

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

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

ABSTRACT. An experiment was conducted in order to study enzymes related to defense and stress mechanisms under controlled conditions, following dynamics of induction of PO and PPO in tomato plants var. Amalia using four species of mycorrhizal-arbuscular fungus (*Glomus clarum*, *Glomus fasciculatum*, *Glomus claroideum* and *Acaulospora scrobiculata*), and the expression of these enzymes was determined. These enzymes are induced in a differential way in time as much as in magnitude. Mycorrhizal specific isoforms for some of these species were observed.

RESUMEN. Con el objetivo de estudiar la inducción de enzimas relacionadas con los mecanismos de defensa y estrés se llevó a cabo el siguiente experimento en condiciones semicontroladas, en el cual se realizó la dinámica de inducción de PO y PPO en plantas de tomate var. Amalia con cuatro especies de hongos micorrízicos (*Glomus clarum*, *Glomus fasciculatum*, *Glomus claroideum* y *Acaulospora scrobiculata*), así como se determinó la expresión de estas enzimas en raíces de tomate. Se observó que estas enzimas se inducen de forma diferencial tanto en el tiempo como en magnitud para cada una de las especies de hongos utilizadas. Se observó además que algunas de estas especies indujeron isoformas específicas de la micorrización.

Key words: *Glomus clarum*, *Glomus fasciculatum*, *Glomus claroideum*, *Acaulospora scrobiculata*, PO, PPO, *Lycopersicon esculentum*, isozymes

Palabras clave: *Glomus clarum*, *Glomus fasciculatum*, *Glomus claroideum*, *Acaulospora scrobiculata*, PO, PPO, *Lycopersicon esculentum*, isoenzimas

INTRODUCCIÓN

Las plantas han desarrollado un amplio rango de estrategias para controlar los microorganismos invasores, conocidas comúnmente como respuestas de defensa o estrés. Estos mecanismos de defensa de las plantas pueden ser divididos en dos categorías: mecanismos constitutivos y mecanismos inducidos por la infección.

Entre los mecanismos inducidos por la infección se encuentran aquellos que están involucrados con el estado oxidativo y que tienen como objetivos detener la infección y la síntesis de compuestos que están involucrados con el bloqueo de esta y la restricción del microorganismo invasor al área de penetración.

Entre estas se encuentran las peroxidasas, que han sido ampliamente estudiadas en tejidos infectados. Ge-

neralmente, después de daños o infección, se detectan incrementos en sus actividades y aparecen nuevas isoenzimas (1, 2). El papel que estas juegan no está claro; se cree que están involucradas en la síntesis de lignina, oxidación de ácido indolacético, biosíntesis de etileno, biosíntesis de flavonoides y asociadas con la hidroxilación de prolina incorporada en las proteínas de la pared celular, actividades que han sido consideradas por tener una significación en la resistencia frente a las enfermedades. Las isoenzimas de peroxidasas pueden tener diferentes funciones, las cuales pueden estar relacionadas con su distribución diferencial dentro de los tejidos (3).

La producción de superóxido durante la respuesta hipersensible genera abundante peróxido de hidrógeno, que a su vez permite aumentar la actividad de las peroxidasas, ya que estas oxidan compuestos fenólicos en presencia de peróxido de hidrógeno. Los compuestos fenólicos oxidados están formados por quinonas muy reactivas, que son capaces de condensarse con grupos aminos, sulfidrilos, cadenas de aminoácidos y proteínas, pudiendo inhibir el crecimiento de los hongos o la actividad de las enzimas hidrolíticas segregadas por los patógenos (4).

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

En el presente trabajo se realizó un estudio de la inducción y expresión de peroxidadas y polifenoloxidasas en la interacción de cuatro especies de HMA con tomate de la var. Amalia.

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 recubrieron 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 (5) más cachaza en la proporción (3:1), esterilizadas y mantenidas en condiciones de casa de cristal (condiciones semicontroladas) a temperatura de 23 +/- 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 de 250 esp/g para todas las cepas estudiadas. Se realizó una dinámica de dos 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 peroxidadas y polifenoloxidasas.

Extracción de enzimas. Se tomaron muestras aleatorias formando un *pool* de plantas, las que se procesaron 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 se almacenó a -20°C hasta su uso. La concentración de proteínas se determinó por el método de Bradford (6), 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: concentración de sustrato y de preparado enzimático ópti-

mo, y condiciones de temperatura, pH y períodos de incubación adecuados (7).

Actividad peroxidasa. La determinación de la actividad peroxidasa se realizó según método continuo descrito por Fric (8). Se utilizaron como sustratos el guayacol y el peróxido de hidrógeno.

Se determinó la velocidad de la reacción de oxidación del guayacol por la enzima, en presencia de peróxido de hidrógeno, en un espectrofotómetro (*Ultrospec Plus Spectrophotometer, Pharmacia LKB*), registrándose los valores de absorbancia a 470 nm (zona del espectro donde absorbe el guayacol oxidado de coloración carmelita). Se tomó la variación de densidad óptica en el tiempo ($\Delta DO / \Delta t$), durante dos minutos a intervalos de cinco segundos.

El cálculo de la actividad enzimática para este método continuo se realizó, según la expresión:

$$\text{Actividad enzimática} = \frac{\Delta DO}{\Delta t} \cdot \frac{1}{k} \cdot \frac{\text{Vens}}{\text{Venz}} \cdot \text{dil}$$

donde k es el coeficiente de extinción molar del guayacol como 5 570.10⁻⁶ mmol.mL⁻¹. La actividad se expresó como μmoles de producto formado.min⁻¹.mL enz⁻¹.

Actividad polifenol-oxidasas. Se determinó a través del método continuo, empleándose como sustrato de la enzima el pirogalol.

La velocidad de la reacción de oxidación del pirogalol por la enzima se determinó de igual forma, pero a 420 nm donde absorbe el pirogalol oxidado de coloración amarilla. La variación de densidad óptica en el tiempo ($\Delta DO / \Delta t$) se determinó durante dos minutos a intervalos de cinco segundos. La actividad se calculó de la misma forma que para la enzima anterior y se expresó como $\Delta DO / \Delta t \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$ enz, o sea, unidades arbitrarias al no contar con el coeficiente de extinción molar del pirogalol.

Análisis isoenzimático. Los análisis electroforéticos se efectuaron en geles de poliácridamida (PAGE) calidad reactivo Fluka, en condiciones nativas, utilizando 10 μg de muestra en cada caso según el método descrito por Maribona (10) con la modificación: gel concentrador (4 %) y gel separador (8.5 %).

La corrida se realizó en una cámara vertical BIORAD miniprotean, con una intensidad de 25 mA y 4°C por 90-120 min. Para ello se empleó un buffer Tris-glicina 0.019 M y pH 8.3.

La actividad peroxidasa se reveló en el gel, tiñendo el mismo por 10 min. con una solución de benzidina hidroclicórica y peróxido de hidrógeno al 30 % (1/1, v/v) (11).

La actividad polifenoloxidasas se reveló tiñendo el gel por 30 min. con una solución de L-prolina y dihidroxifenilalanina (12).

Ambas reacciones fueron detenidas con ácido acético al 10 %.

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

Act. Específica Act. Enzimática/conc. de proteína (μg.mL⁻¹).

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 *G. claroideum*).

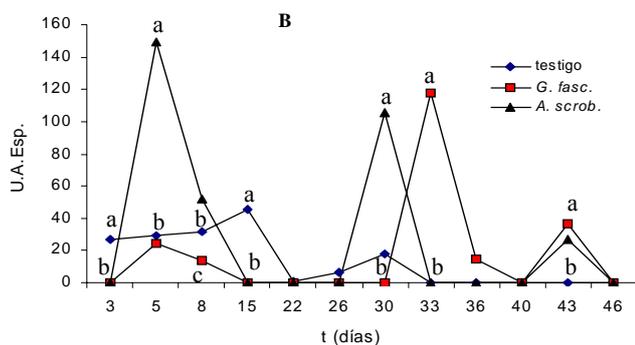
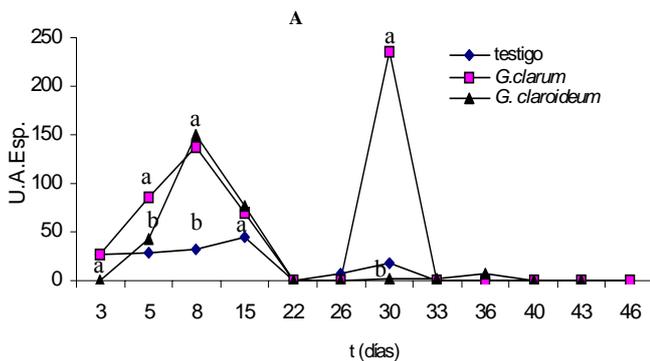
★ **Tiempo** (3, 5, 8, 15, 22, 26, 30, 33, 36, 40, 43 y 46 días).

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

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Actividad peroxidasa (PO). En la Figura 1 se observa que el testigo a los tres días está en un nivel bajo, que se mantiene hasta el día 15, donde se alcanza el máximo para esta primera etapa, el día 22 cae hasta cero y vuelve a alcanzar un máximo el día 30.

G. clarum y *G. claroideum* tienen comportamientos similares hasta el día 26, según se observa en la Figura 1(A), alcanzando un máximo a los ocho días, que decae hasta cero el día 22, se mantiene en cero hasta el día 26 y en el caso de *G. clarum* alcanza otro máximo a los 30 días, cayendo a los 33 días hasta el mínimo y se mantiene hasta el final del experimento.



Letras comunes en cada grupo no difieren significativamente según la Prueba de Duncan ($p \leq 0.05$)

Figura 1. Dinámica de inducción de actividad peroxidasa de las plantas de tomate, var. "Amalia", inoculadas con cuatro especies de hongos micorrízicos arbusculares

En la Figura 1(B) se aprecia que para el caso de *A. scrobiculata*, el máximo de actividad se alcanza a los cinco días, disminuyendo hasta no detectarse actividad a los 15 días, manteniéndose en estos niveles hasta el día 30, donde alcanza otro máximo de actividad, disminuyendo a los 33 días y se mantiene sin actividad detectable hasta el día 43. Para *G. fasciculatum* se observa un pico de actividad el quinto día, con valores de actividad por debajo del testigo, cae a cero el día 15, manteniendo estos niveles hasta el día 33 donde alcanza un máximo, cayendo a los 40 días hasta no detectarse actividad y se mantiene en estos valores hasta el día 43.

Las peroxidasas son una subclase de óxido-reductasa (E.C.1.11.1.7) que usan el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) como agente oxidante (IUB, 1992). Son enzimas encontradas en la mayoría de las plantas verdes, hongos y bacterias aeróbicas (7).

Las peroxidasas, presentes en plantas superiores bajo diversas formas moleculares, parecen estar implicadas en distintos procesos fisiológicos, como son la lignificación y suberización de la pared celular, deposición de polifenoles, formación de estructuras papilares, reforzamiento de la pared por entrecruzamiento de proteínas, oxidación de compuestos fenólicos y la producción de radicales tóxicos (13). Estas enzimas muchas veces aumentan en respuesta al estrés, ya sea biótico o abiótico y procesos oxidativos. Además, participan en la homeostasis del ácido indol acético, inhibidor de la síntesis de lignina, a través de su catabolismo (14).

Los hongos micorrizógenos arbusculares no penetran las paredes reforzadas con estos compuestos, lo que indica su imposibilidad de degradarlos (15).

Teniendo en cuenta los planteamientos anteriores, los bajos niveles de la enzima al comienzo de la infección, para el caso de *G. fasciculatum*, garantizan el avance de los procesos de colonización, ya que como puede observarse los valores de actividad para esta especie se mantienen por debajo del testigo, lo cual permite que el proceso de colonización avance y se establezca la simbiosis.

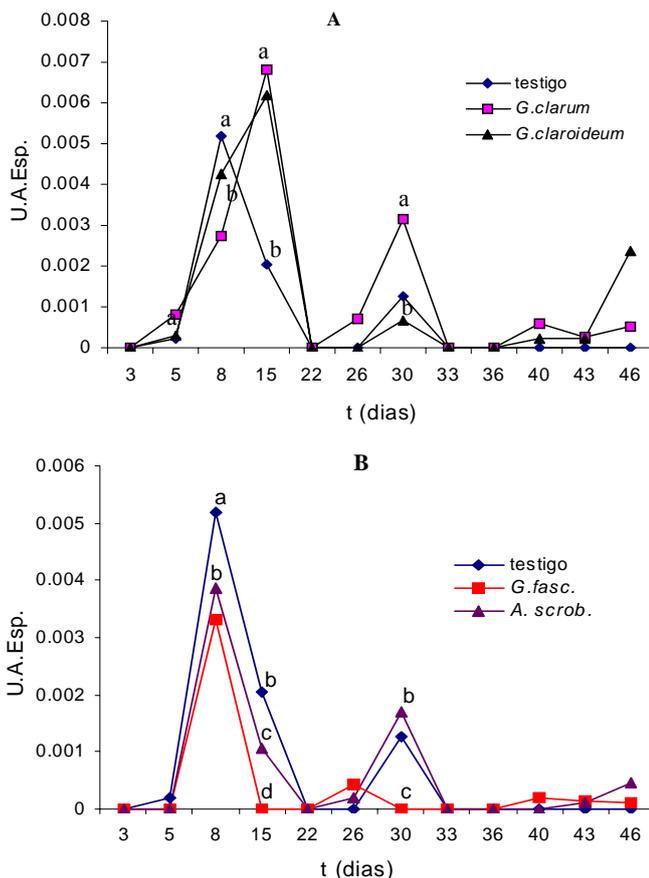
Sin embargo, la simbiosis no solo se establece para esta especie sino que en todos los casos se obtienen valores de colonización determinados por los niveles de densidad visual, lo que está determinado por la comunicación genómica que debe existir entre las partes, teniendo en cuenta que la interacción es altamente compatible (16, 17) y que se aprecia en la disminución de los valores de actividad de la enzima, que en la mayoría de los casos llega a valores menores que el testigo.

Resultados similares han obtenido otros autores (18), estudiando la interacción entre dos especies de hongos y plantas de tomate de la variedad INCA-17, quienes concluyen que la interacción está más favorecida para el caso de esta especie.

En todos los casos se observa un incremento de la actividad entre los días 30 y 36, relacionado con el inicio de los procesos de floración, metabolismo primario que demanda la mayor cantidad de energía y metabolitos de reserva por parte del vegetal, por lo cual deberá restringir

la demanda de fotosintatos del simbionte. Este aumento en la actividad observada puede estar relacionada con este hecho, dado que para la planta representa un costo adicional de fotosintatos que debe desviar a su metabolismo primario. Sin embargo, algunos autores relacionan este aumento con el de la toma de fósforo y otros nutrientes por parte de la planta (13), que en principio podría ser lo que está sucediendo en este caso.

Actividad polifenoloxidasas (PPO). La Figura 2(A y B) describe la dinámica de la enzima polifenoloxidasas (PPO) para las cepas en estudio.



Letras comunes en cada grupo no difieren significativamente según la Prueba de Duncan ($p \leq 0.05$)

Figura 2. Dinámica de inducción de actividad polifenoloxidasas de las plantas de tomate, var. "Amalia", inoculadas con cuatro especies de hongos micorrízicos arbusculares

La Figura 2(A) muestra el comportamiento de PPO para las especies *G. clarum* y *G. claroideum*, en la que se observa que el comportamiento para ambas especies es similar, alcanzando un máximo de actividad a los 15 días y llegando a sobrepasar al testigo; luego disminuye hasta no detectar actividad a los 22 días. A los 30 días se detecta un nuevo incremento, que resulta mayor que el testigo para *G. clarum* y que no sobrepasa el testigo en el caso de *G. claroideum*. Entre 30 y 33 días no se detecta actividad para ninguna de las dos especies y se observa

a los 40 días un ligero aumento de la actividad así como a los 46 días se observa una tendencia al aumento.

La Figura 2(B) muestra un aumento de la actividad PPO para *G. fasciculatum* y *A. scrobiculata* a los ocho días, que en ambos casos no sobrepasan el testigo. Para *G. fasciculatum* se observa una disminución a los 15 días, que se logra a los 22 días para *A. scrobiculata*. Para *G. fasciculatum* se observa un aumento ligero de actividad a los 26 días. A los 30 días se observa un aumento de actividad que sobrepasa al testigo para la especie *A. scrobiculata*, mientras que en el caso de *G. fasciculatum* la actividad no se detecta. Para *G. fasciculatum* hay un ligero incremento en el día 40 y a partir de este una tendencia a la disminución de la actividad.

No se conoce con exactitud la localización de las PPO en el tejido vegetal, aunque se han detectado en cloroplastos, mitocondrias y microcuerpos. Los productos de reacción de estas enzimas son altamente reactivos y tóxicos a patógenos, ya que pueden inhibir el crecimiento de los hongos o la actividad de las enzimas hidrolíticas (19). Participa, además, depositando compuestos fenólicos como la lignina (20).

Como se menciona para PO, los HMA son incapaces de degradar las paredes reforzadas por lignina, lo cual indica que para el establecimiento exitoso de la colonización, los niveles de la enzima deben ser bajos en los primeros estadios; en este experimento se observa que en el caso de las especies *G. fasciculatum* y *A. scrobiculata* se da esta premisa. Sin embargo, se encontraron niveles de PO elevados para esta última especie. Esto sugiere que la especie más favorecida es *G. fasciculatum*.

Para las otras especies la colonización se establece, dado como se discutió para PO por el intercambio de señales que debió ocurrir entre los simbiontes para permitir el reconocimiento planta-HMA, conociendo que la interacción es altamente compatible.

Resultados similares se obtuvieron para la especie *G. fasciculatum* (17) en el estudio que se menciona anteriormente.

A los 30 días se observa un aumento para todas las especies excepto *G. fasciculatum*. Si se considera que esta es la especie más compatible para el cultivo del tomate, es de esperar que los niveles de actividad se mantengan bajos durante esta etapa de crecimiento, ya que el aumento de esta enzima podría producir una disminución en los niveles de colonización, dada la producción de metabolitos tóxicos que podrían afectar el crecimiento del hongo.

A los 40 días se observa un ligero incremento de la actividad, que puede estar relacionada con los procesos de floración y maduración de las plantas (21). Aunque se ha descrito poco el papel de esta enzima en la interacción planta-hongo, incluyendo HMA, el interés se centra en su participación en procesos metabólicos vegetales. No obstante, por sus características y funciones, algunos autores la relacionan con la resistencia inducida frente a patógenos (7).

Si se considera que entre los primeros efectos detectables de la interacción con patógenos está la inducción del estallido oxidativo, el cual produce entrecruzamiento de las proteínas de la pared celular y la subsecuente fortificación de esta (22), entonces será beneficioso para el hongo que los niveles de ambas enzimas sean bajos al comienzo de la colonización, con el fin de garantizar que esta sea exitosa (17).

Análisis de la expresión de isoenzimas. A partir de los resultados de actividad enzimática descritos anteriormente, se realizó el estudio isoenzimático para PO y PPO los días 5, 8, 15, 30, 33 y 43 donde se observó actividad.

Las Figuras 3 y 4 muestran las isoenzimas peroxidasas y polifenoloxidasas respectivamente, presentes en las raíces de los cinco tratamientos evaluados. En ambos casos, se observan variantes isoenzimáticas de diferente movilidad electroforética con diferencias en cuanto a su aparición en el tiempo y su intensidad.

El estudio isoenzimático de peroxidasas a los cinco y ocho días (Figura 3A) muestra siete bandas, cinco de mayor intensidad (1, 2, 3, 4 y 7) y dos menos intensas (5 y 6). La intensidad de las bandas a los ocho días resultó mayor que a los cinco días, coincidiendo con las actividades encontradas.

El día 15 se aprecian, para el testigo y *G. clarum*, igual número de bandas (7) y una banda diferencial para *G. clarum*, *A. scrobiculata* se diferencia en una sola banda de las antes mencionadas. Por su parte, *G. fasciculatum* presentó una sola banda (Figura 3B).

El día 30, *G. fasciculatum* se diferencia de *A. scrobiculata* en tres bandas, pero las bandas de esta última especie se igualan con el testigo no micorrizado, excepto por una banda (d), que aparece al final del gel; en *G. fasciculatum* aparecen cuatro bandas que se aprecian en el testigo (1, 2, 4 y 5) y una banda diferencial (Figura 3B).

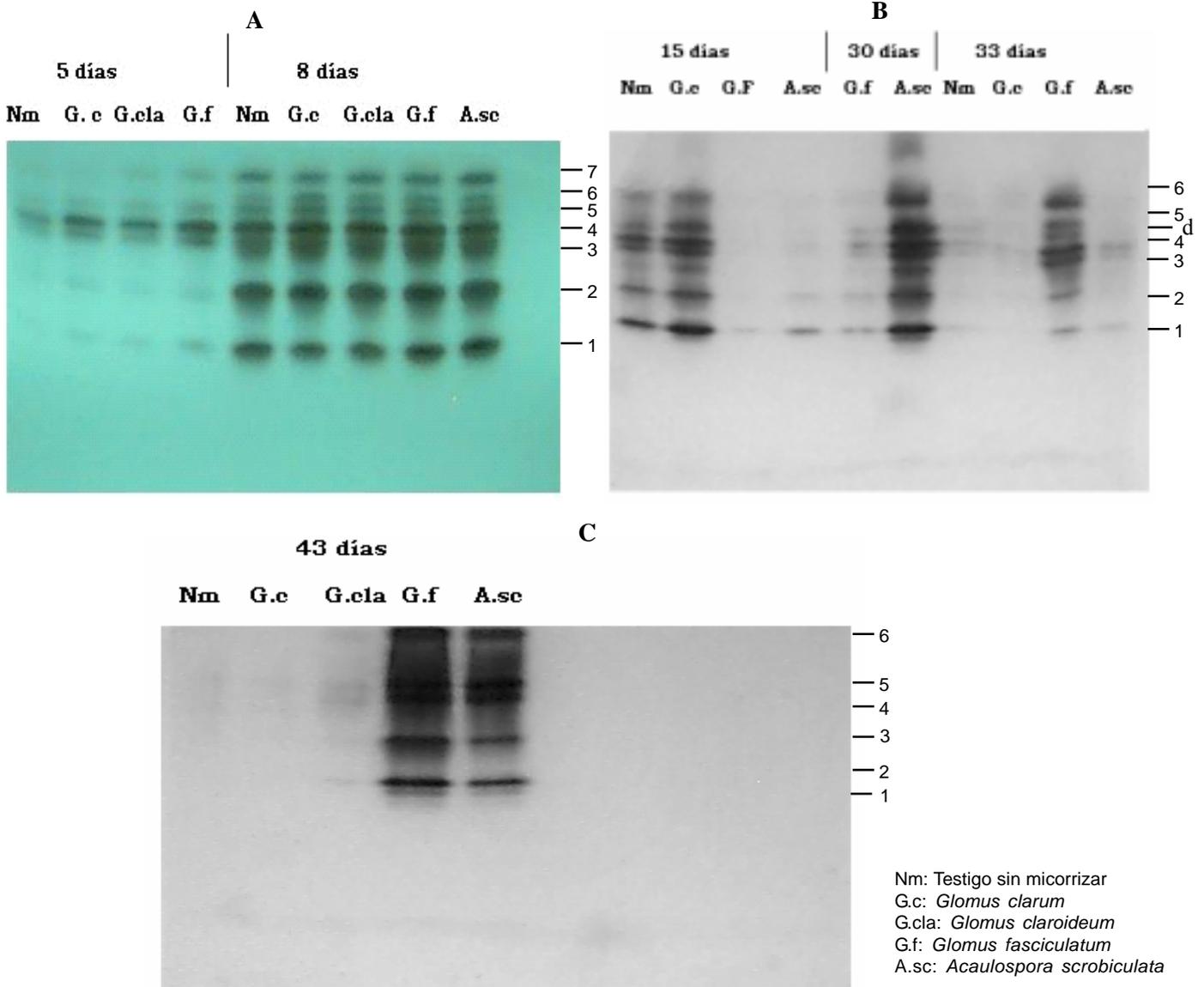


Figura 3. Isoenzimas peroxidasas expresadas en raíces de tomate control e inoculadas con cuatro especies de hongos micorrízicos arbusculares

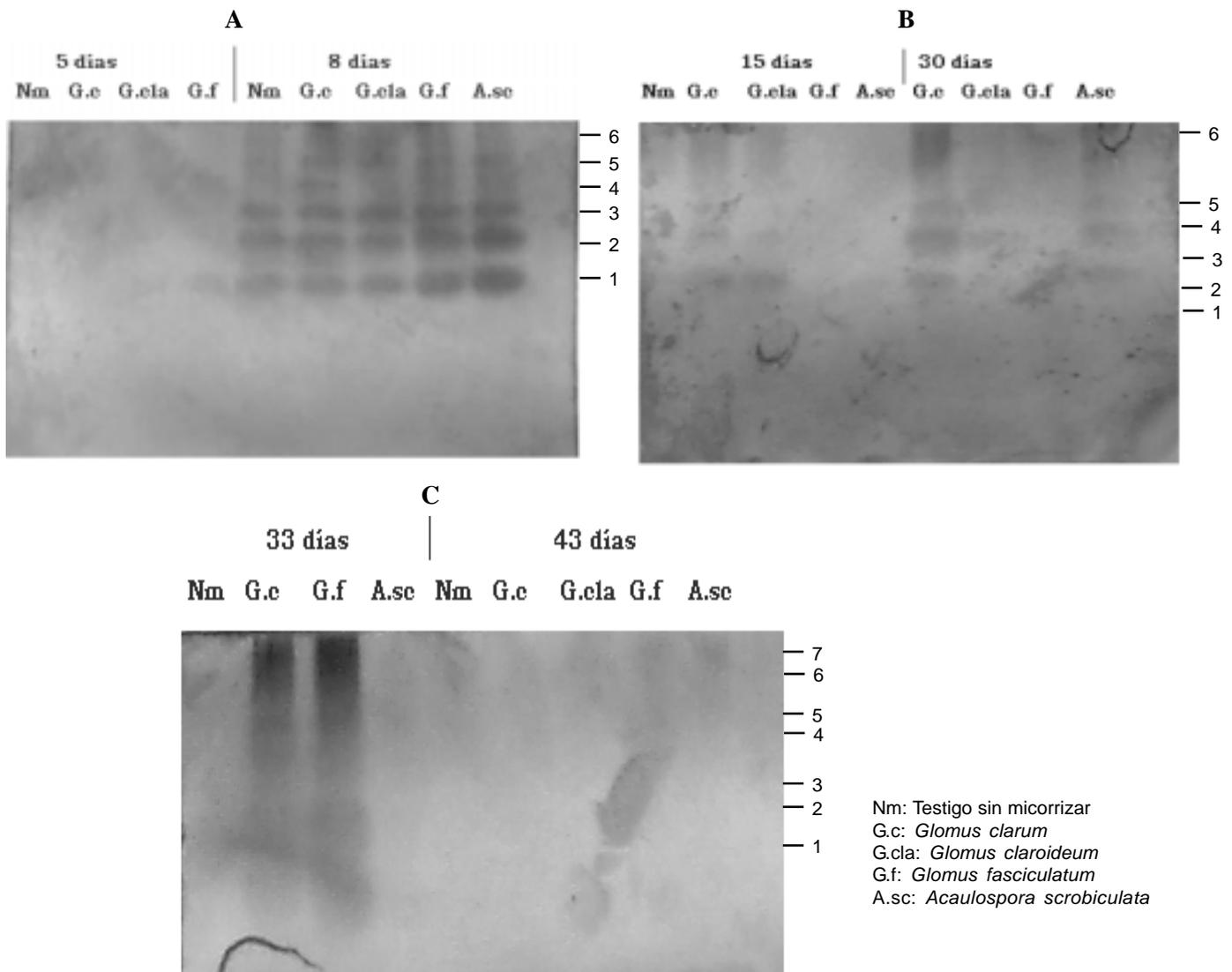


Figura 4. Isoenzimas polifenoloxidasas expresadas en raíces de tomate control e inoculadas con cuatro especies de hongos micorrízicos arbusculares

El día 33, para *G. fasciculatum* se inducen las mismas bandas que en el testigo a los 15 días y se induce, además, una banda diferencial que solo aparece este día para esta especie (Figura 3B).

El día 43 se aprecian diferencias en la inducción de isoenzimas para las cuatro especies, pero no aparecen bandas diferenciales en ninguno de los tratamientos (Figura 3C).

El estudio isoenzimático de polifenoloxidasas (Figura 4A) muestra seis bandas claras en todos los tratamientos a los ocho días, mientras que el día 5 no se aprecian bandas, coincidiendo con los resultados obtenidos en actividad.

A los 15 días no se aprecia inducción de isoenzimas para el caso de *G. fasciculatum* y *A. scrobiculata*, mientras que *G. clarum* y *G. claroideum* muestran seis bandas, cada una con menos intensidad que el día 30 (Figura 4B).

El día 30, *G. clarum* y *A. scrobiculata* inducen igual número de isoenzimas (6), mientras que *G. claroideum* solo induce cuatro bandas, todas de baja intensidad y *G. fasciculatum* no presenta inducción (Figura 4B).

A los 33 días, *G. fasciculatum* y *G. clarum* inducen siete bandas, mientras que no se aprecia en las otras especies. En el día 43 no se aprecia inducción para ninguno de los tratamientos en estudio (Figura 4C).

La actividad de estas isoenzimas parece aumentar con la edad de la planta, lo cual se ve más acentuado en las plantas no micorrizadas.

Además del papel de la defensa de peroxidasa y polifenoloxidasa (7), estas están muy relacionadas al desarrollo de otros estadios fisiológicos de la planta (23), como la respiración, las diferentes reacciones oxidativas, la peroxidación lipídica y el estrés abiótico.

Los patrones electroforéticos obtenidos (Figuras 3 y 4) están en correspondencia con la dinámica de inducción de peroxidadas y polifenoloxidasas (Figuras 1 y 2), coincidiendo la intensidad de las bandas con los valores de actividad observados en cada tratamiento.

La inducción de peroxidadas y polifenoloxidasas se considera, por lo general, parte de una respuesta de defensa no específica iniciada después del ataque del patógeno, pero también una consecuencia de varias alteraciones físico-químicas y medioambientales (7). Algunos autores (24) observaron aumentos en las peroxidadas y fitoalexinas en plantas infectadas por HFMA, confirmando la resistencia contra patógenos.

Cuando la colonización por hongos MA tiene éxito, se presentan estrategias fúngicas de autacamuflaje, como pueden ser algunas modificaciones de la pared, importantes durante el proceso de colonización y la represión de los mecanismos de defensa inducidos por la planta (25); además, existen autores que aseguran que la planta hospedera influye de alguna manera en la organización, morfología y composición de la pared de hongos MA, cuando estos se desarrollan dentro de los tejidos radicales (16). A pesar de que en este estudio la inducción se mantuvo casi hasta el final del experimento en algunas de las especies, las plantas resultaron colonizadas como se aprecia en la Tabla I y esto puede ser debido a la comunicación genómica que existe entre los simbioses, por lo cual en la dinámica se aprecia que tanto los niveles de actividad como la inducción de isoformas de estas dos enzimas son diferentes en cada caso y que se induce para algunas de las especies isoformas específicas de la simbiosis. En estudio realizado con dos especies de HMA en la interacción con tomate de la variedad INCA-17, se detectó una isoforma nueva de peroxidasa y la relacionaron con la compatibilidad de las especies con el cultivo (17).

Puesto que las peroxidadas y polifenoloxidasas pueden desempeñar distintas funciones en los complejos procesos que suceden a la entrada de un microorganismo en la planta, tanto a nivel de reconocimiento como de posible reacción defensiva, no es fácil especular sobre la función de las distintas isoformas con los datos disponibles. Los cambios detectados sí revelan la sensibilidad de los sistemas isoenzimáticos de peroxidadas y polifenoloxidasas en la planta y el hecho de que estas actividades se afectan localmente por la colonización de un hongo micorrízico, y que el efecto es distinto según el HMA implicado. Resultados similares han sido presentados anteriormente (13).

En general, hay evidencias que indican que por acción del elicitor en etapas tempranas de la micorrización, la respuesta de defensa es generalmente menos vigorosa que en interacciones planta patógeno (26, 27) y a menudo completamente suprimida, en particular en etapas tardías de la interacción. Se especula que esto es debido al propio HMA, el cual impide el reconocimiento del elicitor (28).

Los HFMA pueden inducir la expresión de genes estructurales, genes simbióticos y genes defensivos. En la actualidad es difícil distinguir el rol que desempeñan los genes estructurales y defensivos, ya identificados, en el establecimiento de las MA funcionales.

En cualquier caso, se aprecia que la inducción de los sistemas en estudio resultó, de forma general, más alta en los inicios de la colonización que en etapas avanzadas, lo que indica una supresión o comunicación eficiente entre los genomas de la planta y la especie de HMA en cada caso. Algunos investigadores (16) plantean que una vez establecido el hongo MA y por tanto la colonización, los cambios fisiológicos que ocurren así como las modificaciones estructurales son un indicativo de la comunicación genómica que existe entre los simbioses, lo que permite la compatibilidad celular y funcional

CONCLUSIONES

- La colonización de plantas de tomate de la variedad Amalia por las especies de HMA estudiados provocan la inducción de enzimas relacionadas con los mecanismos de defensa de forma diferencial, en cuanto a magnitud y tiempo.
- La inducción de enzimas relacionadas con la defensa en plantas de tomate de la variedad Amalia por la especie *G. fasciculatum* resultó ser muy similar, en los primeros días de la dinámica, a los patrones de inducción encontrados para esta especie en la variedad INCA-17.
- Las especies *G. fasciculatum* y *A. scrobiculata* resultaron las que inducen mayores niveles de activación de las enzimas estudiadas en el cultivo del tomate variedad Amalia.
- Se pudo apreciar la inducción de isoformas específicas para la colonización micorrízica en los análisis isoenzimáticos de peroxidadas, no así para polifenoloxidasas.

REFERENCIAS

1. Craigh, Jt. S.; Kerby, K. B.; Stein, B. D. y Somerville, S. C. Expression of extracellular peroxidase that is induced in barley (*Hordeum vulgare*) by the powdery mildew pathogen (*Erysiphegraminis f. sp. hordei*). *Physiol. Mol. Plant. Pathol.*, 1995, vol. 7, no. 6, p. 407-418.
2. Ezakia, B.; Tsugita, S. y Matsumoto, H. Expression of a moderately anionic peroxidase is induced by aluminium treatment in tobacco cells. Possible involvement of peroxidase isozyme in aluminium ion stress. *Physiologia Plantarum*, 1996, vol. 96, no. 1, p. 21-28.
3. Okusa, K.; Miyakoshi, T. y Chen, C. L. Comparative studies on dehydrogenative polymerization of coniferyl alcohol by laccase and peroxidases. Preliminary results. *Holzforshng*, 1996, vol. 50, no. 1, p. 15-30.
4. Kuc, J. Compounds from plants that regulate or participate in disease resistance. En: *Bioactive compounds from plants. Ciba Foundation Symposium*, 1990, vol. 154, p. 213-218.

5. Cuba. Minagri. Instituto de suelos. Nueva versión de clasificación genética de los suelos de Cuba. La Habana: Agrinfor, 1999. 64 p.
6. 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.
7. Solórzano, E. Inducción y caracterización parcial de proteínas asociadas con la patogénesis en la interacción tomate-*Alternaria solani*. [Tesis de Maestría], INISAV, 1997.
8. Fric, F. Oxidative enzymes. En: *Physiological Plant Pathology. Encyclopedia of Plant Pathology*, 1976, vol. 4, p. 617-627.
9. Alexander, A. G. Sucrose enzyme relationship in immature sugar cane. *J. Agric of Univ. of P. Rico*, 1964, vol. 4813, p. 165-231.
10. Maribona, R. H.; Korneva, S.; Ruiz, A. y González, S. Obtention of sugar cane plants by tissue culture from different plant organs. En: *Proceeding XVIII Cong. ISSCT*, 2, 1983. p. 610-621.
11. Barreto, A. y Simón, P. J. Utilización de las isoenzimas como marcadores genéticos en *Saccharum*. *Cultivos Tropicales*, 1979, vol. 1, no. 1, p. 111-129.
12. 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.
13. 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.
14. Bernal, M. A.; Díaz, J.; Barceló, A. Ros y Merino de Cáceres, F. Peroxidase isoenzyme gradients in *Capsicum annuum* leaves and their expression in vegetative and flowering plant. *Agronomie*, 1994, vol. 2, p. 205-210.
15. 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/folleto>> [con acceso el 31-8-2004].
16. Bonfante-Fassolo, P. y Perotto, S. Strategies of arbuscular mycorrhizal fungi when infecting host plants. *New Phytol.*, 1995, vol. 130, p. 3-21.
17. Solórzano, E.; Meneses, A.; Rodríguez, Y.; Pérez, E.; Fernández, A.; 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.
18. Rodríguez Y.; Pérez, E.; Solórzano, E.; Meneses, A. y Fernández, F. Peroxidase y polyphenoloxidase in tomato roots inoculated with *Glomus clarum* and *Glomus fasciculatum*. *Cultivos Tropicales*, 2001, vol. 22, no. 1, p. 11-16.
19. Goupi, P.; Macheix, J. J.; Nicolas, J. y Varoquaux, P. Partial purification and characterization of endive (*Cichorium endivia* L.) polyphenoloxidase. *Sciences Des Aliments*, 1994, vol. 14, p. 751-762.
20. Kofalvi, S. A.; Gao, J. G. y Nassulh, A. Biochemical investigation into the wall collapse of wheat leaf cells caused by wheat streak mosaic virus infection. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 1995, vol. 47, p. 379-389.
21. Chu, H. L.; Yeh, D. B. y Shaw, J. F. The biochemical properties of polyphenol oxidase from banana leaf. *Bot. Bull. Acad. Sin.*, 1993, vol. 34, p. 169-174.
22. Penninckx, I. Analysis of the signal transduction pathway leading to pathogen-induced activation of a plant defending gene in *Arabidopsis thaliana*. En: *Dissertationes de Agricultura*, 1998.
23. Estrella-Vera, R.; Higgins, V. J. y Blumwald, E. Specific oxidases and peroxidases are involved in the reaction of tomato to race specific elicitors of *Cladosporium fulvum*. *Abstract of VI Congress of Plant Pathology*, 1993, vol. 12, no. 3, p. 22-228.
24. Morandi, D. Occurrence of phytoalexins and phenolic compounds in endomycorrhizal interactions, and their potential role in biological control. *Plant Soil*, 1996, vol. 185, p. 241-251.
25. 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.
26. Mohr, U.; Lange, J.; Boller, T.; Wiemken, A. y Vögeli-Lange, R. Plant defence genes are induced in the pathogenic interaction between bean roots and *Fusarium solani*, but not in the symbiotic interaction with the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *New Phytol.*, 1998, vol. 138, p. 589-598.
27. Solórzano, E.; Fernández, A.; Peteira, B. y León, O. Inducción de isoenzimas de polifenoloxidasas y quitinasas en plantas de tomate infectadas con *Alternaria solani*. *Protección Vegetal*, 1999, vol. 14, no. 1, p. 7-12.
28. Lambais, M. R. y Mehdy, M. C. Suppression of endochitinase, β -1,3-endoglucanase, and chalcone isomerase expression in bean vesicular-arbuscular mycorrhizal roots under different soil phosphate conditions. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 1993, vol. 6, p. 75-83.

Recibido: 19 de julio de 2002

Aceptado: 24 de noviembre de 2003