



RESPUESTA ENZIMÁTICA Y DE CRECIMIENTO EN UNA VARIEDAD COMERCIAL DE TABACO (*Nicotiana tabacum*, L.) TRATADA POR ASPERSIÓN FOLIAR DE UN POLÍMERO DE QUITOSANA

Enzymatic and growth responses in a commercial variety of tobacco (*Nicotiana tabacum*, L.) treated with a chitosan polymer by foliar spray.

Alejandro Bernardo Falcón Rodríguez[✉], Trudy Ann Gordon, Daimy Costales Menéndez y Miguel Ángel Martínez Téllez

ABSTRACT. Tobacco plants (Criollo 98) were sprayed with different concentrations (0, 0.1, 0.5, 1, 2.5 g.L⁻¹) of chitosan polymer at 30 days after planting (dap). At 14 days after treatments, variations caused by chitosan treatments on plant growth were measured, using the following variables: number of leaves, stem and roots length and dry mass. Polymer treatments caused stimulation and inhibition of the variables measured depending on the chitosan concentration tested. Changes in the protein and reducing carbohydrate contents were, also, obtain in tobacco leaves sprayed with chitosan, mainly increments above control at 37 dap, depending on the polymer concentration tested. Nitrate reductase activity was just induced above control at 37 dap with the highest concentration (2.5 g.L⁻¹) tested. In turn, defense markers evaluated were just induced, above control, at 33 dap, again depending on polymer concentration. 1-3 glucanase activated at 1.0 g.L⁻¹, while PAL activated with the three highest concentration (0.5-2.5 g.L⁻¹) employed. According to results, there is no relation between defenses activated and the changes in protein and carbohydrate contents, however, due to the complexity in the induced resistance response, it is necessary to deepen in this study by including other presume markers and different modes of chitosan application.

RESUMEN. Plantas de tabaco, variedad Criollo 98 fueron asperjadas a los 30 días de sembradas (dds) con diferentes concentraciones (0, 0.1, 0.5, 1 y 2.5 g.L⁻¹) de un polímero de quitosana. Se determinó a los 14 días de la aspersión (44 dds) las variaciones causadas por los tratamientos en las siguientes variables de crecimiento: número de hojas, longitud del tallo y radical y masa seca. Los tratamientos de quitosana causaron estimulación e inhibición de las variables determinadas en dependencia de la concentración de quitosana aplicada. Los tratamientos con el polímero provocaron, también, variaciones en el contenido proteico y de carbohidratos reductores, fundamentalmente incrementos sobre el control a los 37 dds en dependencia de las concentraciones empleadas. La actividad nitrato reductasa sólo fue inducida por encima del control a los 37 dds por la mayor concentración (2.5 g.L⁻¹) del polímero. A su vez los indicadores defensivos evaluados fueron inducidos por encima del control sólo a los 33 dds en dependencia de la concentración empleada. La actividad 1-3 glucanasa se activó sobre el control a la concentración de 1.0 g.L⁻¹, mientras la activación de la PAL ocurrió con las 3 mayores concentraciones (0.5, 1.0 y 2.5 g.L⁻¹). De acuerdo a los resultados obtenidos, no parece haber relación entre el incremento de respuestas defensivas y los cambios en el contenido proteico y de carbohidratos reductores; sin embargo, debido a la complejidad de la respuesta de resistencia inducida, resulta necesario profundizar en su estudio incluyendo otros probables indicadores y diferentes formas de aplicación de los tratamientos.

Key words: Chitosan, induced resistance, tobacco, enzymatic responses

Palabras clave: Quitosana, Resistencia inducida, tabaco, respuestas enzimáticas.

Dr.Sc. Alejandro Falcón-Rodríguez, Investigador Auxiliar; M.Sc. Daimy Costales Menéndez, Investigador Agregado del departamento de Fisiología y Bioquímica Vegetal, Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, gaveta postal 1, San José de Las Lajas, Mayabeque, Cuba, CP 32700; Dr. Miguel Á. Martínez Téllez, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, AC (CIAD), Coordinación de Tecnología de Alimentos de Origen Vegetal (CTAOV), carretera a la Victoria km 0.6, AP 1735, Hermosillo 83000, Sonora, México; Trudy Ann Gordon, Graduada de Ingeniería Agrónoma, Universidad Agraria de La Habana (UNAH).

✉ alfalcon@inca.edu.cu

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 o sobre variables de crecimiento de plantas de tabaco en estadio de semillero.

Por lo anterior, este trabajo es un primer acercamiento a este problema científico 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 la aplicación foliar de un polímero de quitosana y su relación con la inducción de respuestas defensivas. Igualmente, se evaluó la respuesta de variables de crecimiento a esta forma de aplicación.

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 %.

Preparación de las disoluciones de quitosana

Se preparó una disolución madre de quitosana al 1 % con el siguiente procedimiento. Se disolvió el polímero con agitación en ácido acético (HAc) al 1% y se ajustó el pH de la disolución con hidróxido de potasio (KOH) 2N hasta pH 5.5, completándose con agua destilada (H₂O_d) 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 la disolución madre de quitosana como la disolución control se diluyeron con H₂O_d hasta las concentraciones deseadas en cada experimento.

Condiciones de crecimiento de las plántulas y experimentación:

Se realizó un experimento para evaluar a los 44 días de sembradas (dds) las plántulas de tabaco (*Nicotiana tabacum*, L.), variedad Criollo 98, el efecto, en el crecimiento, de diferentes concentraciones (0.1, 0.5, 1.0 y 2.5 g.L⁻¹) de un polímero de quitosana asperjado 14 días antes de la evaluación, a razón de entre 0,5 y 1 mL por planta (dosis aproximada de 0.1, 0.5, 1 y 2.5 mg por planta). Las determinaciones enzimáticas se realizaron en las hojas de la planta a los 3 y 7 días de asperjadas las plántulas (33 y 37 dds).

Las semillas de tabaco 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 crecieron en condiciones semicontroladas de luz/oscuridad (16/8 horas) con iluminación artificial y temperatura diurna/nocturna (25/20°C) en el cuarto de crecimiento del dpto. de Fisiología y Bioquímica Vegetal del Inca. Se realizaron riegos diarios a los cepellones para garantizar una adecuada humedad en el sustrato y un buen crecimiento de las plantas. El experimento se repitió dos veces y fueron seleccionadas al azar tres plántulas para conformar una muestra. Se utilizaron 5 muestras como réplicas por tratamiento para las evaluaciones de crecimiento siguientes: Número de hojas, longitud del tallo (cm), longitud radical (cm) y masa seca de la planta (g.pta⁻¹), mientras que para las evaluaciones enzimáticas: Nitrato reductasa, α -1-3 glucanasa y fenil-alanina amonio liasa (PAL), proteínas solubles totales y carbohidratos reductores se conformaron tres muestras por tratamiento.

Extracción 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 en morteros de porcelana. El material pulverizado se homogenizó en solución de Acetato de sodio 0.05 mol.L⁻¹ pH 5.2 + Cloruro de sodio 1 mol.L⁻¹ + EDTA 0.005 mol.L⁻¹ + Mercaptoetanol 0.005 mol.L⁻¹, a razón de 1,5 mL por gramo de hojas.

El extracto se centrifugó por 15 minutos a 12000 g en frío, se descartó el precipitado y se centrifugó nuevamente por 5 min. Seguidamente se colectó el sobrenadante y se congeló por debajo de 0°C hasta las determinaciones enzimáticas.

Determinación de proteínas

Se determinó en el sobrenadante del extracto de hojas siguiendo una metodología micro Lowry descrita por Sun (14). Se usó albúmina de suero bovino como estándar. La concentración de proteínas se expresó como mg de proteínas por gramo de tejido vegetal fresco.

Determinación de Carbohidratos solubles reductores
Se determinó por el método colorimétrico de Somogyi (15) y los resultados se expresaron como actividad específica (ig de glucosa.min⁻¹.mg proteína⁻¹), para lo cual se determinó previamente la pendiente en una curva de azúcares reductores sobre un patrón de glucosa.

Determinación de la actividad nitrato reductasa

Se disolvió una muestra de 0,25 g en un 1 ml de Buffer Tris KNO_3 , H_2O destilada y Tween 80. Se calentó por 10 minutos en baño de María a 70°C . Se enfría hasta temperatura ambiente. Luego se tomaron 0,2 ml de muestra y se le añadió 2,6 ml de H_2O destilada, 0.6 ml de sulfanidamida y 0.6 ml de α naftil etilendiamino dihidroclórico, se homogenizó y se dejó reposar por 20 minutos. A esa mezcla se le determina la absorbancia a 540 nm. La actividad enzimática se expresó como nmoles de NO_2/gr . de tejido.

Determinación de la actividad α 1-3 glucanasa

Para la determinación de actividad α 1-3 glucanasa se siguió la metodología descrita por Boudart *et al.* (16) con la diferencia de que todos los componentes del ensayo se redujeron proporcionalmente para dar un volumen final de 0,5 ml. En el ensayo se cuantificó la liberación de azúcares reductores a partir de Laminarina de calidad reactivo (Sigma) por acción de las enzimas del extracto. 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 (15) y los resultados se expresaron como actividad específica ($\text{ig de glucosa} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$), para lo cual se determinó previamente la pendiente en una curva de azúcares reductores sobre un patrón de glucosa.

Determinación de la actividad Fenilalanina-amonio liasa (PAL)

Se realizó según la metodología de Vander *et al.* (17) con la diferencia de que el ensayo se incubó por dos horas para mejores resultados en tabaco, como previamente se evaluó (12,18). Se cuantificó la formación de ácido trans-cinámico por acción de las enzimas PAL presentes en el extracto usando L-fenilalanina como sustrato (Sigma). La actividad enzimática fue expresada como actividad específica ($\text{ig ácido trans-cinámico} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$), para lo cual se determinó previamente la pendiente de una curva de ácido trans-cinámico a 290 nm.

Análisis 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 cuatro réplicas por tratamiento. Las medias resultantes se compararon con la prueba de Duncan para $p \leq 0.05$ en el programa Statgraphics, versión 5.0 (Statistical Graphics Corporation, 2000).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados del efecto de las diferentes concentraciones de quitosana en las variables de crecimiento a los 14 días de asperjadas las plántulas se muestran en la tabla 1. En todas las variables evaluadas existe un efecto del compuesto en dependencia de las concentraciones empleadas. El número de hojas no fue afectado con las diferentes dosis del polímero de quitosana respecto al control, pero las dos concentraciones mayores redujeron esta variable en relación con la concentración más baja utilizada. Aunque la longitud del tallo hasta el primer par de hojas se benefició con la concentración intermedia ($0,5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$), nuevamente las mayores concentraciones causaron reducción de la longitud radical y también de la masa seca total de las plántulas respecto al control (Tabla 1).

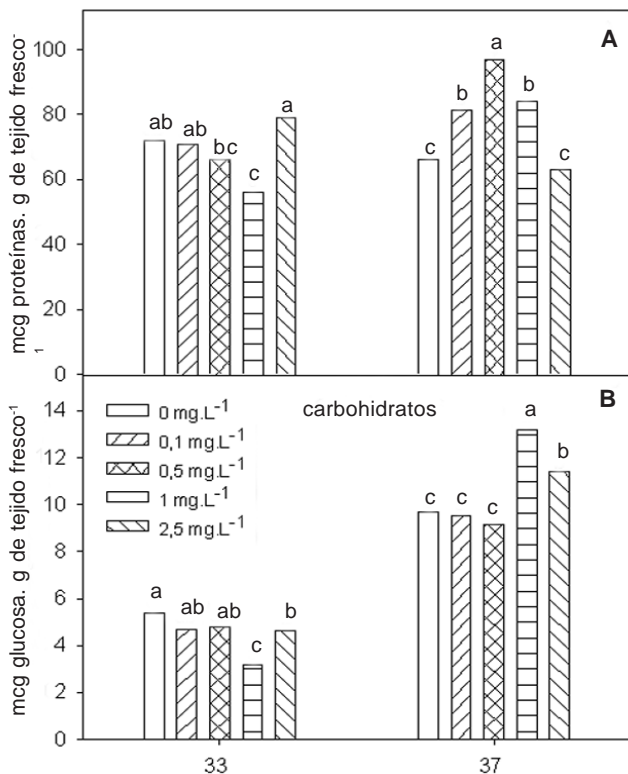
El efecto beneficioso de compuestos de quitosana en el crecimiento, desarrollo, la reproducción y los rendimientos de los cultivos ha sido demostrado en varias especies vegetales (6,8,19,20); sin embargo, no siempre los resultados al aplicar quitosana causan efectos positivos en los diferentes parámetros de los estadios mencionados o sólo afectan algunos indicadores de los mismos (21). Los estudios de un efecto positivo en el crecimiento de esta especie a escala de campo con dosis más bajas que las utilizadas en este trabajo (22).

La aspersión foliar del polímero de quitosana causó la reducción significativa de la concentración de proteínas solubles en las hojas a la concentración de $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 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 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 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 $2,5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) 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 $2,5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) 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.

Tabla 1: Efecto de la aspersión foliar de un polímero de quitosana en el crecimiento de plántulas de tabaco (variedad Criollo 98) a los 14 días del tratamiento (44 dds).

Tratamientos	Número de hojas	Longitud del tallo (cm)	Longitud radical (cm)	Masa Seca ($\text{g} \cdot \text{pta}^{-1}$)
$0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$	6.4 ± 0.24 ab	2.15 ± 0.01 b	2.67 ± 0.10 a	0.05 ± 0.002 a
$0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$	6.6 ± 0.24 a	2.18 ± 0.15 b	2.56 ± 0.05 ab	0.04 ± 0.003 a
$0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$	6.2 ± 0.20 ab	2.89 ± 0.15 a	2.29 ± 0.15 ab c	0.03 ± 0.002 b
$1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$	5.8 ± 0.20 b	2.32 ± 0.09 b	2.01 ± 0.22 c	0.03 ± 0.003 b
$2.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$	5.8 ± 0.20 b	1.97 ± 0.13 b	2.15 ± 0.13 c	0.02 ± 0.002 c

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).

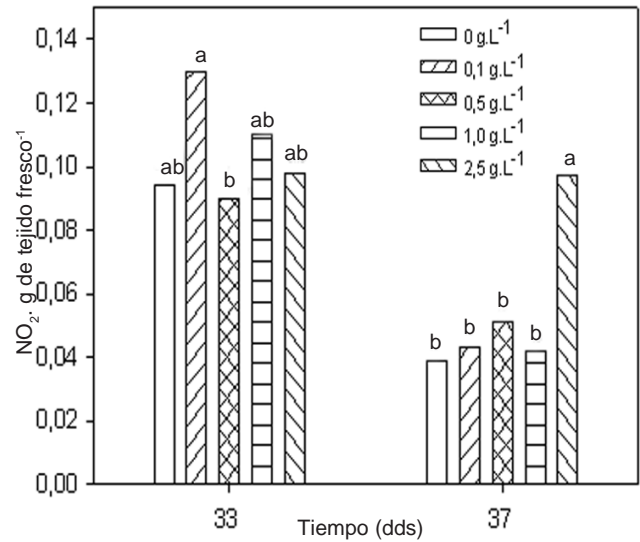


Letras iguales no difieren estadísticamente para $p < 0,05$ en la Prueba de Duncan.

Al realizar la determinación y análisis de la actividad enzimática nitrato reductasa, cuya acción consiste en reducir los nitratos que llegan a las hojas procedentes de las raíces de la planta por lo que esta enzima está vinculada al aporte de nitrógeno para el metabolismo de los aminoácidos, las proteínas y otros compuestos aminados, se obtuvo solamente un incremento de la actividad a los 37 dds por acción de la concentración de 2,5 g.L⁻¹ del polímero de quitosana (Figura 2) que mostró un valor de actividad por encima del doble del control, por lo que la aplicación de los tratamientos de quitosana no afectaron la respuesta de esta enzima en las hojas excepto para el caso descrito. Este incremento de actividad nitrato reductasa no parece estar relacionado con el incremento de proteínas encontrado con este tratamiento (2,5 g.L⁻¹), si se toma en cuenta los resultados mostrados en la figura 1A.

La actividad del indicador defensivo α -1-3 glucanasa solo mostró incrementos de actividad a los 33 dds con la concentración de quitosana de 1 g.L⁻¹ (Figura 3A), 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 (12,18).

Figura 2. Efecto de la aspersión foliar del polímero de quitosana en la actividad enzimática nitrato reductasa en hojas a los 33 y 37 días de sembradas las plántulas de tabaco (dds).



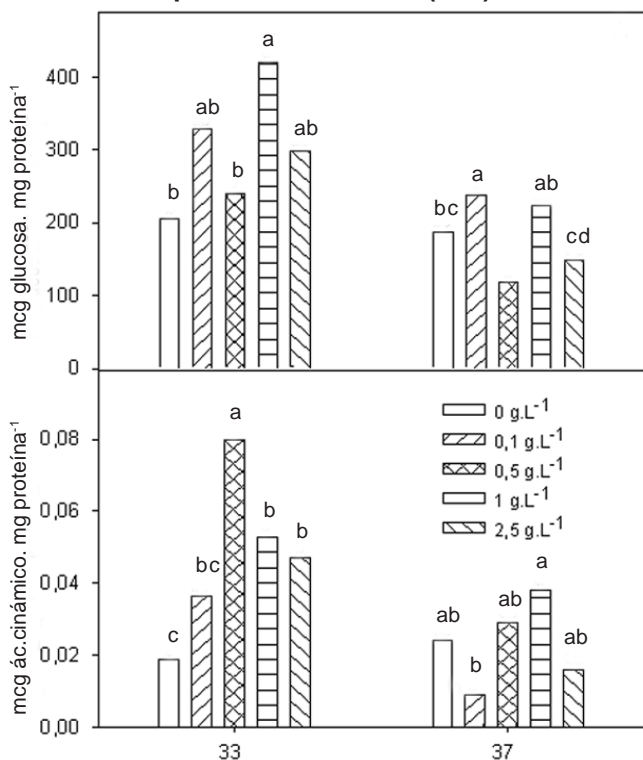
Letras iguales no difieren estadísticamente para $p < 0,05$ en la Prueba de Duncan.

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. 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 (12,18). 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 (12,23).

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 (23) y que demandan de precursores carbonados y energía (24,25). 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 su comportamiento en la planta como respuesta a elicitores de quitosana.

Figura 3. Efecto de la aspersión foliar del polímero de quitosana en los indicadores defensivos α -1-3 glucanasa (A) y fenilalanina-amonioliasa (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

En este estudio se emplearon altas concentraciones de un polímero de quitosana que se ha demostrado que activan respuestas defensivas y de resistencia contra patógenos en tabaco por aspersión foliar a las plantas (11,12,18) y el trabajo presenta, por primera vez, resultados donde se demuestra la inducción por este polímero de respuestas bioquímicas del metabolismo primario en tabaco, que pueden estar relacionadas con el proceso defensivo y podrían constituir indicadores del comportamiento de la planta frente a la aplicación de quitosana. Aunque los resultados obtenidos no permiten demostrar una relación clara entre los indicadores defensivos y los del metabolismo primario si demuestran que estos últimos sufren cambios cuando se le aplican diferentes concentraciones del compuesto, por lo que sería de interés estudiar dinámicas de respuesta de estos indicadores a aplicaciones de quitosana y su relación con indicadores de resistencia contra patógenos.

Como análisis del efecto sobre el crecimiento, la aspersión de las concentraciones mayores (1 y 2.5 g.L⁻¹) del polímero de quitosana causó ligeros decrementos en las variables de crecimiento longitud radical y masa seca de la planta, lo que puede ser evidencia de una afectación del crecimiento y desarrollo de esta especie con la aplicación

de concentraciones elevadas de este polímero. Este tipo de comportamiento ha sido demostrado con anterioridad en estudios con otros elicitores (25,26), pero nunca ha sido demostrado con quitosana u otra oligosacarina, al menos, con concentraciones inductoras de respuestas defensivas y resistencia. Un resultado reciente con quitosana, no demostró afectación del crecimiento y los rendimientos del cultivo del frijol, pero con la aplicación por aspersión foliar de una dosis baja de quitosana (21). Resultados recientes demuestran beneficios sobre el crecimiento y los rendimientos del tabaco y otras solanáceas cuando se aplican dosis bajas de quitosana (22). Por lo anterior, es preciso estudiar en investigaciones futuras si la aplicación de dosis bajas (0,1 mg/planta o menor) del polímero, que no afectan o que benefician su crecimiento, causan protección del cultivo contra patógenos potenciales.

Es de importancia, además, evaluar distintas formas de aplicación de este compuesto en las plantas, ya que la quitosana es un polímero y su entrada a la planta está afectada por su masa molecular. En tabaco, se demostró que otras formas como la aplicación al sustrato y la inmersión de semillas, previo a la siembra, de soluciones de quitosana, causa activación diferencial de respuestas defensivas y de protección contra patógenos (18,27).

REFERENCIAS

- Prashanth, K V H.; Tharanathan, R N. Chitin/chitosan: modifications and their unlimited application potential-an overview. *Trends in Food Science & Tech.* 2007, vol. 18, p 117-131
- Bautista-Baños S.; Hernández-Lauzardo A.N.; Velásquez-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* 2006, vol 25, p 108-118.
- 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.* 2007, vol. 87, p 220-228
- 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*, 2008, vol. 73, p 541-547.
- 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.* 2009, vol. 46, p 585-594
- 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.*; 2004, vol. 73, p. 66-68.
- 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.*, 2006, vol. 114, p. 405-413.

8. Ramos-García, M.; Ortega-Centeno, S.; Hernández, Lauzardo, A.N.; Alía-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*, 2009, vol. 121, p. 480-484
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.*, 2006, vol. 44, p. 893-900
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.*, 2007, vol. 87, p. 78-84
11. Falcón, A. B.; Cabrera, J. C.; Costales, D.; Ramírez, M. A.; Cabrera, G.; Toledo, V.; Martínez, Téllez, M. A. The effect of size and acetylation degree of chitosan derivatives on tobacco plant protection against *Phytophthora parasitica nicotianae*. *World J. Microbiol. Biotech.*, 2008, vol. 24, p. 103-112.
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*, 2009, vol. 4, p. 192-200.
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. Center. Shanhuia Tainan, Taiwan (ROC): Asian Research and Development, 1994, 94p.
15. Somogyi, M. Notes on sugar determination. *J. Biol. Chem.*, 1952, vol. 195, p 19-23.
16. Boudart, G., Lafitte, C., Barthe, J.P., Frasez, D., Esquerré-Tugayé, M-T. Differential elicitation of defence responses by pectic fragments in bean seedlings. *Planta*, 1998, vol. 206, p 86-94.
17. Vander, P.; Varum, K. M.; Domard, A.; El Gueddari, N.E.; Moerschbacher, B. M. Comparison of the ability of partially N-acetylated chitosans and chitooligosaccharides to elicit resistance reactions in wheat leaves. *Plant Physiol.*, 1998, vol. 118: 1353-1359.
18. Falcón-Rodríguez, A. B.; Costales, D.; Cabrera, J.C.; Martínez-Téllez, M. A. Chitosan physico-chemical properties modulate defense responses and resistance in tobacco plants against the oomycete *Phytophthora nicotianae*. *Pestic. Biochem. Physiol.*, doi:10.1016/j.pestbp.2011.04.005
19. Uthairatanakij, A.; Teixeira da Silva, J.A.; Obsurwan, K. Chitosan for improving orchid production and quality. *Orchid Science and Biotech.*, 2007, vol. 1: 1-5.
20. Asghari, R.; Maleki, B.; Sedghi, E. Effect of *in vitro* chitosan application on growth and minituber yield of *Solanum tuberosum* L. *Plant Soil Environ.* 2009, vol. 55, p. 252-256.
21. Iriti, M.; Giulia, C.; Sara, V.; Ilaria, M.; Soave, C.; Fico, G.; Faoro, F. Chitosan-induced ethylene-independent resistance does not reduce crop yield in bean. *Biological Control*, 2010, vol 54, p. 241-247,
22. Falcón, A. B.; Evaluación de Oligosacarinas nacionales de quitosana en la estimulación del crecimiento, la nodulación y la protección de cultivos de interés económico. *Informe Final del PNCT 00300277*, CITMA, 2010.
23. van Loon, L.C.; Rep, M.; Pieterse, C.M.J. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annu. Rev. Phytopathology*, 2006, vol. 44, p.135-162.
24. Agrios, G.N. How plants defend themselves against pathogens (Chapter six). *En: Plant Pathology*. 5th ed. Academic Press, New York, USA, 2005, p. 208.
25. Heil, M. y Walters, D. R. Ecological Consequences of Plant Defence Signalling. *En: L. C. Van Loon editor: Advances in Botanical Research*, Burlington: Academic Press, 2009, vol. 51, p.667-716.
26. Heil, M. Capítulo 9: Trade-offs associated with induced resistance. *En: Induced resistance for plant defense: A sustainable approach to crop protection*. Eds: D. Walters, A. Newton, G. Lyon: Blackwell Publishing, 2007, p. 157-17.
27. Falcón-Rodríguez, A. B.; Costales-Menéndez, D.; Ortega-Delgado, E.; León-Díaz, O.; Cabrera-Pino, J. C.; Martínez-Téllez, M. A. Evaluation of chitosan as inhibitor of soilborne pathogens and elicitor of defence markers and resistance in tobacco plants. *Spanish J. Agric. Research*, 2007, vol. 5, no. 4, p. 533-541.

Recibido: 10 de septiembre de 2010

Aceptado: 29 de agosto de 2011

¿Cómo citar?

Falcón Rodríguez, Alejandro Bernardo; Gordon, Trudy Ann; Costales Menéndez, Daimy y Martínez Téllez, Miguel Ángel. Respuesta enzimática y de crecimiento en una variedad comercial de tabaco (*Nicotiana tabacum*, L.) Tratada por aspersión foliar de un polímero de quitosana. *Cultivos Tropicales*, 2012, vol.33, no.1, p.65-70. ISSN 1819-4087