

**UNIVERSIDAD DE LA HABANA
FACULTAD DE BIOLOGÍA
INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS AGRÍCOLAS**

**Hongos micorrízicos arbusculares (HMA) para
la bioprotección de patógenos en el cultivo del
tomate (*Solanum lycopersicum* L.)**

**Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor
en Ciencias Biológicas**

Aspirante: Lic. Eduardo J. Pérez Ortega

Tutores:

**Dra. Annia Hernández Rodríguez
Dra. C. Ondina León Sánchez**

**-Ciudad de La Habana-
2010**

Citación correcta Norma ISO 690

Según Sistema de Referencia Numérico

Pérez-Ortega, E.J. Hongos micorrízicos arbusculares (HMA) para la bioprotección de patógenos en el cultivo del tomate (*Solanum lycopersicum* L.) [Tesis en opción al grado de Doctor en Ciencias Biológicas] Universidad de La Habana, 2010. 77 p.

Según Sistema de Referencia Apellido, año

Pérez-Ortega, E.J. 2010. Hongos micorrízicos arbusculares (HMA) para la bioprotección de patógenos en el cultivo del tomate (*Solanum lycopersicum* L.) [Tesis en opción al grado de Doctor en Ciencias Biológicas] Universidad de La Habana. 77 p.

*(...) Tener talento es tener buen corazón;
el que tiene buen corazón, ese es el que tiene talento.
Todos los pícaros son tontos.
Los buenos son los que ganan a la larga. (...)*

*José Martí.
T. 18 Pág.324*

A mis padres por lo que representan en mi vida

A mi hijo

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer al Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA), y en especial al Grupo de Micorrizas, Félix Blanca, Kalyanne, Yaquelin, Loreli, Bannie, Yonaisy, por haber contribuido a mi formación profesional y por estar prestos a ayudarme siempre que lo he necesitado. MUCHAS GRACIAS!!!.

También quiero agradecer al Grupo de Fitopatología del Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA) por todo el apoyo brindado en el desarrollo de las investigaciones, en especial a Belkis y Yomaris.

A todos los compañeros del Consejo Científico de la Facultad de Biología de la Universidad de la Habana por sus acertadas y oportunas sugerencias que permitieron elevar la calidad del documento de Tesis.

A mi tutora Dr. Annia Hernández Rodríguez por sus conocimientos, su apoyo, su confianza y su ayuda tan valiosa, y especialmente por ser mi amiga y todo lo que me ha enseñando en el transcurso de estos años. MUCHAS, MUCHAS GRACIAS!!!!

A mi tutora Dr. C. Ondina León Sánchez por su valiosa ayuda y por haberme dado la oportunidad de formar parte de su Grupo de Trabajo y abrirme las puertas de su Laboratorio para desarrollar la parte experimental de la Tesis. MUCHAS GRACIAS PROFE!!!

Quiero agradecer muy especialmente al Dr. Walfredo Torres de la Noval por siempre estar dispuesto a ayudarme en lo que fuera necesario e impulsarme a lograr esta meta. GRACIAS AMIGO!!!.

A los Dres. Benedicto Martínez Coca y Miguel Ramos Leal por sus valiosas ideas y sugerencias que contribuyeron a mejorar este documento.

Mis agradecimientos especiales para Aidita y Aracelis que participaron de forma activa en la parte práctica de la tesis y se comportaron como verdaderas amigas y nunca me abandonaron a pesar de las circunstancias.

A los compañeros del Departamento de Microbiología y Virología, especialmente a los Dres Mayra Heydrich, Orquidea Coto, Gilda Guerra, Nidia Rojas, Marcia Rojas y a la M.C Teresa Rojas por aceptar con cariño revisar el documento de Tesis y por todas las aportaciones que contribuyeron a fortalecer este trabajo.

A Sergio, Narovis, Acela y Yanelis por ser tan especiales y por su apoyo incondicional.

A mis amigos José, Angélica, Jorge, Maiquel, Lourdes y Rey por su apoyo incondicional.

A mis padres y hermanos por estar siempre dispuestos a ayudarme en lo que fuese necesario. A USTEDES MI GRATITUD ETERNA!!!

En fin, agradezco a todos los que han intervenido en mi formación académica y en la elaboración de este documento, sin los que su inapreciable colaboración, este día no fuese posible.

A todos, muchas gracias,

El Autor.

Abreviatura	Significado
°C	Grados Celsius
% DV	porcentaje de Densidad Visual u ocupación fúngica
AS	Ácido salicílico
AJ	Ácido Jasmónico
avr	Genes de Avirulencia;
D	Daltons
dpg	días post germinación
ETI	Inmunidad activada por efectores
ETS	Susceptibilidad inducida por efectores
hpi	horas post inoculación
HMA	Hongos micorrizicos arbúsculares
HR	Respuesta hipersensible
NBS-LRR	Proteínas con uniones nucleotídicas y dominio repetidos ricos en leucina
nm	nanómetros
Nod	Factor de la nodulación
U.A.E	Unidades de actividad específica
P	Patógeno
PAL	fenilalanina amonio liasa
PAMP's	patrones moleculares asociados a patógenos
PCD	Muerte Celular Programada
PDA	medio Agar papa dextrosa
PR proteína	Proteínas relacionadas con la patogenicidad
PR-2	β -1,3-glucanasa
PR-3	quitinasa
PR-9, PRX	peroxidasas inducidas por patógenos
R	gen de resistencia
SAR	Respuesta Sistémica Adquirida
seg.	segundos
<i>sym</i>	Genes de la simbiosis
t	tiempo
U.A.E	Unidades de Actividad Específica
$\mu\text{g.mL}^{-1}$	microgramos por mililitros
μL	microlitros
$\mu\text{mol.mL}^{-1}$	micromoles por mililitro

SÍNTESIS

La aplicación de los hongos micorrízicos arbúsculares (HMA) en los sistemas agrícolas sostenibles tiene potencial en la reducción de las afectaciones producidas por patógenos y proveen otros beneficios entre los que se encuentran, incrementos en el crecimiento y productividad de las plantas, mejoras en la nutrición del Fósforo y la tolerancia a la toxicidad de los metales. En este trabajo se seleccionaron cepas de dos géneros de HMA, en base a la ocupación fúngica y la inducción de enzimas de defensa destacándose las cepas *Glomus hoi-like* y *G. mosseae* por la rapidez en que inducen estos mecanismos defensivos y por los niveles de ocupación fúngica, transitando en un menor periodo de tiempo de la fase de estrés biótico a simbiote. Se demostró además que estos HMA no son inductores de respuesta sistémica adquirida en el cultivo del tomate, al no encontrarse diferencias significativas en los niveles de activación de los sistemas de defensa entre las plantas micorrizadas y las testigo. Se observaron diferencias entre los aislados seleccionados en cuanto al efecto de bioprotección y la capacidad de aumentar resistencia y tolerancia frente a los patógenos estudiados resultando la cepa *G. hoi-like* eficaz contra los patógenos foliares *Alternaria solani* y *Oidiopsis taurica*, y de raíz, *Phytophthora infestans*, reduciendo la severidad de los daños provocados por estos patógenos, en las condiciones de sustrato empleadas. No se observaron efectos contra *P. nicotianae*. La cepa *G. mosseae* resultó ineficiente contra la mayoría de los patógenos estudiados, aún cuando las condiciones ambientales y de fertilidad del sustrato no difirieron para ambos aislados. Las enzimas estudiadas no están involucradas de forma independiente con la disminución de la severidad observada para los patógenos estudiados, sino que la bioprotección contra estos microorganismos está relacionada con los niveles centinelas de PR proteínas que permite el condicionamiento rápido de la respuesta defensiva en la planta con la consiguiente disminución de la severidad de la enfermedad.

ÍNDICE

	Pág.
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	5
1.1 Generalidades del cultivo del tomate	5
1.1.1 Principales enfermedades que afectan al cultivo del tomate en Cuba	5
1.2 Los Hongos Formadores de Micorrizas Arbusculares (HMA)	6
1.2.1 Funcionamiento de la simbiosis planta-HMA	8
1.3 Mecanismos defensivos de las plantas	11
1.3.1 Sistema de inmunidad innata	14
1.3.2 Mecanismos constitutivos	14
1.3.3 Mecanismos inducidos	14
1.3.4 Respuestas de defensa sistémicas	14
1.3.4.1 Proteínas relacionadas con la patogenicidad (PR proteínas)	15
1.4 Características distintivas de la interacción planta hospedante- HMA	16
1.4.1 Elicitores de HMA	16
1.4.2 Amplitud de las respuestas de defensa	17
1.4.3 Mecanismos para el control de la elicitación y las respuestas de defensa en las plantas micorrizadas	19
1.4.3.1 Metabolismo de los fenilpropanoides	20
1.4.3.2 Proteínas relacionadas con la patogénesis e isoformas de enzimas hidrolíticas	20
1.4.4 Cambios en la señalización de las vías del ácido jasmónico y el ácido salicílico en plantas micorrizadas	21
1.5 Manejo de los HMA en la agricultura y su contribución a la bioprotección de plantas	22
CAPÍTULO II. MATERIALES Y MÉTODOS	25
Material Vegetal	25
Condiciones experimentales	25
2.1 Selección de cepas de hongos micorrízicos arbusculares (HMA)	26
2.1.1 Análisis de a ocupación fúngica	27
2.1.2 Dinámica de inducción de actividad enzimática en raíces de	27

tomate inoculadas con diferentes HMA	
Extracción de enzimas y determinación de las actividades enzimáticas	27
Actividad peroxidasa (PRX)	28
Actividad polifenoloxidasa (PPO)	28
Actividad quitinasa (PR3)	28
Actividad β 1-3 glucanasa (PR2)	29
Actividad Fenil alanina amonio liasa (PAL)	29
2.2 Dinámica de inducción temporal y local de PR2 y PR3 en plantas micorrizadas con las cepas seleccionadas	29
2.3 Estudio de la inducción temporal, local y sistémica de PRs en plantas de tomate inoculadas con las cepas de HMA seleccionadas	29
2.3.1 Dinámica de colonización y ocupación fúngica de las plantas	30
2.3.2 Masa fresca de la raíz y foliar de plantas de tomate	30
2.3.3 Dinámica de la inducción de PRs en raíz y hojas	30
2.4 Efecto de los HMA seleccionados sobre la severidad de las enfermedades causadas por <i>Phytophthora nicotianae</i> , <i>P. infestans</i> , <i>Alternaria solani</i> y <i>Oidiopsis taurica</i>	30
2.4.1 Ocupación fúngica	30
2.4.2 Evaluación de la severidad de los daños producidos por microorganismos patógenos de raíz	30
2.4.3 Actividades enzimáticas detectadas en las plantas frente al ataque de los microorganismos patógenos de raíz	31
2.4.4 Análisis de componentes principales en la interacción planta-patógenos de raíz-HMA	31
2.4.5 Evaluación de la severidad de los daños producidos por microorganismos patógenos de acción foliar	31
2.4.6 Actividades enzimáticas detectadas en las plantas frente a los patógenos de acción foliares	32
Diseño experimental y análisis estadístico de los datos	32
CAPÍTULO III. RESULTADOS	33
3.1 Selección de cepas de dos géneros de hongos micorrízicos arbusculares	33
3.1.1 Análisis de la ocupación fúngica	33
3.1.2 Dinámica de la inducción de la actividad enzimática en	34

raíces de plantas de tomate inoculadas con diferentes HMA	
Actividad de la enzima peroxidasa (PRX)	34
Actividad de la enzima polifenoloxidasas (PPO)	35
Actividad de la enzima quitinasa	36
Actividad de la enzima β 1,3 glucanasa	36
Actividad de la enzima fenilalanina amonioliasa (PAL)	37
3.2 Dinámica de inducción temporal y local de PR2 y PR3 en plantas micorrizadas con las cepas promisorias	38
3.3 Estudio de la inducción temporal, local y sistémica de PRs en plantas de tomate inoculadas con las cepas de HMA seleccionadas	39
3.3.1 Dinámica de colonización y ocupación fúngica de las plantas	39
3.3.2 Masa fresca de la raíz y parte aérea de plantas de tomate	41
3.3.3 Dinámica de la inducción de PRs en raíz y hojas	41
3.3.3.1. Dinámica de la inducción de Peroxidasa en raíz y hojas	41
3.3.3.2 Dinámica de la inducción de β 1-3 glucanasa en raíz y hojas	43
3.3.3.3 Dinámica de la inducción de quitinasa en raíces y hojas de plantas de tomates micorrizadas	44
3.4 Efecto de los HMA seleccionados sobre la severidad de las enfermedades causadas por <i>Phytophthora nicotianae</i> , <i>P. infestans</i> , <i>Alternaria solani</i> y <i>Oidiopsis taurica.</i> , en tomate de la variedad Amalia	45
3.4.1 Ocupación fúngica	45
3.4.2 Evaluación de la severidad de los daños producidos por patógenos de la raíz	46
3.4.2.1 Severidad de <i>Phytophthora</i> spp. sobre plantas inoculadas con las cepas de HMA seleccionadas	46
3.4.3 Actividades enzimáticas detectadas en las plantas frente al ataque de los patógenos de raíz	47
3.4.3.1 Actividad PRX en hojas y raíces de plantas inoculadas con HMA frente al ataque de patógenos de raíz	47

3.4.3.2	Actividad PR3 en hojas y raíces de plantas micorrizadas frente al ataque de patógenos	48
3.4.3.3	Actividad PR2 en hojas y raíces de plantas inoculadas con HMA frente al ataque de patógenos	49
3.4.3.4	Actividad PAL en hojas y raíces de plantas inoculadas con HMA frente al ataque de patógenos	50
3.3.5	Análisis de componentes principales en la interacción planta-patógenos de raíz-HMA.	51
3.3.6	Evaluación de la severidad de los daños producidos por los patógenos de acción foliar	53
3.3.6.1	Severidad de las afectaciones producidas por <i>Alternaria solani</i> sobre las plantas inoculadas con HMA	53
3.3.6.2	Afectaciones producidas por <i>Oidiopsis taurica</i> sobre las plantas inoculadas con HMA	54
3.3.7	Actividades enzimáticas detectadas en las plantas frente al ataque de patógenos foliares	54
3.3.7.1	Actividad PRX en hojas y raíces de plantas inoculadas con HMA frente al ataque de patógenos foliares	54
3.3.7.2	Actividad PR3 en hojas y raíces de plantas micorrizadas frente al ataque de patógenos foliares	55
3.3.7.3	Actividad PR2 en hojas y raíces de plantas inoculadas con HMA frente al ataque de los patógenos foliares	56
3.3.7.4	Actividad PAL en hojas y raíces de plantas micorrizadas frente a los patógenos foliares	57
3.3.8	Análisis de componentes principales en la interacción planta-patógenos foliares-HMA	58

CAPÍTULO IV. DISCUSIÓN 60

4.1	Selección de cepas de dos géneros de hongos de micorrízicos arbusculares (HMA)	60
4.2	Dinámica de inducción temporal y local de PR 2 y PR 3, en plantas micorrizadas con las cepas que resultaron las más	65

promisorias	
4.3 Estudio de la inducción, local y sistémica, de PRs en plantas de tomate inoculadas con las dos cepas de HMA	66
4.4 Efecto de los HMA seleccionados sobre la severidad de las enfermedades causadas por <i>Phytophthora nicotianae</i> , <i>P. infestans</i> , <i>Alternaria solani</i> y <i>Oidiopsis taurica</i> .	68
Consideraciones generales	74
CONCLUSIONES	76
RECOMENDACIONES	77
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	

INTRODUCCIÓN

Por más de 400 millones de años las plantas han establecido una asociación mutualística conocida como micorrizas arbusculares (Pazskowski, 2006). Aproximadamente el 80% de todas las plantas terrestres, incluyendo la mayoría de las de interés agronómico son capaces de establecer esta asociación.

El establecimiento de la simbiosis requiere de un programa de desarrollo coordinado que involucra la diferenciación de ambos simbioses para crear una nueva interfase dentro de las células de la raíz (Harrison, 2005). Aunque las señales moleculares que permiten la comunicación inicial aun son desconocidas, estudios recientes apuntan hacia la existencia de estas (Harrison, 2005). Además, dentro de la planta se inducen señales específicas de la micorrización que influyen sobre el desarrollo de la raíz.

Los efectos benéficos de las micorrizas son ampliamente conocidos e incluyen mejoras en la nutrición mineral, e incrementos en la capacidad para superar los estrés bióticos y abióticos a través de una sofisticada red de señales (Fujita *et al.*, 2006).

Entre las vías de señales que se establecen, el sinergismo y antagonismo proveen un potencial regulatorio que permiten la inducción de mecanismos de defensa (Pozo y Azcón-Aguilar, 2007).

En el Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA) se trabaja desde 1992 en la utilización y extensión de estos hongos en la nutrición vegetal en general y en la fosforada en particular, contando con un sistema de recomendación de cepas por tipo de suelo (pH, contenido de materia orgánica y nivel de fertilidad) (Rivera *et al.*, 2007), de forma tal que el cultivo sea eficientemente micorrizado, así como, en la tolerancia de las plantas micorrizadas al estrés de temperatura y en el mejoramiento de las condiciones hídricas del cultivo (Dell Amico *et al.*, 2002).

La aplicación de los hongos micorrízicos en los sistemas agrícolas ofrece además cierto potencial en la reducción de las afectaciones producidas por patógenos y proveen otros beneficios entre los que se encuentran, mejorar la nutrición fosforada (Pazskowski, 2007) y la tolerancia a la toxicidad de los metales, entre otras (Hildebrandt *et al.*, 2007).

El efecto de bioprotección y la capacidad de aumentar resistencia o tolerancia, difiere entre especies de HMA, pues no todas son efectivas frente a los diferentes patógenos, comportamiento que está modulado por las condiciones ambientales (Azcón-Aguilar y Barea, 1996; Whipps, 2004; Pozo y Azcón-Aguilar, 2007).

Entre las causas que afectan los rendimientos del cultivo del tomate (*Solanum lycopersicon*) se encuentran los daños ocasionados por plagas, de las cuales, los producidos por especies de *Alternaria*, *Phytophthora* y *Oidium* se consideran de gran importancia para el mismo.

Las enfermedades producidas por *Alternaria* sp. en solanáceas son de distribución mundial y la importancia del hongo está dada por ser factor limitante en la producción de papa (*Solanum tuberosum*) y tomate, en las condiciones de elevada humedad de los trópicos. *Alternaria solani* produce en tomate la podredumbre del cuello y el tizón temprano, que causa defoliación de plantas maduras y por tanto las mayores pérdidas de productividad (Castaño-Zacata y del Río, 1994; Plagas y enfermedades del tomate, 2006). Las semillas procedentes de frutos infectados pueden transmitir la enfermedad a las plántulas, provocando el chancro del hipocotilo (Dillard *et al.*, 1994; Agrios, 2005). Todas estas alteraciones provocan la disminución del rendimiento o la reducción de la calidad de los cultivos (Agrios, 2004).

Las algas del género *Phytophthora* son típicas habitantes del suelo y causan una variedad de enfermedades en diferentes tipos de cultivos, desde anuales y ornamentales, hasta cultivos perennes. La mayoría de las especies causan pudrición de las raíces, las plántulas, tallos y tubérculos similares a los causados por *Pythium* sp. Todos estos síntomas aparecen en cualquier región donde el suelo sea lo suficientemente húmedo como para que el microorganismo pueda crecer. En las plantas infectadas, el primer síntoma que se manifiesta es la desnutrición, por lo que se debilitan rápidamente y se vuelven susceptibles al ataque de otros patógenos.

La cenicilla polvorienta es una enfermedad causada por varios agentes entre los que se encuentra la especie *Oidium taurica* que produce desecación, necrosis de la hojas y tallos, con la consecuente defoliación de las plantas y pérdida de la productividad de los cultivos (Plagas y enfermedades del tomate, 2006).

En los últimos años, la incidencia de *Alternaria* sp. y *Oidium* sp. se incrementó en Cuba, motivado por inviernos húmedos con temperaturas más altas, debido al efecto del Cambio Climático (Pérez, 2003; Martínez *et al.*, 2006; Gómez, 2008).

El excesivo uso de insumos químicos para controlar enfermedades es un problema importante en los sistemas de producción actuales (Cordier *et al.*, 1998), por lo que se priorizan alternativas de investigación que favorezcan las prácticas de manejo, compatibles con el medio ambiente y una agricultura sostenible. Estos incluyen el uso de microorganismos beneficiosos tales como, los hongos micorrízicos arbusculares que contribuyen a la reducción de las enfermedades de la raíz producidas por un número de patógenos del suelo (Barea *et al.*, 2005).

Durante la evolución, las plantas han desarrollado estrategias que les permiten reconocer a los patógenos que las invaden y desencadenar una defensa exitosa (Staskawicz *et al.*, 2001). Esta respuesta se induce después del reconocimiento de los patrones moleculares asociados a patógenos e incluye proteínas, péptidos, carbohidratos y lípidos (Zipfel y Felix, 2005). Entre estas proteínas, las relacionadas con la patogenicidad (PR proteínas) son de gran importancia pues constituyen una barrera defensiva contra el ataque de patógenos y se inducen no solo por la infección con varios

tipos de patógenos, sino también en respuesta al tratamiento con inductores, reguladores del crecimiento, acción de compuestos metabólicos y diversos agentes químicos (Edreva, 2005; van Loon *et al.*, 2006).

Entre las PR proteínas mas estudiadas se encuentran las quitinasas (PR3) y glucanasas (PR2) que participan en las respuestas de defensa activas de las plantas contra patógenos fúngicos. Estas pueden degradar las paredes celulares de algunos hongos y restringen eficientemente el crecimiento *in vitro* de estos (van Loon *et al.*, 2006). Se considera además, que las quitinasas pueden tener un papel importante en la micorrización dado que pueden participar en la formación/degradación de arbusculos (Slezack, 1999; Dassi *et al.*, 1998), regulando el desarrollo de estas estructuras claves (Dumas-Gaudot, 1996), así como se han observado cambios en la estructura de la hifa intraradical, 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, al facilitarle la extensión intraradical (Gollotte *et al.*, 1997).

Aunque los HMA se emplean en la bioprotección de algunos cultivos, son escasos los informes sobre el efecto de especies diferentes en la inducción de protección frente a las diversos tipos de patógenos que afectan los tejidos radicales y foliares así como de los mecanismos de defensa que se expresan bajo condiciones específicas de sustrato (Judelson, 1997; Lingua *et al.*, 2002; Harrier *et al.*, 2004; Pozo y Azcón-Aguilar, 2007). En particular, para el caso de los patógenos que afectan el tejido aéreo, son muy escasos y recientes los informes existentes (Lingua *et al.*, 2002; Fritz *et al.*, 2006; Pozo y Azcón-Aguilar, 2007).

Los principales resultados publicados sobre el tema demuestran solamente la influencia de una cepa en la bioprotección contra patógenos, pero no refieren la condición de fertilidad del sustrato, sin tomar en consideración que la respuesta a la inoculación con HMA y en consecuencia la extensión del desarrollo simbiótico, depende de al menos tres factores: la cepa de HMA, el suelo y los niveles de fertilidad de estos (Rivera *et al.*, 2007), por tal razón el presente trabajo propone la siguiente hipótesis:

Hipótesis: La inducción de mecanismos de defensa, locales y sistémicos, en plantas de tomate, mediados por la colonización de diferentes especies de hongos micorrizógenos, en las condiciones de sustrato donde ejercen su mayor capacidad asociativa puede contribuir a la protección contra el ataque de patógenos foliares y de raíz.

Objetivo general: Demostrar que la inducción de mecanismos de defensa locales y sistémicos mediados por la colonización de hongos micorrízicos, contribuye a la bioprotección de las plantas de tomate variedad Amalia.

Objetivos específicos:

1. Seleccionar cepas de HMA en base a la ocupación fúngica y actividad enzimática en raíces de plantas de tomate de la variedad Amalia, en condiciones de suelo más productivo, en la que se desarrolla la micorrización más eficiente.
2. Caracterizar la inducción de proteínas relacionadas con la patogenicidad en plantas de tomate de la variedad Amalia inoculadas con cepas de HMA mediante el estudio de su dinámica temporal y espacial.
3. Evaluar el uso de la micorrización en la protección de plantas de tomate frente a patógenos que afectan al cultivo.

Novedad Científica: Se realizan aportes al conocimiento en aspectos relacionados con la dinámica de inducción de mecanismos de defensa en plantas inoculadas con diferentes especies de hongos micorrizógenos arbusculares, demostrándose por primera vez que en la interacción tomate-HMA no se inducen respuestas sistémicas. Se demuestra que la cepa *G. fasciculatum* tiene efecto bioprotector contra el ataque de patógenos foliares y de raíz en el cultivo del tomate, reportándose por primera vez su efecto contra *O. taurica*. Se demuestra por primera vez para la ciencia que existe una relación entre las dinámicas de ocupación fúngica y de inducción de mecanismos de defensa por los HMA, lo que podría ser utilizado como marcador bioquímico en el estudio de las interacciones planta-HMA.

Importancia teórica: Este trabajo contribuye al esclarecimiento de la relación que existe entre la colonización micorrízica de plantas de tomate de la variedad Amalia y la inducción de mecanismos defensivos. Otro aporte teórico lo constituye la demostración de que existen diferencias entre cepas de HMA eficientes en la bioprotección de enfermedades que afectan diferentes tejidos de las plantas de tomate (*S. lycopersicon*, L.) variedad Amalia, en la condición de suelo donde se desarrolla la micorrización eficiente.

Importancia práctica: Se demostró la diferenciación de cepas de HMA, que se asocian con similar intensidad, en la bioprotección del cultivo del tomate contra el ataque de patógenos que afectan diferentes tejidos de la planta, que podrían ser aplicadas en ecosistemas agrícolas sostenibles con vistas a disminuir el uso de pesticidas químicos y evitar el deterioro ambiental.

I- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1 Generalidades del cultivo del tomate

El cultivo del tomate (*Solanum lycopersicon* L.) requiere para su crecimiento temperaturas entre 10 y 26°C, humedad relativa baja y alta luminosidad. Se siembra preferentemente en suelos franco-arenosos, retentivos, con buen drenaje y alto contenido de materia orgánica, profundos y con pH entre 5,8 y 6,5. Se encuentra entre las hortalizas de mayor consumo a nivel mundial con una producción anual de más de 92,9 millones de toneladas (FAOSTAT, 2008). La extensión de su cultivo responde a una demanda creciente, derivada de su papel fundamental en los hábitos alimentarios de un amplio sector de la población.

En Cuba, constituye la hortaliza principal, tanto por el área que ocupa como por su producción. El tomate comprende el 50% del total de áreas dedicadas al cultivo de las hortalizas y anualmente se siembran más de 63 000 hectáreas. La producción anual alcanza 802 600 toneladas (FAOSTAT, 2008).

1.1.1 Principales enfermedades que afectan al cultivo del tomate en Cuba

El tomate es afectado por numerosos patógenos que causan pérdidas elevadas en su producción. Entre estos se destacan las enfermedades producidas por *Alternaria solani*, este produce la pudrición del cuello en tomate y el tizón temprano, que provocan defoliación de plantas maduras y por tanto las mayores pérdidas de productividad. Las semillas procedentes de frutos infectados pueden transmitir la enfermedad, provocando el chancro del hipocotilo (Agrios, 2005).

El género *Phytophthora* puede causar enfermedades multicíclicas en raíces y hojas, dado por su alta velocidad de producción de zoosporas. Bajo condiciones óptimas, el inóculo de estas especies puede pasar de escaso a altas concentraciones en pocos días o semanas. La mayoría de las especies causan pudrición de las raíces, plántulas, tallos y tubérculos, similares a los causados por *Pythium* sp. Entre las pérdidas provocadas por este género se informan, disminución del rendimiento de hasta el 40% en

cultivares tolerantes y la pérdida completa por destrucción de la cosecha en los susceptibles (Agrios, 2005).

La cenicilla es causada por varios agentes patógenos entre los que se encuentra *Oidium* sp. Se desarrolla entre 10-35 °C con un óptimo de temperatura de 26 °C y una humedad relativa del 70% (Linares, 2004). Los síntomas aparecen como manchas amarillas en el haz de las hojas que se necrosan por el centro, con un fieltro blanquecino por el envés. En caso de fuerte ataque, la hoja se seca y se desprende. Las solanáceas silvestres actúan como fuente de inóculo (MINAGRI, 2006).

1.2 Los Hongos Formadores de Micorrizas Arbusculares (HMA)

La simbiosis micorrízica formada entre hongos de suelo y plantas vasculares tienen una larga historia con fósiles desde hace 400 millones de años (Remy *et al.*, 1994; Pazskowski, 2006). Estos datos y fósiles de esporas e hifas apuntan a la existencia de HMA anteriores a 460 millones de años y sugieren que asistieron a las plantas en su colonización terrestre (Smith *et al.*, 1997; Redeker *et al.*, 2000). La habilidad para formar simbiosis micorrízica se estableció desde el inicio de la evolución de las plantas y esta capacidad está ampliamente distribuida a través del reino vegetal e incluye angiospermas, gimnospermas y algunas briofitas. Dentro de las angiospermas, al menos el 80% de las especies tienen la capacidad de formar estas asociaciones (Harrison, 2005).

Estos HMA son simbioses obligados que establecen interacción con las plantas y tienen como principal contribución la de facilitar la adquisición de nutrientes minerales, particularmente Fósforo (Harrison, 2005). Se ha planteado que las plantas micorrizadas reciben todo su Fósforo por la vía de esta simbiosis (Smith *et al.*, 2003).

Todos los HMA son miembros del orden *Glomeromycota*, que está subdividido en cuatro subórdenes (Schüßler *et al.*, 2001). Se han descrito aproximadamente 150 especies y la clasificación actual aceptada es la referida por Schüßler (2008):

División	<i>Glomeromycota</i>		
Clase	<i>Glomeromycetes</i>	Familia	Género
	<i>Glomerales</i>	<i>Glomeraceae</i>	<i>Glomus</i>
	<i>Diversisporales</i>	<i>Gigasporaceae</i>	<i>Gigaspora & Scutellospora</i>
		<i>Acaulosporaceae</i>	<i>Acaulospora, Kuklospora & Appendicispora</i>
Órdenes		<i>Entrophosporaceae</i>	<i>Entrophospora</i>
		<i>Pacisporaceae</i>	<i>Pacispora</i>
		<i>Diversisporaceae</i>	<i>Diversispora & Otospora</i>
	<i>Paraglomerales</i>	<i>Paraglomeraceae</i>	<i>Paraglomus</i>
	<i>Archaeosporales</i>	<i>Geosiphonaceae</i>	<i>Geosiphon</i>
		<i>Archaeosporaceae</i>	<i>Archaeospora & Intraspora</i>
		<i>Ambisporaceae</i>	<i>Ambispora</i>

Los HMA existen en el suelo como esporas y germinan independientemente de la presencia de una planta, la hifa germinada crece a través del suelo en busca de una raíz hospedante. Una vez establecido el contacto entre los simbiositos, el hongo forma un apresorio en la superficie de la raíz. Los patrones de crecimiento dentro de la raíz varían en dependencia de la especie involucrada, en dos tipos morfológicos denominados Paris y Arum, en dependencia de la especie de planta en la que fueron observados por primera vez, en la práctica esta división no es muy clara (Smith y Smith, 1997; Cavagnaro *et al.*, 2001).

La germinación de una espora individual hasta la formación de una red de hifas, involucra una secuencia de eventos morfogenéticos representados por la germinación de esporas y crecimiento micelial presimbótico, patrones de ramificación diferencial de la hifa en presencia de raíces hospedantes, formación del apresorio, colonización radical, desarrollo del arbusculo, crecimiento micelial extrarradical y producción de esporas (Harrison, 2005).

Después de la germinación, el tubo germinativo hifal crece a través del suelo. En ausencia de un potencial hospedante (fase asimbiótica), el crecimiento hifal está limitado por las bajas cantidades de carbono almacenadas (Bago *et al.*, 2000) y eventualmente cesa. Sin embargo, la espora retiene suficiente fuente carbonada para repetir la fase germinativa más tarde y encontrar un hospedante

apropiado. Las esporas particularmente grandes de *Gigaspora gigantea* pueden germinar hasta 10 veces (Koske, 1981).

Para ambos simbioses, el período anterior al contacto físico (formación del apresorio) involucra el reconocimiento y la atracción de ambas partes, así como otros eventos que promueven la alianza (Paszkowski, 2006). La sobrevivencia de los hongos biotróficos está realizada por la germinación “económica” y la rápida colonización de la planta hospedante. Los exudados de la raíz promueven o suprimen la germinación de las esporas, lo que indica la presencia de receptores responsables para las alteraciones en la composición química del ambiente (Bécard *et al.*, 2004; Harrison, 2005). En la vecindad de una raíz hospedante, se induce crecimiento hifal y aumenta la ramificación de esta (Buee *et al.*, 2000). Esta respuesta puede ser activada por los exudados de una raíz hospedante, pero nunca por exposición a una raíz no hospedante o sus exudados (Paszkowski, 2006).

1.2.1. Funcionamiento de la simbiosis planta-HMA

La simbiosis planta-HMA se rige fundamentalmente por los genomas de ambos simbioses y está influenciada a su vez por el medio ambiente (Koide *et al.*, 2004; Harrison 2005; Paszkowski, 2006). En la penetración y distribución del hongo en las raíces ocurren modificaciones fisiológicas tales como: incremento de la actividad nuclear, de la masa citoplasmática, del grado de vacuolización de las células corticales, de la diferenciación de los tejidos vasculares, de la tasa fotosintética y de la síntesis de proteínas, clorofila, sustancias de crecimiento y metabolitos secundario; generación de nuevos organelos y activación de los sistemas enzimáticos. Se favorece, además, la absorción y traslocación de nutrientes y agua.

A pesar del arreglo de la planta y la especie de HMA involucrada, el desarrollo del proceso simbiótico, al menos a nivel morfológico, tiene similitudes. La interacción está acompañada por la alteración en la morfología de ambos simbioses para crear una nueva interfase simbiótica de la micorriza arbuscular, a través de la que se intercambian los fosfatos y la fuente carbonada (Harrison, 2005).

Los arbusculos representan la característica fundamental de la simbiosis MA dado que expresan una forma extrema de intimidad y compatibilidad. La formación de los arbusculos dentro de las células hospedantes está asociado con cambios morfológicos y fisiológicos en ambos simbioses. El hongo invagina las células corticales internas, donde produce una ramificación extensa convirtiéndose en una estructura que llena enteramente las células corticales (Paszkowski, 2006). En consecuencia la arquitectura de la célula hospedante cambia: el núcleo se mueve de una posición periférica a una central, la vacuola comienza a fragmentarse y una extensa membrana periarbuscular se sintetiza de forma continua a la membrana plasmática (Harrison, 1999). A pesar de la intensa actividad de ambos simbioses que permite la formación de arbusculos en las células, éstos colapsan después de varios días, dejando la célula cortical intacta y lista para hospedar un nuevo arbusculo (Paszkowski, 2006).

No se conoce qué elicitó la entrada del hongo en la célula, sin embargo la percepción de un gradiente radial de azúcar entre los tejidos vasculares y las capas externas de la célula parece estar involucrado en la formación del arbusculo (Blee y Anderson, 1998). Las señales que inducen la ramificación intracelular del arbusculo o la destrucción de este, tampoco han sido determinadas, sin embargo, la reciente identificación de la estringolactona como estimulante de la ramificación pre-simbiótica (Akiyama *et al.*, 2005), combinada con el hecho de que su vía biosintética se activa en raíces colonizadas (Maier *et al.*, 1997; Walter *et al.*, 2000; Matusova *et al.*, 2005), indican que esta molécula elicitó la ramificación hifal. La iniciación del proceso de senescencia de los arbusculos puede responder a señales endógenas del hongo o a un diálogo a nivel molecular entre los simbioses. Al menos el desarrollo de éstos, está parcialmente bajo el control del programa genético del hospedante (Paszkowski, 2006).

Los HMA obtienen carbohidratos de sus hospedantes y simultáneamente mejoran la adquisición de nutrientes minerales por la planta, en particular el fosfato (Pi). Recientemente se ha demostrado que

en dependencia de la combinación planta-hongo, la toma simbiótica de Pi puede ser parcial o total (Smith *et al.*, 2003).

La vía metabólica propuesta para esta toma de Pi comienza con la asimilación de este en la interfase suelo-hifa por los transportadores del hongo, los que tienen una alta afinidad por el fosfato (Maldonado-Mendoza *et al.*, 2001; Benedetto *et al.*, 2005). Dentro del hongo, el Pi se trasloca en forma de polifosfatos hasta la raíz (Ohtomo y Saito, 2005). Antes de ser liberado en la interfase periarbuscular, el fosfato comienza a ser depolimerizado a Pi (Ohtomo y Saito, 2005) y es adquirido por la planta a través de transportadores de fosfato codificados por esta. Estos transportadores han sido identificados, demostrándose además que se induce la transcripción de estos durante la simbiosis AM (Glassop *et al.*, 2005; Nagy *et al.*, 2005; Bucher, 2007).

El establecimiento del hongo representa un drenaje de fotosintatos desde la parte aérea hasta la zona de la raíz. Los fotosintatos que toma el HMA los utiliza para producir energía metabólica asegurando, a través de esta vía, su mantenimiento y desarrollo, la otra parte se moviliza en forma de azúcares y lípidos de masa fúngica intra y extrarradical (Bowen, 1987; Bonfante-Fassolo y Scannerini, 1992). Estos fotosintatos van en forma de sacarosa y son hidrolizados a través de la enzima invertasa, convertida en dos monómeros, que a su vez se descomponen posteriormente y se fosforilan en moléculas de triosa-P, para ser transferidos al simbionte mediante los arbusculos (Letacon y Obatón, 1983; Bucher, 2007).

Se reconoce que, además del Pi, los HMA también promueven la nutrición nitrogenada de sus hospedantes (Raven *et al.*, 1978). El nitrógeno es tomado por el micelio extrarradical, se incorpora en aminoácidos, y se trasloca de este al intrarradical como arginina para luego ser liberado en forma de amonio en la planta (Govindarajulu *et al.*, 2005; Jin *et al.*, 2005). En analogía a la vía simbiótica de la toma de Pi, los arbusculos pueden ser el sitio de intercambio de nitrógeno que involucra

transportadores de nitrógeno codificados por la planta, localizados dentro de la membrana periarbuscular (Frenzel *et al.*, 2005; Guimil *et al.*, 2005; Hohnjec *et al.*, 2005).

A pesar de la naturaleza simbiótica de las asociaciones micorrízicas arbusculares ellas representan una invasión masiva de las raíces de las plantas. El hecho de que la expansión micelial ocurre en el parénquima cortical y es restringido a las células epidérmicas o hipodérmicas (Broker, 2006), significa que la planta debe ejercer algún tipo de control sobre la proliferación fúngica, que lo confiere a tejidos específicos de la raíz.

Se ha demostrado que durante el establecimiento de la simbiosis las señales moleculares que se intercambian entre la planta y el HMA permiten la germinación, penetración y el desarrollo intraradical de estos hongos (Gao *et al.*, 2004), sin embargo, la planta responde con un aumento transiente de los niveles de PR proteínas dado que en un inicio reconocen a estos HMA como patógenos (Barrer y Tagu, 2000 Salzer y Boller, 2000; Gao *et al.*, 2004). En la medida que se establece la micorrización por un diálogo coordinado entre las partes, estas respuestas son subsecuentemente reprimidas, lo que está determinado por los genes *sym* (gen relacionado con la capacidad simbiótica de las plantas) (Harrison, 2005; Giovannetti, 2008). Durante la primera etapa del establecimiento el HMA actúa de forma parasítica y demanda mayor flujo de fotosintatos que los beneficios que reporta a la planta (Guerrero, 1996), lo que se conoce como paso de estrés biótico a simbiote y depende de la eficiencia micorrízica que a su vez está determinada por la asociación tripartita suelo-planta-HMA (Rivera *et al.*, 2007).

1.3 Mecanismos defensivos de las plantas

La resistencia a la infección contra patógenos está ampliamente distribuida entre las plantas; aunque es difícil probar la naturaleza de los mecanismos de defensa que confieren algunas de estas formas de resistencia (O'Connell y Panstruga, 2006).

Una simple planta puede mostrar una variedad de respuestas diferentes, en dependencia de si actúa como un hospedante resistente o no frente al patógeno en cuestión. De esta manera pueden distinguirse tres clasificaciones en la interacción planta-patógeno: no interacción, interacción compatible e interacción incompatible (Joosten, 1991; Agrios, 2005). En una interacción compatible no hay un rápido reconocimiento molecular del patógeno y la elicitación de las respuestas de defensa de la planta ocurren, aunque lentamente y/o en menor grado, permitiendo al patógeno colonizar al hospedante. En la incompatible, existe un rápido reconocimiento del patógeno que va a penetrar seguido de una rápida activación de las reacciones de defensa de la planta (Joosten, 1991; O'Connell y Panstruga, 2006).

Las plantas interactúan con los patógenos constantemente y su capacidad para detectar patógenos y responder ante ellos es una condición primaria para su existencia (Chisholm *et al.*, 2006; Chengwei *et al.*, 2007). Para ello las plantas han desarrollado dos líneas de defensivas, la inmunidad innata primaria y la secundaria que incluye la producción de proteínas relacionadas con la patogenicidad (Chisholm *et al.*, 2006; Chengwei *et al.*, 2007).

1.3.1 Sistema de inmunidad innata

El sistema de inmunidad innata se elicita después del reconocimiento de los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP's o MAMP's), los cuales en ocasiones se refieren como elicitores generales (Zipfel y Félix, 2005; Jones y Dangl, 2006), e incluyen proteínas, péptidos, carbohidratos y lípidos (Zipfel y Felix, 2005).

En esencia hay dos vías de acción del sistema inmune de las plantas. La primera utiliza los receptores de reconocimiento de los patrones moleculares asociados a patógenos o a microorganismos (PRR's), que responden lentamente a los PAMP's, como la flagelina (Zipfel y Felix, 2005). La segunda actúa mayormente dentro de las células y emplea las proteínas polimórficas NBS-LRR, codificadas por la mayoría de los genes de resistencia (genes R) (Dangl y Jones, 2001).

El sistema inmune de las plantas se puede explicar a través de un modelo de cuatro fases, denominado “zig-zag”. En la fase 1, los PAMP’s son detectados por los PRR’s del hospedante, activándose una inmunidad inducida por los PAMP’s (PTI), lo que puede detener la nueva colonización de la planta por el patógeno (Fig. 1).

En la fase 2 los patógenos eficientes activan efectores que contribuyen a su virulencia, los cuales pueden interferir con la PTI y activar una susceptibilidad inducida por los efectores (ETS). En la fase 3, un efector determinado, es específicamente reconocido por una de las proteínas NBS-LRR, lo que trae como resultado una inmunidad activada por efectores (ETI). Esta es una respuesta PTI mayor y más rápida, que trae como resultado la resistencia a la enfermedad y usualmente produce una respuesta hipersensible (HR) en el sitio de infección.

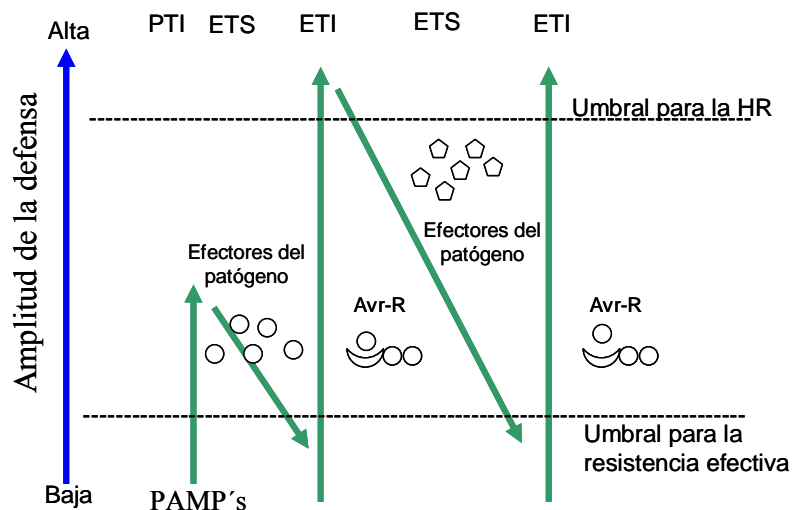


Fig.1 Esquema que representa el modelo zig-zag, que explica el sistema inmune de plantas. Tomado de Dangl y Jones (2001). **Leyenda** PAMP's: Patrones moleculares asociados a patógenos; PTI: Inmunidad inducida por los PAMP's; ETS: Susceptibilidad inducida por efectores; ETI: Inmunidad activada por efectores; HR: Respuesta Hipersensible; Avr: Genes de Avirulencia; R: Genes de Resistencia

En la fase 4, producto de la selección natural, los patógenos evitan la respuesta ETI ya sea evadiendo el gen efector de reconocimiento o por la adquisición de efectores adicionales que suprimen la ETI. Como resultado de la selección natural, en las plantas se generan nuevos genes R específicos, de tal forma que la ETI pueda activarse nuevamente (Jones y Dangl, 2006).

1.3.2 Mecanismos constitutivos

Están presentes independientemente de la presencia del patógeno y se consideran mecanismos protectores del hospedante. Mayormente son fenómenos estáticos, de naturaleza estructural o química, que dificulta la entrada del patógeno con lo que previene su ataque. Incluye barreras físicas como la cutícula y la pared celular y compuestos constitutivos químicos que pueden actuar como inhibidores de la actividad fúngica, tales como compuestos fenólicos, alcaloides, diterpenoides, esteroides glicoalcaloides y otros (Broker, 2006).

1.3.3 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 (Agrios, 2005). 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; respuestas locales clasificadas entre rápidas e intermedias, que incluyen vía de los fenilpropanoides, fitoalexinas, glicoproteínas ricas en hidroxiprolina (GPRH), proteínas intracelulares relacionadas con la patogénesis (PRs) y polímeros de la pared celular; y las respuestas sistémicas clasificadas entre intermedias y lentas, que incluyen: β 1-3 glucanasas, quitinasas, peroxidasas y otras proteínas relacionadas con la patogénesis (van Loon *et al.*, 2006).

1.3.4 Respuestas de defensa sistémicas

La resistencia sistémica se refiere a la resistencia que ocurre en sitios del hospedante distantes del punto de interacción inicial con un patógeno potencial. Esta resistencia es efectiva contra diferentes patógenos y pueden perdurar durante semanas o meses. Este fenómeno se denomina resistencia sistémica adquirida (SAR, por sus siglas en inglés, Systemic Acquired Resistance) y se relaciona con la activación sistémica de diversas defensas específicas de las plantas, lo que constituye la tercera línea de defensa que puede

proteger a las plantas contra invasiones posteriores (van Loon *et al.*, 2006, Pozo y Azcon-Aguilar, 2007). La respuesta SAR está relacionada con la inducción de proteínas extracelulares relacionadas con la patogenicidad (PR proteínas), en respuesta a la infección local.

1.3.4.1 Proteínas relacionadas con la patogenicidad (PR proteínas)

Las PR proteínas se inducen no solo por la infección con varios tipos de patógenos, sino también en respuesta al tratamiento con elicitores, reguladores del crecimiento de las plantas, por la acción de compuestos metabólicos y diversos agentes químicos (Edreva, 2005; van Loon, 2006; Conrath *et al.*, 2006).

La importancia de estas proteínas en la defensa de las plantas ante el ataque de patógenos está relacionada con sus principales características: son estables a pH ácidos, poseen puntos isoeléctricos extremos, exhiben alta resistencia a la degradación proteolítica, son secretadas al espacio extracelular o confinadas a la vacuola y tienen pesos moleculares relativamente bajos (10 000-40 000 Da) (Stintzi *et al.*, 1993). En la tabla 1 se presenta la clasificación actual de las PR proteínas (van Loon *et al.*, 2006).

Tabla 1. Clasificación de las PR proteínas (van Loon *et al.*, 2006)

Familia	Tipo y miembro	Propiedades
PR-1	Tabaco PR-1a	Antifúngica, 14-17kD
PR-2	Tabaco PR-2	β -1,3-glucanasas
PR-3	Tabaco P, Q	Quitinasa tipo I, II, IV,V, VI, VII
PR-4	Tabaco R	Quitinasa tipo I y II
PR-5	Tabaco S	Proteínas como la taumatina
PR-6	Tomate inhibidor I	Inhibidores de proteasa, 6-13kD
PR-7	Tomate P ₆₀	Endoproteinasas
PR-8	Pepino quitinasa	Quitinasas clase III, quitinasa/lysozima
PR-9	Peroxidasa formadora de lignina (Tabaco)	Peroxidasas
PR-10	Perejil PR-1	Ribonucleasas
PR-11	Quitinasa clase V de tabaco	Quitinasa tipo I
PR-12	Rs-AFP3 de Rábano	Defensina
PR-13	Arabidopsis TH 12.1	Tioninas
PR-14	LTP4 de cebada	Proteína transferidora de lípidos
PR-15	Pimiento	Oxalato oxidasa
PR-16	Pimiento	Proteína como la oxalato oxidasa
PR-17	Tabaco PR p 27	Desconocida

Entre las PR proteínas más estudiadas se encuentran las quitinasas y glucanasas que participan en las respuestas de defensa activas de las plantas contra 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 (Beerhues y Kombrink, 1994). Se ha mostrado que 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* (Schroder *et al.*, 1992; van Loon *et al.*, 2006).

1.4. Características distintivas de la interacción planta hospedante-HMA

1.4.1 Elicitores de HMA

A través de su ciclo de vida los HMA sintetizan moléculas que tienen una estructura similar a elicitores de hongos patógenos. Las paredes de los HMA contienen quitina y quitosana y algunos también β -1,3 glucanos, los cuales son elicitores potenciales de la respuesta de defensa en plantas (Lecourieux *et al.*, 2006). La pared del HMA sufre modificaciones drásticas durante la colonización de la raíz, desde gruesa y estratificada en la hifa externa hasta llegar a amorfa y delgada en los arbusculos. Esta simplificación de la pared del hongo podría ser la fuente de oligosacáridos que inducen la respuesta de defensa en plantas (O'Connell y Panstruga, 2006).

Otros tipos de elicitores podrían ser las ergosteroles y las proteínas. La pared celular de las plantas podrían también ser la fuente de oligosacáridos endógenos sintetizados o liberados durante la invasión intensiva de los espacios intercelulares de la raíz o durante la formación de la interfase simbiótica entre las células corticales y la hifa arbuscular (Gollotte *et al.*, 1996).

Hay al menos dos posibilidades que podrían explicar por qué las respuestas de defensa son inducidas sólo débil y localizadamente en los HMA, a pesar de la existencia de estos elicitores potenciales. En la primera, se plantea que los elicitores fúngicos no están directamente accesible a las células de la planta como ocurre en el caso de los hongos patógenos biotróficos y la segunda se refiere a la longitud y estructura interna de los elicitores oligosacáridicos (Dumas-Gaudot *et al.*, 2000), que particularmente en el caso de los HMA, no es la óptima para la elicitación de respuestas de defensa.

Los HMA poseen un gran número de moléculas superficiales similares a las de los patógenos, incluyendo oligómeros de quitina y glucanos por lo cual actúan como elicitores de respuesta de defensa (Boller, 1995). Estos elicitores son conceptualmente equivalentes a los patrones moleculares asociados a los patógenos (PAMPs) (Nurnberger y Brunner, 2002; Parker, 2003) y se conocen algunos de los receptores responsables de su reconocimiento (Gómez-Gómez y Boller, 2000). Estos elicitores activan una cascada de transducción de señales que incluyen flujo de iones, fosforilación de proteínas, estimulación de proteína G heterotrimérica y síntesis de peróxidos. En última instancia, el reconocimiento de elicitores permite la expresión de genes de defensa de plantas y formación de fitoalexinas.

No obstante, si los HMA tienen PAMPs, es interesante conocer cómo evitan elicitar las respuestas de defensa. Una posibilidad es que las moléculas que actúan como PAMPs en los hongos patógenos son sutilmente diferentes de las de los HMA. Este es el caso de la flagelina de *Rhizobium*, que no induce respuestas de defensa en plantas debido a que la molécula es marginalmente diferente en la parte activa del elicitador (Felix *et al.*, 1999). Alternativamente, los HMA pueden inducir alteraciones en sus células hospedantes que permiten la destrucción de la molécula de elicitador. Por ejemplo, las células de abeto (*Hebeloma crustuliniforme* Bull.) secretan una quitinasa que actúa sobre la molécula de quitina de las paredes celulares de un hongo ectomicorrízico, reduciéndolo a un tamaño que es inactivo y no puede inducir defensa (Salzer *et al.*, 1997; Salzer *et al.*, 1997a).

En *Medicago truncatula* solo se induce un gen específico de quitinasa en raíces micorrizadas que se expresa en las ramificaciones de los arbusculos de la pared celular del hongo donde la quitina es fina y no está polimerizada (Bonfante-Fasolo *et al.*, 1990; Bonfante-Fasolo y Scannerini, 1992; Salzer *et al.*, 2000). En consecuencia, la concentración de oligómeros de quitina, la molécula elicitadora, podría ser parcialmente alta en esta localización. Como la expresión de genes de quitinasa se observa específicamente en células con arbusculos (Bonanomi *et al.*, 2001) es posible que la enzima

desempeñe un papel similar al de las quitinasas en la interacción con abeto e inactive la molécula elicitora señal.

1.4.2 Amplitud de las respuestas de defensa

Las barreras estructurales típicas de defensa tales como papilas o deposiciones de pared que contienen calosa, compuestos fenólicos o lignina no son elicitados durante la respuesta de la planta al interactuar con los HMA. Las modificaciones rápidas de la pared celular, característica de muchas interacciones planta-patógeno, tampoco se observan pero muchas plantas hospedantes muestran reacciones citológicas para la formación del apresorio o primer paso de la colonización por un HMA (Gianinazzi-Pearson *et al.*, 1996).

En esta interacción, en el parénquima cortical está presente el material de la pared que contiene proteína PR-1 y glicoproteínas ricas en hidroxiprolina, depositado de forma transiente alrededor de la hifa que penetra a la célula hospedante para formar los arbusculos. No se acumulan compuestos fenólicos ni calosa y las reacciones en la pared son relativamente débiles comparadas con interacciones planta-patógeno del tipo incompatible (Harrison, 2005; Vierheiling *et al.*, 2008).

En diversos estudios de inducción de respuestas de defensa durante los estadios iniciales de la simbiosis con HMA se demostró que estas declinan o son subsecuentemente reguladas en la medida que la simbiosis se desarrolla (Lambais y Medí, 1993; Gianinazzi-Pearson *et al.*, 1996; Kapulnik *et al.*, 1996; Chabaud *et al.*, 2002; Giovannetti, 2008). En este caso, no se ha informado la muerte celular, que es una de las principales manifestaciones elicitadas por los PAMPs (Schulze-Lefert y Panstruga, 2003), lo indica que la planta reconoce a estos hongos como simbiosiontes.

Hay evidencias de la supresión localizada de respuestas de defensa en raíces de plantas micorrizadas que puede ser mediada por la vía de los arbusculos en raíces. En este sentido, Oommen (1994), señaló que el gen *ifr*, cuyo producto está involucrado en la biosíntesis de una fitoalexina antimicrobiana (medicarpina), se expresa en niveles basales en las células corticales de la raíz, donde los niveles del

transcripto aumentan en los momentos iniciales de la simbiosis y subsecuentemente declinan en la medida que se establece. Hibridaciones *in situ* revelaron que la declinación de los transcritos de *ifr* ocurría en células que contenían arbusculos y en células adyacentes, pero no en regiones no colonizadas de la raíz (Harrison y Dixon, 1993 y 1994). Este patrón de expresión espacial es consecuente con los estudios realizados en los cuales la supresión ocurre en los arbusculos.

En la mayoría de los casos, el tiempo en que comienza la regulación correlaciona bien con el momento en que se inicia el desarrollo de los arbusculos. Teniendo en cuenta que la formación de los arbusculos ocurre a través de la simbiosis, se ha planteado que la supresión potencial de la defensa mediada por estos podría ser continua (Harrison y Dixon, 1993; Lambais y Medí, 1993; Volpin *et al.*, 1995; Breuninger y Requena, 2004). Por otro lado, se ha planteado que es posible que los arbusculos de los HMA secreten proteínas que actúen en la expresión de la supresión de los genes de defensa (Abramovitch y Martín, 2004), como ocurre en el haustorio de los hongos patógenos que secretan una pequeña proteína de avirulencia que actúa dentro de su célula hospedante (Dodds *et al.*, 2004).

1.4.3 Mecanismos para el control de la elicitación y respuestas de defensa en las plantas micorrizadas

Una hipótesis alternativa a la baja inducción de defensa de la planta pudiera ser que los elicitores de HMA inicien una vía de transducción de señales hacia la activación de reacciones de defensa en plantas, las cuales son luego reprimidas tanto por el hongo como por la planta. Esto está sustentado por la observación de un incremento transiente en la expresión de algunos genes de defensa y de sus productos en estados tempranos del establecimiento de la simbiosis, seguido por su represión a un nivel igual o por debajo al control no inoculado (Gao *et al.*, 2004), ejemplo actividad quitinasa y peroxidasa de isoflavona reductasa, fenilalanina-amonioliasa, chalcona isomerasa y genes de endoquitinasa (Barrer y Tagu, 2000; Salzer y Boller, 2000; Gao *et al.*, 2004).

Estudios de mutantes de guisantes (Myc-) demuestran qué genes de plantas pueden estar involucrados en la inhibición de reacciones de defensa, al menos durante el primer paso del establecimiento de la simbiosis micorrízica (Harrison, 2005). Una hipótesis para explicar este control, así como su represión en la simbiosis funcional está relacionada con los genes *sym* o sus productos, los que pudieran actuar como receptores para el factor de compatibilidad fúngico (Harrison, 2005; Giovannetti, 2008). Esta hipótesis podría explicar la regulación *downstream* de los genes que codifican para la PR1a y la quitinasa básica durante el desarrollo micorrízico en plantas que sobreexpresan estos genes relacionados con la patogénesis (Dumas-Gaudot *et al.*, 2000).

1.4.3.1 Metabolismo de los fenilpropanoides

El metabolismo de los fenilpropanoides es de tipo secundario e incluye biosíntesis de flavonoides que puede ser alterado en interacciones típicas micorrízicas, pero mucho menos intenso que en interacciones planta-patógeno (Harrison y Dixon, 1994; Morandi, 1996; Mohr *et al.*, 1998).

En varios trabajos se describen diferencias en la expresión temporal de los niveles de transcripción y en la actividad dependiendo de la enzima considerada y la combinación planta-HMA (Gianinazzi-Pearson *et al.*, 1996; Kapulnik *et al.*, 1996; Chabaud *et al.*, 2002).

Contrario a la situación que ocurre en la interacción planta-patógeno, el tiempo en que se activan las enzimas sucesivas de la vía de los fenilpropanoides también varía y las diferentes enzimas a menudo muestran un patrón descoordinado de expresión. Además, no se informa la ocurrencia de elicitación temprana y la mayoría de las alteraciones, tanto en transcriptos como en enzimas, aparecen en etapas tardías de la simbiosis (Wojtaszek, 1997).

1.4.3.2 Proteínas relacionadas con la patogénesis e isoformas de enzimas hidrolíticas

Genes relacionados con la patogénesis y las proteínas que codifican estos genes se informan en varias simbiosis con micorrizas arbusculares (Pozo *et al.*, 2002; Gao *et al.*, 2004; Harrison, 2005). Muchas de estas investigaciones muestran que cuando la respuesta de defensa del hospedante ocurre durante

una interacción compatible con hongos micorrizógenos, esta es débil, transiente, descoordinada y frecuentemente muy localizada.

El estudio de enzimas hidrolíticas inducidas por la defensa en simbiosis con micorrizas arbusculares reveló la activación de isoformas de estas enzimas las cuales pueden ser fácilmente distinguidas de aquellas elicidadas por patógenos. Aunque no se ha demostrado un papel directo de las isoformas de quitinasa en la señalización de la planta, los resultados muestran que esta enzima está involucrada en la formación/degradación de arbusculos, pues no son inducidas por químicos u otros microorganismos del suelo (Slezack, 2001; Dassi *et al.*, 1998) y no son detectadas en guisantes que tienen mutado su capacidad para formar micorrizas y desarrollar arbusculos (Duijff, 1998; Dumas-Gaudot, 1994). Además, cuando la formación del arbusculo se inhibe en plantas tratadas con ácido giberélico, no se observa la elicitación de isoformas de quitinasa relacionadas con la simbiosis (Dumas-Gaudot, 1996), mientras que las formas constitutivas permanecen sin afectación (Shirtliffe y Vassey, 1996).

La quitina de la pared de los arbusculos está en un estado no cristalino sensible a la acción de las quitinasas (Mosse, 1959), por lo que se supone que estas quitinasas relacionadas con la simbiosis micorrízica regulan el desarrollo de los arbusculos.

1.4.4 Cambios en la señalización de las vías del ácido jasmónico y el ácido salicílico en plantas micorrizadas

Como biotrofos obligados, los HMA comparten similitudes con los patógenos biotrofos (Guimil *et al.*, 2005; Pazskowski, 2006), por lo que su sensibilidad a las respuestas defensivas reguladas por el ácido salicílico (AS) está disminuida y su acumulación es baja y transitoria durante las primeras etapas de esta interacción (García-Garrido y O'Campo, 2002; Liu *et al.*, 2003). En este sentido, es posible que los HMA repriman las respuestas defensivas dependientes de AS en la planta hospedante para lograr una interacción compatible (Pozo y Azcón-Aguilar, 2007), por lo que se ha observado un incremento

en las respuestas moduladas por el ácido jasmónico (JA), no solo a nivel de la planta micorrizada, sino también en las células que contienen arbusculos (Hause *et al.*, 2007).

1.5 Manejo de los HMA en la agricultura y su contribución en la bioprotección de las plantas contra patógenos

La agricultura moderna se esfuerza en reducir el empleo de los pesticidas sintéticos y optimizar el uso de alternativas biológicas para el manejo de los patógenos (Hernández *et al.*, 2009, Rives *et al.*, 2009).

Los HMA constituyen un elemento a tener en cuenta, pues este biofertilizante es particularmente importante en los sistemas de cultivos orgánicos y/o sostenibles que emplean más los procesos biológicos que los agroquímicos para el control de las enfermedades en las plantas.

Se conoce la influencia positiva de los HMA en la estimulación del crecimiento y en la productividad de las plantas en cultivos de importancia económica (Fernández *et al.*, 2006; Terry *et al.*, 2005; Rivera *et al.*, 2007). Entre los principales mecanismos involucrados en los efectos beneficiosos obtenidos se destacan el aumento de las capacidades nutricionales del cultivo (P, N, K, Ca, Mg y micronutrientes) y de la tolerancia de la planta a la sequía; además de encauzar el efecto beneficioso de otros microorganismos rizoféricos y contribuir a la formación de agregados en el suelo que contrarrestan los efectos de la erosión y estabilizan el funcionamiento ecológico y la productividad de los ecosistemas (Rivera *et al.*, 2007).

Además, estos hongos contribuyen a la reducción de enfermedades provocadas por diversos patógenos del suelo, entre los que se encuentran grupos de hongos (Pozo *et al.*, 2002; Harrier *et al.*, 2004; Fritz *et al.*, 2006) y nemátodos (Diedhiou *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2006). Así se ha demostrado que los HMA favorecen la protección contra especies de *Aphanomyces*, *Cylindrocladium*, *Fusarium*, *Macrophomina*, *Pythium*, *Rhizoctonia*, *Sclerotium*, *Verticillium* y *Thielaviopsis*, (Lingua *et al.*, 2002; Harrier *et al.*, 2004).

Con relación al empleo de las micorrizas en la protección de las plantas contra las afectaciones causadas por el género *Phytophthora*, diversos autores describen la interacción de cepas de HMA con estos patógenos, los que informan reducción de las enfermedades (Cordier *et al.*, 1996, 1998; Dugassa *et al.*, 1996; Jaizme-Vega *et al.*, 1997). También se ha informado el efecto *G. intraradices* sobre *Fusarium oxysporum* en plantas de *Dianthus caryophyllus* y *Tajetes patula* con reducción de los síntomas de la enfermedad y el decrecimiento de los propágulos en el suelo (St-Arnaud *et al.*, 1997). Resultados similares se observaron por Dugassa *et al.* (1996) al estudiar la misma especie de HMA y de hongo fitopatógeno en *Linum usitatissimum*.

García-Garrido y Ocampo (2002) informaron que la micorrización con *G. mosseae* protegió a plantas de tomates frente al ataque de la bacteria *Erwinia carotovora*, 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* (Nagesh y Parvatha, 2004; Gómez y Rodríguez., 2005; Li *et al.*, 2006). En el cultivo del tomate se relacionó la reducción del índice de la enfermedad causada por *P. parasitica* y la inducción de proteínas del grupo de las PRs por *Glomus mosseae* (Pozo *et al.*, 2002). Zheng *et al.* (2005) determinaron que la micorrización con *G. intraradices* produjo la reducción en un 10% de la enfermedad causada por *Phytophthora capsici* en plantas de pimiento (*Capsicum annuum* L.) con un incremento en la actividad de la enzima peroxidasa.

Sin embargo, existen pocos estudios relacionados con la bioprotección de plantas micorrizadas contra patógenos foliares. Harrier *et al.* (2004) y Fritz *et al.* (2006) observaron que *Glomus* sp. protege las plantas de tomate contra *Alternaria solani*. Sin embargo, Dugassa *et al.* (1996) encontraron que la micorrización de plantas de tomate con *G. intraradices* incrementó la afectación por *Oidium lini*.

En general, existe información acerca del empleo de los HMA en la bioprotección contra diferentes grupos de patógenos, especialmente los que afectan las raíces, por lo que este tipo de biofertilizante

constituye una alternativa ambientalmente segura, que puede ser de gran utilidad en la agricultura, sin embargo, son escasos los informes del efecto o influencia en la inducción de bioprotección por diferentes cepas de HMA en una condición de sustrato específica, si se considera que las especies y cepas de HMA se asocian de forma diferencial en dependencia de las condiciones de fertilidad de los suelos (Rivera *et al.*, 2007).

En Cuba, en el INCA, durante más de 15 años se han desarrollado investigaciones relacionadas con el uso y manejo de los HMA en diferentes agroecosistemas, cuyos resultados brindan importantes aportes en el uso y manejo de este biofertilizante en diferentes cultivos a nivel de invernadero y campo (Fernández *et al.*, 1999; Terry, 2001; Pulido *et al.*, 2003; Fernández *et al.*, 2002; Rodríguez *et al.*, 2006).

II- MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se empleó plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) de la variedad Amalia, obtenida por el Departamento de Genética y Mejoramiento del Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA) (Álvarez *et al.*, 2004).

Hongos micorrízicos arbusculares (HMA)

Se emplearon las cepas de HMA *Glomus mosseae* (Nicolson & Schenck), *G. hoi-like* (Walker & Koske), *G. claroideum* (Gerdeman & Trappe) y *Acaulospora scrobiculata* (Trappe). Las cuatro cepas proceden del Ceparío del Laboratorio de Micorrizas del Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA), San José de las Lajas, La Habana, y nombradas como, INCAM-2, INCAM-4, INCAM-8, INCAM-10, respectivamente. Las especies se encontraban conservadas en un sustrato desarrollado para estos fines por el Laboratorio de Micorrizas del INCA (Registro de patente No.2264) a 4°C. Los inóculos de HMA utilizados en los experimentos poseían una concentración promedio de 50 esporas.g⁻¹ de sustrato, certificado en el Laboratorio de Micorrizas del INCA, e inoculados mediante recubrimiento de semilla (Fernández *et al.*, 2000).

Condiciones experimentales

En todos los casos, los experimentos se realizaron en el período septiembre-marzo de los años 2001 al 2003, por ser la época más propicia para este cultivo. Se desarrollaron en bandejas de 10 kg de capacidad, excepto el experimento descrito en el epígrafe 2.4, con un sustrato esterilizado por calor seco conformado por una mezcla de suelo Ferralítico Rojo lixiviado típico (WRB, 2006) y humus de lombriz en relación 3:1 (p/p). Las características agroquímicas del sustrato empleado se muestran en la Tabla 2.

Las plantas se desarrollaron en condiciones semicontroladas de temperatura (23°C ± 2°C), humedad relativa (80-85%) y fotoperíodo natural (14 horas luz- 10 horas oscuridad). Los experimentos se ejecutaron en condiciones de casa de cristal en las áreas del Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), San José de las Lajas, La Habana, Cuba. El esquema experimental desarrollado se presenta en la Figura 2.

Tabla 2. Características agroquímicas del sustrato

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

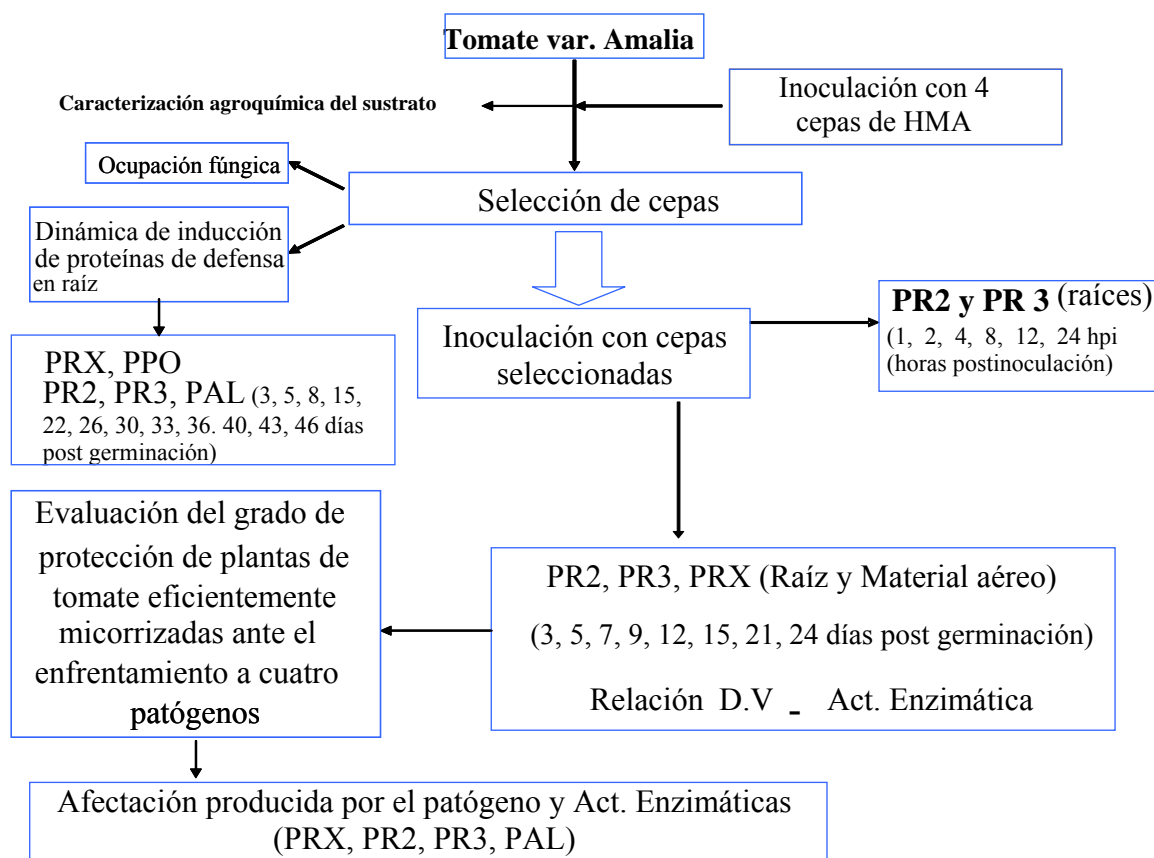


Figura 2. Esquema del trabajo experimental utilizado en la tesis

Los tratamientos desarrollados en cada uno de los bioensayos se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Tratamientos establecidos en los experimentos desarrollados

Experimento 2.1	Experimentos 2.2 y 2.3	Experimento 2.4		
Control	Control	1.Control (C)	6.C+P 3	11.M1+P 4
<i>Glomus mosseae</i>	<i>G. mosseae</i>	2. <i>G. mosseae</i> (M1)	7.C+P 4	12.M2+P1
<i>G. hoi-like</i>	<i>G. hoi-like</i>	3. <i>G. hoi-like</i> (M2)	8.M1+ P 1	13.M2+P2
<i>G. claroideum</i>		4.C+P 1	9.M1+ P 2	14.M2+P3
<i>Acaulospora scrobiculata</i>		5.C+P 2	10.M1+P 3	15.M2+P4
Leyenda: P (Patógeno) 1: <i>P. infestans</i> , P 2: <i>P. parasitica</i> , P 3: <i>A.solani</i> , P 4: <i>Oidipsis taurica</i>				

2.1 Selección de cepas de hongos micorrízicos arbusculares (HMA)

Se inocularon semillas de la variedad Amalia con las diferentes cepas (Tabla 3) por el método de recubrimiento de semillas, mencionado anteriormente. Se determinó la ocupación fúngica y la dinámica de inducción de PRs y otras enzimas relacionadas con la defensa en las raíces de las plantas. Para ello se realizó una dinámica de inducción de la actividad de cinco sistemas enzimáticos en raíces de las plantas y se evaluaron a los 3, 5, 8, 15, 22, 26, 30, 33, 36, 40, 43 y 46 días posteriores a la germinación de las plantas.

Las muestras se conformaron con al menos 10 plantas de forma aleatoria de cada tratamiento (cada bandeja conformaba un tratamiento con 150 plantas y estaba repetido tres veces), sus raíces se lavaron en agua corriente para eliminar los restos del sustrato, se secaron con papel de filtro para eliminar los excesos de agua y se pesaron en balanza técnica (OWA Labor) hasta completar un gramo de masa fresca como mínimo.

2.1.1 Análisis de la ocupación fúngica

Se conformó una muestra de raíces de al menos 10 plantas al azar por tratamiento. Estas se secaron a 70°C y se tiñeron con Tripán azul (Phillips y Hayman, 1972). Se evaluó el porcentaje de colonización por el método de los interceptos (Grid line intersect) de Giovanetti y Mosse (1980), y se calculó mediante la siguiente fórmula:

$\% C = \frac{\sum Z}{Z_1 - Z_5}$, donde Z: No. de interceptos micorrizados.

En todos los experimentos se calculó la ocupación fúngica (D.V) mediante el método descrito por Trouvelot *et al.* (1986) y se calculó mediante la fórmula que se expresa a continuación:

$\% DV = \frac{\sum A}{\sum Z} (100)$

donde $\sum A$: resulta de multiplicar el número de raicillas observadas en cada nivel, (desde uno hasta cinco), por el porcentaje de ocupación observado que es un valor fijo informado por el autor (Tabla 4) y $\sum Z$ es la cantidad de raicillas contadas (100).

Tabla 4. Transformación de los porcentajes de ocupación fúngica en niveles, según Trouvelot *et al.* (1986).

Nivel de evaluación (Z)	0	1	2	3	4	5
% de ocupación observada	0	1	2,5	15,5	35,5	47,5

2.1.2 Dinámica de la inducción de actividad enzimática en raíces de plantas de tomate inoculadas con diferentes HMA

Extracción de enzimas y determinación de las actividades enzimáticas

Las muestras de raíces y hojas se maceraron en nitrógeno líquido de forma independiente y se homogenizó en proporción 1:2 (g.mL⁻¹), con solución amortiguadora de extracción (acetato de Sodio, 0,1 M, pH 5,2; que contenía 5g de polivinilpirrolidona y 0,05g de β- mercaptoetanol, en 100 mL de solución de extracción). El homogenato se agitó en zaranda durante 45 minutos, en baño de hielo. Posteriormente se filtró y se centrifugó a 14 000 x G, a 4°C durante 25 minutos, en centrífuga refrigerada (Beckman, modelo J2-21). El sobrenadante se almacenó a -20°C hasta su uso, para las determinaciones de la actividad enzimática y la concentración de proteínas.

La concentración de proteínas se determinó por el método descrito por Bradford (1976). La lectura de la absorbancia se realizó a 595 nm en espectrofotómetro (Ultrospec Plus Spectrophotometer,

Pharmacia LKB), para lo que se realizó una curva patrón de seroalbúmina bovina (BSA) a partir de una solución madre de 1mg.mL^{-1} . La curva patrón se realizó utilizando 10 concentraciones de esta solución madre entre $0,05\text{-}0,5\text{ mg.mL}^{-1}$.

Los procedimientos de determinación de las actividades enzimáticas fueron estandarizados previamente para las condiciones de ensayo (Solórzano, 2001), determinándose para cada caso: concentración de sustrato y de preparado enzimático óptimos y condiciones de temperatura, pH y períodos de incubación adecuados. Las determinaciones enzimáticas se realizaron en espectrofotómetro (Ultrospec Plus Spectrophotometer, Pharmacia LKB).

Actividad peroxidasa (PRX) (Clasificación enzimática (E.C) 1.11.1.7): Se realizó según el método continuo descrito por Fric (1976). Como sustratos se emplearon guayacol y peróxido de hidrógeno y como solución amortiguadora acetato de Sodio, $0,1\text{M}$, pH 5,2. La velocidad de oxidación del guayacol se determinó en espectrofotómetro, registrándose los valores de absorbancia a 470 nm . Se tomó la variación de la absorbancia, durante dos minutos a intervalos de 10 segundos. El cálculo de actividad enzimática se realizó multiplicando la variación de la absorbancia en el intervalo de tiempo por el volumen final del ensayo y por la dilución de la enzima y dividiendo este producto entre el coeficiente de extinción molar del guayacol multiplicado por el volumen de enzima empleado en el ensayo. La actividad se expresó como $\mu\text{moles de producto formado.min}^{-1}.\text{mL}^{-1}$ de enzima.

Actividad polifenoloxidasas (PPO) (E.C. 1.10.3.1 y 1.10.3.2): Se determinó a través del método continuo descrito por Alexander (1964), empleando como solución amortiguadora fosfato de Sodio $0,1\text{M}$, pH 6,8, y como sustrato pirogalol $0,3\%$, y se leyó la velocidad de oxidación del sustrato a 420 nm . La variación de absorbancia se registró durante dos minutos a intervalos de 10 segundos. La actividad se calculó de forma similar a la actividad de PRX y se expresó como la variación de la absorbancia en el intervalo de tiempo. $\text{min}^{-1}.\text{mL}^{-1}$ de enzima, dado que no se conoce el coeficiente de extinción molar del pirogalol.

Actividad quitinasa (PR3) (E.C. 3.2.1.14): Se empleó el método colorimétrico discontinuo descrito por Boller *et al.* (1983). El sustrato utilizado fue la quitina coloidal obtenida a partir de la quitina calidad reactivo (Fluka) y como solución amortiguadora se utilizó al tetraborato de Sodio, $0,8\text{ M}$, pH 9,1. La absorbancia se leyó a 585 nm en espectrofotómetro. La curva patrón se realizó empleando n-acetil-glucosamina a concentraciones de $10\text{ a }500\ \mu\text{g.mL}^{-1}$. Los cálculos de actividad se realizaron multiplicando la absorbancia de la muestra por la cotangente de la curva patrón por el volumen final del ensayo y por la dilución de la enzima y dividiendo este producto entre el tiempo de incubación del ensayo multiplicado por el volumen de enzima empleado. La actividad se expresó en $\mu\text{moles de producto formado. min}^{-1}.\text{mL}^{-1}$ de enzima.

Actividad β 1-3 glucanasa (PR2) (E.C. 3.2.1.39): Se procedió según el método discontinuo y colorimétrico propuesto por Dangrois *et al.* (1990) y Dangrois *et al.* (1992), que utiliza laminarina (β -1,3 glucano) como sustrato y acetato de Sodio, 50mM, pH 5,2, como solución amortiguadora. La velocidad de la reacción se calculó a partir de las lecturas de absorbancia a 660 nm, determinando los azúcares reductores producidos (Somogyi y Nelson, 1952). Se utilizaron concentraciones variables de glucosa para realizar la curva patrón (entre 0,086 y 2,78 μ moles.mL⁻¹) a partir de una solución de 1mg.mL⁻¹. Los cálculos de actividad se realizaron multiplicando la absorbancia de la muestra por la cotangente de la curva patrón por el volumen final del ensayo y por la dilución de la enzima y dividiendo este producto entre el tiempo de incubación del ensayo multiplicado por el volumen de enzima empleado. La actividad se expresó en μ moles de producto formado. min⁻¹.mL⁻¹ de enzima.

Actividad fenilalanina amonioliasa (PAL) (E.C. 4.3.1.5): Se empleó el método discontinuo propuesto por Nagarotna *et al.* (1993), el que utiliza como sustrato fenilalanina y borato de Sodio 0,1M, pH 8,8 como solución amortiguadora. La actividad enzimática se calculó a partir de las lecturas de absorbancia a 275 nm, determinándose la producción de ácido cinámico y se expresó como μ moles de producto formado.min⁻¹.mL⁻¹ enzima, para lo que se empleó una curva patrón de ácido cinámico en un rango de concentraciones de 0,01 a 0,55 mg.mL⁻¹ y el cálculo de actividad se realizó según la expresión presentada en el epígrafe anterior.

Para el cálculo de la actividad específica de cada enzima se procedió a dividir los valores de actividad enzimática obtenidos entre la concentración de proteínas de cada muestra.

2.2 Dinámica de inducción temporal y local de PR 2 y PR 3 en plantas micorrizadas con las cepas seleccionadas

Se sembraron las semillas en el sustrato presentado en la Tabla 2 y se mantuvieron en las condiciones antes descritas. El día 21 después de la germinación se inocularon las plantas en la zona de las raíces con los HMA seleccionados, en forma líquida, utilizando una suspensión de esporas (10^5 esporas.mL⁻¹) en una solución protegida osmóticamente (Solicitud de Patente Nacional, OCPI 2004-0272). Las muestras de raíces se tomaron a las 1, 2, 4, 8, 12, 18, 24 y 48 horas, después de la inoculación (hpi) de la suspensión y se determinó la inducción de PR2 y PR3 por las metodologías descritas en 2.1.2.

2.3 Estudio de la inducción temporal, local y sistémica de PRs en plantas de tomate inoculadas con las cepas de HMA seleccionadas

Para evaluar la inducción temporal, local y sistémica de PR proteínas de las plantas micorrizadas con las cepas seleccionadas en el epígrafe 2.1, se recubrieron las semillas con los biopreparados correspondientes y se realizó una dinámica de inducción de actividad enzimática de PRX, PR2 y PR3 en raíz y hojas de las plantas bajo tratamiento a los 3, 5, 7, 9, 12, 15, 18, 21 y 24 días posteriores a la germinación.

2.3.1 Dinámica de colonización y ocupación fúngica de las plantas

Se realizó según lo descrito en el epígrafe 2.1.1

2.3.2 Masa fresca de la raíz y foliar de plantas de tomate

Se determinó la masa fresca de raíz y foliar a 5 plantas por tratamiento como indicador del crecimiento de las plantas, a los días 21 y 24 después de la germinación. Para ello las plantas de cada tratamiento se lavaron con agua corriente para eliminar los restos de sustrato y se secaron con papel de filtro para eliminar los excesos de agua. Se separaron las raíces y la parte foliar de cada planta y se pesaron las muestras de forma independiente en balanza técnica (OWA Labor).

2.3.3 Dinámica de la inducción de PRs en raíz y hojas

Se realizó la dinámica de inducción de PR2, PR3 y PRX en raíces y hojas de plantas inoculadas con las cepas seleccionadas en el experimento descrito en el epígrafe 2.1, según las metodologías descritas en el epígrafe 2.1.2

2.4 Efecto de los HMA seleccionados sobre la severidad de las enfermedades causadas por *Phytophthora nicotianae*, *P. infestans*, *Alternaria solani* y *Oidiopsis taurica*

Para evaluar la respuesta de las plantas micorrizadas con las cepas promisorias frente al ataque de los patógenos seleccionados, se sembraron plantas de tomate de la variedad Amalia en macetas plásticas de 1 kg de capacidad y se utilizó el sustrato descrito en la Tabla 2. Las cepas de HMA fueron inoculadas por el método de recubrimiento de semillas (Fernández *et al.*, 2000).

2.4.1 Ocupación fúngica

Se determinaron los porcentajes de colonización e intensidad de la ocupación fúngica (D.V) de las plantas en el día 21 y 24 después de la germinación según la metodología descrita en el epígrafe 2.1.1.

2.4.2 Evaluación de la severidad de los daños producidos por microorganismos patógenos de la raíz

Los experimentos se realizaron en condiciones de casa de cultivo en el período de enero a marzo de los años 2003, 2004 y 2005. Se seleccionaron como patógenos de la raíz a *Phytophthora nicotianae* Dastur cepa T8 y a *P. infestans* cepa 227, procedentes de la Colección de Cultivos del Instituto de Investigaciones de Tabaco (Toledo, 2003), aisladas de tomate y crecidas en Agar Harina de maíz (Biocen). Las suspensiones de los microorganismos fitopatógenos se obtuvieron de colonias crecidas por 15 días en placas de Petri con Agar Harina de maíz (Biocen). A las placas se les añadió 20 mL de agua destilada estéril y se colectó el micelio con una espátula de Drigalski. Se dejó reposar a 4°C durante 20-30 minutos para la liberación de las zoosporas. Se ajustó la concentración a 10^5 zoosporas mL⁻¹ por conteo en cámara de Neubauer bajo microscopio óptico. La inoculación se realizó en plantas de 21 días de edad, aplicándose el microorganismo patógeno en la zona de la raíz a razón de 5 mL.planta⁻¹.

Se establecieron los tratamientos descritos en la Tabla 3, a razón de tres macetas por tratamiento con tres plantas cada uno. Las plantas se separaron espacialmente en tres grupos, uno para cada patógeno y otro para las plantas sin inocular (control). Posterior a la inoculación, las plantas se mantuvieron en cámaras húmedas cerrada con nylon por 48 horas para favorecer el establecimiento de los patógenos (Hernández *et al.*, 2004). A los cinco días posteriores a la inoculación se evaluaron los síntomas y signos de las enfermedades causadas por los patógenos. La severidad de la enfermedad se evaluó mediante la medición del grado de marchitez en cada planta, según la escala descrita por Pozo *et al.* (2002). Se determinaron los valores promedios de infección por patógenos para cada tratamiento.

2.4.3 Actividades enzimáticas detectadas en las plantas frente al ataque de los microorganismos patógenos de raíz

En las mismas plantas evaluadas para el grado de afectación del patógeno, se realizó el muestreo para las determinaciones de actividad de PRs y proteínas, en tejido foliar y de raíz, según metodologías descritas en el epígrafe 2.1.1.

2.4.4 Análisis de componentes principales en la interacción planta-patógenos de raíz-HMA

Se desarrolló un Análisis Multivariado de Componentes Principales para determinar la influencia de los patógenos en 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®.

2.4.5 Evaluación de la severidad de los daños producidos por los microorganismos patógenos de acción foliar

Se seleccionaron como patógenos foliares a *Alternaria solani* (Sor) cepa 100, procedente de la Colección de Cultivos del Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria, previamente descrita por Pérez (2003), y un aislamiento natural de *O. taurica*, mantenido sobre plántulas de tomate. El inóculo de *O. taurica* se colectó de plantas de tomate var. Amalia infectadas que se mantenían en condiciones de crecimiento a $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, humedad relativa de 70% y fotoperíodo natural. Las esporas se colectaron por lavado con agua destilada estéril de hojas infectadas para preparar un inóculo que se ajustó a 2×10^4 esporas $\cdot \text{mL}^{-1}$, según recomienda Lindhout *et al.* (1994) y se asperjaron sobre las hojas de las plantas de tomate var. Amalia previamente micorrizadas. *A. solani* se creció en medio Papa Dextrosa Agar (Biocen) y se determinó la concentración celular (UFC) en cámara de Neubauer bajo el microscopio óptico, con el ajuste de la concentración de la suspensión a 10^3 u.f.c.mL⁻¹. La inoculación se realizó por aspersión foliar y las condiciones experimentales así como el número de plantas inoculadas fueron similares a las descritas en el epígrafe 2.4.2.

Se evaluó el porcentaje de necrosis foliar por hoja, calculándose el promedio de las mediciones en todas las hojas de cada planta. Los datos fueron transformados según la escala informada por

Schaefer *et al.* (2005). Para el caso de *O. taurica* los valores corresponden a los años 2003 y 2004, mientras que para *A. solani* corresponden a los años 2003, 2004 y 2005.

2.4.6 Actividades enzimáticas detectadas en las plantas frente a los patógenos de foliares

Se procedió según lo descrito en el epígrafe 2.4.4.

Diseño experimental y análisis estadístico de los datos

Los experimentos se desarrollaron siguiendo un diseño completamente aleatorizado con tres repeticiones y se reprodujeron en tres momentos diferentes, para el caso de los experimentos descritos en los epígrafes 2.1 y 2.4 y en dos, para los descritos en 2.2 y 2.3.

Se emplearon técnicas paramétricas y no paramétricas en función de la variable analizada. En el caso de la colonización micorrízica se transformaron los datos de % de colonización micorrízica a $2\text{arc sen } \sqrt{\%}$ para el análisis estadístico, según correspondiera.

Se calculó el intervalo de confianza de la media al 95% de probabilidad, atendiendo al número de repeticiones y la reproducibilidad de los datos, utilizando el programa STATISTIC versión 6.1.

En la evaluación de la intensidad de la enfermedad los datos fueron analizados usando la prueba no paramétrica de comparación múltiple de Kruskal Wallis completado por la prueba de comparación de Mann-Whitney y la correspondiente corrección de Bonferroni (Dayton y Schafer, 1973), utilizando el programa STATISTIC versión 6.1.

III- RESULTADOS

3.1. Selección de cepas de dos géneros de hongos micorrízicos arbusculares (HMA)

3.1.1. Análisis de la ocupación fúngica de las plantas

En la Figura 3 se muestran los porcentajes de densidad visual (% D.V.) en los tratamientos evaluados, lo que refleja la ocupación fúngica de las plantas. En todos los casos los porcentajes de densidad visual aumentaron con el desarrollo de las plantas hasta los 40 días después de la germinación. Se observó una disminución hacia los 46 días.

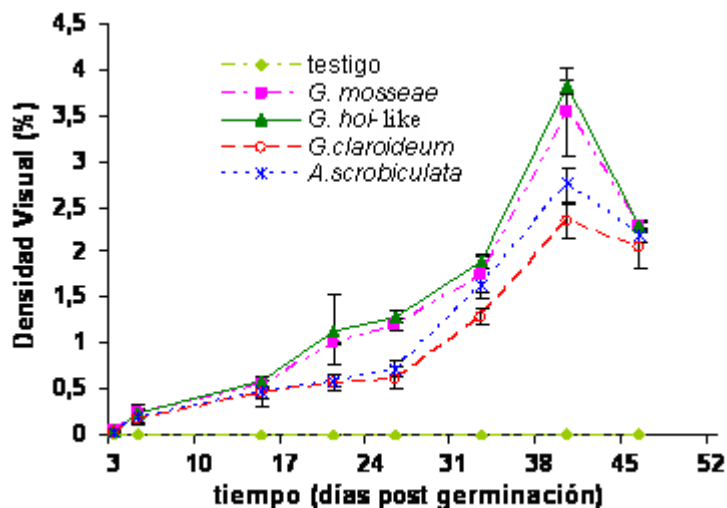


Figura 3. Porcentajes de densidad visual (%D.V.) en raíces de plantas de tomate inoculadas con cuatro cepas de HMA. Las barras representan los intervalos de confianza de la media para cada punto ($p \leq 0.05$), ($n=3$).

En general, todas las plantas inoculadas presentaron valores de ocupación fúngica superiores a 2,3 % a los 40 y 46 días posteriores a la germinación (dpg). Los mayores valores de D.V. correspondieron a los tratamientos inoculados con *G. hoi-like* y *G. mosseae* a los 40 días, con diferencias estadísticamente significativas con el resto de los tratamientos en estudio. Se debe destacar que estas diferencias se observaron desde los 21 días. Esta variable refleja la intensidad de la ocupación fúngica en el interior de la raíces, lo que indica que estas especies son las que mostraron mejor interacción con las plantas en las condiciones en que se desarrolló el experimento. Este resultado podría estar determinado por la especificidad que se establece entre el tipo de sustrato en que se desarrolla el experimento y el hongo formador de micorriza arbuscular.

En todos los casos se apreció una disminución de las estructuras fúngicas en la etapa final del experimento (46 días), que se relaciona con la fase de floración masiva de la planta y que puede estar vinculada con la necesidad de ésta de restringir el flujo de fotosintatos hacia el hongo.

3.1.2. Dinámica de la inducción de la actividad enzimática en raíces de plantas de tomate inoculadas con diferentes HMA

Actividad de la enzima Peroxidasa (PRX)

La dinámica de inducción de enzimas peroxidasa en raíces de plantas micorrizadas con las cuatro cepas en estudio se presenta en la Figura 4. Se aprecian dos máximos de actividad, el primero entre los días cinco y ocho, y el segundo a los 30 días, excepto para *G. hoi-like* que se desplazó hacia el día 33.

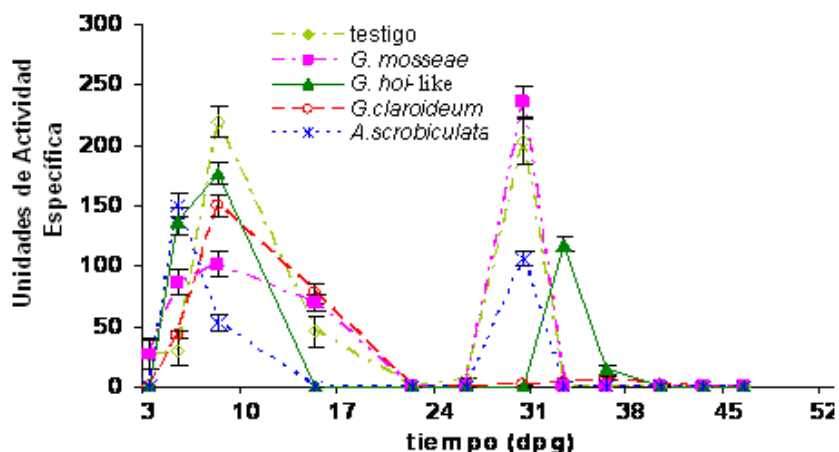


Figura 4. Dinámica de la inducción de la actividad de la enzima Peroxidasa en raíces de plantas de tomate inoculadas con diferentes HMA. Las barras de error representan los intervalos de confianza de la media para cada punto ($p \leq 0.05$), ($n = 9$).

Al relacionar las dinámicas de ocupación fúngica y de actividad enzimática (Figuras 3 y 4), se demuestra que las plantas al inicio de la micorrización reconocen a estos hongos como patógenos con el correspondiente incremento de la actividad de la enzima. Posteriormente, se observa depresión de la actividad enzimática, lo que manifiesta el comienzo de una nueva fase en la que las plantas reconocen a los HMA como simbiosites, con incrementos de los niveles de ocupación fúngica. Este comportamiento se mantiene de forma irreversible, aún cuando se promueve un incremento de la actividad de la enzima en etapas posteriores del desarrollo de la planta. Se destaca el tratamiento con *G. hoi-like* donde este incremento se presenta de forma más tardía y en menor grado, en comparación con el resto de las cepas de HMA estudiadas.

Se debe resaltar además, que al inicio de la dinámica la inducción enzimática observada para *G. mosseae* presentó los niveles más bajos de actividad en comparación con el resto de las cepas. Esta baja actividad al inicio pudiera contribuir al establecimiento de la cepa con niveles de ocupación fúngica superiores a los encontrados para *G. claroideum* y *A. scrobiculata*.

Actividad de la enzima Polifenoloxidasasa (PPO)

La actividad PPO en raíces mostró tres máximos de actividad para las especies estudiadas (Figura 5). El primero aparece en el día ocho para casi todas las especies, excepto para *G. claroideum* y *G. mosseae* que lo alcanzan en el día 15 después de la germinación. El segundo máximo de inducción aparece en el día 30 y un tercero a los 43 días.

Teniendo en cuenta los altos valores de actividad enzimática en los primeros días de la dinámica, no se debían esperar valores altos de ocupación fúngica en esta etapa, lo que se corrobora con los valores de D.V. encontrados. Debe destacarse que este aumento es transitorio para el caso de la especie *G. hoi-like* en la que se observa que en el día 15 los valores disminuyen hasta ser indetectables, mediante la técnica experimental empleada. Sin embargo, la colonización de las plantas por todas las especies incluidas en el experimento se aprecia de forma significativa al compararse con el control sin inocular, por lo que se infiere que la disminución temporal de los niveles de actividad en todos los casos permitió el avance de la colonización (Figura 3). Este aumento puede relacionarse con el crecimiento masivo de las plantas y la toma de Fósforo que demanda esta etapa.

A los 30 días se observa un incremento significativo de la actividad de la PPO en las plantas sin inocular, que podría estar relacionado con la asimilación de Fósforo, proceso en el que interviene esta enzima. Este incremento resultó menor en las plantas micorrizadas, lo que podría estar dado porque el proceso de asimilación de este elemento ocurre por el micelio extramático de las micorrizas y las plantas en este estado economizan sus funciones, no así en las plantas control que como se observa provocan un máximo de inducción superior a las plantas micorrizadas.

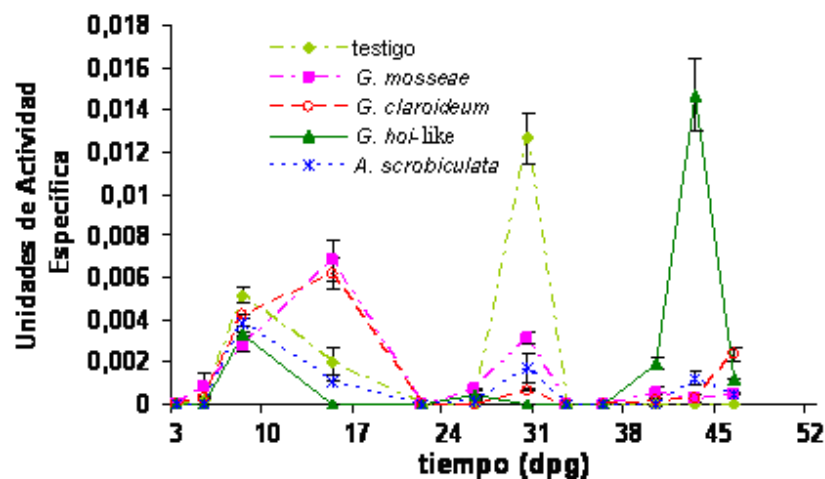


Fig. 5. Dinámica de la inducción de la actividad de la enzima Polifenoloxidasasa en la interacción tomate-HMA. Las barras de error representan los intervalos de confianza de la media para cada punto ($p \leq 0.05$), ($6 \leq n \leq 9$).

Hacia los finales de la dinámica se observa un incremento de la actividad enzimática que podría estar relacionada con los procesos de floración masiva, al igual que ocurre con la enzima peroxidasa, y se puede relacionar con la disminución de la ocupación fúngica y las demandas de Fósforo por las plantas.

Actividad de la enzima Quitinasa (PR3)

En la Figura 6 se muestra el comportamiento de la enzima quitinasa en la interacción de plantas de tomate var. Amalia con diferentes cepas de HMA. La dinámica presenta un comportamiento similar para todas las cepas estudiadas. Se observan diferencias significativas a los 40 días, cuando se presentó un máximo de activación en las plantas inoculadas con las cepas *G. hoi-like* y *G. claroideum*.

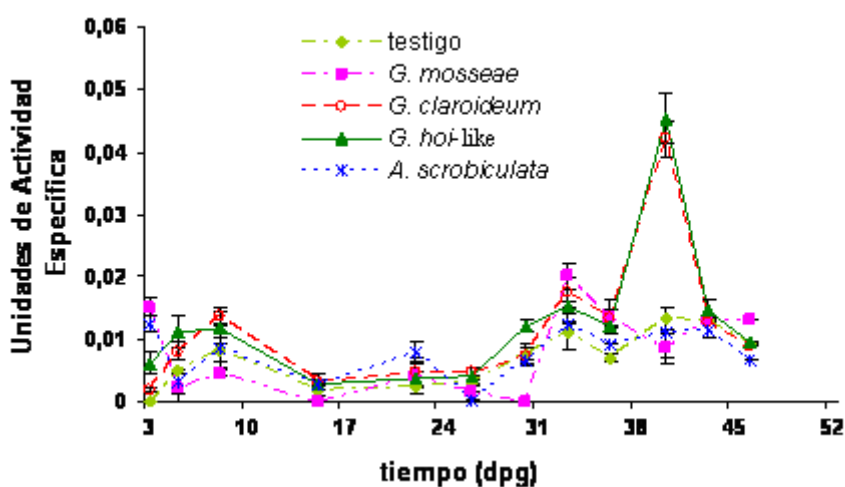


Figura 6. Dinámica de la inducción de la actividad de la enzima Quitinasa en la interacción tomate-HMA. Las barras de error representan los intervalos de confianza de la media para cada punto ($p \leq 0.05$), ($n=9$).

Actividad de la enzima β -1,3-glucanasa (PR2)

En la Figura 7 se representa el comportamiento de la enzima β -1,3-glucanasa en las raíces de las plantas tratadas con las diferentes especies de hongos micorrizógenos. La actividad enzimática resultó más elevada en las plantas inoculadas con las cepas *G. hoi-like* y *G. mosseae*. En fases posteriores, entre 22 y 33 días, todas las plantas (inoculadas y sin inocular, menos evidente con la cepa *A. scrobiculata*) presentaron un incremento en la actividad de esta enzima.

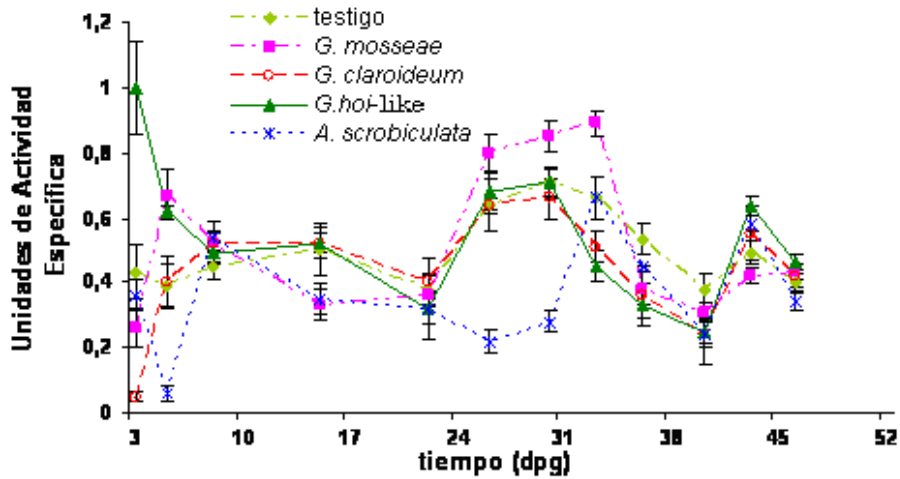


Figura 7. Dinámica de la inducción de la actividad de la enzima β -1,3-glucanasa en la interacción tomate-HMA. Las barras de error representan la desviación estándar poblacional para cada punto ($p \leq 0.05$), ($n=9$).

Actividad de la enzima fenil alanina amonio liasa (PAL)

La Figura 8 muestra la dinámica de la enzima fenil-alanina-amonioliasa en raíces de plantas inoculadas con las diferentes especies de HMA.

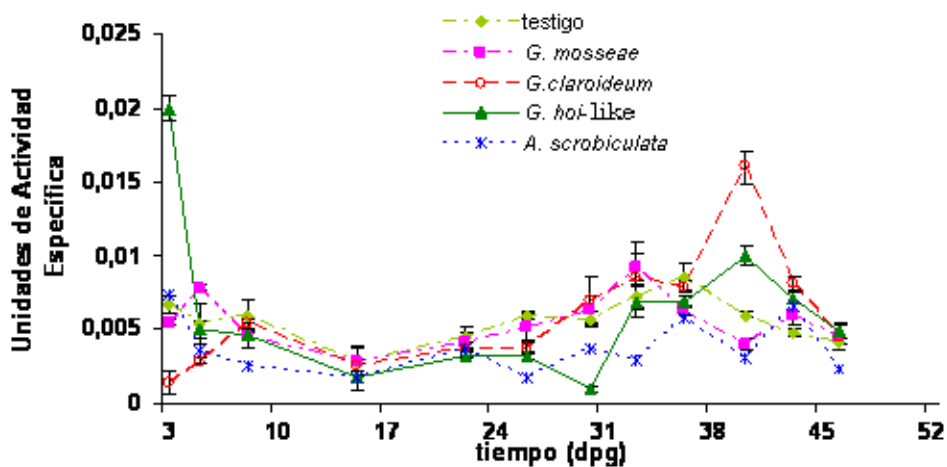


Figura 8. Dinámica de la inducción de la actividad de la enzima fenil alanina amonio liasa en la interacción tomate-HMA. Las barras de error representan los intervalos de confianza de la media para cada punto ($p \leq 0.05$), ($6 \leq n \leq 9$).

Se aprecia que todas las cepas mantuvieron un comportamiento similar, excepto *G. hoi-like* que inició la dinámica con altos niveles, los que disminuyen a los cinco días y luego se observa un comportamiento similar a las demás cepas en estudio. Por su parte, *G. claroideum* inicia con los niveles más bajos y presenta un máximo a los 40 días.

Los mecanismos de inducción enzimática permitieron determinar que las cepas *G. hoi-like* y *G. mosseae* difieren del resto en cuanto a la rapidez en que superan la fase de estrés biótico y comienzan a comportarse como simbios. Esta rápida transición de la fase de estrés biótico a la fase de simbiote se observó no solo en las diferencias de los niveles de actividad de las enzimas en los primeros días con respecto a los días finales de la dinámica, sino también en los más altos valores de D.V. observados durante la fase experimental. Estos constituyeron criterios de selección que determinaron que se continuara el estudio con las cepas *G. hoi-like* y *G. mosseae*.

3.2. Dinámica de inducción temporal y local de PR 2 y PR 3, en plantas micorrizadas con las cepas promisorias

La Figura 9 muestra la dinámica de activación encontrada en raíces, a nivel local, para la enzima β 1, 3 glucanasa horas después de haber sido inoculadas con los HMA en estudio. Se aprecia que la inducción es rápida, dado que se detectaron niveles de actividad enzimática que en el caso de *G. hoi-like* superaron a las plantas sin inocular desde la hora uno y hasta la cuatro. Por su parte, la cepa *G. mosseae* aunque con valores inferiores al testigo, también presentó niveles de actividad desde la hora uno. En las horas finales de esta dinámica (43 horas) se observó un incremento significativamente superior en las plantas tratadas con respecto al testigo sin inocular que no difirió entre las cepas en estudio.

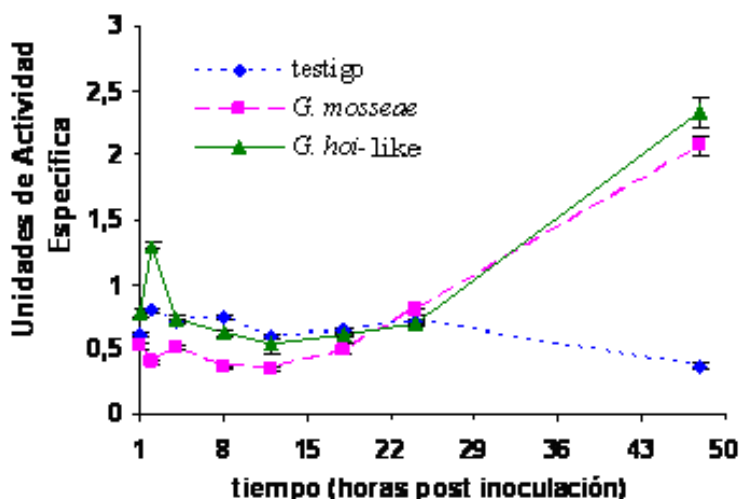


Figura 9. Dinámica de inducción de actividad β 1-3 glucanasas en raíces de plantas de tomate inoculadas con *G. mosseae* y *G. hoi-like* horas después de inducida la micorrización. Las barras representan los intervalos de confianza de la media para ($p \leq 0.05$), ($n=6$).

La Figura 10 muestra la dinámica de activación de la enzima quitinasa en raíces de plantas inoculadas, horas después de ser inducida la micorrización. Se observa que las plantas inoculadas con *G. hoi-like* presentan niveles de activación al inicio de la dinámica que disminuye a las 12 horas, y no se produjo una nueva activación hasta la hora 17 que se mantiene hasta el final de la

dinámica. Las plantas tratadas con *G. mosseae* mostraron un comportamiento similar a las plantas testigo, las que inicialmente presentan una baja actividad y un máximo a los 12 horas. Las plantas testigo a partir de este momento disminuyen la actividad hasta el final de la dinámica, no ocurriendo así con las plantas micorrizadas con *G. mosseae* que presentan un máximo de activación en la hora 24 que disminuye con el tiempo.

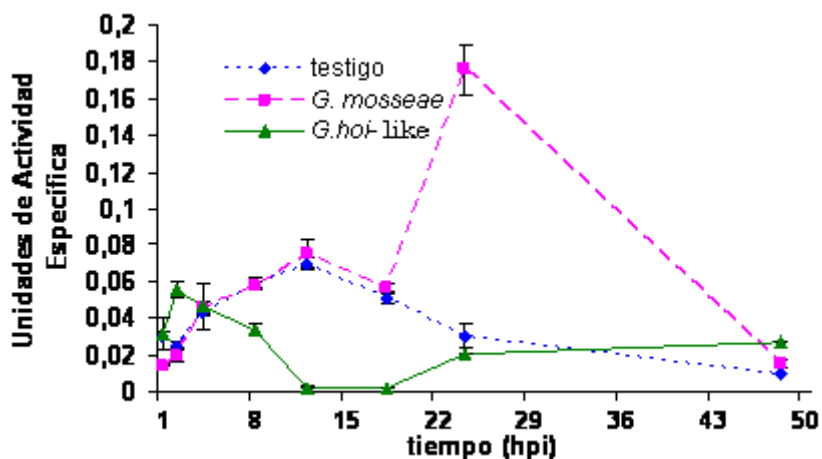


Figura 10. Dinámica de inducción de actividad quitinasa en raíces de plantas de tomate micorrizadas con *G. mosseae* y *G. hoi-like* horas después de inducir la micorrización. Las barras representan los intervalos de confianza de la media para ($p \leq 0,05$), ($n=6$)

Se observa que para ambas cepas la inducción de PRs a nivel local fue rápida y elevada, aunque en momentos diferentes, lo que indica que la percepción de las señales que se establecen entre las cepas y las plantas de tomate de la variedad Amalia fue efectiva para las cepas promisorias.

3.3. Estudio de la inducción temporal, local y sistémica, de PRs en plantas de tomate inoculadas con las cepas de HMA seleccionadas

3.3.1. Dinámica de colonización y ocupación fúngica de las plantas

La dinámica de colonización de las cepas *G. mosseae* y *G. hoi-like* se presenta en la Figura 11. Se observa un incremento de los niveles de colonización fúngica que entre ambas cepas solo difirió de forma significativa en el día 21 de la dinámica. Aún cuando se aprecia una tendencia a ser más altos los niveles de colonización entre los días 15 y 24 para la cepa *G. hoi-like*, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en la capacidad de las cepas para colonizar las plantas de tomate de la variedad en estudio.

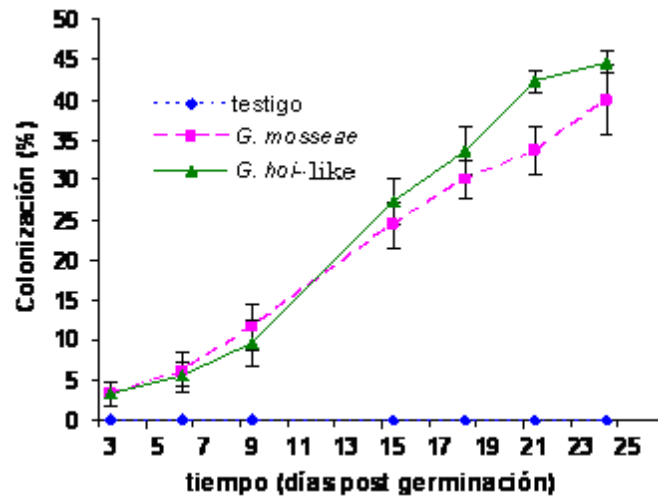


Figura 11. Dinámica de colonización de las cepas *G. mosseae* y *G. hoi-like*. Las barras representan los intervalos de confianza ($p \leq 0.05$), ($n=6$)

La dinámica de ocupación fúngica se presenta en la Figura 12. Para ambas cepas los porcentajes de densidad visual se encuentran en los niveles informados para este cultivo (2,3 – 3,5%) (Terry, 2003).

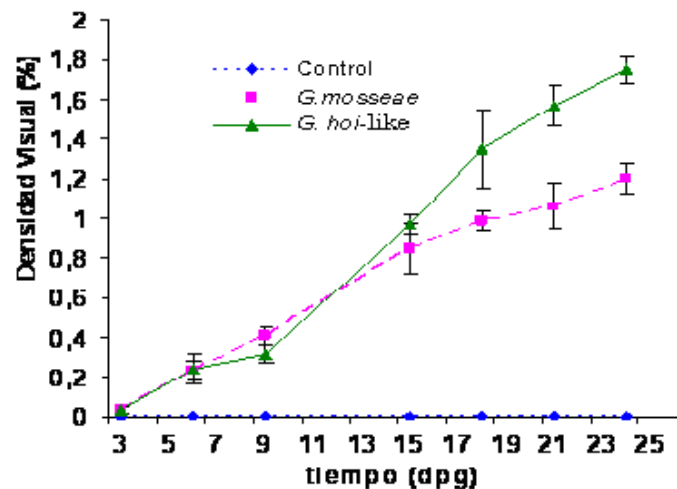


Figura 12. Dinámica de ocupación fúngica (D.V) para las cepas *G. hoi-like* y *G. mosseae*. Las barras representan los intervalos de confianza ($p \leq 0.05$), ($n=6$).

Se destaca que la cepa *G. hoi-like* 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. Este comportamiento podría estar relacionado con las condiciones de sustrato empleado, ya que esta cepa se recomienda específicamente para estas condiciones de fertilidad.

3.3.2 Masa fresca foliar y de raíz de plantas de tomate micorrizadas.

Las variaciones de las masas frescas foliar y de raíz de los tratamientos se presentan en la Figura 13. Con relación a la masa fresca foliar, se observa que el tratamiento inoculado con la cepa *G. hoi-like* presenta los valores más bajos a los 21 días, sin diferencias significativas entre los tratamientos a los 24 días (Figura 13A).

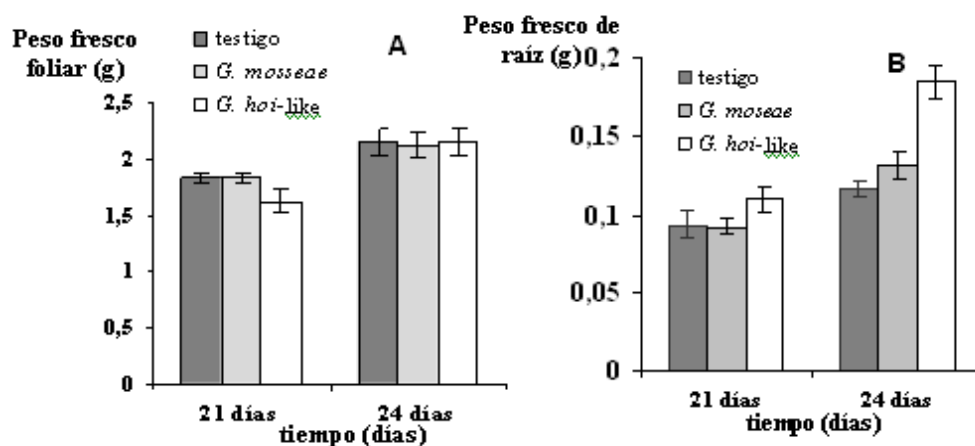


Figura 13. Masa fresca de plantas de tomate de 21 y 24 días de edad, a los que se aplicaron los tratamientos en estudio. (A) Masa fresca foliar (B) Masa fresca de raíces. Las barras representan los intervalos de confianza ($p \leq 0.05$), ($n=6$).

En el caso de la masa fresca de raíz se observaron valores similares en el día 21, para las plantas micorrizadas con *G. mosseae* y las plantas testigo, pero estadísticamente superiores para las plantas micorrizadas con *G. hoi-like*. Estos valores fueron significativamente superiores en el día 24 para los tratamientos inoculados con HMA (Figura 13B). Se debe destacar que las plantas micorrizadas con *G. hoi-like* presentaron los valores de masa fresca de raíz más altos en el día 21 y 24, lo que indica que esta cepa permitió un mejor desarrollo del sistema radical y por tanto una mejor nutrición de la planta. Además, para el caso de *G. hoi-like* se observó el estadio parasítico informado por diferentes autores para las cepas de HMA, lo que se refleja en la disminución de la masa fresca foliar, aún cuando los valores de masa fresca de raíz resultaron superiores para esta especie, estadio que logró superarse rápidamente en el día 24.

3.3.3 Dinámica de la inducción de PRs en raíz y hojas

3.3.3.1. Dinámica de la inducción de Peroxidasa en raíz y hojas

La dinámica de inducción de Peroxidasa en raíces de plantas de tomate inoculadas con las dos cepas seleccionadas se presenta en la Figura 14. De forma general, se observan tres máximos de activación para los tres tratamientos, el primero entre los días tres y seis, un segundo máximo en el día 15 y un tercero en el día 21 para el testigo sin inocular y para *G. hoi-like*.

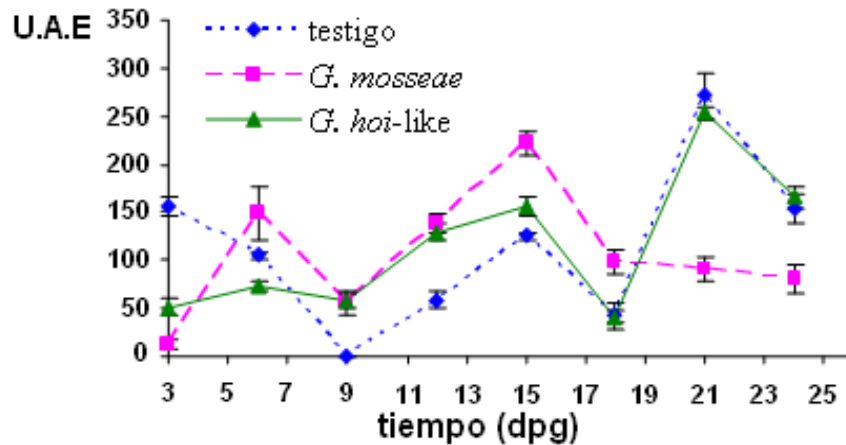


Figura 14. Dinámica de inducción de Peroxidasa en raíces de plantas de tomate var. “Amalia” inoculadas con las cepas *G. mosseae* y *G. hoi-like*. Las barras representan los intervalos de confianza de la media ($p \leq 0.05$), ($n=6$).

La activación del sistema Peroxidasa en hojas de plantas inoculadas con ambas cepas se presenta en la Figura 15. Se observa un máximo para todos los tratamientos que disminuye hasta no ser detectado en el día nueve, permaneciendo así hasta el final de la fase de experimentación para la cepa *G. mosseae* y el testigo sin inocular. Es importante destacar que se observó un nuevo máximo de activación transitorio para la cepa *G. hoi-like* que tiende a desaparecer rápidamente.

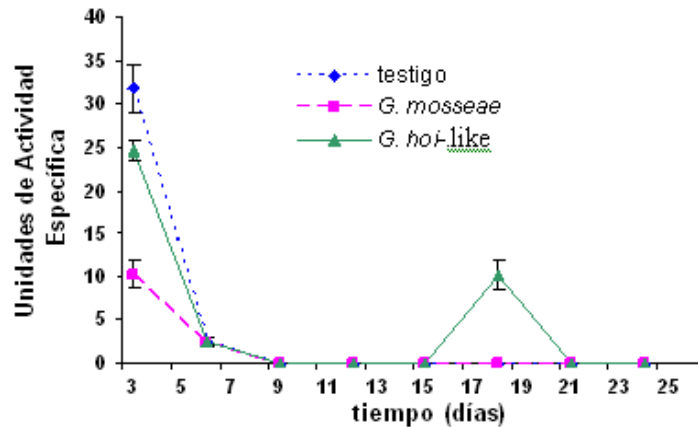


Figura 15. Dinámica de inducción de Peroxidasa en hojas de tomate var. Amalia inoculadas con las cepas *G. mosseae* y *G. hoi-like*. Las barras representan los intervalos de confianza de la media para $p \leq 0.05\%$ ($n=6$)

La inducción de Peroxidasa (PR 9) en raíz, para ambas cepas, mantuvo la tendencia presentada en el experimento 1. En el caso de la dinámica en hojas, no hubo inducción de respuesta sistémica para ambas cepas desde el inicio y solo para el caso de *G. hoi-like* se observó una inducción en el día 18 que resultó ser transitoria.

3.3.3.2 Dinámica de la inducción de β 1,3 glucanasa en raíz y hojas

El comportamiento de la inducción de PR2 en raíces de plantas de tomate inoculadas con las dos cepas se muestra en la Figura 16. Se aprecian dos máximos de inducción de actividad para las dos cepas, el primero en la etapa inicial que supera al testigo y el segundo en el día 12. Se observa además un máximo para la cepa *G. hoi-like* que supera a *G. mosseae* y al testigo sin inocular entre los días 18 y 21.

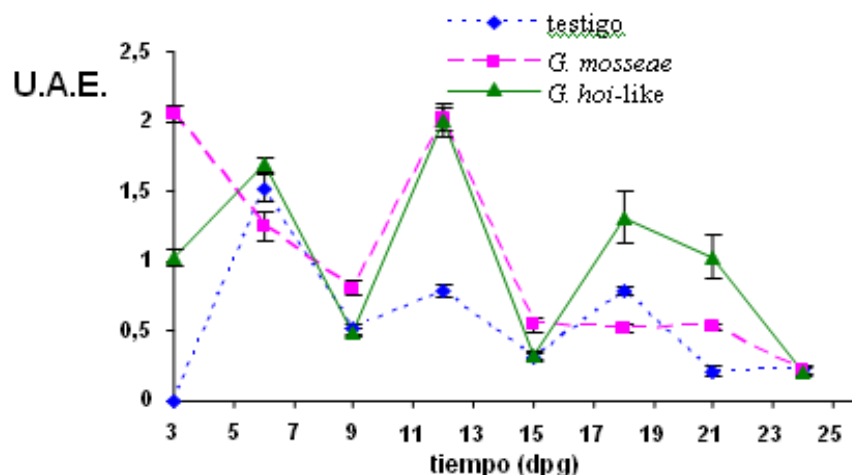


Figura 16. Dinámica de inducción de actividad β 1-3 glucanasa en raíces de plantas de tomate var. “Amalia” inoculadas con las cepas *G. mosseae* y *G. hoi-like*. Las barras representan los intervalos de confianza de la media ($p \leq 0.05$), ($n=6$)

La dinámica de inducción de PR2 en hojas de plantas de tomate inoculadas con las dos cepas seleccionadas se presenta en la Figura 17.

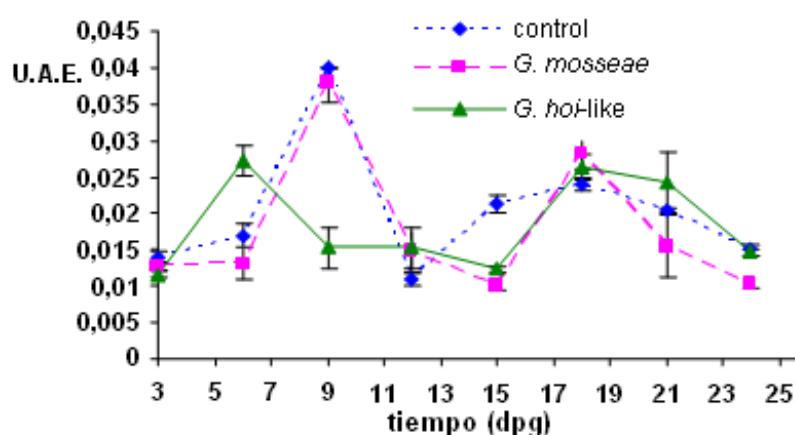


Figura 17. Dinámica de inducción de actividad β 1-3 glucanasa en hojas de plantas de tomate var. Amalia inoculadas con las cepas *G. mosseae* y *G. hoi-like*. Las barras representan los intervalos de confianza de la media ($p \leq 0.05$), ($n=6$).

Se aprecia para ambas cepas dos máximos de activación que para el caso de *G. hoi-like* se inician y terminan antes que para *G. mosseae* y para las plantas sin inocular. El segundo máximo de activación transcurre para todos los tratamientos en el mismo tiempo.

La dinámica de β 1-3 glucanasas corroboró la existencia de niveles basales en plantas de esta enzima y se observó que no existe inducción de respuesta sistémica a nivel de tejido foliar.

3.3.3.3 Dinámica de la inducción de quitinasa en raíces y hojas de plantas de tomates micorrizadas

La dinámica de inducción de PR3 en raíces de plantas de tomate se presenta en la Figura 18. Se aprecian dos picos para *G. hoi-like* y *G. mosseae*. El primer máximo se observó en el día 9 resultando significativamente superior para la especie *G. hoi-like* y una segunda inducción en el día 21, sin diferencias significativas entre ambas cepas. Para el testigo sólo se apreció un máximo de inducción en el día 15.

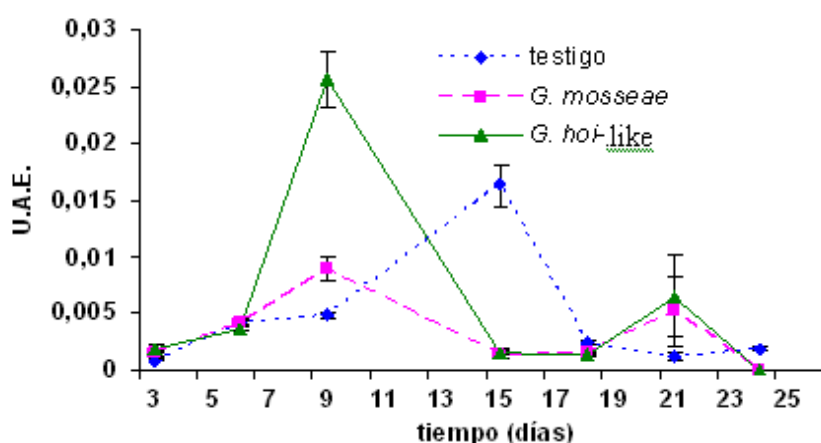


Figura 18. Dinámica de inducción de quitinasa en raíces de plantas de tomate var. “Amalia” inoculadas con las cepas *G. mosseae* y *G. hoi-like*. Las barras representan los intervalos de confianza de la media ($p \leq 0.05$), ($n=6$).

La inducción de quitinasa en hojas de plantas inoculadas con las especies en estudio se presenta en la Figura 19, en la que se observa una dinámica de actividad similar para las dos cepas y para el testigo sin inocular. En la dinámica en el tiempo de esta enzima en hojas tampoco se observó inducción de respuesta sistémica dado que para ambas cepas los niveles de actividad son más bajos que los de las plantas control. De forma general se puede apreciar que las dinámicas de inducción de PR 2, 3 y 9 presentan un perfil similar con las presentadas en el primer experimento.

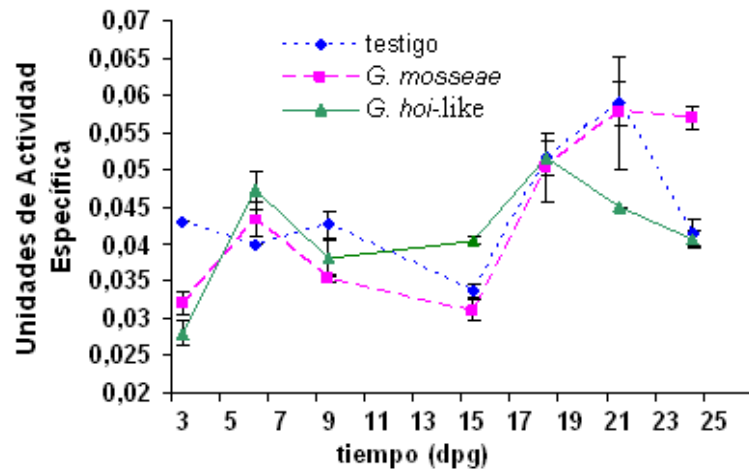


Figura 19. Dinámica de inducción de actividad quitinasa en hojas de plantas de tomate var. “Amalia” inoculadas con las cepas *G. mosseae* y *G. hoi-like*. Las barras representan los intervalos de confianza de la media ($p \leq 0.05$), ($n=6$).

En el presente estudio se observó que aún cuando hay inducción de actividad enzimática diferencial entre las plantas micorrizadas y las plantas testigo, no se aprecia inducción de respuesta sistémica en la planta, al menos con las enzimas evaluadas, lo que podría estar relacionado con informes presentados en la literatura que plantean que los HMA inducen la atenuación de las respuestas defensivas en plantas y que son más débiles que las inducidas por los hongos fitopatógenos.

3.4 Efecto de los HMA seleccionados sobre la severidad de las enfermedades causadas por *Phytophthora nicotianae*, *P. infestans*, *Alternaria solani* y *Oidiopsis taurica*, en tomate de la variedad Amalia.

3.4.1 Ocupación fúngica

Los niveles de colonización y ocupación fúngica de las plantas se presentan en la Figura 20. Para ambas variables se encontraron niveles promedios para la edad del cultivo similares a los observados en acápite anterior. Las plantas inoculadas con la cepa *G. hoi-like* presentaron niveles de ocupación fúngica mayores que las inoculadas con *G. mosseae*, y a su vez mayores que las plantas testigo. Se debe destacar que el experimento se efectuó en condiciones controladas y de sustrato estéril, por tanto las plantas testigos no resultaron micorrizadas.

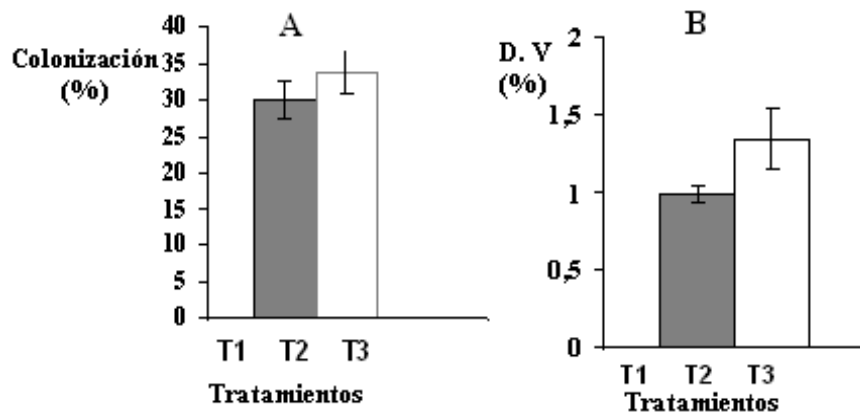


Figura 20 Niveles de colonización (A) y ocupación fúngica (B) detectadas en las plantas inoculadas con HMA (T2: *G. mosseae* y T3: *G. hoi-like*) y las plantas testigo (T1). Las barras representan el intervalo de confianza de la media ($p \leq 0.05$), ($n=6$).

3.4.2. Evaluación de la severidad de los daños producidos por patógenos de la raíz

3.4.2.1 Severidad de *Phytophthora* spp. sobre plantas inoculadas con las cepas de HMA seleccionadas

En la Figura 21 se representa el promedio de tres experimentos en los que se determinó la severidad de *P. nicotianae* y *P. infestans* sobre plantas de tomate de la variedad Amalia en los periodos de enero a marzo de los años 2003, 2004 y 2005.

No se obtuvieron diferencias significativas entre las plantas testigo y las inoculadas con HMA con respecto a la severidad de *P. nicotianae*, lo que se denota por la aparición de marchitez en el 100% de las plantas en el mismo nivel.

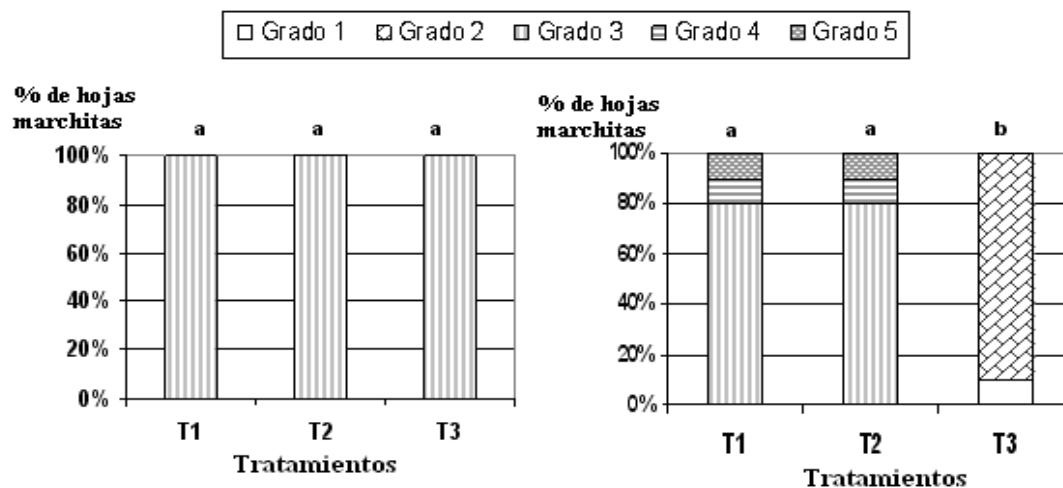


Figura 21. Marchitez foliar en plantas de tomate inoculadas con los tratamientos en estudio y enfrentadas a *Phytophthora* spp. (A) *P. nicotianae* (B) *P. infestans*. Se utilizó una escala en grados para determinar la intensidad de la enfermedad donde 0 es sin daño, 1 es marchitez de hasta un 10 %, 2 se refiere a la marchitez hasta un 25 %, 3 marchitez hasta 50 %, 4 marchitez hasta un 75 % y 5 hasta un 100% de la marchitez. T1: plantas control, T2 y T3: plantas micorrizadas con *G. mosseae*

y *G. hoi-like*, respectivamente. Letras no comunes indican diferencias significativas según corrección de Bonferroni para $p \leq 0.05$.

Para el caso de *P. infestans*, se observaron diferencias en la severidad de los daños producidos por el patógeno, en dependencia de la especie de HMA empleado, resultando las plantas micorrizadas con la especie *G. hoi-like* más protegidas que las micorrizadas con *G. mosseae*, a su vez no se observaron diferencias entre las plantas micorrizadas con *G. mosseae* y las plantas control.

3.4.3. Actividades enzimáticas detectadas en las plantas frente al ataque de los patógenos de raíz

3.4.3.1 Actividad PRX en raíces y hojas de plantas inoculadas con HMA frente al ataque de patógenos de raíz

La Figura 22 representa los promedios de la activación de PRX en tres experimentos donde se enfrentan las plantas micorrizadas a los patógenos *P. nicotianae* y *P. infestans*.

Se puede apreciar que la inoculación de plantas con *Phytophthora* spp. induce niveles de PRX en raíz más altos que los que se inducen en las plantas control, donde no está presente el patógeno (Figura 22A). Las mayores inducciones de actividad en raíz corresponden a las plantas inoculadas con *P. infestans*. Se observó una disminución de la actividad de la enzima en las plantas micorrizadas y enfrentadas a *P. nicotianae*, en comparación con las plantas controles e inoculadas con los patógenos. Este comportamiento no influyó en la respuesta de estas plantas frente al ataque del patógeno, pues los niveles de daño fueron iguales en todos los tratamientos.

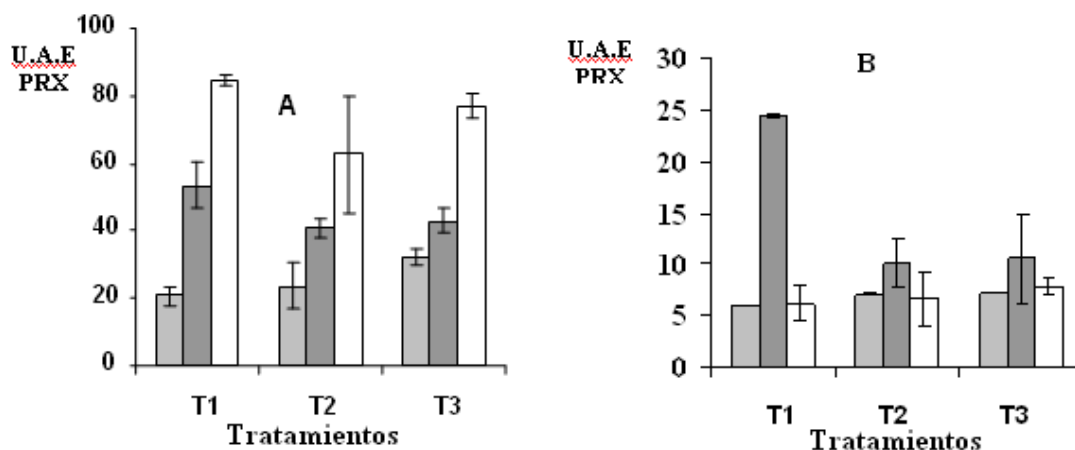


Figura 22. Actividad PRX detectada en raíces (A) y hojas (B) de plantas de tomate frente al ataque de *Phytophthora* spp. Las barras representan: primera- plantas control, segunda y tercera- plantas inoculadas con *P. nicotianae* y *P. infestans*, respectivamente. T1: plantas control, T2 y T3: plantas micorrizadas con *G. mosseae* y *G. hoi-like*, respectivamente. Las barras representan el intervalo de confianza de la media ($p \leq 0.05$), (n=9).

Cuando se determinó la actividad de esta enzima en hojas (Figura 22B), no se apreciaron diferencias entre las plantas sin micorrizar y las micorrizadas. Asimismo, se observó que la infección con *P. nicotianae* indujo valores de actividad de la enzima mayores en las plantas controles que en las micorrizadas. Sin embargo, la disminución en la inducción no influyó en los niveles de protección detectados porque la severidad de la enfermedad fue similar para todos los tratamientos.

Con respecto al enfrentamiento a *P. infestans*, no se encontraron diferencias en los niveles de actividad enzimática entre los tratamientos, no obstante se observaron diferencias en la severidad producida por el patógeno.

3.4.3.2 Actividad PR3 en raíces y hojas de plantas micorrizadas frente al ataque de patógenos

La Figura 23 muestra la inducción de quitinasa en raíces y hojas de plantas inoculadas con HMA frente al ataque de *Phytophthora* spp.

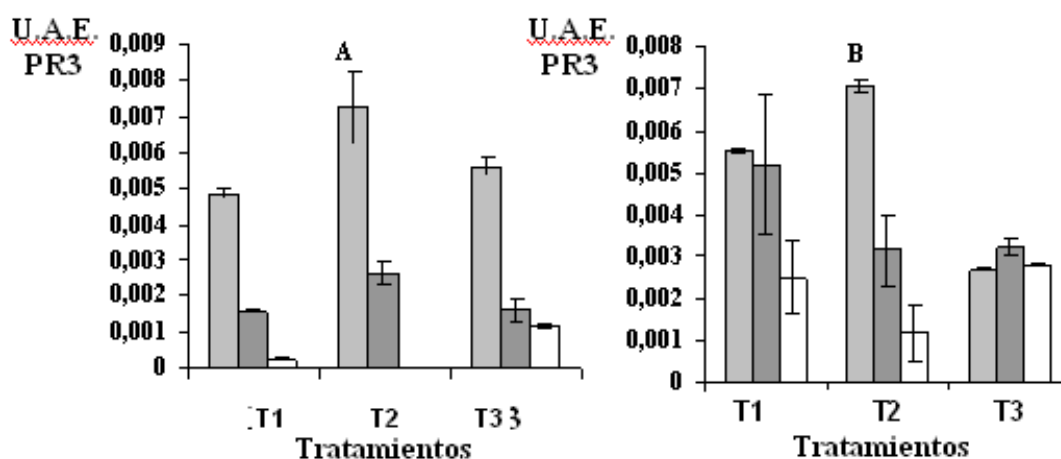


Figura 23. Actividad PR3 detectada en raíces (A) y hojas (B) de plantas de tomate frente al ataque de *Phytophthora*. (La primera barra refiere la actividad de las plantas control, las barras dos y tres refieren la actividad de las plantas con *P. nicotianae* y *P. infestans* respectivamente) (T1: plantas control, T2 y T3: plantas micorrizadas con *G. mosseae* y *G. hoi-like* respectivamente). Las barras representan el intervalo de confianza de la media para $p \leq 0.05$ (n=9).

De modo general, la respuesta local observada resultó superior en las plantas micorrizadas, destacándose *G. mosseae* por la mayor actividad. Esta respuesta resultó similar a la presentada en el experimento 3 (epígrafe 3.3), donde se evidenció que ambas cepas inducen respuestas locales de quitinasas en raíz, con diferencias significativas con el control (Figura 23A).

Cuando estas plantas se enfrentaron con *P. nicotianae* (Figura 23A), los mayores niveles de actividad se detectaron en las plantas micorrizadas con *G. mosseae* y no se presentaron diferencias entre las plantas control y las inoculadas con *G. hoi-like*. En las plantas inoculadas con *G. mosseae*

no hubo actividad detectable al enfrentar las plantas con *P. infestans*, no así en las que se enfrentaron al patógeno previamente inoculadas con *G. hoi-like*, que incrementaron su actividad.

La Figura 23 B muestra la inducción de actividad PR3 en el sistema foliar. Se encontró una respuesta diferencial entre las cepas de micorrizas en cuanto a la inducción sistémica de actividad quitinasa. Las plantas inoculadas con la cepa *G. mosseae* mostraron respuesta sistémica en la inducción de esta enzima, efecto que no se observó en las plantas inoculadas con *G. hoi-like* donde se apreció una disminución de la actividad. Este resultado también coincide con los presentados en el epígrafe 3.3.

Para las plantas inoculadas con *P. nicotianae* se encontró una disminución no significativa de la actividad en *G. mosseae* y significativa para *G. hoi-like*. Con *P. infestans* no se presentaron diferencias entre los tratamientos.

3.4.3.3 Actividad PR2 en raíces y hojas de plantas inoculadas con HMA frente al ataque de patógenos

La Figura 24 presenta la inducción de PR2 en raíces y hojas de plantas inoculadas con HMA frente al ataque de patógenos de acción a nivel de raíz. Se observa que la actividad β 1,3 glucanasa en raíces de plantas micorrizadas resultó en inducción de respuesta local, dado por la diferencia de ambas cepas con el control (Figura 24A).

En las plantas enfrentadas con *P. nicotianae* no se observaron diferencias en la inducción de β 1,3 glucanasa en la raíz entre las plantas inoculadas con HMA y las plantas control. Sin embargo, en el caso de la inoculación con *P. infestans* se apreció un aumento significativo de la actividad por el efecto de la inoculación de las plantas con HMA

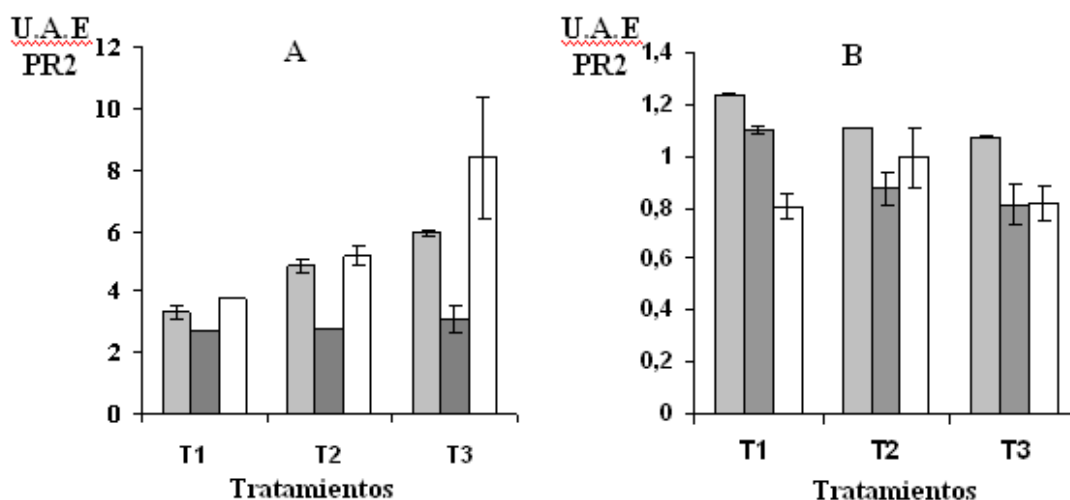


Figura 24. Actividad PR2 detectada en raíces (A) y hojas (B) de plantas de tomate frente al ataque de *Phytophthora*. (La primera barra refiere la actividad de las plantas control, las barras dos y tres refieren la actividad de las plantas inoculadas con *P. nicotianae* y *P. infestans* respectivamente) (T1:

plantas control, T2 y T3: plantas micorrizadas con *G. mosseae* y *G. hoi-like* respectivamente) Las barras representan el intervalo de confianza de la media para $p \leq 0.05$ (n=9)

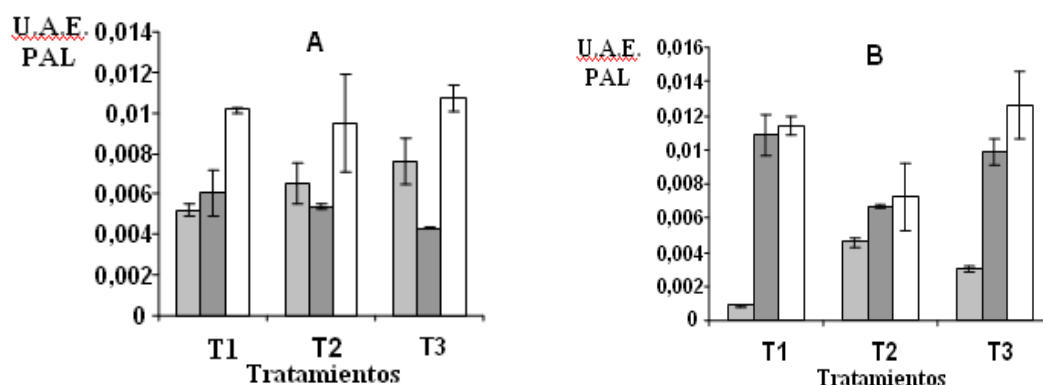
No hubo inducción de respuesta sistémica para esta enzima en las hojas de las plantas inoculadas con HMA, dado que los niveles de actividad PR2 en éstas no se modificaron apreciablemente, respecto a la de las plantas testigo (Figura 24B). Este resultado coincide con lo mostrado en el experimento del epígrafe 3.3.

Cuando estas plantas fueron enfrentadas con *P. nicotianae* se apreció una disminución significativa de la actividad de glucanasa en las plantas inoculadas con HMA, sin diferencias entre las cepas empleadas. En el enfrentamiento a *P. infestans* las plantas inoculadas con *G. mosseae* mostraron la mayor inducción de la enzima y no hubo diferencias entre el control y las plantas inoculadas con *G. hoi-like*.

3.4.3.4 Actividad PAL en raíces y hojas de plantas micorrizadas frente al ataque de microorganismos patógenos de raíz.

La Figura 25 muestra la inducción de fenil alanina amonio liasa (PAL) en los sistemas radical y foliares de las plantas enfrentadas a las dos especies de *Phytophthora*. Las plantas inoculadas con HMA presentaron activación de respuesta local que resultó sin diferencias entre las cepas de HMA empleadas (Figura 25A). Cuando estas plantas se enfrentaron con *P. nicotianae* se obtuvo una disminución de la actividad en las plantas micorrizadas con *G. hoi-like*. No se observaron diferencias en la inducción de la enzima cuando las plantas se enfrentaron a *P. infestans*.

Figura 25. Actividad PAL detectada en raíces (A) y hojas (B) de plantas de tomate frente al ataque de *Phytophthora* spp. (La primera barra refiere la actividad de las plantas control, las barras dos y tres refieren la actividad de las plantas inoculadas con *P. nicotianae* y *P. infestans* respectivamente) (T1:



plantas control, T2 y T3: plantas micorrizadas con *G. mosseae* y *G. hoi-like* respectivamente). Las barras representan el intervalo de confianza de la media para $p \leq 0.05$ (n=9)

La Figura 25B muestra la inducción de la actividad PAL en el sistema foliar. Se encontró inducción de respuesta sistémica en las plantas micorrizadas que resultó ser mayor en aquellas

inoculadas con *G. mosseae*. Las plantas micorrizadas con *G. mosseae* y enfrentadas con *P. nicotianae* y *P. infestans* mostraron niveles de activación de la enzima más bajos que las micorrizadas con *G. hoi-like*. No se encontraron diferencias entre las plantas micorrizadas con *G. hoi-like* y las plantas control cuando se enfrentaron a los patógenos.

Se debe destacar que esta enzima es la que inicia el ciclo de los fenilpropanoides y que se conecta con varias vías metabólicas en plantas, entre las que se encuentran las fitoalexinas y la lignina y la suberina, entre otras, por lo que la elevación de la actividad de la enzima *per se* no es suficiente para predecir su papel en la bioprotección de las plantas frente al ataque de los diferentes patógenos.

3.4.3.5 Análisis de componentes principales en la interacción planta-patógenos de raíz-HMA.

Las Figuras 26 y 27 muestran los análisis de componentes principales para las combinaciones de las actividades PRX, PR2, PR3 y PAL con el efecto producido por los patógenos de acción a nivel de raíz. Para el caso de *P. nicotianae* las dos primeras componentes explican el 79,66% de la variabilidad de los datos (Figura 26). Al componente uno contribuyen la severidad de la enfermedad y la activación de β 1,3 glucanasa, PRX y quitinasas de raíz; al componente dos aportan la β 1-3 glucanasa, PRX y quitinasas de hojas.

Se encontró que no había relación entre el daño producido por el patógeno y las actividades de PR2 y PR3 en hojas y que la relación era positiva y estrecha con PAL y PRX en hojas y PRX en raíz. Se obtuvieron relaciones negativas entre la severidad producida por el patógeno y la actividad de β 1-3 glucanasa, quitinasa y PAL en raíz.

Cuando se compararon las plantas inoculadas con patógenos y las control, se observó que la presencia del patógeno provoca disminución en la actividad de las enzimas PR2, quitinasa y PAL en raíz y aumentos en las actividades PAL y PRX en hojas y PRX en raíz. No se observó relación entre la presencia del patógeno y las actividades PR2 y PR3 en hojas.

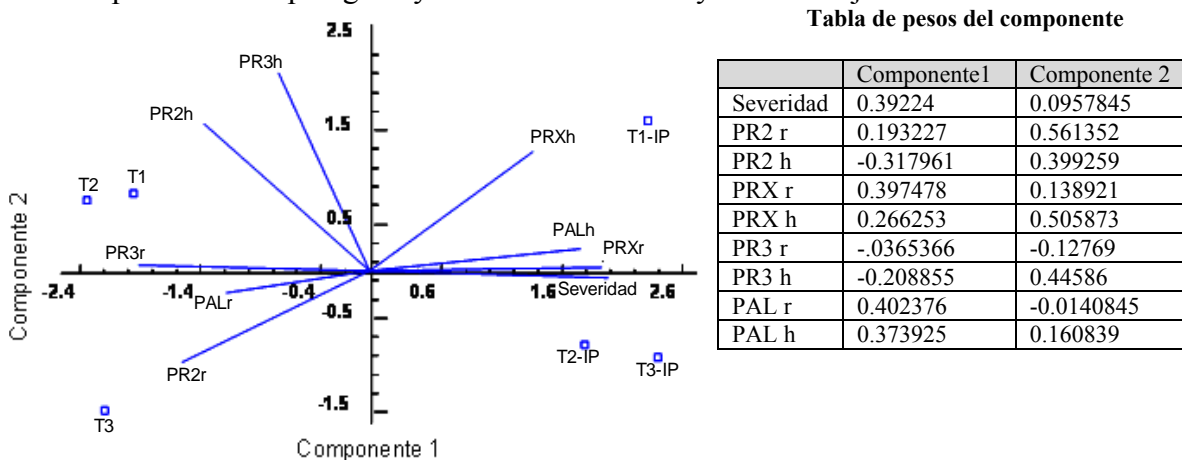


Figura 26. Análisis de componentes principales para *P. nicotianae*. Leyenda: PRX se refiere a la actividad Peroxidasa, PR2, a β 1,3 glucanasa, PR3 a actividad quitinasa y PAL a fenil

alanina amonio liasa, T1 plantas sin micorrizar T2: *G. mosseae* y T3: *G. hoi-like*, r: a los valores de actividad de las enzimas en la raíz y h: en hojas, IP: refiere las plantas enfrentadas a los patógenos.

En el análisis de componentes principales para *P. infestans* las dos primeras componentes explican el 91.75% de la variabilidad de los datos (Figura 27). Se observó que las variables que aportan al componente uno fueron la severidad de la enfermedad, quitinasas de raíz y hojas, PAL en hojas y raíz, PRX en raíz y β 1,3 glucanasa en hojas, y al componente dos PRX en hojas y β 1,3 glucanasa en raíz. No se encontró relación entre el daño producido por el patógeno y las actividades glucanasa en raíz y PRX en hojas. Existe relación positiva entre la severidad de la enfermedad y las actividades PAL y PRX en raíz y PAL en hojas, y negativa entre el daño y la actividad β 1,3 glucanasa en hojas y quitinasa en hojas y raíz.

Cuando se comparan las plantas enfrentadas al patógeno y las control, se observó que la presencia del patógeno provoca disminución de β 1,3 glucanasa en hojas y quitinasa en ambos órganos y aumentos en las actividades PAL y PRX en raíz y PAL en hojas, sin efectos en las actividades β 1,3 glucanasa en raíz y PRX en hojas.

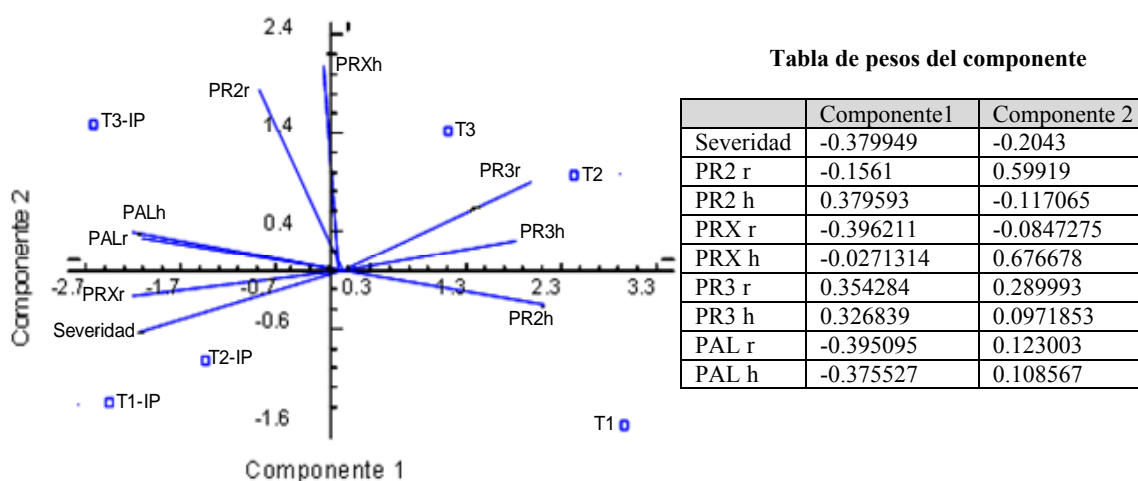


Figura 27 Análisis de componentes principales para *P. infestans* Leyenda: PRX se refiere a la actividad Peroxidasa, PR2, a β 1,3 glucanasa, PR3 a actividad quitinasa y PAL a fenil alanina amonio liasa, T1 plantas sin micorrizar T2: *G. mosseae* y T3: *G. hoi-like*, r: a los valores de actividad de las enzimas en la raíz y h: en hojas, IP: refiere las plantas enfrentadas a los patógenos.

3.3.6 Evaluación de la severidad de los daños producidos por los patógenos de acción foliar

3.3.6.1 Severidad de las afectaciones producidas por *Alternaria solani* sobre las plantas inoculadas con HMA

La Figura 28 presenta los promedios de la severidad de los daños causados por *A. solani* sobre plantas de tomates de la variedad Amalia y evaluados en tres experimentos en los periodos de enero a marzo de los años 2003, 2004 y 2005.

Los niveles de necrosis detectados mostraron un efecto diferencial entre las cepas de HMA empleadas sobre la severidad del daño producido por el patógeno. Las plantas inoculadas con la cepa *G. hoi-like* lograron una disminución significativa de la severidad del patógeno aproximadamente dos niveles por debajo de las plantas testigo, no ocurriendo así para las plantas micorrizadas con *G. mosseae* que mostraron un aumento de la severidad de los daños, en relación con las plantas sin micorrizar.

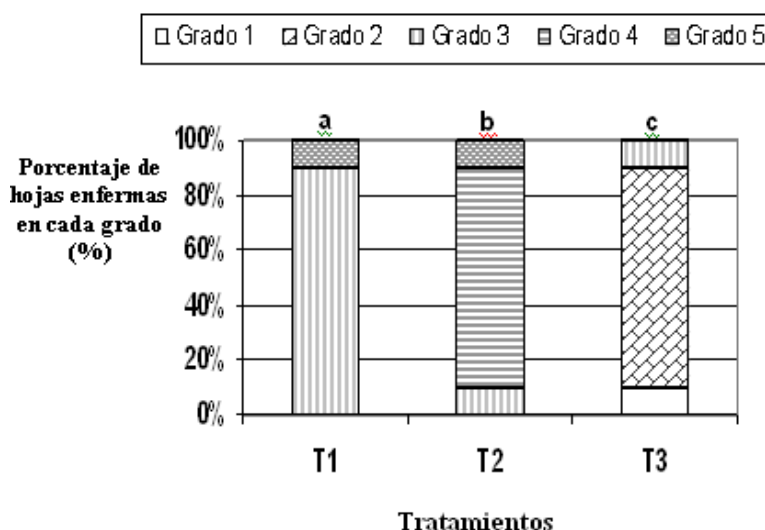


Figura 28. Necrosis foliar en plantas de tomate inoculadas con los tratamientos en estudio y enfrentadas a *A. solani*. Se utilizó una escala en grados para determinar la severidad de la enfermedad donde 0 es planta sana, 1 hasta un 10 % de hojas con síntomas, 2 hasta un 25 % de hojas con síntomas, 3 hasta 50 % de hojas con síntomas, 4 hasta un 75 % de hojas con síntomas y 5 hasta un 100%. T1: plantas control, T2 y T3: plantas micorrizadas con *G. mosseae* y *G. hoi-like* respectivamente. Letras no comunes indican diferencias significativas según corrección de Bonferroni para $p \leq 0.05$.

3.3.6.2 Afectaciones producidas por *Oidiopsis taurica* sobre las plantas inoculadas con HMA

Las afectaciones producidas por *O. taurica* fueron evaluadas en plantas de tomate en los periodos de enero a marzo de los años 2003 y 2004 y se representa el promedio de estas en la Figura 29. Al

igual que en el caso anterior se encontró un comportamiento diferencial entre cepas. Las plantas inoculadas con *G. hoi-like* y *G. mosseae* redujeron los porcentajes de necrosis con relación al control. Las plantas inoculadas con *G. hoi-like* se destacaron por disminuir la mayor intensidad de los daños producidos por el patógeno.

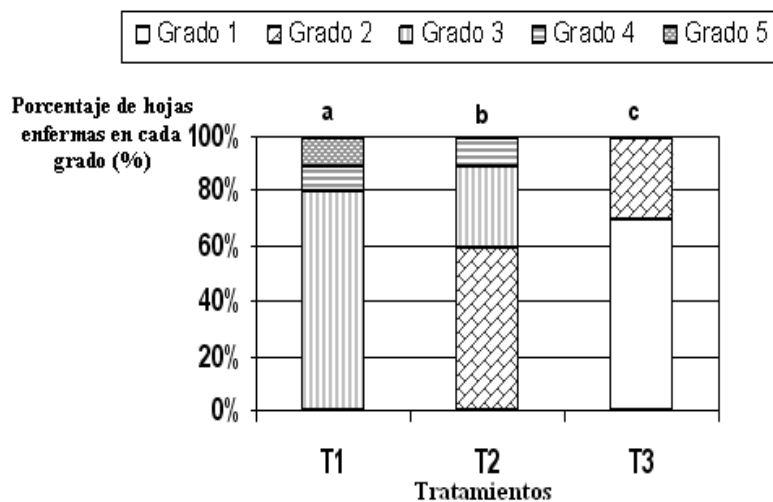


Figura 29. Necrosis foliar en plantas de tomate inoculadas con los tratamientos en estudio y enfrentadas a *Oidopsis taurica*. Se utilizó una escala en grados para determinar la severidad de la enfermedad donde 0 es plantas sanas, 1 hasta un 10 % de hojas con síntomas, 2 hasta un 25 % de hojas con síntomas, 3 hasta 50 % de hojas con síntomas, 4 hasta un 75 % de hojas con síntomas y 5 hasta un 100%. T1: plantas control, T2 y T3: plantas micorrizadas con *G. clarum* y *G. hoi-like*, respectivamente. Letras no comunes indican diferencias significativas según corrección de Bonferroni para $p \leq 0.05$.

3.3.7 Actividades enzimáticas detectadas en las plantas frente al ataque de patógenos foliares

3.3.7.1 Actividad PRX en raíces y hojas de plantas inoculadas con HMA frente al ataque de patógenos foliares

Los promedios de tres experimentos para *A. solani* y de dos en *Oidiopsis taurica* para la activación de PRX en las plantas tratadas se representa en la Figura 30. La activación de la enzima en la raíz confirma el hecho de que esta se induce de manera local.

En el caso de las plantas inoculadas con *G. hoi-like* la presencia de *A. solani* no afectó los niveles de actividad PRX en raíz ni en hojas. Sin embargo, las plantas inoculadas con *G. mosseae* disminuyeron el nivel de PRX en raíz e incrementaron significativamente el nivel de esta actividad en hojas.

En el caso de la *O. taurica*, en raíz, se observó 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.

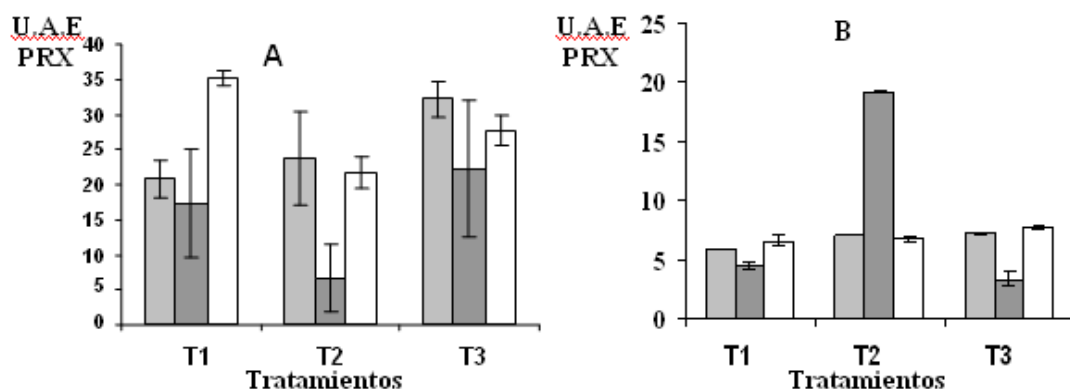


Figura 30. Actividad PRX detectada en raíces (A) y hojas (B) de plantas de tomate frente al ataque de patógenos foliares. La primera barra refiere la actividad de las plantas control, las barras dos y tres refieren la actividad de las plantas inoculadas con *A. solani* y *Oidiopsis taurica* respectivamente (T1: plantas control, T2 y T3: plantas micorrizadas con *G. mosseae* y *G. hoi-like* respectivamente) Las barras representan el intervalo de confianza de la media para $p \leq 0.05$ ($n=9$; $n=6$).

3.3.7.2 Actividad PR3 en raíces y hojas de plantas micorrizadas frente al ataque de patógenos foliares

La Figura 31 muestra la inducción de quitinasa en hojas y raíces de plantas inoculadas con HMA con las dos cepas en estudio frente al ataque de los patógenos foliares empleados.

En la actividad enzimática de quitinasa en el sistema radical de las plantas en estudio, se observa una respuesta local más elevada en las plantas inoculadas con *G. mosseae* y más leve en las inoculadas con *G. hoi-like* (Figura 31A).

En el caso del enfrentamiento con *A. solani* se apreció una disminución no significativa de la actividad para las dos cepas de HMA, respecto a las plantas control; sin embargo, en las plantas enfrentadas con *Oidiopsis taurica*., esta disminución resultó significativa.

La Figura 31B muestra la inducción de actividad PR3 en el sistema foliar. Se observa una respuesta diferencial entre las cepas de micorrizas en cuanto a la inducción sistémica de actividad quitinasa. Las plantas inoculadas con la cepa *G. mosseae* mostraron respuesta sistémica, esto no se observó para las plantas inoculadas con *G. hoi-like* en las que se apreció una disminución de la actividad.

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

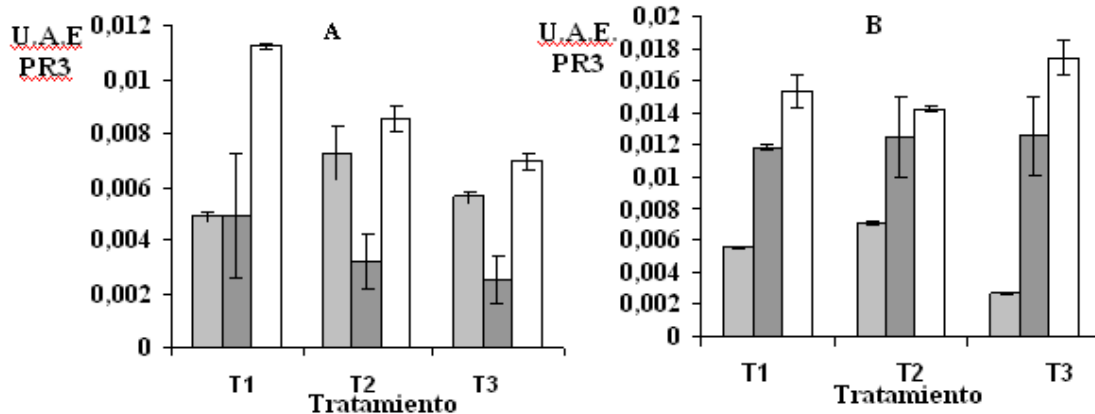


Figura 31. Actividad PR3 detectada en raíces (A) y hojas (B) de plantas de tomate frente al ataque de patógenos (La primera barra refiere la actividad de las plantas control, las barras dos y tres refieren la actividad de las plantas con *A. solani* y *Oidiopsis taurica* respectivamente) (T1: plantas control, T2 y T3: plantas micorrizadas con *G. mosseae* y *G. hoi-like* respectivamente) Las barras representan el intervalo de confianza de la media para $p \leq 0.05$ ($n=9$; $n=6$).

3.4.7.3 Actividad PR2 en raíces y hojas de plantas inoculadas con HMA frente al ataque de los patógenos foliares.

La Figura 32 presenta la inducción de PR2 en raíces y hojas de plantas inoculadas con HMA frente al ataque de los patógenos. Se observa inducción local de β 1,3 glucanasa en raíces de plantas micorrizadas que para ambas cepas fue superior a las plantas testigo (Figura 32A).

Cuando las plantas se enfrentaron a *A. solani* se observaron diferencias en la inducción de actividad glucanasa entre las cepas que resultó ser más alta en las plantas inoculadas con *G. hoi-like*. Sin embargo, se evidenció una disminución de esta actividad para aquellas plantas inoculadas con *G. mosseae* y enfrentadas con el patógeno. Las plantas testigo e inoculadas con HMA y enfrentadas con *Oidiopsis taurica* no mostraron diferencias en la inducción de actividad.

La Figura 32B muestra la inducción de actividad β 1-3 glucanasa en el sistema foliar de las plantas en estudio. No se encontró inducción de respuesta sistémica en las plantas inoculadas con HMA, dado que los niveles de actividad PR2 en éstas no se modificaron apreciablemente respecto a las plantas testigo.

No se observaron diferencias en la inducción de actividad entre las plantas inoculadas con HMA y testigo cuando se enfrentaron a *A. solani*. Por otra parte, cuando las plantas se enfrentaron con *Oidiopsis taurica*, se observó una marcada disminución de la actividad en las plantas inoculadas con *G. mosseae*

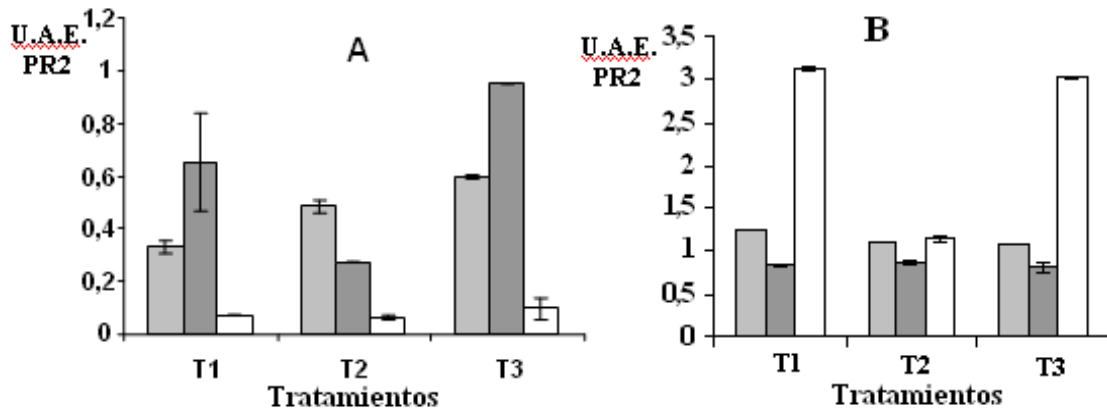


Figura 32. Actividad PR2 detectada en raíces (A) y hojas (B) de plantas de tomate frente al ataque de patógenos (La primera barra refiere la actividad de las plantas control, las barras dos y tres refieren la actividad de las plantas con *A. solani* y *Oidiopsis taurica* respectivamente) (T1: plantas control, T2 y T3: plantas micorrizadas con *G. mosseae* y *G. hoi-like* respectivamente). Las barras representan el intervalo de confianza de la media para $p \leq 0.05$ ($n=9$; $n=6$).

3.3.7.4 Actividad PAL en raíces y hojas de plantas micorrizadas frente a los patógenos foliares

La Figura 33 muestra la inducción de fenil alanina amonio liasa en los sistemas radical y foliares de las plantas. La inducción local de actividad PAL resultó mayor para la cepa *G. hoi-like* (Figura 33A). En el enfrentamiento a *A. solani* se presentó una disminución de la actividad para las plantas micorrizadas. Para el caso en que se enfrentaron a *Oidiopsis taurica* se apreció una disminución de la actividad para las plantas inoculadas con HMA con respecto a las plantas testigo (sin patógeno) y las no inoculadas con HMA.

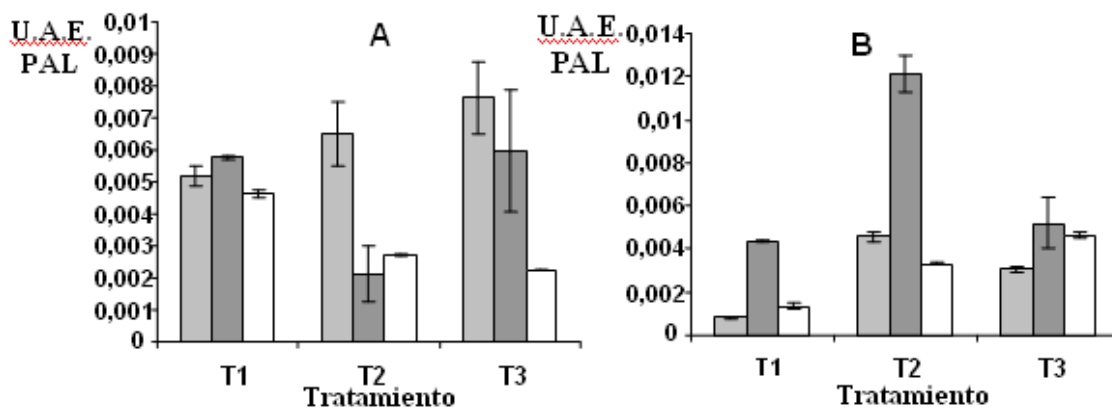


Figura 33. Actividad PAL detectada en raíces (A) y hojas (B) de plantas de tomate frente al ataque de patógenos (La primera barra refiere la actividad de las plantas control, las barras dos y tres refieren la actividad de las plantas con *A. solani* y *Oidiopsis taurica* respectivamente) (T1: plantas control, T2 y T3: plantas micorrizadas con *G. mosseae* y *G. hoi-like* respectivamente) Las barras representan el intervalo de confianza de la media para $p \leq 0.05$ ($n=9$; $n=6$).

La Figura 33B 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*. Se observó activación en las plantas inoculadas con *G. mosseae* cuando se enfrentaron a *A. solani* y no hubo diferencias entre las plantas testigo y las inoculadas con *G. hoi-like*. Cuando las plantas fueron inoculadas con *O. taurica* la activación fue evidente para las dos cepas, siendo superior en las plantas micorrizadas con *G. hoi-like*.

3.3.8 Análisis de componentes principales en la interacción planta-patógenos foliares-HMA

Las Figuras 34 y 35 muestran los análisis de componentes principales para las combinaciones de las actividades PRX, PR2, PR3 y PAL con el efecto producido por los diferentes patógenos en plantas de tomate de la var. Amalia.

Para *A. solani* las dos primeras componentes explican el 86.82% de la variabilidad de los datos (Figura 34). Al componente uno, aportan las variables severidad producida por los patógenos, PRX en raíz y hojas, quitinasas en hojas y PAL en raíz y hojas y al componente dos β 1,3 glucanasa de raíz.

No hay relación entre el daño producido por el patógeno y la actividad β 1,3 glucanasa en raíces. Existe una relación positiva entre la severidad de la enfermedad y las actividades quitinasa, PAL y PRX en hojas, y negativa con quitinasa, PAL y PRX en raíces, β 1-3 glucanasa en hojas y quitinasa en raíz.

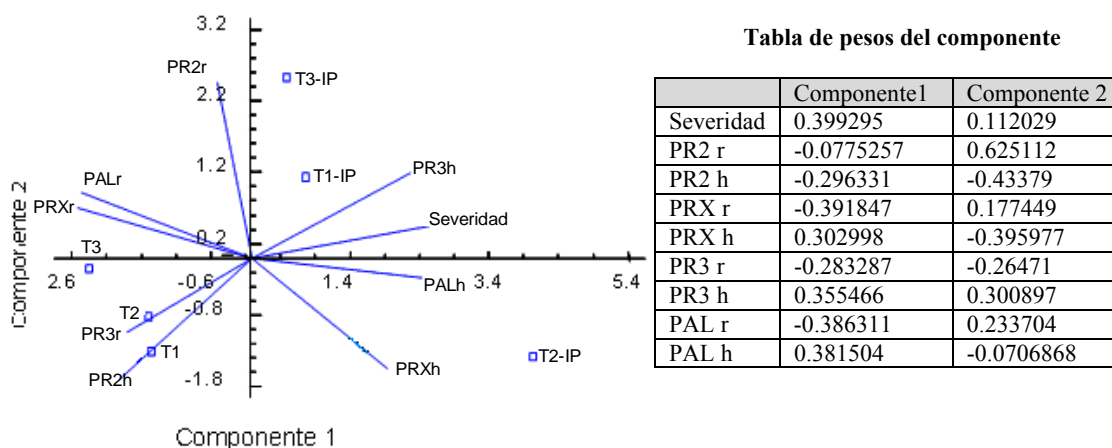


Figura 34. Análisis de componentes principales para *A. solani*. Leyenda: PRX se refiere a la actividad Peroxidasa, PR2, a β 1,3 PR2canasa, PR3 a actividad quitinasa y PAL a fenil alanina amonio liasa, T1 plantas sin micorrizar T2: *G. mosseae* y T3: *G. hoi-like*, r: a los valores de actividad de las enzimas en la raíz y h: en hojas, IP: refiere las plantas enfrentadas a los patógenos.

Cuando se compararon las plantas enfrentadas al patógeno con las plantas sin patógenos se observó que la presencia de este induce aumentos en la actividad quitinasa, PRX y PAL en hojas y disminución de la actividad PAL, PRX y quitinasas en raíz y β 1,3 glucanasa en hojas.

Cuando se analizó la relación para *O. taurica* se encontró que las dos primeras componentes explican el 82.32% de la variabilidad de los datos (Figura 35). 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.

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 quitinasa en raíces y hojas y PRX en raíces y β 1,3 glucanasa en hojas y resultó negativa con β 1,3 glucanasa y PAL en raíces.

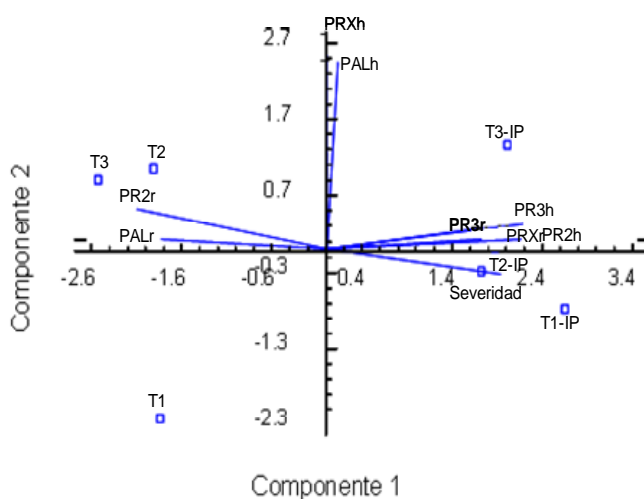


Tabla de pesos del componente

	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

Figura 35. Análisis de componentes principales para *Oidiopsis taurica*. Leyenda: 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. hoi-like*, r: a los valores de actividad de las enzimas en la raíz y h: en hojas, IP: refiere las plantas enfrentadas a los patógenos.

Cuando se compararon las plantas enfrentadas al patógeno con las plantas sin patógenos se observó que la presencia de este produce disminución de PR2 y PAL en raíces e incrementos en las actividades de quitinasas en raíces y hojas y PRX en raíces y β 1,3 glucanasa en hojas.

De forma general, los resultados del efecto de los HMA sobre los cuatro patógenos muestran que *G. hoi-like* resultó ser la cepa de mayor potencial protector en las condiciones de sustrato empleadas, aún cuando no se observó efecto en la severidad de las afectaciones producidas por *P. nicotianae* entre las plantas micorrizadas con esta cepa y las plantas testigo. Para los patógenos foliares resultó que esta especie protege a las plantas de tomate contra las afectaciones producidas por ambos patógenos, con disminución significativa de la severidad de la enfermedad. Al relacionar las actividades enzimáticas con la severidad de los daños se observó que la disminución de la severidad de las afectaciones está relacionada con un grupo de actividades enzimáticas en cada patógeno y no con una enzima específica.

IV- DISCUSIÓN

4.1 Selección de cepas de dos géneros de hongos micorrízicos arbusculares (HMA)

Una de las alternativas más prometedoras dentro del contexto agrícola mundial, lo constituye el uso de biopreparados a partir de microorganismos. Los mismos desempeñan un importante papel en los modelos de agricultura sostenible debido a la posibilidad de producirse a partir de recursos locales renovables (Altieri, 1997; Hernández y Chailloux, 2004). Entre los microorganismos que forman parte de la comunidad microbiana de la rizosfera están los hongos micorrízicos arbusculares (HMA), a los que se les atribuye beneficios tanto para las plantas como para los ecosistemas (Bonfante-Fassolo y Perotto, 1995; Barea *et al.*, 2005; Giri *et al.*, 2005; Morgan *et al.*, 2005).

Existen diferentes hipótesis para explicar la actividad bioprotectora de los HMA contra patógenos. Estas incluyen: mejoras en la nutrición de las plantas y de la biomasa radical que contribuyen a incrementar la tolerancia de las plantas y compensan el daño causado por el patógeno, cambios en la morfología de la raíz, modificaciones en la población antagónica en la micorrizosfera, y competencia entre las micorrizas arbusculares y el hongo fitopatógeno con la posible inducción de mecanismos de defensa en la planta (Whipps, 2004; Giri *et al.*, 2005; Morgan *et al.*, 2005; Vierheilig *et al.*, 2008). Por lo anteriormente planteado, es de gran importancia contar con un grupo de cepas potencialmente eficientes en cultivos de importancia económica, entre ellos el tomate.

La dinámica de colonización de las cuatro cepas empleadas en este trabajo, evidenció que la intensidad de la colonización disminuía hacia los 45 días (Figura 3) y que esto se relacionaba con la fase de floración masiva. Este comportamiento podría deberse a la presencia de un nuevo sitio de consumo (flores y frutos) que se relaciona con perpetuar la vida del individuo, por lo que la migración de asimilatos es hacia ese lugar, disminuyendo así las estructuras fúngicas al ser privadas de estos. Por otra parte, la variedad Amalia es del tipo determinado medio (Domini, 2000), y al alcanzar el tamaño requerido en el inicio de la fase de floración, comienza a prescindir de la asociación fúngica y se ven disminuidas sus estructuras en el interior de la raíz (Rivera *et al.*, 2007).

En experimentos realizados por Schliemann *et al.* (2008), donde se evaluaron, a través de marcadores genéticos específicos, la colonización y la presencia de arbusculos en *Medicago truncatula* micorrizada con *G. intraradices* encontraron que al inicio de la interacción HMA-planta el incremento de los arbusculos era lento, seguido por una etapa en la que 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, mientras que la tinción con Tripán

azul indicaba un estado estacionario de colonización que se alcanzaba aproximadamente a los 35 días.

En el presente trabajo el estado estacionario se presentó a partir de los 33 días (datos no mostrados) y los niveles de colonización resultaron adecuados desde etapas tempranas del cultivo, 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 las especies *G. hoi-like* y *G. mosseae* a partir del día 17 presentando diferencias con las restantes especies estudiadas.

La capacidad de las cepas para inducir respuestas defensivas en plantas, así como la presencia de estructuras de intercambio en el interior de la raíz permitió definir que *G. hoi-like* y *G. mosseae* difieren del resto de las cepas en cuanto a la rapidez en que superan la fase de estrés biótico en el cultivo del tomate de la variedad Amalia y comienzan a comportarse como simbioses. En las condiciones del sustrato utilizado se determinó que las cepas *G. hoi-like* y *G. mosseae* resultaron las especies más asociativas, lo que era de esperar dados los altos niveles de fertilidad del sustrato empleado. Estos resultados corroboran que bajo estas condiciones de fertilidad la especie más asociativa es *G. hoi-like*, aunque se presenta cierta especificidad cepa-cultivo en el caso de la asociación con *G. mosseae* (Rivera *et al.*, 2007).

Por otro lado, al analizar las respuestas de defensa inducidas por estos HMA en la planta, se demuestra que en una primera fase esta reconoce a los HMA como patógenos, con el correspondiente incremento de las actividades enzimáticas evaluadas, las que posteriormente se deprimen como consecuencia del reconocimiento del hongo como simbiote. Es importante destacar que esta fase de reconocimiento es más corta para las cepas *G. hoi-like* y *G. mosseae*, lo que las ratifica como las más asociativas en las condiciones del sustrato empleado. En estudios de campo realizados por diferentes autores se ha demostrado que la cepa *G. hoi-like* es la más asociativa en las condiciones de pH y fertilidad del sustrato empleados en el estudio (Rivera *et al.*, 2007).

Cuando se relacionaron las dinámicas de ocupación fúngica y actividad enzimática (Figuras 3 y 4), se observó una primera etapa en la que las plantas activaron mecanismos de defensa debido a la penetración del HMA, mientras que los niveles de densidad visual se mantienen bajos. Posteriormente, se observó disminución de la actividad de las peroxidasas, lo que sugiere que comienza una nueva fase en la que las plantas reconocen a estos HMA como simbioses, con el consiguiente incremento de los niveles de ocupación fúngica. Este comportamiento se mantiene de forma irreversible, aún cuando se promueve un incremento de la actividad de la enzima en etapas posteriores del desarrollo de la planta, especialmente para el tratamiento con *G. hoi-like* donde este incremento se presenta de forma más tardía y en menor grado, en comparación con el resto de las cepas de HMA estudiadas. El aumento de la actividad enzimática que se observa en todos los

tratamientos puede estar relacionado con la penetración de los HMA en la raíz y con el crecimiento de la planta, considerando que fue inducido tanto en plantas micorrizadas como en plantas testigo.

Se conoce que los HMA no tienen la capacidad de atravesar las paredes celulares reforzadas por los productos metabólicos de la vía de las peroxidasas, por lo que el hecho de que las plantas micorrizadas mantengan niveles de activación más bajos, determina que la asociación se pueda establecer, como se observa en la dinámica de ocupación fúngica. La inducción del sistema peroxidasa no solo está relacionado con los mecanismos defensivos de las plantas sino también con la toma de Fósforo (Pozo *et al.*, 1999 Lambais *et al.*, 2003). Los HMA permiten la nutrición fosforada de la planta a través del micelio extramático por lo que la actividad de esta enzima en las plantas no micorrizadas es mayor para suplementar las necesidades del elemento. En el caso de las plantas micorrizadas este es suministrado fundamentalmente por el hongo (Pazskowski *et al.*, 2006; Mohammadi *et al.*, 2008; Ramos *et al.*, 2008), por lo que se obtuvieron niveles inferiores de actividad enzimática.

En este sentido, el aumento de la actividad de PPO en las plantas no micorrizadas podría deberse a la toma de Fósforo en el inicio de la fase de crecimiento masivo, que demanda las mayores cantidades del elemento por la planta, lo mismo que se plantea para la activación de PRX. La elevación de esta actividad en un segundo momento, en las plantas no micorrizadas, podría deberse a la adquisición de Fósforo por la planta. Se ha sugerido que las plantas micorrizadas reciben la mayoría del Fósforo por la vía de esta simbiosis (Smith *et al.*, 2003), a través del micelio extramático (Pazskowski *et al.*, 2006; Pazskowski, 2006a; Mohammadi *et al.*, 2008; Ramos *et al.*, 2008). La inducción de los mecanismos involucrados con esta vía es más baja en las plantas micorrizadas mientras que las plantas testigo inducen actividades superiores para suplementar sus necesidades.

Se debe destacar que al inicio de la dinámica, la inducción de PRX observada para *G. mosseae* presentó los niveles más bajos de actividad en comparación con el resto de las cepas. Estos niveles de actividad permitieron el establecimiento de la cepa con niveles de ocupación superiores a los encontrados para *G. claroideum* y *A. scrobiculata*.

El incremento de la actividad enzimática entre los días 30 y 36 podría estar relacionado con el inicio de la fase de floración masiva, en la que el metabolismo primario demanda la mayor cantidad de energía y metabolitos de reserva por parte del vegetal, por lo que se observa una disminución de los niveles de ocupación fúngica hacia el final de la dinámica (Figura 3).

En este trabajo, aunque no se determinaron los contenidos de Fósforo en la planta, se relacionan los aumentos de estas actividades con el inicio de la fase de floración masiva y la mayor demanda de portadores energéticos para su metabolismo primario. El retraso encontrado en esta actividad

para la cepa *G. hoi-like* hacia el final de la dinámica podría estar relacionado con la eficiencia de la cepa en estas condiciones de fertilidad del sustrato. En esta interacción, la comunicación que se establece entre los simbiontes es más fuerte. Sin embargo, la disminución de los niveles de ocupación están determinados por el hecho de que las plantas son de tipo determinado y al inicio de la fase de crecimiento masivo precisan de la mayor cantidad de metabolitos para perpetuarse en flores y frutos.

Rodríguez *et al.* (2002), en un estudio similar relacionado con la actividad enzimática de peroxidases en plantas de tomate de la variedad INCA 17, inoculadas con dos especies de HMA, relacionaron esta dinámica con la ocupación fúngica y concluyeron que los niveles de actividad al inicio del proceso de colonización fueron los que determinaron el grado de infectividad de cada cepa, resultando exitosa en *G. hoi-like* cuando la actividad de la enzima resultó baja. No obstante, al inicio del experimento en este trabajo, aun cuando los niveles de la enzima en algunas de las cepas, son incluso mayores que en las plantas sin inocular, el proceso de colonización se produce.

En cuanto a la actividad quitinasa, se ha planteado que la activación de la enzima produce fragmentos más pequeños derivados de la pared celular de los HMA que no cumplen con su función elicitora (Harrison, 2005). Las fluctuaciones cíclicas de la dinámica de activación de esta enzima observadas en el estudio, pudieran explicar este hecho y por tanto no se activan los mecanismos de defensa de la planta.

Algunos autores encontraron que la pared de la hifa extrarradical contiene una gran cantidad de β -1,3 glucanos, pero que son menos abundantes en la hifa intercelular e indetectables en los arbusculos (Gollotte *et al.*, 1997), lo que apoya la teoría de que la acción lítica de ambas enzimas (quitinasas y β -1,3 glucanasas) permite que el hongo se establezca, ya que le facilita la extensión intrarradical. Considerando lo anterior, se puede sugerir que los altos valores de actividad de la enzima al inicio del proceso infectivo de las especies *G. hoi-like* y *G. mosseae* pudieran ser la razón por la que se obtienen los mayores valores de D.V.

Estos resultados se corresponden con lo planteado por Bonfante-Fassolo y Perotto (1995), Harrison (2005), Pazskowski (2006b) que informan que una vez establecido el HMA, los cambios fisiológicos que ocurren, así como las modificaciones estructurales, son un indicativo de la comunicación genómica que existe entre los simbiontes, lo que permite la compatibilidad celular y funcional.

Si se toma en cuenta lo planteado por Mosse (1986), sobre los cambios de la estructura de la quitina, que pasa desde una estructura tridimensional en la hifa extrarradical hasta plana en los arbusculos, y se observa las fluctuaciones de la dinámica de actividad de esta enzima que resultó sin cambios bruscos de inducción, se puede inferir que la quitinasa está involucrada en el crecimiento intrarradical de los HMA.

Asimismo, se observó que la inducción de β 1,3 glucanasa resultó superior y mantenida en las especies que mayor porcentaje de colonización y ocupación fúngica presentaron. Esta enzima provee un mejor sustrato para la actividad quitinasa y viceversa (Pennickx 1998; van Loon *et al.*, 2006), por tanto se podría concluir que esta enzima junto con la quitinasa están involucradas directamente en el crecimiento de los HMA en el interior de la raíz y con los niveles de ocupación fúngica observados para las especies *G. hoi-like* y *G. mosseae*.

Otro aspecto a considerar es la elevación de los niveles de estas enzimas en los estadios tardíos de la colonización. Las quitinasas inducidas en estas etapas están involucradas en el proceso de remoción de los arbusculos en el interior de la raíz, con lo cual se explica la relación observada entre la elevación de los niveles de estas enzimas en la etapa final del experimento y la disminución de los niveles de D.V. (Salzer *et al.*, 2000; Franken *et al.*, 2007).

Aunque los hongos micorrizicos no son considerados como inductores de respuesta de defensa completa del hospedante, se conoce de la acumulación de fitoalexinas y algunas enzimas, como la PAL, que incrementan su concentración y actividad de manera significativa durante las primeras etapas de la colonización radical (Kapulnik, *et al.*, 1996). En este sentido, Volpin (1994), determinó que la actividad PAL estaba asociada con la penetración del hongo en el sistema radical. Esta podría explicar la elevación de la actividad de esta enzima para todas las cepas en el inicio del experimento que además fue significativa para *G. hoi-like*, cepa que logró colonizar y establecerse más rápidamente en el cultivo, según valores de densidad visual (D.V) obtenidos.

Durante el establecimiento de la simbiosis las señales moleculares entre la planta y el HMA permiten la germinación, penetración y desarrollo intrarradical de estos hongos (Gao *et al.*, 2004). Sin embargo, la planta responde con un aumento transiente de los niveles de PR proteínas porque en un inicio reconocen a estos HMA como patógenos (Barrer y Tagu, 2000; Salzer y Boller, 2000; Gao *et al.*, 2004). En la medida que se establece la micorrización por un diálogo coordinado entre los simbiosis estas respuestas son subsecuentemente reprimidas, proceso que es mediado por los genes *sym* (Harrison, 2005; Giovannetti, 2008). Durante la primera etapa del establecimiento el HMA actúa de forma parasítica y demanda mayor flujo de fotosintatos que los beneficios que aporta a la planta (Harrison, 2005). Este mecanismo conocido como paso de estrés biótico a simbiote depende de la eficiencia micorrizica y está determinada por la asociación tripartita suelo-planta-HMA (Rivera *et al.*, 2007; Kageyama *et al.*, 2008).

En esta investigación se presenta el primer informe de una dinámica de inducción de cinco sistemas enzimáticos que se relacionan con los niveles de ocupación fúngica. Se demuestra además, que las enzimas involucradas en el paso de estrés biótico a simbiote son las del estrés oxidativo: Las dinámicas de activación de las otras enzimas (PR2, PR3 y PAL), solo permiten

justificar el crecimiento micelial del HMA en el interior de la raíz y no los mecanismos de estrés informados por otros autores.

Dado el papel que podrían desempeñar estas cepas en la bioprotección contra patógenos que atacan al cultivo del tomate y la importancia que tiene el estudio en el tiempo de la expresión de enzimas relacionadas con la defensa, se estableció una dinámica más precisa con vistas a conocer el momento y tipos de respuesta que podrían obtenerse en plantas inoculadas con estas cepas eficientes.

4.2. Dinámica de inducción temporal y local de PR 2 y PR 3, en plantas micorrizadas con las cepas seleccionadas

La inducción de mecanismos defensivos por estos hongos formadores de micorrizas arbusculares que es deprimida como consecuencia del reconocimiento molecular entre los simbioses, provoca una supresión de los eventos moleculares que permiten la acción defensiva por parte de la planta, aspecto que está en correspondencia con lo señalado por otros autores (Gianinazzi-Pearson *et al.*, 1996; Harrison, 2005).

Esta depresión es lo que permite la colonización de la raíz de la planta por los HMA, que a partir de la percepción de señales, de forma rápida provocó niveles de inducción de PR proteínas en solo 12 horas después de haber sido enfrentados los simbioses. Este hecho indica que en la medida que la planta y los HMA comienzan a interactuar, la dinámica en el tiempo de inducción de mecanismos de defensa debe disminuir, si se considera que pasan de una fase de estrés biótico a simbioses, lo que se puede predecir por el rápido establecimiento de las señales que se establecen entre ambas partes.

Los resultados de inducción temprana de β 1, 3 glucanasa, así como la detección de niveles basales en las plantas sin micorrizar coinciden con los informados por Noval (2004), al encontrar niveles de activación de la enzima desde horas tempranas de la colonización.

La existencia de un máximo de actividad enzimática en las plantas inoculadas con *G. hoi*-like en el inicio de la dinámica de actividad de β 1,3 glucanasa indica que la presencia del HMA en la raíz, induce la activación de esta enzima, que además de actuar en los procesos de diferenciación celular, participa en la degradación de las paredes celulares de los hongos que contienen β 1,3 glucanos (Gianinazzi-Pearson *et al.*, 1996), lo que permite este reconocimiento entre la planta y los hongos micorrizicos empleados y que es más evidente para la cepa *G. hoi*-like.

De igual forma, las quitinasas presentes en las plantas generan la producción de elicitores que inducen respuestas más débiles en plantas micorrizadas que en aquellas que se enfrentan a microorganismos patógenos (Harrison, 2005; Pazskowski, 2006b).

Los niveles basales de actividad para ambas enzimas podrían estar asociados con procesos de diferenciación celular, según lo informado por Collinger *et al.* (1993) y Vázquez-Garcidueñas *et al.* (1998).

La elevación de las actividades enzimáticas al inicio de la dinámica realizada, seguida por una disminución rápida que llega hasta los niveles basales de actividad, supone una interacción y reconocimiento entre las plantas y el HMA. Está demostrado que esto hace que cese la respuesta defensiva por parte de la planta (Gadkar *et al.*, 2001) y que el reconocimiento de los simbiontes suprime rápidamente los patrones defensivos de la misma (Harrison, 2005).

4.3 Estudio de la inducción, local y sistémica, de PRs en plantas de tomate inoculadas con las dos cepas de HMA

Se considera fundamental la determinación de los niveles de colonización entre experimentos aun cuando se utiliza el mismo modelo experimental ya que se ha encontrado diferencias en los niveles de estas variables (Rivera *et al.*, 2007) y en dependencia de los niveles de representación de estos simbiontes en la rizosfera, son los cambios que se inducen en las plantas, por lo que el término eficientemente micorrizadas define a las plantas que presentan estructuras de intercambio en valores similares a los informados por otros autores en una condición edáfica dada (Rivera *et al.*, 2007), por lo que se presentan los valores de ocupación fúngica (DV) y colonización encontrados en cada caso.

El análisis del efecto de la inoculación de plantas de tomate con HMA a través del parámetro de la masa fresca foliar y de raíz, permitió tener una idea general del efecto de las cepas de HMA seleccionadas sobre el crecimiento de las plantas. En el caso de la masa fresca de la parte aérea se observaron diferencias entre las cepas y entre estas y el control en el día 21, las que fueron rápidamente superadas por la cepa *G. hoi-like* en el día 24 (Figura 13A). Para la masa fresca de la raíz, se demostró que las cepas superaron al control sin inocular en el día 24 y que esta promoción del crecimiento de la raíz siempre fue superior para la cepa *G. hoi-like* (Figura 14B). Aun cuando se conoce que la masa fresca no es una medida para seguir los cambios en el crecimiento vegetal debido a que está sujeta a variaciones promovidas por el crecimiento y por errores experimentales (Bashan y de-Bashan, 2005; Hernández *et al.*, 2008), en el presente trabajo se evidenció que el comportamiento de la masa fresca, permitió utilizarlo como un indicador del crecimiento.

En el caso de la masa fresca de raíz se observó para *G. mosseae* valores similares en el día 21 al testigo sin inocular, que resultaron superiores para *G. hoi-like*. Estos valores fueron superiores en el día 24 para todos los tratamientos; dado que las especies del género *Glomus* presentan una alta estabilidad funcional en suelos con alta o media fertilidad donde suelen ser competitivas y efectivas (Rivera *et al.*, 2007). Sin embargo, los niveles obtenidos de masa fresca de raíz para *G. hoi-like*, no se correspondieron con los de la masa fresca de la parte aérea obtenidos.

Al relacionar este parámetro con los valores de ocupación fúngica presentados en la Figura 12, se observó que la cepa *G. hoi-like* indujo una respuesta positiva sobre las plantas de tomate de la variedad Amalia, lo que demuestra que supera rápidamente los estadios de parasitismo y ejerce un efecto beneficioso sobre el desarrollo vegetativo de las plantas y promueve el desarrollo del sistema radical del cultivo con valores superiores a los alcanzados por la otra cepa. Esto demuestra que las condiciones de pH y fertilidad del sustrato empleadas permiten los mayores niveles asociativos de esta cepa; no obstante, dada la alta especificidad que presenta *G. mosseae* con el cultivo del tomate (Rivera *et al.*, 2007), los valores de D.V fueron similares a los obtenidos con *G. hoi-like*. Algunos autores han obtenido resultados con tendencias similares a las de este trabajo (Morgan *et al.*, 2005, Pazkowski, 2005) y señalan que las asociaciones micorrízicas establecen un flujo bidireccional de nutrientes; la planta suministra fuente carbonada hacia el HMA y el hongo nutrientes minerales hacia la planta que favorecen su crecimiento y desarrollo, lo que en este trabajo se demostró a través del efecto sobre la masa fresca.

El establecimiento de la red micorrízica ofrece un número de ventajas básicas para la adquisición de nutrientes minerales dado que la hifa fúngica se extiende más allá del área de insuficiencia de nutrientes cercano a la raíz, además de que pueden acceder a formas de N y P no orgánicas que no están disponibles a plantas no inoculadas con HMA (Morgan *et al.*, 2005; van Aarle y Olsson, 2008).

Por otro lado, diversos autores plantean que las plantas ejercen una acción selectiva sobre las comunidades microbianas que aparecen en su rizosfera (Bashan *et al.*, 1996; Hernández *et al.*, 2004; Acebo *et al.*, 2007; Rives *et al.*, 2007) debido a que diversas especies de plantas tienen diferentes ensamblajes con los HMA en sus sistemas radicales, lo que indica que hay diferencias entre las preferencias HMA-planta hospedante (Vandenkoornhuyse *et al.*, 2003; Morgan *et al.*, 2005), lo que pudiera explicar los resultados de esta investigación donde se reafirma que la cepa *G. hoi-like* es la más asociativa en la interacción con las plantas de tomate de la variedad Amalia bajo las condiciones de fertilidad del sustrato empleadas (Rivera *et al.*, 2007).

Por otra parte, en todos los casos las dinámicas de inducción de PR proteínas presentadas en el primer y tercer experimento, mostraron similares tendencias, no solo en el momento de la inducción, sino que estadísticamente presentaron valores equivalentes. En las condiciones de sustrato empleadas los resultados son altamente reproducibles con las dos cepas más promisorias e indican que la presencia y funcionamiento de las cepas no varía en el tiempo, lo que es de gran utilidad en la práctica agronómica.

Se apreció que la inducción de PRX en las plantas tratadas con *G. hoi-like* es sistémica, a diferencia de lo ocurrido con *G. mosseae* donde la inducción fue local (Figura 15). Estos resultados demuestran que esta cepa podría tener mayores potencialidades para disminuir los

daños provocados por patógenos foliares en las condiciones de fertilidad del sustrato empleadas. Sin embargo, para los otros sistemas enzimáticos determinados (PR2 y PR3) no se observó inducción sistémica.

Las plantas tratadas con los HMA en estudio no difieren de forma significativa con las plantas testigo en cuanto a la actividad de β 1,3 glucanasa y quitinasa, lo que manifiesta que en la interacción no se aprecia la inducción de respuesta del tipo sistémica para estas enzimas. Se debe destacar que aun cuando se observó actividad enzimática en ambos órganos de la planta, ésta no puede considerarse respuesta sistémica inducida por las cepas de HMA incluidas en el estudio porque no superan de forma significativa a las plantas sin inocular en los diferentes tiempos.

Este comportamiento podría explicarse a través de la hipótesis planteada por Lambais y Mehdy (1993), que señalan que la rápida movilización de las respuestas defensivas resulta en la producción de supresores por parte del hongo micorrízico arbuscular que previenen el reconocimiento del elicitor.

Algunos autores (Lambais y Mehdy, 1993; Morgan *et al.*, 2005; Harrison, 2005), coinciden en plantear que los HMA inducen respuestas que son subsecuentemente reprimidas. Si se considera que las fases iniciales de la micorrización inducen estrés biótico y respuestas de defensa que son rápidamente suprimidas cuando comienza la fase de simbiote, es lógico que no se observen respuestas sistémicas en la investigación desarrollada en esta tesis. Estos resultados demuestran que la inducción de resistencia para ambas cepas de HMA es rápida y que en un corto período de tiempo se alcanza la fase de simbiote, lo que indica la supresión de este tipo de respuesta. Pozo y Azcón-Aguilar (2007), señalaron que no se conoce de la acumulación sistémica de PR proteínas, ácido salicílico o la expresión de genes marcadores asociados con la resistencia sistémica adquirida en plantas micorrizadas. Lo anteriormente planteado señala la importancia de desarrollar bioensayos *in vivo* para comprobar el efecto de los hongos micorrízicos arbusculares sobre las respuestas de las plantas ante el ataque de patógenos, con énfasis en los patógenos foliares ya que como se pudo apreciar no se observó inducción de respuestas sistémicas por la inoculación con estas cepas.

4.4 Efecto de los HMA seleccionados sobre la severidad de las enfermedades causadas por *Phytophthora nicotianae*, *P. infestans*, *Alternaria solani* y *Oidiopsis taurica*

En el presente estudio se comprobó que en todos los momentos las dos especies de HMA se encuentran representadas en altos valores en la micorrizósfera, dado los niveles de densidad visual observados para la edad del cultivo, lo que se corresponde con lo señalado por Rivera *et al.* (2007). Los HMA son inductores de mecanismos de defensa y por tanto, pueden influir en los estrés bióticos de las plantas (Li *et al.*, 2006; de la Peña *et al.*, 2006); sin embargo, la premisa fundamental para lograr resistencia inducida por los HMA es que la asociación micorrízica esté

bien establecida (Slezack *et al.*, 2000; Khaosaad *et al.*, 2007; Pozo y Azcón-Aguilar, 2007; Vierheilig *et al.*, 2008).

Para el caso de las plantas que se enfrentaron a patógenos de raíz, no se observó efecto protector de los HMA en la interacción tomate- *P. nicotianae*-HMA y para *P. infestans* se observó una disminución limitada a especie de la severidad de la enfermedad en las plantas inoculadas con *G. hoi*-like.

Para *P. nicotianae*, la mayoría de los sistemas enzimáticos estudiados fueron reprimidos o disminuidos en comparación con las plantas en la misma condición pero sin el patógeno. Se debe destacar que la intensidad de la enfermedad producida por *P. nicotianae* fue alta y sin diferencias significativas con el control sin inocular. Se encontró una relación inversa entre esta variable y los niveles de las enzimas de defensa en raíz que fueron bajos.

A pesar de existir poca información en la literatura que avalen este comportamiento, se describe por algunos autores (Gianinazzi, 1991; Gianinazzi-Pearson *et al.*, 1995; Gianinazzi-Pearson *et al.*, 1996; Cordier *et al.*, 1998) que las hifas de *P. parasitica* nunca han sido observadas en células colonizadas por HMA y señalan que probablemente las células que contienen arbusculos están de alguna forma relacionadas con la baja inducción de proteínas de defensa de la planta en presencia del HMA en esta célula. Esta hipótesis podría explicar los resultados de este trabajo donde se encontró una relación inversa entre las proteínas relacionadas con la patogenicidad (PR2 y PR3) y la PAL, con el nivel de afectación de las plantas, producido por este patógeno.

No obstante a lo anterior, Cordier *et al.* (1996), Pozo *et al.* (1999) y Pozo *et al.* (2002), señalaron que las plantas micorrizadas forman estructuras papilares alrededor del sitio de infección del patógeno, previniendo la diseminación del mismo y acumulan cantidades significativas de PR1a y β 1-3 glucanasa básica, en comparación con las plantas no micorrizadas.

Algunos autores avalan que el mecanismo de competencia por el sitio de infección podría explicar la disminución de la severidad de la enfermedad en plantas inoculadas con HMA (Whipps, 2004; Barea *et al.*, 2005), sin embargo en este estudio no se observaron efectos significativos entre las plantas sin inocular y las inoculadas con HMA al enfrentarse con los patógenos, aún cuando fueron detectados niveles adecuados de colonización micorrízica de la raíz, lo que indica que no es este precisamente el mecanismo involucrado en los resultados que se presentan.

Este principio de competencia por el sitio de infección, se postuló para explicar la protección ejercida por los HMA en las plantas, sin embargo no es aplicable a todas las combinaciones de planta-HMA. Se han observado diferencias en cuanto a la protección del cultivo, algunas especies tienen la capacidad de inducirla y otras no. En este trabajo solo se encontró protección de las plantas de tomate para *P. infestans*, influenciada por el tipo de especie micorrízica empleada. Barea *et al.* (2005) planteó que el efecto no se ejerce con la misma efectividad por todas las

combinaciones microbianas y no es aplicable a todos los patógenos, sustratos y condiciones ambientales. Se debe señalar que las especies del género *Glomus* se recomiendan para suelos con niveles de fertilidad de media a alta (Rivera *et al.*, 2007), sin embargo a pesar de considerarse efectivas en esta combinación de sustrato, no se demostró que las combinaciones suelo-HMA-*Phytophthora* empleadas, resultaran efectivas en la protección contra patógenos de raíz.

Se han postulado diferentes mecanismos para explicar el papel de los HMA en la protección de plantas, entre los que se encuentran mejoras en la nutrición, compensación del daño, competencia por los sitios de colonización o los fotosintatos, cambios en el sistema radical y en las poblaciones microbianas en la rizosfera y la activación de los mecanismos de defensa. Estos mecanismos pueden estar operando simultáneamente con diferentes contribuciones dependiendo de las condiciones ambientales, el tiempo de interacción y las partes involucradas en la interacción planta-HMA (Azcón-Aguilar y Barea, 1996; Whipps, 2004; Pozo y Azcón-Aguilar, 2007; Vierheilig *et al.*, 2008).

La inducción del ácido salicílico (AS) es el mecanismo que coordina la defensa efectiva contra patógenos biotróficos, mientras que la producción de ácido jasmónico (AJ) es el mecanismo principal contra patógenos necrótrofos (Ton *et al.*, 2002; Glazebrook, 2005). Los genes involucrados en la síntesis del AJ están sobreexpresados en células que contienen arbusculos, y las raíces micorrizadas se asocian con un incremento endógeno del jasmonato (Franken *et al.*, 2007; Pozo y Azcon-Aguilar, 2007), lo que determina condicionamiento de la respuesta defensiva de estos microorganismos contra patógenos (Conrath, 2006).

Como biótropos, los HMA comparten similitudes con los patógenos biotrófos, por lo que su sensibilidad a las respuestas defensivas reguladas por AS es pobre (Guimil *et al.*, 2005; Paszkowski, 2006). De acuerdo a este planteamiento, es probable que los HMA repriman en la planta hospedante, las respuestas defensivas dependientes de AS para lograr una interacción compatible (Pozo y Azcón-Aguilar, 2007).

Existen evidencias que vinculan la vía del jasmonato con la deposición de calosa y el aumento de la resistencia contra oomycetes (Harniduzzarnan *et al.*, 2005). Esta vía metabólica se vincula con la formación de papilas en tomates micorrizados ante la infección con *Phytophthora* (Cordier *et al.*, 1998). Sin embargo, Pozo y Azcón-Aguilar (2007) proponen que una micorrización funcional implica la supresión parcial de las respuestas dependientes del AS en la planta, compensado por un incremento de las respuestas reguladas por AJ. Esto resultaría en un condicionamiento de los mecanismos de defensa dependientes de AJ y explicaría el espectro de efectividad descrito para la resistencia inducida por micorrizas, incrementando la susceptibilidad a patógenos biótropos e incrementando la resistencia a necrótrofos.

Se conoce que la resistencia a *Phytophthora*, en papa y tabaco, es dependiente de la activación de una respuesta hipersensitiva (HR) intensa y rápida, para bloquear el progreso del patógeno al interior de la planta (Jones y Dangl, 2006). En este proceso ocurre la acumulación de especies activas de oxígeno regulada, entre otros, por el ácido salicílico (AS) (Stennis *et al.*, 1998; Desender *et al.*, 2007), produciéndose la activación de la muerte celular hipersensitiva, la que tiene un efecto protector contra patógenos biotróficos (Govrin y Levine, 2000).

Sin embargo hay un solapamiento en el espectro de eficiencia, especialmente en aquellos con estilo de vida intermedios como el caso de *Phytophthora* spp. (Pozo *et al.*, 2004; Thaler y Bostock, 2004). Se han realizado grandes esfuerzos para determinar la interacción dentro de la red de regulación de defensa y el intercambio de señales entre las vías del ácido salicílico y el jasmónico (Bostock, 2005; Beckers y Spoel, 2006).

En este sentido, el mecanismo propuesto para la activación de defensa contra *Phytophthora* por Jones y Dangl (2006), podría explicar los resultados presentados en el estudio, al encontrarse disminuidos los niveles de protección contra este patógeno. Este comportamiento está relacionado además con la variedad de tomate empleada como modelo, que se considera medianamente resistente a *Phytophthora*, por lo que no se obtuvieron diferencias entre las plantas micorrizadas y sin micorrizar para *P. nicotianae*, aunque se evidenciaron diferencias en los niveles protectivos entre cepas para *P. infestans*, destacándose *G. hoi*-like. Es importante destacar que las cepas de patógenos empleadas en este estudio se informan como altamente virulentas (Toledo, 2008), lo que garantiza que los resultados sean representativos de lo que se puede encontrar en condiciones de campo.

Se ha informado la acumulación de especies reactivas de oxígeno, la activación de la vía de los fenilpropanoides y la acumulación de isoformas específicas de enzimas hidrolíticas como quitinasas y glucanasas en raíces micorrizadas. Estas reacciones generalmente se describen como respuestas localizadas que desempeñan un papel en el control y establecimiento de la simbiosis (Dumas-Gaudot *et al.*, 2000; Pozo *et al.*, 2002; García-Garrido y O'campo, 2002; Hause *et al.*, 2007; Schliemann *et al.*, 2008).

En el presente estudio, se evidenció que la inducción de estos mecanismos resultaba en una inducción local, sin embargo los patrones de inducción variaron frente al ataque de *Phytophthora* spp. Para el caso de las peroxidases, las plantas micorrizadas disminuyeron los niveles de activación, a nivel local y sistémico. Este comportamiento es normal, si consideramos que la inducción de las especies activas de oxígeno es dependiente de la vía del ácido salicílico (Desender *et al.*, 2007) y que en el caso de las plantas micorrizadas hay una supresión parcial de las respuestas dependientes de esta vía (Pozo y Azcón-Aguilar, 2007).

La vía de los fenilpropanoides tampoco mostró diferencias entre las plantas micorrizadas, independientemente de la presencia del patógeno. La supresión de la inducción de la quitinasa se debe a que el género *Phytophthora* no contiene quitina en su pared celular (Bernicki-García, 1968) y por tanto por principio de economía celular la inducción de esta enzima se ve limitada.

Diferentes autores relacionan la defensa contra *Phytophthora* en las plantas de tomate micorrizadas con la inducción de glucanasas (Cordier *et al.*, 1996; Pozo *et al.*, 1999; Pozo *et al.*, 2002). Sin embargo en el presente estudio, se observó que para *P. nicotianae*, no hubo diferencias entre las plantas micorrizadas y sin micorrizar, en relación con la actividad de esta enzima, por lo que no se observó diferencias en los niveles protectivos entre las plantas de estos tratamientos. Cuando las plantas se enfrentaron a *P. infestans*, se evidenciaron diferencias en los niveles de inducción, que resultaron significativas entre las plantas micorrizadas con *G. hoi-like* y las no micorrizadas, lo que podría estar asociado con la disminución de la severidad de los daños producidos por este patógeno.

De forma general, las plantas micorrizadas con *G. hoi-like*, indujeron disminución de la severidad de la enfermedad para *P. infestans* y no se observó efecto para *P. nicotianae*. La otra especie micorrízica no mostró efecto sobre la disminución de la severidad de los síntomas provocados por los patógenos de raíz.

Cuando las plantas micorrizadas con las dos cepas se enfrentaron con los patógenos foliares, como el caso de *A. solani*, se observó un efecto diferencial entre las cepas de HMA utilizadas, logrando las plantas inoculadas con *G. hoi-like* una disminución significativa del tizón temprano. Se mostraron diferencias con las plantas inoculadas con *G. mosseae* que resultaron más afectadas que las plantas control sin micorrizar. Estos resultados demuestran que la cepa de HMA es un factor determinante en la protección de las plantas de tomate de la variedad Amalia contra este patógeno, bajo las condiciones de sustrato empleados. Las dos cepas de HMA protegen a las plantas de tomate contra *O. taurica*, aunque *G. hoi-like* se destacó por el mejor comportamiento.

En el caso particular de estos dos microorganismos, se evidencian diferencias en cuanto a los niveles de tolerancia/resistencia entre aislados de HMA (Pozo y Azcón-Aguilar, 2007). Estas diferencias en cuanto a los niveles protectivos, se observaron aún cuando ambas cepas de HMA estaban representadas en niveles altos en la micorrizosfera.

En este estudio los niveles de inducción enzimática no lograron diferenciar entre especies micorrízicas para los niveles protectivos, por lo que se puede inferirse que probablemente algún metabolito deba estar relacionado con la capacidad protectora de la cepa. En este sentido, se conoce que los cambios en los compuestos fenólicos que se presentan en la interacción planta-patógeno están involucrados en la resistencia contra las enzimas del microorganismo invasor, de forma que limita el crecimiento de este y constituye una barrera al avance de los patógenos (Dixon

2001; Hahlbrock *et al.*, 2003). Schliemann *et al.* (2008) encontraron diferencias en la inducción de tyrosol, metabolito que exhibe actividad antifúngica, producido por los HMA en dependencia de la especie de micorriza empleada (Tarus *et al.*, 2003; Slininger *et al.*, 2004).

Algunos autores señalan que la defensa de las plantas contra las afectaciones por *A. solani* no son dependientes de la inducción de la actividad β 1,3 glucanasa (Solórzano 2002, Noval, 2008). En este estudio no se observaron diferencias en la inducción de la actividad de esta enzima para ninguna de las dos especies de HMA utilizadas, lo que corrobora esta afirmación. Aunque Solórzano (2002), plantea que la inducción de quitinasa es fundamental para la disminución de las afectaciones producidas por el patógeno, en este estudio tampoco se encontraron diferencias en la inducción de la actividad de la enzima por la micorrización. Sin embargo, hubo diferencias en la afectación producida por el patógeno entre las dos especies de HMA. Adicionalmente la inducción de la actividad PRX en hojas fue diferencial entre cepas y de forma similar, donde la actividad fue mayor, las plantas resultaron más sensibles frente a este patógeno. Estos resultados no se corresponden con los informados por Solórzano (2002) quien considera que los aumentos en las actividades de β 1,3 glucanasa y peroxidasa determinan la disminución de los daños en las plantas enfrentadas a *A. solani*.

En el caso de las plantas que se enfrentaron a *O. taurica*, se observó una relación directa entre la severidad de los daños encontrados y los niveles de actividad de quitinasa en raíz y hojas, peroxidasa en raíz y glucanasa en hojas; sin embargo, la actividad de glucanasa y PAL en raíz, se relacionaron inversamente con la severidad del daño.

En las plantas micorrizadas los niveles de AJ se incrementan con respecto a las plantas sin micorrizar (Meixner *et al.*, 2005; Stumpe *et al.*, 2005; Franken *et al.*, 2007) 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 (Devoto y Turner, 2005; Lorenzo y Solano, 2005; Hause *et al.*, 2007). Para el caso de *Oidiopsis taurica*, se observó que la disminución de los daños estaba relacionada con el aumento de la inducción de β 1,3 glucanasa y PAL, mecanismos que se inducen por la vía del jasmonato con lo que se ratifica lo planteado por Pozo y Azcón-Aguilar (2007).

El diseño de este experimento, sólo permitió evaluar los niveles de actividad de las enzimas en el momento del daño y para asociar la actividad de estas enzimas con el nivel de protección encontrado, se requiere de una dinámica temporal de estas a partir de la inoculación con el patógeno.

De forma general, no se obtuvo respuesta sistémica atendiendo a las enzimas en estudio lo que está en concordancia con lo planteado por Pozo y Azcón-Aguilar (2007), aunque la presencia del patógeno produjo una inducción mayor de algunas de las PRs en los casos de las plantas

enfrentadas con *A. solani* y *O. taurica*. Sin embargo, la elevación en los niveles de actividad de una enzima particular no es suficiente para predecir el comportamiento de las plantas frente al ataque del patógeno (Noval, 2008), sino que la combinación de los sistemas enzimáticos en la planta es la responsable de la disminución de los daños, lo que se demostró a través del análisis multivariado.

Los avances recientes atendiendo a la señalización de los procesos en las asociaciones mutualistas y patogénicas han permitido la mejor comprensión de las interacciones de las plantas con el ambiente. El espectro de la resistencia inducida por micorrizas se asocia con el condicionamiento por una activación eficiente de los mecanismos de defensa frente al ataque de patógenos (Conrath *et al.*, 2006). Esta resistencia de bajo costo puede ser la principal razón que explique por qué los hongos micorrízicos se han conservado durante la evolución y están tan extendidos entre las especies de plantas en el planeta y que no está restringida solo a las áreas micorrizadas, sino que se extiende a toda la planta (Pozo y Azcón-Aguilar, 2007).

Dentro de las especies empleadas en este estudio los resultados que se obtuvieron con *G. hoi*-like corroboran las potencialidades de esta cepa en la protección de patógenos foliares e incrementa su importancia práctica en el manejo integrado de enfermedades que afectan al cultivo.

Consideraciones generales

El efecto rizosfera para las micorrizas depende de tres factores fundamentales: el hongo, la planta y el suelo en el que se desarrolla la interacción. El sistema de recomendación de cepas del INCA está basado en la fertilidad de los suelos, de esta forma se recomienda una cepa o grupo de cepas de HMA en dependencia de los niveles de fertilidad (Rivera *et al.*, 2007). Esta recomendación permite que la micorriza que se establece en tal asociación sea la más eficiente según el tipo de suelo y con ellos se logra no solo que los niveles de colonización sean altos sino también que la eficiencia micorrízica entendida como el mecanismo por el que se logran los niveles nutricionales más altos de la planta favorecido por la interacción, sea superior.

Se conoce además que durante el establecimiento de la simbiosis las señales moleculares que se establecen entre la planta y el HMA permiten la germinación, penetración y el desarrollo intraradical de estos HMA (Gao *et al.*, 2004), sin embargo la planta responde con un aumento transiente de los niveles de PR proteínas dado que en un inicio reconocen a estos HMA como patógenos con el consecuente aumento (Barrer y Tagu, 2000; Salzer y Boller, 2000; Gao *et al.*, 2004). En la medida que se establece la micorrización por un diálogo coordinado entre los simbiontes, estas respuestas son subsecuentemente reprimidas y esto está determinado por los genes *sym* que apagan esta respuesta (Harrison, 2005; Giovannetti, 2008).

En este trabajo se ha observado el efecto de la cepa de HMA *G. hoi*-like en la bioprotección del cultivo del tomate variedad Amalia, asociado con un nivel centinela de respuestas de defensa en la

planta que permite el condicionamiento rápido de la respuesta defensiva ante el patógeno con la consiguiente disminución de la severidad de la enfermedad, por enfrentamiento directo de las respuestas de las plantas ante el patógeno y por el hecho de que una planta mejor nutrida está más preparada para tolerar la enfermedad (Pozo y Azcón-Aguilar 2007; Vierheiling *et al.*, 2008). Teniendo en cuenta estos aspectos, se considera que este mecanismo es común a otras variedades de tomate de tipo determinado y que esta cepa puede ser aplicada como parte del manejo integrado de plagas en el cultivo del tomate en las condiciones de sustrato recomendada y no como la solución única a la incidencia de estos patógenos en campo.

Conclusiones

1. Las cepas de HMA *Glomus hoi-like* y *G. mosseae* inducen mayor micorrización y mejores respuestas defensivas en plantas de tomate de la variedad Amalia, en las condiciones de sustrato empleadas, transitando entre cinco y siete días más rápido de la fase de estrés biótico a simbiote.
2. Las cepas *G. hoi-like* y *G. mosseae* activan señales moleculares rápidas que provocan la inducción de proteínas defensivas temporalmente atenuadas a nivel local.
3. *G. hoi-like* mostró una mayor efectividad contra patógenos foliares (*A. solani* y *O. taurica*) y de raíz (*P. infestans*), reduciendo la severidad de los daños provocados por los microorganismos patógenos analizados.
4. Las enzimas PR-2, PR-3, PR-9 y PAL no están involucradas de forma independiente con los mecanismos defensivos frente a la infección por los patógenos.
5. La bioprotección contra patógenos del tomate por HMA está relacionada con los niveles centinelas de las PR proteínas con lo cual produce un condicionamiento de la respuesta defensiva de la planta y la consiguiente disminución de la severidad de la enfermedad.

Recomendaciones

1. Realizar otros estudios básicos de dinámica temporal que permitan profundizar en la inducción de actividad enzimática asociada a la defensa contra patógenos a partir de su inoculación en plantas micorrizadas.
2. Desarrollar estudios in situ que permitan profundizar en la interacción patógeno- HMA-planta de la variedad Amalia para determinar si la protección de la planta se mantiene durante todo el ciclo del desarrollo del cultivo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abramovitch, RB.; Martin, GB. (2004). Strategies used by bacterial pathogens to suppress plant defenses. *Curr. Opin. Plant Biol.* 7:356–64.
2. Acebo, Y.; Rives, N.; Heydrich, M.; Hernández, A. (2007). Plant growth promoting effect of *Azospirillum* sp. in rice crop. *Cultivos Tropicales*, 28:29-32.
3. Agrios, GN. (2005). *Plant Pathology*. Fifth edition. Academic Press. San Diego. 922p.
4. Akiyama, K.; Matsuzaki, K.; Hayashi, H. (2005). Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature* 435: 824-827.
5. Alexander, AG. (1964). Sucrose enzyme relationship in immature sugar cane. *J. Agric of Univ. of P. Rico*. 4813: 165-231.
6. Altieri, MA. (1997). *Agroecología. Bases científicas para la agricultura sustentable*. CLADES. ACAO. Tercera Edición. La Habana. 240p.
7. Álvarez, M.; Moya, C.; Domini, ME.; Arzuaga, J.; Martínez, B.; Pérez, S.; Cuartero J. (2004). Amalia: A medium-fruit-size, heat-tolerant tomato cultivar for tropical conditions. *Hort. Science* 39: 1503-1504.
8. Azcón-Aguilar, C.; Barea, JM. (1996). Arbuscular mycorrhizas and biological control of soil-borne plant pathogen: an overview of the mechanisms involved. *Mycorrhiza*(6): 457-464.
9. Baar, J. (2008). From production to application of arbuscular mycorrhizal fungi in agricultural systems: requirements and needs. In: *Mycorrhiza*. Third Edition. Ed Ajit Varma pp361-374.
10. Bago, B.; Pfeffer, PE.; Shachar-Hill, Y. (2000). Carbon metabolism and transport in arbuscular mycorrhizas. *Plant Physiology* 124: 949-958.
11. Barea, JM.; Pozo, MJ.; Azcon, R.; Azcon-Aguilar, C. (2005). Microbial co-operation in the rizosphere. *J of Experimental Botany* 56: 1761-78.
12. Barrer, SJ.; Tagu, D. (2000). The roles of auxins and cytokinins in mycorrhizal symbiosis. *J. Plant Growth Regul.* 19: 144-154. Barrer y Tagu, 2000.
13. Bashan, Y.; de-Bashan, LE. (2005). Fresh Weight measurements of roots provide inaccurate estimates of the effects of plant growth-promoting bacteria on root growth: a critical examination. *Soil Biol. And Biochem.* 37: 1795-1804.
14. Bashan, Y., Holguín, G., Ferrera-Cerrato, R. (1996). Interacciones entre plantas y microorganismos benéficos. *Terra*. 14:159–192.
15. Becard G, Kosuta S, Tamasloukht M, Sejalon-Delmas N, Roux C.(2004). Partner communication in the arbuscular mycorrhizal interaction. *Can. J. Bot. Rev. Can. Bot.* 82:1186.

16. Beckers, GJM.; Spoel, SH. (2006). Fine-tuning plant defense signalling: salicylate versus jasmonate. *Plant Biol.* (8) 1-10.
17. Beerhues, L.; Kombrink, E. (1994). Primary structure and expresión of mRNAs encoding basic chitinase and β -1,3-glucanase in potato. *Plant. Mol Biol.* 24: 353-367.
18. Benedetto, A.; Magurno, F.; Bonfante, P.; Lanfranco, L. (2005). Expression profiles of a phosphate transporter gene (*GmosPT*) from the endomycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *Mycorrhiza*.15: 620-627.
19. Bernicki-Garcia, S. (1968). Cell wall chemistry, morphogenesis and taxonomy of fungi. *Annu. Rev. Microbiol.* 22: 87-108.
20. Blee, KA.; Anderson, AJ. (1996). Defense-related transcript acumulation in *Phaseolus vulgaris* L. colonized by the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. Schenk and Smith. *Plant Physiol.* (110): 675-688.
21. Boller, T. (1995) Chemoperception of microbial signals in plant cells. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 46:189-214.
22. Boller, T.; Geheri, A.; Mauch, F.; Vogeli, U. (1983). Chitinase in bean leaves: induction by ethylene, purification, properties and possible function. *Planta* 157:22-31.
23. Bonanomi, A.; Wiemken, A.; Boller. T.; Salzer, P. (2001). Local induction of a mycorrhiza-specific class III chitinase gene in cortical root cells of *Medicago truncatula* containing developing or mature arbuscules. *Plant Biol.* 3:194-199.
24. Bonfante-Fasolo, P; Faccio, A; Perotto, S, Schubert, A. (1990). Correlation between chitin distribution and cell wall morphology in the mycorrhizal fungus *Glomus versiforme*. *Mycol. Res.* 94:157-65
25. Bonfante-Fasolo, P.; Scannerini, S. (1992). The cellular basis of plant-fungus interchanges in mycorrhizal associations. In *Functioning Mycorrhizae*, ed. M Allen, pp. 65-101. New York/London: Chapman & Hall
26. Bonfante-Fasolo, P.; Perotto, S (1995). Strategies of arbuscular mycorrhizal fungi when infecting host plants. *New Phytol.*, 130:3-21.
27. Bostock, RM. (2005). Signal crosstalk and induced resistance: straddling the line between cost and Benefit. *Ann. Rev Phytopathol.* (43): 545-580.
28. Bowen, GD. (1987). The Biology and Physiology of infection and its development. En: Safir, G.R. *Ecophysiology of VA Mycorrhizal Plants*. CRC Press. Boca Raton. p 27-57.
29. Bradford, MM. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.*, 73:248-250.

30. Breuninger, M.; Requena, N. (2004). Recognition events in AM symbiosis: analysis of fungal gene expression at the early appressorium stage. *Fungal Genet. Biol.* 41:794–804.
31. Brooker, RW. (2006) Plant–plant interactions and environmental change . *New Phytologist*. 171: 271–284.
32. Bucher, M. (2007) Functional biology of plant phosphate uptake at root and mycorrhiza interfaces *New Phytologist*. 173: 11–26.
33. Buee, M.; Rossignol, M.; Jauneau, A.; Ranjeva, R.; Becard, G. (2000) The pre-symbiotic growth of arbuscular mycorrhizal fungi is induced by a branching factor partially purified from plant root exudates. *Molecular Plant-Microbe Interaction* 13: 693–698.
34. Castaño-Zacata, J.; del Río Mendoza, L. (1994). *Guía para el Diagnóstico y Control de Enfermedades en Cultivos de Importancia Económica*. 3ra. Edición. Zamorano, Honduras: Zamorano Academic Press. 302p.
35. Cavagnaro, TR.; Gao, LL.; Smith, AF; Smith, SE. (2001). Morphology of arbuscular mycorrhizas is influenced by fungal identity. *New Phytol.* 151:469–75
36. Chabaud, M.; Venard, C.; Defaux-Petras, A.; Becard, G.; Barker, DG. (2002). Targeted inoculation of *Medicago truncatula in vitro* root cultures reveals MtENOD11 expression during early stages of infection by arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol.* 156:265–73.
37. Chengwei, L.; Bonnema, G.; Che, D.; Dong, L.; Lindhout, P.; Visser, R.; Bai, Y. (2007). Biochemical and molecular mechanisms involved in monogenic resistance responses to tomato powdery mildew. *MPMI* 20 (9): 1161-1171.
38. Chisholm, ST.; Coaker, G.; Day, B.; Staskawicz, BJ. (2006). Host–microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. *Cell* 124: 803–814.
39. Collinger, DB.; Kragh, KM.; Mikkelsen, LD.; Nielsen, KK.; Rasmussen, U.; Vad, K. (1993) Plant chitinases. *Plant J.* 3: 31-40.
40. Conrath, U.; Beckers, GJM.; Flors, V.; García-Agustín, P.; Jakab, G.; Mauch, F.; Newman, M.A; Pieterse, CM.J.; Poinssot, B.; Pozo, M.J.; Pugin, A.; Schaffrath, U.; Ton, J.; Wendehenne, D.; Zimmerli, L.; Mauch-Mani, B. (2006). Priming: Getting Ready for Battle *MPMI* 19 (10): 1062–1071.
41. Cordier, C.; Pozo M.J.; Barea, JM.; Gianinazzi S.; Gianinazzi-Pearson, V. (1998) Cell defense response associated with localized and systemic resistance to *Phytophthora parasitica* induced in tomato by an arbuscular mycorrhizal fungus *MPMI*, 11:1017-1028.

42. Cordier, C.; Trouvelot, A.; Gianinazzi, S.; Gianinazzi-Pearson, V (1996). Arbuscular mycorrhiza technology applied to micropropagated *Prunus avium* and to protection against *Phytophthora cinnamomi*. *Agronomie*. 16:679-688.
43. Cordier, C.; Gianinazzi, S.; Gianinazzi-Pearson, V. (1996) Colonization patterns of roots tissues by *Phytophthora nicotianae* var. *parasitica* related to reduced disease in mycorrhizal tomato. *Plant and Soil*. 185: 223-232.
44. Dangl, J.L., Jones, J.D.G. (2001). Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature*. 411 (14): 826-833.
45. Dangrois H.J.; Lafitte C.; Barthe P.J.; Touze, A. (1990). Induction of β 1-3 glucanase and chitinase activity in compatible and incompatible interactions between *Colectotrichum lindemuthianum* and bean cultivars. *J. Phytopathology*, 130:225-234.
46. Dangrois H.J., Lafitte C., Barthe P.J., Foucher, C., Touze, A. and Esquerre-Tugaye Marie-Therese. (1992). Purification and characterization of two basic β 1-3 glucanase induced in *Colectotrichum lindemuthianum* infected bean seedlings. *Arch. Biochem. Bioph.*, 292:468-474
47. Dassi, B., Dumas-Gaudot, E., Asselin, A., Richard, S., (1998). Chitinase, chitosanase and β 1,3 glucanase activities in *Allium* and *Pisum* roots inoculated with arbuscular mycorrhizal or pathogenic fungi. *Eur. J. Plant Pathol*. 102: 105-108.
48. Dayton, C.M.; Schafer, N.D. (1973). Extended Tables of t and chi square for Bonferroni Test with unequal Error Allocation. *JASA Assoc*. 68: 78-83.
49. de la Peña, E.; Rodriguez-Echeverria, S.; Putten, W.H.; Freitas, H.; Moens, M.; (2006): Mechanism of control of root-feeding nematodes by mycorrhizal fungi in the dune grass *Ammophila arenaria*. *New Phytol*, 169: 829-840.
50. Dell' Amico, J.M.; Rodríguez, P.; Torrecillas, A.; Morte, A.; Sánchez-Blanco, M.J. (2002) Influencia de la micorrización en el crecimiento y las relaciones hídricas de plantas de tomate sometidas a un ciclo de sequía y recuperación. *Cultivos Tropicales* 23 (1): 29-34.
51. Desender, S.; Andrivon, D.; Val, F. (2007) Activation of defence reactions in *Solanaceae*: where is the specificity? *Cellular Microbiology* 9(1): 21–30.
52. Devoto, A.; Turner, J.G. (2005): Jasmonate-regulated *Arabidopsis* stress signalling network. *Physiol. Plant* (123): 161-172.
53. Diedhiou, P.M., Hallmann, J., Oerke, E.C., Dehne, H.W. (2003) Effects of arbuscular mycorrhizal fungi and a non-pathogenic *Fusarium oxysporum* on *Meloidogyne incognita* infestation of tomato. *Mycorrhiza*. 13(4):199-204.

54. Dillard, HD.; Cole, T.; Hedges, A.; Turner, D; Utete, B; Mvere, A.; Wilkinson P. (1995). Early Blight of Tomatoes. Zimbabwe. Horticultural Crops Pest Management. NYSAES, Geneva NY. 2 pp.
55. Dixon, RA. (2001). Natural products and plant disease resistance. *Nature* 411: 843–847
56. Dodds, PN; Lawrence, GJ; Catanzariti, AM; Ayliffe, MA.; Ellis, JG. (2004). The *Melampsora lini* AvrL567 avirulence genes are expressed in haustoria and their products are recognized inside plant cells. *Plant Cell* 16:755–68.
57. Domini, ME (2000) Nuevas variedades y su tecnología en los cultivos de tomate y habichuela Informe final de Proyecto. Programa Ramal Agricultura Urbana. INCA.
58. Dugassa, G.D.; von Alten, H., Schönbeck, F. (1996) Effects of arbuscular mycorrhiza (AM) on health of *Linum usitatissimum* L. infected by fungal pathogens. *Plant Soil*. 185: 173-182.
59. Duijff, BJ.; Bakker, PAHM.; Schippers, B.. (1994). Supresión of fusarium wilt of carnation by *Pseudomonas putida* WCS358 at different levels of disease incidence and iron availability. *Biocontrol Science and Technology* 4: 279–288.
60. Dumas-Gaudot, E.; Gollotte. A.; Cordier, C, Gianinazzi, S, Gianinazzi- Pearson, V. (2000). Modulation of host defence systems. In *Arbuscular Mycorrhizas: Physiology and Function*. Edited by Kapulnik Y, Douds DDJ. Kluwer Academic Publishers: 173-200.
61. Dumas-Gaudot, E.; Asselin, A.; Gianinazzi-Pearson, V.; Gollotte, A.; Gianinazzi, S. (1994). Chitinase isoforms in roots of various pea genotypes infected with arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Sci*. 99: 27-37.
62. Dumas-Gaudot, E.; Slezack, S.; Dassi, B.; Pozo, MJ.; Gianinazi-Pearson, V.; Gianinazzi, S. (1996) Plant hydrolytic enzymes (chitinases and β 1,3 glucanase) in root reactions to psthogenic and symbiotic microorganisms. *Plant soil* 185: 211-221.
63. Edreva, A. (2005) Pathogens related proteíns: research progress in the last 15 years. *Gen appl. Plant Phisiol* 31(1-2): 105-124.
64. FAOSTAT. [Consultado octubre, 2008]. Disponible en: <http://faostat.fao.org/>
65. Felix, G.; Duran, JD.; Volko, S., Boller, T. (1999). Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin. *Plant J*. 18: 265–76.
66. Fernández, F.; Dell`Amico, JM.; Rodríguez, P. (2006). Efectividad de algunos tipos de inoculantes micorrízicos a base de *Glomus hoi* “like” en el cultivo del tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill. Var. Amalia). *Cultivos Tropicales*. 27 (3): 25-30.
67. Fernández, F.; Rodríguez, EL.; Gómez, R. (1999). Caracterización de la efectividad de un nuevo inoculante micorrizógono en poaceas. *Cultivos Tropicales*. 20: 9-14.

68. Fernández, F.; Gómez, R.; Vanegas, LF.; Noval, BM. de la; Martínez, MA. (2000). Oficina Nacional de Propiedad Industrial. Patente No. 22641.
69. Fernández, K.; Fernández, F.; González, ME.; Pérez, E.; Mirabal, L.; Pazos, M. (2002). Micorrización *in vitro* de plántulas de *Coffea canephora* var. Robusta: ¿Una realidad? Cultivos Tropicales. 23: 47-52.
70. Franken, P.; Donges, K.; Grunwald, U.; Kost, G.; Rexer, KH.; Tamasloukht, MB. Waschke, A.; Zeuske, D. (2007) Gene expression analysis of arbuscule development and functioning Phytochemistry 68: 68–74.
71. Frenzel, A.; Manthey, K.; Perlick, AM.; Meyer, F.; Puhler, A.; Kuster, H.; Krajinski, F. (2005). Combined transcriptome profiling reveals a novel family of arbuscular mycorrhizal-specific *Medicago truncatula* lectin genes. Mol. Plant Microbe Interact. 18, 771–782.
72. Fric, F. (1976) Review article: Oxidative enzymes. Encyclopedia of Plant Physiol.. 4: 617-631.
73. Fritz, M., Jakobsen, I., Lyngkjaer, MF., Thordal-Christensen, H., Pons- Kuehnemann, J. (2006) Arbuscular mycorrhiza reduces susceptibility of tomato to *Alternaria solani*. Mycorrhiza, 16: 413-419.
74. Fujita, M.; Fujita, Y.; Noutoshi, Y.; Takahashi, F.; Narusaka, Y.; Yamaguchi-Shinozaki, K.; Shinozaki, K. (2006) Crosstalk between abiotic and biotic stress responses: a current view from the points of convergence in the stress signaling networks. Curr Opin Plant Biol, 9: 436-442.
75. Gadkar, V.; David-Schwartz, R.; Kunik, T.; Kapulnik, Y. (2001). Arbuscular mycorrhizal fungal colonization. factors involved in host recognition. Plant Physiol. 127: 1493-1499.
76. Gao, LL.; Knogge, W.; Delp, G.; Smith, FA.; Smith, SE. (2004). Expression pattern of defense-related genes in different types of arbuscular mycorrhizal development in wild-type and mycorrhiza-defective mutant tomato. Molec. Plant-Microbe. Interact. 17(10):1103-1113.
77. García-Garrido, JM.; Ocampo, JA. (2002). Regulation of the plant defence response in arbuscular mycorrhizal symbiosis. J. Exp. Bot. 53(373): 1377-1386.
78. Gavito, ME.; Olsson, PA. (2008). Foraging for resources in arbuscular mycorrhizal fungi: What is an obligate symbiont searching for and how is it done?. **In**: Mycorrhiza. Third Edition. Ed Ajit Varma. Pp 73-88.
79. Gianinazzi, S. (1991) Vesicular arbuscular (endo) mycorrhizas: Cellular biochemical and genetic aspects. Agric. Ecosyst. Environ., 35:105-111.

80. Gianinazzi-Pearson, V. (1996) Plant cell responses to arbuscular mycorrhizal fungi: Getting to the roots of the symbiosis. *Plant Cell*, 8:1871-1883
81. Gianinazzi-Pearson, V.; Dumas-Gaudot, E.; Gollotte, A.; Tahiri-Alaoui, A.; Gianinazzi, S. (1996). Cellular and molecular defence-related root responses to invasion by arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol.* 133:45–57.
82. Gianinazzi-Pearson, V.; Gollotte, A.; Lherminier, J.; Tisserant, B.; Franken P.; Dumas-Gaudot, E.; Lemoine, MC.; van Tuinen, D.; Gianinazzi, S. (1995). Cellular and molecular approaches in the characterization of symbiotic events in functional arbuscular mycorrhizal associations. *Can. J. Bot.*, 73: 526-532.
83. Giovanetti, M.; Mosse, B. (1980) An evaluation of techniques to measure vesicular-arbuscular infectinon in roots. *New Phytologist.* 84: 489-500.
84. Giovannetti, M. (2008). Structure, extent and functional significance of belowground arbuscular mycorrhizal networks. In: *Mycorrhiza*. Third Edition. Ed. Ajit Varma. pp59-72
85. Giri, B., Giang, PH., Kumari, R., Prasad, R., Varma, A. (2005) Microbial diversity in soils. In: Buscot F, Varma, S. Eds. *Microorganisms in soils: roles in genesis and functions* Heildeberg Germany: Springer-Verlag pp195-212
86. Glassop, D.; Smith, SE.; Smith, FW. (2005). Cereal phosphate transporters associated with the mycorrhizal pathway of phosphate uptake into roots. *Planta* 222: 688–698.
87. Glazebrook, J. (2005): Contrasting mechanism of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 43: 1-2.
88. Gollotte, A.; Cordier, C.; Lemoine, MC.; Gianinazzi-Pearson, V. (1997). Role of fungal wall components in interactions between endomycorrhizal symbionts. En: *Eukaryotism and Symbiosis* (HEA Shenck, R Herrmann, KW Jeon, NE Muller, Schwemmler, eds) Springer, Berlin. 412-428.
89. Gollotte, A.; Lemoine, MC.; Gianinazzi-Pearson, V. (1996). Morphofunctional integration and cellular compatibility between endomycorrhizal symbionts. En: *Concepts in Mycorrhizal Research*. K. G. Mujeri Ed. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. 91-111.
90. Gómez G. (2008) Comunicación Personal (Instituto Nacional de Sanidad Vegetal).
91. Gómez, L.; Rodríguez, M. (2005) Evaluación de un esquema de rotación de cultivos para el manejo de *Meloidogyne* spp. en sistemas de cultivos protegidos. *Rev. Protección Veg.* 1: 67-69.
92. Gomez-Gomez, L.; Boller, T. (2000). FLS2: an LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in Arabidopsis. *Mol. Cell* 5:1003–11.

93. Govindarajulu, M.; Pfeffer, PE.; Jin, H.; Abudaker, J.; Douds, DD; Allen, JW.; Bucking, H.; Lammers, P.J.; Shachar-Hill, Y. (2005) Nitrogen transfer in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Nature* 435: 819–823.
94. Govrin, EM.; Levine, A. (2000). The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. *Curr. Biol.* 10: 751-757
95. Guerrero, E. (1996). Micorrizas. **En**: Recurso biológico del suelo. Bogota: 3- 206
96. Guimil, S.; Chang, HS.; Zhu, T.; Sesma, A.; Osbourn, A.; Roux, C.; Ioannidis, V.; Oakeley EJ.; Docquier, M., Descombes, P., Briggs, SP., Paszkowski, U. (2005). Comparative transcriptomics of rice reveals an ancient pattern of response to microbial colonization. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 102: 8066–8070.
97. Hahlbrock, K.; Bednarek, P.; Ciolkowski, I.; Hamberger, B.; Heise, A.; Liedgens, H.; Logemann, E.; Nürnberger, T.; Schmelzer, E.; Somssich, IE.; Tan, JW. (2003). Non-self recognition, transcriptional reprogramming, and secondary metabolite accumulation during plant/ pathogen interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 14569–14576.
98. Harniduzzarnan, MM.; Jakab, G.; Bamavon, L.; Neuhaus, JM.; Mauch-Mani, B. (2005). β -Aminobutyric acid-induced resistance against downy mildew in grapevine acts through the potentiation of callose formation and jasmonic acid signalling. *Mol. Plant Microbe Interact.* 18: 819-829.
99. Harrier, LA.; Watson, CA. (2004) The potential role of arbuscular mycorrhizal (AM) fungi in the bioprotection of plants against soil-borne pathogens in organic and/or other sustainable farming systems. *Pest. Manag. Sci.* 149-57.
100. Harrison, MJ. (1999). Molecular and cellular aspects of the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant. Mol. Biol.* 50:361–89
101. Harrison, MJ.; Dixon, RA. (1993). Isoflavonoid accumulation and expression of defense gene transcripts during the establishment of vesicular-arbuscular mycorrhizal associations in roots of *Medicago truncatula*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 6: 643–54.
102. Harrison, MJ.; Dixon, RA. (1994). Spatial patterns of expression of flavonoid/isoflavonoid pathway genes during interactions between roots of *Medicago truncatula* and the mycorrhizal fungus *Glomus versiforme*. *Plant J.* 6:9–20
103. Harrison, MJ. (2005) Signaling in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Annu. Rev. Microbiol.*, 59:19-42.
104. Hause, B.; Mrosk, C.; Isayenkov, S.; Strack, D. (2007) Jasmonates in arbuscular mycorrhizal interactions. *Phytochemistry* (68): 101-110.
105. Hernández, A.; Heydrich, M.; Diallo, B.; El Jaziri, M.; Vandeputte, O. (2010). Cell-free culture medium of *Burkholderia cepacia* improves seed germination and seedling growth in maize (*Zea mays*) and rice (*Oryza sativa*). *Plant Growth Regul.* 60:191–197.

106. Hernández, A.; Hernández, AN.; Velázquez, MG.; Bigiramana, Y.; Audenaert, K.; Hofte, M. (2004). Rhizobacteria application to induce resistance in the plant-pathogen systems bean-*Colletotrichum lindemuthianum* and tomato *Botrytis cinerea*. *Mex. J. Phytopathol.*, 22:100–106.
107. Hernández, A.; Heydrich, M.; Acebo, Y.; Velázquez, MG.; Hernández AN. (2008). Antagonistic activity of Cuban native rhizobacteria against *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenb. in maize (*Zea mays* L.), *Appl. Soil Ecol.*, 39:180-186.
108. Hernández, MI.; Chailloux, M. (2004). Las micorrizas arbusculares y las bacterias rizosféricas como alternativa a la nutrición mineral del tomate. *Cultivos Tropicales*. 25: 5-12.
109. Hildebrandt, U.; Regvar, M.; Bothe, H. (2007). Arbuscular mycorrhiza and heavy metal tolerance. *Phytochem.* (68) 139-146.
110. Hohnjec, N.; Vieweg, M. F.; Puhler, A.; Becker, A.; Kuster, H. (2005). Overlaps in the transcriptional profiles of *Medicago truncatula* roots inoculated with two different *Glomus* fungi provide insights into the genetic program activated during arbuscular mycorrhiza. *Plant Physiology* **137**: 1283–1301
111. IUSS Working group WRB (2006). World reference base for soil resources 2006. World soil resources report No, 103 FAO.
112. Jaizme- Jaizme-Vega, M.C.; Tenoury, P.; Pinochet, J.; Jaumot, M. (1997). Interactions between the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* and *Glomus mosseae* in banana. *Plant Soil*. 196: 27-35.
113. Jin, H., Pfeffer, PE.; Douds, DD.; Piotrowski, E.; Lammers, PJ.; Shachar-Hill, Y. (2005). The uptake, metabolism, transport and transfer of nitrogen in an arbuscular mycorrhizal symbiosis. *New Phytol.* 168, 687–696.
114. Jones, JDL.; Dangl, JL. (2006). The plant immune system. *Nature*. 444 (16): 323-329.
115. Joosten, MHA.J. (1991). The *Cladosporium fulvum*-tomato interaction: physiological and molecular aspects of pathogenesis. Tesis para la obtención del grado de Dr. En Ciencias Agrícolas, Universidad Agrícola de Wageningen, Netherlands, 125 pp.
116. Judelson, H. (1997) The genetics and biology of *Phytophthora infestans*: Modern approaches to a historical challenge. *Fungal Genetic and Biology*. 22: 65-76.
117. Kageyama, SA.; Mandyam, KG.; Jumpponen, A. (2008). Diversity, function and potencial applications of the root-associated endophytes. **En**: *Mycorrhiza*. Third Edition. Ed Ajit Varma. pp 29-58.
118. Kapulnik, Y.; Volpin, H.; Itzhaki, H., Ganon, D.; Galili, S. (1996). Suppression of defence responses in mycorrhizal alfalfa and tobacco roots. *New Phytol.* 133: 59–64.

119. Khaosaad, T.; Garcia-Garrido, JM.; Steinkellner, S.; Vierheilig, H. (2007). Takeall disease is systemically reduced in roots of mycorrhizal barley plants. *Soil Biol Biochem*, 39:727-734.
120. Koide R T.; Mosse B (2004) A history of research on arbuscular mycorrhiza *Mycorrhiza* 14: 145–163.
121. Koske, R. (1981). Multiple germination by spores of *Gigaspora gigantea*. *Transactions of the British Mycological Society* 76: 328-330.
122. Lambais, MR.; Mehdy, MC. (1993). 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.*, 6:75-83.
123. Lambais, MR.; Ríos-Ruiz, WF.; Andrade, RM (2003). Antioxidant responses in bean (*Phaseolus vulgaris*) roots colonized by arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol.* 160: 421-428.
124. Lecaton, L.; Obaton, M. (1983). Faune et Flore do sol les organismes symbiotiques faune et flores auxiliaires en agriculture. **Ed** ACTA. Paris. 119-213
125. Li, HY. ; Yang, GD. ; Shu, HR. ; Yang, YT. ; Ye, BX. ; Nishida, I. ; Zheng, CC. (2006). Colonization by the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus versiforme* induces a defense response against the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* in the grapevine (*Vitis amurensis* Rupr.), which includes transcriptional activation of the class III chitinase gene VCH3. *Plant Cell.* 47: 154-163.
126. Lindhout, P.; Pet, G.; van der Beek, H. (1994) Screening wild *Lycopersicon* species for resistance to powdery mildew (*Oidium lycopersicum*). *Euphytica* 72: 43-49.
127. Lingua, G.; D'Agostino, G.; Massa, N.; Antosiano, M.; Berta, G. (2002). Mycorrhiza-induced differential response to a yellows disease in tomato. *Mycorrhiza*. 12: 191-198.
128. Liu, J. ; Blaylock, L. ; Endre, G.; Cho, J.; Town, CD. (2003). Transcript profiling coupled with spatial expression analyses reveals genes involved in distinct developmental stages of the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Plant Cell* 15:2106–23.
129. Lorenzo, O.; Solano, R. (2005). Molecular players regulating the jasmonate signalling network. *Curr. Opin. Plant Biol.* (8): 532-540.
130. Maier, W.; Hammer, K.; Dammann, U.; Schulz, B.; Strack, D. (1997). Accumulation of sesquiterpenoid cyclohexenone derivatives induced by an arbuscular mycorrhizal fungus in members of the Poaceae. *Planta* 202: 36–42.
131. Maldonado-Mendoza, IE.; Dewbre, GR.; Harrison, MJ. (2001) A phosphate transporter gene from the extra-radical mycelium of an arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus*

132. Martínez, J.; Gutiérrez, A.; Postigo, I.; Cardona, G.; Guisantes, J. (2006) Variability of Alt a 1 Expression by Different Strains of *Alternaria alternata* J Investig Allergol Clin Immunol. 16:279-282.
133. Matusova, R.; Rani, K.; Verstappen, FW.; Franssen, MC.; Beale, MH., Bouwmeester, HJ. (2005). The strigolactone germination stimulants of the plant-parasitic *Striga* and *Orobancha* spp. are derived from the carotenoid pathway. *Plant Physiology* 139: 920–934.
134. Meixner, C.; Ludwig-Muller, J.; Miersh, O.; Gersshoff, P.; Staehelin, C.; Vierheilig, H. (2005). Lack of mycorrhizal autorregulation and phytohormonal changes in the phytohormonal in the supernodulating soybean mutant *nts 1007*. *Planta* (222)709-715.
135. MINAGRI (2006). Plagas y enfermedades del tomate. Guía de Productores. Instructivo Técnico.
136. Mohammadi Goltapeh, E.; Rezaee Danesh, Y.; Prasad, R.; Varma, A. (2008). Mycorrhizal fungi: What we know and what should we know? In: Mycorrhiza. Third edition. Ed Ajit Varma. Pp 3-28.
137. Mohr, U.; Lange, J.; Boller, T.; Wiemken, A.; Vögeli-Lange, R. (1998) .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.* 138: 589-598
138. Morandi, D. (1996). Occurrence of phytoalexins and phenolic compounds in endomycorrhizal interactions, and their potential role in biological control. *Plant Soil*, 185:241-251 Morandy *et al.* (1984),
139. Morgan, JAW.; Bending, GD.; White, PJ. (2005) Biological cost and benefits to plant-microbe interactions in the rizosphere *J. Exp.Bot.*, 56:1729-39.
140. Mosse, B. (1959) Observations on the extramatrical mycelium of a vesicular-arbuscular endophyte. *Trans Br Mycol Soc* 42:439–448
141. Mosse, B. (1986). Mycorrhiza in a sustainable agriculture. *Biological Agricultural Horticulture* 3, 191–209.
142. Nagarotna, KC.; Shetty, SA.; Shetty, HS. (1993). *J. Exp. Bot.* 44 (265): 1291-1296.
143. Nagesh, M.; Parvatha, RP. (2004) Biochemical changes in *Glomus fasciculatum* colonized roots of *Lycopersicon esculentum* in presence of *Meloidogyne incognita*. *Indian J. Exp. Biol.*. 42: 721-727.
144. Nagy, R.; Karandashov, V.; Chague, V.; Kalinkevich, K.; Tamasloukht, M.; Xu, G.; Jakobsen, I.; Levy, AA.; Amrhein, N.; Bucher, M. (2005). The characterization of novel

- mycorrhiza-specific phosphate transporters from *Lycopersicon esculentum* and *Solanum tuberosum* uncovers functional redundancy in symbiotic phosphate transport in solanaceous species. *The Plant Journal* **42**: 236–250.
145. Noval, BM de la. (2008) Efecto de la interacción hongos micorrízicos Arbusculares-sistemina–tomate (*Solanum lycopersicum* L Variedad amalia) sobre proteínas de defensa y respuesta a patógenos. Tesis en opción al grado de Doctor en Ciencias Agrícolas Universidad Agraria de la Habana “Fructuoso Rodríguez Pérez”
 146. Noval, BM de la; Pérez, E.; Olalde, V.; Délano, JP.; Martínez, N. (2004), Inducción de β 1,3 glucanasas y quitinasas en plántulas de tomate por hongos micorrízicos arbusculares y sistemina. *Cultivos Tropicales* (1): 5-12.
 147. Ohtomo, R.; Saito, M. (2005). Polyphosphate dynamics in mycorrhizal roots during colonization of an arbuscular mycorrhizal fungus. *New Phytology* **167**: 571–578.
 148. Oommen, A.; Dixon, RA.; Paiva, NL. (1994). The elicitor-inducible alfalfa isoflavone reductase promoter confers different patterns of developmental expression in homologous and heterologous transgenic plants. *Plant Cell* **6**:1789–803
 149. Paszkowski, U.; Jakovleva, L.; Boller, T. (2006) Maize mutants affected at distinct stages of the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Plant J*, **47**:165-173.
 150. Paszkowski, U. (2006a) A journal through signalling in arbuscular mycorrhizal symbioses 2006 *New Phytologist* **172**: 35-46
 151. Paszkowski, U. (2006b) Mutualism and parasitism: The Ying and Yang of plant symbioses. *Curr. Opin. Plant Biol.* (9): 364-370.
 152. Penninckx, I. (1998). Analysis of the signal transduction pathway leading to pathogen-induced activation of a plant defensin gene in *Arabidopsis thaliana*. Katholieke Universiteit Leuven.. p.1-46.
 153. Pérez, S. (2003) Variabilidad cultural, patogénica y genética del agente causal del tizón temprano (*Alternaria solani* Sor.) del tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) en Cuba. Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Agrícolas. Universidad Agraria de la Habana. 100p.
 154. Phillips, JM.; Hayman, DS. (1972) Improve procedures for cleaning root and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapic assesment of infections. *Tranfer. Britanic. Micology Society.* **55**: 159-161.
 155. Pozo, MJ.; Cordier, C.; Dumas-Gaudot, E.; Gianinazzi, S.; Barea, JM.; Azcon-Aguilar, C. (2002) Localized versus systemic effect of arbuscular mycorrhizal fungi on defense response to *Phytophthora* infection in tomato plants. *J. Exp. Bot.*, **53**: 525-534.
 156. Pozo, M.J.; Azcón-Aguilar, C.; Dumas-Gaudot, E.; Barea, JM. (1999) β -1,3 glucanase activities in tomato roots inoculated with arbuscular mycorrhizal fungi and/or

157. Pozo, M.J.; Slezack-Deschaumes, S.; Dumas-Gaudot, E.; Gianinazzi, S.; Azcon-Aguilar C. (2002). Plant defense responses induced by arbuscular mycorrhizal fungi In: Gianinazzi S, Schuepp H, Barea JM, Haselwandter K, eds. Mycorrhiza technology in agriculture: from genes to bioproducts. Basel, Switzerland: Birkhauser Verlag, 103–111.
158. Pozo, MJ.; Van Loon, LC.; Pieterse, CMJ. (2004) Jasmonates-signals in plant-microbe interactions. *J. Plant Growth Regul.* 23: 211-222.
159. Pozo, MJ.; Azcón-Aguilar, C. (2007) Unraveling micorriza-induced resistance. *Curr. Opin. Plant Biol.* 10: 393-399
160. Pulido, LE.; Medina, N.; Cabrera, A. (2003). La biofertilización con rizobacterias y hongos micorrícicos arbusculares en la producción de posturas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) y cebolla (*Allium cepa* L.) I. Crecimiento vegetativo. *Cultivos Tropicales*: 24: 15-24
161. Ramos, AC.; Façanha, AR.; Feijó, JA. (2008). Ion dynamics during the polarized growth of arbuscular mycorrhizal fungi: from presymbiosis to symbiosis. In *Mycorrhiza*. Third Edition. Ed Ajit Varma. Pp 241-260.
162. Raven, J.; Smith, S.; Smith, F. (1978). Ammonium assimilation and the role of mycorrhizas in climax communities in Scotland. *Botanical Society of Edinburgh* 43: 27–35..
163. Redecker, D.; Morton, JB.; Bruns, TD. (2000) Ancestral lineages of arbuscular mycorrhizal fungi (*Glomales*). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 14, 276-284.
164. Remy, W.; Taylor, TN.; Hass, H.; Kerp, H. (1994). Four hundred-million-year-old vesicular arbuscular mycorrhizae. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91: 11841-11843.
165. Rivera, R.; Fernández, F.; Hernández, A.; Martín, JR.; Fernández, K. (2003). El manejo de la simbiosis micorrízica: una vía hacia la agricultura sostenible. Estudio de caso: El caribe Ed Rivera R y Fernández, K, 166 páginas.
166. Rivera, R.; Fernández, F.; Fernández, K.; Ruiz, L.; Sánchez, C.; Riera, M. (2007). Chapter 5. Advances in the Management of Effective Arbuscular Symbiosis in Tropical Ecosystems. En: *Mycorrhizae in Crop Productions*. Ed. Hamel. C. y Plenchette, C., p. 151-195.
167. Rives, N.; Acebo, Y.; Hernández, A. (2007). Plant Growth Promoting Bacteria in rice crop: perspectivas of their use in Cuba. *Cultivos Tropicales*, 28:29-38.
168. Rives, N.; Acebo, Y.; Almaguer, M.; García, JC.; Hernández, A. (2009). Actividad antagonica frente a *Pyricularia grisea* (sacc.) y fitoestimulación en el cultivo del arroz

169. Rodríguez, Y.; Pérez, E.; Lara, RM.; Fernández, F.; Noval, BM de la; de la Providencia, I. (2002) Polimorfismo bioquímico de siete especies de hongos micorrizógenos arbusculares inoculados en sorgo Cultivos Tropicales, vol. 23, no. 1, p. 25-28.
170. Rodríguez, AT.; Ramírez, MA.; Falcón, A.; Utria, E.; Bautista, S. (2006). Estimulación de algunas enzimas en plantas de arroz (*Oriza sativa* L.) tratadas con un hidrolizado de quitosana. Cultivos Tropicales. 27: 87-91.
171. Salzer, P.; Hebe, G.; Hager, A. (1997a). Cleavage of chitinous elicitors from the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma crustuliniforme* by host chitinases prevents induction of K⁺ and Cl⁻ release, extracellular alkalinization and H₂O₂ synthesis of *Picea abies* cells. Planta 203:470–79
172. Salzer, P.; Hübner, B.; Sirrenberg, A.; Hager, A. (1997). Differential effect of purified spruce chitinases and β-1,3-glucanases on the activity of elicitors from ectomycorrhizal fungi. Plant Physiol. 114:957–68
173. Salzer, P.; Boller, T. (2000). Elicitor induced reactions in mycorrhizae and their suppression. En: Current Advances in Mycorrhizae Research. Section I: Signaling mechanisms in mycorrhizal symbiosis. (eds) Podilla, G.K. y Douds, D.D. Jr. APS Press USA, p.1-10.
174. Salzer, P.; Bonanomi, A.; Beyer, K.; Vogeli-Lange, R.; Aeschbacher, RA.; Lange, J.; Wiemken, A.; Kim, D.; Cook, DR.; Boller, T. (2000). Differential expression of eight chitinase genes in *Medicago truncatula* roots during mycorrhiza formation, nodulation, and pathogen infection. Mol. Plant Microbe. Interact. 13:763-777.
175. Schaefer, SC.; Basic, K.; Cammue, B.; Broekaert, W.; van Damme, EJM.; Peumans, WJ.; Korban, SS. (2005) Enhanced resistance to early blight in transgenic tomato lines expressing heterologous plant defense genes. Planta. 222: 858-866.
176. Schliemann, W.; Ammer, C.; Strack, D. (2008) Metabolite profiling of mycorrhizal roots of *Medicago truncatula*. Phytochem. (69): 112-146.
177. Schulze-Lefert, P.; Panstruga, R.(2003). Establishment of biotrophy by parasitic fungi and reprogramming of host cells for disease resistance. Annu. Rev. Phytopathol. 41: 641–67.
178. Schüßler, A (2008) Disponible en <http://www.lrz-muenchen.de/~schuessler/amphylo/>
179. Schüßler, A. ; Schawarzott, D. ; Walker, C. (2001) A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. Mycol. Res.. 105: 1414-1421.

180. Shirliff, S.J.; Vasey, J.K. (1996). A nodulation (Nod⁺/Fix⁻) mutant of *Phaseolus vulgaris* L. has nodule-like structures lacking peripheral vascular bundles (Pvb⁻) and is resistant to mycorrhizal infection (Myc⁻) Plant Sci 118: 209-220.
181. Slezacek, S.; Negrel, J.; Bestel-Corre, G.; Dumas-Gaudot, E.; Gianinazzi, S. (2001). Purification and partial amino acid sequencing of a mycorrhiza-related chitinase isoform from *Glomus mosseae* inoculated roots of *Pisum sativum* L. Planta 213: 781–787.
182. Slezacek, S.; Dumas-Gaudot, E.; Paynot, M.; Gianinazzi, S. (2000). Is fully established arbuscular mycorrhizal symbiosis required for bioprotection of *Pisum sativum* root against *Aphanomyces euteiches*? Mol. Plant Microbe Interact. (13): 238-241.
183. Slininger, P.J.; Burkhead, K.D.; Schisler, D.A. (2004). Antifungal and sprout regulatory bioactivities of phenylacetic acid, indole-3-acetic acid, and tyrosol isolated from the potato dry rot suppressive bacterium *Enterobacter cloacae* S11:t:07. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 31, 517–524.
184. Smith, F.A.; Smith, S.E. (1997). Structural diversity in (vesicular)-arbuscular mycorrhizal symbioses. New Phytol. 137:373–88.
185. Smith, S.E.; Smith, F.A.; Jakobsen, I. (2003). Mycorrhizal fungi can dominate phosphate supply to plants irrespective of growth responses. Plant Physiol. 133:16–20.
186. Solórzano, E. (2002). Proteínas de defensa y estudio enzimática en la interacción tomate-*Alternaria solani*. Tesis para optar por el grado de Doctor en Ciencias Agrícolas. Universidad Agraria de la Habana. 100p.
187. Somogyi, M.; Nelson, S. (1952). Notes on sugar determinations. J. Biol. Chem. (195): 19-23.
188. St-Arnaud, M.; Hamel, C.; Virnard, C.M.; Fortin, J.A. Inhibition of *Fusarium oxysporum* f. sp. *Dianthi* in the non VAM species *Diathus carophyllus* by co-culture with *Tagetes patula* companion plants colonized by *Glomus intraradices*. Can J. Bot. 1997. 75: 998-1005.
189. Staskawicz, B.J.; Mudgett, M.B.; Dangl, J.L.; Galan, J.E. (2001) Common and contrasting themes of plant and animal diseases Science 292: 2285-2289.
190. Stennis, M.J.; Chandra, S.; Ryan, C.A.; Low, P. (1998). Systemin potentiates the oxidative burst in cultured tomato cells. Plant Physiol. 117: 1031-1036.
191. Stintzi, A.; Heitz, T.; Prasad, V.; Wiedemann-Merdinoglu, S.; Kauffmann S.; Geoffroy, P.; Legrand, M.; Fritig, B. (1993). Plant ‘pathogenesis-related’ proteins and their role in defence against pathogens. Biochimie 75: 687–706.

192. Stumpe, M; Carsjens, JG.;Stenzel, I.; Gobel, C.; Lang, I.; Pawloski, K.; Hause, B.; Feussner, I. (2005). Lipid metabolism in arbuscular mycorrhizal roots of *Medicago truncatula*, *Phytochem.* (66): 781-791.
193. Tarus, PK.; Langlat-Thoruwa, CC.; Wanyonyi, AW.; Chhabra, SC. (2003) Bioactive metabolites from *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma longibrachianum*. *Bull. Chem. Soc. Ethiop.* (17): 185-190.
194. Terry, E. (2001). Efectividad agronómica de biofertilizantes en el cultivo del tomate. Tesis presentada en opción al título académico de Maestro en Ciencias Agrícolas. ISCAH. 69p.
195. Terry, E., Leyva, A. y Díaz, MM. (2005). Uso combinado de microorganismos benéficos y productos bioactivos como alternativa para la producción de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Cultivos Tropicales*, 26:77-81.
196. Terry, E., Núñez, M., Pino, MA. y Medina, N. (2001). Efectividad de la combinación biofertilizantes-análogo de brasinoesteroides en la nutrición del tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill). *Cultivos Tropicales*, 22:56-59.
197. Thaler, JS.; Bostock, RM. (2004). Interactions between abscisic acid mediated responses and plant resistance to pathogens and insects. *Ecology* 85: 48-58.
198. Toledo, V. (2003). Comunicación personal. Instituto de Investigaciones del Tabaco. Carr Tumbadero, Km 8.5. San Antonio de los Baños.
199. Ton, J.; van Pelt, JA.; van Loon, LC.; Pieterse, CMJ. (2002). Differential effectiveness at salicylate-dependent and jasmonate/ethylene dependent induced resistance in *Arabidopsis*. *Mol. Plant Microbe Interact.* (15): 27-34
200. Trouvelot, A.; Kough, J.; Gianinazzi-Pearson, V. (1986) Mesure du Taux de Mycorhization VA d'un Systeme Radiculaire. Recherche de Methodes d'Estimation ayantune Signification Fonctionnelle. Proceedings of the 1st European Symposium on Mycorrhizae: Physiological and Genetical Aspects of Mycorrhizae, Dijon, 1-5 July, 1985. (V. Gianinazzi-Pearson y S. Gianinazzi, eds.). INRA, Paris. p. 217-222.
201. van Aarle, IM.; Olsson, PA. (2008). Resource partitioning between extraradical and intraradical AM Fungal mycelium. In *Mycorrhiza*.Third edition. Ed. Ajit Varma, pp 321-336.
202. van Loon, LC.; Rep, M.; Pieterse, CMJ. (2006). Significance of inducible defense.related proteins in infected plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* 44: 135-162.
203. Vandenkoornhuysen P., Ridgway K.P., Watson I.J., Fitter A.H., Yong J.P.W (2003) Co-existing grass species have distinctive arbuscular mycorrhizal community. *Molecular Ecology*, 12:3085-3095.

204. Vázquez-Garcidueñas, M.S.; Leal-Morales, C.; Herrera-Estrella, A. (1998). Analysis of β -1,3-glucanolytic system of biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. Appl. Environ. Microbiol. 64(4): 1442-1446.
205. Vierheilig, H.; Steinkellner, S.; Khaosaad, T.; García Garrido, JM. (2008) The biocontrol effect of micorrhization on soilborne fungal pathogens and the autoregulation of the AM symbiosis: One mechanism, two effects? In: Mycorrhiza. Third Edition. Ed. Ajit Varma, pp 307-320.
206. Volpin, H.; Phillips, DA.; Okon, Y.; Kapulnik, Y. (1995). Suppression of an isoflavonoid phytoalexin defense response in mycorrhizal alfalfa roots. Plant Physiol. 108:1449–54.
207. Volpin, H.; Elkind, Y.; Okong, Y. (1994). A vesicular arbuscular mycorrhizal fungus (*Glomus intraradices*) induces a defence responses in Alfalfa roots. Plant Physiol., 104:683-689.
208. Walter, MH.; Fester, T.; Strack, D. (2000). Arbuscular mycorrhizal fungi induce the non-mevalonate methylerythritol phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis correlated with accumulation of the ‘yellow pigment’ and other apocarotenoids. Plant Journal 21: 571–578.
209. Whipps, J.M. (2004) Prospects and limitations for mycorrhizas in biocontrol of root pathogens. Can. J. Bot., 82:1198-1227.
210. Wojtaszek, P. (1997). Oxidative burst: on early response to pathogen infection. Bio 1-692.
211. Zheng, HZ.; Cui, CI.; Zhang, YT.; Wang, D.; Jing, Y.; Kim, KY. (2005). Active changes of lignification-related enzymes in pepper response to *Glomus intraradices* and/or *Phytophthora capsici*. J. Zhejiang Univ. Sci. B. 6(8): 778–786.
212. Zipfel, C.; Felix, G. (2005) Plants and animals: a different taste for microbes? Curr. Opin. Plant Biol. 8:353-360.