

CHITOSAN DERIVATIVES INDUCE LOCAL AND DISTAL EXPRESSION OF DEFENCE-RELATED GENES IN WHEAT (*Triticum aestivum* L.) SEEDLINGS

LOS DERIVADOS DE QUITOSANO INDUCEN LA EXPRESIÓN LOCAL Y A DISTANCIA DE GENES DE PROTECCIÓN EN PLÁNTULAS DE TRIGO (*Triticum aestivum* L.)

Juan M. Díaz-Martínez¹, Emmanuel Aispuro-Hernández¹, Irasema Vargas-Arispuro², Alejandro B. Falcón-Rodríguez³, Miguel Á. Martínez-Téllez^{1*}

¹Coordinación de Tecnología de Alimentos de Origen Vegetal, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD), Km. 0.6, Carretera a La Victoria, 83304. Hermosillo, Sonora, México. (norawa@ciad.mx). ²Coordinación de Ciencia de los Alimentos, CIAD. ³Departamento de Fisiología y Bioquímica Vegetal, Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA). Km. 3.5, Carretera Tapaste, 32700. San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba.

ABSTRACT

Chitosan and its derivatives are elicitors of defence responses in plants. The physical and chemical characteristics, like the molecular weight and acetylation degree determine the type of effect and specificity. Although chitosan-induced biochemical and enzymatic reactions in wheat (*Triticum aestivum*) are reported, the transcriptional activation of defensive markers by chitosan derivatives remains unaddressed. The hypothesis of our study was that the different structural features of chitosan derivatives would influence the transcriptional patterns related to protective responses in wheat. The aim of our study was to compare the local and systemic inductive properties of chitosan and chitooligosaccharides (COS) in wheat seedlings through the expression of the defence-related genes *chitinase* (*CHI*), β -1-3 *glucanase* (*GLU*) and *phenylalanine ammonia-lyase* (*PAL*). Chitosan and COS solutions were characterized by MALDI-TOF and applied by soil drench or foliar spray to seedlings grown under controlled conditions. Gene expression levels in the leaves of treated plants were analysed by RT-PCR. Different expression patterns were observed according to the gene evaluated and the type of elicitor. COS induced the local and distal expression of *CHI* and *GLU*, but decreased *PAL*; while chitosan increased the distal expression of *CHI* and *GLU* and the local and distal expression of *PAL*. Our results showed the capacity of chitosan and COS to differentially mediate transient transcriptional responses of defensive markers in wheat.

RESUMEN

El quitosano y sus derivados son activadores de respuestas de protección en las plantas. Las características físicas y químicas, como el peso molecular y el grado de acetilación, determinan el efecto y la especificidad. Aunque las reacciones enzimáticas y bioquímicas inducidas por el quitosano en trigo (*Triticum aestivum*) se conocen, la activación transcripcional de marcadores de protección por derivados del quitosano no se han estudiado. La hipótesis de nuestro estudio fue que las características estructurales de los derivados del quitosano influirían en los patrones transcripcionales de respuesta de protección en trigo. El objetivo fue comparar las propiedades inductivas locales y sistémicas del quitosano y los quitooligosacáridos (COS) en plántulas de trigo mediante la expresión de los genes relacionados con la protección: *quitinasa* (*CHI*), β -1-3 *glucanasa* (*GLU*) y *fenilalanina amonio liasa* (*PAL*). Soluciones de quitosano y COS se caracterizaron por MALDI-TOF y se aplicaron en el sustrato o por aspersión foliar a plantas cultivadas en condiciones controladas. La expresión génica en las hojas de las plantas tratadas se analizó con RT-PCR. Los patrones de expresión se relacionaron con el gen evaluado y el tipo de activador. Los COS indujeron expresión local y distal de *CHI* y *GLU*, pero disminuyeron la de *PAL*. El quitosano incrementó la expresión distal de *CHI* y *GLU*, y la expresión local y distal de *PAL*. Nuestros resultados mostraron que el quitosano y los COS median diferencialmente las respuestas transcripcionales transitorias de marcadores de protección en trigo.

*Autor responsable ❖ Author for correspondence.

Recibido: mayo, 2017. Aprobado: octubre, 2017.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 52: 497-509. 2018.

Palabras clave: quitinasa, quitooligosacáridos, glucanasa, fenilalanina amonio liasa, resistencia sistémica.

Key words: chitinase, chitoooligosaccharide, glucanase, phenylalanine ammonia-lyase, systemic resistance.

INTRODUCTION

Wheat (*Triticum* spp.) is the most cultivated cereal for human consumption worldwide and despite its growing production, grain yield losses caused mainly by rust diseases can reach 30 % to 60 % and up to total loss in extreme situations (Roelfs *et al.*, 1992; Curtis, 2002). In order to deal with the current world challenges for food provision, it was highlighted the need of more efficient and integrated cereal farming systems which may include strategies to decrease the development of pest populations without threatening the environment and human health (FAO, 2014). An earlier and pronounced induction of intrinsic defence mechanisms in resistant plant varieties was observed upon pathogen attack (Moloi and van der Westhuizen, 2006). This has encouraged the utilization of biotic and abiotic stressors to enhance defence responses in vulnerable plants, which may contribute to avoid or minimize crop losses. Several physiological and biochemical responses indicate that some elicitors improve the systemic acquired resistance of plants through the stimulation of synthesis of defence related metabolites and enzymes (Gozzo, 2003). In wheat, aphid infestation raised the levels of H₂O₂ and NADPH oxidase activity (Moloi and van der Westhuizen, 2006). An early systemic induction of expression levels of peroxidase and pathogenesis-related (PR)-genes was observed after fungal infection in wheat spikes (Pritsch *et al.*, 2001), while infiltration of detached young wheat leaves with *Fusarium* mycotoxin triggered accumulation of ROS and defence related transcripts and proteins (Desmond *et al.*, 2008). Lignification in wounded and intact wheat leaves (Barber *et al.*, 1989) as well as induction of the activity of the defence-related enzymes phenylalanine ammonia-lyase and peroxidase (Vander *et al.*, 1998) were promoted by chitosan; a β -(1-4) linked (acetylated or deacetylated) D-glucosamine polysaccharide. The elicitor properties of chitosan were studied for decades in different plants, and are dependent of physicochemical characteristics such as the degree of polymerization and acetylation. The chemical nature and length of chitosan oligosaccharides

INTRODUCCIÓN

El trigo (*Triticum* spp.) es el cereal más cultivado para el consumo humano en el mundo y, a pesar de su producción creciente, las pérdidas de rendimiento del grano provocadas principalmente por roya pueden alcanzar de 30 a 60 %, incluso pérdida total en situaciones extremas (Roelfs *et al.*, 1992; Curtis, 2002). Para enfrentar los desafíos mundiales actuales para la provisión de alimentos, se destacó la necesidad de contar con sistemas de cultivos de cereales más eficientes e integrados, los cuales pueden incluir estrategias para disminuir el desarrollo de poblaciones de plagas sin amenazar el medio ambiente y la salud humana (FAO, 2014). Variedades de plantas resistentes a patógenos mostraron una inducción temprana y pronunciada de mecanismos de defensa intrínsecos al ser atacadas (Moloi y van der Westhuizen, 2006). Esto ha promovido el uso de estresores bióticos y abióticos para mejorar las respuestas de defensa en plantas vulnerables, lo cual puede contribuir a evitar o minimizar las pérdidas de cultivos. Varias respuestas fisiológicas y bioquímicas indican que algunos elicitors mejoran la resistencia sistémica adquirida de plantas a través de la estimulación de síntesis de metabolitos y enzimas relacionados con la defensa (Gozzo, 2003). En el trigo, la infestación de áfidos aumentó los niveles de H₂O₂ y la actividad de NADPH oxidasa (Moloi y van der Westhuizen, 2006). Una inducción sistémica temprana de los niveles de expresión de peroxidasa y los genes relacionados con patogénesis (PR) se observó después de la infección fúngica en espigas de trigo (Pritsch *et al.*, 2001), mientras que la infiltración de hojas jóvenes de trigo desprendidas con micotoxinas de *Fusarium* desencadenó la acumulación de ROS y transcritos y proteínas relacionadas con la defensa (Desmond *et al.*, 2008). La lignificación en hojas de trigo heridas e intactas (Barber *et al.*, 1989) así como la inducción de la actividad de las enzimas relacionadas con la defensa fenilalanina amonio liasa y peroxidasa (Vander *et al.*, 1998) fueron estimuladas por el quitosano; un polisacárido de D-glucosamina unido por enlaces β -(1-4) (acetilado o desacetilado). Las propiedades inductoras del quitosano se estudiaron durante décadas en diferentes plantas y dependen de características fisicoquímicas, como el grado de polimerización y acetilación. La naturaleza química y la longitud de los oligosacáridos del quitosano pueden influir diferencialmente en

can differentially influence the transcription, accumulation and activity of PR proteins in rice (Lin *et al.*, 2005) and peach (Ma *et al.*, 2013), and increase the activity of enzymes and the synthesis of defensive metabolites in wheat (Vander *et al.*, 1998) and tobacco (Falcón-Rodríguez *et al.*, 2009). According to Li *et al.* (2016), fungal-derived oligochitosans are able to exert a direct fungitoxic activity against phytopathogens and simultaneously elicit the activity of defensive enzymes and accumulation of phenolic compounds in the medicinal plant *Z. bungeanum*. However, the influence of chitosan derivatives on the transcription patterns of defence-related genes in wheat has not been studied so far. Therefore, the hypothesis of our study was that the different structural features of chitosan derivatives might influence the transcriptional patterns related to protective responses in wheat. The aim of our study was to evaluate the induction of local and systemic accumulation of defence-related transcripts in wheat seedlings by chitosans with different physicochemical characteristics.

MATERIALS AND METHODS

Preparation and characterization of chitosan and chitosan derivatives

Commercially available chitosan (Sigma-Aldrich, USA) was dissolved overnight in 1 % acetic acid, pH 5.5. The chitosan average molecular weight (M) was determined by capillary viscosimetry (Cabrera and Van Cutsem, 2005) using an Ubbelohde viscometer and the Mark-Houwink's equation $[\eta] = KM^\alpha$, where $[\eta]$ = intrinsic viscosity, $K=0.076$ and $\alpha=0.76$. The degree of acetylation (DA) was determined by infrared spectroscopy using the equation $DA \% = 31.92 A_{1320}/A_{1420} - 12.2$ according to Brugnerotto *et al.* (2001). For the production of chitoooligomers a 10 g L^{-1} chitosan solution was hydrolysed with papain (Sigma-Aldrich, USA) at 35°C for 24 h as suggested by Vishu *et al.* (2004). The chitoooligosaccharides (COS) were characterized by matrix assisted laser desorption/ionization-time of flight-mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) at the Complex Carbohydrate Research Center, University of Georgia. Briefly, a 5 mg mL^{-1} COS solution in deionized water was sonicated for 1 h to dissolve the soluble material, filtered through $0.22\text{-}\mu\text{m}$ Durapore membrane filters (Millipore, Ireland) and mixed with a 2,5-dihydroxybenzoic acid matrix (Cabrera and Van Cutsem, 2005). Mass spectra were recorded on an Applied Biosystems 5800 MALDI-TOF in the positive ion mode.

la transcripción, acumulación y actividad de proteínas PR en arroz (Lin *et al.*, 2005) y durazno (Ma *et al.*, 2013) e incrementar la actividad de las enzimas y la síntesis de metabolitos de defensa en trigo (Vander *et al.*, 1998) y tabaco (Falcón-Rodríguez *et al.*, 2009). De acuerdo con Li *et al.* (2016), los oligoquitosanos derivados de hongos son capaces de ejercer una actividad fungitóxicas directa contra fitopatógenos y simultáneamente estimular la actividad de enzimas de defensa y la acumulación de compuestos fenólicos en la planta medicinal *Z. bungeanum*. Sin embargo, hasta ahora no se ha estudiado la influencia de los derivados de quitosano en los patrones de transcripción de los genes relacionados con la defensa en el trigo. Por lo tanto, la hipótesis de nuestro estudio fue que las diferentes características estructurales de los derivados de quitosano podrían influir en los patrones transcripcionales relacionados con las respuestas de protección en el trigo. El objetivo de nuestro estudio fue evaluar la inducción de la acumulación local y sistémica de transcritos relacionados con la defensa en plántulas de trigo por quitosanos con diferentes características fisicoquímicas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación y caracterización del quitosano y de los derivados de quitosano

El quitosano disponible de manera comercial (Sigma-Aldrich, EUA) se disolvió en ácido acético al 1 %, pH 5.5 durante la noche. El peso molecular promedio del quitosano (M) se determinó con viscosimetría capilar (Cabrera y Van Cutsem, 2005) usando un viscosímetro Ubbelohde y la ecuación de Mark-Houwink, $[\eta] = KM^\alpha$, donde $[\eta]$ es igual a la viscosidad intrínseca, K es igual a 0.076 y α es igual a 0.76. El grado de acetilación (GA) se determinó mediante espectroscopía infrarroja usando la ecuación $GA \% = 31.92 A_{1320}/A_{1420} - 12.2$ de acuerdo con Brugnerotto *et al.* (2001). Para la producción de chitoooligómeros, una solución de 10 g L^{-1} de quitosano se hidrolizó con papaína (Sigma-Aldrich, EUA), a 35°C por 24 h, según Vishu *et al.* (2004). Los chitoooligosacáridos (COS) se caracterizaron por espectrometría de masas de tiempo de vuelo desorción/ionización por láser asistida en matriz (MALDI-TOF-MS por sus siglas en inglés) en el Complex Carbohydrate Research Center, en la Universidad de Georgia. En breve: una solución de 5 mg mL^{-1} de COS en agua desionizada se sonicó 1 hora para disolver el material soluble, se filtró a través de filtros de membrana Durapore de $0.22\text{-}\mu\text{m}$ (Millipore, Irlanda) y se mezcló con una matriz de

Plant material and treatments

Wheat (*Triticum aestivum* cv. Tacupeto F2001) seedlings were grown in a controlled environment chamber, with a 16 h photoperiod and 28/24 °C day/night temperature. Two experiments were conducted according to the type of chitosan derivative evaluated (polymeric chitosan or COS). For each experiment, 18 pots with 25-day-old seedlings were randomly assigned to six different groups, where chitosan or COS at 1 g L⁻¹ and 0.1 g L⁻¹ were either sprayed to leaves or applied to the substrate of growing plants. Such concentrations were chosen according to Falcón-Rodríguez *et al.* (2009; 2011). Control groups were treated with dd-water. Samples of leaves from four to five seedlings were collected from each pot, pooled together and considered a replication. Subsequently, leaves were frozen and ground with liquid nitrogen at 0, 6 and 12 h after treatments for further expression analysis of the defence-related genes *chitinase* (*CHI*), *β-1-3 glucanase* (*GLU*) and *phenylalanine ammonia-lyase* (*PAL*).

RNA extraction and reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

Total RNA was extracted with the Concert Plant Reagent (Invitrogen, USA) according to the manufacturer's instructions and genomic DNA was removed with the DNA-free kit (Ambion, USA). One microgram of total RNA was reverse transcribed using the SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen, USA) and oligodT priming as recommended by the supplier. Semiquantitative PCR was performed using the GoTaq® Flexi DNA Polymerase kit (Promega, USA) with serially diluted cDNA template in 28 cycles of 95 °C for 1 min, 58 °C for 1 min and 72 °C for 1 min. Control reactions to normalize RT-PCR amplification were run with primers for *glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase* (*GAPDH*). The gene-specific primer pairs used for the PCR were designed from sequences in the GenBank database (Table 1). Amplification products were analysed by 1 % agarose gel electrophoresis stained with Gel-Red (Biotium, USA) and visualized under UV light with the Kodak Gel Logic 100 Imaging System. Band densities were quantified using the software 1D Image Analysis (Kodak, USA). The results were expressed as a ratio between the total band densitometric intensity of each analysed gene and the reference gene *GAPDH*.

Statistical analysis

Three biological replicates per treatment and sampling point were considered for analysis of gene expression. An analysis of variance was conducted using NCSS (Number Cruncher Statistical

ácido 2,5-dihidroxibenzoico (Cabrera y Van Cutsem, 2005). Los espectros de masas se registraron en un Applied Biosystems 5800 MALDI-TOF en el modo de iones positivos.

Material vegetal y tratamientos

Las plántulas de trigo (*Triticum aestivum* cv. Tacupeto F2001) se cultivaron en una cámara de ambiente controlado, con un fotoperiodo de 16 h y una temperatura de día/noche de 28/24 °C. Dos experimentos se realizaron de acuerdo con el tipo de derivado de quitosano evaluado (quitosano polimérico o COS). Para cada experimento, 18 macetas con plántulas de 25 días de edad se asignaron de manera aleatoria a seis grupos diferentes, donde se les aplicó quitosano o COS a 1 g L⁻¹ y a 0.1 g L⁻¹ ya sea por aspersión sobre las hojas o aplicados al sustrato de las plantas en crecimiento. Tales concentraciones fueron elegidas de acuerdo con Falcón-Rodríguez *et al.* (2009; 2011). Los grupos testigo se trataron con agua dd. De cada maceta se recogieron muestras de hojas de cuatro a cinco plántulas, se juntaron y se consideraron una repetición. Después, las hojas se congelaron y molieron con nitrógeno líquido a las 0, 6 y 12 h después de los tratamientos para un análisis de expresión de los genes relacionados con la defensa: *quitinasa* (*CHI*), *β-1-3 glucanasa* (*GLU*) y *fenilalanina amonio liasa* (*PAL*).

Extracción de ARN y reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa (RT-PCR)

El ARN total se extrajo con el reactivo comercial Concert Plan Reagent (Invitrogen, EUA), según las instrucciones del fabricante y el ADN genómico se eliminó con el reactivo comercial DNA-free (Ambion, EUA). Un microgramo del ARN total, se retrotranscribió utilizando la SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen, EUA) y el cebador oligodT como recomendó el proveedor. La PCR semicuantitativa se realizó utilizando el kit GoTaq® Flexi DNA Polymerase (Promega, EUA) con diluciones en serie del templado (ADNc) en 28 ciclos de 95 °C por 1 min, 58 °C por 1 min y 72 °C por 1 min. Las reacciones de control para normalizar la amplificación mediante RT-PCR se realizaron con cebadores para *gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa* (*GAPDH*). Los pares de cebadores específicos utilizados para la PCR se diseñaron desde secuencias en la base de datos de GenBank (Tabla 1). Los productos de la amplificación se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 % teñida con Gel-Red (Biotium, EUA) y se visualizaron bajo luz UV con el sistema Kodak Gel Logic 100 Imaging System. Las densidades de las bandas se cuantificaron usando el software 1D Image Analysis (Kodak, EUA). Los resultados se expresaron como una relación entre la intensidad densitométrica

Table 1. Primers used in semi-quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis of gene expression. Cuadro 1. Cebadores utilizados en el análisis semicuantitativo de la expresión génica por la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa (RT-PCR).

Gene	Primer sequence	GenBank accession number
<i>Chitinase (CHI)</i>	Sense 5'- GTTCTACACGTCACGACGCCTTCTT-3' Antisense 5'- CCCGCCGTTGATGACGTTGGTGAT-3'	AB029935.1
β -1,3-Glucanase (<i>GLU</i>)	Sense 5'-ATCGACCTCATCATGGACGTGG-3' Antisense 5'-GTCGAAGAGGTTTGTGTAGGTGAG-3'	AB244639.2
<i>Phenylalanine ammonia-lyase (PAL)</i>	Sense 5'-CCAATGTTCTGTCCGTCCTTGCT-3' Antisense 5'-AACTGCGCGAACATCAGCTTGC-3'	AY005474.1
<i>Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)</i>	Sense 5'-GATTTGGTCTCCACTGACTTTGTGCG-3' Antisense 5'-CAACTAACATGAACCAGGCGTGC-3'	AY290728.1

System 2007) and differences between means were analysed by Tukey test ($p \leq 0.05$).

RESULTS AND DISCUSSION

Characterization of chitosan and chitosan derivatives

Chitosan solution presented a deacetylation degree of 84.5 %, which was calculated by considering the intensity ratio of infra-red absorption bands of N-acetyl glucosamine and glucosamine. In addition, viscometry results showed that chitosan in solution had a molecular weight of 50.8 kDa, considered low for a polymeric chitosan. Hydrolysed chitosan derivatives were characterized and mass spectrometry analysis revealed that oligomeric species found in the COS mixture had three or four monomeric units (chitotrioses and a chitotetraose) with different degrees of acetylation (Figure 1). Four main ion species were detected as sodium or potassium adducts at m/z values of 580.6, 607, 663.6 and 783.1, where m/z 580.6 corresponds to a monoacetylated chitotriose, whereas fully acetylated COS were detected at m/z 663.6. Molecular weight and acetylation degree directly influence the biological activity of chitosan and its derivatives (Kauss *et al.*, 1989; Falcón-Rodríguez *et al.*, 2009). Highly active COS have a degree of polymerization from four to six units with acetyl groups (Barber *et al.*, 1989), whereas fully deacetylated COS lack capacity to elicit defensive reactions in plants.

Chitosan exhibits inductive properties even when degree of acetylation varies from 1 % to 60 %, but

de la banda total de cada gen analizado y el gen de referencia *GAPDH*.

Análisis estadístico

Para el análisis de la expresión génica, se consideraron tres repeticiones biológicas por tratamiento y punto de muestreo. Un ANDEVA se realizó usando NCSS (Number Cruncher Statistical System 2007) y las diferencias entre medias se analizaron con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización del quitosano y derivados del quitosano

La solución de quitosano mostró desacetilación de 84.5 %, calculada con base en la relación de intensidad de las bandas de absorción infrarroja asignadas a N-acetilglucosamina y glucosamina. La viscometría mostró que el quitosano en solución tuvo peso molecular de 50.8 kDa, considerado bajo para un quitosano polimérico. Los derivados de quitosano hidrolizado se caracterizaron y el análisis de espectrometría de masas reveló que las especies oligoméricas en la mezcla de COS tenían tres o cuatro unidades monoméricas (quitotriosas y una quitotetraosa) con diferentes grados de acetilación (Figura 1). Cuatro especies de iones principales se detectaron como aductos de sodio o potasio a valores m/z de 580.6, 607, 663.6 y 783.1, donde m/z 580.6 corresponde a una quitotriosa monoacetilada, mientras que en m/z 663.6 se detectaron COS completamente acetilados. El peso molecular y el

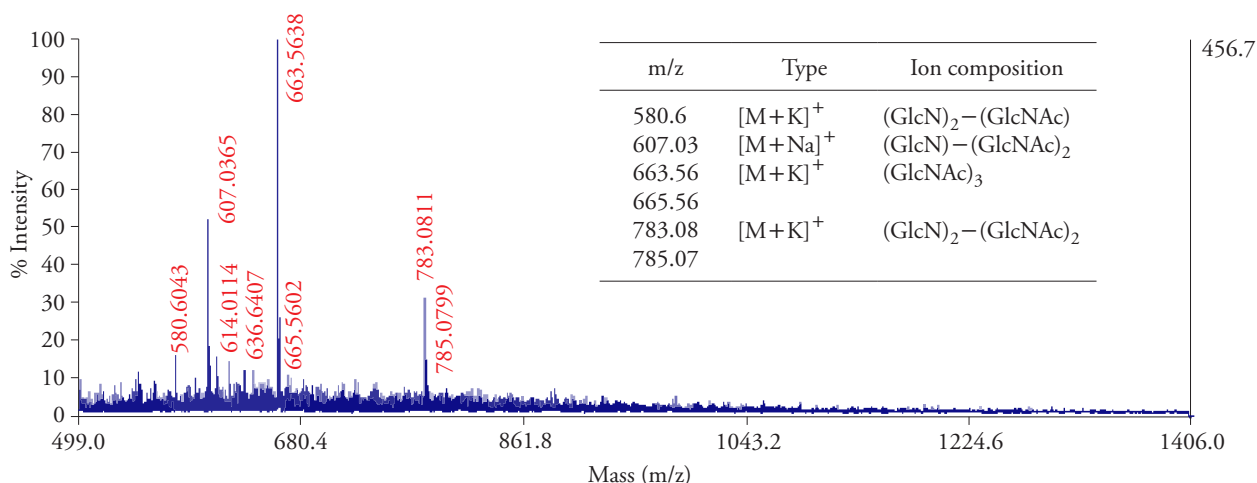


Figure 1. Mass spectrum and assigned ion composition of hydrolysed chitosan.
Figura 1. Espectro de masas y composición iónica asignada del quitosano hidrolizado.

with different intensity (Vander *et al.*, 1998). Also, this characteristic is associated to selective modulation of enzymes PAL and peroxidase in tobacco plants (Falcón-Rodríguez *et al.*, 2011). Interestingly, a linear deacetylated COS with a degree of polymerization of five reduced the incidence of *Fusarium* infection in *Z. bungeanum* and increased activity of enzymes related to protective mechanisms (Li *et al.*, 2016). This may suggest certain specificity between the structural features in chitosan derivatives with respect to the studied plant species.

Expression of the genes *chitinase (CHI)*, *β-1-3 glucanase (GLU)* and *phenylalanine ammonia-lyase (PAL)*

Chitosan and COS treatments induced both local and systemic responses in leaves of wheat seedlings, but with different speed and intensity depending on type of elicitor, concentration and gene evaluated (Figures 2 and 3). Expression of *CHI* and *GLU* was increased to different extents in seedlings treated with both types of elicitor, whereas *PAL* expression was differentially regulated: *PAL* transcript levels were increased by chitosan (Figure 2E, F) but decreased by COS (Figure 3E, F), with respect to controls.

Chitosan treatments elicited distal expression of the three evaluated genes; *CHI* and *PAL* transcripts peaked at hour 6 and went back to normal after 12 h (Figure 2B, F). *GLU* transcripts increased 12 h after 1 g L⁻¹ application (Figure 2D). Differences

grado de acetilación influyen directamente en la actividad biológica del quitosano y sus derivados (Kauss *et al.*, 1989; Falcón-Rodríguez *et al.*, 2009). Los COS altamente activos tienen un grado de polimerización de cuatro a seis unidades con grupos acetilo (Barber *et al.*, 1989), mientras que los COS totalmente desacetilados carecen de la capacidad de provocar reacciones de defensa en las plantas.

El quitosano exhibe propiedades inductivas incluso cuando el grado de acetilación varía de 1 % a 60 %, pero con diferente intensidad (Vander *et al.*, 1998). Además, esta característica se asocia con la modulación selectiva de las enzimas PAL y peroxidasa en plantas de tabaco (Falcón-Rodríguez *et al.*, 2011). Es interesante que un COS lineal desacetilado con un grado de polimerización de cinco redujo la incidencia de infección por *Fusarium* en *Z. bungeanum* y aumentó la actividad de enzimas relacionadas con los mecanismos de protección (Li *et al.*, 2016). Esto puede sugerir cierta especificidad entre las características estructurales en derivados de quitosano con respecto a las especies de plantas estudiadas.

Expresión de los genes *quitinasa (CHI)*, *β-1-3 glucanasa (GLU)* y *fenilalanina amonio liasa (PAL)*

Los tratamientos con quitosano y COS indujeron respuestas locales y sistémicas en las hojas de las plántulas de trigo, pero con diferente velocidad e intensidad en dependencia del tipo de elicitor,

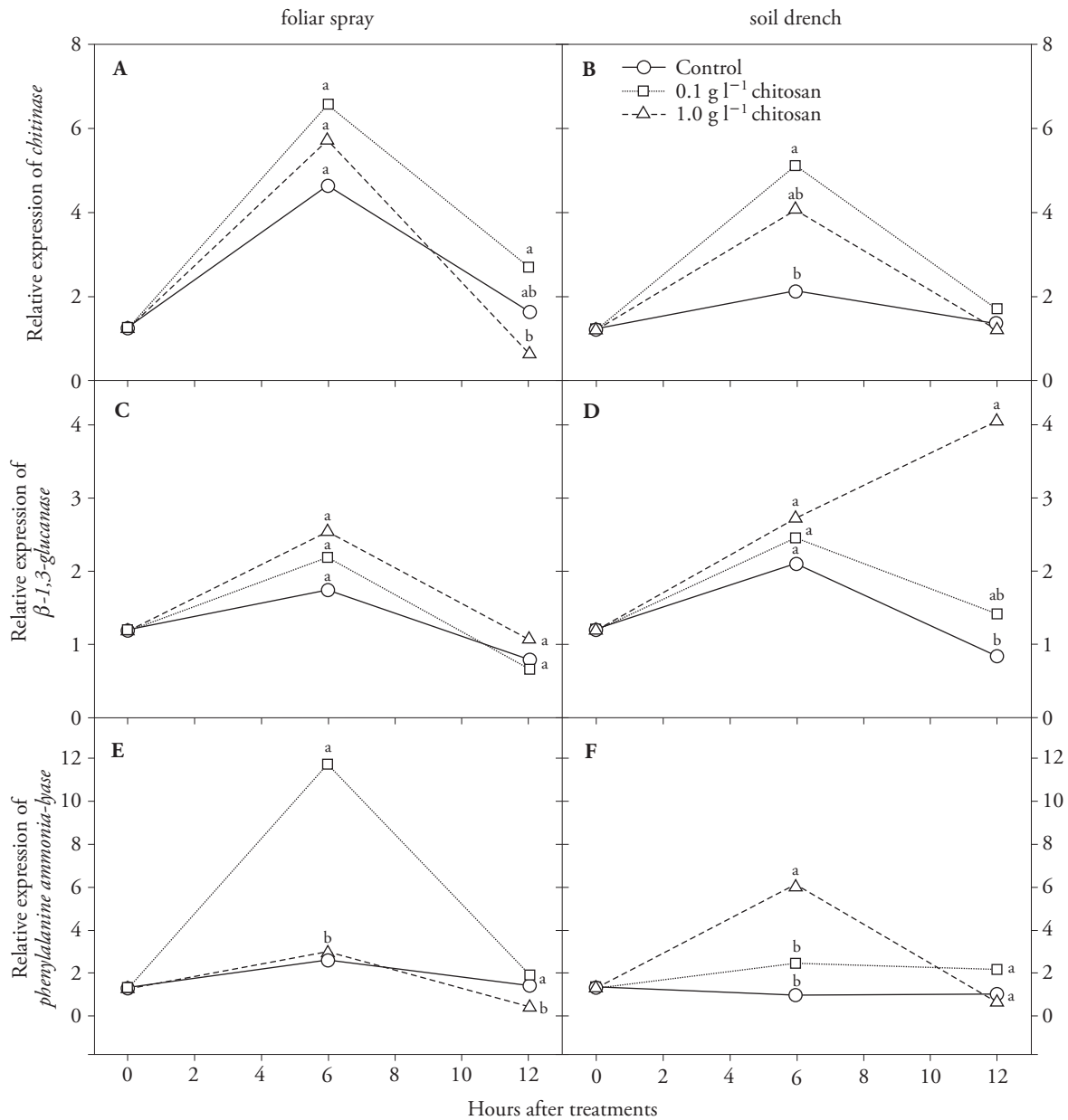


Figure 2. Changes in relative gene expression levels of defence-related markers *chitinase* (*CHI*) (A, B), β -1,3-*glucanase* (*GLU*) (C, D) and *phenylalanine ammonia-lyase* (*PAL*) (E, F) in leaves of chitosan-treated wheat seedlings by foliar spray or soil drench.

Mean values of three replications are presented. Means with different letters were significantly different ($p \leq 0.05$).

Figura 2. Cambios en los niveles de expresión génica relativos de los marcadores relacionados con la defensa *quitinasa* (*CHI*) (A, B), β -1-3 *glucanasa* (*GLU*) (C, D) y *fenilalanina amonio liasa* (*PAL*) (E, F) en hojas de plántulas de trigo tratadas con quitosano por aspersión foliar o aplicación en el sustrato.

Los valores medios de tres repeticiones se presentan. Letras diferentes indican medias significativamente diferentes ($p \leq 0.05$).

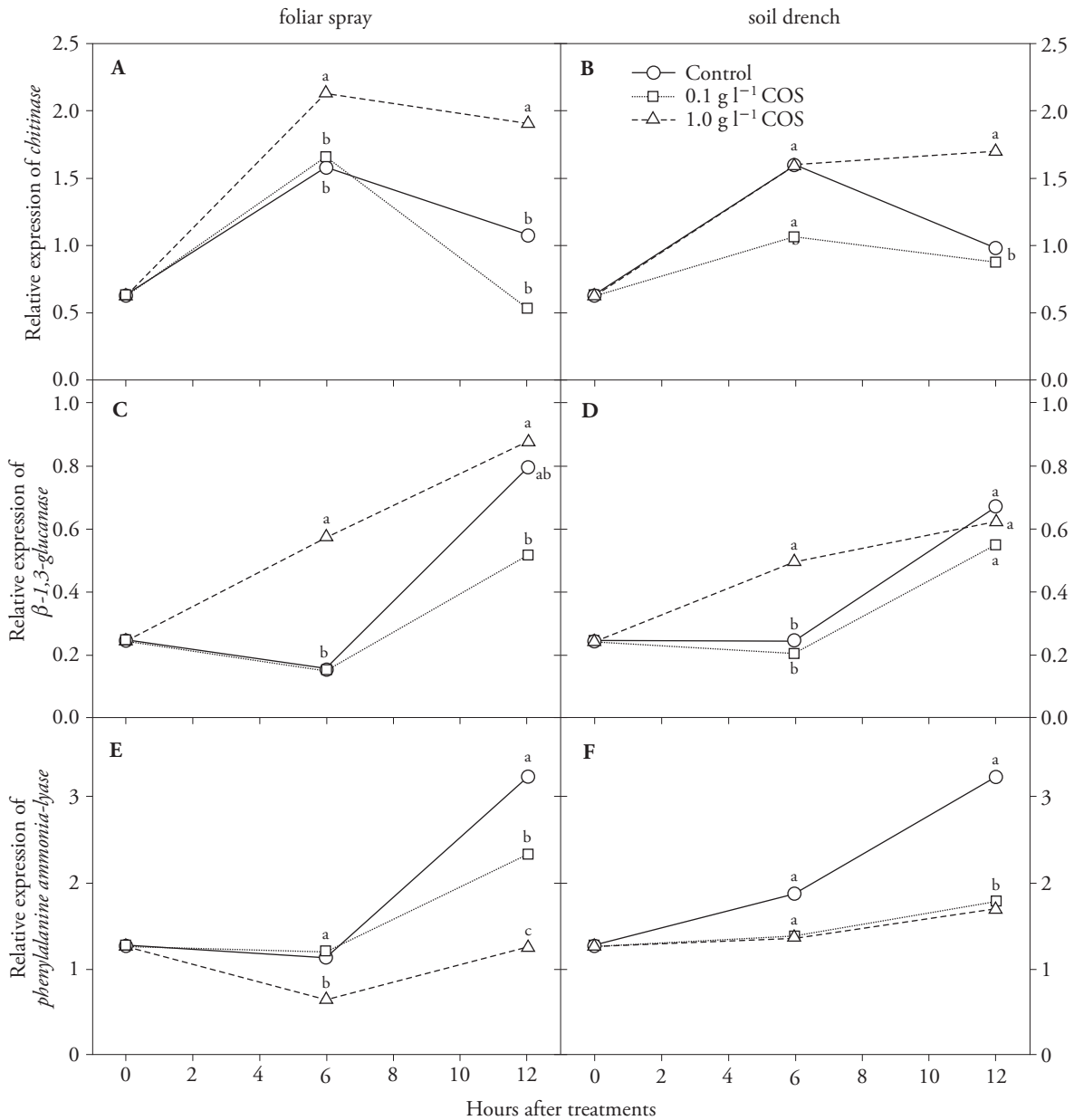


Figure 3. Changes in the relative gene expression levels of defence-related markers chitinase (*CHI*) (A, B), β -1,3-glucanase (*GLU*) (C, D) and phenylalanine ammonia-lyase (*PAL*) (E, F) in leaves of wheat seedlings treated with chito oligosaccharides (COS) by foliar spray or soil drench.

Mean values of three replications are presented. Means with different letters were statistically different ($p \leq 0.05$).

Figura 3. Cambios en los niveles relativos de expresión génica de los marcadores relacionados con la defensa quitinasa (*CHI*) (A, B), β -1,3 glucanasa (*GLU*) (C, D) y fenilalanina amonio liasa (*PAL*) (E, F) en hojas de plántulas de trigo tratadas con quitooligosacáridos (COS) por aspersión foliar o aplicación en el sustrato.

Los valores medios de tres repeticiones se presentan. Letras diferentes indican medias significativamente diferentes ($p \leq 0.05$).

in expression among analysed genes may rely on a different sensitivity to the stimulus, where a certain concentration may be sufficient for triggering a particular response. In our trial, the influence of elicitor concentration for transient *PAL* induction, within the first 6 h post-treatments, was evident (Figure 2 E and F): lower chitosan concentration (0.1 g L^{-1}) increased *PAL* transcripts in directly sprayed leaves. Distal induction of *PAL* was only favoured by more concentrated solution (1 g L^{-1}) applied to roots. This observation may show that perception of polymeric chitosan by radicular tissue was probably hampered by the soil matrix, thus influencing the availability of active molecules that trigger the accumulation of *PAL* transcripts. Increment of *PAL* activity can indirectly improve defensive performance of plant tissues by reinforcing physical barriers with lignin (Barros *et al.*, 2015) and by enabling production of phytoalexins (Hasan *et al.*, 2013).

A non-linear dose-response effect on accumulation of phenylpropanoid compounds and on increment of *PAL*, *GLU* and *CHI* enzymatic activities was reported for cultured parsley cells treated with fungal elicitors (Kombrink and Hahlbrock, 1986). Hence, chitosan dose-response curves would be necessary to test this effect on wheat seedlings. Foliar application of chitosan derivatives increased enzymatic activity of *PAL* and *GLU* in tobacco seedlings, and promoted systemic protection against the oomycete pathogen *Phytophthora nicotianae* (Falcón-Rodríguez *et al.*, 2011). However, when chitosan was directly applied to wheat leaves no significant induction of *CHI* and *GLU* transcript levels was observed (Figure 2A, C), which would suggest different specificity among plant species. Lin *et al.* (2005) found that the polymeric chitosan was less effective than the smaller COS at raising H_2O_2 levels and at inducing expression of PR genes *CHI* and *GLU* in rice cells. Increment in H_2O_2 levels is one of the first cell signalling mechanisms for activation of defensive responses in plants.

One g L^{-1} COS was a more effective concentration than 0.1 g L^{-1} to enhance the expression levels of *CHI* and *GLU* in both foliar and root treated wheat seedlings (Figure 3). In foliar treated plants *CHI* transcript levels were higher than controls within the first 6 h post-treatment and this effect was maintained by hour 12 (Figure 3A). Subsequent experiments showed that the induction of *CHI* transcript levels

concentración y gen evaluados (Figuras 2 y 3). La expresión de *CHI* y *GLU* se incrementó a diferentes grados en plántulas tratadas con ambos tipos de elicitor, mientras que la expresión de *PAL* se reguló diferencialmente: los niveles de transcritos de *PAL* se incrementaron con quitosano (Figura 2E, F) pero disminuyeron con COS (Figura 3E, F), comparados con los controles.

Los tratamientos con quitosano provocaron la expresión distal de los tres genes evaluados; los transcritos de *CHI* y *PAL* alcanzaron su punto máximo a la hora 6 y volvieron a la normalidad después de 12 h (Figura 2B, F). Los transcritos de *GLU* aumentaron 12 h después de la aplicación de 1 g L^{-1} (Figura 2D). Las diferencias en la expresión entre los genes analizados pueden depender de una sensibilidad diferente al estímulo, donde una cierta concentración puede ser suficiente para desencadenar una respuesta particular. En nuestro estudio, la influencia de la concentración del elicitor para la inducción transitoria de *PAL*, en las primeras 6 h después del tratamiento, fue evidente (Figura 2 E y F): menor concentración de quitosano (0.1 g L^{-1}) aumentó los transcritos de *PAL* en hojas rociadas de forma directa. La inducción distal de *PAL* solo se favoreció por una solución más concentrada (1 g L^{-1}) aplicada a las raíces. Esto puede mostrar que la percepción del quitosano polimérico por el tejido radicular quizá fue obstaculizada por la matriz del sustrato, lo que influye en la disponibilidad de moléculas activas que desencadenan la acumulación de transcritos de *PAL*. El aumento de la actividad de *PAL* puede mejorar indirectamente el rendimiento de protección de los tejidos de las plantas reforzando las barreras físicas con lignina (Barros *et al.*, 2015) y permite la producción de fitoalexinas (Hasan *et al.*, 2013).

El efecto dosis respuesta no lineal en la acumulación de compuestos fenilpropanoides e incremento de las actividades enzimáticas de *PAL*, *GLU* y *CHI* para células cultivadas de perejil, tratadas con elicitores fúngicos se documentó (Kombrink y Hahlbrock, 1986). Por lo tanto, curvas de dosis-respuesta del quitosano serían necesarias para probar este efecto en las plántulas de trigo. La aplicación foliar de derivados de quitosano aumentó la actividad enzimática de *PAL* y *GLU* en plántulas de tabaco y promovió la protección sistémica contra el patógeno oomiceto *Phytophthora nicotianae* (Falcón-Rodríguez *et al.*, 2011). Sin embargo, cuando el quitosano se aplicó

in foliar treated wheat plants was evident earlier than hour 6 (data not shown). The expression of *GLU* was transiently enhanced after 6 h in leaves of both foliar and root treated seedlings with 1 g L^{-1} COS (Figure 3C, D), but controls reached levels of treated plants by hour 12. Our results are similar to those reported by Ma *et al.* (2013), who showed that *GLU* expression was induced in peach fruit at 12 and 24 h after dip treatment with 5 g L^{-1} chitosan or COS. In contrast, COS significantly reduced both local and distal *PAL* expression (Figure 3E, F). This may likely indicate a regulatory effect, where COS might differentially induce or repress some defence-related pathways for a limited period of time. Such dynamic behaviour in expression profiles between *PAL* and the PR genes *CHI* and *GLU* could optimize cell energy waste due to *de novo* protein synthesis from induced transcripts.

An enhanced GLU enzymatic activity was observed in tobacco seedlings treated with COS by Falcón-Rodríguez *et al.* (2011). The increment in the expression and activity of enzymes GLU and CHI was associated to an enhanced plant tolerance to fungal infections (Zhu *et al.*, 1994). These enzymes hydrolyse components of cell wall of diverse phytopathogens and insect cuticle; therefore, they are key effectors of the systemic acquired resistance in plants, which is mainly triggered by phytohormone salicylic acid (Durner *et al.*, 1997).

The relationship between the increments of salicylic acid content and the activity of GLU in chitosan-treated peanut leaves was reported by Sathiyabama and Balasubramanian (1998). One of the known pathways for salicylic acid biosynthesis in plants is led by *PAL* (Chen *et al.*, 2009). However, the decrease of *PAL* transcript levels observed in the COS-treated wheat seedlings, did not avoid the increment of the PR transcripts *CHI* and *GLU*, which may have occurred by a COS-induced salicylic acid accumulation predominantly through an alternative pathway controlled by the enzyme isochorismate synthase (Catinot *et al.*, 2008). Therefore, it would be very interesting to study the effect of chitosan derivatives on the expression of *isochorismate synthase*, but also to determine if the induction of these defence-related transcripts correlates with an *in vivo* decreased susceptibility of chitosan- and COS-treated wheat seedlings to fungal infections.

directamente a las hojas de trigo la inducción no fue significativa en los niveles de transcritos de *CHI* y *GLU* (Figura 2A, C), lo que indica especificidad diferente entre las especies de plantas. Lin *et al.* (2005) encontraron que el quitosano polimérico era menos efectivo que los COS pequeños para aumentar los niveles de H_2O_2 e inducir la expresión de los genes PR *CHI* y *GLU* en células de arroz. El incremento en los niveles de H_2O_2 es uno de los primeros mecanismos de señalización celular para la activación de las respuestas de defensa en las plantas.

Un 1 g L^{-1} de COS fue una concentración más efectiva que 0.1 g L^{-1} para mejorar los niveles de expresión de *CHI* y *GLU* en plántulas de trigo tratadas de manera foliar o por raíz (Figura 3). En las plantas tratadas de manera foliar, los niveles de transcritos de *CHI* fueron más altos que los controles dentro de las primeras 6 h después del tratamiento y este efecto se mantuvo hasta la hora 12 (Figura 3A). Experimentos posteriores mostraron que la inducción de niveles de transcritos de *CHI* en plantas de trigo tratadas foliarmente era evidente antes de la hora 6 (datos no mostrados). La expresión de *GLU* aumentó transitoriamente después de 6 h en hojas de plántulas tratadas de manera foliar o por raíz con 1 g L^{-1} de COS (Figura 3C, D), pero en la hora 12 los testigos alcanzaron los niveles de las plantas tratadas. Nuestros resultados son similares a los reportados por Ma *et al.* (2013), quienes mostraron que la expresión de *GLU* se indujo en duraznos a las 12 y 24 h después de ser tratados por inmersión en quitosano o COS a una concentración de 5 g L^{-1} . En cambio, los COS redujeron significativamente la expresión de *PAL* local y distal (Figura 3E, F). Esto probablemente indica un efecto regulador, donde los COS podrían inducir o reprimir de manera diferencial algunas vías relacionadas con la defensa durante un período de tiempo limitado. Tal comportamiento dinámico en los perfiles de expresión entre *PAL* y los genes PR *CHI* y *GLU* podría optimizar el gasto de energía celular debido a la síntesis de proteínas *de novo* a partir de transcritos inducidos.

Falcón-Rodríguez *et al.* (2011) observaron una actividad enzimática mejorada de GLU en plántulas de tabaco tratadas con COS. El incremento en la expresión y la actividad de las enzimas GLU y CHI se asoció a una mayor tolerancia de las plantas a las infecciones fúngicas (Zhu *et al.*, 1994). Estas enzimas hidrolizan los componentes de la pared celular de di-

The differences between the expression patterns elicited by chitosan and COS indicate that molecular species in the COS mixture may have a particular action mechanism different from that of polymeric chitosan, which is a more complex molecule with a different acetylation pattern. Cell recognition patterns for non-acetylated species seems to lack specific receptors, hence eliciting properties of chitosan appears to be mediated by the interaction between positively charges and negatively charged membrane phospholipids (Silipo *et al.*, 2010). Some potential receptors that bind with high affinity to more acetylated species were characterized from plasma membrane of model plants (Kaku *et al.*, 2006; Miya *et al.*, 2007), suggesting that N-acetylated COS may trigger specific responses, which may in part explain the different expression patterns between COS- or chitosan-treated wheat seedlings. Our results agree with Vander *et al.* (1998), who found that partially N-acetylated chitosans elicited enzymatic activities of resistant markers in wheat leaves, whereas oligomeric species failed to induce lignin deposition. Biosynthesis of lignin precursors is carried out in the phenylpropanoid pathway, which is regulated by PAL. Therefore, it would be interesting to see whether or not a combined treatment of polymeric chitosan and COS could enhance the induction of defence responses in a greater extent.

CONCLUSION

The capacity to differentially modulate the local and systemic expression of defence-related genes in wheat by chitosan derivatives was shown by our research. Type and concentration of elicitor appear to be determinant factors for the response: COS with a polymerization degree from three to four units exert a stronger effect at higher doses. But, polymeric chitosan concentrations apparently do not follow a direct linear relationship with induction of defence-related transcripts accumulation. These results may help understand the activation of protective processes elicited by chitosan derivatives in wheat plantlets and its possible relation to induction of systemic resistance.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Dr. Jaime Lizardi for his kind support with the viscosimetry and IR spectroscopy techniques. Also, to the

versos fitopatógenos y la cutícula de los insectos; por lo tanto, son efectores clave de la resistencia sistémica adquirida en las plantas, la cual es desencadenada principalmente por la fitohormona ácido salicílico (Durner *et al.*, 1997).

La relación entre los aumentos del contenido de ácido salicílico y la actividad de GLU en las hojas de cacahuete tratadas con quitosano fue informada por Sathiyabama y Balasubramanian (1998). Una de las vías conocidas para la biosíntesis del ácido salicílico en las plantas es liderada por la PAL (Chen *et al.*, 2009). Sin embargo, la disminución de los niveles de transcritos de *PAL* observados en las plántulas de trigo tratadas con COS, no evitó el aumento de los transcritos PR *CHI* y *GLU*, lo cual pudo ocurrir por una acumulación de ácido salicílico inducida por COS predominantemente a través de una vía alternativa controlada por la enzima isocorismato sintasa (Catinot *et al.*, 2008). Por lo tanto, sería muy interesante estudiar el efecto de los derivados de quitosano en la expresión de *isocorismato sintasa*, pero también determinar si la inducción de estos transcritos relacionados con la defensa, correlaciona con una disminución *in vivo* de la susceptibilidad de plántulas de trigo, tratadas con quitosano y COS contra las infecciones fúngicas.

Las diferencias entre los patrones de expresión provocados por el quitosano y los COS indican que las especies moleculares en la mezcla de COS pueden tener un mecanismo de acción particular diferente al del quitosano polimérico, el cual es una molécula más compleja con un patrón de acetilación diferente. Los patrones de reconocimiento de células para especies no acetiladas parecen carecer de receptores específicos; entonces, las propiedades inductoras del quitosano parecen estar mediadas por la interacción entre sus cargas positivas y los fosfolípidos de membrana cargados negativamente (Silipo *et al.*, 2010). Algunos receptores potenciales que se unen con alta afinidad a las especies más acetiladas se caracterizaron desde la membrana plasmática de plantas modelo (Kaku *et al.*, 2006; Miya *et al.*, 2007), lo que sugiere que un COS N-acetilado puede desencadenar respuestas específicas, lo cual explica, en parte, los diferentes patrones de expresión entre las plántulas de trigo tratadas con COS o quitosano. Nuestros resultados concuerdan con Vander *et al.* (1998), quienes encontraron que los quitosanos N-acetilados parcialmente inducían actividades enzimáticas de marca-

Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), México, for providing the seeds for these experiments.

LITERATURE CITED

- Barber, M. S., R. E. Bertram, and J. P. Ride. 1989. Chitin oligosaccharides elicit lignification in wounded wheat leaves. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 34: 3-12.
- Barros, J., H. Serk, I. Granlund, and E. Pesquet. 2015. The cell biology of lignification in higher plants. *Ann. Bot.* 115: 1053-1074.
- Brugnerotto, J., J. Lizardi, F. M. Goycoolea, W. Argüelles-Monal, J. Desbrieres, and M. Rinaudo. 2001. An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization. *Polymer.* 42: 3569-3580.
- Cabrera, J. C., and P. Van Cutsem. 2005. Preparation of chitoooligosaccharides with degree of polymerization higher than 6 by acid or enzymatic degradation of chitosan. *Biochem. Eng. J.* 25: 165-172.
- Catinot, J., A. Buchala, E. Abou-Mansour, and J. P. Metraux. 2008. Salicylic acid production in response to biotic and abiotic stress depends on isochorismate in *Nicotiana benthamiana*. *FEBS Lett.* 582: 473-478.
- Chen, Z., Z. Zheng, J. Huang, Z. Lai, and B. Fan. 2009. Biosynthesis of salicylic acid in plants. *Plant Signaling Behav.* 4: 493-496.
- Curtis, B. C. 2002. Wheat in the world. *In: Curtis, B. C., S. Rajaram, and H. Gomez M. (eds). Bread Wheat: Improvement and Production. Plant Production and Protection Series No. 30. FAO, Rome.*
- Desmond, O. J., J. M. Manners, A. E. Stephens, D. J. Maclean, P. M. Schenk, D. M. Gardiner, A. L. Munn, and K. Kazan. 2008. The *Fusarium* mycotoxin deoxynivalenol elicits hydrogen peroxide production, programmed cell death and defence responses in wheat. *Mol. Plant Pathol.* 9: 435-445.
- Durner, J., J. Shah, and D. F. Klessig. 1997. Salicylic acid and disease resistance in plants. *Trends Plant Sci.* 2: 266-274.
- Falcón-Rodríguez, A. B., J. C. Cabrera, E. Ortega, and M. A. Martínez-Téllez. 2009. 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. Sci.* 4: 192-200.
- Falcón-Rodríguez, A. B., D. Costales, J. C. Cabrera, and M. A. Martínez-Téllez. 2011. Chitosan physico-chemical properties modulate defense responses and resistance in tobacco plants against the oomycete *Phytophthora nicotianae*. *Pestic. Biochem. Physiol.* 100: 221-228.
- FAO. 2014. Maize, rice, wheat farming must become more sustainable. FAO, Rome. <http://www.fao.org/news/story/en/item/273303/icode/> (Accessed: April 2017).
- Gozzo, F. 2003. Systemic acquired resistance in crop protection: from nature to a chemical approach. *J. Agric. Food Chem.* 51: 4487-4503.
- Hasan, M. M., M. Cha, V. K. Bajpai, and K. H. Baek. 2013. Production of a major stilbene phytoalexin, resveratrol in peanut (*Arachis hypogaea*) and peanut products: a mini review. *Rev. Environ. Sci. Bio/Technol.* 12: 209-221.
- dores de resistencia en las hojas de trigo, mientras que las especies oligoméricas fallaron al inducir la deposición de lignina. La biosíntesis de precursores de lignina se realiza en la ruta de fenilpropanoides, que está regulada por PAL. Por lo tanto, sería interesante ver si (o no) un tratamiento combinado de quitosano polimérico y COS podría mejorar la inducción de respuestas de defensa en mayor medida.

CONCLUSIÓN

Nuestra investigación muestra la capacidad de los derivados de quitosano para modular diferencialmente la expresión local y sistémica de genes relacionados con la protección en el trigo. El tipo y la concentración de activadores parecen determinantes para la respuesta: los COS con un grado de polimerización de tres a cuatro unidades ejercen efecto mayor con dosis mayores. Pero las concentraciones de quitosano polimérico, aparentemente, no siguen una relación lineal directa con la inducción de la acumulación de transcritos relacionados con la protección. Estos resultados pueden ayudar a entender la activación de procesos protectores provocados por derivados del quitosano en plántulas de trigo y su posible relación con la inducción de la resistencia sistémica.

—Fin de la versión en Español—



- Kaku, H., Y. Nishizawa, N. Ishii-Minami, C. Akimoto-Tomiya, N. Dohmae, K. Takio, E. Minami, and N. Shibuya. 2006. Plant cells recognize chitin fragments for defense signaling through a plasma membrane receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103: 11086-11091.
- Kauss, H., W. Jeblick, and A. Domard. 1989. The degrees 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.
- Kombrink, E., and K. Hahlbrock. 1986. Responses of cultured parsley cells to elicitors from phytopathogenic fungi timing and dose dependency of elicitor-induced reactions. *Plant Physiol.* 81: 216-221.
- Lin, W., X. Hu, W. Zhang, W. J. Rogers, and W. Cai. 2005. Hydrogen peroxide mediates defence responses induced by chitosans of different molecular weights in rice. *J. Plant Physiol.* 162: 937-944.
- Li, P., R. J. Linhardt, and Z. Cao. 2016. Structural characterization of oligochitosan elicitor from *Fusarium sambucinum* and its elicitation of defensive responses in *Zanthoxylum bungeanum*. *Int. J. Mol. Sci.* 17: 2076.

- Ma, Z., L. Yang, H. Yan, J. F. Kennedy, and X. Meng. 2013. Chitosan and oligochitosan enhance the resistance of peach fruit to brown rot. *Carbohydr. Polym.* 94: 272-277.
- Miya, A., P. Albert, T. Shinya, Y. Desaki, K. Ichimura, K. Shirasu, Y. Narusaka, N. Kawakami, H. Kaku, and N. Shibuya. 2007. CERK1, a LysM receptor kinase, is essential for chitin elicitor signaling in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104: 19613-19618.
- Moloi, M. J., and A. J. van der Westhuizen. 2006. The reactive oxygen species are involved in resistance responses of wheat to the Russian wheat aphid. *J. Plant Physiol.* 163: 1118-25.
- Pritsch, C., C. P. Vance, W. R. Bushnell, D. A. Somers, T. M. Hohn, and G. J. Muehlbauer. 2001. Systemic expression of defense response genes in wheat spikes as a response to *Fusarium graminearum* infection. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 58: 1-12.
- Roelfs, A.P., R. P. Sing, and E. E. Saari. 1992. Rust diseases of wheat: Concepts and methods of disease management. CIMMYT, México. 81 p.
- Sathiyabama, M., and R. Balasubramanian. 1998. Chitosan induces resistance components in *Arachis hypogaea* against leaf rust caused by *Puccinia arachidis* Speg. *Crop Prot.* 17: 307-313.
- Silipo, A., G. Erbs, T. Shinya, J. M. Dow, M. Parrilli, R. Lanzetta, N. Shibuya, M. A. Newman, and A. Molinaro. 2010. Glycoconjugates as elicitors or suppressors of plant innate immunity. *Glycobiology.* 20: 406-419.
- Vander, P., K. M. Vårum, A. Domard, N. E. El Gueddari, and B. M. Moerschbacher. 1998. Comparison of the ability of partially N-acetylated chitosans and chitoooligosaccharides to elicit resistance reactions in wheat leaves. *Plant Physiol.* 118: 1353-1359.
- Vishu K., A. B., M. C. Varadaraj, R. G. Lalitha, and R. N. Tharanathan. 2004. Low molecular weight chitosans: preparation with the aid of papain and characterization. *Biochim. Biophys. Acta.* 1670: 137-146.
- Zhu, Q., E. A. Maher, S. Masoud, R. A. Dixon, and C. J. Lamb. 1994. Enhanced protection against fungal attack by constitutive co-expression of chitinase and glucanase genes in transgenic tobacco. *Nat. Biotechnol.* 12: 807-812.