

EFECTO DE LA INOCULACIÓN CON TRES CEPAS DE HONGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES SOBRE LA ACLIMATIZACIÓN DE VITROPLANTAS DE PAPA (*Solanum tuberosum*)

Yakelín Rodríguez✉, Y. Quiñones y María M. Hernández

ABSTRACT. The influence of three strains of arbuscular mycorrhizal fungi (*Glomus claroideum*, *Glomus mosseae* and *Glomus* sp) on potato vitroplant acclimatization, clon 6-457, was studied. The percentages of mycorrhizal colonization and fungal density, as well as the growth variables: plant height, leaf number, nodal cutting number, and plant survival, were determined. Besides, leaf peroxidase and polyphenoloxidase activities and their isoenzyme expression were analyzed. In general, a positive effect of *Glomus* sp and *G. claroideum* strains on potato vitroplants was observed, *Glomus* sp-inoculated treatment being remarkable for the superior values recorded in fungal and growth variables evaluated. Indeed, enzymatic activities were repressed by *Glomus* sp, suggesting a minor stress of potato plants inoculated with this strain, as well as a better acclimatization in this stage. Isoenzymatic patterns did not show mycorrhization effect, due to differences among treatments were not detected and a new symbiosis-specific isoform was not expressed either.

RESUMEN. Este trabajo se realizó con el objetivo de estudiar la influencia de tres cepas de hongos micorrízicos arbusculares (*Glomus claroideum*, *Glomus mosseae* y *Glomus* sp) sobre la aclimatización de vitroplantas de papa (*Solanum tuberosum*), clon 6-457. Se determinaron los porcentajes de colonización micorrízica y densidad visual, las variables del crecimiento: altura, números de entrenudos y hojas, así como la supervivencia de las plántulas. Además, se estudiaron las actividades enzimáticas de peroxidasas y polifenoloxidasas en hojas y la expresión de sus isoenzimas. En general, se observó un efecto positivo de las cepas *Glomus* sp y *G. claroideum* sobre las vitroplantas de papa, destacándose *Glomus* sp por los valores superiores alcanzados en las variables fúngicas y del crecimiento evaluadas. Asimismo, esta cepa reprimió las actividades de las enzimas analizadas, sugiriendo una menor afectación de las plántulas de papa inoculadas y, por tanto, una mejor aclimatización en esta fase. Los patrones isoenzimáticos no reflejaron el efecto de la micorrización, ya que no se detectaron diferencias ni se expresó ninguna isoforma nueva específica de la simbiosis.

Key words: arbuscular mycorrhizae, adaptation, potato

Palabras clave: micorrizas arbusculares, adaptación, papa

INTRODUCCIÓN

La papa se cultiva a gran escala en más de 130 países (1) y los modos de propagación varían en función de los intereses de los productores, siendo la micropropagación una de las técnicas más empleadas con estos fines. Por lo general, la aplicación de estas técnicas tiene aún determinados problemas, que limitan su uso generalizado y no garantizan totalmente las condiciones para el posterior desarrollo de las plántulas derivadas en ambientes naturales.

En la última década, algunos investigadores han informado el uso de determinados microorganismos que habitan las plantas de manera natural, como una posible solución para incrementar la adaptación de las plántulas

producidas *in vitro* (2); un ejemplo de ello lo constituyen los hongos micorrízicos arbusculares (HMA).

La inoculación de estos hongos en posturas ha sido bien demostrada, siendo extendida a plantas micropropagadas como la piña, la fresa, la nuez, el aguacate, el plátano y otras vitroplantas. En todos los casos se han obtenido resultados positivos en el crecimiento y desarrollo, así como en el vigor y la sobrevivencia de estos cultivos, ya que estos microorganismos reducen el estrés asociado con la nutrición, la carencia de agua, la estructura del suelo, el pH, las sales, los metales tóxicos y los patógenos (2, 3, 4, 5). Paralelamente a estos estudios, se han realizado otros de carácter bioquímico; entre ellos, se destaca la determinación cuantitativa y cualitativa de sistemas enzimáticos involucrados en los eventos que tienen lugar en los procesos de reconocimiento, establecimiento y funcionamiento de la simbiosis micorrízica.

Dos de las enzimas ampliamente analizadas son las peroxidasas (EC 1.11.1.7) y las polifenoloxidasas (EC 1.10.3.1 y EC 1.10.3.2), las cuales pertenecen al sistema celular antioxidante de las plantas, donde participan como una

Ms.C. Yakelín Rodríguez, Investigador Agregado del Laboratorio de Micorrizas, Departamento de Biofertilizantes y Nutrición de las Plantas; Ms.C. Y. Quiñones, Investigador Agregado y Dra.C. María M. Hernández, Investigadora Titular del Departamento de Genética y Mejoramiento Vegetal, Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, Gaveta Postal 1, San José de las Lajas, La Habana, Cuba, CP 32 700.

✉ yakelin@inca.edu.cu

primera línea de defensa ante cualquier situación estresante (6).

Los trabajos realizados han demostrado que se producen variaciones en la transcripción, actividad enzimática y expresión isoenzimática de ambas enzimas, fundamentalmente en el sistema radical de las plantas, inducidos por la presencia del hongo (7, 8).

Tomando en cuenta todos los aspectos antes mencionados, ha sido objetivo del presente trabajo evaluar el efecto de la inoculación de distintas cepas de HMA (*G. claroideum*, *G. mosseae* y *Glomus* sp) sobre la aclimatización de vitroplantas de papa.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para la realización del experimento se seleccionaron vitroplantas de papa (clon 6-457) con 25 días de establecidas *in vitro*. El experimento se realizó en aislador y se utilizaron tres cepas de HMA (Tabla I), las cuales fueron inoculadas a razón de 2 g por vitroplanta, que se sembraron en bolsas de polietileno negro, una planta por bolsa. El sustrato utilizado fue la mezcla de suelo Ferralítico Rojo Compactado y cachaza (2:1 v/v). Se utilizó un diseño completamente aleatorizado con 20 plantas por tratamiento. A los 0 y 45 días de establecidas las plantas, se procedió a la toma de muestras para las determinaciones realizadas. También se evaluaron variables del crecimiento como la altura de las plántulas, el número de hojas y entrenudos, así como la supervivencia.

Tabla I. Relación de las cepas de hongos micorrízicos arbusculares estudiadas

Tratamientos	Cepas de HMA
Gcd	<i>Glomus claroideum</i> (Schenck & Smith)
Gm	<i>Glomus mosseae</i> (Nicol. & Gerd. emend. Gerdeman & Trappe)
Gsp	<i>Glomus</i> sp

Evaluaciones fúngicas (solo a los 45 días). Aproximadamente 200 mg de raicillas fueron cuidadosamente lavadas, secadas a 70°C y teñidas según Phillips y Hayman (9), para analizar los porcentajes de colonización micorrízica y densidad visual mediante el procedimiento descrito por Herrera *et al.* (10).

Extracción y cuantificación de proteínas. Las hojas de las vitroplantas fueron maceradas en mortero con nitrógeno líquido y el polvo resultante se homogenizó en *buffer* de extracción Tris-HCl 50mM pH 7.2 (1:1, p/v), el cual contenía sacarosa 10 % y β mercaptoetanol 0.1 %. Los extractos crudos fueron agitados en zaranda durante 45 min. en baño de hielo. Al terminar se filtraron a través de gaza doble y se centrifugaron a 14 000 gravedades por un período de 25 min. a 4°C. El sobrenadante obtenido fue conservado a -20°C. Se procesaron tres réplicas en cada caso. La concentración de proteínas se determinó por el método de Bradford (11) en un espectrofotómetro (*Ultrospec 2100 pro*).

Actividad enzimática. Las actividades enzimáticas de peroxidadas (PO) y polifenoloxidasas (PPO) se determi-

naron solo en hojas. Para la determinación de ambas actividades se emplearon métodos colorimétricos. La actividad peroxidasa se realizó según el método descrito por Frick (12) y se utilizaron guayacol y peróxido de hidrógeno como sustratos. La velocidad de oxidación del guayacol fue determinada a 470 nm. La actividad polifenoloxidasa se determinó por el método descrito por Alexander (13). El sustrato utilizado en este caso fue el pyrogalol y su oxidación fue evaluada a 420 nm. En los dos casos se tomó la variación de la densidad óptica ($\Delta D.O$) en el tiempo (Δt) durante dos minutos a intervalos de 15 segundos y se calculó según la expresión:

$$\text{Actividad enzimática} = \frac{\Delta D.O}{\Delta t} \cdot \frac{1}{k} \cdot \frac{V_1}{V_2} \cdot \text{dilución}$$

Donde:

k- coeficiente de extinción molar del guayacol o pyrogalol, V_1 - volumen de ensayo, V_2 - volumen de extracto enzimático.

A partir de la actividad enzimática expresada en $\mu\text{moles de producto formado/min/mL de enzima}$, se calculó la actividad específica que se expresó como UAE/mg de proteína.

Análisis estadístico. Los datos del porcentaje de colonización micorrízica fueron transformados por la función $2\arcsen\sqrt{x}$. Estos, además de los de densidad visual y actividades específicas, fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA) de clasificación simple siguiendo un diseño completamente aleatorizado. Las medias con diferencias significativas se compararon según la prueba de Rangos Múltiples de Duncan 0.05. Para el procesamiento estadístico se utilizó el *software SPSS*, versión 7.5.

Electroforesis. Los análisis electroforéticos fueron efectuados en geles de poliácridamida (*PAGE*) (reactivo calidad Fluka) en condiciones nativas utilizando 20 μL de muestra en cada caso, según el método descrito por Maribona *et al.* (14) con la siguiente modificación: gel concentrador (superior)-4 % y gel separador (inferior)-7.5 %.

Las electroforesis se realizaron en una cámara vertical *BIORAD miniprotean*, corridas a 25 mA y 4°C por 90-120 min. Para ello se empleó *buffer* Tris-Glicina 19 mM pH 8.3.

Para la tinción de las peroxidadas se sumergió el gel en benzidina hidroclicorica y peróxido de hidrógeno, hasta la aparición de bandas azules entre los 5-10 min. (15). La actividad polifenoloxidasa en el gel se reveló con L-Prolina y dihidroxifenilalanina (*DOPA*) disueltos en solución amortiguadora de fosfato de sodio 0.1M pH 6.5 (16). Ambas reacciones fueron detenidas con HAc al 10 %.

Los geles se fotografiaron con una cámara Nikon F90X y se utilizó una película Konica (100 asa); posteriormente las fotos fueron escaneadas (Acer Slim6).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Colonización fúngica. Los valores de las variables fúngicas analizadas son adecuados, mostrando similitud con los obtenidos en un experimento desarrollado en vitroplantas

de papa inoculadas con distintas cepas y concentrados de HMA, en dos sustratos (17).

Los tres tratamientos inoculados con HMA mostraron valores superiores al control en el porcentaje de colonización micorrízica (Tabla II), sin diferencias significativas entre ellos. Sin embargo, en el porcentaje de densidad visual sobresalieron por sus elevados valores las vitroplantas tratadas con *Glomus* sp, seguido por los tratamientos inoculados con *G. mosseae* y *G. claroideum*, que superaron al control sin diferir estadísticamente entre ellos.

Tabla II. Porcentajes de colonización micorrízica (%C) y densidad visual (% DV) en raíces de las vitroplantas de papa no inoculadas e inoculadas con tres cepas de HMA

Tratamientos	% C	% DV
Gcd	25.7 a	1.24 b
Gm	25.0 a	1.35 b
Gsp	26.0 a	3.69 a
C	21.0 b	0.46 c
ES	0.50***	0.01***
CV (%)	3.54	0.61

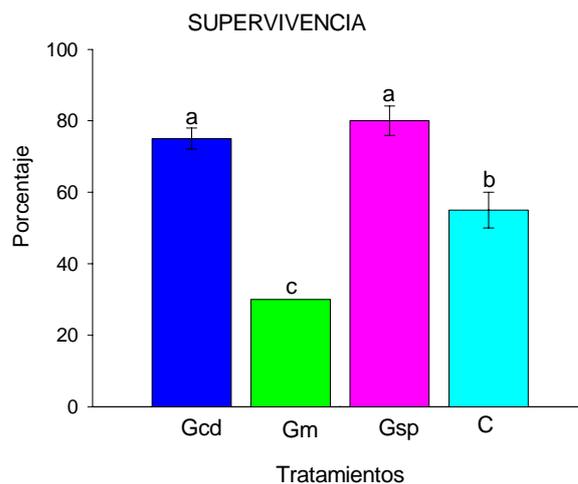
Valores con letras comunes en una misma columna no difieren significativamente según prueba de Duncan $p \leq 0.05$

Estos resultados indican que a pesar de estar colonizados de forma similar los sistemas radicales por los tres hongos estudiados, *Glomus* sp presentó una mayor ocupación de este, lo cual se refleja en la densidad visual, desarrollando más sus estructuras fúngicas, lo cual apunta hacia un efecto más marcado de esta cepa sobre las vitroplantas de papa. Resalta, asimismo, el bajo porcentaje de densidad visual que muestra el control, lo que sugiere que las cepas nativas no son muy infectivas.

Crecimiento y desarrollo. Al observar el comportamiento de la supervivencia de las vitroplantas de papa (Figura 1), sobresalen por sus valores elevados los tratamientos inoculados con *G. claroideum* y *Glomus* sp, sin diferencias significativas entre ellos. En cambio, el tratamiento inoculado con *G. mosseae* mostró valores inferiores al control sin inocular.

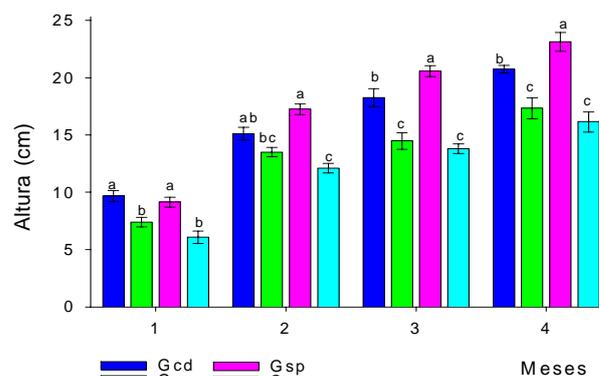
En la Figura 2 se aprecia la evolución de la altura de las vitroplantas de papa, donde durante los dos primeros meses evaluados se destacan los tratamientos inoculados con *G. claroideum* y *Glomus* sp sobre el inoculado con *G. mosseae* y el control sin inocular, que no manifiestan diferencias significativas entre ellos.

En cambio, al tercer mes se evidencia la superioridad del tratamiento inoculado con *Glomus* sp que sobresale por sus valores elevados, seguido por *G. claroideum* que difirió estadísticamente del resto de los tratamientos. Las vitroplantas controles y las inoculadas con *G. mosseae* no mostraron diferencias significativas, exhibiendo los valores inferiores de altura. A los cuatro meses se comportó de la misma forma con valores ligeramente superiores.



Gcd- *Glomus claroideum*, Gm- *Glomus mosseae*, Gsp- *Glomus* sp, C-Control

Figura 1. Efecto de la inoculación de tres cepas de hongos micorrízicos arbusculares sobre la supervivencia de las vitroplantas de papa aclimatizadas a los tres meses de establecidas



Gcd-*Glomus claroideum*, Gm- *Glomus mosseae*, Gsp-*Glomus* sp, C-Control

Figura 2. Efecto de la inoculación de tres cepas de hongos micorrízicos arbusculares sobre la altura de las vitroplantas de papa aclimatizadas durante cuatro meses

El número de entrenudos (Figura 3A) mostró un comportamiento similar a la altura, donde durante los primeros meses no se observaron grandes diferencias entre los tratamientos, a excepción del segundo mes que se destacan los tres tratamientos inoculados sobre el control, con valores superiores, sin diferencias significativas entre ellos. Sin embargo, al cuarto mes se manifiesta el mejor comportamiento del tratamiento inoculado con *Glomus* sp, con el mayor número de entrenudos, difiriendo estadísticamente del resto de los tratamientos.

En cuanto al número de hojas (Figura 3B), se observó algo parecido, destacándose al final del período evaluado el tratamiento inoculado con *Glomus* sp con el valor superior, seguido por *G. claroideum*, luego *G. mosseae* y por último el control, con diferencias significativas entre todos.

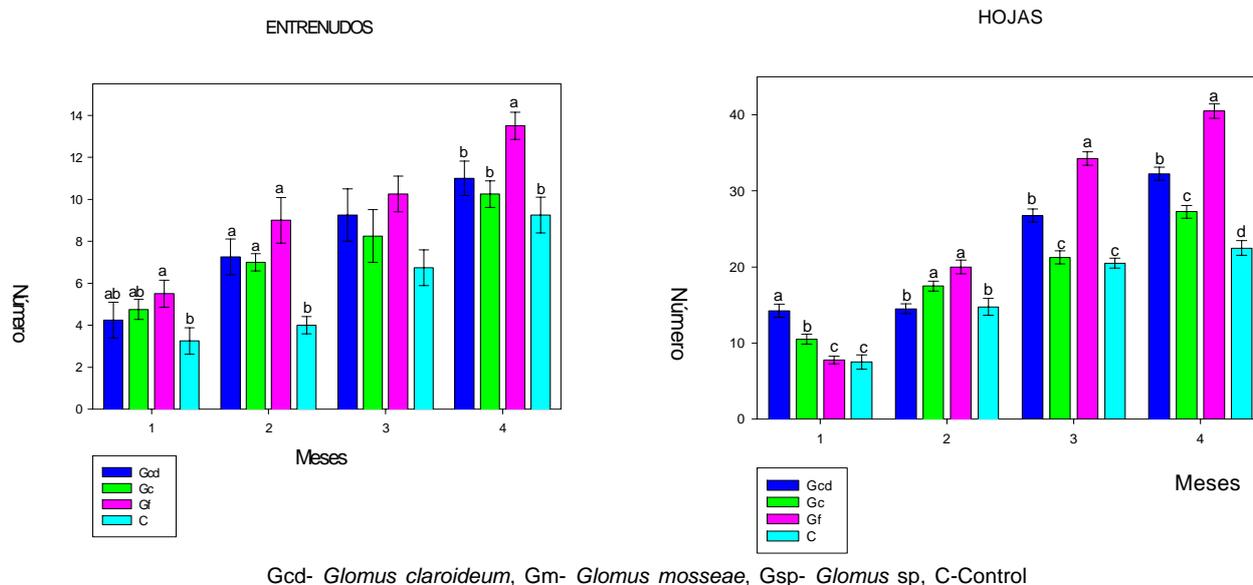
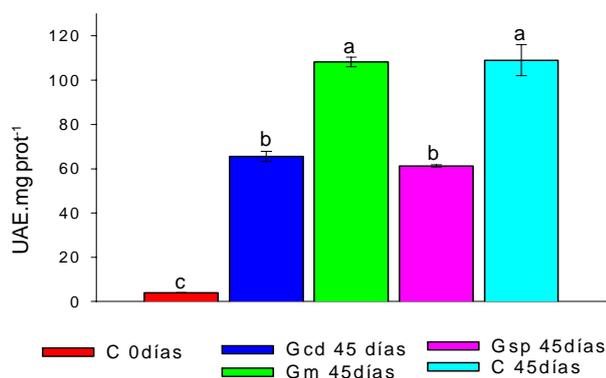


Figura 3. Efecto de la inoculación de tres cepas de hongos micorrízicos arbusculares sobre los números de entrenudos (A) y hojas (B) de las vitroplantas de papa aclimatizadas durante cuatro meses

Las variables del crecimiento analizadas reflejan claramente el efecto positivo de la inoculación con las cepas de HMA *Glomus* sp y *G. claroideum* sobre las vitroplantas de papa aclimatizadas, y entre ellas sobresale *Glomus* sp por sus valores elevados. Esto coincide con los resultados de las variables fúngicas expuestos anteriormente.

Actividades enzimáticas. Al analizar la actividad específica PO en hojas de las vitroplantas de papa inoculadas con las distintas cepas de HMA (Figura 4), se encontró que a los 45 días los valores fueron superiores (de tres a cinco veces) a los obtenidos a la salida de las vitroplantas de la fase *in vitro* (0 días), lo cual es lógico. En el segundo período evaluativo se observó un decremento de esta actividad en los tratamientos inoculados con las cepas *G. claroideum* y *Glomus* sp, entre los que no hubo diferencias significativas, mientras que el inoculado con *G. mosseae* no presentó diferencias respecto al control.



C-Control, Gcd- *Glomus claroideum*, Gm- *Glomus mosseae*, Gsp- *Glomus* sp.

Figura 4. Actividad específica de peroxidases a los 0 y 45 días de la aclimatización de las vitroplantas de papa inoculadas o no con hongos micorrízicos arbusculares

En cuanto a la actividad específica PPO (Figura 5), de forma similar al comportamiento observado para la actividad PO, los valores alcanzados por las vitroplantas aclimatizadas (45 días) fueron mayores a los que muestran estas vitroplantas antes del proceso de aclimatización (0 días). A los 45 días los tratamientos inoculados con las cepas *G. claroideum* y *G. mosseae* no difirieron estadísticamente del control sin inocular, mostrando los valores superiores. Solo el tratamiento inoculado con *Glomus* sp provocó una disminución de esta actividad.

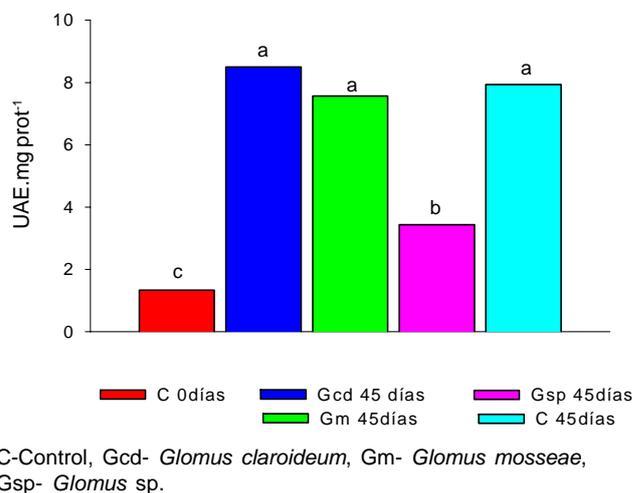


Figura 5. Actividad específica de polifenoloxidasas a los 0 y 45 días de la aclimatización de las vitroplantas de papa inoculadas o no con hongos micorrízicos arbusculares

Estos resultados concuerdan con los obtenidos en las variables fúngicas y del crecimiento y desarrollo estudiadas, ya que solo la cepa *Glomus* sp fue capaz de

reducir las actividades específicas de las enzimas determinadas en el tejido foliar, lo cual indica una menor afectación de las plántulas inoculadas con esta cepa y, por tanto, una mejor adaptación en esta fase.

El hecho de que ambas actividades fueran superiores en el segundo período evaluado respecto al primero, es debido a que a los 0 días estas vitroplantas están todavía en condiciones *in vitro*, mientras que a los 45 días están en condiciones de estrés más severas en la fase de aclimatación.

Se ha demostrado la participación de ambas enzimas en la llamada explosión oxidativa, que se produce como mecanismo de defensa de las plantas a los estrés biótico y abiótico (18, 19, 20), por lo que no resulta difícil aceptar que estén involucradas en el proceso de aclimatación de las vitroplantas de papa.

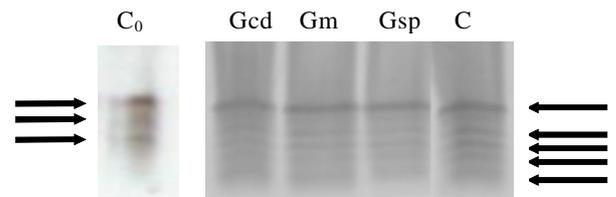
La represión de PO y PPO encontrada en hojas es un indicativo de la presencia del hongo en la raíz de las plántulas, evidenciándose mejor el efecto de la cepa *Glomus* sp. Aunque escasas, estas variaciones sugieren que los hongos *Glomus* sp y *G. claroideum* indujeron una respuesta sistémica, que pudiera favorecer la fase estudiada de la micropropagación (aclimatación).

Cabe mencionar los distintos procesos fisiológicos en los que participan ambas enzimas, como son el reforzamiento de la pared celular por la deposición de lignina y suberina, la acumulación de polifenoles, la formación de estructuras papilares y el entrecruzamiento de proteínas de la pared (21, 22).

La mayoría de los estudios realizados con plantas micorrizadas, relacionados con estas actividades enzimáticas, son en raíz, donde se han detectado incrementos de carácter transitorio y localizado, en diferentes etapas de la colonización de distintos cultivos (23, 24). Particularmente el tomate ha sido inoculado con estas mismas cepas y los resultados sugieren que *Glomus* sp está mejor preparada fisiológicamente para la colonización del cultivo y suponen que sea portadora de algún mecanismo, que inhiba la acción de esta enzima y su papel de defensa, existiendo mayor compatibilidad con el cultivo (7, 8).

No obstante, existen ya algunas evidencias de determinaciones realizadas en el tejido foliar, donde se han encontrado cambios en las actividades de enzimas de defensa (25). Asimismo, en hojas de vitroplantas de café micorrizadas en estadio *in vitro*, se han observado variaciones en las actividades PO y PPO, predominando la represión de estas (26).

Expresión de isoenzimas. En la Figura 6 se observa el patrón isoenzimático de PO, donde al salir de la fase *in vitro* (C_0) se detectaron tres isoformas en las hojas de las vitroplantas de papa, mientras que a los 45 días de la aclimatación aparecieron cinco isoformas. Sin embargo, no hubo diferencias en la expresión de estas isoenzimas en los tratamientos estudiados, por lo que no se manifiesta un efecto de la micorrización en este análisis.

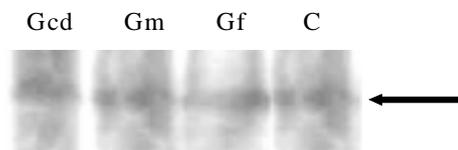


C_0 - Control antes del trasplante, C- Control a los 45 días, Gcd- *Glomus claroideum*, Gm- *Glomus mosseae* y Gsp- *Glomus* sp.

Figura 6. Patrón isoenzimático de peroxidases en hojas de las vitroplantas de papa aclimatizadas a los 0 y 45 días de inoculadas con tres cepas de hongos micorrízicos arbusculares

Se destaca una correspondencia entre estos resultados y los obtenidos en la actividad específica PO (Figura 4), observándose un menor número de bandas y una actividad baja antes del trasplante (0 días), así como un mayor número de bandas y una mayor actividad a los 45 días de la aclimatación.

En cuanto a la expresión de PPO (Figura 7), no se detectaron isoformas en las hojas de las vitroplantas de papa al salir de la fase *in vitro* (C_0) y a los 45 días de la aclimatación apareció una isoforma en todos los tratamientos. Similar a lo descrito para PO, esta determinación tampoco refleja efecto de la micorrización y muestra una correspondencia entre estos resultados y los obtenidos en la actividad específica PPO (Figura 5).



Gcd- *Glomus claroideum*, Gm- *Glomus mosseae*, Gsp- *Glomus* sp, C- Control a los 45 días

Figura 7. Patrón isoenzimático de polifenoloxidasas en vitroplantas de papa aclimatizadas a los 45 días de inoculadas con tres cepas de hongos micorrízicos arbusculares

REFERENCIAS

1. Struik, P. C. y Wiersema, S. G. Seed potato technology. Wageningen : Wageningen Pers. 1999, 383 p.
2. Nowak, J. Benefits on *in vitro* biotization of plant tissue cultures with microbial inoculants. *Review In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.*, 1998, vol. 34, p. 122-130.
3. Noval, B. de la *et al.*. Efecto del uso de micorriza arbuscular y combinaciones de sustrato sobre el crecimiento y desarrollo de vitroplantas de piña. *Cultivos Tropicales*, 1995, vol. 16, no. 1, p. 19- 22.
4. Vosatka, M.; Jansa, J. y Regver, M. Inoculation of mycorrhizal fungi-a feasible biotechnology for horticulture. *Plant Annu. Rev. Bot.*, 1999, vol. 39, p. 219-224.

5. Rai, M. K. Current advances in mycorrhization and micropropagation. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant*, 2001, vol. 37, p. 158-167.
6. Camejo, D.; Alarcón, J. J.; Torres, W.; Rodríguez, P. y Dell'Amico, J. M. Changes induced by high temperatures in photosynthesis and antioxidant response on two genotypes of tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Cultivos Tropicales*, 2002, vol. 23 no. 4, p. 33-37.
7. Rodríguez, Y.; Pérez, E.; Solórzano, E.; Meneses, A.; Fernández, F. Peroxidase and polyphenoloxidase activities in tomato roots inoculated with *Glomus mosseae* or *Glomus fasciculatum*. *Cultivos Tropicales*, 2001, vol. 22, no. 1, p. 11-16.
8. Pérez, E.; Rodríguez, Y.; Hernández, M. A. y Noval, B. M. de la. Dinámica de inducción de algunos sistemas de defensa en la interacción HMA-tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) var. Amalia. II. Inducción y expresión de peroxidasas y polifenoloxidasas en raíces de tomate. *Cultivos Tropicales*, 2004, vol. 25, no. 2, p. 45-52.
9. Phillips, J. M. y Hayman, D. E. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Trans. Br Mycol. Soc.* 1970, vol. 55, p. 158-161.
10. Herrera, R. A. /et al./ Estrategia de funcionamiento de la micorrizas VA en un bosque tropical. Biodiversidad en Iberoamérica. Ecosistemas, evolución y procesos sociales. En: Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el desarrollo. Subprograma XII, Diversidad Biológica (12:1995, Mérida).
11. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 1976, vol. 73, p. 248-250.
12. Frick, F. Oxidative enzymes. En: Physiological Plant Pathology. Encyclopedia of Plant pathology. Ed. Heitefuss, R y Williams, P. H. New series 4, p. 617-627, 1976.
13. Alexander, A. G. Sucrose enzyme relationship in immature sugar cane. *J. Agric of Univ. of P. Rico.* 1964, vol. 4813, p. 165-231.
14. Maribona, R. H.; Korneva, S.; Ruiz, A. y González, S. Obtention of sugar cane plants by tissue culture from different plant organs. *Proceeding XVIII Cong. ISSCT*, 1983, vol. 2, p. 610-621.
15. Barreto, A. y Simón, P. J. Utilización de las isoenzimas como marcadores genéticos en *Saccharum*. *Cultivos Tropicales*, 1979, vol. 1, p. 111-129.
16. Standford, H. A. y Galston, A. W. Ontogeny and hormonal control of polyphenoloxidase isozymes in tobacco pith. *Plant Physiology*, 1970, vol. 46, p. 1505-1512.
17. Fernández, K.; Fernández, F.; Rivera, R. y Olalde, V. La micorrización en la micropropagación de la papa (*Solanum tuberosum* L. Var. Alfa). Compendio de Exposiciones del Taller Nacional Producción de Papa en los Trópicos (5:2003, La Habana).
18. Doke, N.; Miura, Y.; Sánchez, L. M.; Park, H. J.; Toritake, T.; Yoshioka, H. y Kawakita, K. The oxidative burst protects plants against pathogen attack: Mechanism and role as an emergency signal for plant bio-defense. *Gene*, 1996, vol. 179, p. 45-51.
19. Mazorra, L. M. y Núñez, M. Influencia de análogos de brasinoesteroides en la respuesta de plantas de tomate a diferentes estrés ambientales. *Cultivos Tropicales*, 2003, vol. 24, no. 1, p. 35-40.
20. Porcel, R.; Barea, J. M. y Ruiz-Lozano, J. M. Antioxidant activities in mycorrhizal soybean plants under drought stress and their possible relationship to the process of nodule senescence. *New Phytologist*, 2003, vol. 157, p. 135-143.
21. Pozo, M. J. Inducción de enzimas hidrolíticas en raíces de tomate (*Lycopersicon esculentum*) como respuesta a la formación de MA y su implicación en el control biológico de *Phytophthora parasítica*. [Tesis de doctorado]. Universidad de Granada. 1999.
22. Quiroga, M.; Guerrero, C.; Botella, M. A.; Barcelo, A.; Amaya, I.; Medina, M. I. y Alonso, J. A tomato peroxidase involved in the synthesis of lignin and suberin. *Plant Physiol.*, 2000, vol. 122, no. 4, p. 1119-1127.
23. Ikram, B.; Bueno, P.; García-Garrido, J. M. y Ocampo, J. A. Catalase and peroxidase activities in tobacco roots inoculated by *Glomus mosseae*. En: International Conference on Mycorrhiza (2:1998, Sweden).
24. Spanu, P. y Bonfante-Fasolo, S. Cell-wall bound peroxidase activity in roots of mycorrhizal *Allium cepa*. *New Phytologist*, 1988, vol. 109, p. 119-124.
25. Rodríguez, Y.; Noval, B. de la; Fernández, F. y Rodríguez, P. Estudio comparativo del comportamiento de seis cepas de hongos micorrízicos arbusculares en su interacción con el tomate (*Lycopersicon esculentum* M. Var "Amalia"). *Ecología Aplicada*, 2004, vol. 3, no. 1, 2, p. 162-171.
26. Fernández, K.; Fernández, F.; González, M. E.; Pérez, E.; Mirabal, L. y Pazos, M. Micorrización *in vitro* de plántulas de *Coffea canephora* var. Robusta: ¿Una realidad? *Cultivos Tropicales*, 2002, vol. 23, no. 3, p 47-52.

Recibido: 10 de noviembre de 2004

Aceptado: 8 de diciembre de 2005