

COMPORTAMIENTO DE INDICADORES BIOQUÍMICOS Y MOLECULARES EN UNA VARIEDAD DE TABACO COMERCIAL INDUCIDA CON COMPUESTOS DE QUITOSANA

Autores: Alejandro B. Falcón-Rodríguez¹, Daimy Costales-Menéndez¹, Marisol Ochoa-Villareal², Emmanuel Aispuro-Hernández², Miguel A. Martínez-Téllez²

¹ Grupo de Productos Bioactivos, Departamento de Fisiología y Bioquímica Vegetal, Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA), Carretera a Tapaste, Km. 3 ½, San José de las Lajas, La Habana, 32700, Cuba. alfalcon@inca.edu.cu

² Coordinación de Tecnología de los Alimentos de Origen Vegetal, Centro de Investigaciones en Alimentación y Desarrollo, AC, Carretera de la Victoria, Km 0,6, Hermosillo, Estado de Sonora, 83000, México.

Introducción

La quitosana es un polímero lineal formado por residuos de glucosamina unidos por enlaces β 1-4, cuyos grupos aminos pueden estar parcialmente acetilados. Su principal fuente de obtención es la quitina que se extrae del exoesqueleto de los crustáceos. Ambos polímeros, pero fundamentalmente la quitosana, tienen grandes aplicaciones en diversas ramas como la industria, la medicina, la cosmética, la protección del medio ambiente y la agricultura, por lo que la producción mundial de estos polímeros es de millones de toneladas (1).

En la agricultura, la quitosana y sus derivados de menor masa molar, pueden tener una amplia aplicación a partir de las potencialidades biológicas que se le han demostrado a estos compuestos, como son, una importante actividad antimicrobiana sobre el crecimiento y desarrollo de hongos, bacterias y oomycetes (2-5), la inducción de resistencia en plantas contra patógenos potenciales y la promoción del crecimiento y desarrollo de varios cultivos (2,6-8).

En la actualidad varios grupos de investigación estudian la protección de diversos cultivos con aplicaciones de quitosana. En la última década varios autores han informado de la protección del tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) contra algunos de sus principales patógenos mediante la activación de resistencia inducida, por aplicaciones con polímeros y oligómeros de quitosana (9-12), sin embargo, no se ha informado del efecto que las aplicaciones con este biopolímero pueden causar sobre enzimas y componentes del metabolismo primario. Otra pregunta aún no totalmente dilucidada es la de conocer la respuesta sistémica temporal de indicadores defensivos activados por estas y otras oligosacáginas en plantas de tabaco.

Por lo anterior, este trabajo es un primer acercamiento a ambos problemas científicos y su objetivo fue evaluar los cambios en componentes del metabolismo primario de carbohidratos y proteínas en una variedad comercial de tabaco en estadio de semillero como respuesta a dos formas de aplicación de un polímero de quitosana y su relación con la inducción de respuestas defensivas. Igualmente, se evaluó la dinámica de respuesta de indicadores defensivos en hojas de tabaco a la aplicación vía raíz de inductores de resistencia basal.

Materiales y métodos.

Se empleó un polímero de quitosana que se obtuvo mediante desacetilación básica (NaOH) de quitina de langosta cubana de calidad farmacéutica (13) por el Grupo de Productos Bioactivos del Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas. El polímero tenía una masa molecular de $1,35 \times 10^5$ g.mol⁻¹ y un grado de N-acetilación del 12%. Se preparó una disolución madre de quitosana al 1% que se diluyó con H₂O^d hasta las concentraciones deseadas en cada experimento (12).

Condiciones de crecimiento de las plántulas

Semillas de tabaco (*Nicotiana tabacum*, L.), variedad Criollo 98, fueron sembradas en cepellones conteniendo suelo ferralítico rojo mezclado con cachaza, turba ácida y turba rubia en proporción 2:4:2:0,5 (v:v), respectivamente, a pH 6,0. Las plántulas se crecieron en condiciones semicontroladas de luz/oscuridad (16/8 horas) con iluminación artificial y

temperatura diurna/nocturna (25/20°C). Se realizaron riegos diarios a los cepellones para garantizar una adecuada humedad en el sustrato y un buen crecimiento de las plantas.

Experimentación realizada:

Efecto de un polímero de quitosana sobre indicadores defensivos y del metabolismo primario en hojas de plántulas de tabaco:

Se realizaron dos experimentos. En el primero las plántulas de tabaco de 30 días de sembradas (dds), fueron asperjadas con diferentes concentraciones (0.1, 0.5, 1.0 y 2.5 g.L⁻¹) de un polímero de quitosana en dosis de entre 0.5 y 1 mL por planta. Las determinaciones bioquímicas se realizaron en las hojas de la planta a los 3 y 7 días de asperjadas (33 y 37 dds). En el segundo experimento se aplicó el polímero de quitosana al sustrato de crecimiento a razón de 1 mL por cm³ (0.1, 1.0, 2.5 y 10 g.L⁻¹) a los 25 dds. Las determinaciones bioquímicas se realizaron en las hojas a los 5 días del tratamiento (30 dds). Cada experimento se repitió dos veces y se conformaron tres muestras por tratamiento para las evaluaciones bioquímicas: β 1-3 glucanasa y fenil-alanina amonio liasa (PAL), proteínas solubles totales y carbohidratos reductores.

Dinámica de respuesta defensiva en hojas de plántulas de tabaco tratadas vía raíz con diferentes inductores de resistencia basal.

Plántulas de tabaco de 26 dds fueron aplicadas vía raíz por 1 hora según metodología descrita (12) con 0,5 g.L⁻¹ de los siguientes inductores de resistencia: Polímero de quitosana de baja masa molecular (Sigma), una mezcla de Oligoquitosanas de grado de polimerización entre 5 y 9, Spermina y una mezcla de Oligogalacturónidos con grado de polimerización menor de 7.

Se determinaron las enzimas β 1-3 glucanasa, PAL y POD en hojas de las plántulas a los 12, 24, 48 y 72 horas. El experimento se repitió dos veces y las muestras se tomaron como en el experimento anterior.

Extracción y determinación de proteínas y carbohidratos solubles de hojas de plántulas de tabaco

Se colectaron las hojas verdaderas de las plántulas de tabaco en cada tratamiento y se maceraron con nitrógeno líquido y se centrifugó el extracto según se describe en Falcón y colaboradores (12). La determinación de proteínas se realizó en el sobrenadante del extracto de hojas siguiendo una metodología micro Lowry descrita por Sun (14), mientras los carbohidratos reductores se determinaron por el método colorimétrico de Somogyi (15).

Determinación de indicadores defensivos

Para la determinación de actividad de los indicadores β 1-3 glucanasa, fenilalanina-amonio liasa (PAL) y peroxidasa (POD) se realizaron las metodologías respectivas anteriormente descritas (12).

Ánálisis estadístico de las determinaciones metabólicas y enzimáticas

En todas las determinaciones se utilizó un diseño completamente aleatorizado. Los datos resultantes se sometieron a la verificación de las premisas del ANOVA antes de realizar un análisis de varianza de Clasificación Simple a tres o cuatro réplicas por tratamiento. Las medias resultantes se compararon con la prueba de Duncan (Primer experimento) y Tukey (experimento de dinámica) para $p \leq 0.05$ en el programa Statgraphics, versión 5.1 (Statistical Graphics Corporation, 2000).

Resultados y discusión

La aspersión foliar del polímero de quitosana causó la reducción significativa de la concentración de proteínas solubles en las hojas a la concentración de 1 g.L⁻¹ a los 33 dds (3 días después de aplicado los tratamientos), sin embargo, la determinación a los 37 dds (7 días después de los tratamientos), mostró incrementos de la concentración de proteínas a concentraciones entre 0,1 y 1 g.L⁻¹ de quitosana respecto al control (Figura 1A). Al analizar el comportamiento de los carbohidratos reductores se obtuvo un resultado similar al de proteínas a los 33 dds, las mayores concentraciones (1 y 2,5 g.L⁻¹) causaron reducciones respecto al control y un incremento de la concentración de azúcares reductores a los 37 dds con las concentraciones más altas (1 y 2,5 g.L⁻¹) del polímero de quitosana (Figura 1B). Lo

anterior muestra un efecto inhibitorio sobre estos indicadores en momentos más cercanos a la aplicación y sugiere un mayor proceso de síntesis de nuevas proteínas y otros compuestos posterior a los 3 días de aplicados los tratamientos de quitosana, lo que podría estar vinculado a una mayor activación del proceso de síntesis defensiva en la planta para este período.

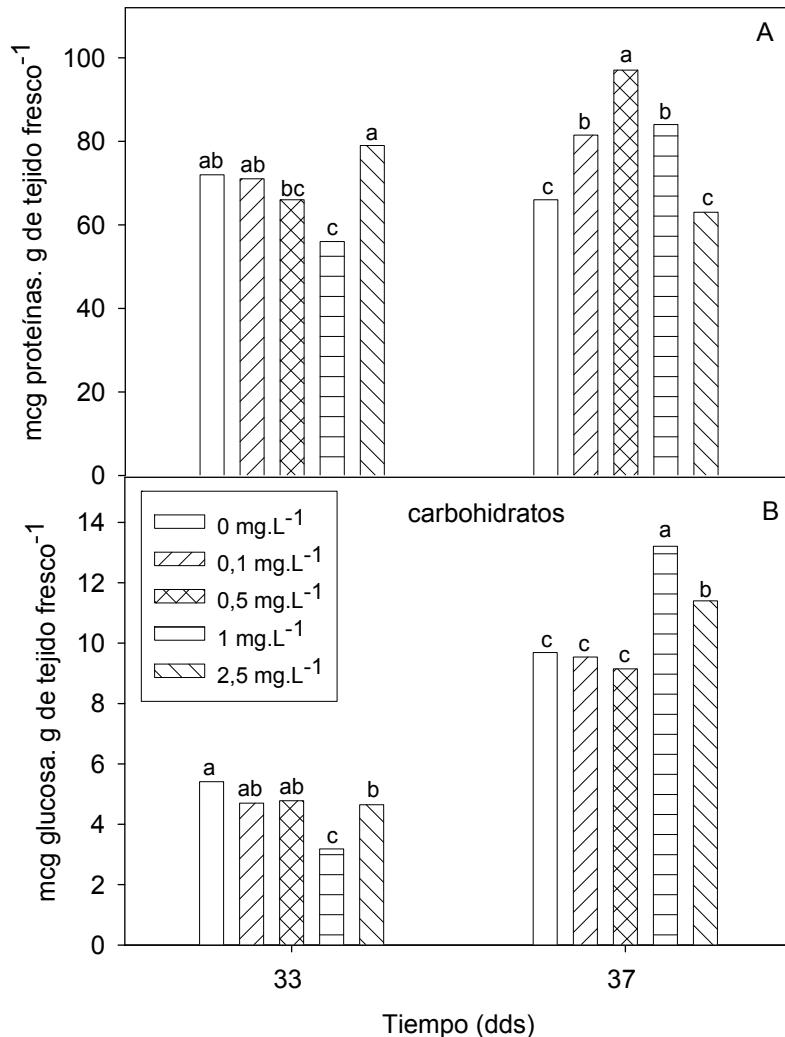


Figura 1. Efecto de la aspersión foliar del polímero de quitosana en la concentración de proteínas (A) y carbohidratos (B) en hojas a los 33 y 37 días de sembradas las plántulas de tabaco (dds). Letras iguales no difieren estadísticamente para $p<0.05$ en la Prueba de Duncan.

La actividad del indicador defensivo β 1-3 glucanasa solo mostró incrementos de actividad a los 33 dds con la concentración de quitosana de 1 g.L^{-1} (Figura 2A), obteniéndose casi el doble de la actividad del control, mientras la concentración intermedia redujo la actividad significativamente por debajo del control a los 37 dds. Incrementos y decrementos de actividad en esta enzima respecto al control fueron demostrados en tabaco, variedad Corojo, al aplicar este polímero con la misma concentración que la empleada aquí, en diferentes formas de aplicación (16).

De forma similar, la actividad PAL fue incrementada por encima del control en esta variedad de tabaco solo a los 33 dds con las concentraciones más altas ($0.5, 1$ y 2.5 g.L^{-1}) del polímero de quitosana evaluado (Figura 2B). Con anterioridad se han demostrado resultados similares a los 3 días de aplicados los tratamientos con similares concentraciones de polímeros de quitosana, pero en la variedad Corojo (11,12). No se obtuvieron diferencias

entre los tratamientos a los 37 dds, lo que demuestra una reducción de la actividad defensiva para este momento evaluado y puede estar relacionado con el comportamiento temporal y transitorio que tienen estos indicadores defensivos (17).

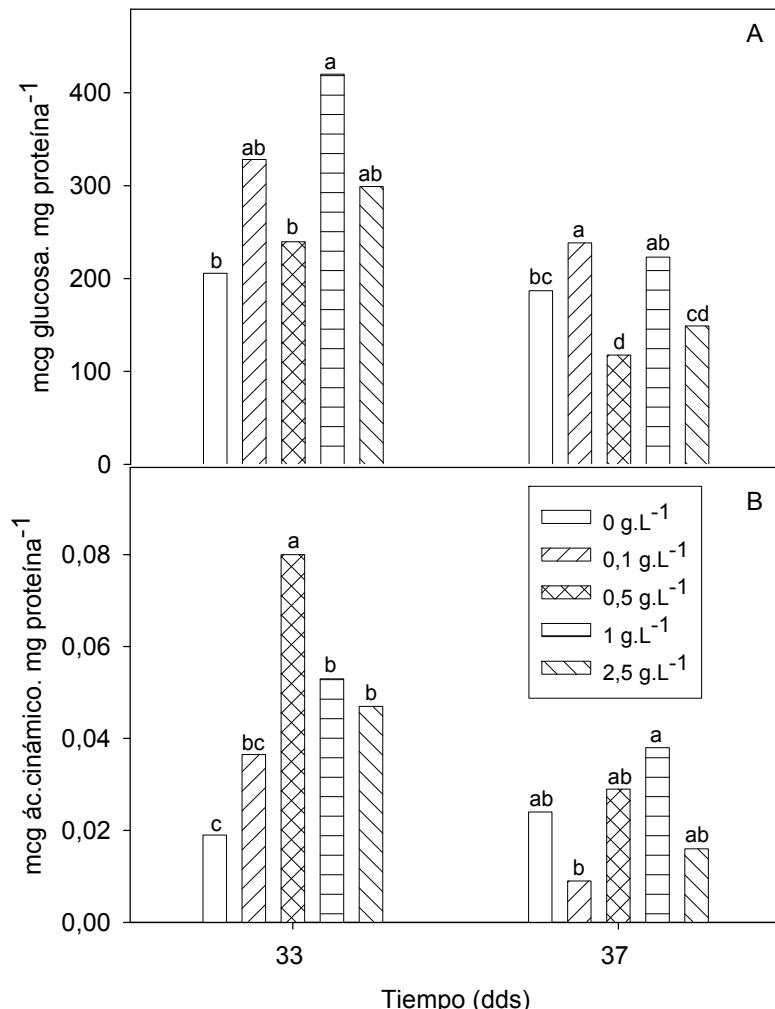


Figura 2. Efecto de la aspersión foliar del polímero de quitosana en los indicadores defensivos β 1-3 glucanasa (A) y fenilalanina-amoniolasa (B) en hojas a los 33 y 37 días de sembradas las plántulas de tabaco (dds). Letras iguales no difieren estadísticamente para $p<0.05$ en la Prueba de Duncan.

Los incrementos de actividad defensiva a los 33 dds, particularmente 1 y 2,5 g.L^{-1} coinciden con reducciones de los niveles de proteína y carbohidratos en algunos casos por debajo del control, mientras que a los 37 dds se observan incrementos por encima del control de proteínas y carbohidratos reductores con las concentraciones mencionadas y además con las otras en el caso de las proteínas sin que se detectara actividad de los indicadores defensivos determinados para este momento de evaluación. La inducción de resistencia basal en las plantas es un proceso que involucra la activación de múltiples respuestas y vías metabólicas que se ordenan en tiempo y espacio por toda la planta (18) y que demandan de precursores carbonados y energía (17,19). Por lo anterior, todas las respuestas no se activan al mismo tiempo, sino que son secuenciales y las demandas de compuestos carbonados y de energía varían con el curso de la respuesta, esto puede justificar las variaciones en la respuesta obtenida y la necesidad de ampliar las determinaciones con otros indicadores defensivos y del metabolismo que permitan establecer mejor la relación entre ambos sistemas bioquímicos y dilucidar con claridad su comportamiento en la planta como respuesta a elicidores de quitosana.

Cuando el polímero de quitosana se aplicó al sustrato de crecimiento de las plantas el comportamiento de los niveles de proteínas a los 5 días de aplicados los tratamientos no fueron diferentes del control excepto para la concentración más baja que redujo significativamente los niveles (Figura 3A). Sin embargo, los niveles de azúcares reductores en las hojas fueron drásticamente reducidos con todos los tratamientos de quitosana respecto al control, siendo las concentraciones entre 1 y 2,5 g.L⁻¹ los tratamientos de mayores reducciones (Figura 3B). Lo anterior demuestra un importante efecto de las aplicaciones de quitosana sobre los niveles de carbohidratos reductores de en las hojas de la planta, este efecto fue mucho más marcado en esta forma de aplicación, que el causado por similares concentraciones (1 y 2,5 g.L⁻¹) mediante aspersión foliar a los 33 dds, donde también se detectaron reducciones significativas respecto al control. Ambos resultados parecen indicar a los azúcares reductores como un marcador metabólico a aplicaciones de quitosanas en las plantas, por lo que sería conveniente estudiar las variaciones en el tiempo de este indicador con diferentes formas de aplicación de quitosanas.

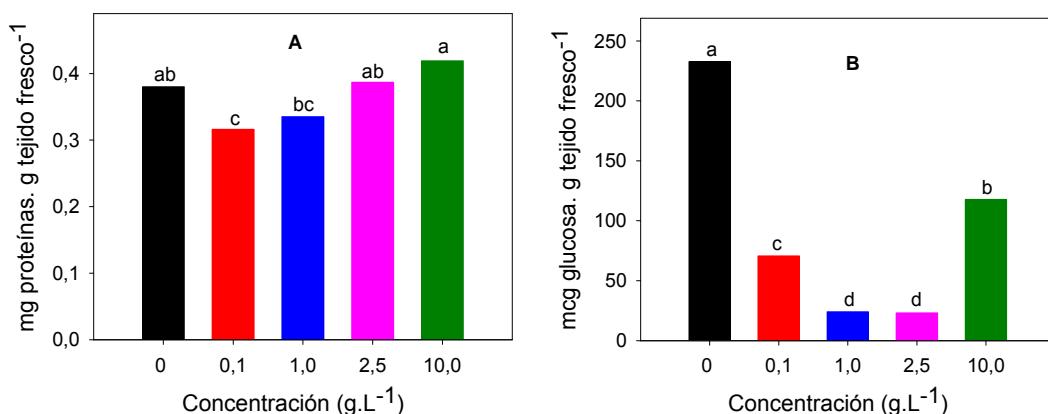


Figura 3. Efecto de la aplicación al sustrato del polímero de quitosana en la concentración de proteínas (A) y de carbohidratos reductores (B) a los 5 días de aplicados los tratamientos (30 dds). Letras iguales no difieren estadísticamente para $p<0.05$ en la prueba de Duncan.

La respuesta defensiva encontrada en este experimento, al aplicar quitosana al sustrato, permitió detectar importantes diferencias respecto al control, dependiendo de las concentraciones de quitosana aplicadas y del tipo de indicador defensivo determinado. Así, las concentraciones entre 1 y 10 g.L⁻¹ causaron importantes incrementos de actividad β 1-3 glucanasa de entre 10 y 15 veces los niveles del control (Figura 4A), mientras que solo 1 y 10 g.L⁻¹ causaron incrementos significativos de actividad fenilalanina-amonioliasa (PAL) de más de tres veces los valores del control (Figura 4B). Ambos indicadores defensivos han sido informados en tabaco en respuesta a diferentes formas de aplicaciones de quitosana, estando muy relacionados con la resistencia de esta planta contra patógenos del género *Phytophthora* (11, 16).

De los resultados de ambos experimentos se puede inferir que las respuestas bioquímicas determinadas varían tanto con las diferencias en concentraciones de quitosana como con las formas de aplicación del polímero a la planta. Es posible que la aplicación al sustrato de crecimiento cause respuestas más marcadas en el metabolismo y el sistema defensivo de la planta debido a que las raíces de esta se mantienen en contacto directo con el producto una vez hecha la aplicación hasta el momento de la determinación, mientras que la aspersión foliar, aunque es una aplicación directa sobre el órgano donde se hicieron las determinaciones, causa un contacto más puntual y puede que haya una menor entrada a la planta del compuesto activo, debido a las barreras histológicas que tiene la hoja al paso de compuestos de mayor masa molecular. En todo caso se impone profundizar en el estudio de dosis y de dinámica de respuesta que incluya indicadores defensivos, del metabolismo y el comportamiento de nutrientes esenciales en la planta.

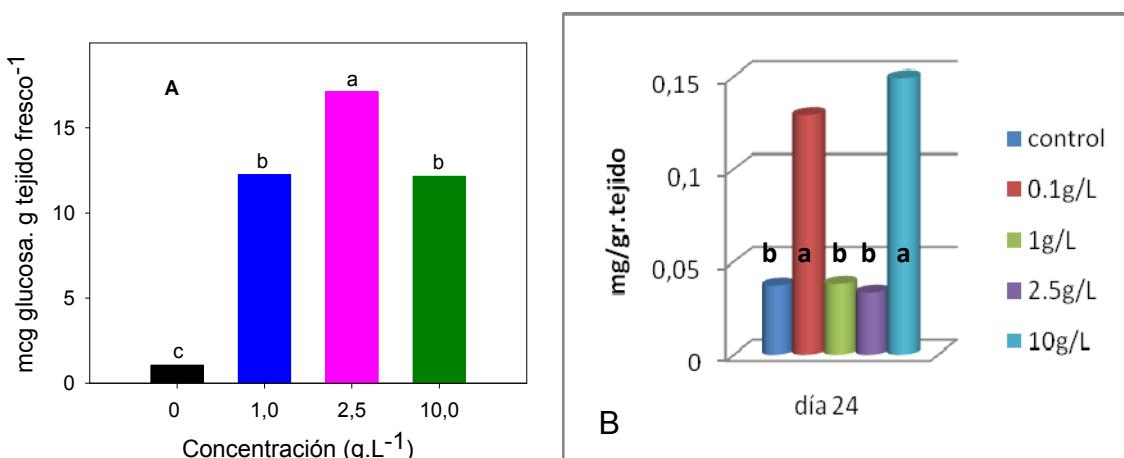


Figura 4. Efecto de la aplicación al sustrato del polímero de quitosana en los indicadores defensivos β 1-3 glucanasa (A) y fenilalanina-amoniolasa (B) en hojas de tabaco a los 5 días de aplicados los tratamientos (30 dds). Letras iguales no difieren estadísticamente para $p<0.05$ en la prueba de Duncan.

Con la ejecución de la dinámica de respuesta defensiva en hojas de plantas de tabaco tratadas vía raíz, se pudo comparar la influencia de diferentes oligosacáridos y compuestos aminados en la inducción sistémica y temporal de la acumulación de proteínas y la activación de indicadores enzimáticos. El efecto sobre la respuesta varió con el compuesto empleado y el momento de la determinación.

Los cambios en el contenido de proteínas solubles en las hojas fueron detectados desde las 12 horas de aplicados los tratamientos vía raíz. En este punto todos los tratamientos (polímero de quitosana, mezcla de oligoquitosanas, spermina y mezcla de oligogalacturónidos con grado de polimerización menor de 7) causaron incrementos superiores al control tratado con una solución de acetato de potasio (resultados no mostrados). Este comportamiento se mantuvo por encima y diferente del control a las 24 horas solo para la mezcla de oligoquitosanas, mientras que a las 48 horas los 3 compuestos excepto el polímero de quitosana causaron incrementos superiores al control, siendo máxima la actividad de las oligoquitosanas para este tiempo, ya que para las 72 horas se redujeron los niveles de actividad de esta mezcla aunque con niveles significativamente superiores al control, mientras la acumulación máxima en este tiempo fue para el polímero de quitosana y el compuesto aminado spermina. Aunque los mayores niveles de actividad se obtuvieron con los compuestos aminados como se explicó, la mezcla de oligopectatos causó incrementos por encima del control a las 48 y 72 horas.

La actividad guayacol peroxidasa varió con los compuestos y el tiempo (resultados no mostrados). Los compuestos de menor masa molar (oligoquitosanas, oligopectatos y spermina) incrementaron la actividad POD a las 12 horas por encima del control y del polímero de quitosana, que no fue superior y diferente del control hasta las 24 horas con un incremento de actividad sostenida hasta las 72 horas cuando duplicó la actividad del control. Para este momento, todos los tratamientos fueron superiores al control, pero los compuestos de menor masa fueron inferiores en actividad enzimática al polímero.

El comportamiento de la actividad PAL fue diferente al de la POD. Se detectaron dos picos de incrementos de actividad para las oligoquitosanas a los 12 y 48 horas (resultados no mostrados). A las 12 horas se obtuvo similares incrementos también con el polímero de quitosana, sin embargo a las 48 horas hubo, además, incrementos superiores al control, pero menores al de las oligo-quitosanas, con la spermina y los oligopectatos. En todo caso, a las 72 horas todos los tratamientos fueron significativamente superiores al control aunque diferentes entre ellos.

El comportamiento de la actividad β 1-3 glucanasa fue bastante parecido al de la actividad PAL (resultados no mostrados). Se detectaron dos picos de incremento de actividad de diferentes niveles. A las 12 horas, los compuestos aminados fueron superiores al control y los oligogalacturónidos. Un segundo pico muy superior fue detectado a las 48 horas, pero esta vez para las oligoquitosanas y la spermina y el único máximo sobre el control para los oligopectatos, mientras que el segundo pico de incremento para el polímero ocurrió a las 72 horas con máxima actividad también para la spermina.

Al analizar la dinámica anterior se puede concluir que la aplicación vía raíz de plántulas de tabaco con inductores de resistencia del tipo oligosacarinas permite detectar respuestas defensivas sistémicas en las hojas desde las 12 horas de la aplicación siendo mayores y de más importancia para la resistencia basal contra patógenos a las 48 y 72 horas dependiendo del tipo de indicador defensivo determinado y de las características del inductor utilizado. De los resultados de las enzimas y los contenidos de proteínas solubles, el polímero de quitosana necesita de 72 horas para causar los mayores incrementos de proteínas defensivas, mientras que la mezcla de oligoquitosanas, de menor masa molecular que el polímero, causa los mayores incrementos a las 48 horas. Esta diferencia temporal puede ser crítica en la protección del cultivo contra infecciones patogénicas. Con anterioridad fue demostrada la diferencia entre polímeros y oligómeros de quitosana a favor de estos últimos en cuanto a la concentración necesaria para inducir los niveles mayores de respuesta defensiva (16).

La diferencia de inducción defensiva, tanto como resultado de la concentración como del tiempo necesario para la propia activación defensiva, puede estar relacionada con la diferencia de percepción de ambos compuestos a nivel de la membrana, que puede diferenciarse tanto porque causen diferentes interacciones con la membrana (interacción de cargas o con receptores proteicos) como por las diferencias del paso de ambos compuestos al penetrar las raíces, donde la diferencia de masa molecular juega un papel importante. Estos estudios son de gran actualidad y se han demostrado fundamentalmente para aplicaciones foliares (16, 20).

Conclusiones principales

- La inducción por quitosana tanto de indicadores defensivos como del metabolismo es dependiente de la concentración del elicitor, del momento de la determinación y de la forma de aplicación de este polímero a las plantas.
- La activación defensiva por quitosana en las hojas de tabaco parece estar vinculada con la reducción del contenido de carbohidratos reductores en este órgano, principalmente cuando la aplicación del elicitor se hace al sustrato de las plantas en crecimiento.
- La activación defensiva en hojas de tabaco por oligosacarinas es detectable desde las 12 horas de aplicado el tratamiento a las raíces de la planta y es máxima entre las 48 y 72 horas, en dependencia de la oligosacarina aplicada.
- La activación máxima defensiva difiere entre polímeros y oligómeros de quitosana.

Referencias

1. Prashanth, KVH., Tharanathan, RN. Chitin/chitosan: modifications and their unlimited application potential-an overview. *Trends in Food Science & Tech.*, vol. 18: 117-131, 2007
2. Bautista-Baños S., Hernández-Lauzardo A.N., Velázquez-del Valle M.G., Hernández-López M, Ait Barka E., Bosquez-Molina E., Wilson C.L. Chitosan as a potential natural compound to control pre and postharvest diseases of horticultural commodities. *Crop Protection*, vol. 25: 108-118, 2006.
3. Xu, J., Zhao, X., Han, X., Du, Y. Antifungal activity of oligochitosan against *Phytophthora capsici* and other plant pathogenic fungi in vitro. *Pest. Biochem. Physiol.*, vol. 87: 220-228, 2007.
4. 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. *Carbohyd. Polymers*, vol. 73: 541–547, 2008.
- 5. Palma-Guerrero, J. Huang, I.-C. Jansson, H.-B. Salinas, J. Lopez-Llorca, L.V. Read, N.D. Chitosan permeabilizes the plasma membrane and kills cells of *Neurospora crassa* in an energy dependent manner. *Fungal Gen. Biol.*, vol. 46: 585–594, 2009.
 - 6. Ohta, K., Morishita, S., Suda, K., Kobayashi, N. and Hosoki, T. Effects of chitosan soil mixture treatment in the seedling stage on the growth and flowering of several ornamental plants. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.*, vol. 73: 66-68, 2004.
 - 7. Trotel-Aziz, P., Couderchet, M., Vernet, G. and Aziz, A. Chitosan stimulates defense reactions in grapevine leaves and inhibits development of *Botrytis cinerea*. *Europ. J. Plant Pathol.*, vol., 114: 405–413, 2006.
 - 8. Ramos-García, M., Ortega-Centeno, S., Hernández-Lauzardo, A.N., Alia-Tejacal, I., Bosquez-Molina, E., Bautista-Baños, S. Response of gladiolus (Gladiolus spp) plants after exposure corms to chitosan and hot water treatments. *Scientia Horticulturae*, vol. 121: 480–484, 2009.
 - 9. Iriti, M., Sironi, M., Gomarasca, S., Casazza, A.P., Soave, C., Faoro, F. Cell death-mediated antiviral effect of chitosan in tobacco. *Plant Physiol. Biochem.*, vol. 44: 893-900, 2006.
 - 10. Zhao, X.M., She, X.P., Du, Y.G., Liang, X.M. Induction of antiviral resistance and stimulatory effect by oligochitosan in tobacco. *Pesticide Biochem. and Physiol.*, vol. 87: 78–84, 2007.
 - 11. Falcón, AB, Cabrera, JC, Costales, D, Ramírez, MA, Cabrera, G, Toledo, V, Martínez-Téllez, MA The effect of size and acetylation degree of chitosan derivatives on tobacco plant protection against *Phytophthora parasitica nicotianae*. *World J. Microbiol Biotech*, 24: 103-112, 2008.
 - 12. Falcón-Rodríguez, A.B., Cabrera, J.C., Ortega, E., Martínez-Téllez, M.A. Concentration and physicochemical properties of chitosan derivatives determine the induction of defense responses in roots and leaves of tobacco (*Nicotiana tabacum*) plants. *Am. J. Agric. Biol. Sciences*, 4: 192-200, 2009.
 - 13. Falcón, A.B., Cabrera, J.C., Reinaldo, I.M., Nuñez, M.N. Desarrollo de activadores de las plantas de amplio espectro de acción. *Informe Final del PNCT 00100191*, CITMA, 2005.
 - 14. 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.
 - 15. Somogyi, M. Notes on sugar determination. *J. Biol. Chem.*, 1952, vol. 195: 19-23.
 - 16. Falcón, A.B. 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 de Doctorado* en Ciencia Biológicas, UH, La Habana, 2009.
 - 17. van Loon, L.C.; Rep, M.; Pieterse, C.M.J. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annu. Rev. Phytopathology*, vol. 44:135-162, 2006.
 - 18. Agrios, G.N. How plants defend themselves against pathogens (Chapter six). *En: Plant Pathology*. 5th ed. Academic Press, New York, USA, 2005, pág. 208.
 - 19. Heil, M. y Walters, D.R. Ecological Consequences of Plant Defence Signalling. *En: L. C. Van Loon editor: Advances in Botanical Research*, vol. 51, Burlington: Academic Press, 2009, pág.667-716.
 - 20. Zhao, X.M., She, X.P., Yu, W., Liang, X.M. Du, Y.G., (2007) 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