

DINÁMICA DE INDUCCIÓN DE ALGUNOS SISTEMAS DE DEFENSA EN LA INTERACCION HMA-TOMATE (*Lycopersicon esculentum* MILL.) VAR. AMALIA. I. INDUCCIÓN DE PR2, PR3 Y FENILALANINA AMONIO-LIASA EN RAÍCES DE TOMATE

E. Pérez[✉], Yakelín Rodríguez, María de los A. Hernández y Blanca M. de la Noval

ABSTRACT. To deeply know about the induction of biochemical mechanisms of plant defense in mycorrhizal-tomato interaction, levels of activation of local defense induced by arbuscular-mycorrhizal fungi (AMF) were determined and the time of these responses are sustained in tomato plants var. "Amalia". Under semicontrolled conditions, four AMF were studied: *Glomus clarum*, *Glomus fasciculatum*, *Glomus claroideum* and *Acaulospora scrobiculata*; those species induce PR2, PR3 and phenyl alanine ammonialyase differently as in time and magnitude. *G. fasciculatum* and *G. clarum* were the species which induce the highest levels of these enzymes.

RESUMEN. Con el objetivo de profundizar en el conocimiento de la inducción de mecanismos bioquímicos de defensa en la interacción micorriza-planta, se determinaron los niveles de activación de las respuestas de defensa local provocada por hongos formadores de micorrizas arbusculares (HFMA) y el tiempo que estas respuestas se mantienen en plantas de tomate variedad "Amalia". Para ello se estudiaron en condiciones semicontroladas, cuatro HFMA: *Glomus clarum*, *Glomus fasciculatum*, *Glomus claroideum* y *Acaulospora scrobiculata*, los cuales provocaron la inducción de las enzimas PR2, PR3 y fenilalanina amonio-liasa de forma diferencial, en cuanto a magnitud y tiempo. Las especies *G. fasciculatum* y *G. clarum* resultaron las que inducen mayores niveles de activación de las enzimas estudiadas.

Key words: *Glomus clarum*, *Glomus fasciculatum*, *Glomus claroideum*, *Acaulospora*, phenyl alanine ammonialyase, *Lycopersicon esculentum*

Palabras clave: *Glomus clarum*, *Glomus fasciculatum*, *Glomus claroideum*, *Acaulospora*, fenilalanina amonio-liasa, *Lycopersicon esculentum*

INTRODUCCIÓN

Las plantas no son hospederos pasivos al ataque de microorganismos con los que interactúan en su ambiente, sino que se defienden contra tales ataques con un arsenal de mecanismos defensivos (1). Los mecanismos de defensa preexistentes involucran barreras tales como ceras, cutículas o reservorios estratégicamente ubicados, que actúan para prevenir la colonización del tejido. Las plantas también inducen defensa celular, que previene la colonización posterior del tejido una vez que las barreras estructurales han sido flanqueadas. Estas defensas inducidas se describen como mecanismos activos, porque son una respuesta al patógeno invasor y requieren del metabolismo del hospedero (1).

A pesar del gran número de hongos y bacterias involucrados en la descomposición del material vegetal, solo muy pocos de estos patógenos potenciales han adquirido la habilidad de colonizar las plantas (2). En los casos en que ocurran infecciones, los agentes patógenos no invaden con la misma intensidad todas las variedades de una misma especie, provocando daños diversos entre ellas. Así, la resistencia a la infección contra patógenos es ampliamente distribuida entre las plantas; sin embargo, es difícil probar la naturaleza de los mecanismos de defensa que confieren algunas de estas formas de resistencia.

Una planta puede mostrar un rango de respuesta diferente, en dependencia de si actúa como un hospedante resistente o no frente al patógeno en cuestión. Los mecanismos constitutivos están presentes independientemente de la presencia del patógeno y son mecanismos protectores del huésped. Mayormente son fenómenos estáticos, de naturaleza estructural o química, que dificulta la entrada del patógeno, con lo cual previene su ataque (3). Incluye barreras físicas como cutícula y pared celular y compuestos constitutivos químicos, los que

E. Pérez, Ms.C. Yakelín Rodríguez y Ms.C. Blanca M. de la Noval, Investigadores Agregados del Departamento de Biofertilizantes y Nutrición de las Plantas, Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, Gaveta Postal 1, San José de las Lajas, La Habana, CP 32 700; María de los A. Hernández, Especialista en Gerencia y Control del Departamento de Biomedicina, Delegación CITMA, calle 17 no. 5008 e/ 50 y 52, Ciudad de La Habana, Cuba.

✉ eduardo@inca.edu.cu

pueden actuar como inhibidores de la actividad fúngica, tales como compuestos fenólicos, alcaloides, diterpenoides, esteroides glicoalcaloides y otros.

Los mecanismos inducidos constituyen procesos dinámicos, que descansan en mecanismos bioquímicos muy variados que se desencadenan como resultado de la presencia del patógeno. Muchas de las respuestas inducibles son el resultado de la activación transcripcional de genes específicos (3).

Existen tres clases de respuestas inducibles: respuestas de defensa inmediata, que incluyen la despolarización de la membrana, reacciones oxidativas, deposición de calosa y muerte celular hipersensible. Las respuestas locales clasificadas entre rápidas e intermedias, que incluyen la vía de los fenilpropanoides, fitoalexinas, glicoproteínas ricas en hidroxiprolina, proteínas intracelulares relacionadas con la patogénesis (PRs), peroxidasas y polímeros de la pared celular, y las respuestas sistémicas clasificadas entre intermedias y lentas, que incluyen: β 1-3 glucanasas, quitinasas y otras proteínas relacionadas con la patogénesis (2).

Esta división se basa en los patrones de expresión temporal y espacial de las diferentes respuestas de defensa. Sin embargo, es arbitraria, ya que ciertas respuestas tienen funciones duales o pueden exhibir patrones de expresión variables en los diferentes sistemas o en diferentes condiciones (2); no obstante, esta clasificación es la más empleada (4).

En Cuba, se han dado pasos acelerados para poner en práctica el uso de biofertilizantes, entre los que se encuentran los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) (4), que forman asociaciones simbióticas con las raíces de las plantas, conocidas como la simbiosis universal por su amplio rango de distribución tanto geográfica como biológica, presentes en más del 85 % de las plantas con interés económico.

Dentro de los principales beneficios que recibe una planta colonizada por hongos micorrízicos, se encuentran su mayor crecimiento principalmente en suelos con bajos contenidos de nutrientes poco móviles, mayor capacidad de absorción de agua y tolerancia a la sequía, protección contra patógenos de la raíz, detoxificación de metales pesados y estimulación de otros microorganismos simbióticos integrantes de la comunidad microbiana de la micorrizósfera (5).

En numerosas investigaciones realizadas, se evidencia que los HFMA y sus plantas hospederas producen una interacción altamente compatible, que induce una respuesta defensiva en la planta de carácter temporal, débil en relación con microorganismos patogénicos (6).

Hasta el momento, se conoce poco acerca de la dinámica de estos sistemas enzimáticos en la simbiosis del tomate variedad Amalia con dichas especies micorrízicas utilizadas en el presente trabajo.

Por tal razón, este trabajo tiene como objetivo profundizar en el conocimiento de la inducción de mecanismos bioquímicos de defensa en la interacción micorriza-

planta; para ello se determinaron los niveles de activación de las respuestas de defensa local con cuatro especies de hongos formadores de micorrizas arbusculares (HFMA), así como el tiempo que estas respuestas se mantienen en la planta.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal. Para la realización de este trabajo se utilizaron plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum*, Mill) de la variedad Amalia, incluida en el programa de mejoramiento del Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA).

Las semillas se peletizaron a razón de diez por ciento de inóculo por peso de semilla (7) con los inóculos a base de hongos micorrizógenos arbusculares, los cuales fueron: *Glomus clarum*, *Glomus fasciculatum*, *Glomus claroideum* y *Acaulospora scrobiculata*. Estas se sembraron en cajuelas con una mezcla de suelo Ferralítico Rojo más cachaza (8) en la proporción (3:1) esterilizadas y mantenidas en condiciones de casa de cristal (condiciones semicontroladas) a temperatura de 23°C +/- 2°C, humedad relativa entre 80-85 % y fotoperíodo natural durante 46 días.

Se estudiaron cinco tratamientos: plantas testigo (no inoculadas), plantas inoculadas con *G. clarum*, *G. fasciculatum*, *G. claroideum* y *A. scrobiculata*. La concentración de esporas en los inóculos fue 250 esp/g para todas las cepas estudiadas. El experimento se realizó bajo un diseño completamente aleatorizado. Se realizó una dinámica de tres sistemas enzimáticos en raíces a los 3, 5, 8, 15, 22, 26, 30, 33, 36, 40, 43 y 46 días. Los sistemas enzimáticos estudiados fueron quitinasa, β -1,3-glucanasa y fenilalanina amonio-liasa (PAL).

Extracción de enzimas. Se tomaron muestras aleatorias formando un *pool* de plantas, las que fueron procesadas de la siguiente manera: el material radicular se maceró en nitrógeno líquido y se homogenizó con solución amortiguadora de extracción (acetato de sodio 0.1 M pH 5.2 conteniendo 5 g de polivinilpirrolidona y 0.05 mL de β -mercaptoetanol en 100 mL de solución de extracción), en proporción 2:1 (mL:gramo de peso fresco). El homogenato se agitó en zaranda durante 45 minutos en baño de hielo. Posteriormente se centrifugó a 14 000 g a 4°C durante 25 minutos en centrifuga refrigerada (Beckman, modelo J2-21). El sobrenadante obtenido se utilizó para realizar las determinaciones de actividad enzimática. El extracto de proteínas fue almacenado a -20°C hasta su uso. La concentración de proteínas se determinó por el método de Bradford (9), realizando la lectura de la absorbancia a 595 nm del complejo proteína-Azul de Coomassie G-250 en un espectrofotómetro (*Ultrospec Plus Spectrophotometer*, Pharmacia LKB), para lo cual se realizó una curva patrón de albúmina bovina (BSA) a partir de una solución madre de 1 mg.mL⁻¹.

Determinación de las actividades enzimáticas. Los procedimientos de determinación de actividad enzimática

fueron estandarizados en nuestras condiciones previo a su utilización, determinándose en cada uno de ellos la concentración de sustrato y de preparado enzimático óptimo y condiciones de temperatura, pH y períodos de incubación adecuados.

Actividad quitinasa. La actividad quitinasa se determinó según el método colorimétrico, discontinuo, descrito por Boller (10) modificado. Se utilizó como sustrato la quitina coloidal obtenida a partir de quitina calidad reactivo (Fluka). La actividad fue medida espectrofotométricamente a 585 nm (11). La curva patrón se determinó utilizando n-acetilglucosamina a partir de una solución madre de 1 mg.mL⁻¹, a la cual se le realizó el mismo procedimiento. El cálculo se realizó según la expresión:

$$\text{Actividad enzimática} = \frac{\text{D.O.}}{t \text{ incub}} \cdot \text{Cot.} \cdot \frac{V_{\text{ens}}}{V_{\text{enz}}} \cdot \text{dil.}$$

y las unidades de actividad se expresaron en $\mu\text{moles de producto formado} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1} \text{ enz.}$

Actividad β -1,3-glucanasa. Se procedió según el método discontinuo y colorimétrico propuesto por Somogyi (12), utilizando como sustrato laminarina (β -1,3- glucano).

La velocidad de la reacción se calculó a partir de las lecturas de absorbancia a 660 nm, determinando azúcares reductores.

La curva patrón se realizó utilizando distintas concentraciones de glucosa como estándar a partir de una solución de 1 mg.mL⁻¹ y siguiendo el mismo procedimiento descrito anteriormente. El cálculo y la expresión de la actividad enzimática se realizó según lo referido para la enzima anterior.

Actividad fenilalanina amonio-liasas (PAL). Se procedió según el método discontinuo propuesto por Paynet (13), utilizando como sustrato la fenilalanina. La velocidad de la reacción se calculó a partir de las lecturas de absorbancia a 275 nm, determinando ácido cinámico.

La curva patrón se realizó utilizando distintas concentraciones de ácido cinámico como estándar a partir de una solución de 1 mg.mL⁻¹ y siguiendo el mismo procedimiento descrito anteriormente. El cálculo y la expresión de la actividad enzimática se realizó según lo referido para quitinasa.

La actividad específica de cada una de las enzimas se determinó según la expresión:

$$\text{Actividad específica} = \frac{\text{Actividad enzimática}}{\text{concentración de proteína } (\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})}$$

Análisis de la ocupación fúngica. Se realizaron las determinaciones correspondientes a densidad visual (DV) por el método de Trouvelot (14).

Análisis estadístico. Los datos que se presentan son la media de al menos tres réplicas para cada una de las actividades enzimáticas en estudio.

Los datos obtenidos fueron sometidos a análisis de varianza bifactorial (ANOVA), donde los factores a evaluar fueron:

→ tratamiento: plantas testigo, plantas inoculadas con *Acaulospora scrobiculata*, *G. clarum*, *G. fasciculatum* y *Glomus claroideum*.

→ tiempo: 3, 5, 15, 21, 26, 33, 40 y 46 días.

Se incluyó el análisis de la Prueba de Intervalos Múltiples de Duncan, con un nivel de significación de $p < 0.01$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis de la ocupación fúngica. En la tabla se presenta la dinámica de los porcentajes de densidad visual (DV) para cada uno de los tratamientos estudiados en comparación con el testigo.

Esta medida micorrízica refleja con mayor claridad e intensidad la presencia del miceto y de hecho la propia eficiencia simbiótica, debido a que expresa la cantidad porcentual de estructuras fúngicas y de intercambio entre los simbioses.

Al comparar los valores de densidad visual alcanzados en las plantas inoculadas, pudo determinarse que los mayores se obtuvieron en los tratamientos con *G. fasciculatum*, en los cuales se alcanzaron valores de 3.81 % a los 40 días, siendo el más alto el obtenido para esta variable en el experimento.

Considerando que este parámetro refleja la intensidad de la ocupación fúngica en el interior de las raíces, se puede presumir que esta especie es la más agresiva para el cultivo del tomate en las condiciones en que se realizó el experimento, lo que está determinado, entre otras cosas, por la especificidad que se establece entre la especie vegetal y su hospedante micorrízico.

Tabla I. Porcentajes de densidad visual (DV) determinados en cada uno de los tratamientos

Días/tratamiento	3	5	15	21	26	33	40	46
<i>Glomus fasciculatum</i>	0.02 j	0.21 h	0.53 g	1.00 e	1.28 d	1.86 c	3.81 a	2.28 b
Plantas no micorrizadas	0.00 j	0 j	0.01 j	0.04 j	0.11 i	0.25 h	0.94 f	0.56 g
CV = 3.93								
<i>Glomus clarum</i>	0.02 j	0.21 h	0.53 g	1.00 e	1.28 d	1.86 c	3.81 a	2.28 b
Plantas no micorrizadas	0.00 j	0.00 j	0.01 j	0.04 j	0.11 i	0.25 h	0.94 f	0.56 g
CV = 8.09								
<i>Acaulospora scrobiculata</i>	0.02 k	0.17 i	0.41 g	0.59 f	0.71 e	1.65 c	2.79 a	2.18 b
Plantas no micorrizadas	0.00 k	0.00 k	0.01 k	0.04 k	0.11 j	0.25 h	0.94 d	0.56 f
CV = 4.12								
<i>Glomus claroideum</i>	0.02 k	0.17 i	0.44 g	0.52 f	0.56 ef	1.31 c	2.49 a	2.00 b
Plantas no micorrizadas	0.00 k	0.00 k	0.01 k	0.04 k	0.11 j	0.25 h	0.94 d	0.56 ef
CV = 4.45								

Medias con letras iguales no difieren significativamente para $p < 0.01$

En general, todas las plantas inoculadas presentaron altos valores de colonización y ocupación fúngica.

Resultados similares han sido presentados por otros autores (15), quienes encontraron variabilidad en la respuesta de plantas de tomate inoculadas con *G. fasciculatum* y *G. clarum*, en experimentos de campo sobre suelo Ferralítico Rojo e informaron a *G. fasciculatum* como la especie más agresiva, debido a los altos niveles de infectividad encontrados y a sus efectos sobre el rendimiento. Así mismo, en estudios anteriores con la variedad INCA-17 y dos especies de *Glomus*, se encontraron resultados similares en cuanto al establecimiento de la simbiosis, que resultó estar más beneficiada para la cepa *G. fasciculatum* (16).

En todos los casos se aprecia una disminución de las estructuras fúngicas en la etapa final del experimento, que se relaciona con el inicio de la fase de floración de la planta y que parece estar vinculada con la necesidad de restringir el flujo de fotosintatos hacia el hongo, debido a la alta demanda nutricional que implica esta fase en su ciclo vegetativo.

Actividad quitinasa. La Figura 1(A y B) muestra la dinámica de inducción de la enzima quitinasa en la interacción tomate-HMA.

En la Figura 1(A) se muestra el comportamiento de la enzima para las especies *G. clarum* y *G. claroideum*, donde se observa que en las plantas inoculadas con *G. claroideum* se mantiene a niveles por debajo del testigo en la primera etapa de la colonización, no comportándose así para *G. clarum*, donde desde el tercer día se observa actividad que alcanza un pico a los ocho días, luego tiende a disminuir, pero se mantiene por encima del testigo y a partir de los 26 días comienza a incrementarse la actividad, obteniéndose un pico a los 33 días con tendencia a disminuir hasta los 36 días y un nuevo incremento a los 40 días para luego disminuir. En el caso de *G. clarum* a los 26 días tiende a aumentar los valores de actividad que sobrepasan al testigo,

obteniéndose un máximo a los 33 días, después disminuye y luego a los 43 días tiende a incrementarse.

La Figura 1(B) describe la dinámica de esta enzima para *G. fasciculatum* y *A. scrobiculata*.

En el caso de *G. fasciculatum*, en todo momento se observan valores por encima del testigo, obteniéndose picos de actividad entre los cinco y ocho días, a los 33 días y un pico significativo a los 40 días. Para el caso de *A. scrobiculata*, a los tres días se obtiene actividad quitinasa por encima del testigo, que inmediatamente decae hasta valores similares al testigo. Después la tendencia es a incrementarse, pero se comporta con niveles similares al testigo, menos en el día 22 que se obtiene un pico de actividad igual que en *G. fasciculatum*.

Las quitinasas son enzimas hidrolíticas capaces de romper los enlaces β -1,4-glicosídicos entre los residuos N-acetil glucosamina de la quitina. Este polisacárido es un componente de la estructura de la pared de todos los hongos verdaderos, incluyendo los HMA y ectomicorrizas así como de muchos patógenos, lo que indica que las quitinasas son importantes en las interacciones planta-hongo (17).

Se han encontrado resultados similares para *G. fasciculatum* y sugieren que estos niveles de actividad estén relacionados con el crecimiento de la hifa intrarradical, conociendo que la estructura de la hifa cambia desde terciaria y compleja en la fase de apresorio hasta plana y sencilla en la fase de arbusculo. Así mismo se relaciona la actividad con la senescencia de los arbusculos, los cuales son fagocitados entre tres y siete días después de establecidos (16).

Para *G. clarum* y *G. fasciculatum* se aprecia que desde el inicio de los muestreos la actividad quitinasa se encontraba elevada; los planteamientos anteriores podrían justificar los altos niveles de quitina observados en el experimento para estas dos cepas. Así mismo, se aprecia en los valores de DV que estos fueron los hongos con valores más elevados desde el comienzo del proceso, lo

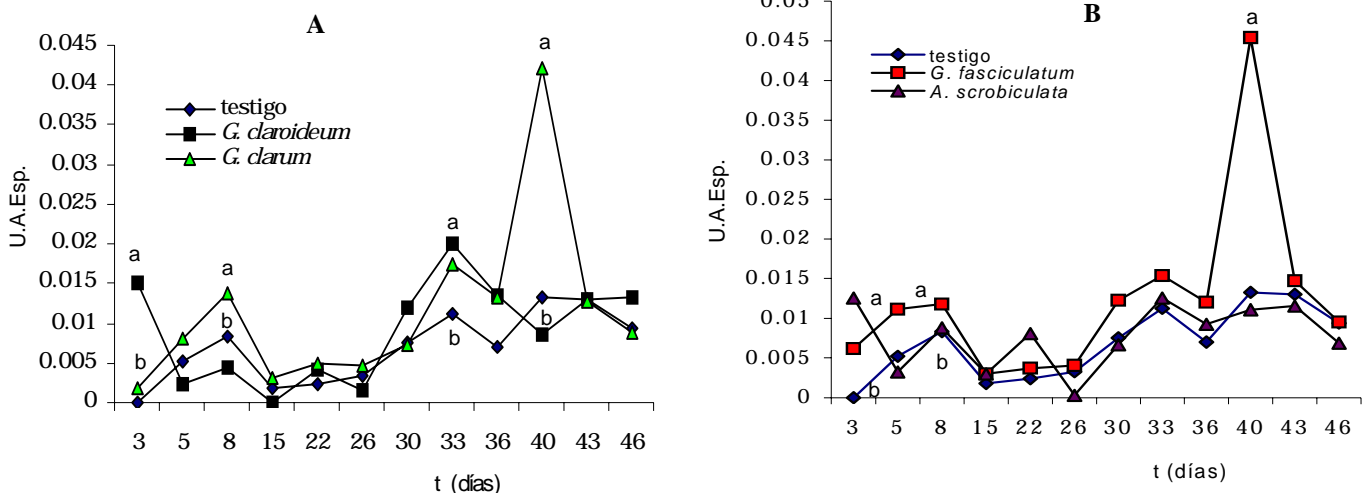


Figura 1. Efecto de la inoculación con HMA sobre la actividad enzimática de quitinasa en tomate, en los diferentes momentos de muestreo

cual da una medida de la correlación que puede existir entre la actividad y el porcentaje de estructuras fúngicas encontradas en el experimento para estas dos especies.

Para el caso de las otras dos especies, se aprecia que aún cuando los niveles de actividad en el inicio no logran sobrepasar al testigo, los niveles basales de la enzima en el inicio son capaces de garantizar que se empiece a establecer comunicación entre los simbiontes y por tanto que la infección proceda.

Los altos niveles de la enzima garantizan además que, en el caso de los HMA, las quitinasas inducidas por estos hongos pueden hidrolizar los elicitores fúngicos producidos por estos y, por tanto, atenuar los sistemas de defensa de la planta. Algunos autores plantean que en estadios tardíos, se produce la acumulación de quitinasas específicas inducidas exclusivamente por la micorrización. Estas inactivan completamente a los oligoquitosacáridos al hidrolizarlos hasta monómeros de N-acetil glucosamina, lo que elimina las respuestas defensivas rápidas que dan lugar a la síntesis de proteínas PR (18, 19). Considerando lo anterior es de suponer que la interacción está más favorecida en el caso de *G. fasciculatum* y *G. clarum*, que presentan los mayores niveles de activación de la enzima desde el inicio del muestreo.

Al final de la dinámica se observa un incremento de la actividad alrededor del día 40 para la mayoría de las especies en estudio, que coincide con el inicio de los procesos de floración y que consideramos se debe a lo planteado anteriormente respecto a la restricción de la planta hacia el HMA, por el aumento en las necesidades nutricionales de esta, lo que puede estar avalado por el hecho de que la enzima participa en el caso de los HMA en la fagocitosis de los arbusculos. El aumento de actividad también se aprecia en plantas testigo, aunque más leve, lo que podría ser consecuencia del estrés provocado por el crecimiento de la planta en un área limitada.

Actividad β -1,3-glucanasa. En la Figura 2(A y B) se representa el comportamiento de la enzima β -1,3-glucanasa

en las plantas tratadas con las diferentes especies de hongos micorrizógenos.

Como se puede observar en la Figura 2(A), desde los tres días comienza a incrementarse la actividad de la enzima, en el caso de *G. claroideum* el máximo de actividad lo alcanza a los cinco días y para *G. clarum* a los ocho días, siendo en este último caso la actividad mayor que la del testigo sin micorrizar. Luego en ambas especies tiende a disminuir hasta el día 22. Después comienza a elevarse los niveles de actividad en ambos casos, resultando que para *G. clarum* se mantiene muy por debajo del testigo, no comportándose de esta manera para *G. claroideum* que tiene valores mayores que este. Más tarde, a los 33 días, disminuye la actividad y es en *G. clarum* donde la disminución es mayor a los 40 días. A los 43 días vuelve a observarse un ligero aumento en la actividad, siendo más elevado en *G. clarum*.

En la Figura 2(B) se representa el comportamiento de esta enzima en plantas inoculadas con *G. fasciculatum* y *A. scrobiculata*. Se observa que a los tres días, para el caso de *G. fasciculatum*, se obtiene el máximo de actividad de la enzima, la cual inmediatamente disminuye hasta los ocho días y a los 15 días se observa un ligero aumento, para luego disminuir. A partir de los 22 días se incrementa y vuelve a disminuir la actividad, pero se mantiene por debajo de los niveles del testigo en la mayor parte de este período y es a los 43 días que se incrementa por encima de este y luego tiende a disminuir.

Para el caso de *A. scrobiculata*, los niveles de actividad se mantienen por debajo del testigo, solo a los ocho y 43 días sobrepasa los valores de este.

Las β -1,3-glucanasas catalizan la hidrólisis de los enlaces glucosídicos del tipo β -1,3-D en los β -D-glucanos. Este polisacárido es, junto con la quitina, el componente fundamental de la pared de la mayoría de los hongos (20), por lo que se ha atribuido a las β -1,3-glucanasas un carácter antifúngico, al ser capaces de degradar parcialmente las paredes celulares de ciertos hongos. Además

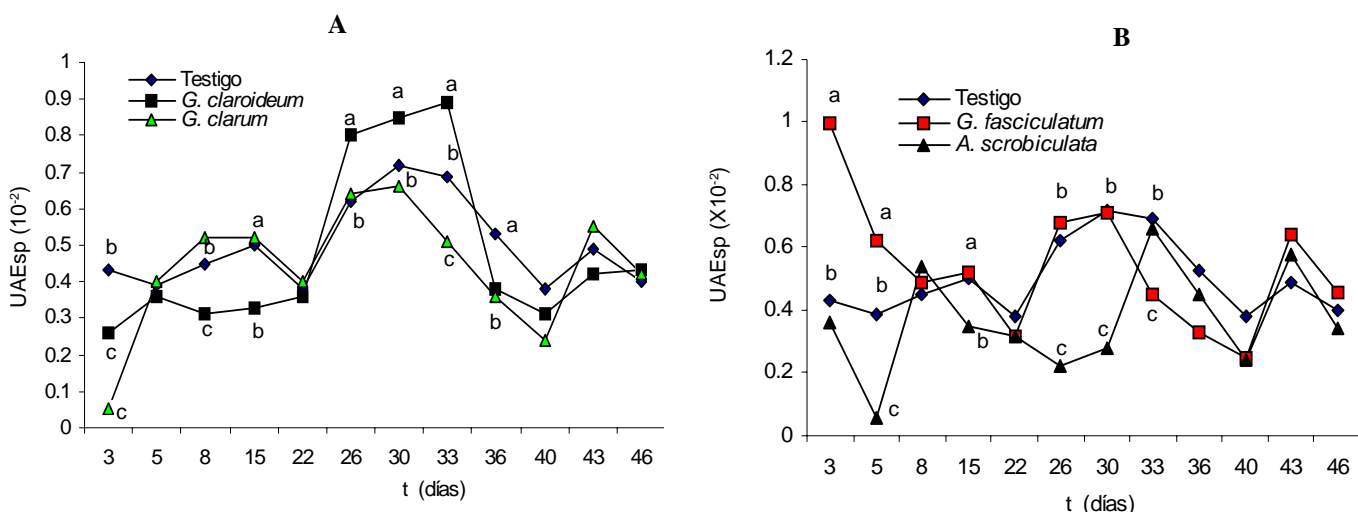


Figura 2. Efecto de la inoculación con HMA sobre la actividad enzimática de β -1,3 glucanasa en tomate, en los diferentes momentos de muestreo

de este papel en defensa, se han propuesto otras funciones para las β -1,3-glucanasas y otras enzimas hidrolíticas, tanto en la morfogénesis y el desarrollo de la planta, como en el intercambio de señales en las interacciones planta-microbio, actuando de forma sinérgica con las quitinasas (20).

Las β -1,3-glucanasas intervienen en la penetración y colonización en general durante las primeras etapas de la infección, desarrollando su acción sinérgica con quitinasas en las etapas siguientes (21). Considerando lo anterior, se hace evidente que la interacción está más favorecida para el caso de *G. fasciculatum*, como se ha manifestado a lo largo de este estudio, ya que en el inicio los niveles de la enzima son altos para esta especie. Se aprecia, además, que después del estallido inicial de actividad para esta especie, la actividad se mantiene en valores cercanos al testigo, lo que indica que las señales de reconocimiento para ambos simbiontes se deben haber establecido.

Algunos autores han encontrado que la pared de la hifa extrarradical contenía una gran cantidad de β -1,3 glucanos, pero que eran menos abundantes en la hifa intercelular e indetectables en los arbusculos (22), lo que soporta la teoría de que la acción lítica de ambas enzimas (quitinasas y β -1,3 glucanasas) permite que el hongo se establezca, ya que es posible que le facilite la extensión intrarradical. Considerando lo anterior, se puede concluir que los altos valores de actividad de ambas enzimas en el inicio del proceso infectivo para la especie *G. fasciculatum*, pudieran ser la razón por la cual se obtienen los mayores valores de DV, lo que indica que esta especie es la más favorecida para la interacción en este estudio. Las demás especies, aunque más lentamente, se establecen y se debe en primera instancia a la elevación de los niveles de la enzima en etapas más tardías del experimento (entre tres y ocho días después de la germinación).

Otros autores (23), al analizar la acumulación de mRNA complementado por estudios de hibridación *in situ* para varios genes de defensa, incluyendo glucanasas y quitinasas, indicaron que la intensidad de la respuesta parecía estar correlacionada con la presencia de arbusculos jóvenes. Esta es la causa que se sugiere para la compatibilidad encontrada por esta especie con el cultivo del tomate y parece ser la razón para los resultados obtenidos en este experimento, ya que como se menciona a lo largo del estudio, resultó ser la especie más compatible en la interacción tomate-HMA estudiada (16).

En los estadios finales del experimento, se observa un aumento de la actividad en todas las interacciones estudiadas, coincide con varios autores acerca de que la actividad tiende a incrementar con la edad de las raíces (20).

Se ha sugerido que la acción de las β -1,3-glucanasas sobre las paredes fúngicas provee un mejor acceso para las quitinasas a sus sustratos y viceversa. Además de un rol directo como agentes antimicrobianos, las quitinasas y β -1,3 glucanasas pueden también estar involucradas en la liberación de elicitores de las paredes celulares fúngicas (3). Consideramos que esa es la razón por la cual ambas actividades resultaron tan similares en este estudio para cada una de las interacciones estudiadas. **Actividad PAL.** La Figura 3 muestra la dinámica de la enzima fenilalanina amonio-liasa en plantas inoculadas con las diferentes especies de HMA.

La actividad de las plantas inoculadas con *G. clarum* y *G. claroideum* muestra una dinámica similar al testigo, con un incremento ligero de actividad a los cinco días para *G. claroideum* (Figura 3A). *G. claroideum* muestra un pico de actividad a los 40 días con valores elevados.

En la Figura 3(B) se describe el comportamiento de la enzima en plantas tratadas con *G. fasciculatum* y *A. scrobiculata*, donde se observa para el caso de *G. fasciculatum* un máximo de actividad a los tres días, que inmediata-

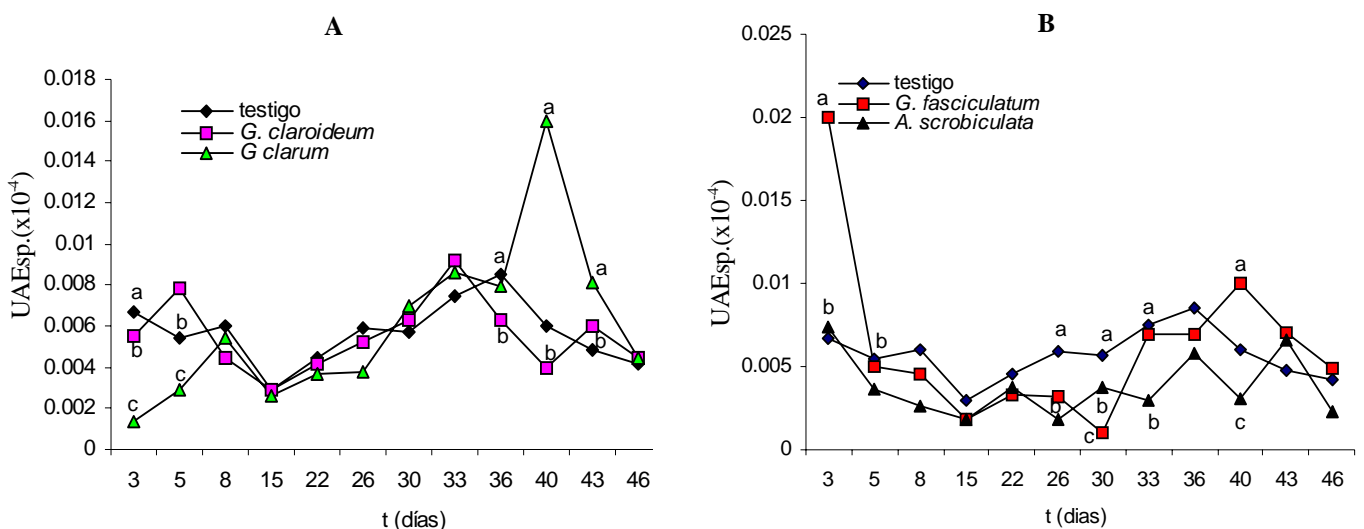


Figura 3. Efecto de la inoculación con HMA sobre la actividad enzimática de fenilalanina amonio-liasa en tomate, en los diferentes momentos de muestreo

mente después disminuye hasta valores similares al testigo; luego se observa un ligero incremento a los 22 días que no supera al testigo y a partir de los 30 días ocurre otro incremento en la actividad, con un máximo a los 40 días y valores superiores al testigo para luego decaer nuevamente. Con *A. scrobiculata* se observó que la actividad se mantuvo en todo momento por debajo del testigo, donde solo a los 43 días hay un ligero incremento en la actividad que superó al testigo, para luego disminuir.

Aunque los hongos micorrizógenos no son considerados como inductores de una respuesta de defensa completa del hospedante, se conoce de la acumulación de fitoalexinas y algunas enzimas como la PAL, las cuales incrementan su concentración y actividad respectivamente, de manera significativa, durante las primeras etapas de la colonización de la alfalfa por *G. intraradix* (24). Estos autores encontraron que en la porción colonizada del sistema radical, la actividad PAL fue un 200 % mayor que en las raíces controles no inoculadas. Así mismo, se ha planteado (25) que la actividad PAL parecía estar asociada con la penetración del hongo en el sistema radical. Esta podría ser la razón de los altos niveles de la enzima al inicio de la colonización encontrados para *G. fasciculatum*, que se estableció primero según valores de DV.

Al parecer existe una estrecha relación entre la actividad de esta enzima y la presencia de estructuras fúngicas en el interior de las células radicales. Algunos autores han informado aumentos en la acumulación de mRNA de PAL en las células que contenían arbusculos, a partir de análisis de hibridación *in situ* en *Medicago sativa*, colonizada por el hongo *G. versiforme* (23). Según Mosse (26), una vez que el arbusculo deja de ser funcional y comienza a ser reabsorbido, la célula que lo contiene no vuelve a ser re infectada, lo cual puede deberse a la deposición de lignina como consecuencia del aumento de la actividad de PAL. Esta debe ser la causa de los incrementos registrados en esta dinámica, debido a que los arbusculos senescen entre tres y siete días después de establecidos (27), por lo cual la enzima se mantiene en niveles fluctuantes en el estudio para cualquiera de las cepas, debido a que durante el período de desarrollo de la planta debe continuar ocurriendo la formación y degradación de arbusculos.

Para todas las especies se aprecia un aumento de la actividad que resultó ser mayor para *G. clarum*, coincidiendo con el inicio de la etapa de floración del experimento, lo que avala lo planteado anteriormente para todas las enzimas, dado por la necesidad de economizar fotosintatos por parte de la planta para ser utilizados en su metabolismo primario.

CONCLUSIONES

* La colonización de plantas de tomate de la variedad Amalia por las especies de HMA estudiadas provocan la inducción de enzimas relacionadas con los mecanismos de defensa de forma diferencial, en cuanto a magnitud y tiempo.

- * Como se observa la inducción temprana de estas enzimas ayuda, en algunos casos (*G. clarum* y *G. fasciculatum*), al avance del hongo en la raíz y por tanto al establecimiento de la simbiosis.
- * Las especies *G. fasciculatum* y *G. clarum* resultaron las que inducen mayores niveles de activación de las enzimas estudiadas en el cultivo del tomate variedad Amalia.
- * La dinámica de inducción de las enzimas que se estudiaron podrían explicar los resultados agronómicos obtenidos en el cultivo del tomate con la especie *G. fasciculatum*, en similares condiciones edáficas.

REFERENCIAS

1. Hutcheson, W. Current concepts of active defense in plants. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 1998, vol. 36, p. 59-90.
2. Kombrink, E. y Somssich, E. Defense responses of plant to pathogens. *Adv in Botanical Research*, 1995, vol. 21, p. 1-34.
3. Penninckx, I. Analysis of the signal transduction pathway leading to pathogen-induced activation of a plant defense gene in *Arabidopsis thaliana*. En: *Dissertationes de Agricultura*, 1998.
4. Fernández, F.; Rodríguez, E. L. y Gómez, R. Caracterización de la efectividad de un nuevo inoculante micorrizógeno en Poaceas. *Cultivos Tropicales*, 1999, vol. 20, no. 2, p. 9-14.
5. Guerrero, E. /et al./ Micorrizas: Recurso biológico del suelo. Bogotá, 1996. 206 p.
6. Blee, K. A. y Anderson, A. J. Defense responses in plants to arbuscular mycorrhizal fungi. En: *Current Advances in Mycorrhizae Research*. Section II: Mycorrhizal fungi and plants defense. 2000, p. 27-44.
7. Fernández, F.; Rivera, R. A.; Vanegas, F. y Noval, B. M. de la. Producto inoculante micorrizógeno. Oficina Nacional de Propiedad Industrial. No. 22641. 2000.
8. Cuba. Minagri. Instituto de Suelos. Nueva versión de clasificación genética de los suelos de Cuba. La Habana: Agrinfor, 1999.
9. 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.
10. Boller, T.; Geheri, A.; Mauch, F. y Vogeli, U. Chitinase in bean leaves: induction by ethylene, purification, properties and possible function. *Planta*, 1983, vol. 157, p. 22-31.
11. Reissig, J. L.; Strominger, J. L. y Leloir, F. L. A modified colorimetric method for the estimation of N-acetyl amino sugars. *J. Biol. Chem.*, 1955, vol. 217, p. 959-966.
12. Somogyi, M. Notes on sugar determinations. *J. Biol. Chem.*, 1952, vol. 195, p. 19-23.
13. Paynet, M. /et al./ Activité phenylalanine ammonia lyase et hypersensibilite an virus de la mosaïque du tabac. *Acad. Sci.*, 1971, vol. 273, p. 537-539.
14. Trouvelot, A.; Kough, J. y Gianinazzi-Pearson, V. Mesure du Taux de Mycorrhization VA d'un Systeme Radiculaire. Recherche de Methodes d'Estimation ayant une Signification Fonctionnelle. En: *Proceedings of the 1st European Symposium on Mycorrhizae: Physiological and Genetical Aspects of Mycorrhizae*, Dijón, 1-5 July, 1985. (1:1985 jul. 1-5: Dijón). Paris:INRA, 1986, p. 217-222.

15. Llonín, D. Nutrición mineral con NPK y biofertilización con hongos MA en el cultivo del tomate en suelo Ferralítico Rojo compactado. [Tesis de Maestría]; UNAH, 1999.
16. Solorzano, E.; Meneses, A.; Rodríguez, Y.; Pérez, E.; Fernández, F.; Peteira, B. y León, O. Inducción de cinco sistemas enzimáticos en la simbiosis tomate-micorriza arbuscular. *Revista de Protección Vegetal*, 2000, vol. 15, no. 1.
17. Albrecht, C.; Geurts, R. y Bisseling, T. Legume nodulation and mycorrhizae formation; two extremes in host specificity meet. *EMBO J.*, 1999, vol. 18, p. 281-288.
18. Salzer, P. y Boller, T. Elicitor induced reactions in mycorrhizae and their suppression. En: *Current Advances in Mycorrhizae Research. Section I: Signaling mechanisms in mycorrhizal symbiosis*. 2000. p. 1-10.
19. Gadkar, V.; David-Schwartz, R.; Kimik, T. y Kapulnik, Y. Update on mycorrhizal symbiosis, arbuscular mycorrhizal fungal colonization. Factors involved in host recognition. *Plant Physiol.*, 2001, vol. 127, p. 1493-1499.
20. 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 *P. parasítica*. Granada : Universidad de Granada, 1999.
21. Ji, C. y Kúc, J. Antifungal activities of cucumber β -1,3-eglucanase and chitinase. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 1996, vol. 49, p. 257-265.
22. Gollotte, A.; Cordier, C.; Lemoine, M. C. y Gianinazzi-Pearson, V. Role of fungal wall components in interactions between endomycorrhizal symbionts. En: *Eukaryotism and Symbiosis*. Berlin:Springer. 1997. p. 412-428.
23. Blee, K. A. y Anderson, A. J. Defense-related transcript accumulation in *Phaseolus vulgaris* L. colonized by the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. Schenk and Smith. *Plant Physiol.*, 1996, vol. 110, p. 675-688.
24. Kapulnik, Y.; Volpin, H. y Palinski, W. Signals in plant vesicular-arbuscular mycorrhizal fungal symbiosis. En: *Plant signals in interactions with other organisms*, 1993, p. 142-150.
25. Volpin, H.; Elkind, Y. y Okong, Y. A vesicular arbuscular mycorrhizal fungus (*Glomus intraradices*) induces a defence response in alfalfa roots. *Plant Physiol.*, 1994, vol. 104, p. 683-689.
26. Noval, B. de la y Pérez, E. Inducción de respuesta de defensa en la interacción planta-microorganismos (micorrizas arbusculares y Rhizobium). Disponible desde Intranet en: <<http://intranet.inca.edu.cu/revista/folletos>> [con acceso el 31-8-2004].
27. Staehelin, C.; Charon, C.; Boller, T.; Crespi, M. y Kondorosi, A. *Medicago truncatula* plants overexpressing the early nodulating gene on 490 exhibit accelerated mycorrhizal colonization and enhancement formation of arbuscules. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2001, vol. 98, no. 26, p. 15366-15371.

Recibido: 19 de julio de 2002

Aceptado: 12 de noviembre de 2003

DIPLOMADOS

Precio: 2000 USD

Desarrollo agroindustrial de pequeñas empresas

Coordinador: Dra.C. Inés Reynaldo Escobar

Duración: 1 año

SOLICITAR INFORMACIÓN

Dr.C. Walfredo Torres de la Noval
Dirección de Educación, Servicios Informativos
y Relaciones Públicas
Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA)
Gaveta Postal 1, San José de las Lajas,
La Habana, Cuba. CP 32700
Telef: (53) (64) 6-3773
Fax: (53) (64) 6-3867
E.mail: posgrado@inca.edu.cu