig, B. (1987) Biological functions of pathogenesis-related proteins: four PR proteins of tobacco have  $\beta$ -1,3-glucanase activity. ***EMBO Journal***, 6: 3209-3212.
129. **Kauss**, H., Jeblick, W., Domard, A. (1989) The degree of polymerization and N-acetylation of chitosan determine its ability to elicit callose formation in suspension cells and protoplasts of *Catharanthus roseus*. ***Planta***, 178: 385-392.
130. **Kauss**, H., Jeblick, W., Domard, A., Siegrist, J. (1997) Partial acetylation of chitosan and a conditioning period are essential for elicitation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in surface-abraded tissues from various plants. ***Adv. Chit. Sci.*** II: 94-101.
131. **Kawano**, T., Sahashi, N., Uozumi, N., Muto, S. (1999) Involvement of apoplastic peroxidase in the chitosaccharide-induced immediate oxidative burst and a cytosolic Ca<sup>2+</sup> increase in tobacco suspension culture. ***Plant Peroxidase Newsletter***, 14: 117-124.

132. **Kendra**, D.F, Hadwiger L.A. (1984) Characterization of the smallest chitosan oligomer that is maximally antifungal to *Fusarium solani* and elicits pisatin formation in *Pisum sativum*. **Exp Mycol.**, 8: 276-281.
133. **Khan**, W., Prithiviraj, B., Smith, D. (2003) Chitosan and chitin oligomers increase phenylalanine ammonia-lyase and tyrosine ammonia-lyase activities in soybean leaves. **J. Plant Physiol.**, 160: 859-863.
134. **Kittur**, F.S., Kumar, V., Gowda, L.R., Tharanathan, R.N. (2003) Chitosan analysis by a pectinase isozyme of *Aspergillus niger*. A non-specific activity. **Carbohydr. Polym.**, 53: 191–196
135. **Kim**, C.-Y., Zhang, S. (2004) Activation of a mitogen-activated protein kinase cascade induces WRKY family of transcription factors and defense genes in tobacco. **Plant J.**, 38:142-151.
136. **Klarzynski**, O., Plesse, B., Joubert, J.M., Yvin, J.C., Kopp, M., Kloareg, B., Fritig, B. (2000) Linear  $\beta$ -1,3 glucans are elicitors of defense responses in tobacco. **Plant Physiol.**, 124: 1027-1037.
137. **Klarzynski**, O., Fritig, B. (2001) Stimulation des défenses naturelles des plantes. **C. R. Acad. Sci. Paris, Sciences de la vie/Life Sciences**, 324: 953-963.
138. **Klessig**, D.F., Durner, J., Noad, R., Navarre, D.A., Wendehenne, D., Kumar, D., Zhou, J.M., Shah, J., Zhang, S., Kachroo, P., Trifa, Y., Portier, D., Lam, E., Silva, S. (2000) Nitric oxide and salicylic acid signaling in plant defense. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, 97: 8849-8855.
139. **Knoester**, M., van Loon, LC., van den Heuvel, J., Hennig, J., Bol, JF., Linthorst, HJM. (1998) Ethylene-insensitive tobacco lacks nonhost resistance against soil-borne fungi. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, 95: 1933-1937.
140. **Kombrink**, E., Schmelzer, E. (2001) The hypersensitive response and its role in local and systemic disease resistance. **European J. of Plant Pathol.**, 107: 69-78.
141. **Kuč**, J. (2000) Development and future direction of induced systemic resistance in plants. **Crop Prot.**, 19: 859-861.

142. **Laflamme**, P, Benhamou, N., Bussi eres, G., Dessureault, M. (1999) Differential effect of chitosan on root rot fungal pathogens in forest nurseries. **Can. J. Botany**, 77: 1460-1468.
143. **Lafontaine**, P.J., Benhamou, N. (1996) Chitosan treatment: an emerging strategy for enhancing resistance of greenhouse tomato plants to infection by *Fusarium oxysporum* f.sp.*radicis-lycopersici*. **Biocontrol Sci. Technol.** 6: 11–124.
144. **Lamb**, C., Dixon, R.A. (1997) The oxidative burst in plant disease resistance. **Annual Rev. of Plant Physiol. and Plant Mol. Biol.**, 48: 251-275.
145. **Lapous**, D., Mathieu, Y., Guern, J., Lauri ere, C. (1998) Increase of defense gene transcripts by cytoplasmic acidification in tobacco cell suspensions. **Planta**, 205: 452-458.
146. **Latijnhouwers**, M., de Wit, P.J., Govers, F. (2003) Oomycetes and fungi: similar weaponry to attack plants. **Trends Microbiol.** 11: 462-469.
147. **Latijnhouwers**, M., Ligterink, W., Vleeshouwers, V., van West, P., Govers, F. (2004) A G alpha subunit controls zoospore motility and virulence in the potato late blight pathogen *Phytophthora infestans*. **Mol. Microbiol.**, 51: 925-936.
148. **Latunde-Dada**, A.O., Lucas, J.A. (2001) The plant defence activator acibenzolar-S-methyl primes cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] seedlings for rapid induction of resistance. **Physiol. Mol. Plant Pathol.**, 58: 199-208.
149. **Leuba**, S., Stossel, P. (1985) **In: Chitin in Nature and Technology**; Muzzarelli, R.A.A., Jeuniaux, C., Eds.; Plenum: New York, p. 217.
150. **Leubner-Metzger**, G., Meins, F. (1999) Functions and regulation of plant  $\beta$ -1,3-Glucanases (PR-2). **En: Pathogenesis-related proteins in plants**. Datta y Muthukrishnan Eds. CRC Press. p. 49-76.
151. **Lhuissier**, F.G.P., De Ruijter, N.C.A., Sieberer, B.J., Esseling, J.J., Emons, A.M.C. (2001) Time course of cell biology events evoked in legume root hairs by *Rhizobium* Nod factors: state of the art. **Ann Bot.** 87: 289-302.
152. **Li**, J., Du, Y., Yang, J, Feng T., Li, A., Chen, P. (2004) Preparation and characterisation of low molecular weight chitosan and chitooligomers by a commercial enzyme. **Polym. Degrad. Stabil.**, 87: 441–448

153. **Li**, B.C; Bass, W.T, Cornelius, P.L. (2006) Resistance to tobacco Black Shank in *Nicotiana* species. **Crop. Sci.**, 46: 554-560.
154. **Ligterink**, W., Kroj, T., zur Nieden, U., Hirt, H., Scheel, D. (1997) Receptor-mediated activation of a MAP kinase in pathogen defense of plants. **Science**, 276: 2054-2057
155. **Liu**, H., Du, Y., Wang, X., Sun, L. (2004) Chitosan kills bacteria through cell membrane damage. **Inter. J. of Food Microbiol.**, 95: 147-155
156. **Liu**, W., Sun, S., Cao, Z., Zhang, X., Yao, K., Lu, W.W., Luk, K.D.K. (2005) An investigation on the physicochemical properties of chitosan/DNA polyelectrolyte complexes. **Biomaterials**, 26: 2705-2711
157. **Liu**, J., Tian, S., Meng, X., Xu, Y. (2007) Effects of chitosan on control of post-harvest diseases and physiological responses of tomato fruit. **Post. Biol. Technol.**, 44: 300-306
158. **López**, MC., Espino, E., Espino, M., Hernández, M. (2003) Líneas promisorias de tabaco Connecticut (*Nicotiana tabacum* L.) resistentes al Moho azul (*P. hyoscyami* Sp.) y a otras enfermedades. **Cuba Tabaco**, 4: 39-44.
159. **Lusso**, M., Kuć, J. (1996) The effect of sense and antisense expression of the PR-N gene for  $\beta$ -1,3-glucanase on disease resistance of tobacco to fungi and viruses. **Physiol. and Molec. Plant Pathol.**, 49: 267-283.
160. **Mach**, J.(2008) Cellulose Synthesis in *Phytophthora infestans* Pathogenesis. **The Plant Cell**, 20: 500
161. **Mäder**, M., Amberg-Fisher, V. (1982) Role of peroxidase in lignification of tobacco cells. **Plant Physiol.**, 70: 1128-1131
162. **Maghami**, G.G., Roberts, G.A.F. (1988) Evaluation of the viscosimetric constants for chitosan. **Makromol. Chem.**, 189: 195-200.
163. **Majeti**, N.V., Kumar, R. (2000) A review of chitin and chitosan applications. **React and Funct. Polym.**, 46: 1-27.
164. **Manandhar**, H.K., Lyngs-Jørgensen, Mathur, S.B., Smedegaard-Petersen (1998) Resistansse to rice blast induced by ferric chloride, di-potassium hydrogen phosphate and salicylic acid. **Crop Protection**, 17: 323-329

165. **Marfà**, V., Gollin, D., Eberhard, S., Mohnen, D., Albersheim, P., Darvill, A. (1991) Oligogalacturonides are able to induce flowers to form on tobacco explants. ***Plant J.***, 1: 217–225.
166. **Maronek**, P.M., Hendrix, J.W. (1978) Resistance to race 0 of *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* in tissue cultures of a tobacco breeding line with black shank resistance derived from *Nicotiana longiflora*. ***Phytopathol.*** 68: 233-234.
167. **Marry**, M., Cavalier, D.M., Schnurr, J.K., Netland, J., Yang, Z., Pezeshk, V., York, W.S., Pauly, M., White, A.R. (2003) Structural characterization of chemically and enzymatically derived standard oligosaccharides isolated from partially purified tamarind xyloglucan. ***Carbohydr. Polymers***, 51: 347-356.
168. **Martínez**, C., Blanc, F., Le Claire, E., Besnard, O., Nicole, M., Baccou, J.C. (2001) Salicylic acid and ethylene pathways are differentially activated in melon cotyledons by active or heat-denaturated cellulase from *Trichoderma longibrachiatum*. ***Plant Physiol.***, 127: 334–344.
169. **Mathieu**, Y., Lapous, D., Thomine, S., Laurière, C., Guern, J. (1996) Cytoplasmic acidification as an early phosphorylation-dependent response of tobacco cells to elicitors. ***Planta***, 199: 416-424.
170. **Matsuoka**, M., Ohashi, Y. (1986) Induction of pathogenesis-related proteins in tobacco leaves. ***Plant Physiol.***, 80: 505-510.
171. **Mauch**, F., Mauch-Mani, B., Boller, T. (1988) Antifungal hydrolases in pea tissue. II. Inhibition of fungal growth by combinations of chitinase and  $\beta$ -1,3-glucanase. ***Plant Physiol.***, 88: 936-942
172. **McDougall** G.J., Fry, S.C. (1990) Xyloglucan oligosaccharides promote growth and activate cellulase. Evidence for a role of cellulose in cell expansion. ***Plant Physiol.***, 93: 1042–1048
173. **Meins**, F., Ahl, P. (1989) Induction of chitinase and  $\beta$  1-3-glucanase in tobacco plants infected with *Pseudomonas tabaci* and *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*. ***Plant Sci.***, 61: 155-161.

174. **Melton**, T. A., Broadwell, A. (2003) Disease Management. Pages 119-143 **En:** Flue Cured Tobacco Information. North Carolina Coop. Ext. Ser. AG-187. N. C. State University, Raleigh.
175. **Mithöfer**, A., Lottspeich, F., Ebel, J. (1996) One-step purification of the  $\beta$ -glucan elicitor-binding protein from soybean (*Glycine max* L.) root and characterization of an anti-peptide antiserum. **FEBS Letters**, 381: 203-207.
176. **Molloy**, C., Cheah, L-H., Koolaard, J.P. (2004) Induced resistance against *Sclerotinia sclerotiorum* in carrots treated with enzymatically hydrolysed chitosan. **Postharv. Biol. and Technol.**, 33: 61–65
177. **Muiño**, B.L., Rodríguez, F., Espino, M. Martínez, M.L. (2001) Uso del Propamocarb para el manejo de la resistencia de *P. nicotianae* al metalaxyl en semilleros de tabaco. **Cuba Tabaco**, 2: 30-36.
178. **Mutlu**, M., Sarioğlu, K., Demir, N., Ercan, M.T., Acar, J. (1999) The use of commercial pectinase in fruit juice industry. Part I: viscosimetric determination of enzyme activity. **J. of Food Engin.** 41: 147-150
179. **Negrel**, J., Javelle, F. (1995) Induction of phenylpropanoid and tyramine metabolism in pectinase- or pronase-elicited cell suspension cultures of tobacco (*Nicotiana tabacum*). **Physiol. Plantarum**, 95: 569-574.
180. **Neuhaus**, J-M. Plant chitinases (PR-3, PR-4, PR-8, PR-11). **En:** Pathogenesis-related proteins in plants. CRC Press, 1999. p. 77-105.
181. **Nieves**, N., Poblete, A., Cid, M., Lezcano, Y., González-Olmedo, J.L., Cabrera, J.C. (2006) Evaluación del Pectimorf como complemento del 2,4-D en el proceso de embriogénesis somática de caña de azúcar (*Saccharum* spp). **Cult. Trop.**, 27: 25.
182. **Niki**, T., Mitsuhashi, I., Seo, S., Ohtsubo, N., Ohashi, Y. (1998) Antagonistic effect of Salicylic acid and Jasmonic acid on the expression of Pathogenesis-Related (PR) protein genes in wounded mature tobacco leaves. **Plant Cell Physiol.**, 39: 500-507.
183. **Nishizawa**, Y., Kawakami, A., Hibi, T., He, D.Y., Shibuya, N., Minami, E. (1999) Regulation of the chitinase gene expression in suspension-cultured rice cells by N-acetylchitoooligosaccharides: differences in the signal transduction pathways

- leading to the activation of elicitor-responsive genes. ***Plant Mol. Biology***, 39: 907-914.
184. **Ogawa**, D., Nakajima, N., Seo, S., Mitsuhashi, I., Kamada, H., Ohashi, Y. (2006) The phenylalanine pathway is the main route of salicylic acid biosynthesis in *Tobacco mosaic virus*-infected tobacco leaves. ***Plant Biotech.*** 23, 395–398
185. **Ohashi**, Y., Shimomura, T., Matsuoka, M. (1986) Acquisition of resistance to TMV coincident with induction of pathogenesis-related proteins by TMV infection and chemical treatment in tobacco leaves. ***Annals of the Phytopathol. Soc. of Japan***, 52: 626-635.
186. **Ohta**, K., Morishita, S., Suda, K., Kobayashi, N. and Hosoki, T. (2004) Effects of chitosan soil mixture treatment in the seedling stage on the growth and flowering of several ornamental plants. ***J. Japan. Soc. Hort. Sci.***, 73: 66-68.
187. **Oka**, Y., Cohen, Y. (2001) Induced resistance to cyst and root-knot nematodes in cereals by DL-*B*-amino-*n*-butyric acid. ***Europ. J. of Plant Pathol.***, 107: 219-227.
188. **Oostendorp**, M., Kunz, W., Dietrich, B., Staub, T. (2001) Induced disease resistance in plants by chemicals. ***Europ. J. of Plant Pathol.***, 107: 19-28.
189. **Pacheco**, N., Larralde-Corona, C.P., Sepúlveda, J., Trombotto, S., Domard, A., Shirai, K. (2008) Evaluation of chitosans and *Pichia guilliermondii* as growth inhibitors of *Penicillium digitatum*. ***Int. J. of Biol. Macromol.***, 43: 20-26
190. **Pan**, S.Q., Ye, X.S., Kuć, J. (1991) Association of  $\beta$ -1,3-glucanase activity and isoform pattern with systemic resistance to blue mould in tobacco induced by stem injection with *Peronospora tabacina* or leaf inoculation with tobacco mosaic virus. ***Physiol. and Molec. Plant Pathol.***, 39: 25-39.
191. **Pantaleone**, D., Yalpani M., Scollar, M. (1979) Unusual susceptibility of chitosan to enzymatic hydrolysis. ***Carbohydr Res.***, 237: 325–332
192. **Park**, R., Kyu-Jong, J., You-Young, J., Yu-Lan, J., Kil-Yong, K., Jae-Han, S., Yong-Woong, K. (2002) Variation of antifungal activities of chitosans on plant pathogens. ***J. of Microbiol. and Biotech.***, 12: 84-88.
193. **Passardi**, F., Cosio, C., Penel, C., Dunand, C. (2005) Peroxidases have more functions than a Swiss army knife. ***Plant Cell Rep.***, 24: 255–265

194. **Paz-Lago**, D., Cabrera, G., Ramírez, M.A., Pombo, R. y Gutiérrez, A. (1999) Influencia de derivados de quitina en la interacción Tomate-Fusarium oxysporum fsp licopersicii a nivel de bioensayo. **Cult. Trop.**, 20: 59-61.
195. **Pérez**, O., Redonet, J.L., Mena, L. (2002) Empleo de la turba mejorada y su efecto en el rendimiento y la calidad del tabaco para capas. **Cuba Tabaco**, 3: 24-28.
196. **Plascencia-Jatomea**, M., Viniegra, G., Olayo, R., Castillo-Ortega, M., Shirai, K. (2003) Effect of chitosan and temperatura on spore germination on *Aspergillus niger*. **Macromol. BioSci.**, 3: 582 –586.
197. **Plana**, D., Álvarez, M., Florido, M., Lara, R.M., Cabrera, J.C. (2003) Actividad biológica en la morfogénesis *in vitro* del tomate variedad Amalia. **Cult. Trop.**, 24: 29-33.
198. **Preston**, C.A., Lewandowski, C., Enyedi, A.J., Baldwin, I.T. (1999) Tobacco mosaic virus inoculation inhibits wound-induced jasmonic acid-mediated responses within but not between plants. **Planta**, 209: 87-95.
199. **Prithviraj**, B., Solumenoev, A., Zhou, X., Smith, D.L. (2000) Differential response of soybean (*Glycine Max* (L.) Merr.) to lipochitooligosaccharide Nod BJ V(C<sub>18:1</sub> Me Fuc) **J. Exp. Bot.**, 51: 2045-2051.
200. **Prithviraj**, B., Solumenoev, A., Zhou, X., Kahn, W.M., Smith, D.L. (2003) A host-specific bacteria-to-plant signal molecule (Nod factor) enhances germination and early growth of diverse crop plants. **Planta**, 216: 437-445.
201. **Raafat**, D., von Bargen, K., Haas, A., Sahl, H-G. (2008) Insights into the Mode of Action of Chitosan as an Antibacterial Compound. **Appl. Env. Microbiol.**, 74: 3764–3773
202. **Rabea**, E.I., Badawy, M.E-T., Stevens, C.V., Smagghe, G., Steurbaut, W. (2003) Chitosan as antimicrobial agent: Applications and mode of action. **Biomacromolecules**, 4: 1457-1465
203. **Ramírez**, M.A., Cabrera, G., Gutiérrez, A., Rodríguez, T. (2000) Metodología de obtención de quitosana a partir de quitina de langosta. **Cult. Trop.**, 21: 81-84.
204. **Rancé**, I., Fournier, J., Esquerré-Tugayé, M-T. (1998) The incompatible interaction between *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* race 0 and tobacco

- is suppressed in transgenic plants expressing antisense lipoxygenase sequences. ***Proc. Natl. Acad. Sci. USA.***, 95: 6554-6559.
205. **Resende**, M.L.V., Salgado, S.M.L., Chaves, Z.M. (2003) Espécies ativas de oxigênio na desposta de defesa de plantas a patógenos. ***Fitopatol. Bras.***, 28: 123-130.
206. **Reuveni**, R., Dor, G., Raviv, M., Reuveni, M., Tuzun, S. (2000) Systemic resistance against *Sphaeroteca fuliginea* in cucumber plants exposed to phosphate in hydroponics system, and its control by foliar spray of mono-potassium phosphate. ***Crop Protection***, 19: 355-361
207. **Ricci**, P., Trentin, F., Bonnet, P., Venard, P., Moun-ton-Perronet, F., Bruneteau, M. (1992) Differential production of parasiticein, an elicitor of necrosis and resistance in tobacco, by isolates of *Phytophthora parasitica*. ***Plant Pathol.***, 41: 298-307.
208. **Rickauer**, M., Fournier, J., Esquerré-Tugayé, M.T. (1989) Induction of proteinase inhibitors in tobacco cell suspension culture by elicitors of *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*. ***Plant Physiol.*** 90: 1065-1070.
209. **Rickauer**, M., Brodschelm, W., Bottin, A., Véronési, C., Grimal, H., Esquerré-Tugayé, M-T. (1997) The jasmonate pathway is involved differentially in the regulation of different defence responses in tobacco cells. ***Planta***, 202: 155-162.
210. **Ridley**, B.L., O'Neill, M.A., Mohnen, D. (2001) Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. ***Phytochemistry***, 57: 929-967
211. **Rhazi**, M., Desbrieres, J., Tolaimate, A., Rinaudo, M., Vottero, P., Alagui, A., El Meray, M. (2002) Influence of the nature of the metal ions on the complexation with chitosan. Application to the treatment of liquid waste. ***Europ. Polymer J.*** 38: 1523-1530
212. **Rhoades**, J., Roller, S. (2000) Antimicrobial actions of degraded and native chitosan against spoilage organisms in laboratory media and foods. ***App. Environ. Microbiol.***, 66: 80-86
213. **Roberts**, F. ***En***: Chitin chemistry. 1<sup>th</sup> Edition. London Mac Millan Press, 1992.

214. **Rojo**, E., Solano, R., Sánchez-Serrano, J.J. (2003) Interactions between Signaling Compounds Involved in Plant Defense. ***J Plant Growth Regul.***, 22: 82–98.
215. **Romanazzi**, G., Nigro, F., Hipólito, A., Di Venere, D., Salerno, M. (2002) Effect of pre and postharvest chitosan treatments to control storage grey mold of table grapes. ***J. Food Sci.***, 67: 1862-1865.
216. **Rouet**, M-A., Mathieu, Y., Barbier-Brygoo, H., Laurière, C. (2006) Characterization of active oxygen-producing proteins in response to hypo-osmolarity in tobacco and Arabidopsis cell suspensions: identification of a cell wall peroxidase. ***J. Experim. Botany***, 57: 1323–1332
217. **Roy**, I., Sardar, M., Gupta, M.N. (2003) Hydrolysis of chitin by Pectinex™, ***Enz. Microb. Technol.*** 32: 582–588.
218. **Sathiyabama**, M., Balasubramanian, R. (1998) Chitosan induces resistance components in *Arachis hypogaea* against leaf rust caused by *Puccinia arachidis* Speg. ***Crop Prot.***, 17: 307–313.
219. **Schatz**, C., Domard, A., Viton, C., Pichot, C., Delair, T., (2004) Versatile and Efficient Formation of Colloids of Biopolymer-Based Polyelectrolyte Complexes ***Biomacromolecules***, 5: 1882-1892
220. **Schenk**, P.M., Kazan, K., Manners, J.M., Anderson, J.P., Simpson, R.S., Wilson, I.W. (2003) Systemic gene expression in Arabidopsis during an incompatible interaction with *Alternaria brassicicola*. ***Plant Physiol.***, 132: 999-1010.
221. **Sharathchandra**, R.G., Niranjan Raj, S., Shetty, N.P., Amruthesh, K.N., Shetty, H.S. (2004) A Chitosan formulation Elexa™ induces downy mildew disease resistance and growth promotion in pearl millet. ***Crop Prot.***, 23: 881–888
222. **Sharp** J.K., McNeil M., Albersheim P. (1984) The primary structures of one elicitor active and seven elicitor inactive hexa-β-gluco-pyranosyl-D-glucitol isolated from the mycelial cell walls of *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea*. ***J. of Biological Chem.***, 259: 11321-11336.
223. **Shew**, H.D. (1991) Compendium of tobacco diseases. ***En***: The diseases compendium series of American Phytopathological Society. Shew, H.D., Lucas, G.B. (Eds.), 90 págs.

224. **Shibuya**, N., Ebisu, N., Kamada, Y., Kaku, H., Cohn, J., Ito, Y. (1996) Localization and binding characteristics of a high-affinity binding site for N-acetylchitooligosaccharide elicitor in the plasma membrane from suspension-cultured rice cells suggest a role as a receptor for the elicitor signal at the cell surface. ***Plant Cell Physiol.***, 37: 894-898.
225. **Shibuya**, N., Minami, E. (2001) Oligosaccharide signalling for defenses responses in plant. ***Physiol. and Mol. Plant Pathol.***, 59: 223-233
226. **Shibuya**, N., Yamaguchi, T., Minami, E., Kaku, H., Ito, Y., Okada, M. (2002) Oligosaccharide elicitor signaling: perception and transduction of oligochitin/ oligoglucan elicitor in rice. ***Biol Plant-Microbe Interact***, 2: 109– 13.
227. **Shin-Yaa**, Y., Lee, M-Y., Hinode, H., Kajiuchi, T. (2001) Effects of N-acetylation degree on N-acetylated chitosan hydrolysis with commercially available and modified pectinases, ***Biochem. Eng. J.***, 7:85–88
228. **Shoresh**, M., Yedidia, I., Chet, I. (2005) Involvement of jasmonic acid/ethylene signalling pathway in the systemic resistance induced in cucumber by *Trichoderma asperellum* T203. ***Phytopathol.***, 95: 76-84.
229. **Somogyi**, M. (1952) Notes on sugar determination. ***J. Biol. Chem.***, 195: 19-23.
230. **Somssich**, I.E., Hahlbrock, K. (1998) Pathogen defense in plants-a paradigm of biological complexity. ***Trends in Plant Sci.***, 3: 86-90
231. **Spaink**, H.P. (2000) Root nodulation and infection factors produced by rhizobial bacteria. ***Ann. Rev. Microbiol.***, 54: 257-288.
232. **Staub**, T., Sozzi, D. (1981) Résistance au métalaxyl en pratique et les conséquences pour son utilisation. ***Phytiatrie Phytopharm.***, 30: 283-291.
233. **Strand**, S.P., Danielsen, S., Christensen, B.E., Vårum, K.M. (2005) Influence of chitosan structure on the formation and stability of DNA-Chitosan polyelectrolite complexes. ***Biomacromol.***, 6 : 3357-3366
234. **Struszczyk**, H., Schanzenbach, D., Peter, M.G, Pospieszny, H. Biodegradation of chitosan. ***En:*** Struszczyk, H., Pospieszny, H., Gamzazade, A. (eds), *Chitin and Chitosan*. Polish and Russian monograph, Polish Chitin Society, Serie 1, 1999, pp. 59-75.

235. **Sun**, S.M. Methods in plant molecular biology and agricultural biotechnology: A laboratory training manual, Asian Research and Development Center. Shanhua, Tainan, Taiwan (ROC), 1994, 94p.
236. **Tao**, Y., Xie, Z., Chen, W., Glazebrook, J., Chang H-S., et al. (2003) Quantitative nature of Arabidopsis responses during compatible and incompatible interactions with the bacterial pathogen *Pseudomonas syringae*. ***Plant Cell***, 15: 317–30.
237. **Tejchgraber**, P., Popper, L., Knorr, D. (1991) Chitosan as an elicitor for the production of chitinase, an antifungal enzyme from soybean seeds. ***Agro-Ind. Hi-Tech.***, 11 –14.
238. **Thakur**, R.P., Mathur, K. (2002) Downy mildews of India. ***Crop Prot.***, 21: 333-345.
239. **The BioPesticide Manual**. Second edition. Copping L.G. (ed.) (2001) British crop protection council. Surrey, United Kingdom.
240. **Toledo**, V. (2001) Variabilidad cultural, patogénica y sensibilidad al Metalaxyl de *P. nicotianae* Breda de Haan en el cultivo del tabaco. ***Cuba Tabaco***, 2: 19-22.
241. **Toledo**, V. y Rivas, E. (2001) Patogenicidad diferencial de *P. nicotianae* Breda de Haan en el cultivo del tabaco en Cuba. ***Cuba Tabaco***, 2: 24-29
242. **Toledo**, V. (2002) Caracterización de la variabilidad de *P. nicotianae* Breda de Haan, en el cultivo del tabaco en Cuba. ***Cuba Tabaco***, 3: 71-72.
243. **Toledo**, V. Caracterización cultural, patogénica y molecular de *Phytophthora nicotianae*, Breda de Haan, agente causal de la pata prieta del tabaco en Cuba. ***Tesis de Doctorado*** en Ciencia Agrícolas, IIT, La Habana, 2008.
244. **Torres**, M.A, Jones, J.D.G., Dangl, J.L. (2006) Reactive oxygen species signaling in response to pathogens. ***Plant Physiol.***, 141: 373-378
245. **Thomma**, B.P.H.J., Eggermont, K., Penninckx, I.A.M.A., Mauch-Mani, B., Vogelsang, R., Cammue, B.P.A., Broekaert, W.F. (1998) Separate jasmonate-dependent and salicylate-dependent defense-response pathways in Arabidopsis are essential for resistance to distinct microbial pathogens. ***Proc. Natl. Acad. Sci. USA.***, 95: 15107-15111.

246. **Trotel-Aziz**, P., Couderchet, M., Vernet, G. and Aziz, A. (2006) Chitosan stimulates defense reactions in grapevine leaves and inhibits development of *Botrytis cinerea*. **Europ. J. Plant Pathol.**, 114: 405–413.
247. **Tsigos**, I., Martinou, A., Kafetzopoulos, D., Bouriotis, V. (2000) Chitin deacetylases: new, versatile tools in Biotechnology. **TIB Tech.**, 18: 305-312
248. **Uchida**, Y., Izume, M., Ohtakara, A. **En**: “Chitin and Chitosan” (G. Skjak-Braek, T. Anthonsen y P. Sanford, eds.), Elsevier, London, 1989, pp. 373-382
249. **Ueno**, K., Yamaguchi, T., Sakairi, N., Nishi, N., Tokura, S., **En**: “Advances in Chitin Science Vol II” (A. Domard, G.A.F. Roberts y K.M. Varum, eds.), Jacques Andre Publisher, Paris, 1997, pp. 156-161.
250. **Utsunomiya**, N., Kinai, H., Matsui, Y., Takebayashi, T. (1998) The effects of chitosan oligosaccharides soil conditioner and nitrogen fertilizer on the flowering and fruit growth of purple passion fruit (*Pasiflora edulis Sims var. edulis*). **J. Japan. Soc. Hort. Sci.**, 67: 567-571.
251. **Vander**, P., Varum, K.M., Domard, A., El Gueddari, N.E., Moerschbacher, B.M. (1998) Comparison of the ability of partially N-acetylated chitosans and chitooligosaccharides to elicit resistance reactions in wheat leaves. **Plant Physiol.**, 118: 1353-1359.
252. **van Loon**, L.C. (1975) Polyacrylamide disk electrophoresis of the soluble leaf proteins from *Nicotiana tabacum* var. “Samsun” and “Samsun” NN IV. Similarity of qualitative changes of specific proteins after infection with different viruses and their relationship to acquired resistance. **Virology**, 67: 566-575.
253. **van Loon**, L.C., Antoniew, J.F. (1982) Comparison of the effects of salicylic acid and ethephon with virus-induced hypersensitivity and acquired resistance in tobacco. **Netherlands J. of Plant Pathol.**, 88: 237-256.
254. **van Loon**, L.C. Occurrence and properties of pathogenesis-related proteins. **En**: Pathogenesis-related proteins in plants. CRC Press, 1999. p. 1-19.
255. **van Loon**, L.C., Bakker, P.A.H.M. (2005) Induced systemic resistance as a mechanism of disease suppression by rhizobacteria (Chapter 2). **En**: *PGPR: Biocontrol and Biofertilization*, 39-66. Z. A. Siddiqui (ed.), Springer, Dordrecht, The Netherlands

256. **van Loon**, L.C., Rep, M., Pieterse, C.M.J. (2006) Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. ***Annu. Rev. Phytopathol.***, 44: 135-162.
257. **van Wees**, S.C.M., de Swart, E.A.M., van Pelt, J.A., van Loon, L.C., Pieterse, C.M.J. (2000) Enhancement of induced disease resistance by simultaneous activation of salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways in *Arabidopsis thaliana*. ***Proc. Natl. Acad. Sci. USA.***, 97: 8711-8716.
258. **van West**, P., Appiah, A.A., Gow, N.A.R. (2003) Advances in research on oomycete root pathogens. ***Physiol. Mol. Plant Pathol.***, 62: 99-113
259. **Vargas-Rechia**, C., Reicher, F., Sierakowski, M.R., Heyraud, A., Driguez, H., Liénart, Y. (1998) Xyloglucan octasaccharide XXLGol derived from the seeds of *Hymenaea courbaril* acts as a signaling molecule. ***Plant Physiol.***, 116: 1013-1021.
260. **Velazhahan**, R., Datta, S.K., Muthukrishnan, S. The PR-5 family: Thaumatin-like proteins. ***En: Pathogenesis-related proteins in plants***. CRC Press, 1999. p. 107-129.
261. **Véronési**, C., Pouénat, M-L., Rickauer, M. & Esquerré-Tugayé, M-T. (1999) Regulation of tobacco lipoxygenase by methyl jasmonate and fatty acids. ***C.R.Acad.Sci.Paris, Sciences de la vie/ Life Sciences***, 322: 491-497.
262. **Walker-Simmons**, M., Ryan, C.A. (1984) Proteinase inhibitor synthesis in tomato leaves. ***Plant Physiol.***, 76: 787-790.
263. **Walker**, C.A., van West, P. (2007) Zoospore development in the oomycetes. ***Fungal Biol. Reviews***, 21: 10-18
264. **Walker**, R., Morris, S., Brown, P. & Gracie, A. (2004) Evaluation of potencial for chitosan to enhance plant defence. ***En: Report of Rural Industries Research and Development Corporation, Publication Nº 4/Project Nº RS***, págs 49.
265. **Walters**, D., Boyle, C. (2005) Induced resistance and allocation costs: What is the impact of pathogen challenge? ***Physiol. Mol. Plant Pathol.***, 66: 40-44.
266. **Walters**, D., Walsh, D., Newton, A. and Lyon, G. (2005) Induced resistance for plant disease control: Maximizing the efficacy of resistance elicitors. ***Phytopathol.***, 95: 1368-1373.

267. **Way**, H. M., Kazan, K., Mitter, N., Goulter, K. C., Birch, R. G. and Manners, J. M. (2002) Constitutive expression of a phenylalanine ammonia-lyase gene from *Stylosanthes humilis* in transgenic tobacco leads to enhanced disease resistance but impaired plant growth. ***Physiol. Mol. Plant Pathol.***, 60: 275-282.
268. **Wessels**, J.G.H., Sietsma, J.H. (1981) Fungal cell walls: a survey. ***En: Plant Carbohydrates II***, Berlín, Germany, Springer-Verlag Press, Eds. Tanner W, Loewus F.A, p. 352-394, (Encyclopaedia of Plant Physiology New Series; Vol. 13 B)
269. **Wirth**, SJ, Wolf, GA (1990) Dye-labelled substrates for the assay and detection of chitinase and lysozyme activity, ***J. of Microbiol. Methods.***, 12: 197- 205.
270. **Xing**, R., Liu, S., Yu, H., Guo, Z., Wang, P., Li, C., Lia, Z., Lia, P. (2005) Salt-assisted acid hydrolysis of chitosan to oligomers under microwave irradiation. ***Carbohydr. Research***, 340: 2150–2153
271. **Xu**, J., Zhao, X., Han, X., Du, Y. (2007) Antifungal activity of oligochitosan against *Phytophthora capsici* and other plant pathogenic fungi in vitro. ***Pest. Biochem. Physiol.***, 87: 220-228
272. **Ye**, X.S., Pan, S.Q., Kuć, J. (1990) Association of pathogenesis-related proteins and activity of peroxidases,  $\beta$ -1,3-glucanase and chitinase with systemic induced resistance to blue mould of tobacco but not to systemic tobacco mosaic virus. ***Physiol. and Mol. Plant Pathol.***, 36: 523-531.
273. **Ye**, X.S., Jälfors, U., Tuzun, S., Pan, S.Q., Kuć, J. (1992) Biochemical changes in cell walls and cellular responses of tobacco leaves related to systemic resistance to blue mold (*Peronospora tabacina*) induced by tobacco mosaic virus. ***Can. J. of Botany***, 70: 49-57.
274. **Yoshikawa**, M., Tsuda, M., Takeuchi, Y. (1993) Resistance to fungal diseases in transgenic tobacco plants expressing the phytoalexin elicitor-releasing factor,  $\beta$ -1,3-endoglucanase, from soybean. ***Naturwissenschaften***, 80: 417-420.
275. **Zavala**, J.A., Patankar, A.G., Gase, K., Baldwin, I.T. (2004) Constitutive and inducible trypsin proteinase inhibitor production incurs large fitness costs in *Nicotiana attenuate*. ***Proc. of the Nat. Acad. of Sciences***, 101: 1607-1612.

276. **Zhang**, S., Du, H., Klessig, D.F. (1998) Activation of the tobacco SIP kinase by both a cell wall-derived carbohydrate elicitor and purified proteinaceous elicitors from *Phytophthora* spp. ***The Plant Cell***, 10: 435-449.
277. **Zhao**, J., Davis, L.C., Verpoorte, R. (2005) Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. ***Biotech. Advances***, 23: 283-333
278. **Zhao**, X.M., She, X.P., Du, Y.G., Liang, X.M. (2007a) Induction of antiviral resistance and stimulatory effect by oligochitosan in tobacco. ***Pesticide Biochem. and Physiol.***, 87: 78-84
279. **Zhao**, X.M., She, X.P., Yu, W., Liang, X.M. Du, Y.G., (2007b) Effects of oligochitosans on tobacco cells and role of endogenous nitric oxide burst in the resistance of tobacco to TMV. ***J. Plant Pathol.***, 89: 55-65
280. **Zheng**, L.Y., Zhu, J.F. (2003) Study on antimicrobial activity of chitosan with different molecular weights. ***Carbohydr. Polymers***, 54: 527-530.
281. **Zuppini**, A., Baldan, B., Million, R., Favaron, F., Navazio, L., Mariani, P. (2003) Chitosan induces Ca<sup>2+</sup>-mediated programmed cell death in soybean cells. ***New Phytol.***, 161: 557-568