



INDUCCIÓN DE MECANISMOS DE DEFENSA EN PLANTAS DE TOMATE (*Solanum lycopersicon* L.) MICORRIZADAS FRENTE AL ATAQUE DE *Oidiopsis taurica* (Lev.) Salm

Induction of defense mechanisms in mycorrhized tomato plants against the attack of *Oidiopsis taurica* (Lev.) Salm

Eduardo Pérez Ortega^{1✉}, Blanca M. de la Noval¹; Benedicto Martínez Coca²; Walfredo Torres de la Noval¹, Aida Medina Carmona¹, Annia Hernández³ y Ondina León²

ABSTRACT. In order to evaluate mycorrhized tomato plants against the attack of *Oidiopsis taurica* pathogen an experiment was conducted. Plants previously treated with arbuscular mycorrhizal fungus (AMF) *Glomus cubense* (40 spores g⁻¹) and *G. mosseae* (60 spores g⁻¹) were challenged with *O. taurica* (2 x 10⁴ spores mL⁻¹), at 21 days of germination. Several enzymatic activities related to the induction of defense (PRX, PPO, β-1,3 glucanase, chitinase and phenylalanine ammonia lyase) were determined and mycorrhizal variables (visual density or fungal occupation (DV) and colonization rate) and percentage of damage caused by the pathogen were measured. Mycorrhizal species induced systemic responses in plants where higher levels of protection were observed in plants treated with *G. cubense*. These levels were not sufficient to prevent colonization of the pathogen and thus the damage caused by this, however, there was a differential response between both AMF studied. The low response induced by *G. mosseae* against the attack of the plant pathogenic fungus was remarkable, which leads to the conclusion that not all HMA have the same inductive response against a specific plant pathogen.

Key words: defense mechanisms, pathogenicity, tomato, AMF

RESUMEN. Se realizó un experimento con el objetivo de evaluar la respuesta del tomate micorrizado, frente al ataque del hongo fitopatógeno *Oidiopsis taurica* (Lev.) Salm. Para ello se enfrentaron plantas previamente tratadas con los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) *Glomus cubense* (40 esporas g⁻¹) y *G. mosseae* (60 esporas g⁻¹) con *O. taurica* (2 x 10⁴ esporas mL⁻¹), a los 21 días de germinadas. Se determinaron algunas actividades enzimáticas relacionadas con la inducción de defensa (PRX, PPO, β-1,3 glucanasa, quitinasa y fenilalanina amonio liasa), así como variables micorrízicas (densidad visual u ocupación fungica (D.V) y porcentaje de colonización) y porcentaje de daño producido por el patógeno. Las especies micorrízicas indujeron respuestas sistémicas en las plantas, donde los mayores niveles de protección se observaron en las plantas tratadas con *G. cubense*. Los niveles de inducción de respuesta no fueron suficientes para evitar la colonización del hongo fitopatógeno y por ende, el daño producido por este; sin embargo; existió una respuesta diferencial entre las dos especies de HMA estudiadas. Es interesante destacar la baja respuesta inducida por *G. mosseae* frente al ataque de este hongo fitopatógeno, lo cual permite concluir que no todos los HMA presentan la misma respuesta inductiva frente a un fitopatógeno específico.

Palabras clave: mecanismos de defensa, patogenicidad, tomate, HMA

INTRODUCCIÓN

Es conocida la tendencia actual a disminuir el uso de plaguicidas de cualquier tipo y, por tanto, su incidencia negativa sobre el suelo y el hombre (1). El uso de productos de origen biológico en la agricultura ha alcanzado gran auge en los últimos años, estimulando el rendimiento de las plantas y la productividad de los cultivos a través de la producción

¹ Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA), gaveta postal 1, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba. CP 32 700.

² Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), Mayabeque, Cuba.

³ Universidad de La Habana, Cuba.

✉ eduardo@inca.edu.cu

de biofertilizantes, que sustituyan las sustancias químicas contaminantes (2).

Teniendo en cuenta esa tendencia los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) han recibido una especial atención en las últimas décadas, primeramente por encontrarse de manera natural en los ecosistemas y establecer una simbiosis mutualista con la mayoría de las plantas de interés económico y luego, por influir positivamente en la nutrición del hospedero, su estado fisiológico y su disposición para enfrentar el ataque de diversos patógenos (2, 3).

Entre los hongos fitopatógenos que afectan al cultivo de las hortalizas se encuentra *Oidiopsis taurica* (Lev.) Salm., causante de la cenicilla polvorienta, cuya incidencia se ve aumentada por los cambios climáticos que han producido inviernos más cálidos y húmedos. Este patógeno se ve favorecido en condiciones de humedad relativa del 70 % y temperaturas de entre 10 y 35 °C, con un óptimo a los 25 °C, condiciones ambientales promedio en las que se desarrollan las hortalizas en nuestro país^A.

Teniendo en cuenta lo antes planteado y considerando que estos HMA se informan como bioprotectores contra patógenos radicales fundamentalmente (6), y dada la necesidad de conocer su capacidad bioprotectiva contra patógenos foliares se realizó este trabajo con el objetivo de evaluar la respuesta de dos especies de HMA, en plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*, L.), frente al ataque del hongo fitopatógeno que provoca la cenicilla polvorienta.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los experimentos fueron desarrollados en las áreas del Centro Nacional de Sanidad Vegetal (CENSA) y se condujeron utilizando un diseño completamente aleatorizado con tres réplicas y dos repeticiones. Se seleccionó la variedad de tomate "Amalia" (*Solanum lycopersicum*, L.) obtenida por el Departamento de Genética y Mejoramiento del Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA) (4). El experimento se desarrolló en recipientes de 1 kg de capacidad, con un sustrato conformado por una mezcla de suelo Ferralítico Rojo y humus de lombriz en relación 3:1 (v/v), que fue esterilizado por calor seco a 150 °C durante una hora por tres días. Algunas características agroquímicas del sustrato empleado se muestran en la Tabla I.

^AGómez G. Comunicación personal (INISAV). 2008

Tabla I. Características agroquímicas del sustrato.

Sustrato	K ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	P	Materia Orgánica	pH
		(cmol kg ⁻¹)		(ppm)	(%)	(H ₂ O)
Suelo Ferralítico Rojo lixiviado típico (8,9): humus de lombriz (3:1)	0,6	18,9	6,0	160,0	6,9	7,3

Se emplearon las especies de HMA *Glomus cubense* (Y. Rodr. & Dalpé) (INCAM-4) (5) y *Glomus mosseae* (Nicolson & Schenck) (INCAM-2) (6) procedentes del cepario del Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA), cuyos inóculos poseían un título de 40 y 60 esporas g⁻¹ de suelo fresco respectivamente, los que fueron inoculados mediante recubrimiento de semilla y se realizó una dinámica de establecimiento de la micorrización para las dos cepas desde el día 3 hasta el día 26.

Se realizó el muestreo para determinar la colonización fúngica en las plantas no inoculadas con el patógeno, para lo cual se conformó una muestra de raíces de al menos 10 plantas, tomadas al azar, por tratamiento. Las mismas se secaron a 70 °C y fueron teñidas mediante el método descrito por Phillips y Hayman (7), siendo evaluado el porcentaje de colonización por el método de los interceptos (Grid line intersect) (8). Se calculó la intensidad de la colonización o Densidad Visual (% DV) (9).

Se realizaron dos repeticiones del experimento en los años 2003, 2004, durante el periodo Enero-Marzo por ser la época más propicia para el cultivo. Las plantas fueron mantenidas en condiciones de casa de cristal hasta el momento de ser inoculadas con el patógeno en que se ubicaron en casa de malla, donde se les atenuó la incidencia de los rayos solares, en las áreas del CENSA, San José de Las Lajas, Mayabeque, Cuba.

El inóculo de *O. taurica* se colectó de plantas de tomate variedad Amalia infectadas que se mantenían en condiciones de crecimiento a 20 ± 2 °C, humedad relativa de 70 % y fotoperíodo natural. Las esporas frescas se colectaron por lavado con agua destilada de hojas infectadas para preparar un inóculo cuya concentración se ajustó a 2 x 10⁴ esporas mL⁻¹ y se asperjaron sobre las hojas de las plantas de 21 días de edad, a razón de 5 mL. Se emplearon tres réplicas conformadas cada una por tres plantas, las que fueron mantenidas en cámara húmeda cerrada (cubiertas con nylon), para favorecer el establecimiento de los patógenos.

Se establecieron los siguientes tratamientos:

- ◆ Plantas control (sin HMA ni patógenos)
- ◆ Plantas micorrizadas con *G. mosseae*
- ◆ Plantas micorrizadas con *G. cubense*
- ◆ Plantas inoculadas con *O. taurica*

- ◆ Plantas micorrizadas con *G. mosseae* e inoculadas con *O. taurica*
- ◆ Plantas micorrizadas con *G. cubense* e inoculadas con *O. taurica*

A los cinco días posteriores a la inoculación se evaluaron los síntomas y signos de la enfermedad causada por el patógeno y se muestreó para determinaciones de actividad enzimática, donde el material vegetal fue separado por órganos. Los datos fueron transformados, según la escala informada por Schaefer *et al.* (10) y se analizaron usando la prueba no paramétrica de comparación múltiple de Kruskal Wallis complementado por la prueba de comparación de Mann-Whitney y la correspondiente corrección de Bonferroni (11).

Se procedió a la extracción de proteínas por el método descrito por Solórzano^B y se cuantificó la concentración (19), realizándose la lectura de la absorbancia a 595 nm en espectrofotómetro (Ultraspec Plus Spectrophotometer, Pharmacia LKB), para lo cual se confeccionó una curva patrón de albúmina de suero bovino a partir de una solución madre de 1 mg mL⁻¹.

Se determinaron las actividades enzimáticas que se muestran en la Tabla II y se expresaron en Unidades de Actividad Enzimática según la siguiente expresión:

Actividad Específica (UAE) = Act. Enzimática/ Conc. de proteína

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La Figura 1 muestra los porcentajes de colonización y ocupación fúngica (% DV) para cada uno de los tratamientos en estudio.

La dinámica de colonización de las cepas de HMA se presenta en la Figura 1A, donde se evidencia un incremento de los niveles de colonización fúngica que difirió entre ambas cepas de forma significativa en el día 21. Aún cuando se aprecia una tendencia a ser más altos los niveles de colonización entre los días 15 y 24 para la cepa *G. cubense*, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en la capacidad de las cepas para colonizar las plantas de tomate de la variedad en estudio.

La dinámica de ocupación fúngica se presenta en la Figura 1B. Para ambas cepas los porcentajes de densidad visual se encuentran dentro de los niveles informados para este cultivo (1,3–1,8 %) (12). Sin embargo, la cepa *G. cubense* presentó a partir del día 18, niveles superiores de D.V., que se corresponden con una mayor cantidad de estructuras de intercambio entre las plantas de tomate de la variedad Amalia y esta cepa de HMA, comportamiento que podría estar relacionado con las condiciones de sustrato empleado al ser la cepa recomendada para estas condiciones de fertilidad (13).

Tabla II. Determinaciones enzimáticas realizadas en el trabajo experimental.

Enzima	Método de cuantificación	Sustrato	λ (nm)	Unidades (referidas como U.A.E)
β -1,3-glucanasas (PR2)	Dangrois <i>et al.</i>	Laminarina	450	μ Kat mg ⁻¹ proteína
Quitinasas (PR3)	Boller <i>et al.</i>	Quitina coloidal	585	pKat mg ⁻¹ proteína
Peroxidasas (PRX)	Fric	Guayacol y H ₂ O ₂	470	nKat mg ⁻¹ proteína
Fenil alanina amonio liasa (Phenyl alanine ammonia-lyase PAL)	Nagarotna <i>et al.</i>	Fenil alanina	275	nKat mg ⁻¹ proteína
Polifenol oxidasa (Polyphenol oxidase PPO)	Alexander <i>et al.</i>	Pirogalol	420	nKat mg ⁻¹ proteína
	Citados por Noval B.M (12)			

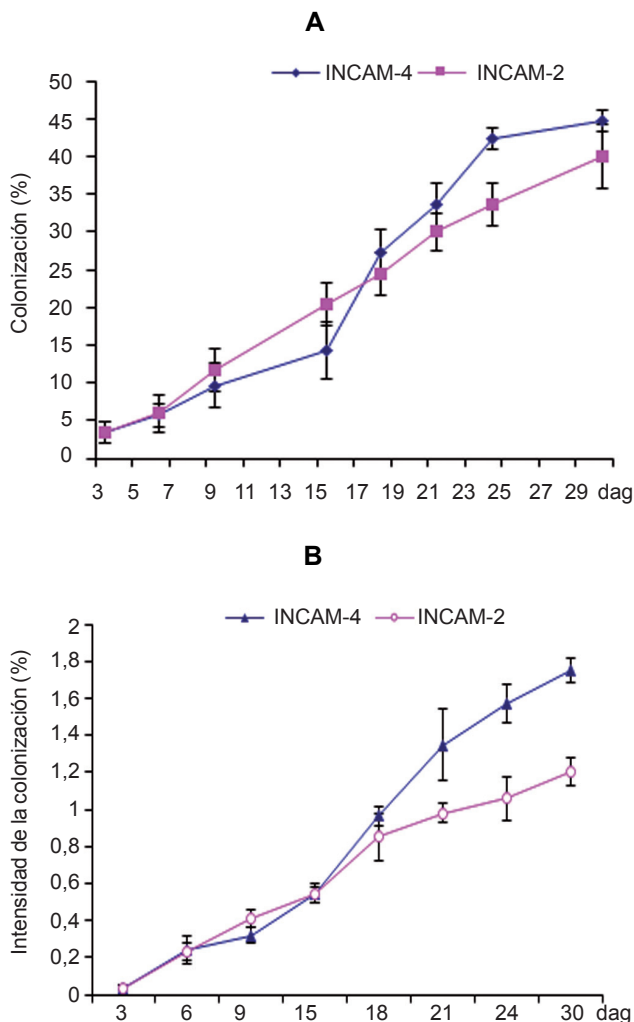
Se calculó el intervalo de confianza de las medias al 95 % de probabilidad, atendiendo al número de repeticiones y la reproducibilidad de los datos. Se desarrolló un Análisis Multivariado de Componentes Principales para determinar las relaciones de los patógenos con las actividades enzimáticas que se reflejan en las plantas y la severidad de los síntomas. Se utilizó el programa STATGRAPHICS Plus, Versión 5.1.de Microsoft®. Los análisis de comparación de medias y la determinación de los intervalos de confianza fueron realizados por el programa STATISTIC versión 6.1.

A través de marcadores genéticos específicos, evaluaron la intensidad de la colonización y la presencia de arbusculos, en *Medicago truncatula* (Gaertn) micorrizada con *G. intraradices* (Biermann & Lindermar) (14). Estos investigadores encontraron que al inicio de la interacción HMA-planta el incremento de los arbusculos era lento, seguido por una etapa en la cual los niveles de colonización y el contenido de arbusculos incrementaba entre los 21 y los 49 días con presencia de todos los estadios de desarrollo y senescencia de estos últimos.

En el presente trabajo los niveles de colonización resultaron adecuados dada la edad del cultivo en condiciones similares (14), lo que indica que la presencia de arbusculos, como estructuras de intercambio en el interior de la raíz, se mantuvo en niveles altos de representación y que la intensidad de la colonización fúngica medida como D.V. fue elevada para ambas especies de HMA.

^BSolórzano, E. Proteínas de defensa y estudio enzimática en la interacción tomate-*Alternaria solani*. [Tesis de Doctorado]. Universidad Agraria de la Habana. 2002. 100 pp.

Este resultado permitió comprobar que en todos los momentos las dos especies de HMA se encuentran representadas en altos valores en la micorrizósfera, dados los niveles de densidad visual observados para la edad del cultivo, lo que se corresponde con lo señalado por otros autores (13).



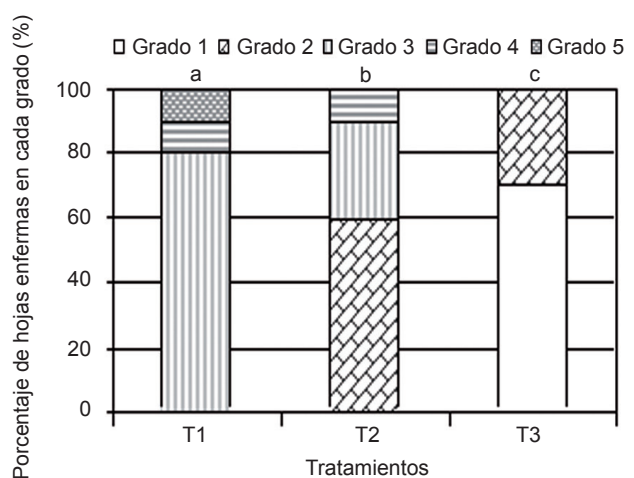
Las barras representan los intervalos de confianza de la media de tratamientos para $p \leq 0,05$ ($n=3$). T1 refiere a las plantas control (M-) y T2 y T3 a las plantas inoculadas con *G. cubense* y *G. mosseae*, respectivamente.

Figura 1. Dinámica de colonización (A) e intensidad de la colonización (B) detectados para los tratamientos en estudio.

El diálogo molecular que se establece entre la planta y el HMA determina los niveles de colonización que estos alcanzan y la eficiencia micorrizica observada como intensidad de la colonización (13), para el caso del cultivo del tomate los porcentajes de colonización y de ocupación fúngica medidos como densidad visual son entre 40 y 45 % y 4-4,3 % respectivamente para plantas que han completado su ciclo de vida (14). En el caso de las plantas utilizadas en el experimento se

realizó la dinámica de colonización para demostrar que ambas cepas se encontraban representadas en niveles adecuados para la edad del cultivo y se empleó un sustrato esterilizado para disminuir o evitar colonización por HMA nativos de suelo por lo cual las plantas testigo no desarrollaron colonización.

Los porcentajes de necrosis foliar observados en las plantas de tomate bajo diferentes tratamientos se presentan en la Figura 2. Se observa que en las plantas inoculadas con *G. cubense* y *G. mosseae* los porcentajes de necrosis en relación con el control fueron inferiores. Las plantas inoculadas con *G. cubense* se destacaron por disminuir la intensidad de los daños producidos por el patógeno en dos grados de afectación.



T1: plantas control, T2 y T3: plantas micorrizadas con *G. mosseae* y *G. cubense*, respectivamente.

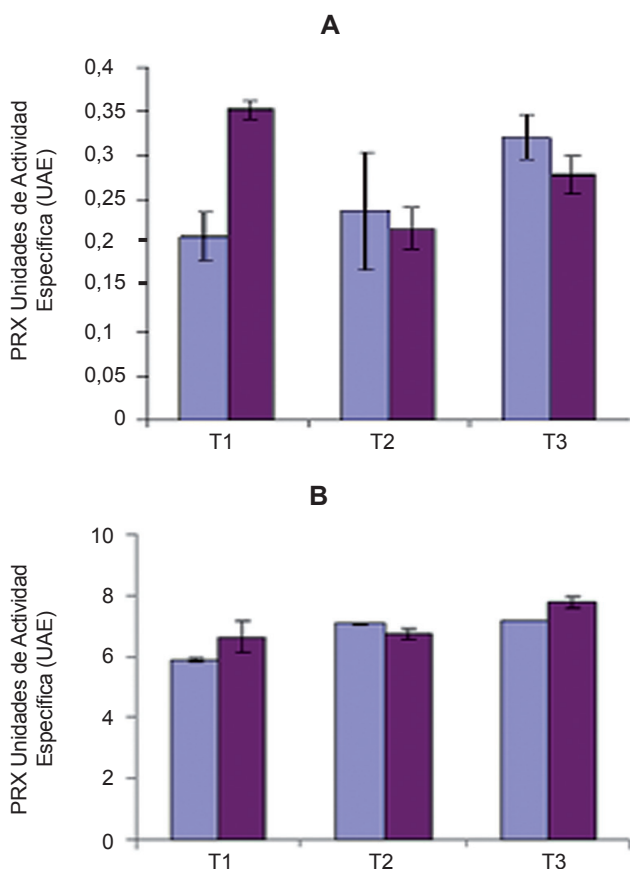
Letras no comunes indican diferencias significativas según corrección de Bonferroni para $p \leq 0,05$ ($n=6$).

Figura 2. Necrosis foliar en plantas de tomate inoculadas con los tratamientos en estudio y enfrentadas a *Oidopsis taurica*.

La activación de PRX para la interacción planta-HMA-*O. taurica* se representa en la Figura 3. La actividad de la enzima en la raíz confirma el hecho de que esta se induce de manera local por los HMA (15) y resultó superior para las plantas micorrizadas respecto a las plantas control.

Cuando las plantas se enfrentaron a *O. taurica*, se observó, en raíz, la disminución de la actividad de la enzima en las plantas inoculadas con HMA respecto a aquellas sin inocular y enfrentadas al patógeno y no se apreciaron cambios sustanciales en el nivel de actividad de esta enzima en hojas, entre las plantas control y las micorrizadas con *G. mosseae*. Se observaron diferencias entre estas plantas y las micorrizadas con *G. cubense*.

Se ha sugerido que el estallido oxidativo que se produce debido a la citotoxicidad de especies activas de oxígeno, tales como el anión superóxido y el peróxido de hidrógeno, así como la rapidez de su producción, constituyen la primera línea de defensa contra la invasión del patógeno. Esto provoca la muerte directa del patógeno o retiene su entrada, debido al endurecimiento de la pared celular por reacción cruzada oxidativa con las proteínas estructurales de la pared. La toxicidad de las especies activas de oxígeno también puede contribuir a la muerte celular del hospedante (16). Aunque las diferencias entre especies de HMA, respecto a la activación enzimática fueron evidentes, se encontró que incluso los niveles más bajos resultaron satisfactorios para detener el avance del patógeno, expresado en la disminución de la severidad encontrada para ambas especies de HMA. No obstante, resultó muy evidente que la especie *G. cubense* se comportó de manera más eficiente, disminuyendo la severidad en dos niveles respecto a las plantas control.



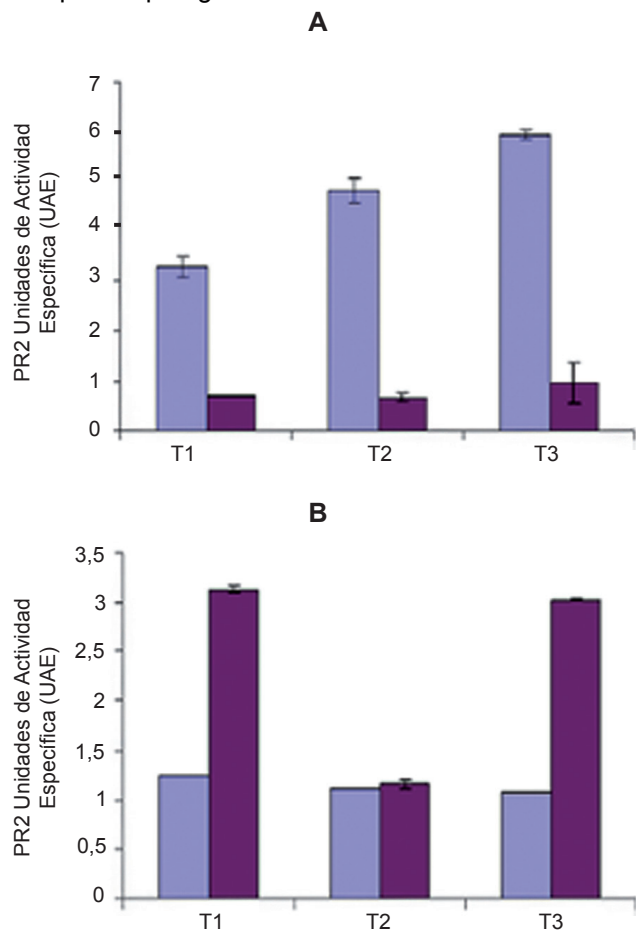
La primera barra representa plantas sin el patógeno T1: plantas control; T2 y T3: plantas micorrizadas con *G. mosseae* y *G. cubense* respectivamente.

Las barras de error representan el intervalo de confianza de la media para $p \leq 0,05$ ($n=6$).

Figura 3. Actividad PRX detectada en raíces (A) y hojas (B) de plantas de tomate frente al ataque de *Oidiopsis taurica*.

Se ha señalado que hay cierta compatibilidad entre *G. cubense* y el tomate (12) por lo que la activación de este mecanismo a los niveles que se aprecian en este trabajo sugiere que se trató de inducir un mecanismo de muerte celular programada en un porcentaje mayor para tratar de circunscribir al patógeno al área de inoculación. El aumento de este proceso, vinculado con el metabolismo oxidativo, en el tratamiento, donde las plantas fueron retadas con el patógeno, respecto a los demás, evidenció, una vez más, que el establecimiento de la simbiosis no sólo beneficia a la planta en cuanto a los parámetros agronómicos, sino también en cuanto a la protección frente a patógenos.

La Figura 4 presenta la inducción de PR2 en raíces y hojas de plantas inoculadas con HMA ante el ataque del patógeno.



La primera barra representa las plantas sin el patógeno.

T1: plantas control; T2 y T3: plantas micorrizadas con *G. mosseae* y *G. cubense* respectivamente.

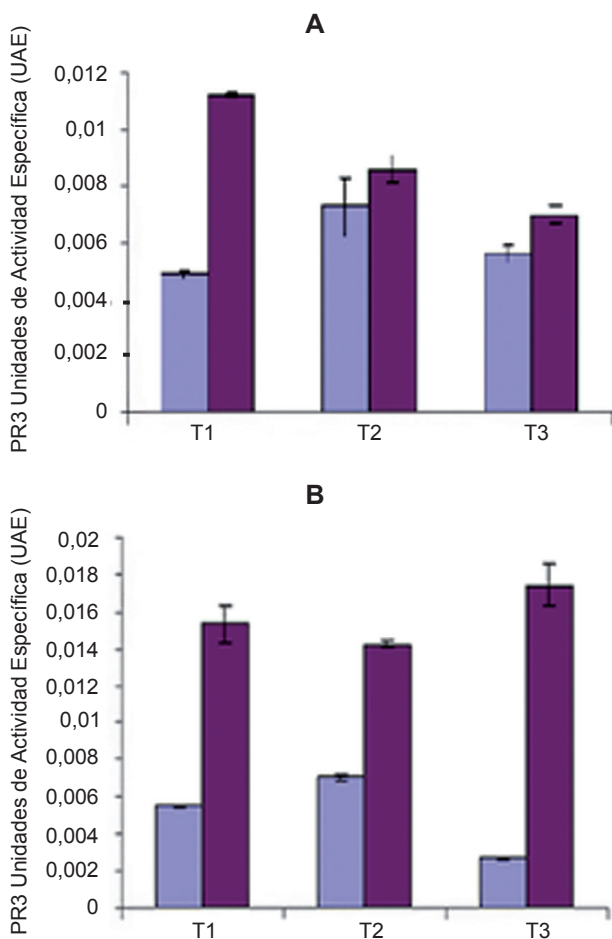
Las barras de error representan el intervalo de confianza de la media para $p \leq 0,05$ ($n=6$).

Figura 4. Actividad PR2 detectada en raíces (A) y hojas (B) de plantas de tomate frente al ataque del patógeno.

Se observa que la inducción local de β 1,3 glucanasa en las raíces de plantas micorrizadas fue superior en relación con el testigo (Figura 4A), mientras que no se observó inducción de respuesta sistémica en las plantas inoculadas con HMA, ya que los niveles de actividad PR2 en estas no se modificaron apreciablemente respecto a las plantas testigo (Figura 4B).

Al enfrentarse al patógeno, en raíz no se observaron diferencias entre los tratamientos y en el sistema foliar se observó una marcada disminución de la actividad en las plantas inoculadas con *G. mosseae* y sin diferencias entre los tratamientos 1 y 3.

La Figura 5 muestra la inducción de quitinasa en hojas y raíces de las plantas inoculadas con HMA frente al ataque del patógeno. La actividad en raíces mostró una respuesta local más elevada en las plantas micorrizadas, que resultó superior para la interacción con *G. mosseae* (Figura 5A).



La primera barra refiere la actividad de las plantas sin el patógeno T1: plantas control, T2 y T3: plantas micorrizadas con *G. mosseae* y *G. cubense* respectivamente.

Las barras de error representan el intervalo de confianza de la media para $p \leq 0,05$ ($n=6$).

Figura 5. Actividad PR3 detectada en raíces (A) y hojas (B) de plantas de tomate frente al ataque del patógeno.

En el enfrentamiento a *O. taurica*, se apreció una disminución significativa de la actividad para las dos cepas de HMA, respecto a las plantas control.

La Figura 5 B muestra la inducción de actividad PR3 en el sistema foliar, donde se observa una respuesta diferencial entre las cepas de micorrizas en cuanto a la inducción sistémica de actividad quitinasa, que fue superior en las micorrizadas con *G. mosseae*, respecto a las plantas control e inferior en las micorrizadas con *G. cubense*.

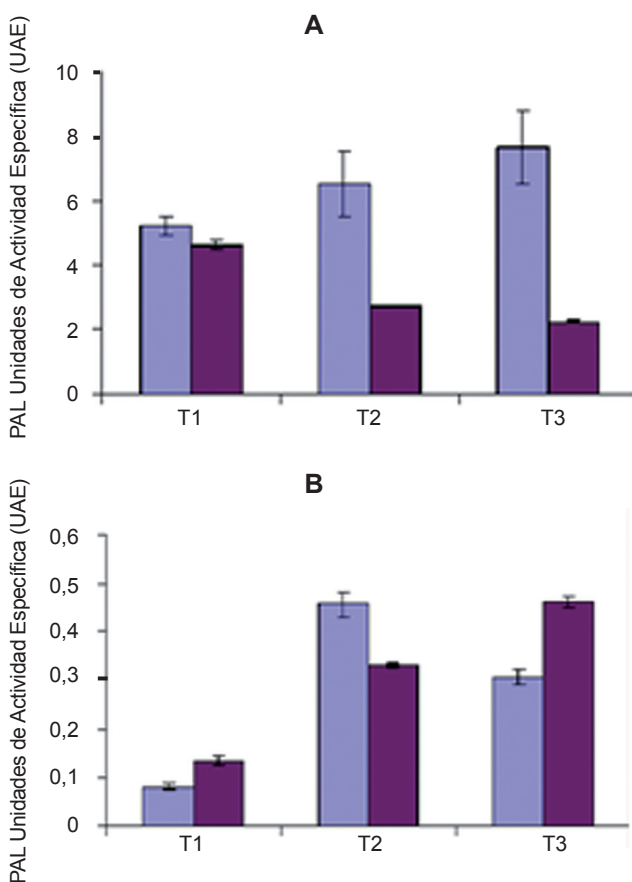
De forma general, no se presentaron diferencias significativas entre las plantas control y las micorrizadas frente al ataque del patógeno en los niveles de inducción de la enzima, aún cuando se encontró una tendencia a la disminución de la actividad en las plantas micorrizadas con *G. mosseae* y la actividad de quitinasa fue alta en todos los tratamientos, por la presencia del patógeno.

Entre las PR proteínas más estudiadas se encuentran las quitinasas y glucanasas que participan en las respuestas de defensa activa de las plantas frente a patógenos fúngicos. Estas enzimas catalizan la hidrólisis de polisacáridos que representan los principales componentes de las paredes celulares de muchos hongos. Además, la quitina, sustrato de la quitinasa, no está presente en las plantas superiores. Las quitinasas solas o en combinación con glucanasas pueden degradar las paredes celulares aisladas de algunos hongos y se ha observado que restringen eficientemente el crecimiento de estos *in vitro* (12).

Se ha demostrado por diferentes autores que la micorrización induce respuestas defensivas en plantas que son subsecuentemente reprimidas en la medida que los HMA son reconocidos y que esta compatibilidad entre la planta y el simbionte está mediada por los genes *sym* (17) y dado que la eficiencia micorrizica depende fundamentalmente de la fertilidad del suelo y la cepa de HMA (13, 18), se observa en el presente estudio que ambas cepas de HMA no inducen respuestas sistémicas pues no difirieron de forma significativa en los valores de actividad enzimática de las enzimas en hojas con las plantas sin micorrizar (T1).

Este resultado está en concordancia con lo informado por diversos autores (1, 3, 18), quienes aseguran que no se han detectado PR proteínas en hojas de plantas micorrizadas. Esto se debe a que estas enzimas actúan no solo en la respuesta defensiva como ocurre en las interacciones patogénicas sino que permiten el crecimiento intraradical de estos HMA, por lo que disminuyen el tamaño de los fragmentos generados por estas enzimas y no constituyen elicitores de respuesta sistémica (3). Sin embargo, estas situaciones se modifican en el caso en que las plantas se someten a estrés biótico, presentando diferencias en las inducciones de la enzima que en algunos casos se diferencian de las plantas controles y permitió la disminución de la severidad encontrada.

La Figura 6 muestra la inducción de fenil alanina amonio liasa (PAL) en raíces y hojas de las plantas. La inducción local de actividad PAL no evidenció diferencias entre las plantas micorrizadas y estas fueron superiores al testigo. En el enfrentamiento a *O. taurica* se apreció una disminución de la actividad para las plantas inoculadas con HMA respecto a las plantas testigo. Además, se evidenció que en el caso en que las plantas fueron enfrentadas al patógeno, la actividad resultó más baja que las plantas en iguales condiciones y sin el patógeno. Este fenómeno puede deberse a que el enfrentamiento se realizó en tejido foliar y a que el metabolismo de inducción enzimática representa un gasto energético para la planta (19).



La primera barra refiere la actividad de las plantas sin el patógeno T1: plantas control; T2 y T3: plantas micorrizadas con *G. mosseae* y *G. cubense* respectivamente. Las barras de error representan el intervalo de confianza de la media para $p \leq 0,05$ ($n=6$).

Figura 6. Actividad PAL detectada en raíces (A) y hojas (B) de plantas de tomate frente al ataque del patógeno.

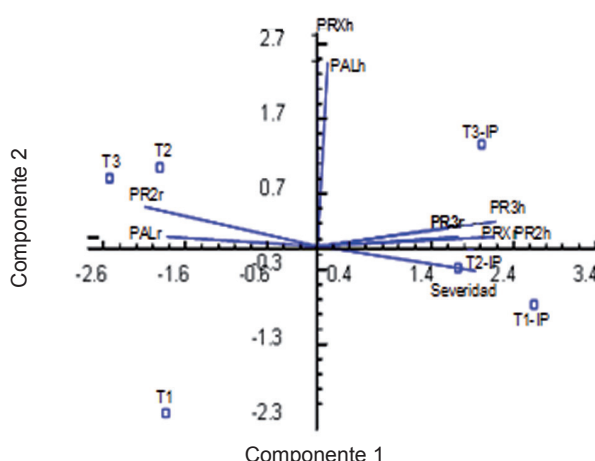
Debe ser menos costoso para la planta inducir este sistema en la zona donde está actuando el patógeno, de ahí que por economía celular esta inducción resultó más baja en la zona de la raíz, aunque se observa actividad, que en este caso puede permitir a la planta contar con niveles centinelas de la enzima.

La Figura 6B muestra la inducción de la actividad en el sistema foliar. Se encontró inducción de respuesta sistémica en las plantas micorrizadas que resultó ser significativa en aquellas inoculadas con *G. mosseae*. Cuando las plantas fueron inoculadas con *O. taurica* la activación fue evidente para las dos cepas, siendo superior en las plantas micorrizadas con *G. cubense*.

La fenilalanina amonio liasa se encuentra involucrada en la vía de los fenilpropanoides que interviene en la deposición de compuestos fenólicos en las paredes celulares y su posterior reforzamiento (20), por lo que, aumentos de su actividad como los que se aprecian en las plantas de los tratamientos del panel B, permiten suponer que esta se está reforzando contra el avance del patógeno y, por tanto, se debe esperar una disminución del daño.

La Figura 7 muestra el resultado del análisis de componentes principales para las combinaciones de las actividades PRX, PR2, PR3 y PAL con el efecto producido por el patógeno en plantas de tomate de la var. Amalia. Se encontró que las dos primeras componentes explican el 82,32 % de la variabilidad de los datos. Al componente uno aportan las variables severidad producida por los patógenos, β 1,3 glucanasa en hojas y raíz, PRX en raíz y quitinasa en raíces y hojas, y al componente dos PRX y PAL en hojas.

	Componente1	Componente2
Severidad	0,372049	-0,0888877
PR2 r	-0,407121	0,147174
PR2 h	0,332437	0,0765588
PRX r	0,416619	0,0330246
PRX h	-0,000397718	0,702557
PR3 r	0,329851	0,0365701
PR3 h	0,41855	0,0930152
PAL r	-0,35665	0,0363865
PAL h	0,023688	0,677191



PRX se refiere a la actividad Peroxidasa, PR2, a β 1,3 glucanasa PR3 a actividad quitinasa y PAL a fenil alanina amonio liasa T1 plantas sin micorrizar T2: *G. mosseae* y T3: *G. cubense* r: a los valores de actividad de las enzimas en la raíz y h: en hojas IP: refiere las plantas enfrentadas a los patógenos.

Figura 7. Análisis de componentes principales para *O. taurica*.

Como se observa, no se encontró relación entre el daño producido por el patógeno y la actividad PRX y PAL en hojas. Esta relación resultó positiva con quitinasas en raíces y hojas, con PRX en raíces y con β 1,3 glucanasa en hojas, resultando negativa con β 1,3 glucanasa y PAL en raíces.

Cuando se compararon las plantas enfrentadas al patógeno con las plantas sin inoculación de patógeno, se observó que la presencia del mismo disminuye la expresión de glucanasa y PAL en raíces e incrementa las actividades de quitinasas en raíces y hojas, de PRX en raíces y de β 1,3 glucanasa en hojas (Figura 7).

Los HMA son inductores de mecanismos de defensa y, por tanto, pueden influenciar en los estrés bióticos de las plantas. Sin embargo, la premisa fundamental para lograr resistencia inducida por los HMA es que la asociación micorrízica esté bien establecida (21), premisa que se cumple en este estudio.

Está ampliamente documentado en la literatura el efecto benéfico de estos HMA en la bioprotección contra patógenos de raíz, entre los que se encuentran especies de *Aphanomyces*, *Cylindrocladium*, *Fusarium*, *Macrophomina*, *Pythium*, *Rhizoctonia*, *Sclerotium*, *Verticillium* y *Thielaviopsis* (1, 17). Se ha informado que la micorrización protege a las plantas de tomate frente al ataque de la bacteria *Erwinia carotovora* Smith., además de producir la disminución en la población del microorganismo en la rizosfera. Otro de los grupos de patógenos en los que se estudió la influencia de los HMA por los daños que causan a la agricultura, son los nemátodos formadores de agallas de la especie *Meloidogyne incognita* (1). Se ha relacionado la reducción del índice de la enfermedad causada por *P. parasitica* Dastur (sin: *Phytophthora nicotianae* Breda de Hann) y la inducción de proteínas del grupo de las PRs por *Glomus mosseae*.

Sin embargo, existen pocos estudios relacionados con la bioprotección de plantas micorrizadas contra patógenos foliares. En el presente estudio se observó que la inoculación con ambas cepas de HMA redujo la severidad de la enfermedad producida por este patógeno, lo cual constituye un informe novedoso de la utilización de estos en la bioprotección.

En las plantas micorrizadas, los niveles de AJ se incrementan con respecto a las plantas sin micorrizar (22) y se ha observado que este incremento activa genes involucrados con la defensa de plantas como las enzimas de la vía de los fenilpropanoides y la producción de PRs (22). Para el caso de la cenicilla, se observó que la disminución de los daños estaba relacionada con el aumento de la inducción de β 1,3 glucanasa en hojas y quitinasas en hojas y raíz, mecanismos que se inducen por la vía del jasmonato. Además, se debe observar que aun cuando las plantas micorrizadas presentaron activaciones de los sistemas defensivos estos, en algunos casos, presentaron

activaciones superiores cuando se enfrentaron a los patógenos, lo que permite aseverar que existió un condicionamiento de la respuesta defensiva (3, 23, 24, 25) que permitió la disminución de la severidad del patógeno.

CONCLUSIONES

De forma general se pudo observar que:

- ◆ Los HMA *G. mosseae* y *G. cubense* se establecieron en la micorrizosfera en niveles adecuados para la edad del cultivo.
- ◆ Ambas especies resultaron efectivas en la disminución de la severidad de *O. taurica* y resultó más efectiva la especie *G. cubense* que logró disminuciones de la severidad de hasta dos niveles respecto a las plantas testigo.
- ◆ Se observó inducción diferencial de PRs en raíz y hojas que resultó efectivo en la disminución de la severidad producida por este patógeno.
- ◆ Se observó condicionamiento de estas respuestas en las plantas micorrizadas que determinaron las reducciones de la severidad ocasionada por el patógeno.

BIBLIOGRAFÍA

1. López-Ráez, J. A.; Bouwmeester, H. y Pozo, M. J. Communication in the Rhizosphere, a Target for Pest Management. *Agroecology and Strategies for Climate Change. Sustainable Agriculture Reviews*, 2011, vol. 8. DOI 10.1007/978-94-007-1905-7_5.
2. Bever, J. D.; Dickie, I. A.; Facelli, E.; Facelli, J. M.; Klironomos, J.; Moora, M.; Rillig, M. C.; Stock, W. D.; Tibbett, M. y Zobel, M. Rooting theories of plant community ecology in microbial interactions. *Trends in Ecology and Evolution*, 2010, vol. 25, pp. 468-478. ISSN 0169-5347.
3. Jung, S. C.; Martínez-Medina, A.; López-Ráez, J. A. y Pozo, M. J. Mycorrhiza-Induced Resistance and Priming of Plant Defenses. *J. Chem. Ecol.*, 2012, vol. 38, pp. 651-664. ISSN 1573-1561.
4. Álvarez, M. *et al.* Amalia: A medium-fruit-size, heat-tolerant tomato cultivar for tropical conditions. *Hort. Science*, 2004, vol. 39, pp. 1503-1504. ISSN 2327-9834.
5. Rodríguez, Y.; Dalpé, Y.; Séguin, S.; Fernández, K.; Fernández, F. y Rivera, R. A. *Glomus cubense* sp. nov., An arbuscular mycorrhizal fungus from Cuba. *Mycotaxon*, 2011, vol. 118, pp. 337-347. ISSN 0093-4666.
6. Rodríguez, Y.; van Tuinen, D. y Fernández, K. Reclasificación taxonómica de dos cepas de hongos micorrizicos arbusculares. *Cultivos Tropicales*, 2009, vol. 30, no. 1, pp. 31-35. ISSN 1819-4087.
7. 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.*, 1972, vol. 55, pp. 158-161. ISSN 0007-1536.

8. Giovanetti, M. y Mosse, B. An evaluation of techniques to measure vesicular-arbuscular infection in roots. *New Phytologist*, 1980, vol. 84, pp. 489-500. ISSN 1469-8137.
9. Trouvelot, A.; Kough, J. y Gianinazzi-Pearson, V. Mesure du taux de mycorrhization VA d'un système racinaire. Recherche de méthodes d'estimation ayant une signification fonctionnelle. In: Proceedings of the 1st European Symposium on Mycorrhizae: Physiological and Genetical Aspects of Mycorrhizae, Dijon, 1-5 July, 1985. (Gianinazzi-Pearson, V. y Gianinazzi, S., eds.). Paris: INRA. 1986. pp. 217-222.
10. Schaefer, S. C. *et al.* Enhanced resistance to early blight in transgenic tomato lines expressing heterologous plant defense genes. *Planta*, 2005, vol. 222, pp. 858-866. ISSN 1432-2048.
11. Dayton, C. M. y Schaefer, N. D. Extended Tables of t and chi square for Bonferroni Test with unequal Error Allocation. *JASA Asoc.*, 1973, vol. 68, pp. 78-83. ISSN 1537-274X.
12. de la Noval, B. M.; Pérez, E.; Martínez, B.; León, O.; Martínez-Gallard, N. y Délano-Frier, J. Exogenous systemin has a contrasting effect on disease resistance in mycorrhizal tomato (*Solanum lycopersicum*) plants infected with necrotrophic or hemibiotrophic pathogens. *Mycorrhiza*, 2007, vol. 17, no. 5, pp. 449-460. ISSN 1432-1890.
13. Rivera, R.; Fernández, F.; Fernández, K.; Ruiz, L.; Sánchez, C. y Riera, M. Chapter 5. Advances in the Management of Effective Arbuscular Symbiosis in Tropical Ecosystems. En: Ed. Hamel, C. y Plenchette, C. Mycorrhizae in Crop Productions. 2007. pp. 151-195. ISBN 9781560223061.
14. Schliemann, W.; Ammer, C. y Strack, D. Metabolite profiling of mycorrhizal roots of *Medicago truncatula*. *Phytochem*, 2008, no. 69, pp. 112-146. ISSN 0031-9422.
15. Bressano, M.; Curetti, M.; Giachero, L.; Vargas Gil, S.; Cabello, M.; March, G.; Ducasse, D. A. y Luna, C. M. Mycorrhizal fungi symbiosis as a strategy against oxidative stress in soybean plants. *Journal of Plant Physiology*, 2010, vol. 167, no. 18, pp. 1622-16256. ISSN 0176-1617.
16. Bao, G.; Bi, Y.; Li, Y.; Kou, Z.; Hu, L.; Ge, Y.; Wang, Y. y Wang, D. Overproduction of reactive oxygen species involved in the pathogenicity of *Fusarium* in potato tubers. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 2014, vol. 86, pp. 35-42. ISSN 0885-5765. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pmpp.2014.01.004>.
17. Zamioudis, C. y Pieterse, C. M. J. Modulation of Host Immunity by Beneficial Microbes. *MPMI*, 2012, vol. 2, no. 25, pp. 139-150. ISSN 0894-0282.
18. Smith, S. E. y Smith, F. A. Roles of Arbuscular Mycorrhizas in Plant Nutrition and Growth: New Paradigms from Cellular to Ecosystem Scales. Annual review of plant biology, 2011, vol. 62, pp. 227-250. ISSN 1543-5008.
19. Walters, D. y Heil, M. Costs and trade-offs associated with induced resistance. *Physiol. Mol. Plant Pathol*, 2007, vol. 71, pp. 3-7. ISSN 0885-5765.
20. van Loon, L. C.; Rep, M. y Pieterse, C. M. J. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annu. Rev. Phytopathol*, 2006, vol. 44, pp. 135-162. ISSN 0066-4286.
21. Kiers, T.; Duhamel, M.; Beesetty, Y.; Mensah, J. A. *et al.* Reciprocal Rewards Stabilize Cooperation in the Mycorrhizal Symbiosis. *Science*, 2011, vol. 333, no. 6044, pp. 880-882. ISSN 1095-9203.
22. Arafat, A. H. A. L. y He, C. Effect of arbuscular mycorrhizal fungi on growth, mineral nutrition, antioxidant enzymes activity and fruit yield of tomato grown under salinity stress. *Sc. Hort.*, 2011, vol. 27, no. 3, pp. 228-233. ISSN 0304-4238.
23. Verbruggen, E.; van der Heijden, M. G. A., Rillig, M. C. y Kiers, E. T. Mycorrhizal fungal establishment in agricultural soils: factors determining inoculation success. *New Phytologist*, 2012, vol. 197, no. 4, pp. 1104-1109. ISSN 1469-8137. doi: 10.1111/j.1469-8137.2012.04348.
24. Tisserant, E.; Kohler, A.; Dozolme-Seddas, P.; Balestrini, R.; Benabdellah, K. *et al.* The transcriptome of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* (DAOM 197198) reveals functional tradeoffs in an obligate symbiont. *New Phytologist*, 2011, vol. 193, no. 3, pp. 755-769. ISSN 1469-8137. doi: 10.1111/j.1469-8137.2011.03948.
25. Klopffholz, S.; Kuhn, H. y Requena, N. A Secreted Fungal Effector of *Glomus intraradices* Promotes Symbiotic Biotrophy. *Current Biology*, 2011, vol. 21, no. 14, pp. 1204-1209. ISSN 0960-9822.

Recibido: 8 de octubre de 2013

Aceptado: 2 de abril de 2014

¿Cómo citar?

Pérez Ortega, Eduardo; de la Noval, Blanca M.; Martínez Coca, Benedicto; Torres de la Noval, Walfredo; Medina Carmona, Aida; Hernández, Annia y León, Ondina. Inducción de mecanismos de defensa en plantas de tomate (*Solanum lycopersicon* L.) micorrizadas frente al ataque de *Oidiopsis taurica* (Lev.) Salm. [en línea]. *Cultivos Tropicales*, 2015, vol. 36, no. 1, pp. 98-106. ISSN 1819-4087. [Consultado: ____]. Disponible en: <----->.