

# EFECTO DE DERIVADOS DE QUITOSANA EN LA SIMBIOSIS *Bradyrhizobium*-SOYA

Daimy Costales<sup>✉</sup>, María C. Nápoles y A. Falcón

**ABSTRACT.** The influence of polymer chitosan and its partially hydrolyzed derivatives was studied through an *in vitro* assay on different variables that characterize soybean nodulating process. In all cases, chitosans applied by means of seed imbibition caused a similar or superior effect to those applied directly to plant culture medium on the nodulating variables evaluated. Chitosan hydrolyzed for 24 hours showed the best results when inducing nodulation (without statistical differences with polymer chitosan) as well as nodular mass increment, probably because of the appearance of smaller chitosan fragments with biological activity as a result of hydrolysis. Chitosan hydrolyzed for 48 hours showed a positive effect only for the dry biomass of nodules. This behavior was probably due to the degradation of smaller fragments with biological activity derived from 24 hours of hydrolysis.

**Key words:** *Bradyrhizobium*, soybean, chitosan, symbiosis

**RESUMEN** En el trabajo se estudió, mediante un ensayo *in vitro*, la influencia de quitosana polímero y sus derivados parcialmente hidrolizados sobre diferentes variables que caracterizan la nodulación de la soya. En todos los casos, las quitosanas aplicadas mediante imbibición de las semillas ejercieron un efecto similar o superior a aquellos aplicados por adición directa al medio de cultivo, sobre las diferentes variables de nodulación evaluadas. La quitosana hidrolizada por 24 horas presentó los mejores resultados en la inducción de la nodulación (aunque sin diferencias con la quitosana polímero) y en el incremento de la masa nodular, posiblemente vinculado a la aparición por la hidrólisis de fragmentos de quitosana de menor tamaño con actividad biológica. La quitosana hidrolizada por 48 horas tuvo un efecto positivo solo en la biomasa seca de los nódulos. Este comportamiento pudo deberse a la degradación de los fragmentos menores con actividad biológica originados hasta las 24 horas de hidrólisis.

**Palabras clave:** *Bradyrhizobium*, soya, quitosana, simbiosis

## INTRODUCCIÓN

De manera natural se establece una asociación simbiótica entre las plantas leguminosas y las bacterias de la familia *Rhizobiaceae* que habitan el suelo. En este proceso, ambos simbiosistas se benefician y es el resultado de complejas interacciones moleculares que se establecen entre la planta y el microorganismo, las cuales dan lugar a la formación de los nódulos (1, 2). Numerosos factores influyen en el éxito de la interacción, pero se plantea que la producción de factores de nodulación por la bacteria constituye una clave esencial en el éxito de esta simbiosis (3).

Se conoce, además, que la estructura de los factores de nodulación consiste en un esqueleto de N-acetil glucosamina, ramificado con toda una gama de sustituyentes que son específicos para cada interacción especie de leguminosa-cepa de bacteria (4). Se ha demostrado que dichas estructuras tienen un papel en la estimulación de la división celular y la morfogénesis en el sistema radical de leguminosas (5, 6), y se ha sugerido que la parte oligosacárida de la estructura del factor Nod

es la responsable de inducir las divisiones celulares de las células corticales de la raíz (7).

La quitosana es el derivado desacetilado de la quitina, un polímero de N-acetil-glucosamina que se extrae del exoesqueleto de los crustáceos; una fuente muy rica y explotada de estos compuestos, aunque en condiciones naturales, se encuentra además en las paredes celulares de muchas especies de hongos y en la cutícula de insectos y arácnidos (8).

Entre los efectos biológicos de la quitosana y sus derivados se encuentra la inhibición del crecimiento de hongos fitopatógenos (9, 10) y la protección de las plantas contra enfermedades causadas por virus, bacterias y hongos (11). Adicionalmente, son considerados reguladores del crecimiento de las plantas, ya que ejercen una influencia probada en el crecimiento vegetativo y radical de estas (12, 13), acortan el período de la floración y mejoran la floración y fructificación (14, 15) e incrementan los rendimientos, especialmente mediante tratamiento previo de las semillas (12, 16).

Tomando en cuenta que las respuestas biológicas de la planta dependen de la masa molecular de la quitosana (17), el objetivo de este trabajo fue estudiar la influencia de la masa molecular de la quitosana en interacción con el simbionte *Bradyrhizobium elkanii* sobre la nodulación *in vitro* del cultivo de la soya (*Glycine max* (L.) Merrill).

Daimy Costales, Reserva Científica, Dra.C. María C. Nápoles y Ms.C. A. B. Falcón, Investigadores Agregados del Departamento de Fisiología y Bioquímica Vegetal, Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, San José de las Lajas, Gaveta Postal 1, La Habana, Cuba. CP 32700.

✉ daimy@inca.edu.cu

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Material microbiano.** Para el desarrollo del trabajo se utilizó la cepa *Bradyrhizobium elkanii* ICA 8001 (hasta hace poco tiempo conocida como *Bradyrhizobium japonicum* ICA 8001) (18), la cual fue cultivada en medio Bradyfact (19), en condiciones de agitación a 30°C, durante 56 horas (20).

**Material vegetal.** Se emplearon semillas certificadas de la variedad de soya INCASOY-27 procedente del banco de germoplasma del INCA. Las plantas fueron cultivadas en dependencia de las condiciones de cada ensayo.

**Preparación de las quitosanas parcialmente hidrolizadas.** La quitosana polímero se obtuvo mediante desacetilación básica de quitina de langosta calidad farmacéutica, según la metodología descrita (21). Las soluciones de quitosana fueron hidrolizadas enzimáticamente durante 24 y 48 horas con Pectinex Ultra SP-L. A cada producto utilizado en el bioensayo se le determinó la viscosidad en un viscosímetro Ostwald de constante viscosimétrica  $k=0.1$  y la concentración de azúcares con extremos reductores mediante la técnica de Nelson (22).

**Ensayo de nodulación in vitro.** Se realizó el experimento en condiciones controladas, empleando un diseño completamente aleatorizado con descomposición en los factores producto y forma de aplicación, con ocho y dos niveles respectivamente. Se emplearon 10 plantas por tratamiento y se comparó el efecto de diferentes tiempos de hidrólisis de la quitosana a la concentración de 1000 mg.L<sup>-1</sup>, así como su aplicación mediante imbibición de las semillas y directamente en el medio de cultivo donde creció la planta.

Las semillas se desinfectaron previamente en etanol al 70 % durante cinco minutos y posteriormente en hipoclorito de sodio al 25 % (v/v) por el mismo tiempo. Se enjuagaron seis veces con agua destilada y se dejaron reposar por una hora en las soluciones estériles que contenían los diferentes tratamientos. Posteriormente, se colocaron en placas de Petri sobre medio Agar-agua a 30°C durante tres días para su germinación (bioensayo de imbibición). Para el bioensayo donde se aplicaron los productos al medio de cultivo de las plantas, las semillas fueron colocadas directamente en placas de Petri para su germinación.

Una vez pregerminadas, las semillas con aproximadamente 20 mm de raíz emergente fueron colocadas en tubos de ensayo que contenían 30 mL de medio Norris y Date semisólido (23), a razón de una semilla por tubo. Las raíces de las plántulas se inocularon siete días después, descargando con micropipeta 1 mL del inóculo obtenido con la cepa ICA 8001 en medio líquido Bradyfact a una concentración celular de 10<sup>8</sup> UFC.mL<sup>-1</sup> en cámara Neubauer. Un tratamiento sin inocular se utilizó como control en cada ensayo.

Las plantas se cultivaron en condiciones de luz/oscuridad de 16/8 horas, a una temperatura de 25°C y humedad relativa del 70 % (24). Cuatro semanas después

de la inoculación, se determinaron las variables número de nódulos por planta, masa fresca y seca de los nódulos, así como la efectividad nodular, siguiendo el método visual de la eficiencia de los nódulos (25). El experimento se repitió dos veces.

Los datos se sometieron a la prueba de normalidad y homogeneidad de varianza y se aplicó análisis de varianza, utilizando la prueba de rangos múltiples de Duncan ( $p<0.05$ ) para discriminar diferencias entre medias. Se procesaron mediante el paquete estadístico SPSS versión 10.

Los niveles del factor producto fueron los siguientes:

T1- Testigo sin aplicación (To)

T2- Inóculo de *B. elkanii* (Be)

T3- Be+Q-0h

T4- Be+QH-24h

T5- Be+QH-48h

T6- Q-0h

T7- QH-24h

T8- QH-48h

Q-0h: Quitosana sin hidrolizar

QH-24h: Quitosana parcialmente hidrolizada durante 24 horas

QH-48h: Quitosana parcialmente hidrolizada durante 48 horas

Los niveles del factor forma de aplicación fueron:

1. Imbibición de semillas

2. Adición directa al medio de cultivo de las plantas.

## RESULTADOS

Algunas de las características distintivas de los derivados de quitosana obtenidos en el proceso de hidrólisis del polímero nativo (Q-0h) se muestran en la Tabla I.

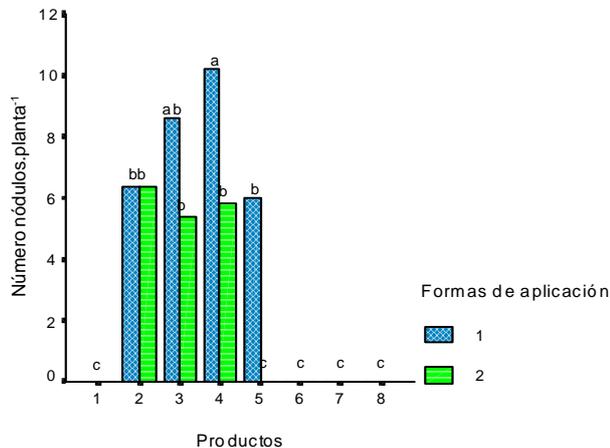
**Tabla I. Características distintivas de las quitosanas parcialmente hidrolizadas en relación con el polímero nativo**

Quitosana parcialmente hidrolizada	Porcentaje de viscosidad (%)	Concentración de extremos reductores (ug de glucosamina.mL <sup>-1</sup> x 10 <sup>-3</sup> )
QH-24 horas	26.1	86.44
QH-48 horas	24.6	200.36

Como se puede apreciar, tanto el QH-24h como el QH-48h disminuyeron la viscosidad original del polímero en 74 y 75 %, respectivamente. Sin embargo, el incremento de extremos reductores fue más del doble en el QH-48h en relación con el QH-24h. Lo anterior indica que entre 24 y 48 horas de hidrólisis, aunque hubo una degradación importante de los productos, esta ocurrió fundamentalmente sobre los fragmentos de menor tamaño que no contribuyen a la viscosidad de la solución de quitosana.

Los resultados del análisis estadístico del ensayo de nodulación para los diferentes caracteres estudiados demostraron que hubo interacción entre los productos evaluados y sus formas de aplicación. El ensayo se repitió dos veces con similares resultados.

Al analizar los diferentes productos y formas de aplicación en cuanto al número de nódulos desarrollados, la quitosana polímero (Q-0 h) y su derivado de 24 horas (QH-24 h) mostraron los mejores resultados cuando ambos se aplicaron a la semilla por imbibición (Figura 1), mientras que la quitosana hidrolizada por 48 horas no se diferenció del inóculo solo, para igual forma de aplicación del producto, pero fue superior a los tratamientos sin inóculo (T1, T6, T7 y T8).



Letras comunes no se diferencian estadísticamente para  $p < 0.05$   
T1- (To), T2- (Be), T3- Be+Q-0h, T4- Be+QH-24h,  
T5- Be+QH-48h, T6- Q-0h, T7- QH-24h, T8- QH-48h

**Figura 1. Número de nódulos desarrollados cuando los productos se aplicaron mediante imbibición de las semillas (nivel 1) o por adición al medio de cultivo donde crecieron las plantas (nivel 2)**

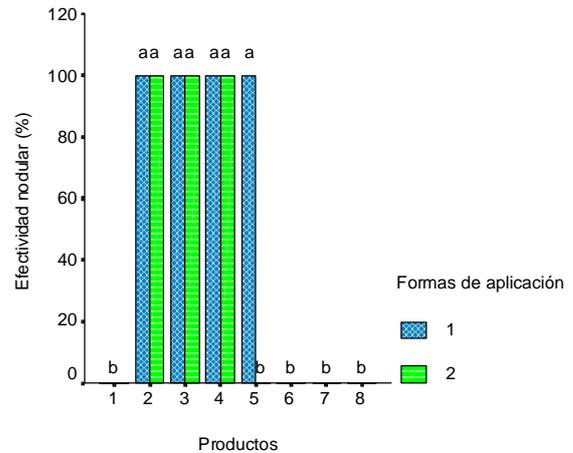
Cuando los diferentes productos se adicionaron directamente al medio de cultivo de la planta, se encontró que los tratamientos T3 (Q-0 h) y T4 (QH-24 h) no se diferenciaron estadísticamente del inóculo *Bradyfact* solo (T2), aunque fueron superiores al T5 (QH-48 h) y a los tratamientos sin inóculo. La quitosana hidrolizada 48 h (T5) mostró los resultados inferiores, sin diferencias con los tratamientos sin inoculación y disminuyó el efecto ejercido en relación con el de 24 h, lo que significa que una mayor exposición a la hidrólisis enzimática afectó negativamente la influencia de este producto en la nodulación.

Resulta lógico que aquellos tratamientos sin inóculo ofrecieran los resultados inferiores, teniendo en cuenta que solo la presencia de *Bradyrhizobium* o de los factores de nodulación como resultado de su fermentación pueden ser responsables de la inducción nodular (24).

En la variable efectividad nodular (Figura 2), todos los nódulos desarrollados en el sistema radical de las plantas fueron efectivos.

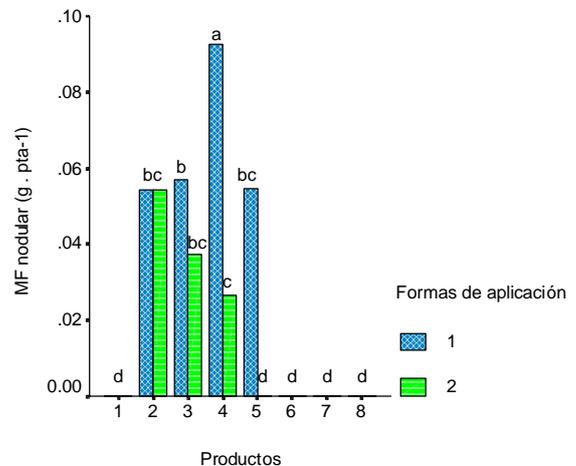
El análisis de la masa fresca de los nódulos (Figura 3) destacó marcadamente el efecto del T4 (QH-24 h) aplicado a la semilla, el cual mostró valores superiores en todos los tratamientos. El hecho de que T4 (QH-24 h) no mostrara diferencias significativas con el T3 (Q-0 h) en

cuanto a número de nódulos, y que se diferenció para esta variable, indica que los nódulos desarrollados en el T4 tuvieron un mayor tamaño.



Letras comunes no se diferencian estadísticamente para  $p < 0.05$   
T1- (To), T2- (Be), T3- Be+Q-0h, T4- Be+QH-24h,  
T5- Be+QH-48h, T6- Q-0h, T7- QH-24h, T8- QH-48h

**Figura 2. Efectividad de los nódulos desarrollados cuando los productos se aplicaron mediante imbibición de las semillas (nivel 1) o por adición al medio de cultivo donde crecieron las plantas (nivel 2)**

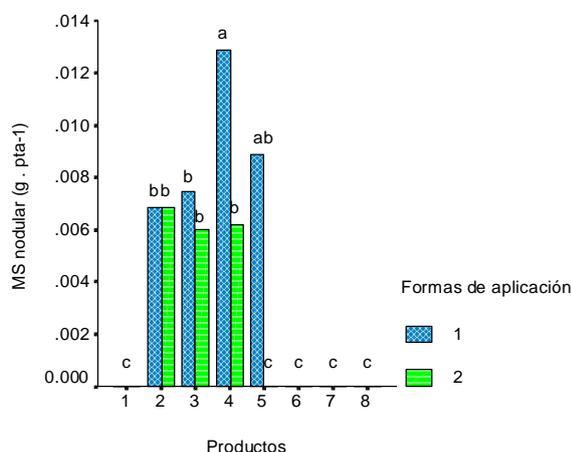


Letras comunes no se diferencian estadísticamente para  $p < 0.05$   
T1- (To), T2- (Be), T3- Be+Q-0h, T4- Be+QH-24h,  
T5- Be+QH-48h, T6- Q-0h, T7- QH-24h, T8- QH-48h

**Figura 3. Efecto de los diferentes productos aplicados mediante imbibición de las semillas (nivel 1) o por adición al medio de cultivo donde crecieron las plantas (nivel 2) en la masa fresca de los nódulos desarrollados**

El inóculo bacteriano solo (T2), la quitosana polímero y el derivado de quitosana de 48 h (T3 y T5) no se diferenciaron entre sí, aunque todos fueron superiores al control sin inoculación. Cuando se aplicaron los productos al medio de cultivo de la planta, igualmente los resultados fueron inferiores.

Un comportamiento similar al de la masa fresca se observó en los resultados de la masa seca de los nódulos por planta (Figura 4), donde para la aplicación de los productos mediante imbibición de la semilla, resaltó nuevamente el QH-24 h, aunque esta vez no difirió estadísticamente del mayor tiempo de hidrólisis (T5). Los nódulos desarrollados en este tratamiento (T4) tienen mayor masa y puede deberse fundamentalmente a un mayor contenido en bacteroides.



Letras comunes no se diferencian estadísticamente para  $p < 0.05$   
 T1- (To), T2- (Be), T3- Be+Q-0h, T4- Be+QH-24h,  
 T5- Be+QH-48h, T6- Q-0h, T7- QH-24h, T8- QH-48h

**Figura 4. Efecto de los diferentes productos aplicados mediante imbibición de las semillas (nivel 1) o por adición al medio de cultivo donde crecieron las plantas (nivel 2) en la masa seca de los nódulos desarrollados**

Para ambas formas de aplicación de los productos se obtuvieron resultados similares para el inóculo bacteriano, la quitosana polímero y el derivado de quitosana de 24 h, este último cuando se adicionó directamente al medio de cultivo de las plantas.

## DISCUSIÓN

Los resultados de este ensayo permitieron seleccionar a la QH-24 h como la mejor de los derivados de quitosana empleados. El efecto positivo encontrado con este hidrolizado pudiera explicarse si se tiene en cuenta que la estructura de los factores de nodulación producidos por los diferentes rizobios, contiene básicamente un oligosacárido de quitina y que se le confiere a esta parte de la molécula un papel importante en la determinación de su actividad biológica (7). La hidrólisis del polímero de quitosana permitió obtener fragmentos que pudieron incrementar la percepción de la señal por la planta dirigida a la mayor formación de nódulos. Sin embargo, un incremento del tiempo de hidrólisis por encima de las 24 horas, al parecer, provocó la degradación de aquellos fragmentos mejor percibidos por la planta (Tabla I).

En general, la quitosana hidrolizada hasta 24 h arrojó los mejores resultados tanto en la formación de los nódulos (aunque sin diferencias estadísticas con la quitosana polímero) como en el incremento de la biomasa nodular. Estas diferencias pueden deberse a la aparición de fragmentos de menor tamaño con actividad biológica, como resultado de la degradación del polímero de quitosana (Tabla I) y demostrado por la reducción en un 74 % de la viscosidad relativa inicial de la solución y por el incremento de extremos reductores en ella.

Al continuarse la hidrólisis hasta 48 h, se evidenció un incremento de la aparición de extremos reductores, sin reducción apenas de la viscosidad, en relación con las 24 h de hidrólisis, lo que implica que la degradación continuó fundamentalmente sobre los fragmentos menores aparecidos hasta las 24 horas, los cuales no contribuyen a la viscosidad de la solución (25).

Se ha comprobado que la degradación de quitosana con Pectinex Ultra SP-L ocurre mediante una acción endohidrolítica sobre la fracción de la cadena polimérica carente de grupos acetilos<sup>1</sup>, por lo que la poca disminución de la viscosidad entre 24 y 48 horas puede deberse a la presencia de espacios acetilados en el polímero de quitosana, que impiden su degradación por el complejo enzimático.

La presencia, por ende, de los oligómeros de quitosana producto de la hidrólisis en el entorno de la semilla y el inóculo, pudiera constituir una señal que incremente la respuesta de la interacción simbiótica. Al resultar estructuralmente similares estos compuestos a los factores Nod, pudieran inducir en la plántula la producción de mayores concentraciones de flavonoides u otros inductores de los genes *nod* en la bacteria, lo que se traduciría en la síntesis de mayor cantidad de estos morfógenos y finalmente en una nodulación mejor (26).

La forma de aplicación por imbibición de las semillas fue la vía más efectiva de accionar estos productos con el Bradyfact, comparado con la adición de estos en el medio de cultivo de la planta. Es conocido el efecto inhibitorio de la quitosana y sus oligómeros a concentraciones por encima de  $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  en el crecimiento de diferentes microorganismos, fundamentalmente hongos fitopatógenos (9), aunque también se han informado resultados similares en algunos grupos de bacterias (27, 28). El crecimiento de la cepa ICA 8001 en medio Bradyfact conteniendo quitosana a la concentración de  $1000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  redujo el crecimiento del microorganismo en relación con el control sin quitosana (datos no mostrados), lo que confirma la explicación anterior.

Hasta el momento, este es el primer estudio acerca del efecto de la quitosana y sus derivados sobre parámetros de la nodulación en leguminosas. Resulta válida la utilización de quitosana o sus oligómeros como aditivos de bioinoculantes para incrementar el proceso de nodulación de la soya. Sin embargo, es importante tener en cuenta la concentración y forma de aplicación más convenientes.

<sup>1</sup>Cabrera, J. C., comunicación personal, INCA, 2004

## REFERENCIAS

1. Stougaard, J. Regulators and regulation of legume root nodule development. *Plant Physiol.*, 2000, no. 124, p. 531-540.
2. Madigan, M.; Martinko, T. J. M. y Parker, J. Brock biology of microorganisms. Tenth Edition. Prentice Hall. Pearson Education, Inc. NJ, 2003.
3. Hadri, A. E. y Bisseling, T. Responses of the plant to Nod factors. En: *The Rhizobiaceae*, molecular biology of model plant-associated bacteria. 1998, p. 1102-1156.
4. Spaink, H. P. Root nodulation and infection factors produced by rhizobial bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.*, 2000, no. 54, p. 257-288.
5. Diaz, C.; Spaink, H. P. y Kijne, J. W. Heterologous rhizobial lipochitin oligosaccharides and chitin oligomers induce cortical cell divisions in red clover roots, transformed with the pea lectin gene. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 2000, vol. 13, p. 268-276.
6. Kendra, D. F. y Hadwiger, L. A. Characterization of the smallest chitosan oligomer that is maximally antifungal to *Fusarium solani* and elicits pisatin formation in *Pisum sativum*. *Exp. Mycol.*, 1984, vol. 8, p. 276-281.
7. Schlaman, H. R. M.; Gisel, A. A.; Quaedvlieg, N. E. M.; Bloemberg, G. V.; Ben, J. J. Lugtenberg, B. J. J.; Kijne, J. W.; Potrykus, I.; Spaink, H. P. y Sautter, C. Chitin oligosaccharides can induce cortical cell division in roots of *Vicia sativa* when delivered by ballistic microtargeting. *Development*, 1997, vol. 124, no. 23, p. 4887-4893.
8. Leffler, M. Chitin breakdown: The bacterial way. 15(2). March-April 1997. Eds: *Chitin-Sea Maryland*. Consultado [8-1-2002]. Disponible en: <<http://www.mdsg.umd.edu/MarineNotes/Mar-Apr.97/side1.html>>.
9. Laflamme, P.; Benhamou, N.; Bussi eres, G. y Dessureault, M. Differential effect of chitosan on root rot fungal pathogens in forest nurseries. *Can. J. Bot.*, 1999, vol. 77, p. 1460-1468.
10. Park, R.; Kyu-Jong, J.; You-Young, J.; Yu-Lan, J.; Kil-Yong, K.; Jae-Han, S. y Yong-Woong, K. Variation of anti-fungal activities of chitosans on plant pathogens. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2002, vol. 12, p. 84-88.
11. Pospieszny, H. Potential use of chitosan in plant protection. En: Struszczyk H, Pospieszny H, Gamzazade A, eds. *Chitin and Chitosan. Polish and Russian monograph*. Polish Chitin Society, 1999, vol. 1, p. 115-130.
12. Hadwiger, L. A. Method for treating cereal crop seed with chitosan to enhance yield, root growth and stem strength. Canadian Patent, 1989.
13. Chibu, H.; Shibayama, H.; Arima, S. Effects of chitosan application on the shoot growth of rice and soybean. *Japanese Journal of Crop Science*, 2002, vol. 71, no. 2, p. 206-211.
14. Ohta, K.; Morishita, S.; Suda, K.; Kobayashi, N. y 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.*, 2004, vol. 73, no. 1, p. 66-68.
15. Utsunomiya, N.; Kinai, H.; Matsui, Y. y Takebayashi, T. 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.*, 1998, vol. 67, p. 567-571.
16. Freepons, D. Plant growth regulators derived from chitin. United States Patent 4964894, 1990, October 23.
17. Vander, P.; Varum, K. M.; Domard, A.; El Gueddari, N. E. y Moerschbacher, B. M. Comparison of the ability of partially N-acetylated chitosans and chitoooligosaccharides to elicit resistance reactions in wheat leaves. *Plant Physiol.*, 1998, vol. 118, p. 1353-1359.
18. Nápoles, M. C. Induccin de la nodulacin en soya (*Glycine max* (L.) Merrill) por *Bradyrhizobium* sp. Influencia del medio de cultivo. [Tesis de grado]; Universidad de La Habana, 2003. 97 h.
19. Nápoles, M. C.; Gutiérrez, A. y Corbera, J. Medio de cultivo para *Bradyrhizobium japonicum*. Biopreparado resultante. Patente cubana 22797. 2002.
20. Nápoles, M. C.; Gutiérrez, A.; Laeremans, T. y Vanderleyden, J. The analysis of nodulation factors as a tool in the design of new culture media for *Bradyrhizobium japonicum*. *Cultivos Tropicales*. 1999, vol. 20, no. 2, p. 79-81.
21. Ramírez, M.; Cabrera, G.; Gutiérrez, A. y Rodríguez, A. T. Metodolog a para la obtenci n de quitosana a bajas temperaturas. *Cultivos Tropicales*. 2000, vol. 21, no. 1, p. 79-82.
22. Nelson, N. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *J. Biol. Chem.*, 1944, vol. 153, p. 375-380.
23. Norris, D. O. y Date, R. A. Legume bacteriology Tropical Pasteur Research. Principles and Methods. *C.A.B. Bill*, 1976, vol. 51, p. 134-174.
24. Nápoles, M. C.; Gutiérrez, A. y Varela, M. Comportamiento de una cepa de *Bradyrhizobium japonicum* en nuevos medios de cultivo que contienen inductores de la s ntesis de los factores de nodulación. *Cultivos Tropicales*, 1998, vol. 19, no. 1, p. 25-27.
25. FAO. Les inoculums de légumineuses et leurs applications. Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture. Roma, 1985. 63 p.
26. Stacey, G.; Day, R.; Cohn, J.; Koh, S.; McAlvin, C. y Loh, J. Nod signal recognition. En: Biology of Plant-Microbe Interactions. Proceedings of the International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions. Amsterdam, The Netherlands. (9:2003 jul. 25-30:Amsterdam), 2003.
27. Rhoades, J. y Roller, S. Antimicrobial actions of degraded and native chitosan against spoilage organisms in laboratory media and foods. *App. Environ. Microbiol.*, 2000, vol. 66, no. 1, p. 80-86.
28. Jeon, Y. y Kim, S. Production of chitoooligosaccharides using an ultrafiltration membrane reactor and their antibacterial activity. *Carbohydr. Polymers*, 2000, vol. 41, p. 133-141.

Recibido: 23 de octubre de 2003

Aceptado: 14 de octubre de 2004