

**UNIVERSIDAD AGRARIA DE LA HABANA
“FRUCTUOSO RODRÍGUEZ PÉREZ”
INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS AGRÍCOLAS**

**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

AUTOR: M.Sc. Blanca M. de la Noval Pons

TUTORES: Dr.C. Ondina León
Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria

Dr. C. Miguel Ramos
Universidad de la Habana, Facultad de Biología

La Habana
2008

AGRADECIMIENTOS

- En primera instancia quisiera agradecer al Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas por haber contribuido en mi formación como profesional desde que me convertí en miembro de esa gran familia en el año 1988.
- En segunda instancia, y no por la segunda, menos importante, al Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria que me permitió desde el año 2001 desarrollar una gran parte de los experimentos que forman parte de este trabajo de Tesis y de esta forma compartir con sus trabajadores como uno más, entre los que cuento con muchas amistades.
- Al Centro de Investigaciones y de Estudios Avanzados, Campus Irapuato, del estado mexicano de Guanajuato, por aceptarme para la realización de la Maestría de Biotecnología y Bioquímica de Plantas, resultados que forman parte del presente trabajo de Tesis. A la Secretaria de Relaciones Exteriores de México quien brindó el apoyo económico para la misma.
- A mis tutores la Dra.C. Ondina León y al Dr.C. Miguel Ramos que constituyeron la guía del trabajo de investigación y realizaron la revisión minuciosa del documento de Tesis, por darme ánimo durante todo el desarrollo de los experimentos y del proceso de defensa. En especial a la Dra. C. Ondina por los consejos oportunos tanto en el plano profesional como personal.
- Al Dr.C. Benedicto Martínez del Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA) quien gentilmente me facilitó la cepa de *Alternaria solani* y me permitió trabajar en su laboratorio. A la M.Sc. Verónica Toledo del Instituto de Investigaciones del Tabaco la cual me proporcionó la cepa de *Phytophthora nicotianae*.
- Quisiera agradecer a mis compañeros Aida, Eduardo y Lourdes por haber sido parte importante en la realización de los experimentos y apoyarme cuando las cosas no salían como se esperaba. A las compañeras del laboratorio de Fisiopatología de CENSA, Arais, Berkis Peteira, Belkis Pino y Yomaris por ser muy buenas amigas y ayudarme mucho. Un beso para ellos.
- A los compañeros del CENSA que me hicieron sentir bien y me dieron apoyo y consejos durante mi larga estancia de ocho años, son muchos pero no podía faltar Sambrana mi mano derecha para los experimentos en las casas de cultivo. A los del Dpto. de Plaga, en especial Mayra, Lucy y Robertico quienes me acompañaron en las muchas noches de trabajo en el centro. A Robertico el fotógrafo por su colaboración en la realización de las fotos y apoyo incondicional.

- Quisiera darle las gracias a mis investigadores, especialista y técnicos del Grupo de Micorrizas del INCA por ser buenos amigos durante tantos años. A los muchos compañeros del INCA que me han apoyado siempre.
- Un agradecimiento muy grande a mi familia. A mi mamá que siempre estuvo conmigo apoyándome desde los estudios universitarios y en la educación de mi hija. A mi hija Claudia que siempre me ha querido y ayudado mucho, y ha sido un apoyo importante en mi vida. A mi esposo Silio que me ha brindado su cariño y me ha acompañado en las horas de trabajo intenso. Ellos han sido un importante soporte, dándome ánimo y colaborando en la realización de la presente Tesis. Los quiero mucho.
- Finalmente quisiera hacer un agradecimiento especial a mi papá, quien fue una fuente de inspiración en este mundo de la investigación científica. Él me enseñó, con su propia experiencia, que para poder lograr un trabajo de doctorado exitoso se necesita del esfuerzo mancomunado de toda la familia. Gracias Dr.C. Manuel de la Noval Hernández por seguir siendo un ejemplo a seguir.

A TODOS MUCHAS GRACIAS

DEDICATORIA

Α ΜΙ ΠΑΡΑ
Α ΜΙ ΠΑΡΑ

SÍNTESIS

Con el objetivo de determinar el efecto de especies de hongos micorrízicos arbusculares (HMA) y la sistemina en la inducción de respuestas de defensa y evaluar su influencia sobre la intensidad de las enfermedades causadas por patógenos, en el cultivo del tomate (*Solanum lycopersicum* L.) variedad Amalia, se realizaron tres experimentos en condiciones controladas. Se encontró que con la aplicación combinada de *Glomus clarum* (Nicolson y Schenk) y la sistemina no se produjo retardo del desarrollo vegetativo y se alcanzaron niveles de micorrización satisfactorios. La aplicación del elicitor potenció el proceso de establecimiento de la simbiosis micorrízica arbuscular, que se hizo evidente a partir de los 12 días. Se detectó la inducción diferencial de tres sistemas enzimáticos (β -1,3-glucanasa, quitinasa y peroxidasa) mediante la aplicación de HMA y el elicitor, los que mostraron especificidad en cuanto al tiempo de evaluación y al órgano de la planta (raíz y hoja). Se encontró la aparición de isoformas adicionales de β -1,3-glucanasa y de peroxidasa en raíz, detectadas mediante la focalización isoeléctrica (IEF) y otra por geles de poliacrilamida (PAGE), respectivamente. La aplicación conjunta de dos HMA, *G. clarum* y *G. fasciculatum* (Walker y Koske), con la sistemina redujo la severidad de las enfermedades causadas por patógenos en tomate, de forma diferencial: *G. clarum* contra *Alternaria solani* (Sor) y *G. fasciculatum* contra *Phytophthora nicotianae* (Breda de Hann syn. *P. parasitica* Dastur). Las enzimas estudiadas mostraron potencial como indicadores bioquímicos del proceso de micorrización y de la inducción de protección contra *A. solani* y *P. nicotianae* en el sistema micorriza arbuscular-sistemina. Este constituye el primer estudio combinado de la sistemina con los HMA, así como de su efecto sobre la inducción de proteínas relacionadas con la patogénesis y sobre la intensidad de las enfermedades causadas por *A. solani* y *P. nicotianae* en *Solanum lycopersicum*.

Abreviaturas empleadas en el documento

Abreviatura	Significado en español	Significado en inglés
% DV	porcentaje de Densidad Visual	-
°C	Grados Celsius	-
$\mu\text{g.mL}^{-1}$	microgramos por mililitros	-
$\mu\text{Kat.mg}^{-1}$ proteína	microkatales por miligramos de proteína	-
μL	microlitros	-
$\mu\text{mol.mL}^{-1}$	micromoles por mililitro	-
ADN	Ácido Desoxinucleótido	Deoxyribonucleic acids
ADNr	Ácido Desoxinucleótido ribosomal	-
AJ	Ácido jasmónico	-
AOS	Especies activas de oxígeno	Active oxygen species
ARNm	Acido Ribonucleico mensajero	Transfer Ribonucleic acids
ARNr	Acido Ribonucleico ribosomal	Ribosomes ribonucleic acids
AS	Ácido salicílico	-
ATPasaH ⁺	ATPasa protónica	-
Avr	gen de avirulencia	-
bp	pares de bases	basis par
BSA	Albúmina de suero bovino	Bovine Serum Albumine
CHS	harcona sintasa	Chalcone synthase
D.O.	Densidad óptica	-
ddg	después a la germinación	-
ETI	Inmunidad activada por el efector	Effector-triggered inmunity
g.L^{-1}	gramos por litro	-
HMA	Hongo micorrízico arbuscular	-
HR	Reacciones hipersensibles	Hypersensitive Response
HR	Respuesta hipersensible	Hipersensitive response
HRGP	glicoproteínas ricas en hidroxiprolina	Hidroxypoline-rich glycoprotein
IEF	Focalización isoelectrica	Iso-Electro Focusin
kDa	Kilo daltons	-
Kg	Kilogramos	-
M	molares	-
MA	Micorrizas Arbusculares	-
mA	miliamperes	-
MAPK	proteínas kinasas activadoras del mitógeno	Mitogen-activated protein kinases
MeJA	Metil jasmonato	Methyl Jasmonate Acid

MeSA	Ácido metil salicílico	Methylen salicylic acid
mg	miligramos	-
mg.L ⁻¹	miligramos por litro	-
mg.mL ⁻¹	miligramos por mililitro	-
min	minutos	
mL	mililitros	-
mL.planta	mililitros por planta	-
mM	milimolar	-
mm	milímetros	-
<i>MtAOC</i>	mutante de <i>Medicago truncatula</i> con supresión de la expresión de la síntesis de oxido de aleno ciclasa	-
NB-LRR	Proteínas con uniones nucleotídicas y dominio de repetidos ricos en leucina	Nucleotide binding and leucine rich repeat domains proteins
nKat.mg ⁻¹ proteína	nanokatales por miligramos de proteína	-
nm	nanómetros	-
nM	nanomoles	-
Nod	Factor de la nodulación	-
PAGE	Geles de Poliacrilamida	Poly-acrilamide Gel
PAL	fenilalanina amonio liasa	Phenylalanine ammonia lyase
PAMP	patrones moleculares asociados a patógenos	Pathogen-associated molecular patterns
PCD	Muerte Celular Programada	Program Cellular Death
PDA	medio Agar papa dextrosa	-
pI	Punto isoeléctrico	-
pKat.mg ⁻¹ proteína	picokatales por miligramos de proteína	-
PM	Peso Molecular	-
PR	Proteínas relacionadas con la patogenicidad	Pathogenesis Related Proteins
PR-2	β-1,3-glucanasa	-
PR-3	quitinasa	-
PR-5	Taumatina de tabaco	-
PR-9	peroxidasas inducidas por patógenos	-
R	gen de resistencia	-
Rf	Distancia media de migración en PAGE	-
SAR	Respuesta Sistémica Adquirida	Acquired Sistemic Response
seg.	segundos	-

t	toneladas	-
V	Voltios	-
v/v	volumen/volumen	-
W	Watst	-

INDICE

	pág
SINTESIS	
1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	5
2.1. Cultivo del tomate.....	5
2.2. Patógenos que afectan al cultivo del tomate	5
2.2.1. <i>Alternaria</i> spp.....	6
2.2.2. <i>Phytophthora</i> spp.....	7
2.3. Interacción planta-patógeno	8
2.4. Micorrizas.....	10
2.4.1. Micorriza arbuscular.....	11
2.4.1.1 Establecimiento de la simbiosis micorrízica arbuscular.....	12
2.4.1.2. Respuestas de defensa inducidas en la simbiosis micorrízica arbuscular	14
2.4.1.2.1. β -1,3-glucanasas.....	16
2.4.1.2.2. Quitinasas.....	17
2.4.1.2.3. Peroxidasa.....	18
2.4.1.3. Isoenzimas y sus métodos de estudio.....	18
2.4.1.4. Empleo de los HMA en la agricultura	20
2.4.1.5. Contribución de la micorrización a la protección contra el ataque de los patógenos.....	21
2.5. Compuestos inductores de resistencia en plantas.....	23
2.5.1. Elicitores.....	23
2.5.1.1. Sistemina.....	24
2.5.1.1.1. Actividad biológica.....	25
3. MATERIALES Y MÉTODOS	27
3.1. Efecto de la sistemina sobre el proceso de establecimiento de la simbiosis micorrízica arbuscular y el desarrollo vegetativo del tomate	29
3.1.1. Determinación del desarrollo vegetativo de las plántulas.....	30
3.1.2. Cuantificación de la colonización micorrízica.....	30
3.2. Dinámica de proteínas PRs inducidas por <i>Glomus clarum</i> y la sistemina durante el establecimiento de la simbiosis MA	31
3.2.1. Periodo de pre-colonización	32
3.2.2. Periodo de colonización	33
3.2.3. Dinámica de la colonización micorrízica.....	33
3.2.4. Cuantificación de las actividades enzimáticas en las raíces y en las hojas de plantas de tomate.....	33

3.2.4.1. Actividad β -1,3-glucanasas.....	34
3.2.4.2. Actividad Quitinasas.....	35
3.2.2.3. Actividad Peroxidasa	35
3.2.5. Determinación de los patrones isoenzimáticos	36
3.2.5.1. Obtención de patrones de β -1,3-glucanasa mediante geles de poliacrilamida (PAGE).....	36
3.2.5.2. Obtención de patrones de β -1,3-glucanasas mediante focalización isoelectrica (IEF).....	37
3.2.5.3. Obtención de patrones de peroxidasa mediante PAGE.....	38
3.3. Efecto de los HMA y la sistemina sobre la incidencia de las enfermedades causadas por <i>Alternaria solani</i> y <i>Phytophthora nicotianae</i> en tomate.....	38
3.3.1. Muestreo y evaluación previa a la inoculación de los patógenos.....	41
3.3.1.1. Determinación del desarrollo vegetativo de las plantas a los 21 días después de la germinación.....	41
3.3.1.2. Cuantificación de la colonización micorrízica de las plantas a los 21 días después de la germinación.....	41
3.3.2. Muestreo y evaluación posterior a la inoculación de los patógenos.....	41
3.3.2.1. Evaluación de los síntomas de la enfermedad causada por <i>Alternaria solani</i>	41
3.3.2.2. Evaluación de los síntomas de la enfermedad causada por <i>Phytophthora nicotianae</i>	42
3.3.2.3. Cuantificación de las actividades enzimáticas evaluadas en las plantas inoculadas con los patógenos en las raíces y en las hojas.....	43
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	45
4.1. Efecto de la sistemina sobre el proceso de establecimiento de la simbiosis micorrízica arbuscular y el desarrollo vegetativo del tomate.....	45
4.1.1. Determinación del desarrollo vegetativo de las plántulas.....	45
4.1.2. Cuantificación de la colonización micorrízica.....	47
4.2. Dinámica de proteínas PRs inducidas por <i>Glomus clarum</i> y la sistemina durante el establecimiento de la simbiosis MA.....	50
4.2.1. Periodo de pre-colonización.....	50
4.2.1.1. Dinámica de la colonización micorrízica en el período de pre-colonización	50
4.2.1.2. Cuantificación de las actividades enzimáticas en las raíces y en las hojas de plantas de tomate en el período de pre- colonización.....	52
4.2.1.2.1. Determinación de la actividad β -1,3-glucanasa en el período de pre- colonización.....	52
4.2.1.2.2. Determinación de la actividad quitinasa en el período de pre- colonización.....	54

4.2.2. Periodo de colonización.....	57
4.2.2.1. Dinámica de la colonización micorrízica en el período de colonización	57
4.2.2.2. Cuantificación de las actividades enzimáticas en las raíces y en las hojas de plantas de tomate en el período de colonización.....	60
4.2.2.2.1. Determinación de la actividad β -1,3-glucanasa en el período de colonización.....	60
4.2.2.2.2. Determinación de la actividad quitinasa en el período de colonización.....	62
4.2.2.2.3. Determinación de la actividad peroxidasa en el período de colonización.....	63
4.2.2.3. Determinación de los patrones isoenzimáticos en el período de colonización	65
4.2.2.3.1. Patrones de β -1,3-glucanasas obtenidos mediante geles de poliacrilamida (PAGE).....	65
4.2.2.3.2. Patrones de β -1,3-glucanasa obtenidos mediante Focalización isoeléctrica (IEF).....	66
4.2.2.3.3. Patrones de peroxidasa obtenidos mediante PAGE.....	67
4.3. Efecto de los HMA y la sistemina sobre la intensidad de las enfermedades causadas por <i>Alternaria solani</i> y <i>Phytophthora nicotianae</i> en tomate.....	70
4.3.1. Evaluación previa a la inoculación de los patógenos.....	70
4.3.1.1. Determinación del desarrollo vegetativo de las plantas a los 21 días después de la germinación.....	70
4.3.1.2. Cuantificación de la colonización micorrízica de las plantas a los 21 días después de la germinación.....	72
4.3.2. Evaluación posterior a la inoculación de los patógenos.....	73
4.3.2.1. Evaluación de los síntomas de la enfermedad causada por <i>Alternaria solani</i>	73
4.3.2.2. Evaluación de los síntomas de la enfermedad causada por <i>Phytophthora nicotianae</i>	75
4.3.2.3. Cuantificación de las actividades enzimáticas evaluadas en las plantas inoculadas con los patógenos en las raíces y en las hojas.....	78
4.3.2.3.1. Determinación de la actividad de β -1,3-glucanasa y quitinasa.....	78
4.3.2.3.2. Determinación de la actividad de peroxidasa.....	82
5. DISCUSIÓN GENERAL.....	87
6. CONCLUSIONES.....	94
7. RECOMENDACIONES.....	95
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	
ANEXOS	

1. INTRODUCCIÓN

El tomate, *Solanum lycopersicum* L., syn. *Lycopersicon esculentum* Mill, (Código Internacional de Nomenclatura Botánica, 2008) constituye la hortaliza de mayor consumo a nivel mundial, en Cuba también posee gran importancia, tanto por el volumen de su producción como por el área que ocupa. Su cultivo es afectado por una serie de microorganismos fitopatógenos, siendo los de mayor incidencia los géneros *Alternaria* y *Phytophthora*, causantes de diferentes enfermedades entre las que se destacan el tizón temprano y la marchitez foliar (Judelson, 1997).

Las especies de *Alternaria* afectan a las Solanáceas y constituyen un factor limitante en la producción de los cultivos de papa y tomate, en las condiciones de alta humedad y frecuentes lluvias (Pérez, 2003). Particularmente *Alternaria solani* puede producir en las plantas de tomate la podredumbre del cuello y el tizón temprano el cual causa defoliación y, por tanto, afecta la productividad y la calidad del fruto (Maeiro y col., 1991). En Cuba la afectación por el tizón temprano ocupa un lugar importante con presencia de la enfermedad en todas las provincias, tanto en el sector estatal como en el privado. Esto se debe a su elevado endemismo y a la ausencia de productos de control biológico (Martínez, y col., 2002).

Los miembros del género *Phytophthora* son habitantes del suelo y pueden causar diferentes enfermedades, tanto sobre cultivos anuales como perennes. La mayoría de sus especies y razas producen marchitez foliar y pudrición de las raíces de las plántulas, de tallos y de tubérculos. Una vez infectadas las plantas el primer síntoma que muestran es la desnutrición, debilitándolas rápidamente y aumentando por ende su susceptibilidad al ataque por otros patógenos (Agrios, 2005).

Debido a las cuantiosas pérdidas económicas que produce la afectación por ambos patógenos en los cultivos, se han empleado productos fitoquímicos diversos para su control. En la actualidad, su uso indiscriminado constituye un grave problema debido a la elevada contaminación en los suelos y en el agua, por lo que se trabaja en la búsqueda de tecnologías y productos que permitan su sustitución, sin afectar los niveles de producción. Dentro de las alternativas disponibles se encuentra el empleo de los microorganismos

nativos del suelo, con acción benéfica sobre las plantas, donde los HMA poseen un gran potencial, si se tiene en cuenta que son ampliamente estudiados por su efecto biofertilizante (Rivera, 2003).

Diversos autores estudian la interacción de los HMA con diferentes patógenos, por lo que es muy conocido el efecto protector de esta simbiosis para las plantas. Se ha informado que los HMA son capaces de reducir la severidad de enfermedades producidas por especies fúngicas (Fritz y col., 2006), algas, fundamentalmente del género *Phytophthora* (Judelson, 1997; Pozo y col., 2002; Zheng y col., 2005; Yamamizo y col., 2006) y nematodos formadores de agallas (Li y col., 2006).

La colonización micorrízica induce importantes cambios fisiológicos y bioquímicos en la planta hospedante, tales como alteraciones cualitativas y cuantitativas en la expresión de proteínas, entre las que se encuentran las proteínas relacionadas con la patogénesis (PRs), (Blee y Anderson, 2000). De igual forma se inducen otros mecanismos involucrados en los procesos de defensa, los que han sido fundamentalmente estudiados en la zona radical de la planta (Pozo y col., 2002). Estos estudios han demostrado la diversidad existente entre las plantas y los diferentes HMA, donde la especie del hongo participante tiene un papel preponderante (Gao y col., 2004).

Durante más de 15 años, en Cuba se han desarrollado una serie de investigaciones relacionadas con el uso y manejo de los HMA en diferentes agroecosistemas, estudios que han brindado importantes aportes en el conocimiento del funcionamiento de esta asociación en diferentes cultivos (Rivera 2003), sin embargo se conoce poco sobre el potencial de los mismos en la protección contra patógenos radicales y foliares.

El empleo de compuestos con acción elicitora diversa constituye en la actualidad una práctica creciente en la agricultura. En Solanaceas ha sido caracterizada una proteína denominada sistemina de bajo peso molecular con actividad elicitora sistémica (Ryan y Pearce, 1998; Schaller, 1999), detectada en tomate, chile (*Capsicum annum* L.) y papa (*Solanum tuberosum* L.) (Pearce y Ryan, 2003). Su aplicación a nivel de campo en México ha demostrado una elevada efectividad en la protección contra insectos (Delano, 2000).

Debido a las perspectivas de los HMA en la agricultura y el papel de la sistemina en la

activación de respuestas de defensa sistémica, resulta de gran interés el estudio de la interacción entre ambos y de su efecto en la inducción de proteínas relacionadas con la patogénesis, así como de su influencia sobre enfermedades causadas por patógenos radicales y foliares que afectan al cultivo del tomate. De esta forma se logrará sentar las bases teóricas para la introducción de su uso en los Programas de Manejo de Plagas.

Teniendo en cuenta estos antecedentes se plantea la siguiente hipótesis:

“Los hongos formadores de las micorrizas arbusculares y la sistemina inducen la acumulación de diferentes proteínas de defensa y reducen la severidad de las enfermedades causadas por *Alternaria solani* y *Phytophthora nicotianae* en plantas de tomate”.

Para confirmar o refutar esta hipótesis se propuso el siguiente objetivo general:

Determinar el efecto de dos especies de HMA y de la sistemina sobre la activación de respuestas de defensa y evaluar su influencia sobre la severidad de las enfermedades causadas por *Alternaria solani* y *Phytophthora nicotianae*, en el tomate var. Amalia.

Como objetivos específicos se propusieron:

1. Comprobar la influencia de la sistemina sobre el proceso de establecimiento de la simbiosis micorrízica arbuscular en la variedad de tomate Amalia.
2. Determinar la influencia de la cepa *Glomus clarum* y de la sistemina, individualmente y de conjunto, sobre la inducción de enzimas relacionadas con los procesos de defensa en plantas de tomate.
3. Evaluar el efecto de dos especies de HMA y de la sistemina sobre la severidad de las enfermedades causadas por *Alternaria solani* y *Phytophthora nicotianae* y sobre la inducción de enzimas relacionadas con defensa en plantas de tomate inoculadas con estos patógenos.

Los resultados de esta Tesis resultan novedosos debido a que:

Constituye el primer estudio a nivel mundial de los efectos de la aplicación combinada de los HMA y la sistemina en plantas de tomate, así como de su influencia sobre la inducción de proteínas de defensa y la reducción de la severidad de las enfermedades causadas por *Alternaria solani* y *Phytophthora nicotianae*.

De forma general la Tesis tiene la siguiente aplicación práctica:

1. Se determina la influencia de la sistemina y su efecto potenciador sobre la acción de *G. clarum* y *G. fasciculatum*, en la reducción de la severidad de las enfermedades causadas por *A. solani* y *P. nicotianae*, respectivamente, en tomate.
2. Se proponen alternativas a ser valoradas en el manejo de *A. solani*, luego de su confirmación en condiciones de campo, que resultan de importancia práctica si se tiene en cuenta la poca existencia de métodos de control de enfermedades foliares.
3. Los resultados obtenidos abren nuevas perspectivas de su uso en la agricultura al brindan los elementos básicos para el empleo de los HMA y el elicitor en la protección del cultivo del tomate frente a estos patógenos.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Cultivo del tomate

El tomate (*Solanum lycopersicum* L., syn. *Lycopersicon esculentum* Mill.) (Código Internacional de Nomenclatura Botánica, 2008) es una planta de la familia de las solanáceas originaria de América y cultivada en todo el mundo por su fruto comestible. Las variedades antiguas son potencialmente perennes, aunque en el cultivo moderno se las trata como plantas anuales.

Es considerada la hortaliza de mayor distribución mundial ya que alcanza los 4.5 millones de hectáreas cultivadas y una producción anual promedio de 122 millones de toneladas (t). En Cuba, también posee gran importancia, con un 50% del total de áreas dedicadas al cultivo de las hortalizas, un promedio anual de más de 55 mil hectáreas sembradas y una producción de 0.7 t (FAOSTAT data, 2007). Debido a las condiciones necesarias para su desarrollo este cultivo es afectado por una serie de patógenos que producen afectación de los rendimientos, siendo los hongos y las algas del grupo de los Oomycetes los de mayor incidencia a nivel mundial. Las principales afectaciones se producen en la época conocida como primavera-verano, debido a que las condiciones climáticas de elevada temperatura y humedad favorecen el desarrollo de estos organismos (Agrios, 2005; Pérez, 2003).

2.2. Patógenos que afectan al cultivo del tomate.

El cultivo del tomate es amenazado por patógenos microbianos capaces de afectar el rendimiento, en mayor o menor medida, en dependencia del grado de resistencia o susceptibilidad que posea el hospedante a ellos. Dentro del grupo de las bacterias encontramos a *Erwinia carotovora*, especies de *Pseudomonas* y *Xantomonas campestris*, como los más importantes por los daños que causan. De los virus los más frecuentes son el Virus del mosaico de tomate, Virus Y y X de la papa (los cuales también afectan al tomate), Virus del mosaico dorado y el Virus del enchinamiento del tomate. De los hongos se informan como los más dañinos, especies de *Pythium*, *Fusarium*, *Alternaria tenuis*, *A. brassicae* y *Cladosporium fulvum*, sobresaliendo las especies de *Phytophthora* y *Alternaria solani* (Agrios, 2005; Lovisolo y col., 2003).

2.2.1. *Alternaria* spp

Las enfermedades provocadas por especies de *Alternaria* spp. en Solanáceas están distribuidas a nivel mundial, aunque prevalecen en las condiciones de alta humedad de las zonas tropicales (Agrios, 2005) y los hospedantes más frecuentes son el tomate y la papa (Pérez, 2003). Constituye un factor limitante en la producción de estos cultivos, particularmente por causar la reducción gradual del potencial fotosintético al producir necrosis de las hojas (Jones y col., 1993). Su mejor representante es la especie *A. solani*, la cual ha sido bien caracterizada por Ellis en 1971 (Solórzano, 2002). Este género pertenece a la clase Dothideomycetes, orden Pleosporales, familia Pleosporaceae (Código Internacional de Nomenclatura Botánica, 2008).

El hongo sobrevive en el suelo, en residuos de cultivos, malezas o en semillas infectadas. Sus esporas se dispersan ya sea por factores ambientales o antrópicos y al llegar a la planta germinan e infectan las hojas húmedas, tallos o fruto. La gravedad del daño es mayor cuando la infección ocurre a temperaturas moderadas o calientes y el ambiente está húmedo, por lo que es un problema en la época lluviosa. Los síntomas son diversos causados por la acción combinada de diferentes factores, entre los que se encuentra el desvío de las fuentes nutritivas en las células afectadas y la acción de metabolitos secundarios fitotóxicos, de origen fúngico, como el ácido alternárico y el zinniol (Agrios, 2005).

En semilleros, el hongo produce el “ahorcamiento” de las plántulas y el mal del talluelo (damping-off), mientras que en plantas adultas puede también causar la podredumbre del cuello, del tallo y del fruto (Thomma, 2003; Agrios, 2005).

La principal enfermedad causada por este patógeno es el tizón temprano, la cual es más severa cuando las plantas están estresadas por abundante fructificación, ataque de nemátodos, o deficiencias de nitrógeno. El síntoma típico es una mancha oscura con anillos concéntricos en hoja, con un área clorótica, producida por la difusión de toxinas (Thomma, 2003), entre las que se han caracterizado el alternariol, éter alternariol monometílico, altenuene, altertoxinas I, II, y III y el ácido L-tenuazonico (Scott, 2001).

A medida que la enfermedad progresa, el hongo puede atacar tallos y frutos y producir manchas similares a las de las hojas de color café y anillos concéntricos oscuros, en los que

se observan las esporas polvorientas y oscuras (Castaño-Zacata y del Río, 1994; Dillard y col., 1995).

En la actualidad, se trabaja en la búsqueda de diversos métodos para el control del tizón temprano, donde el uso de fungicidas sigue siendo el más empleado, debido a su gran efectividad, aunque su aplicación de forma indiscriminada ha producido contaminación del agroecosistema. Por esta razón, es importante tomar medidas preventivas para el saneamiento de los suelos, más aún si se tiene en cuenta que el hongo sobrevive en los restos de cosecha (Pérez, 2003).

Por otra parte, los esfuerzos por mejorar la resistencia a esta enfermedad en cultivares de tomate han sido obstaculizados por la necesidad de poseer genes de resistencia simples y el complejo patrón de herencia que poseen. Consecuentemente, los cultivares de tomate no comerciales (silvestres) poseen un adecuado nivel de resistencia a *Alternaria* que no se observa en las variedades comerciales como *Lycopersicon pimpinellifolium* L. (Kalloo y Banerjee, 1993).

2.2.2. *Phytophthora* spp

.Las especies del género *Phytophthora* pertenecen a los Oomycetes con crecimiento filamentosos, característica que los había ubicado entre los hongos. Sin embargo, estudios del metabolismo, composición de la pared celular y fundamentalmente la secuenciación de ARNr indican que los Oomycetes tienen más similitud con las chrysophytes, diatomeas y algas pardas (Judelson, 1997; Birch y Whisson, 2001). Pertenecen a la clase Oomycetes, orden Peronosporales, familia Pythiaceae (Código Internacional de Nomenclatura Botánica, 2008).

Estas algas son típicos habitantes del suelo y pueden causar enfermedades diversas, tanto sobre cultivos anuales como perennes. La mayoría de las especies y razas producen pudrición de las raíces, damping-off de las plántulas y pudrición de tallos y tubérculos similares a los causados por *Pythium* spp (Judelson, 1997).

El ciclo de vida de estas algas se caracteriza por poseer una fase asexual y otra sexual, observadas, tanto en el tejido vegetal como en cultivo "in vitro". Los núcleos son diploides en cada fase, con excepción de la formación de los gametos en la cual se originan núcleos haploides. La patogénesis involucra el crecimiento asexual, en la cual se despliega un alto

grado de biotrofismo y especificidad al hospedante, con la obtención de una infección efectiva. Esta puede estar limitada a cultivos como la papa, el tomate y otras Solanáceas como la berenjena así como a otras familias distantes a esta.

La infección comienza cuando el esporangio cae sobre la planta y libera las zoosporas biflageladas, las cuales se “enquistan” después de un periodo móvil, a partir del cual emerge el tubo germinativo. También puede originarse la germinación directa del esporangio como ocurre en muchos hongos verdaderos, lo cual le da una ventaja competitiva a esta especie. La penetración se produce cuando el extremo del tubo germinativo se diferencia y se forma el apresorio, el cual es capaz de invadir a la célula hospedante subyacente. La ramificación de las hifas que se originan de forma intercelular permiten la interrelación nutrimental biotrófica con la célula vegetal a través de los haustorios, donde eventualmente la célula hospedante muere, por lo cual las especies de *Phytophthora* son consideradas como hemibiótrofo. Cuando la interacción continúa, se forman nuevos esporangios en la superficie de la planta, los que a diferencia de los conidios de Ascomycetes y Basidiomycetes no se desecan, aunque son de corta vida, fenómeno que ha sido observado en todas las especies del género (Agrios, 2005).

Las especies de este género constituyen patógenos devastadores de los cultivos, los cuales son de difícil control y manejo y un problema sanitario debido al desarrollo periódico de la resistencia a la mayoría de los productos fungicidas sistémicos empleados y la aparición de cepas altamente agresivas (Yamamizo y col., 2006).

2.3. Interacción planta-patógeno

Las plantas se encuentran continuamente expuestas al ataque de patógenos, ante los cuales tienen que activar diferentes respuestas. Estos pueden conllevar a producir la resistencia ante el agente causal o a desatarse la enfermedad, porque el patógeno es capaz de burlar los mecanismos de defensa.

Se conoce que la resistencia ante un patógeno determinado, involucra la existencia de barreras constitutivas y componentes de defensa inducible (Penninckx, 1998). Entre los mecanismos constitutivos se encuentran la presencia de una cutícula cerosa o reservorios de compuestos antimicrobianos, estratégicamente situados, cuya función es prevenir la colonización de los tejidos (Jackson y Taylor, 1996; Hutcheson, 1998).

Las respuestas de defensa inducidas son un rasgo característico de las interacciones incompatibles asociadas con la resistencia a enfermedades, de las cuales Hutcheson (1998), identificó tres tipos, según el tejido involucrado y las señales participantes: respuesta primaria, secundaria y sistémica adquirida.

La respuesta primaria es localizada en la célula que entra en contacto con el patógeno e involucra la participación de moléculas señales específicas. Su reconocimiento, activa una serie de fenómenos en cascada que conllevan, frecuentemente, a la ocurrencia de la muerte celular programada (PCD). Durante la respuesta primaria se produce, además, la liberación de moléculas señales difusibles, conocidas como elicitores (Boller, 1995; Hahn, 1996). Estos compuestos son los responsables de la inducción de la respuesta secundaria en las células adyacentes, alrededor del sitio de infección. Como tercer tipo se encuentra la resistencia sistémica adquirida (SAR, por sus siglas en inglés), la cual es producida por la participación de hormonas que son acumuladas en el sitio de infección o adyacentes a este. Las mismas son transportadas por toda la planta, para producir resistencia en zonas lejanas al sitio de contacto con el patógeno (Durner y col., 1997; Sticher y col., 1997).

Las respuestas inducibles se producen con el objetivo de atenuar o evitar la diseminación del patógeno. Una de ellas es el reforzamiento de la pared celular, que constituye una barrera física resistente a las enzimas hidrolíticas provenientes del invasor. En este proceso se ha observado que ocurre la deposición de lignina, calosa y glicoproteínas ricas en hidroxiprolina (HRGP), las que pueden ser inducidas por elicitores derivados de la pared celular fúngica (Templeton y col., 1991). Mediante este mecanismo se limita la diseminación del patógeno en el tejido vegetal, restringiéndolo a la célula hospedante, en la cual se induce la muerte celular hipersensitiva (Penninckx, 1998).

Al estudiar las bases genéticas que rigen el fenómeno de que ciertos cultivares del hospedante pueden ser colonizados por razas particulares de un patógeno, se ha encontrado que estas relaciones están gobernadas por una interacción gen-gen específica. Estas se producen entre *loci* del gen de avirulencia (*Avr*) del patógeno y *alelos* del correspondiente gen de resistencia (*R*), dando como resultado la resistencia a la enfermedad. A pesar de la amplia gama de patógenos diversos y de las moléculas efectoras de la patogenicidad, los

genes *R* codifican solamente para cinco clases de proteínas (Penninckx, 1998; Dangl y Jones, 2001).

Recientemente, se postuló una hipótesis de protección que implica el reconocimiento indirecto del efector del patógeno por la proteína *R*, mediante el monitoreo de las modificaciones inducidas por el mismo en la célula blanco del hospedante (Jones y Dangl, 2006). En ella participan los receptores de reconocimiento de los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP), los que actúan en gran medida dentro de la célula. Para ello usan el polimorfismo de las proteínas NB-LRR (uniones nucleotídicas con dominio de repetidos ricos en leucina, por sus siglas en inglés), las cuales constituyen productos de los genes *R* (Dangl y Jones, 2001).

Los efectores de patógenos de diversos reinos son reconocidos por las proteínas NB-LRR, las que activan respuestas de defensa similares. La resistencia mediada por ellas es efectiva solo contra patógenos que se desarrollan en organismos vivos (biótrofos obligado) o hemibiotróficos.

Si un efector es reconocido por la correspondiente proteína NB-LRR, ocurre la inmunidad activada por el efector (ETI, por sus siglas en inglés) que frecuentemente culmina en una reacción hipersensible (HR). Esta generalmente se limita a la célula infectada y retiene el crecimiento del patógeno, aunque actualmente no está claro, en muchos casos, que es lo que realmente detiene el crecimiento del mismo (Jones y Dangl, 2006).

2.4. Micorrizas

Albert Bernard Frank en 1885, al estudiar la interacción entre planta y hongo propuso el término **micorrizas** (*hongo-raíz*), para identificar a la asociación simbiótica observada entre hongos del suelo y especies forestales (Sylvia y col., 1998). En base a la anatomía de la infección, las micorrizas fueron tradicionalmente separadas en ectomicorrizas y endomicorrizas. Este agrupamiento resultó muy artificial, por lo que estudios recientes sobre distribución geográfica, especies presentes, morfoanatomía y ultraestructura de la simbiosis, permitieron la elaboración de un agrupamiento más lógico, en: ectomicorrizas, endomicorrizas y ectendomicorrizas, siendo las endomicorrizas las de mayor importancia en los cultivos de interés agrícola.

Las endomicorrizas, se caracterizan por la penetración inter e intracelular, pero sin la formación de manto ni modificaciones morfológicas evidentes en las raíces. Cumplen con estas condiciones las micorrizas ericoides, orquidoides y las arbusculares (Read, 1999). Los dos primeros tipos son de distribución restringidas a los taxones hospedantes que le dan nombre, mientras que el tercero, las micorrizas arbusculares (MA), presentan la más amplia distribución geográfica de todos los microorganismos biofertilizantes.

2.4.1. Micorriza arbuscular

Las micorrizas del tipo arbuscular constituyen la simbiosis más extendida sobre el planeta, tanto por el número de hospedantes como por su distribución, siendo la más antigua de las que se tengan evidencias fósiles. Su origen se ubica en el principio del periodo Devoniano (más de 400 millones de años) (Remy y col., 1994). Sin embargo, estudios moleculares basados en la secuencia del ADN ribosomal (ADNr) 18S, sugirieron que los Glomales poseían alrededor de 350-460 millones de años, y que la simbiosis fue un instrumento para la colonización exitosa de las plantas terrestres (Harrier, 2001). Barea y col., (1991) estimaron que entre, el 80 y el 90% de las especies vegetales estudiadas poseen micorrización de forma natural, donde aproximadamente en el 95 % de los casos son del tipo arbuscular, con presencia en todos los hábitat (Rodríguez, 2005).

La observación de que aproximadamente 150 especies de HMA son capaces de colonizar aproximadamente 225,000 especies de plantas llevó a la conclusión de que estos hongos poseen un amplio número de hospedantes, lo que indica su alto grado de adaptabilidad y de integración en el proceso simbiótico (Gadkar y col., 2001).

Se ha planteado que en la simbiosis MA no existe especificidad del microsimbionte (HMA), ni del macrosimbionte (planta). No obstante, las distintas especies e incluso cultivares de la misma especie pueden mostrar un comportamiento diferentes, lo cual se interpreta como diferencias en el grado de compatibilidad entre las plantas y los distintos HMA (Rodríguez, 2003).

Los hongos que forman la simbiosis MA fueron clasificados como Zygomycetes según sus características morfológicas (Morton y Benny, 1990); pero recientemente mediante el análisis de la secuencia de la subunidad menor del ARNr fueron reclasificados, creándose tres nuevas *phyla*, Glomeromycota, Ascomycota y Basidiomycota (Schübler y col., 2001). Todos los

HMA pertenecen a Glomeromycota, el cual posee seis clases, donde se han caracterizado aproximadamente 150 especies (Kramadibrata y col., 2000; Harrison, 2005).

2.4.1.1. Establecimiento de la simbiosis micorrízica arbuscular

Durante el desarrollo de la simbiosis micorrízica arbuscular tienen lugar cambios anatómicos y citológicos en la raíz. Sin embargo, la expresión morfológica no se detecta a simple vista; quizás por ello la simbiosis ha sido ignorada en estudios sobre la fisiología de la planta, cuando realmente forma parte de la misma. El micotrofismo es para el vegetal la forma habitual de adquisición de nutrimentos minerales.

Diferentes autores han trabajado en definir los eventos que ocurren en el proceso de establecimiento de la simbiosis micorrízica arbuscular (Bago y col., 1998; Sylvia y col., 1998; Douds y Nagahashi, 2000), los que de forma general, coinciden con las fases definidas por Barea y col., (1991):

1. Germinación de la espora, estimulada por la acción de los exudados radicales (Buée y col., 2000; Vierheiling y col., 2003) y de los microorganismos del suelo, así como por las condiciones físico-químicas del mismo
2. Formación del apresorio, sobre la célula epidérmica, debido al incremento de la presión hidrostática de la zona apical de la hifa infectiva
3. Penetración a través de los pelos radicales o de las células epidérmicas, por la combinación de procesos mecánicos y enzimáticos
4. Crecimiento intercelular a partir de la hifa de penetración que se extiende entre las células de la epidermis hacia la corteza de la raíz, sin penetrar en el tejido vascular ni en los meristemas
5. Desarrollo del micelio extramatricial en el suelo con la formación de las estructuras ramificadas de absorción, las que aumentan considerablemente la adquisición de nutrientes y de agua por la planta
6. Formación de los arbuscúlos intracelularmente, con el consiguiente aumento de la superficie de contacto entre el hongo y la célula vegetal. También se puede formar vesículas y células auxiliares en dependencia de especie fúngica
7. Formación de las esporas (Rodríguez, 2005).

Al parecer, en el establecimiento de la simbiosis actúan señales, que controlan las modificaciones fisiológicas y anatómicas entre ambos simbioses.

En la formación de los arbusculos, el hongo invagina la membrana de la célula vegetal, la que subsecuentemente lo envuelve, creándose así un nuevo compartimiento donde se deposita material de una elevada complejidad molecular, el cual se ha denominado espacio apoplástico o interfase arbuscular. En esta zona, se produce el contacto directo entre el hongo y la planta, ya que los arbusculos ocupan aproximadamente un 35% del volumen de la célula, distribuida en un 20% como ramificación y un 15% como tronco arbuscular (Alexander y col., 1988).

Los arbusculos son las estructuras más importantes, pues en ellos ocurre la transferencia bidireccional de nutrientes y de elementos esenciales en la funcionalidad de la simbiosis, como los grupos fosfatos (Benedetto y col., 2005; Eckardt, 2005; Karandashov y Bucher, 2005) y las fuentes carbonadas (Bago y col., 2000). Se ha observado que las células arbusculadas poseen mayor nivel de sacarosa que el resto de las células radicales del hospedante (Vierheiling y col., 2001). De igual forma, en *Medicago truncatula* se ha detectado la expresión de transportadores de hexosas en raíces micorrizadas, inducidos en las células corticales en la vecindad del hongo, lo cual sugiere que este compete con los mecanismos de la planta, suprimiéndolos (Harrison, 1999).

Durante el desarrollo de estas estructuras ocurren una serie de eventos involucrados en la morfogénesis de la raíz, que incluyen modificaciones a nivel citoplasmático y nuclear (Bonfante y Perotto, 1995), alteraciones metabólicas (Harrison, 1999; Strack y col., 2003), cambios en la expresión génica y activación de respuestas de defensa, así como variación en el balance hormonal y modificación del ciclo celular (Bonfante y Perotto, 2000). Similares reacciones ocurren en respuesta a la invasión de hongos patógenos, pero en el caso de la MA, el citoplasma permanece intacto y funcional, ya que cuando el arbusculo se ha colapsado, las células llegan a ser frecuentemente reinvasadas.

Al estudiar el desarrollo de las raíces micorrizadas, se ha encontrado que en ellas se producen una amplia variedad de elicitores, vinculados a la fase de pre-colonización, los cuales son inductores de respuestas de defensa (Salzer y Boller, 2000).

2.4.1.2. Respuestas de defensa inducidas en la simbiosis micorrízica arbuscular

Durante la micorrización se inducen respuestas de defensa de forma transiente y en menor nivel que las observadas en las interacciones planta-patógeno, las cuales frecuentemente son suprimidas en los estadios posteriores de la interacción. Este patrón de expresión sugiere la participación de compuestos que pueden actuar como elicitores, en los primeros estadios de la formación de las micorrizas (García-Garrido y Ocampo, 2002), donde la quitina y los productos de su hidrólisis podrían ser buenos candidatos (Rodríguez y col., 1998; Bonfante y Perotto, 2000).

En 1993, Giovannetti obtuvo la primera evidencia de moléculas señales generadas por plantas micorrizadas, al utilizar membranas semipermeables que separaban al hongo de la planta. Este autor encontró que las señales eran moléculas difusibles, exudadas por el hospedante, con peso molecular menor a 500 Da (Bonfante y Perotto, 2000).

Bonfante y Perotto, (1995) plantearon que según las características de la interacción micorrízica, al menos tres grupos diferentes de genes de la planta podrían estar involucrados en el proceso simbiótico. El primero constituido por genes relacionados con la síntesis de nuevos componentes de las células radicales colonizadas por hifas intracelulares y arbusculos. El segundo, pudiera incluir genes involucrados en las funciones metabólicas de las micorrizas y el tercero, genes asociados con algunos mecanismos de defensa de la planta (Bonfante y Perotto, 2000).

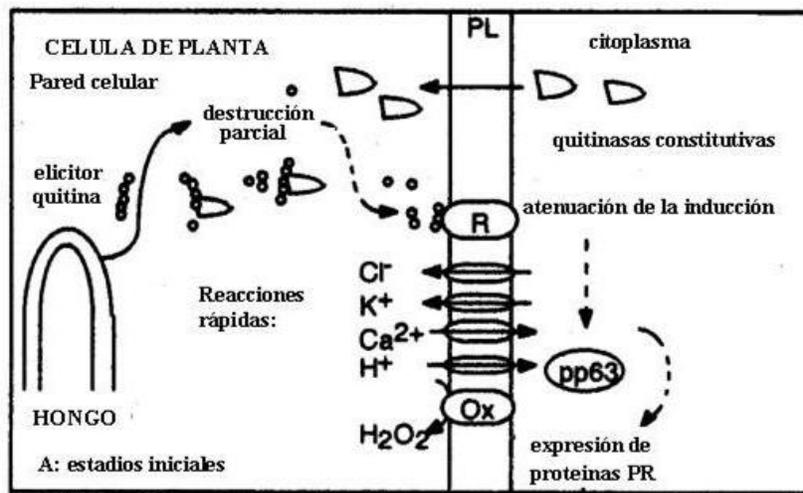
Con relación al tercer grupo, se ha encontrado que durante la interacción simbiótica se produce la expresión de genes relacionados con los procesos de defensa, tales como quitinasas, β -1,3-glucanasas (Gao y col., 2004) y fenilalanina amonio liasas (PAL) (Blilou y col., 2000). Estos genes se activan desde las etapas iniciales de la micorrización, activación que se mantiene durante varias semanas, a diferencia de la chalcona sintasa (CHS) que se induce en fases tardías (Mohr y col., 1998; Bonanomi y col., 2001).

Al tratar de explicar este fenómeno se ha especulado que ello podría ocurrir debido a la participación de compuestos supresores producidos por el hongo micorrizógeno, que prevengan el reconocimiento del elicitador. Según esta teoría, Salzer y Boller (2000) plantearon dos hipótesis. La primera propone que la acción de los oligómeros de quitina es anulada por las quitinasas extracelulares, liberadas por la planta, tal como ocurre en la

interacción *Rhizobium*-leguminosa, durante la inactivación de los factores Nod (oligoquitinas). La segunda asume la participación de fitohormonas en la supresión de las respuestas de defensa, tal como ha sido observado por García-Garrido y Ocampo, (2002). En muchas ectomicorrizas y micorrizas arbusculares ha sido demostrada la capacidad de sintetizar hormonas vegetales (Gongala, 1991).

Según la primera hipótesis, Salzer y Boller (2000) proponen un modelo especulativo de los mecanismos de supresión inducidos por las MA (Fig. 1).

A



B

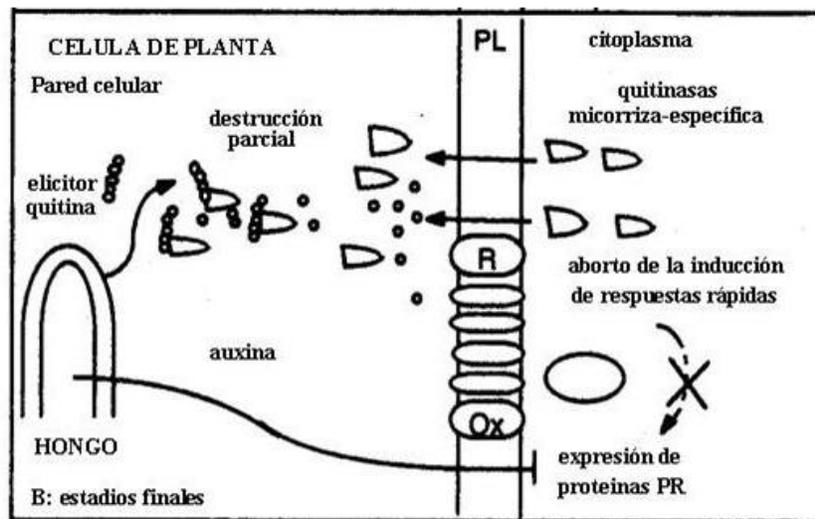


Figura 1: Modelo propuesto por Salzer y Boller (2000) para explicar los mecanismos de supresión de las quitinasas inducidos durante la micorrización arbuscular.

Según este modelo en los primeros estadios de la formación de la simbiosis, (panel A), se produce la expresión constitutiva de quitinasas en la planta, que degradan parcialmente a los elicitores fúngicos derivados de la quitina. Estas tienen baja actividad biológica y por lo tanto solo producen una respuesta de defensa atenuada. En estadios tardíos, (panel B), se produce la acumulación de quitinasas específicas inducidas exclusivamente por la micorrización, las que inactivan completamente a los oligoquitosacáridos al hidrolizarlos hasta monómeros de N-Acetil glucosamina. Mediante la participación de estas enzimas se eliminan las respuestas defensivas rápidas que dan lugar a la síntesis de proteínas relacionadas con la patogénesis (PR). Los resultados experimentales indican que los mecanismos o vías por las cuales la acción de los genes de las quitinasas son suprimidos, son muy específicos (Shaul y col., 2000).

Con relación a la segunda hipótesis se planteó la participación de fitohormonas, las que han sido relacionadas con la supresión de las respuestas de defensa, donde las auxinas de origen fúngico son las mejores candidatas. De igual forma, en las raíces micorrizadas se informó también alteración de los niveles de citoquininas, ácido abscísico y etileno, cuyo balance puede modular la expresión de los genes relacionados con la defensa (Barrer y Tagu, 2000).

Durante el proceso de establecimiento de la MA se observó que las plantas experimentan cambios en la expresión de genes vinculados con las respuestas de defensa, entre las que se encuentran las proteínas relacionadas con patogénesis (PR), siendo las más significativas β -1,3-glucanasas y quitinasas (Mohr y col., 1998; Gao y col., 2004).

2.4.1.2.1. β -1,3-glucanasas

Las β -1,3-glucanasas son enzimas que hidrolizan los enlaces β -O-glicosídicos de las cadenas poliméricas de β -1,3-glucano. Existen dos mecanismos de acción probables, que pueden ser identificados por los productos de hidrólisis como exo- β -glucanasas o endo-glucanasas. Las primeras hidrolizan el sustrato y producen la liberación de residuos de glucosa del extremo de cada cadena, mientras que las segundas rompen los enlaces β en sitios al azar a lo largo de la cadena del polisacárido, para producir oligosacáridos más pequeños. La degradación de los β -glucanos por la enzima es acompañada, frecuentemente, por la acción sinérgica de exo y endo-glucanasas (Pitson y col., 1993). En

muchos casos, se ha encontrado todo un sistema de esta enzima, conformado por numerosas isoformas, las cuales se distinguen por su especificidad hacia el sustrato, modo de acción, peso molecular, punto isoelectrico (pI) y condiciones de síntesis y activación (Vázquez-Garcidueñas y col., 1998).

Entre sus características fundamentales están el pH óptimo entre 4 y 6, la máxima actividad se manifiesta a los 37°C (Zheng y Wosniak, 1997; Pan y col., 1989) y se desnaturalizan entre los 60 y 70°C. El peso molecular varía entre 10 y 100 kDa, en dependencia del organismo de origen (Vázquez-Garcidueñas y col., 1998).

2.4.1.2.2. Quitinasas

Las quitinasas son enzimas que catalizan la hidrólisis de la quitina, las cuales se encuentran presente de forma basal en muchos tejidos de las plantas, aunque su expresión también es inducida durante infecciones por patógenos o por evocadores bióticos (David y col., 1998). Debido a su capacidad de hidrolizar quitina, estas enzimas pueden degradar parcialmente la pared fúngica (Boller y col., 1983) e inhibir el crecimiento de hongos (David y col., 1998).

Varios autores han estudiado las quitinasas mediante diferentes métodos de marcaje a través de los cuales han localizado su expresión en las células que contienen arbusculo (Blee y Anderson, 2000; Lambais, 2000). Su papel en el proceso de la micorrización se inclina a favor de que poseen una acción directa sobre la formación y degradación de estas estructuras (Dumas-Gaudot y col., 2000).

Bonfante-Fasolo (1988) al estudiar el papel de la pared celular en diferentes asociaciones micorrízicas, encontró que a medida que el proceso de establecimiento de la simbiosis avanzaba, la organización fibrilar de la quitina se modificaba. En las esporas este polímero poseía una estructura helicoidal, en las hifas se observó una disposición paralela, mientras que en los arbusculos adoptó una organización amorfa, con apenas 50 nm de grosor. Este autor mediante el empleo de técnicas de localización ultraestructural basadas en la afinidad molecular del oro y la quitina, observó que la accesibilidad a este polímero decreció cuando se encontraba en una organización helicoidal, a diferencia de la estructura paralela y la amorfa, las cuales fueron susceptibles a ser degradadas por las quitinasas. Este resultado aportó una información importante sobre el papel de esta enzima en el desarrollo de la micorrización. Ella puede actuar como facilitadora del intercambio entre los

simbiontes al degradar la pared fúngica. En los arbusculos la quitina es muy sensible a la acción de las quitinasas (Dumas-Gaudot y col., 2000).

Mediante diferentes estudios de expresión han sido localizados ARNm de varias enzimas relacionadas con las respuestas de defensa en las células que contienen arbusculos, entre las que se encuentran las β -1,3-glucanasa, PAL, CHS y glicoproteínas ricas en hidroxiprolina (HRGP) (Blee y Anderson, 2000; Lambais, 2000).

De forma general, se informa que los cambios que ocurren durante la transcripción de genes de defensa en las células con arbusculos no son tan drásticos como los observados en la respuesta hipersensible, donde se activa la PCD. Las células arbusculadas son insensibles a ser atacadas por patógenos, lo cual podría estar dado por las modificaciones que sufren como el reforzamiento de la pared celular.

2.4.1.2.3. Peroxidasa

Las peroxidasas son enzimas consideradas como elementos importantes en la compleja respuesta defensiva de las plantas, ya que actúan en la regulación de los procesos conocidos como explosión oxidativa. En estos procesos se produce la acumulación de especies activas de oxígeno, entre las que se encuentra el peróxido de hidrógeno (Rodríguez y col., 2003).

Fry, (1986, citado por Lambais, 2000) postula que la liberación de proteínas estructurales insolubles provenientes de la pared celular es catalizada por esta enzima, en presencia de H_2O_2 , la cual es regulada a nivel transcripcional y post-transcripcional. De esta forma se produce la hiperpolarización de la membrana, mediante la apertura de canales de calcio (Mori y Schroeder, 2004), lo cual ha sido observado en diferentes tipos de células de tomate (Hamilton y col., 2000; Demidchik y col., 2003; Foreman y col., 2003). Su inducción ocurre, además, como respuesta a diferentes estrés, ya sean bióticos, como el ataque por organismos patógenos, o abióticos.

2.4.1.3. Isoenzimas y sus métodos de estudio

Las isoenzimas son formas múltiples de una enzima determinada que pueden presentarse en una especie e inclusive ser características de una sola célula y están codificadas por diferentes alelos de un mismo locus (Market y Moller, 1959). Ellas poseen similar especificidad hacia el sustrato, así como condiciones de síntesis y activación (Vázquez-Garcidueña y col., 1998; Rodríguez, 2003).

La multiplicidad isoenzimática puede ser el resultado de diferencias en las secuencias de aminoácidos o producto de modificaciones post-traduccionales. En el primero la variación esta dada porque son distintos alelos del mismo *locus* (aloenzimas) o porque pertenecen a diferentes *loci* (isoenzimas no alélicas), mientras que en el segundo caso se producen cambios en la conformación de la estructura terciaria (isoenzimas conformacionales). Su origen puede ser diverso, siendo una de las causas la ocurrencia de la duplicación génica seguida de divergencia entre los *loci*. Este mecanismo, generalmente, es un proceso lento dado por la ocurrencia de mutaciones, seguido por la selección o deriva al azar.

La presencia de formas isoenzimáticas le brinda a las células una diversidad en las funciones que puede realizar, tanto en los mecanismos de regulación metabólica, como en los de señalización y expresión diferencial de los genes, lo cual le permite ampliar el límite de tolerancia ante diversos estrés (González, 2002).

La definición de las isoenzimas como marcadores ha sido controvertida, ya que algunos las denominan marcadores bioquímicos, mientras que otros al considerar su base genética las incluyen entre los marcadores moleculares (Rodríguez, 2003). González (2002) las ha descrito como “el mejor método corriente para medir variaciones genéticas cercanas al nivel del ADN, relativamente libre de efectos ambientales y sobre un número de muestras manipulables”.

Para el estudio de estos sistemas se han empleado diversos métodos de electroforesis, los cuales se basan en la movilidad diferencial que poseen las proteínas en presencia de un campo eléctrico. La velocidad de migración en el gel está en dependencia de su carga neta, el peso molecular y el pH del medio, por lo que se han diseñado diferentes tipos de electroforesis que combinan algunas de estas características. Los más utilizados son los geles de poliacrilamida (PAGE) y el enfoque isoeléctrico o focalización isoeléctrica (IEF, por sus siglas en inglés).

La PAGE fue introducida por Raymond y Weintraub en 1959. En esta técnica se emplea una malla de poliacrilamida que funciona como tamiz molecular, donde el tamaño del poro puede ser regulado al variarse las concentraciones de los geles. Este método es capaz de separar las proteínas según sus dimensiones y forma. De esta manera las isoformas de mayor peso molecular se retardan, mientras que las de menor peso se mueven con mayor

libertad en función de su carga iónica. Mediante el uso de la PAGE se hace posible separar proteínas de cargas idénticas, pero de dimensiones diferentes (González, 2002).

Teniendo en cuenta que las proteínas en un medio polarizado libre de barreras se pueden mover en función de su carga, H. Svensson ideó un método para su separación denominado focalización isoelectrica, la cual permite la determinación de su punto isoelectrico. En la IEF se utiliza un soporte gelificado con un gradiente de pH establecido mediante el empleo de una mezcla de ácidos orgánicos de bajo peso molecular y bases (anfóliticas), las cuales se distribuyen por si mismas cuando se le aplica un campo eléctrico a través del gel, y crean un gradiente. Este soporte permite que las isoformas migren y queden “enfocadas” en aquella posición cuyo valor de pH es igual a su punto isoelectrico, formando una banda bien definida (Nelson y Cox., 2003).

El empleo de las isoenzimas posee sus limitaciones debido a que muchos cambios son originados post-traduccionales y cerca del 30% de las sustituciones de base en el ADN no producen modificaciones en la secuencia aminoacídica, a causa de la redundancia del código genético (Rodríguez, 2003). A esto se le une el fenómeno de que no siempre las sustituciones de aminoácidos en las proteínas producen alteración en su movilidad electroforética (González, 2002). A pesar de ello continúan siendo una potente herramienta en el estudio de diferentes procesos metabólicos.

Debido a la facilidad para su detección han sido ampliamente utilizadas, en la estimación de la variación genética entre variedades (Florido y col., 2002; Lara y col., 2003, Morales y col., 1999). También se han empleado en la caracterización de diferentes enzimas relacionadas con el desarrollo vegetativo (Andrews y col., 2002), los mecanismos de defensa en planta (Pozo, 1999; Pozo y col., 1999, 2002; Shaul y col., 2000; González, 2002; Talano y col., 2006) y con los procesos simbióticos, entre ellos las micorrizas arbusculares (Rodríguez y col., 2001, 2003; Rodríguez, 2003; Pozo y col., 2005).

2.4.1.4. Empleo de los HMA en la agricultura

Durante más de 15 años en Cuba se han desarrollado una serie de investigaciones relacionadas con el uso y manejo de los HMA en diferentes agroecosistemas, cuyos resultados han brindado importantes aportes en el uso y manejo de este biofertilizantes en

diferentes cultivos a nivel de invernadero y campo (Fernández y col., 1999; Terry 2001; Pulido y col., 2003a y b; Fernández y col., 2002; Rodríguez y col., 2006 b).

Ortiz y Fernández, (1998), estudiaron la forma y momento de aplicación de los HMA mediante recubrimiento de semillas de arroz y encontraron un marcado efecto positivo mediante esta tecnología, así como incrementos en el rendimiento y sus componentes, sin dañar la calidad industrial del arroz.

Se demostró la influencia positiva de cepas de HMA (*Glomus clarum* y *G. fasciculatum*) sobre el desarrollo de posturas de tomate y cebolla, efecto que se favoreció al ser coinoculadas con rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (*Azospirillum brasilense* y *Burkholderia cepacea*) (Pulido y col., 2003b). Hernández y Chailloux (2004) también obtuvieron resultados favorables al estudiar combinaciones de los HMA, *G. moseae* y *G. fasciculatum*, con las rizobacterias *Azospirillum brasilense*, *Azotobacter chroococum* y *Pseudomonas fluorescens* en el cultivo del tomate. Similares resultado habían sido obtenidos por Corbera y Nápoles (2000) en el cultivo de la soya al combinar HMA con *Bradyrhizobium japonicum*.

Se ha demostrado la gran aceptación de los biofertilizantes a base de HMA entre los productores, por lo que uno de los objetivos primordiales, lo constituye ampliar el estudio del potencial de los HMA en la bioprotección contra patógenos radicales y foliares.

2.4.1.5. Contribución de la micorrización a la protección contra el ataque de los patógenos.

La agricultura moderna se esfuerza en reducir el empleo de los pesticidas sintéticos y optimizar el uso de alternativas estratégicas para el control de los patógenos, donde los HMA constituyen un elemento a tener en cuenta. 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 (Harrier y col., 2004).

Es bien conocida la influencia positiva de las MA en la reducción de la incidencia de diversos patógenos del suelo, entre los que se encuentran grupos de hongos (Pozo y col., 2002; Harrier y col., 2004; Fritz y col., 2006) y nematodos (Diedhiou y col., 2003; Li y col., 2006).

Entre los patógenos fúngicos del suelo contra los cuales las MA le han conferido protección a las plantas se encuentran especies de *Aphanomyces*, *Cylindrocladium*, *Fusarium*, *Macrophomina*, *Phytophthora*, *Pythium*, *Rhizoctonia*, *Sclerotinium*, *Verticillium* y *Thielaviopsis*, (Lingua y col., 2002; Harrier y col., 2004).

Las algas del género *Phytophthora* han sido estudiadas ampliamente ya que son causantes de grandes pérdidas en cultivos de la familia de las Solanáceas, fundamentalmente en las condiciones del trópico (Judelson, 1997; Salzer y col., 2000; Yamamizo y col., 2006). Diversos autores han estudiado la interacción de diferentes especies de HMA con estos patógenos, los que informan reducción de las enfermedades causadas por los mismos (Cordier y col., 1996, 1998; Dugassa y col., 1996; Jaizme-Vega y col., 1997). Pozo y col. (2002) informaron la reducción del índice de la enfermedad causada por *P. parasitica* (*P. nicotianae*) y la inducción de proteínas del grupo de las PRs mediante el empleo de especies de *Glomus*.

Zheng y col. (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 y suprimió la mortalidad radical, con un incremento a los nueve días de la actividad de la enzima peroxidasa asociado a este fenómeno.

Se informó un efecto positivo de *G. intraradices* sobre *Fusarium oxysporum* en plantas de *Dianthus caryophyllus* y *Tapetes patula*, en las cuales se ha encontrado la reducción de los síntomas de la enfermedad y el decrecimiento de los propágulos en el suelo (St-Arnaud y col., 1997). Similar resultado fueron observados por Dugassa y col. (1996) al estudiar la misma especie de HMA y de hongo fitopatógeno en *Linum usitatissimum*. Sin embargo, estos autores encontraron que la micorrización incrementó la susceptibilidad a *Oidium lini*. Otro de los grupos de patógenos en los que se ha estudiado la influencia de los HMA por los daños que causan a la agricultura, son los nematodos formadores de agallas de la especie *Meloidogyne incognita*, ante el cual se han observado diferentes respuestas (Diedhiou y col., 2003; Nagesh y Parvatha, 2004; Gómez y Rodríguez., 2005; Li y col., 2006).

García Garrido y Ocampo (1988, citado por García Garrido y Ocampo, 2002) informaron que la micorrización con *G. mosseae* protegió a plantas de tomates frente al ataque de la

bacteria *Erwinia caratovora*, además de producir la disminución en la población del microorganismo en la rizosfera.

Como se puede observar existe abundante información sobre el empleo de los HMA en el combate contra los organismos patógenos del suelo, la que puede ser de gran utilidad en la agricultura. Además, de haberse encontrado buenos resultados en la bioprotección contra grupos de patógenos diversos, este biofertilizante constituye una alternativa ambientalmente segura.

2.5. Compuestos inductores de resistencia en plantas

2.5.1. Elicitores

Los elicitores son compuestos orgánicos solubles en agua de bajo peso molecular que poseen alta afinidad por sitios de la pared y de la membrana de la célula hospedante que actúan como señales. En ella actúan como receptores y producen la activación de una cascada de transducción de señales, que conlleva a la expresión de diferentes genes relacionados con los procesos de defensa (Boller, 1995). Estos pueden ser de dos tipos: los que son específicos para una interacción hospedante-patógeno determinada y por lo tanto están dados por el genotipo de avirulencia del agente invasor y de resistencia del organismo invadido; mientras que los no específicos son frecuentemente determinados por todo el genotipo del patógeno (Penninckx, 1998).

Los compuestos que elicitán las respuestas de defensa primaria en planta pueden ser de naturaleza diversa, siendo, fundamentalmente, del grupo de los oligosacáridos (Creelman y Mullet, 1997), aunque también ha sido caracterizada una proteína de bajo peso molecular con actividad elicitora, la sistemina (Ryan y Pearce, 1998).

Los oligosacáridos que actúan como inductores son carbohidratos complejos, cuyo origen puede estar dado por la degradación de la pared celular del hospedante o la del agente invasor y son capaces de modular el crecimiento y desarrollo de las plantas a bajas concentraciones (Creelman y Mullet, 1997).

Es posible que en las MA, los fragmentos de la pared celular del hongo, tales como los oligómeros de quitina, puedan ser reconocidos como elicitores por la planta, similar a lo que ocurre en las infecciones causadas por patógenos (Salzer y Boller, 2000). La quitina es el mayor componente de la pared celular de los HMA, la cual no solamente posee un papel

estructural, sino que también actúa como molécula señal (Bonfante y Perotto, 2000). Se ha observado, que tanto el polímero como sus derivados estimulan el establecimiento de la simbiosis MA (Rodríguez y col., 1998).

Otros elicitores comunes a los hongos lo constituyen los glucanos, los péptidos de bajo peso molecular y los oligómeros pépticos liberados por la hidrólisis de la pectina de la pared celular vegetal (Blee y Anderson, 2000). La recepción de estos elicitores produce la activación de las cascadas de transducción de señales en el hospedante, que involucran cambios en el flujo iónico y activación de proteínas a nivel de membrana plasmática, así como la inducción de kinasas y fosfolipasas (García-Garrido y Ocampo, 2002). También se ha observado procesos de fosforilación y desfosforilación de proteínas, estimulación de proteínas G y síntesis de peróxido de hidrógeno, respuestas que varían según el elicitador y el hospedante en cuestión (Salzer y Boller, 2000).

En las interacciones planta-patógeno, los elicitores juegan un papel fundamental al constituir las moléculas activadoras de todo el sistema de defensa que se desencadena. Ante el ataque por el agente invasor se produce la acumulación de fitoalexinas y de lignina, así como la activación de diferentes enzimas, entre las que se encuentran los inhibidores de proteasas, peroxidasas, lipoxigenasas, β -1,3-glucanasas (Creelman y Mullet, 1997, Rodríguez y col., 2004), PAL, quitinasas y quitosanasas (Falcón y col., 2002, Rodríguez y col., 2006 a). Se ha encontrado que en estadios tempranos de la micorrización ocurre la acumulación transiente de fitoalexinas, la que en algunos casos puede ser inducida también en estadios tardíos (Lambais, 2000).

2.5.1.1. Sistemina

La sistemina es una hormona polipeptídica de 18 aminoácidos, involucrada en la expresión de genes de defensa en plantas de tomate y otras especies de solanáceas, como respuesta al ataque por herbívoros y daño mecánico (Ryan y Pearce, 1998).

Este polipéptido se aisló a partir de hojas de plantas de tomate, gracias a su capacidad de inducir la acumulación de inhibidores de proteasas, los cuales se sugieren que interfieren con los procesos de digestión de los insectos plagas. Sin embargo, investigaciones posteriores revelaron que la actividad inductora se extiende a la expresión, de por lo menos 19 proteínas, entre las que se inducen endo y exo-proteasas, componentes de las vías de

transducción de señales y otras de las cuales aún se desconoce su función en la defensa de las plantas (Schaller, 1999).

Esta hormona polipeptídica se encuentra codificada por un gen nuclear de 4,2 kb con 11 exones y 10 intrones, que generan un ARNm maduro de 920 bp. Todo indica que la sistemina se produce a partir de un precursor de 200 aminoácidos, llamado prosistemina, por hidrólisis proteolítica catalizada por enzimas aún no identificadas (McGurl y col., 1992). Dicha hidrólisis es inducida por el daño mecánico o por el ataque de insectos, liberándose el polipéptido de 18 amino ácidos.

Su estructura no varía mucho entre las especies donde se ha identificado. En todas las secuencias identificadas se encuentran dos motivos Pro-Pro que son parte del palíndromo XXQXBPPXBBXPPBXQXX, donde la B es Lys o Arg, la prolina en posición 13 y treonina en posición 17 son importantes para su función biológica (Ryan y Pearce, 1998).

2.5.1.1.1. Actividad biológica

Después de la liberación de la sistemina, mediante la hidrólisis proteolítica, y su posterior traslocación por el floema, se produce una respuesta sistémica, en la que actúa como una señal primaria en tejidos remotos al sitio dañado (Schaller, 1999; Ryan y col., 2002; Pearce y Ryan, 2003; Schillmiller y Howe, 2005). Una vez reconocida por las células blanco, se produce la activación de una cascada de señales que conlleva a la alteración del transporte iónico (Schaller y Oecking, 1999), al incremento en la actividad de MAPK (proteínas kinasas activadoras del mitógeno, por sus siglas en inglés) (Stratman y Ryan, 1997) y de Fosfolipasas tipo A2 (Narváez-Vázquez y col, 1999). También se induce la calmodulina (Bergey y Ryan, 1999) y se incrementa de forma transiente la concentración del Ca^{2+} intracelular (Moyen y col., 1998).

Farmer y Ryan (1992) propusieron un modelo en el cual el primer evento es la liberación de ácido linoleico de la membrana del cloroplasto (Conconi y col., 1996) y su conversión en ácido jasmónico (AJ) por la vía de los ácidos octadecanoicos, con la subsiguiente activación de genes de defensa (Farmer y Ryan, 1992; O'Donnell y col., 1996).

Scheer y Ryan (1999), mediante el empleo de ^{125}I -Tyr²,Ala¹⁵-Sistemina como ligando, y preparaciones de membranas microsomales preparadas a partir de cultivo celular de plantas de tomate (*Lycopersicon peruvianum*), lograron caracterizar el receptor para este

polipéptido. Las evidencias señalan que es una proteína de membrana de 160 kDa, la cual no es abundante, ya que su número ha sido estimado en 3000 unidades/célula. Sin embargo, se encontró que este número se incrementa luego del tratamiento del cultivo celular con metil jasmonato (MeJA), lo que se propone ocurre por síntesis de *novο* del receptor.

Teniendo en cuenta los trabajos realizados mediante el empleo de diferentes mutantes, Schaller (1999) plantea un modelo de acción de la sistemina, el que tiene en cuenta la ocurrencia de una serie de eventos a nivel de membrana, con la participación de canales de calcio, hiperpolarización de la membrana y ATPasaH⁺, así como otros a nivel citoplasmático que incluyen la participación de MAPK (Stratmann, 2003), Fosfolipasa A₂ y la Vía de los ácidos octadecanoícos (Farmer y Ryan, 1992), con la consiguiente síntesis de *novο* de ácido jasmónico; hormona que actúa directamente en la activación de genes de defensa.

Esta hormona polipeptídica es activa a concentraciones extraordinariamente bajas, del orden de los fmol por planta, pero en suspensiones celulares se ha empleado a concentraciones de los nmol, al igual que en ensayos realizados en plantas (Ryan, 2000; Orozco-Cárdenas y col., 2001).

A pesar de que la sistemina ha sido descubierta y caracterizada hace más de una década, los estudios se han circunscrito a la protección contra insectos plagas mediante la inducción de inhibidores de proteasas y algunas enzimas relacionadas con defensa. Sin embargo, no se ha abordado su acción en la protección contra patógenos microbianos, como los hongos, los cuales constituyen un importante causante de pérdidas del rendimiento en las solanáceas a nivel mundial.

Dadas las características de las respuestas que esta hormona induce y las observadas en las plantas micorrizadas es de gran importancia estudiar su acción combinada en la búsqueda de la protección contra patógenos fúngicos e insectos.

3. MATERIALES Y METODOS

Para cumplimentar los objetivos propuestos se realizaron tres experimentos, los cuales se enmarcaron en el esquema experimental que se muestra en la figura 2.

Aspectos generales

Se empleó la variedad de tomate Amalia (*Solanum lycopersicum* L., syn. *Lycopersicon esculentum* Mill.) (Código Internacional de Nomenclatura Botánica), obtenida por el Departamento de Mejoramiento Genético del Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA, La Habana, Cuba) (Álvarez y col., 1997), la cual es empleada por los productores de nuestro país para inicio y cierre de campaña de esta hortaliza, por su buen comportamiento general y elevados rendimientos (Álvarez y col., 2004). En condiciones *in vitro* se determinó que es medianamente tolerante a *Alternaria solani* y resistente a *Phyophthora infestans* (Álvarez y col., 1997), pero en producción, esta variedad se encuentra entre las más afectadas por *A. solani* (MINAGRI, 2002), sin embargo aun no ha sido evaluada ante *P. nicotianae*.

Las semillas fueron desinfectadas superficialmente con hipoclorito de sodio comercial al 10% durante 10 min, seguido de tres lavados con agua destilada (H₂O destilada) estéril, posterior a los cuales se procedió a su siembra.

Los inóculos de los HMA fueron producidos en condiciones controladas, cuyo título y pureza fue analizado por el Laboratorio de Micorrizas del Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas. Los mismos contenían un promedio de 25 esporas por gramo de inóculo.

La sistemina sintética fue obtenida por la empresa mexicana BQ SOS Laboratories, la que se aplicó a razón de 1 mL por planta, en la base del tallo, para lo cual se empleó una solución acuosa preparada a 44 nM, concentración recomendada por el fabricante para su aplicación en el cultivo del tomate en condiciones controladas, así como por otros trabajos realizados en el Estado mexicano de Guanajuato en la última década (Delano, 2000).

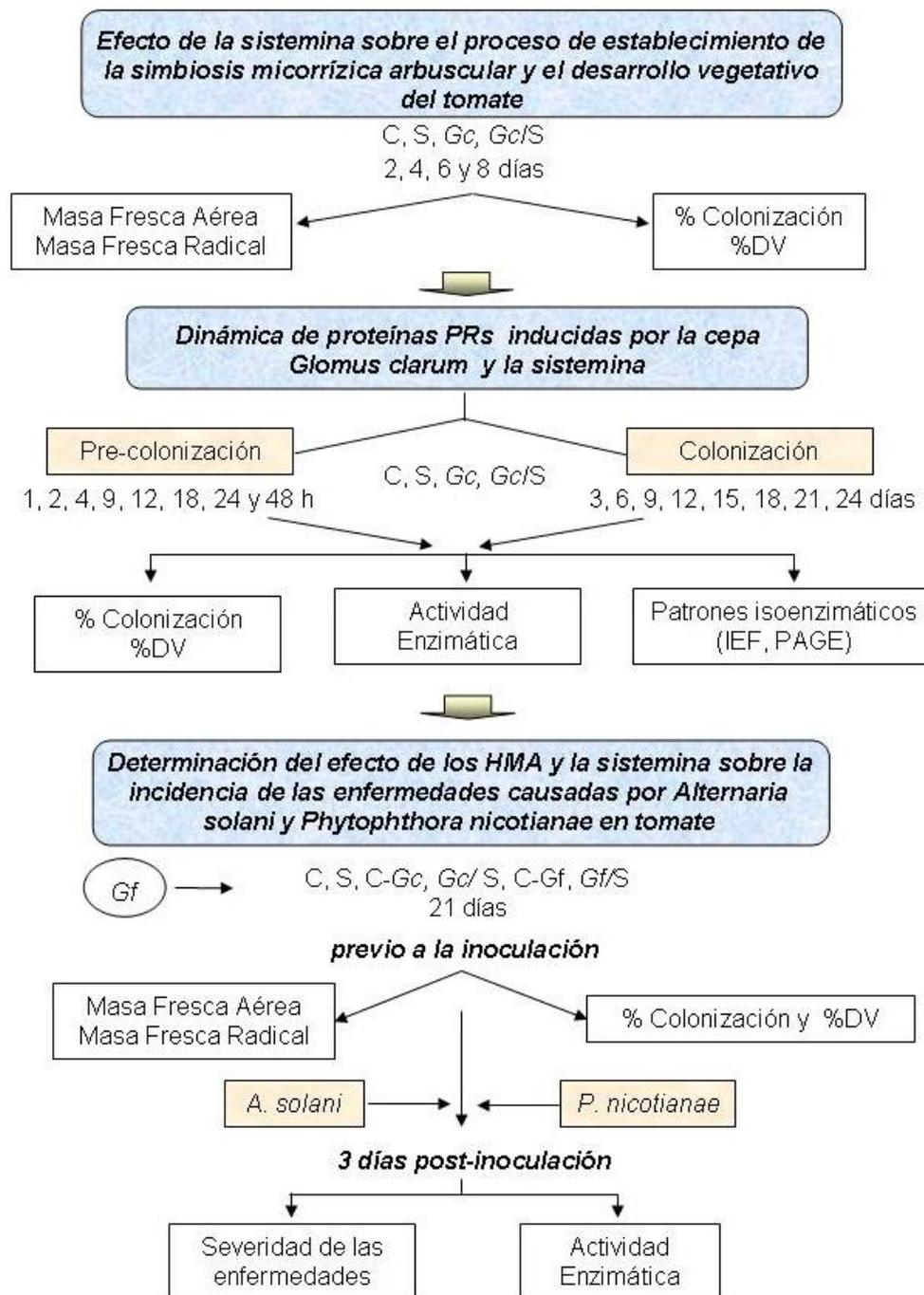


Figura 2: Esquema de trabajo empleado en el desarrollo de los experimentos.
 Experimento 1 y 2: C (control), S (sistemina), Gc (*Glomus clarum*) y Gc/S (*Glomus clarum* con sistemina)
 Experimento 3: C (Control), S (Sistemina), C-Gc (Control micorrizado con *Glomus clarum*), Gc/S (*Glomus clarum* mas sistemina), C-Gf (Control micorrizado con *Glomus fasciculatum*) y Gf/S (*Glomus fasciculatum* mas sistemina).

3.1. Efecto de la sistemina sobre el proceso de establecimiento de la simbiosis micorrízica arbuscular y el desarrollo vegetativo del tomate

Los HMA y la sistemina han sido estudiados de forma independiente en el tomate; sin embargo, se desconoce el efecto que pueda tener la acción combinada de ambos, por lo que se procedió a la evaluación de la acción conjunta de un hongo micorrizógeno y el elicitor mediante la determinación del desarrollo vegetativo y del establecimiento de la simbiosis micorrízica.

Obtención del material vegetal

Se sembraron 30 semillas por maceta, de 250g de capacidad. Como sustrato se utilizó la termolita estéril, sustrato artificial que permite obtener raíces limpias, por lo que fue necesario suministrarle los nutrientes a las plántulas de forma permanente. Para ello se mantuvieron las macetas en bandejas embebidas en la solución nutritiva de “Long Ahston”, la cual posee la siguiente composición (en g.L⁻¹); KNO₃, 0,404; MgSO₄.7H₂O, 0,038; Ca(NO₃)₂.4 H₂O, 0,944; NaH₂PO₄.H₂O, 0,0986; MnSO₄.H₂O, 0,0017; CuSO₄.5.H₂O, 0,0003; ZnSO₄.7 H₂O, 0,0003; H₃BO₃, 0,0031; NaCl, 0,0059; (NH₄)₆Mo₇O₂₄.4H₂O, 0,0009; FeC₆H₅O₇, 0,0245; y ácido cítrico, 0,0245. Para favorecer el establecimiento de la simbiosis micorrízica, la concentración de fósforo se ajustó a 14.6 mg.mL⁻¹, teniendo en cuenta la influencia que tiene este elemento sobre la micorrización (Fernández, 2003).

Aplicación de los productos

Se seleccionó el hongo micorrizógeno *Glomus clarum* (Nicolson y Schenk), procedente de la colección del INCA, para lo cual se tuvo en cuenta los resultados positivos obtenidos en su introducción como biofertilizante en la agricultura cubana (Rivera, 2003). La inoculación del HMA se realizó mediante recubrimiento de semillas (Fernández y col., 2000).

La sistemina se adicionó inmediatamente después de la germinación, en los tratamientos que correspondían según el diseño del experimento. Previo a su aplicación a todas las plantas se les suspendió el suministro de la solución nutritiva, la que se restableció al día siguiente. Al resto de los tratamientos se les añadió agua destilada. La germinación se definió como el momento en el cual emergieron las plántulas.

Las plantas se desarrollaron en cámara de crecimiento, bajo condiciones controladas, con fotoperiodo de 8h de oscuridad a 16°C y 16h de luz a 28°C y una intensidad de 200-300

$\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{seg}^{-1}$, las raíces se mantuvieron inmersas en la solución nutritiva. Se mantuvo un grupo de plántulas que constituyeron los controles a las cuales no se les aplicó HMA ni sistemina, para conformar los siguientes tratamientos: Control (sin micorriza ni sistemina, C); Sistemina (S); *G. clarum* (Gc) y la combinación de *G. clarum* con la sistemina (Gc/S).

Muestreo y evaluación

Los muestreos se efectuaron a los 2, 4, 6 y 8 días después a la germinación (ddg), en los cuales se evaluaron 30 plantas por tratamiento en cada tiempo de evaluación. El material vegetal fue separado en hojas y raíces. Una fracción de estas últimas se secó en estufa a 70°C para la determinación del establecimiento de la simbiosis micorrízica (colonización micorrízica).

3.1.1. Determinación del desarrollo vegetativo de las plántulas

En todos los momentos de muestreo se extrajo todo el material vegetal de las macetas correspondientes, teniendo el cuidado de recuperar todas las raicillas. Las plantas se lavaron con agua corriente para retirar el sustrato, luego se dejaron escurrir para evaluar el desarrollo vegetativo, el que se cuantificó como masa fresca aérea y masa fresca radical, mediante el empleo de Balanza Analítica Adam Equipment Co. LTD Ada. Se realizaron tres determinaciones por muestra para calcular el promedio.

3.1.2. Cuantificación de la colonización micorrízica

Se estudió la influencia de los tratamientos sobre el establecimiento de la simbiosis micorrízica mediante la determinación de los indicadores que caracterizan este proceso. De las raíces secas a 70 °C se seleccionaron las raicillas, las que fueron teñidas mediante el método descrito por Phillips y Hayman (1972). La evaluación se realizó por el método de los interceptos desarrollado por Giovanetti y Mosse (1980), mediante el cual se determinó el porcentaje de colonización micorrízica.

La determinación del porcentaje de Densidad Visual (% DV) o intensidad de la colonización se realizó siguiendo la metodología descrita por Trouvelot y col. (1986), mediante la cual se evaluó la ocupación fúngica de cada intercepto y se le asignó un nivel (Tabla 1).

Tabla 1: Transformación de los porcentajes de ocupación fúngica intrarradical en niveles, según Trouvelot (1986).

Nivel de evaluación	% de ocupación observada
0	0
1	1
2	2.5
3	15.5
4	35.5
5	47.5

Posteriormente se realizó el cálculo según la fórmula:

$$\% DV = \frac{\sum A_i}{\sum Z_i}$$

donde Z: número de interceptos contados en cada nivel

A: multiplicación del número de interceptos contados en cada nivel (Z), por el porcentaje de ocupación observada.

Diseño experimental y análisis estadístico

Se empleó un diseño completamente aleatorizado con tres repeticiones. Se muestrearon 30 plantas por repetición en cada momento de evaluación. El experimento se realizó tres veces en el tiempo, por lo que se muestran los resultados de una de las repeticiones, teniendo en cuenta que se observó un comportamiento similar de los tratamientos, durante las mismas. Se verificó el cumplimiento de las premisas del ANOVA, como la normalidad y homogeneidad de la varianza y posteriormente los datos fueron procesados estadísticamente comparándose las medias mediante los intervalos de confianza con un grado de significación de 95%. Para analizar estadísticamente el porcentaje de la colonización micorrízica, los datos fueron transformados mediante el $\arcsin\sqrt{x}$, por ser un parámetro binomial. Todas las comparaciones se realizaron según el paquete estadístico SPSS Versión 10.0 para Windows.

3.2. Dinámica de proteínas PRs inducidas por *Glomus clarum* y la sistemina durante el establecimiento de la simbiosis MA

Con el objetivo de determinar la influencia de los HMA y la sistemina sobre la inducción de proteínas relacionadas con los procesos de defensa en plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L), se desarrolló un experimento en condiciones controladas, en el que se cuantificaron las actividades enzimáticas y se determinaron los patrones isoenzimáticos de proteínas PRs.

El mismo se realizó en dos fases independientes, para poder estudiar el proceso de intercambio de señales entre los simbioses (Pre-colonización), donde aun no es detectable la presencia del HMA en las raíces por los métodos tradicionales de evaluación y la fase de colonización.

Aspectos comunes

El sustrato estuvo conformado por una mezcla de suelo ferralítico rojo lixiviado típico y humus de lombriz en relación 1:1 (v:v), estéril, cuya composición se muestra en la Tabla 2. Tanto en este experimento como en el que continúa, se empleó una concentración de fósforo superior a la utilizada en el primer experimento, debido a que las plantas se desarrollaron hasta los 24 días, por lo que se necesitaba asegurar que las mismas no sufrieran deficiencias nutricionales durante este tiempo.

Tabla 2: Características físico-químicas del sustrato conformado por la mezcla de suelo Ferralítico Rojo Lixiviado típico y humus de lombriz en relación 1:1 (v:v)

K ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	P	Materia Orgánica	pH
(cmol.kg ⁻¹)			(mg.mL ⁻¹)	(%)	(H ₂ O)
0.31	25.5	9.0	160.	14.7	7.1

Las plántulas crecieron en casa de cristal, a una temperatura promedio de 25 ± 3 °C y humedad relativa de 75-80 %.

Se mantuvo el empleo de la especie de HMA *G. clarum* (Gc), la que se inoculó de forma diferente en cada periodo, según se destaca a continuación. Los tratamientos quedaron conformados de la siguiente forma: control, sin aplicación de HMA ni de sistemina (C), sistemina (S), *G. clarum* (Gc) y *G. clarum* más sistemina (Gc/S).

3.2.1. Periodo de pre-colonización

Se emplearon bandejas de 120 orificios (10 mL de capacidad), donde se sembró una semilla en cada uno. Este sistema permitió realizar los muestreos en cortos periodos de tiempo, aunque limitó el volumen del material que se obtuvo. El HMA y la sistemina se aplicaron cuando las plantas poseían 21 días de desarrollo para poder estudiar la actividad de las proteínas PRs en etapas tempranas de la simbiosis. Ambos se añadieron a razón de 1 mL por planta, donde el HMA fue preparado en una suspensión acuosa de 20 esporas.mL⁻¹.

Los muestreos se realizaron en las primeras 48 horas en los siguientes momentos: 1, 2, 4, 8, 12, 18, 24 y 48 horas post-aplicación de los productos

3.2.2. Periodo de colonización

Se utilizaron bandejas de 10 kg de capacidad, para obtener abundante material vegetal. El HMA se aplicó mediante el recubrimiento de las semillas (Fernández y col., 2000) para lo cual se empleó inóculo en formulación sólida con un promedio de 25 esporas por gramo de inóculo (Laboratorio de Micorrizas del INCA).

. Posterior a la emergencia se añadió la sistemina. Para los muestreos se siguió una dinámica desde los tres hasta los 24 días después de la germinación (ddg), correspondientes a los 3, 6, 9, 15, 18, 21 y 24 ddg.

Procesamiento de muestras

En todos los momentos de muestreo de ambos periodos, el material vegetal fue separado en hojas y raíces, dividiéndose estas últimas en dos grupos. Una porción se empleó para la determinación de las actividades enzimáticas y los patrones isoenzimáticos, mientras que la otra se secó en estufa a 70 °C para la determinación del establecimiento de la simbiosis micorrízica (colonización micorrízica).

3.2.3. Dinámica de la colonización micorrízica

En todos los momentos de muestreo se evaluó el establecimiento de la simbiosis micorrízica, con el objetivo de determinar la influencia de la sistemina sobre este proceso. Para ello se cuantificó el porcentaje de colonización y de la densidad visual, mediante los métodos referidos en el acápite 3.1.2.

3.2.4. Cuantificación de las actividades enzimáticas en las raíces y en las hojas de plantas de tomate

Con el objetivo de determinar la inducción de proteínas relacionadas con la defensa de la planta, se evaluaron diferentes sistemas enzimáticos, pertenecientes a las proteínas relacionadas con la patogénesis (PRs), los que fueron cuantificados en las raíces y en las hojas, en todos los momentos de muestreo. En la fase de precolonización se determinó la actividad enzimática de β -1,3-glucanasas y quitinasas, mientras que en la colonización se cuantificó además peroxidasa.

Tabla 3: Sistemas isoenzimáticos y métodos empleados.

Tipo de enzima	Sistema enzimático	Nomenclatura	Método de cuantificación
β -1,3-glucanasa	PR-2	E.C.3.2.1.39	Zheng y Wozniak (1997)
quitinasa	PR-3	E.C.3.2.1.14	Bolle y col. (1983)
peroxidasa	PR-9	E.C.1.11.1.7	Fric (1976)

Preparación de los extractos de proteínas para la actividad de PRs

Se procedió a la extracción de proteínas mediante el método descrito por Solórzano (2002). Para ello se realizó una mezcla con las raíces y con las hojas de las plantas de cada réplica, donde se procesó cada órgano de forma independiente. La concentración de proteína se determinó según las recomendaciones de Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories), basada en el método de Bradford (1976), el cual utiliza una solución ácida de Azul de Coomassie® Brillante G-250. Para la curva patrón se prepararon cinco diluciones de albúmina de suero bovino (BSA por sus siglas en inglés), con concentraciones desde 0,05 a 0,5 mg.mL⁻¹. La absorbancia se leyó a 595 nm, durante los primeros 30 min, para lo cual se empleó el espectrofotómetro Ultrospec Plus Spectrophotometer, (Pharmacia LKB).

3.2.4.1. Actividad β -1,3-glucanasas

La cuantificación de la actividad de esta enzima se realizó por el método descrito por Zheng y Wozniak (1997), en el cual empleó laminarina como sustrato y la solución amortiguadora acetato de sodio 50 mM pH 5.5. Las determinaciones se desarrollaron en placas de microtítulo de polipropileno autoclavables Nunc®96 (Catalog No. 506112-07; PGC Scientific, Gaithersburg, MD). En el revelado de los azúcares reductores se sustituyó el calentamiento en autoclave por ebullición de la placa colocada dentro de una bolsa sellada "Ziploc Brand" en baño de agua, a 100 °C, aproximadamente, durante 10 min.

La curva estándar de glucosa se preparó con diferentes concentraciones comprendidas entre 2-80 μ g.mL⁻¹, por duplicado, aplicando 30 μ L.pocillo⁻¹.

La absorbancia se leyó a 450 nm en un lector de microplacas SUMA, PR 521 y la actividad enzimática se calculó mediante el empleo de la ecuación de regresión que se obtuvo al graficar los datos de la D.O y las concentraciones de BSA de la curva patrón. La actividad se

transformó teniendo en cuenta el método descrito por Tipton (1993) y se informó como actividad enzimática específica en $\mu\text{Kat} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$.

3.2.4.2. Actividad Quitinasas

Esta actividad se cuantificó según el método discontinuo reportado por Boller y col. (1983), para lo cual se empleó como sustrato la quitina coloidal preparada a partir de quitina grado reactivo (Fluka) y la solución amortiguadora tetraborato de sodio 0,8 M pH 9.1. La curva patrón se realizó empleando n-acetil-glucosamina a las concentraciones de 10-500 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. La absorbancia se leyó a 585 nm en el espectrofotómetro referido en el acápite 3.2.2 y la actividad se calculó según la fórmula:

$$AE = \frac{DO \times \text{Cot} \times \text{Vens} \times \text{dil}}{t \times \text{Venz}}$$

donde: Cot: $\frac{\sum \text{conc de DO en curva patrón}}{\sum \text{DO}}$

Vc: Volumen de ensayo

Venz: Volumen de enzima

dil: Dilución de la muestra

La actividad se transformó teniendo en cuenta el método descrito por Tipton (1993) y se informó como actividad enzimática específica en $\text{nKat} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$ en el periodo de pre-colonización y en $\text{pKat} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$ en el periodo de colonización.

3.2.4.3. Actividad Peroxidasa

El método continuo descrito por Fric (1976), fue empleado para determinar la actividad peroxidasa, en el cual se usaron como sustratos el guayacol y el peróxido de hidrógeno y como solución amortiguadora el acetato de sodio 0,1 M pH 5.2. La absorbancia se leyó a 470 nm en el espectrofotómetro referido en el acápite 3.2.2, durante dos minutos a intervalos de 15 segundos. A partir de las lecturas obtenidas se determinó la variación de densidad óptica (D.O) en el tiempo.

Para el cálculo de la actividad enzimática se empleó la fórmula:

$$AE = \frac{\Delta DO \times \text{Vens} \times \text{dil}}{\Delta t \times \text{Venz} \times k}$$

donde: Vens: Volumen de ensayo

Venz: Volumen de extracto enzimático

dil: Dilución de la muestra

k: Coeficiente de extinción molecular del Guayacol
($5.57 \times 10^{-3} \mu\text{mol.mL}^{-1}$)

La actividad se transformó teniendo en cuenta el método descrito por Tipton (1993) y se informó como actividad enzimática específica en nKat.mg proteína⁻¹.

3.2.5. Determinación de los patrones isoenzimáticos

Para la determinación de los patrones isoenzimáticos se seleccionaron los tiempos de evaluación en los cuales se cuantificaron los mayores niveles de las respectivas enzimas.

3.2.5.1. Obtención de los patrones de β -1,3-glucanasas mediante geles de poliacrilamida (PAGE)

Separación de las proteínas

Para la separación de las proteínas se preparó el gel concentrador a 4% y el separador a 16%, mediante el método descrito por Solórzano (2002). Se emplearon los extractos proteicos de las raíces y de las hojas obtenidos a los seis días. Los mismos se mezclaron con una solución de azul de bromofenol 3:1 v/v (0.5 M Tris-HCl, pH 6.8, 10 % glicerol, 0.05 % azul de bromofenol), para ajustar las concentraciones de proteína a $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$, de las cuales se aplicó 20 μL de cada muestra.

La separación se efectuó en un equipo de electroforesis vertical minigel (BIORAD), con la solución amortiguadora Tris-Glicina 0,019M pH 8.3. Las corridas se realizaron con una intensidad de 25 mA, durante 90-120 min a 4°C.

Detección de β -1,3-glucanasas

La detección de las isoformas de β -1,3-glucanasas se realizó mediante el método descrito por Pan y col. (1989), el cual emplea laminarina (100 mg en 75 mL de H₂O destilada) como sustrato de la enzima y cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio al 0,3 % para el revelado. El gel se calentó en un horno de microondas a la máxima potencia con pulsos de 30 seg. (tres min como máximo), hasta la aparición de bandas color rosa. Para reducir el fondo rosado, el gel se sumergió en ácido acético al 7,5 %, hasta la definición de las bandas de interés. Para fijar las bandas, el gel se mantuvo unos minutos en una mezcla de 3 mL de glicerol, 40 mL de metanol, 10 mL de ácido acético y 47 mL de H₂O destilada, paso que

debe realizarse con cuidado y rapidez ya que esta mezcla decolora el gel. Finalmente, se dejaron secar sobre papel absorbente para su conservación en una bolsa de nylon sellada.

La posición relativa de cada banda fue establecida según su Rf, el cual se obtuvo al dividir la distancia media de migración obtenida, entre la distancia de migración del frente de corrida, según la cual cada banda se caracterizó por un valor numérico.

3.2.5.2. Obtención de los patrones de β -1,3-glucanasas mediante focalización isoelectrica (IEF)

Separación de proteínas

La separación se realizó empleando geles preformados de poliacrilamida, los cuales poseen gradiente inmovilizado de pH de 3,5 a 9,5 y un sistema “Multiphor”, ambos pertenecientes a Pharmacia. El volumen de las muestras fue ajustado con H₂O destilada para obtener una concentración final de 20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de proteína, para reducir el contenido de sales en la muestra, que puedan interferir en el gradiente de pH. Se aplicó 20 μL de muestras por aplicador, los que fueron ubicados en el centro del gel (correspondiente al pH 7.0).

Las condiciones de corrida fueron 30 W, 50 mA y 1500 V durante 90 min. Las muestras se corrieron por duplicado y el pH en el gel se corroboró mediante un medidor portátil de pH WPA modelo CD-500 con electrodo de superficie EL-34.

Después de la IEF, los geles fueron cortados por la mitad, para revelar la actividad β -1,3-glucanasa por dos métodos. En ambos casos, los geles se lavaron previamente tres veces con H₂O destilada.

Detección de β -1,3-glucanasas

Se realizó mediante el método descrito por Pan y col., (1989), tal como se refiere en el acápite 3.2.5.1.

Se evaluó un segundo método en el revelado de estas isoenzimas teniendo en cuenta los resultados obtenidos por Délano (2000). El mismo consistió en sumergir el gel en una mezcla de las soluciones A (40 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de Na₂CO₃, 16 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de Glicina y 0.45 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de CuSO₄) y B (0.12 g de neocuproina hidroclicrica en 100 ml de H₂O destilada), empleadas para la cuantificación de la actividad, en una relación 1:1 (v:v).

En ambos casos el desarrollo del color y la conservación de los geles se realizó como se explica en el acápite 3.2.4.1.

3.2.5.3. Obtención de los patrones de peroxidasa mediante PAGE

Separación de las proteínas

La separación de las proteínas se realizó según el acápite 3.2.2., para lo cual se preparó el gel concentrador a 4 % y el separador a 7.5 %.

Detección de peroxidasa

El revelado de las isoformas de peroxidasa se efectuó mediante el método descrito por Barreto y Simón (1979), que emplea para la de tinción benzidina hidroclicórica y ácido acético glacial. Las isoformas aparecieron como bandas azules sobre un fondo blanco.

La posición relativa de cada banda fue establecida según su Rf, tal como se refiere en el acápite 3.2.3.1.

Se empleó una cámara digital SONY modelo DSC-R1 para realizar las fotos de los patrones obtenidos en la PAGE y la IEF.

Diseño experimental y análisis estadístico

El experimento se desarrolló siguiendo un diseño completamente aleatorizado con tres repeticiones, conformadas cada una por 10 plantas, en cada momento de muestreo. Se repitió tres veces durante los años 2002-2004, en los meses de octubre a marzo, por lo que se muestran los resultados de una de las repeticiones, teniendo en cuenta que se observó un comportamiento similar de los tratamientos, durante las mismas.

Los datos fueron procesados estadísticamente comparándose las medias mediante los intervalos de confianza con un grado de significación de 95%, para ello primeramente se verificó el cumplimiento de las premisas del ANOVA, como la normalidad y homogeneidad de la varianza. Todas las comparaciones se realizaron según el paquete estadístico SPSS Versión 10.0 para Windows.

3.3. Efecto de los HMA y la sistemina sobre la severidad de las enfermedades causadas por *Alternaria solani* y *Phytophthora nicotianae* en tomate

Obtención del material vegetal y aplicación de los productos

Se emplearon macetas de 1 kg de capacidad con una mezcla de suelo Ferralítico Rojo Lixiviado típico y humus de lombriz en relación 1:1 (v:v) estéril (Tabla 2). Las plántulas crecieron en casa de cristal, a una temperatura promedio de 25 ± 3 °C y humedad relativa promedio de 75-80 %.

Como HMA se continuó trabajando con la especie *G. clarum* (Gc) y se incorporó *Glomus fasciculatum* (Walker y Koske) (Gf), de la colección del INCA, con el objetivo de ampliar el efecto de los hongos micorrizógenos frente a los patógenos foliares y radicales. Para ello se tuvo en cuenta los resultados informados por Rodríguez y col. (2004) sobre la inducción de proteínas PRs por *G. fasciculatum*, teniendo en cuenta la influencia que tienen las especies de HMA sobre la activación de mecanismos de defensa.

Ambos HMA fueron inoculados, de forma independiente, mediante la peletización de semillas (Fernández y col. 2000), empleando inóculos que contenían como promedio un título de 25 esporas por gramo de inóculo (Laboratorio de Micorrizas del INCA).

La inducción con la sistemina se realizó aplicando 1 mL por planta de una solución acuosa de 44 nM en la base del tallo, en el momento de la germinación.

Las especies patógenas con las que se inocularon las plantas fueron aisladas previamente del mismo cultivo e identificadas por los métodos tradicionales. Como patógeno foliar se seleccionó la cepa 100 de *Alternaria solani* (Sor), de la colección del Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), por ser la más agresiva de las 16 probadas por Pérez (2003) en tomate y como patógeno radical la cepa T8 de *Phytophthora nicotianae* (Breda de Hann, syn. *P. parasitica* Dastur), aislada de tomate, perteneciente a la colección del Instituto de Investigaciones del Tabaco (Toledo, 2003).

Para el desarrollo de los patógenos se utilizaron medios diferentes según la especie en cuestión. Para *A. solani* se empleó el medio sintético Agar papa dextrosa (PDA), preparado según las especificaciones del fabricante (BIOCEN). El alga *P. nicotianae* se inoculó en el medio natural Agar maíz, que se preparó de la siguiente forma: 20 g de germinado fresco de trigo se hirvió en una porción de H₂O destilada, mientras que por otra parte 30 g de harina de maíz se hirvió en baño a 100 °C en una porción de H₂O destilada, ambos por una hora. Pasado este tiempo ambas porciones se dejaron refrescar y se filtraron por gasa, los que se unieron para completar 1L con H₂O destilada. Posteriormente se añadió 15 g de agar No.3 (BIOCEN). Ambos medios fueron esterilizados a 120°C por 20 min y vertidos en placa de Petri de 9 mm. Los patógenos fueron inoculados en el medio correspondiente e incubados a 25°C por 15 días.

Para la preparación de los inóculos se separó el micelio del medio agarizado, el que se mezcló con H₂O destilada estéril. El material de *A. solani* obtenido se maceró previamente en 200 mL de H₂O destilada, completándose posteriormente hasta 600 mL. Con el micelio de *P. nicotianae* se preparó una suspensión acuosa, la que fue mantenida 1h a 4°C para favorecer la ruptura de los esporangios y la liberación de las esporas. Las suspensiones fueron cuantificadas mediante el empleo de una cámara de “Neubauer” contándose el número de fragmentos en *A. solani* y el número de hifas y zoosporas en *P. nicotianae*.

La inoculación se realizó a los 21 días después de la germinación, para lo cual se dividieron las plantas en tres grupos (tres macetas con tres plantas cada una), conformados por los patógenos y las testigos (sin patógenos). *A. solani* se aplicó de forma foliar, por aspersión de 5 mL por planta de una suspensión de fragmentos (10^5 fragmentos.mL⁻¹), mientras que de *P. nicotianae* se aplicó 5 mL por planta de una suspensión de esporas (10^5 esporas.mL⁻¹) en la base del tallo. Posterior a la inoculación las plantas fueron mantenidas en cámara húmeda (cubiertas con nylon), para favorecer el establecimiento de los patógenos, hasta el momento de su evaluación

El experimento se desarrolló en casa de cristal, a una temperatura promedio de $25 \pm 3^\circ\text{C}$ y humedad relativa de 75-80 %. Los grupos de plantas fueron mantenidos en cubículos separados para evitar la contaminación entre los tratamientos correspondientes a cada patógeno y las plantas sin patógenos (plantas sanas). En cada grupo se mantuvo un control al que no se le aplicó ningún producto y dos controles micorrizados correspondientes a cada HMA por separado. Los tratamientos quedaron conformados de la siguiente forma:

1. Control (C)
2. Sistemina (S)
3. Control micorrizado con *G. clarum* (C-Gc)
4. *G. clarum* + Sistemina (Gc/S)
5. Control micorrizado con *G. fasciculatum* (C-Gf)
6. *G. fasciculatum* + Sistemina (Gf/S)

3.3.1. Muestreo y evaluación previa a la inoculación de los patógenos

A los 21 ddg se tomaron muestras de plantas para la evaluación del desarrollo vegetativo, separándose una fracción de las raíces para la determinación de la colonización micorrízica.

3.3.1.1. Determinación del desarrollo vegetativo de las plantas a los 21 días después de la germinación

Para determinar el estado de las plantas antes de realizar la inoculación de los patógenos, se evaluó el desarrollo vegetativo de las mismas a los 21 ddg. Para ello se escogieron macetas al azar dentro de cada tratamiento, de las cuales se extrajo el material vegetal, teniendo el cuidado de recuperar todas las raicillas, lavándose las plantas con agua corriente para retirar la tierra, las que posteriormente se dejaron escurrir. La cuantificación de la masa fresca aérea y masa fresca radical se efectuó mediante el uso de una Balanza Analítica Adam Equipment Co. LTD. Debido al volumen de las plantas para la determinación de la masa fresca foliar se empleó una Balanza Técnica Denver Instrument PK-601.

3.3.1.2. Cuantificación de la colonización micorrízica de las plantas a los 21 días después de la germinación

Con el objetivo de corroborar el establecimiento de la simbiosis micorrízica en las plantas inoculadas con los HMA se procedió a evaluar los porcentajes de la colonización y de densidad visual a los 21 ddg. Posterior a la evaluación de la masa fresca radical se secaron las raíces a 70 °C, las que fueron procesadas y evaluadas como se refiere en el acápite 3.1.2.

3.3.2. Muestreo y evaluación posterior a la inoculación de los patógenos

A los tres días posteriores a la aplicación de los patógenos (24 ddg) se evaluaron los síntomas de las enfermedades causadas por los patógenos y se realizó el muestreo final, donde el material vegetal fue separado por órganos.

3.3.2.1. Evaluación de los síntomas de la enfermedad causada por *Alternaria solani*

En el grupo de plantas inoculadas con *A. solani*, se evaluó el porcentaje de necrosis foliar en cada hoja, calculándose el promedio sobre la base de las mediciones en todas las hojas

de cada planta. Los datos fueron transformados según la escala informada por Schaefer y col, (2005) (Tabla 4).

Tabla 4: Escala propuesta por Schaefer y col, (2005) para evaluar la severidad de la enfermedad causada por *A. solani* en plantas de tomate.

Grado	Nivel de la enfermedad	Necrosis foliar (%)
1	Altamente resistente	0-4
2	Resistente, con pequeñas lesiones aisladas	5-15
3	Intermedia, con algunas pequeñas lesiones y/o lesiones superficiales en tallo	16-25
4	Moderadamente susceptible, lesiones en hojas y tallo	26-50
5	Susceptible, lesiones bien desarrolladas en hojas y tallos	51-95
6	Altamente susceptible, muerte de hojas y/o plantas	96-100

3.3.2.2. Evaluación de los síntomas de la enfermedad causada por *Phytophthora nicotianae*

En las plantas infectadas con *P. nicotianae* se evaluó el daño mediante la medición del grado de marchitez en cada planta, según la escala que se presenta en la Tabla 5 y la pudrición radical mediante estimación visual.

Tabla 5: Escala empleada para evaluar la intensidad de la marchitez causada por *P. nicotianae* en plantas de tomate, según Pozo y col, (2002).

Grado	Porcentaje
0	.
1	hasta un 10% de síntomas
2	hasta un 25% de síntomas
3	hasta un 50% de síntomas
4	hasta un 75% de síntomas
5	hasta un 100% de síntomas

Posterior a las evaluaciones, se realizó la toma de muestras, donde las plantas fueron procesadas según 3.2

3.3.2.3. Cuantificación de las actividades enzimáticas evaluadas en las plantas inoculadas con los patógenos en las raíces y en las hojas.

Para la extracción de proteínas se empleó la metodología informada en el acápite 3.2.4., mediante la cual se obtuvieron los extractos y se determinó la concentración de proteína. Se cuantificaron las actividades enzimáticas de β -1,3-glucanasas, quitinasas y peroxidadas según los acápites 3.2.4.1., 3.2.4.2. y 3.2.4.3.

Diseño experimental y análisis estadístico

Se empleó un diseño completamente aleatorizado con tres repeticiones, conformado por tres plantas cada una. El experimento se repitió durante los años 2003-2005, en el periodo comprendido entre los meses de marzo a mayo, para favorecer el establecimiento de los patógenos. Teniendo en cuenta que los tratamientos mostraron similar tendencia en los tres años, con relación a los síntomas de las enfermedades, para el estudio de las actividades enzimáticas se seleccionó la repetición del experimento realizada en el año 2003.

Se verificó el cumplimiento de las premisas del ANOVA, como la normalidad y homogeneidad de la varianza. Los datos fueron procesados estadísticamente según un Análisis de varianza bifactorial donde el primer factor estuvo constituido por seis niveles (control, sistemina, *G. clarum*, *G. clarum* más sistemina, *G. fasciculatum* y *G. fasciculatum* más sistemina) y el segundo factor por tres niveles, conformados por los grupos de cada patógeno independiente; el primero por las plantas inoculadas con *A. solani*, el segundo las enfrentadas a *P. nicotianae* y el tercero por las plantas testigo (sin patógenos).

Los niveles de severidad de las enfermedades causadas por los patógenos fueron analizados estadísticamente mediante el empleo de la prueba no paramétrica de comparación múltiple de Kruskal Wallis, ya que los mismos no cumplen con la premisa de normalidad. Cuando la significación fue mayor a un 95% las medias fueron comparadas mediante el método multivariado de Mann-Whitney con la corrección de Bonferroni.

Las masas fresca y los resultados de la cuantificación de las diferentes enzimas, fueron comparadas mediante el Procedimiento de Tukey con un grado de significación de 95%. Para ello se analizaron las medias del patógeno radical y el foliar con el control respectivo,

de forma independiente. Los procesamientos estadísticos se efectuaron mediante el empleo del paquete estadístico SPSS Versión 10.0 para Windows.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Efecto de la sistemina sobre el proceso de establecimiento de la simbiosis micorrízica arbuscular y el desarrollo vegetativo del tomate

4.1.1. Determinación del desarrollo vegetativo de las plántulas

La figura 3 muestra la dinámica de la masa fresca aérea en la variedad de tomate Amalia, donde se observa que los tratamientos mostraron un incremento en el tiempo. A los dos, seis y ocho ddg no se obtuvo diferencias significativas entre las variantes en estudio, aunque en este último periodo de evaluación (ocho ddg) la inoculación con *G. clarum* de forma independiente produjo un incremento de este indicador.

Las micorrizas constituyen un sistema simbiótico eficiente donde se produce el intercambio de nutrientes proveniente del suelo y de los productos de la fotosíntesis entre los participantes, el HMA y la planta, (Bonfante y Perotto, 1995; 2000; Benedetto y col., 2005; Eckardt, 2005; Karandashov y Bucher, 2005). Por este fenómeno se ha encontrado que en diferentes cultivos su aplicación produce la promoción del crecimiento y del desarrollo (Hernández y Chailloux, 2004; Pulido y col., 2003a y b; Rivera, 2003; Rodríguez y col., 2006 b), proceso que, al parecer, comienza a producirse en este estudio a partir de los ocho días.

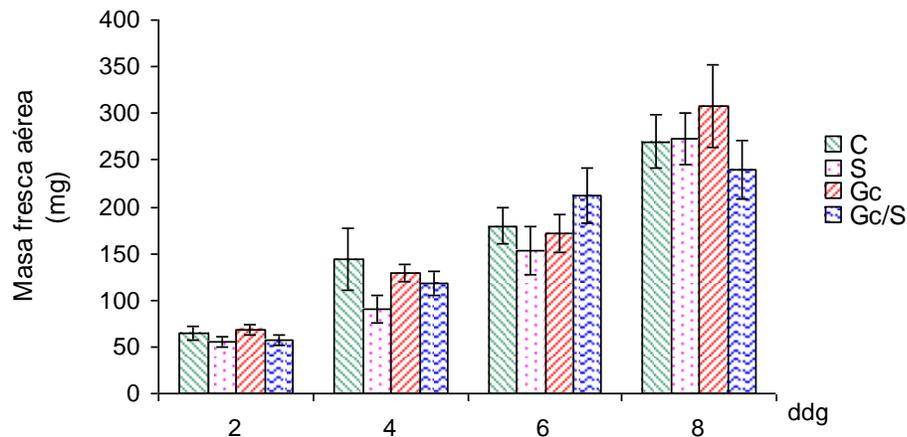


Figura 3: Determinación de la masa fresca aérea en plántulas de tomate var. Amalia, en los primeros ocho días de germinadas (ddg).

Leyenda: C-control, S-sistemina, Gc-*Glomus clarum* y Gc/S- *Glomus clarum* mas sistemina.

Las barras verticales indican los intervalos de confianza para cada media ($p \leq 0.05$)

A los cuatro ddg la aplicación de la sistemina produjo un retardo en el desarrollo de tallos y hojas, que se evidenció en la masa fresca aérea y mostró diferencias estadísticamente significativas con el control y con las variantes micorrizadas (Gc y Gc/S).

Délano (2000), estudiando la influencia de la sistemina sobre tomate y papa, encontró que su aplicación produjo la disminución del crecimiento en ambos cultivos, en las primeras etapas del desarrollo de las plantas. Este autor le atribuye este comportamiento al fenómeno conocido como “economía celular”, según el cual, al activarse de forma intensa las respuestas de defensa, las plantas retardan o reprimen los procesos vinculados al metabolismo primario, como los correspondientes al desarrollo vegetativo.

Al analizar la masa fresca radical (figura 4), se encontró que las plantas controles y las micorrizadas mostraron niveles estadísticamente similares, dentro de cada momento de evaluación, excepto a los seis ddg donde los mayores valores se alcanzaron en la combinación *G. clarum*/sistemina, variante que mostró diferencias estadísticamente con el resto de los tratamientos.

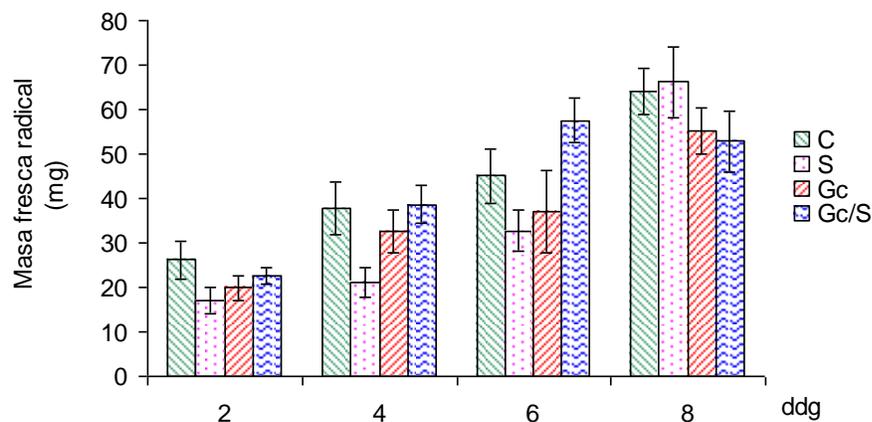


Figura 4: Determinación de la masa fresca radical en plántulas de tomate var. Amalia, en los primeros ocho días de germinadas (ddg).

Leyenda: C-control, S-sistemina, Gc-*Glomus clarum* y Gc/S- *Glomus clarum* mas sistemina. Las barras verticales indican los intervalos de confianza para cada media ($p \leq 0.05$).

La aplicación de la sistemina produjo la disminución del desarrollo radical en los primeros seis ddg, comportamiento que se superó cuando se combinó con *G. clarum* (Gc/S) a los cuatro y seis ddg. Este comportamiento fue similar al observado con relación a la masa fresca aérea.

Existen diferentes indicadores que pueden ser empleados para el estudio del desarrollo vegetativo, entre los que se encuentra como los más utilizados la altura de las plantas, el número de hojas y el área foliar. Sin embargo, para la evaluación en plántulas de muy poco tiempo de crecimiento es más adecuado el uso de la determinación de masa, ya sea fresca o seca, debido a que generalmente la altura y el número de hojas no sufren alteraciones durante este periodo, además, de que permite el análisis del desarrollo de toda la plántula de forma integral.

Rodríguez y col., (2004) estudiaron la influencia de seis especies de HMA sobre el desarrollo vegetativo de plantas de tomate de la variedad “Amalia”, en condiciones semicontroladas, y encontraron que las plantas mostraron similitudes estadísticas en cuanto al comportamiento de la masa fresca total y la masa seca total, evaluadas a los 18 y 32 días posteriores a la inoculación con los HMA. Este resultado nos demuestra que, al menos en esta variedad, ambos indicadores pueden ser empleados para monitorear el crecimiento vegetal, mas si se tiene en cuenta que el experimento se desarrolló en cámara de crecimiento.

En resumen, se observó un buen desarrollo de las plantas y aunque la aplicación de la sistemina produjo una ligera depresión con relación al control en los primeros seis ddg, su dinámica en el tiempo fue creciente.

4.1.2. Cuantificación de la colonización micorrízica

Los resultados de la colonización micorrízica obtenidos en las plantas de tomate inoculadas se muestran en la figura 5A. Con relación al porcentaje de colonización no existieron diferencias significativas entre los tratamientos, en los diferentes momentos de evaluación. Se destacó que desde estadios tempranos, a los dos ddg, se detectaron elevados niveles de colonización, 30-40 %, lo cual evidenció la efectividad del método de inoculación que se empleó (peletización de semillas) (Fernández y col., 2000). Es importante destacar que la sistemina no tuvo efecto negativo sobre el establecimiento de la simbiosis, ya que en la combinación con el HMA se alcanzaron niveles similares a los del tratamiento donde no se aplicó el elicitor.

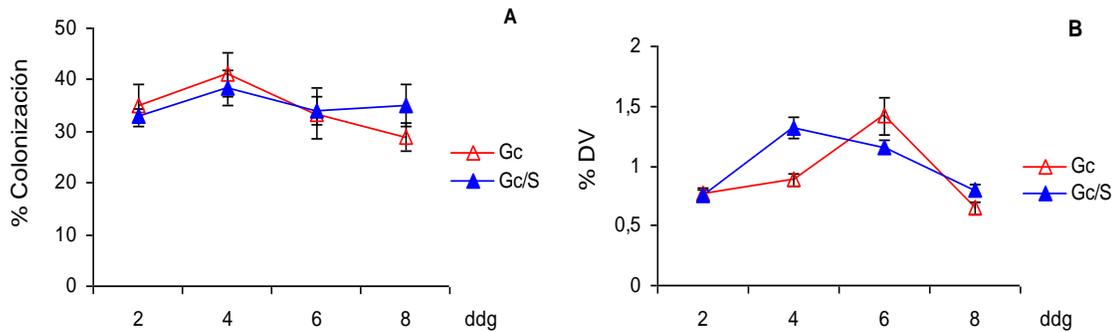


Figura 5: Indicadores de la colonización micorrízica obtenidos en plántulas de tomate, var. Amalia, inoculadas con el HMA, en los primeros 8 días de germinadas (ddg). Porcentaje de Colonización (A) y porcentaje de Densidad Visual (%DV) (B).

Leyenda: Gc-*Glomus clarum* y Gc/S- *Glomus clarum* mas sistemina.

Las barras verticales indican los intervalos de confianza para cada media ($p \leq 0.05$).

La Densidad Visual (%DV) es un indicador importante ya que permite cuantificar la intensidad de la colonización micorrízica arbuscular, el resultado de su evaluación se muestra en la figura 5B, donde se observó la existencia de diferencias significativas entre las variantes micorrizadas. Se encontró que un gran número de raicillas poseían niveles correspondientes a 1.0-2.5 % de ocupación fúngica.

Se observó un efecto puntual a los 4 ddg donde la aplicación de la sistemina produjo un incremento de la micorrización, a nivel de intensidad de la colonización que se hizo evidente en las plantas donde se combinó este elicitore con *G. clarum* (Gc/S).

Se observó que tanto en el porcentaje de colonización como en la densidad visual se obtuvieron elevados niveles si se tienen en cuenta los resultados informados por Rodríguez y col. (2004), quienes encontraron valores de 15 % de colonización y 0.41 % de DV en plantas de tomate micorrizadas con *G. clarum*, con 32 días de crecimiento.

Las diferencias observadas en los indicadores de la micorrización pueden deberse a que en el presente experimento se empleó niveles bajos de fósforo ($14.6 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$), para favorecer el procesos de micorrización, mientras que en el trabajo informado por Rodríguez y col. en el 2004, se utilizó una combinación conformada por suelo-cachaza en relación 3:1. Este sustrato es uno de los recomendado para la producción de semilleros en diferentes cultivos por poseer elevados contenidos de nutrientes, lo cual ha sido referido por otros autores (Jerez y col., 2004; Fernández y col., 2006).

Sin embargo, se conoce que los niveles elevados de este elemento afectan el proceso de establecimiento de la simbiosis a diferentes niveles, siendo uno de los más importantes la represión del crecimiento micelial (Fernández, 2003; Giovannetti, 2000).

La cuantificación de la intensidad de la colonización, indicó que la micorrización se encontraba en las fases iniciales del proceso de establecimiento, donde aún no se detectan la presencia de los arbusculos, como ocurrió en este trabajo, lo cual explica porque no se observó una marcada tendencia al aumento del crecimiento en los tratamientos micorrizados. Los arbusculos son la estructura de intercambio entre los simbioses, en los cuales se produce el movimiento bidireccional, de nutrientes hacia la célula vegetal y de fotosintatos hacia el hongo (Bago y col., 2000; Vierheiling y col., 2001). Su formación es crucial para el establecimiento de la fase simbiótica, en la cual se observa la estimulación del desarrollo vegetativo. Es reconocido que la simbiosis micorrízica promueve el crecimiento de las plantas, debido a diferentes mecanismos (Bago y col., 2000), sin embargo, para ello es necesario que la simbiosis esté bien establecida.

Los resultados de la evaluación de las masas frescas indicaron que, al parecer, no se produjo el estadio parasítico caracterizado por Siqueira y Franco (1988), a pesar de que las plantas tenían corta edad, lo cual se evidenció porque no se produjo una depresión significativa del desarrollo vegetativo. Estos autores estudiaron la relación entre el micelio externo y el interno, y caracterizaron esta fase como "establecimiento de la colonización" o "fase parasítica". En la misma se produce un retardo del crecimiento vegetal como consecuencia del movimiento unilateral de fotosintatos hacia el hongo, lo que en plantas de ciclo corto puede durar entre cuatro y cinco semanas. Es posible que este resultado se deba a que a las plantas se les suministró de forma continua los nutrientes a través del riego con la solución de "Long Ahston", por lo cual no sufrieron deficiencias nutricionales. En la misma el contenido de fósforo fue bajo para favorecer el desarrollo de la micorrización, de forma tal que se pudiera estudiar mejor la influencia de la sistemina sobre este proceso, efecto que se observó en las evaluaciones realizadas.

Por primera vez se estudia la acción combinada de *G. clarum* y la sistemina, la que teniendo en cuenta los resultados alcanzados, puede ser empleada en la variedad de tomate Amalia, ya que se alcanzaron elevados niveles de micorrización, similares a los informados

en plantas adultas, por lo que la aplicación exógena de este elicitor no afectó el proceso de colonización de los HMA.

Por otra parte se alcanzó un resultado interesante con relación a la evaluación del desarrollo vegetativo, ya que se tenían antecedentes de que ambos por separado producían retardo del crecimiento, en las primeras semanas de desarrollo del tomate. En el presente experimento se alcanzaron niveles de crecimiento similares a los obtenidos por las plantas controles, lo cual demuestra que no existió antagonismo entre *G. clarum* y la sistemina.

4.2. Dinámica de proteínas PRs inducidas por *Glomus clarum* y la sistemina durante el establecimiento de la simbiosis MA

4.2.1. Periodo de pre-colonización

4.2.1.1. Dinámica de la colonización micorrízica en el período de pre-colonización

En la figura 6 se muestran los resultados de la evaluación del porcentaje de colonización y de la densidad visual, como indicadores de la micorrización.

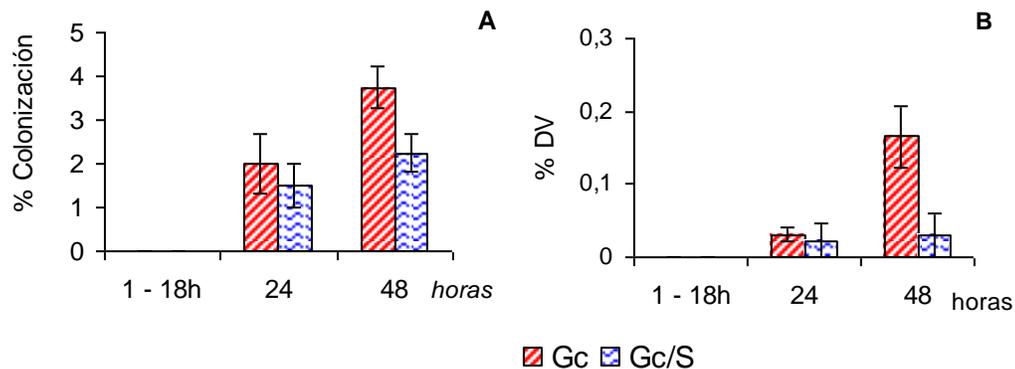


Figura 6: Indicadores de la colonización micorrízica obtenidos en las plántulas de tomate, var. Amalia, inoculadas con el HMA, en el periodo de pre-colonización (1-48 horas). Porcentaje de colonización (A) y porcentaje de Densidad Visual (%DV) (B).

Leyenda: C-control y Gc/S- *Glomus clarum* mas sistemina.

Las barras verticales indican los intervalos de confianza para cada media ($p \leq 0.05$).

En las primeras 18 horas del periodo de pre-colonización no se detectó la presencia de estructuras fúngicas en las raíces, las que fueron observadas entre las 24 y 48 horas. Con relación al porcentaje de colonización se observó similitud estadísticamente entre las dos variantes inoculadas con *G. clarum*, a diferencia de la densidad visual, donde los tratamientos mostraron diferencias estadísticas a los 48 horas. En este momento de

evaluación se produjo una disminución de este indicador en las plantas donde se realizó la aplicación combinada del HMA y del elicitor.

Esta respuesta puede deberse a la manifestación en las raíces de dos eventos que compiten entre sí, la inducción de respuestas rápidas por la sistemina y el estrés producido por los procesos de penetración y diseminación del micelio del hongo intrarradicalmente. Este último involucra una serie de fenómenos como la ocurrencia de modificaciones morfológicas y fisiológicas en la célula colonizada (Bonfante y Perotto, 1995; Harrison, 1999; Strack y col., 2003) y variaciones en la expresión de genes como los *sym8*, *sym9* y *sym19*, los cuales participan en la compatibilidad entre ambos simbiontes (LaRue y Weeden, 1994).

Con relación a esta hipótesis se observó que en las plantas donde se aplicó de forma combinada *G. clarum* y la sistemina a las 48 horas no se produjo un incremento de la intensidad de la micorrización (%DV), al ser comparadas con los niveles obtenidos a las 24 horas, mostrando similitud estadística entre sí.

En ambos indicadores se observaron niveles bajos (1.5-3.75 % colonización y 0.023-0.16 % DV), lo cual indica que se encontraba en las primeras fases de la colonización del hongo micorrizógeno dentro de las raíces. A pesar de ello, fue interesante la observación de la presencia del HMA en las raíces en la micorrización etapas tempranas ya que no se había estudiado con anterioridad.

Existen numerosos informes de la evaluación de la colonización micorrízica en diferentes cultivos, los cuales se realizan en momentos diversos según sea el interés. Cuando se necesita correlacionar la micorrización con determinados procesos fisiológicos de la plantas, generalmente estos se realizan a partir de los 25 días (Fernández y col., 2006; Hernández y Chailloux, 2004; Pulido y col., 2003a y b; Tian y col., 2004; Rodríguez y col., 2004). Sin embargo, en los estudios bioquímicos, de expresión génica y de citolocalización de genes y enzimas, estos se efectúan a partir de los tres días (Blilou y col., 2000; Gao y col., 2004).

En el presente experimento la evaluación de la colonización en etapas tempranas permitió detectar los momentos iniciales del establecimiento de la simbiosis, los que ocurrieron entre las 24 y 48 horas.

4.2.1.2. Cuantificación de las actividades enzimáticas en las raíces y en las hojas de plantas de tomate en el período de pre- colonización

4.2.1.2.1. Determinación de la actividad β -1,3-glucanasas en el período de pre-colonización

En las raíces se observó que la actividad de las enzimas β -1,3-glucanasas poseen un nivel basal (figura 7A), detectado en las plantas controles, el que se cuantificó desde la primera hora de evaluación y se mantuvo hasta las 48 horas ($61.58 - 52.28 \mu\text{Kat}.\text{mg}^{-1}$ proteína).

La presencia de esta enzima durante todo el periodo de evaluación se explicó ya que las determinaciones se realizaron en plantas de muy corta edad, periodo en el cual las mismas se encontraban en pleno crecimiento y desarrollo, donde el proceso de diferenciación celular se encuentra activo. Agrios (2005), informó que esta enzima exhibe una actividad basal en muchos tejidos de las plantas, a las que se les atribuyen diversas funciones fisiológicas como la diferenciación celular.

Se observó que el tratamiento conformado por la aplicación de la sistemina mostró diferencias estadísticamente significativas con relación al control a los ocho, 18 y 48 horas, siendo importante el incremento alcanzado a los ocho horas ($166.33 \mu\text{Kat}.\text{mg}^{-1}$ proteína).

Se ha demostrado que la sistemina es un elicitor de respuesta rápida (Ryan, 2000; Shilmiller y Howe, 2005) que induce la expresión de varias proteínas, siendo las más estudiadas las relacionadas con la protección contra insectos (Schaller, 1999). Lee y Howe (2003) estudiaron la acumulación de RNAm de diferentes proteínas inducidas por la aplicación de la sistemina en tomate y encontraron que la detección de los inhibidores de proteasas ocurría a las dos horas posteriores al tratamiento con el elicitor, mientras que una lipoxigenasa y las especies activas de oxígeno fueron expresadas en los primeros 30 minutos post-inducción.

Con la aplicación de *G. clarum*, de forma independiente, se alcanzaron niveles de la actividad β -1,3-glucanasas inferiores al control, en las primeras ocho horas, con diferencias significativas entre si. A partir de las 12 horas mostró niveles similares a los obtenidos en las planta controles, hasta las 48 horas, momento en el que se produjo un aumento ($199.08 \mu\text{Kat}.\text{mg}^{-1}$ proteína, respectivamente).

García-Garrido y Ocampo (2002), plantearon que las respuestas de defensa durante la micorrización se inducen de forma transiente y que frecuentemente son suprimidas en los estadios posteriores, además de ocurrir en etapas más avanzada de la micorrización, por lo que este es un resultado esperado.

Se observó un efecto sinérgico con la aplicación conjunta de *G. clarum* y de la sistemina, que produjo un incremento importante de la actividad de esta enzima en las primeras dos horas. El mismo puede ser debido a la acción conjunta de componentes de las vía de traducción de señales del elicitor y de las respuestas activadas durante la simbiosis micorrízica.

Se conoce que luego de la recepción de la sistemina se activa una serie de reacciones donde se produce la acumulación de MAPK, la entrada de calcio, la acumulación de especies activas de oxígeno y el incremento de la actividad de la enzima ATPasaH⁺, con la consecuente hiperpolarización de la membrana (Bergey y Ryan, 1999; Moyen y col., 1998; Stratman y Ryan, 1997).

Diferentes autores han informado sobre elementos que constituyen señales secundarias o productos de la inducción de respuestas de defensa durante el proceso de micorrización. De esta forma se ha observado que en plantas micorrizadas se produce de forma diferencial la expresión de tres ATPasaH⁺ membranales (Ferrol y col., 2002), de dos kinasas, una dependiente de cadmodulina y por consiguiente de Ca (CCaMKs) (Lévy y col., 2004) y otra que constituye uno de los receptores de la simbiosis (SYMRK). Esta última es requerida como señal primaria del proceso de micorrización (Hause y Fester., 2005; Stracke y col., 2002; Yoshida y Parniske, 2005). Hause y col., (2002) e Isayenkov y col., (2005) han informado también, la acumulación de especies activas de oxígeno y de una proteína inductora de jasmónico.

Como puede apreciarse existen varios componentes de ambas vías que constituyen elementos importantes de la ruta de señalización que conducen a la acumulación del ácido jasmónico (Farmer y Ryan, 1992; Schaller y col., 2005; Thoma y col., 2003) y de esta forma a la inducción de respuestas de defensa, entre las que se encuentran las proteínas PRs.

La cuantificación de la actividad de esta enzima en hoja se presenta en la figura 7B, donde se alcanzaron niveles más bajos que el obtenido en las raíces. En este órgano se encontró la presencia de un nivel basal dado por el tratamiento control, de forma similar al observado en las raíces, que se mantuvo alrededor de $38.26 \mu\text{Kat}\cdot\text{mg}^{-1}$ proteína. Los tratamientos mostraron diferencias estadísticas entre sí a los ocho horas, donde se destacó la respuesta alcanzada por la aplicación de la sistemina ($93.37 \mu\text{Kat}\cdot\text{mg}^{-1}$ proteína) y a las 24 horas, donde la combinación del HMA y el elicitor superó al resto de las variantes ($89.63 \mu\text{Kat}\cdot\text{mg}^{-1}$ proteína).

4.2.1.2.2. Determinación de la actividad quitinasas en el período de pre- colonización

En la figura 8A se muestran los resultados de la determinación de la actividad específica de esta enzima en las raíces de los diferentes tratamientos en estudio, entre los cuales se encontraron diferencias estadísticamente significativas. Esta enzima tiene una expresión basal (plantas control) que se observó desde la primera hora de evaluación y que coincidió con lo informado por Agrios (2005). Este autor relacionó las proteínas PR-3 con el proceso de germinación de la semilla, similar a como ocurre con las β -1,3-glucanasas.

La respuesta basal encontrada parecería contradictoria, dado por la propia actividad de esta enzima, si tenemos en cuenta que en las plantas no existe la presencia de su sustrato, la quitina. Sin embargo, Bisseling (1999) señaló que podrían participar en el proceso de desarrollo de las raíces, al inducir la diferenciación de callos de tomate en cultivo *in vitro*, mientras que Agrios (2005) las relacionó con la embriogénesis en zanahoria.

Con la aplicación de la sistemina se produjo un rápido incremento de la actividad a las dos horas, con un segundo momento a las ocho horas (1.64 y $2.38 \text{ nKat}\cdot\text{mg}^{-1}$ proteína, respectivamente), que mostró diferencias significativas con todas las variantes estudiadas. Este resultado corrobora su carácter de hormona polipeptídica sistémica, de acción rápida (Ryan, 2000; Schillmiller y Howe, 2005). A pesar de ello, la mayoría de los estudios realizados centran su atención en la detección de genes que se expresan por daño mecánico o por el ataque de insectos herbívoros (Li y col, 2002; Kessler y Baldwin, 2004) y monitorean los inhibidores de proteasa (Ryan, 2000; Li y col, 2002), así como otras proteínas inducidas por el ácido jasmónico (Schillmiller y Howe, 2005), por lo que este trabajo constituye el primer reporte mundial de la inducción de quitinasas por este elicitor.

La inoculación con *G. clarum* de forma independiente produjo una disminución de la actividad de esta enzima hasta las 12 horas, al ser comparada con los niveles alcanzados por el control, con diferencias significativas entre si. A las 24 horas se observó un incremento que alcanzó 1.95 nKat.mg⁻¹ proteína y que difirió estadísticamente con el control y con la variante donde se aplicó la sistemina de forma independiente.

La depresión producida por *G. clarum* en los estadios tempranos se logró superar al ser combinado el HMA con el elicitor (Gc/S), variante en la cual se produjo un aumento de la actividad en las primeras dos horas de evaluación (0.99 - 1.36 nKat.mg⁻¹ proteína). Al parecer, esta respuesta fue inducida por la sistemina y no por un efecto sinérgico entre ambos, ya que mostró el mismo patrón de comportamiento al encontrado con la aplicación del elicitor de forma independiente.

Nuevamente en hoja se encontró la presencia de niveles basales de la enzima quitinasa (plantas controles), los que fueron superados por todos los tratamientos, en la mayoría de los tiempos en que se realizó la evaluación (figura 8B), mostrando diferencias estadísticamente significativas entre ellos.

La aplicación de la sistemina produjo un incremento de la actividad a las ocho y a las 24 horas (1.57 y 0.91 nKat.mg⁻¹ proteína, respectivamente), momentos a los cuales difirió significativamente de los demás tratamientos. Por su parte, la micorrización con *G. clarum* y su combinación con la sistemina solo produjeron aumentos a las ocho horas, con 1.20 y 1.62 nKat.mg⁻¹ proteína, respectivamente. Este resultado confirma los informados por otros autores con relación a la influencia de los HMA sobre esta enzima, quienes plantean que posee una expresión transiente (Spanu y col., 1989; Volpin y col., 1994).

Spanu, y col., (1989), en raíces de *Allium porrum* micorrizadas con *G. versiforme* encontraron inducción de la actividad de quitinasa en los primeros estadios de la formación de la micorrización arbuscular, la que decreció cuando la simbiosis fue totalmente establecida. En el presente experimento también se observó el acople entre el incremento de la actividad de esta enzima y la detección de la presencia del HMA en las raíces del tomate, evaluada como porcentaje de colonización y densidad visual. Similares resultados fueron obtenidos por Volpin y col., (1994) en plantas colonizadas con *G. intrarradices*.

Salzer y Boller (2000), estudiando la expresión de los genes que codifican para las quitinasas, encontraron que la misma estuvo relacionada con la micorrización, ya que no se encontró en raíces no micorrizadas, en las mutantes myc- (no micorrizógenas), ni en las inoculadas con hongos patógenos.

Se ha informado que existe una fuerte correlación entre la expresión de isoformas de quitinasas ácidas y el establecimiento de la micorrización arbuscular en plantas de perejil (*Petroselinum crispum* Mill.) (Dumas-Gaudot y col., 1994), aunque en un estudio realizado por David y col., (1998) encontraron que la expresión de quitinasas básicas en plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) colonizadas con *G. intraradices* se reducía como respuesta al establecimiento de la simbiosis

En las raíces y en las hojas a las 48 horas se produjo una caída abrupta en la actividad enzimática, la que fue apenas detectada en este último órgano.

Se observó que en la primera hora de evaluación en las hojas las plantas controles alcanzaron niveles de actividad superiores a los mostrados por los demás tratamientos, con diferencias significativas entre ellos.

Diferentes autores informan la participación de las quitinasas en diversos procesos fisiológicos, los cuales como la diferenciación celular (Bisseling, 1999; Agrios, 2005), las cuales pueden haber sido las responsables del incremento obtenido en el tratamiento control en la primera hora de evaluación. Sin embargo, esta respuesta no fue observada en las plantas micorrizadas ni en las que se efectuó la aplicación de la sistemina.

Durante el establecimiento de la simbiosis micorrízica arbuscular las quitinasas juegan un papel importante, donde ocurre la regulación de la expresión de esta enzima por el HMA en el tiempo (Rodríguez, 2005).

En las fases iniciales de la micorrización se promueven diferentes procesos en los cuales son intercambiadas señales entre ambos simbiosis, de forma tal que se suprimen los mecanismos defensivos de la planta. De esta forma se facilita la penetración del micelio fúngico en la raíz. En este caso se observó la disminución de la actividad de esta enzima en hoja con relación a los niveles basales, lo cual indicó que posterior a la aplicación del HMA, en periodos muy cortos de tiempo (una hora), se produjo la activación de señales móviles en la planta, capaces

de dar una respuesta sistémica y que se reflejó en la supresión de la expresión de las quitinasas en hoja.

Esta hipótesis se apoya también en el resultado de la evaluación de los indicadores de la micorrización, donde se observó la presencia del HMA en la raíz en las primeras 24 horas posteriores a la inoculación, avalados por el porcentaje de colonización y de Densidad Visual. La aplicación de la sistemina produjo la expresión temprana de las enzimas β -1,3-glucanasas y quitinasas en raíz, en las primeras ocho horas de evaluación, lo que sugiere que en este órgano debe existir un sistema de recepción exógena para este elicitador, donde participe la proteína SR-160 u otra similar, que actúe como señal primaria.

Otro mecanismo puede ser que esta hormona penetre a través de las pequeñas heridas que se producen en la pared celular de las raíces de la planta, por la entrada de la hifa de penetración del HMA, facilitado por su pequeño tamaño. Esta última hipótesis podría explicar el efecto sinérgico con *G. clarum*, pero no las respuestas que se observaron cuando se aplicó el elicitador de forma independiente.

4.2.2. Periodo de colonización

4.2.2.1. Dinámica de la colonización micorrízica en el período de colonización

Se detectó la presencia de estructuras fúngicas en las raíces desde los tres dds las que fueron evaluadas como porcentaje de colonización y de densidad visual (figura 9). Ambos indicadores mostraron niveles bajos en los primeros nueve días (6.1 % colonización y 0.0824 % DV), si se comparan con los obtenidos en el estudio de la interacción HMA-sistemina (acápite 4.1.2). Esta diferencia se explica si se tiene en cuenta que en dicho experimento se empleó en la solución nutritiva un nivel de fósforo bajo (14.6 mg.L^{-1}) para favorecer el establecimiento de la micorrización, mientras que en el presente el sustrato poseía 160 mg.L^{-1} de fósforo.

Como se había planteado con anterioridad las altas concentraciones de este elemento tienen una influencia negativa sobre la micorrización (Fernández, 2003; Giovannetti, 2000). Sin embargo, tanto en el presente estudio como en el siguiente se necesitó utilizar concentraciones más elevadas de este elemento, debido a que las plantas se desarrollaron hasta un periodo más largo de tiempo.

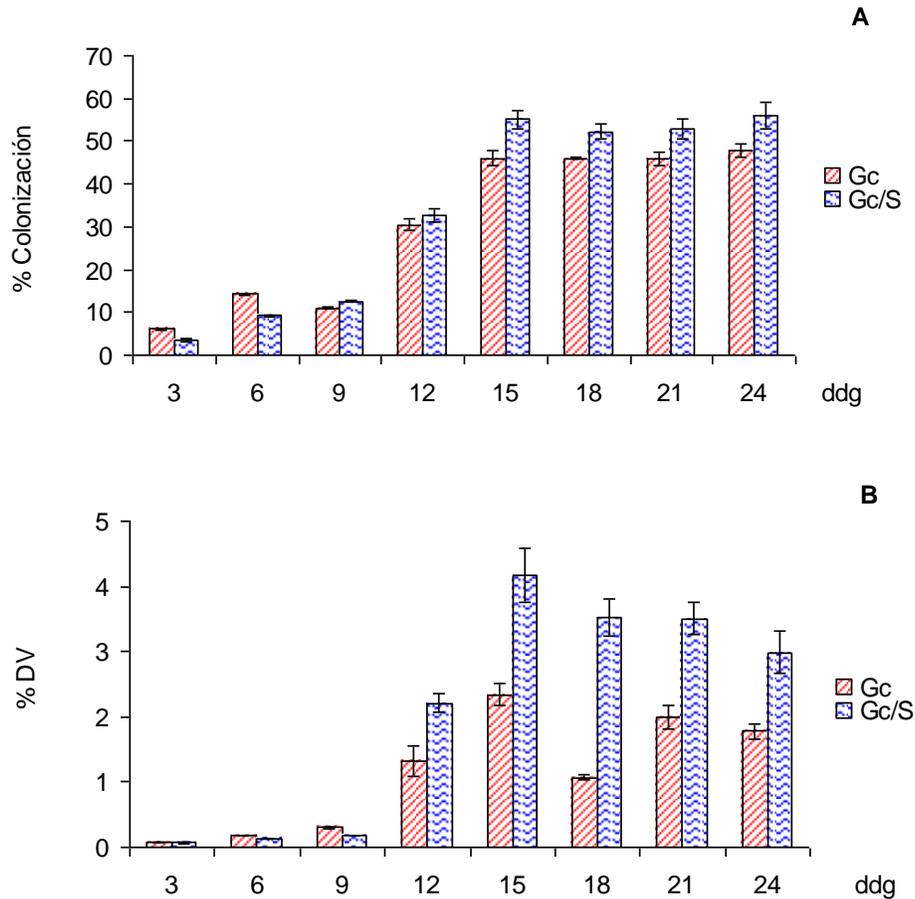


Figura 9: Indicadores de la colonización micorrízica obtenidos en plántulas de tomate, var. Amalia, inoculadas con el HMA, en el periodo de colonización, 3-24 días de germinadas (ddg). Porcentaje de colonización (A) y porcentaje de Densidad Visual (%DV) (B).
 Leyenda: C-control y Gc/S- *Glomus clarum* mas sistemina.
 Las barras verticales indican los intervalos de confianza para cada media ($p \leq 0.05$).

A partir de los 12 y 15 ddg, tanto la colonización como la densidad visual se incrementaron rápidamente, los que mostraron diferencias significativas con los niveles obtenidos en los periodos anteriores (de tres a nueve ddg). A los 15 ddg se produjo un segundo aumento, para alcanzar valores que se mantuvieron hasta el final del experimento, con similitud estadística entre ellos (15 a 24 ddg). Durante esta fase se alcanzando niveles elevados de ambos indicadores para este cultivo si se tienen en cuenta los resultados informados por Rodríguez y col., (2001). Estos autores encontraron valores de 19 a 28 % de colonización y

0.45 a 0.56 porcentaje de DV en plantas de tomate micorrizadas con *G. clarum* en un periodo similar (15 a 26 días).

Se observó que la sistemina actuó como potenciador de la micorrización, a partir de los 12 ddg, evaluada tanto como porcentaje de colonización, como de ocupación fúngica (%DV), siendo más evidente en este último indicador. En la combinación *G. clarum*/sistemina (Gc/S) se obtuvieron porcentajes de incremento de la densidad visual desde 32.08% hasta 78.63 %, al compararlos con los niveles alcanzados por las plantas donde se inoculó *G. clarum* de forma independiente.

Este es un resultado muy interesante si tenemos en cuenta que esta proteína es un inductor de respuestas propias del metabolismo secundario, vinculada con la acumulación de ácido jasmónico y etileno (O'Donnell y col., 1996). Con relación a la influencia de estas hormonas sobre la micorrización Minosky (2005) observó que durante la interacción simbiótica entre *Medicago truncatula* y *G. intraradices* se produjo el incremento del AJ endógeno. Sin embargo, las raíces de plantas mutantes con supresión de la expresión de la síntesis de oxido de aleno ciclasa (*MtAOC*) exhibieron niveles bajos de AJ, un marcado retardo de la colonización y el decrecimiento del número de arbusculos, aunque no se afectó su estructura. Este resultado indicó el papel crucial de esta hormona en el establecimiento de la simbiosis MA en *M. truncatula*.

Por otra parte, se ha observado que la aplicación de diferentes concentraciones de etileno a *Medicago sativa* y *Triticum vulgare* tuvo efectos diversos sobre la depresión de la colonización por *Glomus mosseae*. Niveles bajos estimularon la germinación y el crecimiento hifal, mientras que concentraciones superiores a 0.2 mg.mL^{-1} inhibieron drásticamente ambos procesos (Geil, 2000).

El efecto observado sobre la micorrización con la aplicación del elicitor, resulta de gran utilidad práctica, si tenemos en cuenta que podría incrementar los beneficios que estos hongos le brindan a los cultivos, lo cual debería profundizarse en trabajos futuros. El aumento del contenido de micelio intraradical (%DV) se traduce en la posibilidad de la formación de mayor número de arbusculos y por lo tanto de un incremento en el grado de intercambio bidireccional de nutrientes entre las raíces de las plantas y el HMA.

En los estadios avanzados de la simbiosis (24 ddg) se observaron niveles elevados de colonización y DV, lo que indicó que este es un periodo adecuado para la realización de investigaciones que necesiten una micorrización efectiva, como los trabajos de enfrentamiento a patógenos.

4.2.2.2. Cuantificación de las actividades enzimáticas en las raíces y en las hojas de plantas de tomate en el período de colonización

4.2.2.2.1. Determinación de la actividad β -1,3-glucanasas en el período de colonización

En este periodo se observó que en raíz los niveles basales alcanzaron valores inferiores a los encontrados en la fase de pre-colonización (plantas control), los que se mantuvieron hasta los 24 ddg, con un promedio de $44.96 \mu\text{Kat} \cdot \text{mg}^{-1}$ proteína (figura 10A). La sistemina mostró incremento de la actividad a los seis y 12 ddg con valores de 317.64 y 256.34 $\mu\text{Kat} \cdot \text{mg}^{-1}$ proteína, respectivamente, los que mostraron diferencias significativas

Una tendencia similar a la detectada en las plantas control fue seguida por el tratamiento donde se inoculó *G. clarum* en la mayoría de los momentos de evaluación, a excepción de los tres ddg, donde se observó un aumento de la actividad enzimática ($248.64 \mu\text{Kat} \cdot \text{mg}^{-1}$ proteína). Esta respuesta coincidió con el desarrollo de las primeras fases del proceso de establecimiento de la simbiosis, dada por la presencia del hongo en el interior de la raíz en niveles bajos (6.1 % colonización y 0.0824 %DV).

Se observó un efecto sinérgico entre *G. clarum* y la sistemina (Gc/S) a los tres y seis ddg, que presentó diferencias estadísticamente significativas con los tratamientos donde se aplicaron ambos de forma independiente (560.49 y 699.06 $\mu\text{Kat} \cdot \text{mg}^{-1}$ proteína). La combinación del HMA y el elicitor fue la que mostró los valores más elevados durante el experimento.

Se observó que en hoja los tratamientos mostraron diferencias estadísticamente significativas, aunque de forma general en todos se alcanzaron niveles bajos, los que oscilaron entre 1.64 y 2.06 $\mu\text{Kat} \cdot \text{mg}^{-1}$ proteína (figura 10B). Solo a los nueve ddg se observó un incremento importante en la actividad en las plantas control, el que fue seguido en orden decreciente por *G. clarum* y por la sistemina (4.02, 3.77 y 3.16 $\mu\text{Kat} \cdot \text{mg}^{-1}$ proteína, respectivamente).

Se ha informado que durante el período de establecimiento de la simbiosis MA las plantas experimentan cambios en la expresión de genes relacionados con las respuestas de defensa, como los de las proteínas β -1,3-glucanasas.

Al analizarse de forma conjunta los periodos de pre-colonización y colonización, se observó que la actividad de esta enzima se incrementó en raíz en etapas tempranas del proceso de establecimiento de la simbiosis micorrízica (48 horas y a los tres ddg), de forma similar a lo descrito por García-Garrido y Ocampo (2002), quienes plantearon que las respuestas de defensa durante la micorrización se inducen de forma transiente y que frecuentemente son suprimidas en los estadios posteriores de la micorrización.

Las enzimas β -1,3-glucanasas al igual que otras proteínas PRs han sido localizadas solamente en las células que contenían arbusculos (Blee y Anderson, 2000), lo cual podría explicar los resultados obtenidos en este experimento, ya que en el mismo no se observó la presencia de estas estructuras al realizar la cuantificación de la colonización micorrízica.

Con relación a la función de estas enzimas en la simbiosis MA se ha encontrado en la pared de los miembros de la familia de las Glomaceae y Acaulosporaceae la presencia del sustrato de estas hidrolasas, los β -1,3-glucanos (Lambais, 2000). Esto sugiere la posibilidad de que las β -1,3-glucanasas puedan estar involucradas en la degradación parcial de la pared celular de los HMA y de las plantas, lo cual facilita la penetración (Rodríguez y col., 2004).

Por otra parte, también se observó que la aplicación de la sistemina de forma independiente produjo un incremento transitorio de la actividad de esta enzima en raíz a las ocho horas y a los seis ddg. Se conoce que esta hormona polipeptídica produce la acumulación de inhibidores de proteinasas, y de por lo menos 19 proteínas más. Ellas abarcan componentes de las vías de transducción de señales y otras proteínas cuya función en la defensa de las plantas es aun desconocida (Schaller, 1999; Ryan, 2000), sin embargo, su influencia sobre esta PR no había sido informada con anterioridad.

La presencia de la sistemina fue importante, ya que potenció la acción de *G. clarum* sobre la inducción de β -1,3-glucanasa, en ambos periodos, lo cual se manifestó en el tratamiento con ambos, en el cual se encontró un efecto sinérgico en las primeras dos horas y a los seis ddg.

Hasta el presente, el efecto de este elicitor solo había sido estudiado en las hojas, evaluando la acumulación de inhibidores de proteasas inducidas por el ataque de insectos herbívoros, por lo que este es el primer informe de su influencia sobre proteínas PRs en las raíces de plantas de tomate, así como de su relación con la simbiosis micorrízica arbuscular.

4.2.2.2.2. Determinación de la actividad quitinasa en el período de colonización

En el periodo de colonización (figura 11A) todos los tratamientos alcanzaron valores inferiores a los obtenidos en la fase de pre-colonización (10 veces más bajos). Se observó que en la mayoría de los tiempos de evaluación los tratamientos mostraron diferencias significativas.

Se produjeron dos incrementos importantes, uno en las plantas inoculadas con *G. clarum* de forma independiente a los nueve ddg (154.05 pKat.mg⁻¹ proteína) y otro a los tres ddg en la combinación del HMA y la sistemina (Gc/S), tratamiento en el cual se alcanzaron los valores más elevados (263.09 pKat.mg⁻¹ proteína). Ambos mostraron diferencias estadísticamente significativas con todos los tratamientos, durante los tiempos a los cuales se evaluó esta actividad.

A los 12 ddg se observó un incremento de la actividad de esta enzima en las plantas control, que mostró diferencias significativas al compararlas con los demás tratamientos. Como se conoce esta PR participa en diferentes procesos fisiológicos, con funciones diversas, que pudieron haber producido el incremento puntual de quitinasas no relacionadas con la micorrización (Salzer y Boller, 2000). Agrios, (2005) planteó que estas enzimas son abundantes en las raíces donde pueden actuar liberando señales moleculares que actúan como elicitores endógenos de la morfogénesis. Por otra parte, como ha sido informado con anterioridad, en las plantas micorrizadas se produce una regulación de la expresión de esta proteína PR para favorecer el procesos de micorrización (Rodríguez, 2005), lo cual podría explicar porque en este grupo de plantas no se produjo el incremento de la actividad en este momento de evaluación. Téngase en cuenta que a los 12 ddg ocurrió un incremento de la colonización micorrízica tanto a nivel del número de raíces (porcentaje de colonización) como de intensidad (porcentaje de densidad visual). Sin embargo, no se observó la presencia de los arbusculos, estructura en cuya morfogénesis participan estas enzimas (Bonfante y Perotto, 2000).

Con relación a la sistemina, es importante resaltar que su influencia sobre la inducción de esta PR no había sido estudiada anteriormente, por lo que se desconoce cual pueda ser la causa de la represión de la actividad de esta enzima en raíz a los 12 ddg, al ser comparada con las plantas control. Por otra parte, tampoco se ha encontrado una influencia negativa de los componentes de la vía de señalización de este elicitor con la inducción de quitinasas.

Al igual que en las raíces, la cuantificación de la actividad de esta enzima en las hojas mostró niveles inferiores a los alcanzados en la fase de pre-colonización (figura 10B). A pesar de que desde los primeros momentos se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos, todos alcanzaron valores cercanos o inferiores al control. El mismo mostró una media de 71.49 pKat.mg⁻¹ proteína, a excepción de los 18 ddg, momento en el cual alcanzó un máximo de 103.08 pKat.mg⁻¹ proteína.

Durante los estadios iniciales del establecimiento de las MA, predominan las quitinasas no relacionadas con la simbiosis, como ha sido planteado con anterioridad, las que producen respuestas de defensa atenuadas, mientras que en las fases más avanzadas se produce la acumulación de quitinasas específicas de la micorrización (Salzer y Boller, 2000). Rodríguez (2005) encontró la acumulación de quitinasas vinculadas con la micorrización a los 32 días en plantas de tomate de la variedad Amalia inoculadas con *G. clarum*. Al parecer en el presente experimento este momento de inducción se produjo a los nueve ddg en raíz y a los 21 ddg en hojas, lo cual confirma la ocurrencia de un proceso de señalización rápida que condujo a la inducción de respuestas de defensa sistémicas.

La sistemina aplicada de forma independiente produjo una depresión de la actividad a partir de los 18 ddg que se mantuvo aún a los 24 ddg. Con la aplicación de este elicitor se ha encontrado la activación rápida de respuestas de defensa en las cuales participan diferentes elementos que conllevan a la acumulación de AJ y etileno, los cuales son inductores de la expresión de proteínas PRs, entre las que se encuentra la quitinasa. Sin embargo, estas hormonas no han sido vinculadas con procesos de represión de la actividad de esta enzima.

4.2.2.2.3. Determinación de la actividad peroxidasa en el período de colonización

Los resultados de la cuantificación en raíz de la actividad peroxidasa se muestran en la figura 12A. La actividad de esta enzima se observó desde los primeros momentos de evaluación,

principalmente en las plantas controles, en las cuales se alcanzaron los mayores niveles a los tres, 12 y 18 ddg (507.14, 444.43 y 446.40 nKat.mg⁻¹ proteína, respectivamente).

Al analizar la dinámica inducida por la aplicación de la sistemina, se encontró que ésta se incrementó a los 12 ddg, en los cuales se alcanzó el mayor valor de actividad de todo el experimento (982.53 nKat.mg⁻¹ proteína), el que mostró diferencias significativas con relación a los demás tratamientos.

En las plantas micorrizadas con *G. clarum*, tanto de forma independiente, como combinadas con la sistemina (Gc y Gc/S) se obtuvo una dinámica similar durante todo el experimento, a excepción de los nueve ddg, donde en la combinación se alcanzaron valores inferiores, con diferencias estadísticas entre si. Los mayores niveles fueron observados a los seis y a los 12 ddg (529.93 y 770.10 nKat.mg⁻¹ proteína, respectivamente), siendo este último tiempo donde se alcanzó los mayores valores el que coincidió con el incremento del porcentaje de colonización y de densidad visual (acápite 4.2.2.1.).

En el tejido foliar se observó el incremento de la actividad de esta enzima en los primeros seis ddg (figura 12B). Se destacaron las plantas control a los tres ddg (523.81 nKat.mg⁻¹ proteína) y las variantes a las que se les aplicó la sistemina ya fuera de forma independiente o combinada con *G. clarum* (Gc/S) a los seis ddg (463.35 y 221.43 nKat.mg⁻¹ proteína, respectivamente). Sin embargo, a partir de los nueve ddg la actividad de esta enzima decayó hasta niveles no detectables.

Stennis y col. (1998) observaron que el pre-tratamiento de suspensiones celulares de *L. esculentum* variedad "Río Grand PtoR" con sistemina, incrementó entre 10 y 16 veces la intensidad de las respuestas oxidativas, inducidas en estas células por la adición de oligogalaturónidos de origen fúngico. Este efecto no se produjo al emplear el análogo inactivo de la sistemina (A-17), ni cuando se adicionó cicloheximida al medio (inhibidor de la síntesis de proteínas), lo que indicó que la respuesta era específica para este elicitor y que ésta requería de la síntesis *de novo* de proteínas. Estos autores también encontraron que, era necesario pre-incubar las células con sistemina 12 horas antes de la aplicación del elicitor.

En el presente experimento se observó un incremento a los 12 ddg con la aplicación de esta hormona, la que resultó tardía, si se tiene en cuenta los resultados informados por Lee y Howe, (2003), quienes encontraron la expresión de especies activas de oxígeno a los 30

minutos posteriores a la inducción con el elicitor, respuesta que se mantuvo hasta las dos horas, posteriores a las cuales se suprimió.

En raíz y en hoja se observó un resultado interesante, donde tanto los tratamientos micorrizados como la variante donde se aplicó la sistemina produjeron una reducción de la actividad peroxidasa con relación a las plantas control. En las plantas se ha encontrado que esta enzima participa en diferentes procesos como la respiración, las reacciones oxidativas, la peroxidación lipídica y respuestas ante condiciones de estrés biótico y abiótico (Vera-Estrella y col., 1994), lo cual puede explicar los niveles basales obtenidos en los tratamientos control.

Es conocido que las micorrizas son capaces de proteger a las plantas debido a la activación de diferentes mecanismos, que conducen a la obtención de un buen balance nutricional, la mejora del estatus hídrico de las plantas, así como la regulación de diversos estrés (Bonfante y Perotto, 1995, 2000), entre los que se ha observado la disminución de la actividad peroxidasa en las primeras fases de la simbiosis MA.

Solórzano y col, (2001) encontraron que en plantas de tomate micorrizadas se produjo la disminución de la actividad peroxidasa en los primeros nueve días, los que estuvieron relacionados con el proceso de establecimiento del hongo micorrizógeno en las raíces. Estas enzimas participan en el reforzamiento de las paredes celulares con la formación de lignina y suberina (Pozo, 1999), compuestos que no pueden ser degradados por los HMA y por lo tanto inhiben el establecimiento de la simbiosis micorrízica.

4.2.2.3. Determinación de los patrones isoenzimáticos en el período de colonización

4.2.2.3.1. Patrones de β -1,3-glucanasas obtenidos mediante geles de poliacrilamida (PAGE)

Mediante la separación de las isoenzimas de β -1,3-glucanasas por PAGE se obtuvo un número bajo de isoformas, poco definidas entre sí. En el mismo, los tratamientos en estudio no mostraron diferencias en el patrón de expresión de esta enzima.

4.2.2.3.2. Patrones de β -1,3-glucanasas obtenidos mediante la Focalización isoelectrica (IEF)

El empleo del cloruro de trifeniltetrazolio para revelar las β -1,3-glucanasas permitió la detección de una isoforma diferencial en hoja con punto isoelectrico (pI) 3.8, la que se expresó cuando se combinó la sistemina con *G. clarum*. En raíz fue observada en todos los tratamientos, aunque con menor intensidad (figura 13).

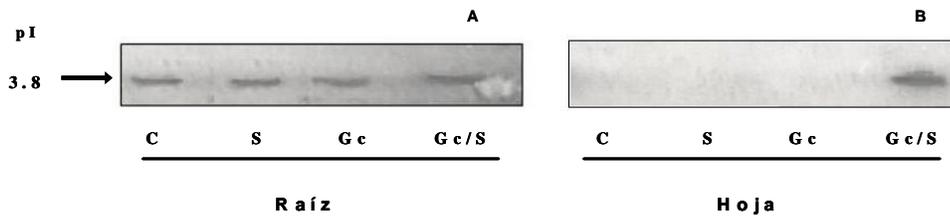


Figura 13: Isoforma ácida de β -1,3-glucanasas en las raíces (A) y en las hojas (B) de tomate var. Amalia, a los seis días después a la germinación (ddg), obtenidos por focalización isoelectrica y reveladas mediante el empleo de cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio.

Leyenda: C-control, S-sistemina, Gc-*Glomus clarum* y Gc/S- *Glomus clarum* mas sistemina. La flecha indica isoforma con diferente nivel de expresión.

Con el empleo del revelado de la neocuproina hidroclicórica se detectó una isoforma nueva de β -1,3-glucanasas que se expresó en todos los tratamientos, tanto en las hojas como en las raíces (pI 6.0) (figura 14), no observadas en la tinción con trifeniltetrazolio.

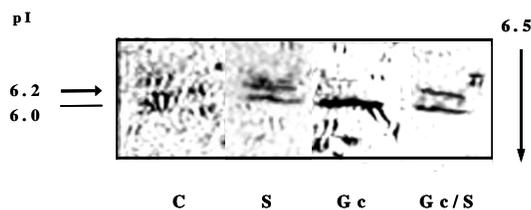


Figura 14: Isoformas de β -1,3-glucanasas obtenidas en raíces de tomate var. Amalia a los seis días después a la germinación (ddg). Las proteínas fueron separadas por focalización isoelectrica y revelada la actividad mediante el empleo de Neocuproina hidroclicórica.

Leyenda: C-control, S-sistemina, Gc-*Glomus clarum* y Gc/S- *Glomus clarum* mas sistemina. La flecha indica isoforma nueva.

En este órgano la sistemina indujo otra forma adicional, ligeramente ácida (pI 6.2), que se observó desde los tres hasta los nueve ddg, vinculada con la aplicación de la sistemina, ya sea de forma independiente o combinada con *G. clarum* (Gc/S). Esta forma nueva puede ser la responsable del resultado observado en la cuantificación de la actividad enzimática a los seis ddg ya que estuvo relacionada con los tratamientos donde se alcanzaron los mayores valores en ese momento de evaluación.

Pozo y col. (2002) estudiaron la expresión de las β -1,3-glucanasas por PAGE y encontraron la presencia de tres isoformas constitutivas (dos ácidas y una básica) localizadas en las raíces de plantas de tomate no micorrizadas y de tres isoenzimas nuevas (una ácida y dos básicas) relacionada con la micorrización por *Glomus mosseae*. Plantearon, además, que existe una respuesta específica en ciertas interacciones HMA-planta, donde el hongo es el responsable de la especificidad.

En este experimento se observó un efecto sinérgico en raíz entre el HMA y la sistemina con relación a la actividad enzimática de la β -1,3-glucanasa en etapas tempranas (acápite 4.2.2.2.1.), que coincidió con la aparición de nuevas isoformas al sexto día de evaluación separadas por la IEF.

4.2.2.3.3. Patrones de peroxidasa obtenidos mediante PAGE

En la figura 15 se muestra el resultado de la separación de las peroxidasa de las raíces mediante geles de poliacrilamida, en la cual se observaron diferentes patrones isoenzimáticos en los tiempos de muestreo.

A los tres ddg se observó la aparición de cuatro isoformas, donde las de mayor intensidad se encontraron en el tratamiento control, en coincidencia con los resultados de la determinación de la actividad enzimática (figura 15A). En las variantes donde se aplicó la sistemina, ya fuera de forma independiente o combinada con *G. clarum*, también se detectaron dos isoformas, aunque de muy baja intensidad. En estos tratamientos se alcanzaron niveles de actividad inferiores a los controles (acápite 4.2.2.2.2.).

A los nueve ddg (figura 15B) se obtuvieron cinco isoformas, las que presentaron diferentes intensidades. Solo el tratamiento de Gc/S mostró un comportamiento diferente, el cual presentó una banda adicional con Rf de 0.119, con relación al resto de los tratamientos e incremento de la intensidad de otras dos (Rf de 0.285 y 0.405).

Este resultado es contradictorio en relación con los obtenidos en la cuantificación de la actividad de esta enzima, ya que en este tratamiento se alcanzaron niveles bajos, sin embargo, fue en el que se observó el mayor número de isoformas (seis).

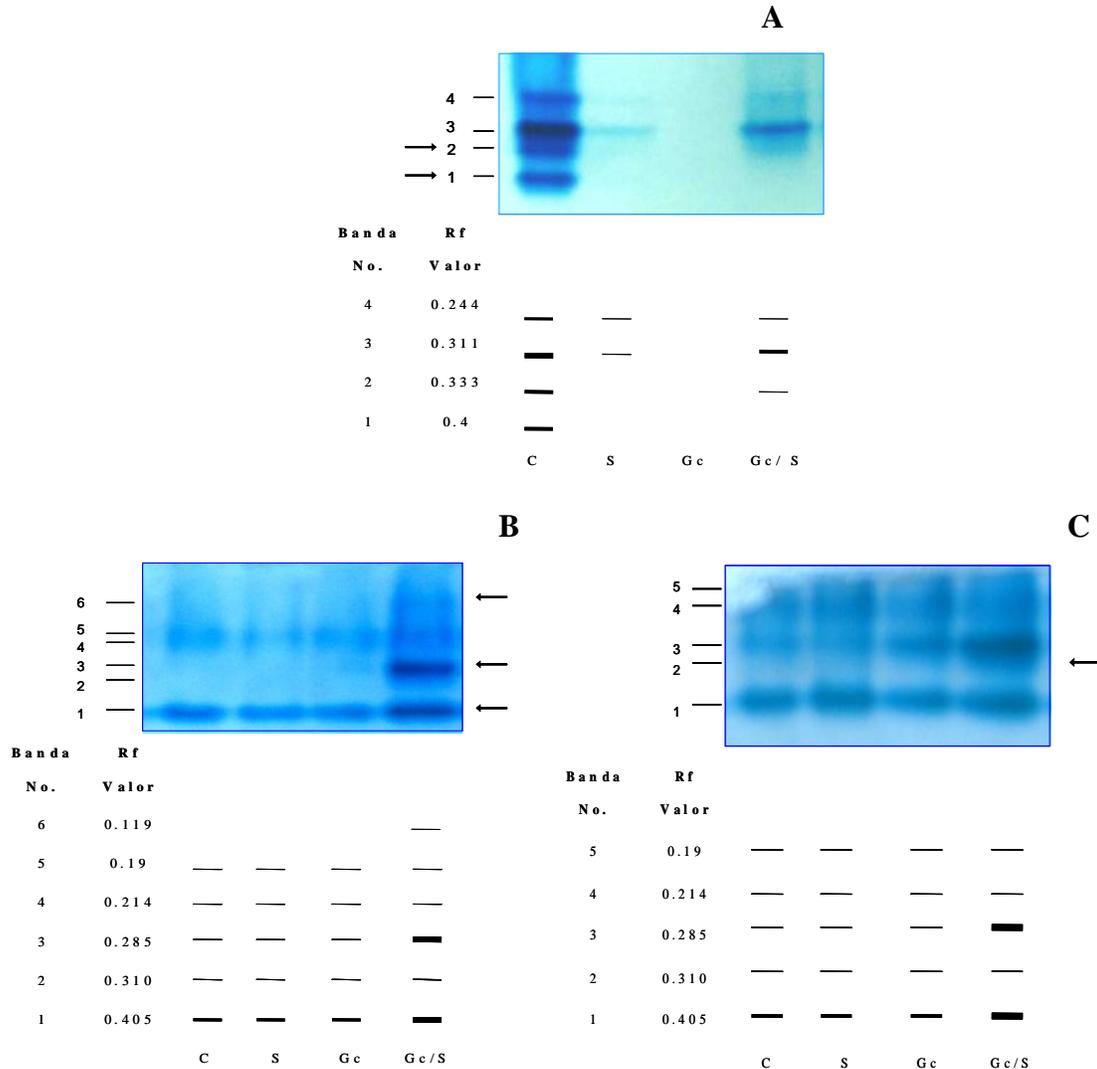


Figura 15: Patrones isoenzimáticos de peroxidasa en raíz de tomate var. Amalia, a los tres (A), nueve (B) y doce días después a la germinación (ddg).
 Leyenda: C-control, S-sistemina, Gc-*Glomus clarum* y Gc/S- *Glomus clarum* mas sistemina. Las flechas indican isoformas nuevas o con diferente nivel de expresión.

Son diferentes los mecanismos que originan la aparición de isoenzimas y que podrían dar respuesta al resultado obtenido en la combinación de *G. clarum* con la sistemina, los que están influenciados por diferentes condiciones bióticas o abióticas. Al parecer en este tratamiento

(Gc/S) las formas cuyo Rf corresponde a 0.285 y 0.405 son las que poseen mayor contribución a la actividad enzimática, siendo una característica propia de esta variante.

El patrón de expresión a los doce ddg fue similar al que se observó a los nueve ddg, tanto en el número de isoenzimas como en la intensidad de las mismas, a excepción de la isoforma adicional (Rf 0.119), la cual no fue detectada (figura 15C).

La expresión de esta enzima está regulada por el proceso de desarrollo de la planta lo cual se evidencia en el incremento del número e intensidad de las isoformas en el tiempo, tal como lo informan Vera-Estrella y col., (1994), quienes plantean que las peroxidases están muy vinculadas al desarrollo de estadios fisiológicos de la planta.

Se ha informado en diferentes cultivos que durante el desarrollo de las MA el patrón de expresión de las peroxidases es muy similar al observado para las quitinasas, con una inducción transiente seguida por la supresión de la actividad (Dumas-Gaudot y col., 2000; Lambais, 2000), lo cual podría explicar la diferencia en la detección de la isoforma adicional observada a los nueve y a los 12 ddg.

La mayoría de los estudios que se informan con relación a los patrones de expresión de esta enzima en tomate (*Solanum lycopersicum* L) se han basado en la separación por isoelectroenfoque, por lo que se refieren a isoformas con relación a su punto isoeléctrico (pI). Se han encontrado tanto formas ácidas como básicas, con diferencias en la localización celular (Botella y col., 1994; Talano y col., 2006). Brownleader y col., (1995) trabajaron con suspensiones celulares de este cultivo y aislaron una isoenzima de peroxidasa que mostró un pI de 9.0 y PM de 30 kD.

En cuanto a la expresión de estas enzimas en la simbiosis micorrízica Santos y col., (2001) estudiaron la inoculación con diferentes especies de HMA y encontraron que la aparición de isoformas no estaba relacionada con la micorrización, de forma similar a lo que se observó en este trabajo.

El análisis integral de los resultados permitió plantear que las PRs estudiadas se indujeron de forma local. Las enzimas β -1,3-glucanasa y quitinasa presentaron los mayores niveles de actividad en ambos periodos (pre-colonización y colonización), mientras que la peroxidasa lo mostró en la fase tardía (a los 12 ddg).

Por su parte, la sistemina mostró un efecto sinérgico con *G. clarum* que se manifestó a nivel de establecimiento de la simbiosis micorrízica (porcentaje de colonización y densidad visual) y de la evaluación de las PRs. Este fue evidente sobre la enzima β -1,3-glucanasa en etapas tempranas mientras que sobre las quitinasa se manifestó en estadios más avanzados. El elicitor produjo una respuesta transitoria que coincidió con la expresión de una isoforma adicional, ligeramente ácida a los seis días (pI 6.2), ya fuera aplicado de forma independiente o combinado con el HMA.

Se logró definir sistemas enzimáticos que permiten la caracterización del procesos de establecimiento de la simbiosis micorrízica arbuscular en sus diferentes estadios.

Este constituye el primer informe de la determinación de proteínas PRs inducidas por la sistemina, a través del estudio de la actividad y patrones isoenzimáticos, en plantas de tomate micorrizadas. Los resultados alcanzados son importantes ya que se evaluaron enzimas claves en la defensa de las plantas contra patógenos fúngicos y en procesos de estrés bióticos y abióticos, sobre las cuales la sistemina y su combinación con *G. clarum* mostraron un efecto positivo.

4.3. Efecto de los HMA y la sistemina sobre la severidad de las enfermedades causadas por *Alternaria solani* y *Phytophthora nicotianae* en tomate

4.3.1. Evaluación previa a la inoculación de los patógenos

4.3.1.1. Determinación del desarrollo vegetativo de las plantas a los 21 días después de la germinación

Para determinar la influencia de los HMA y la sistemina sobre el desarrollo vegetativo de las plantas previo a la inoculación con los patógenos se evaluó la masa fresca en ambos órganos (figura 16), encontrándose diferencias estadística entre los tratamientos. Con relación a la masa fresca foliar (figura 16A), se encontró que en la combinación de *G. clarum* con la sistemina (Gc/S) fue en la se alcanzó el valor más elevado, que mostró diferencias estadísticamente significativas con su control micorrizado (C-Gc).

Esta evaluación se realizó a los 21 ddg, momento en el cual en todos los tratamientos se alcanzó un desarrollo foliar adecuado, obteniéndose plantas de buen porte.

Con relación a la masa fresca radical (figura 16B) se observó que los tratamientos mostraron diferencias significativas entre si. El mayor nivel se obtuvo en la combinación de

G. clarum con la sistemina (Gc/S) que coincidió con el nivel mas elevado de la masa fresca foliar, lo cual sugiere que la misma es favorable para la obtención de plantas vigorosas. Este tratamiento mostró similitud estadística con el control micorrizado con *G. fasciculatum* (C-Gf), pero difirió del resto.

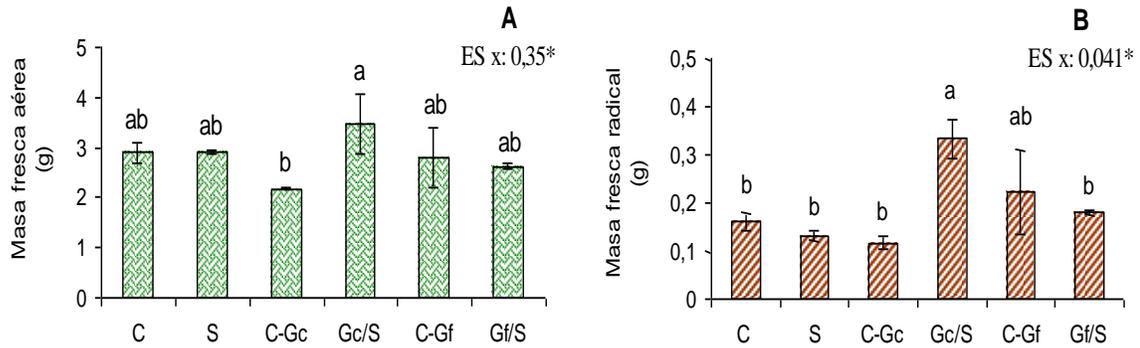


Figura 16: Desarrollo vegetativo obtenido por las plantas controles (sin aplicación de los patógenos) a los 21 días de germinadas, tomate var. Amalia. Masa fresca aérea (A) y masa fresca radical (B).

C (control inoculado), S (sistemina), C-Gc (control micorrizado con *Glomus clarum*), Gc/S (*Glomus clarum* mas sistemina), C-Gf (control micorrizado con *Glomus fasciculatum*) y Gf/S (*Glomus fasciculatum* mas sistemina).

Medias con letras comunes no difieren significativamente según el Procedimiento de Tukey (HSD) ($p \leq 0.05$). Las barras verticales indican la desviación estándar.

En todas las variantes se observó un abundante desarrollo radical que ocupó todo el sustrato.

El uso de los HMA en la agricultura ha sido avalado por numerosos resultados que demuestran su importancia en cultivos y condiciones diversas (Rivera, 2003; Artursson, 2006), tanto a nivel de parcela experimental como en condiciones de producción (Terry 2001; Fernández y col., 2002; Pulido y col., 2003 a y b; Hernández y Chailloux, 2004). A pesar de ello, en nuestro país no se ha abordado el papel de estos hongos en la protección contra patógenos, circunscribiéndose las investigaciones a su influencia como biofertilizante sobre el rendimiento, de ahí la importancia de realizar este experimento adicionando además un elicitor como la sistemina.

El análisis global de los indicadores evaluados permitió concluir que todos los tratamientos promovieron un buen desarrollo vegetativo, ya que en los mismos se alcanzó valores de

masa fresca similares o superiores a las observadas en las plantas control. Sobresalió la interacción Gc/S, en la cual se alcanzó 3.81 g de masa fresca total, por lo que las plantas se encontraban aptas para el enfrentamiento a los patógenos en estudio.

4.3.1.2. Cuantificación de la colonización micorrízica de las plantas a los 21 días después de la germinación

La evaluación de los indicadores del proceso de micorrización a los 21 ddg se muestra en la tabla 6. Se observó que la combinación de *G. clarum* con la sistemina (Gc/S) produjo la disminución del porcentaje de colonización con relación a su control micorrizado (C-Gc), sin embargo, ambos mostraron niveles similares de intensidad de la micorrización (%DV), respuesta que también fue observada en los tratamientos micorrizados con *G. fasciculatum*. Con relación a la densidad visual, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las variantes micorrizadas.

Tabla 6: Indicadores micorrízicos evaluados como porcentaje de colonización y de Densidad Visual (% DV) en plantas de tomate, var. Amalia, tratadas con HMA y sistemina a los 21 días de germinadas.

Tratamientos	% Colonización	% DV
Control micorrizado con <i>G. clarum</i>	41,3 a	1,03 a
<i>G. clarum</i> + sistemina	39.2 b	1,02 a
Control micorrizado con <i>G. fasciculatum</i>	40,66 ab	0,96 a
<i>G. fasciculatum</i> + sistemina	37,66 c	0,97 a
<i>ESx</i>	1.97*	0.05*

Medias con letras comunes no difieren significativamente según el Procedimiento de Tukey (HSD) ($p \leq 0.05$).

Los porcentajes de colonización fueron elevados en correspondencia con la edad de las plantas. Estos valores tuvieron similitud con los informados por Terry (2001), quien encontró un 39% de colonización en plantas de tomate inoculadas con *G. fasciculatum*, y superiores a los informados por Rodríguez y col. (2001).

El hecho de obtenerse plantas con elevados niveles de porcentaje de colonización y densidad visual nos permitió asegurar, que los resultados que se observaron en las

evaluaciones realizadas posteriormente a la inoculación con los patógenos fueron debido a una micorrización eficiente y por lo tanto al efecto de los HMA sobre los mismos.

4.3.2. Evaluación posterior a la inoculación de los patógenos

4.3.2.1. Evaluación de los síntomas de la enfermedad causada por *Alternaria solani*

En la figura 17 se muestran los resultados de la severidad de la enfermedad producida por *A. solani* en las plantas de tomate, en todos los años de estudio. Se observó que en los tres años que se repitió el estudio los tratamientos mostraron tendencias similares, los que tuvieron similitudes estadísticas entre sí. En todas las variantes se produjo la afectación por este hongo, aunque en diferente grado, siendo más severa en las plantas del control inoculado y en el control micorrizado con *G. clarum*.

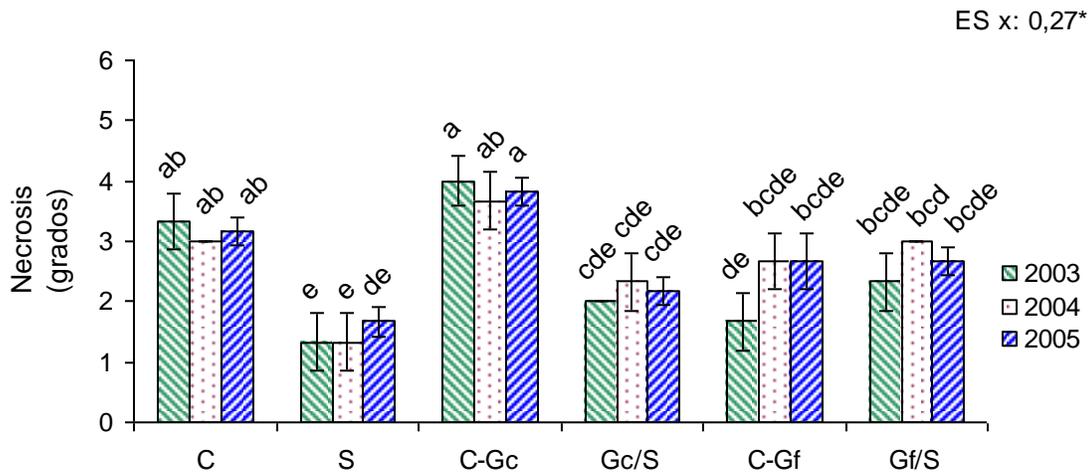


Figura 17: Grados de Necrosis foliar producida por *A. solani* en plantas de tomate, var. Amalia, a los tres días post-inoculación del patógeno (24 días de germinadas), durante los tres años de evaluación.

C (control inoculado), S (sistemina), C-Gc (control micorrizado con *Glomus clarum*), Gc/S (*Glomus clarum* mas sistemina), C-Gf (control micorrizado con *Glomus fasciculatum*) y Gf/S (*Glomus fasciculatum* mas sistemina).

Medias con letras comunes no difieren significativamente según la prueba no paramétrica de comparación múltiple de Kruskal Wallis y la comparación de las medias mediante el método multivariado de Mann-Whitney con la corrección de Bonferroni ($p \leq 0.05$).

La aplicación de la sistemina de forma independiente redujo significativamente la severidad del tizón temprano en dos grados, con relación al control, con el cual mostró diferencias estadísticamente significativas, al igual que con el control micorrizado con

G. clarum (C-Gc). Esta respuesta puede deberse al carácter necrotrófico de *A. solani*, ya que se conoce que los patógenos con este comportamiento activan respuestas defensivas dependientes de AJ (Trusov y col., 2006), hormona principal de la cascada de transducción de señales inducida por la sistemina (Ryan, 2000).

Trusov y col., (2006) en un estudio con mutantes de *Arabidopsis thaliana* y los patógenos necrotróficos *Alternaria brassicicola* y *Fusarium oxysporum*, concluyeron que la señalización mediada por AJ es un componente importante en la resistencia de la planta contra este grupo de patógenos. Mientras que Glazebrook, (2005) demostró que la diseminación de los patógenos necrotróficos *Alternaria brassicicola* y *Botrytis cinerea* en *Arabidopsis thaliana* fue restringida por la inducción de respuestas de defensa dependientes de AJ y etileno.

Se observó un efecto interesante al aplicar de forma conjunta la especie *G. clarum* y la sistemina (Gc/S), en la cual se produjo una reducción considerable de la severidad del Tizón temprano si se compara con el control micorrizado con este HMA (C-Gc) (dos grado). En este tratamiento (Gc/S) se alcanzó una niveles similares a los obtenidos por la aplicación de la sistemina (1.66 en la combinación y 1.33 grados con el elicitor), aunque también compartió similitudes estadísticas con el control micorrizado con *G. fasciculatum* (C-Gf) y con su combinación con el elicitor (Gf/S), los cuales mostraron mayor grado de afectación.

Fritz y col., (2006) estudiaron el efecto de las micorrizas sobre le tizón temprano en tomate y encontraron que *Alternaria* indujo clorosis y necrosis en todas las hojas, tanto en las plantas micorrizadas como en las no micorrizadas, aunque en las colonizadas con el HMA fue significativamente menor, a pesar de que no obtuvo mejoría del crecimiento de la planta ni de la toma de fosfatos.

Diversos autores indican que las plantas micorrizadas expresan incrementos en el nivel de resistencia al ataque por patógenos, siendo una de las respuestas que se inducen, las modificaciones de la pared de la célula vegetal, para limitar la penetración del agente invasor (Cordier y col., 1998; Blee y Anderson, 2000). Al producirse el reconocimiento del patógeno por la planta, se activa a nivel celular una serie de procesos rápidos con el fin de

limitar la penetración por el organismo invasor o de bloquearle el acceso a las fuentes de nutrientes (Staskawicz y col., 1995; Glazebrook, 2005).

Al parecer en las plantas de resistencia intermedia, como es el caso de la variedad Amalia, este mecanismo de resistencia para impedir la afectación por este hongo patógeno no es lo suficientemente rápido y/o intenso. Esto se evidenció en las plantas control enfrentadas al patógeno, en las que se alcanzó un nivel tres (aproximadamente un 25 % de necrosis foliar), correspondiente a resistencia intermedia.

Con relación a la respuesta de esta variedad ante la afectación por *A. solani*, se han obtenido resultados diferentes, Álvarez y col., (1997) informan una conducta medianamente tolerante, mientras que Pérez (2003) encontró una respuesta de resistencia ante la cepa 100 del patógeno.

Con el empleo de la sistemina de forma independiente se logró que esta variedad mostrara una elevada resistencia al Tizón temprano (grado 1), mientras que en sus combinaciones con los HMA solo se alcanzó una condición de resistencia (grado 2). Estas respuestas deben ser el resultado de la modulación de la expresión de diferentes mecanismos de defensa relacionados con la protección ante este patógeno.

4.3.2.2. Evaluación de los síntomas de la enfermedad causada por *Phytophthora nicotianae*

El daño producido por la inoculación con la especie *P. nicotianae* fue evaluado mediante la determinación de diferentes parámetros que caracterizan la enfermedad causada por este patógeno. Con relación al porcentaje de marchitez se observó una respuesta similar en los tres años evaluados (figura 18). En ellos no se encontró un efecto positivo de los tratamientos sobre la reducción de la severidad de la enfermedad, a excepción de la combinación de *G. fasciculatum* con la sistemina (Gf/S). En este tratamiento se logró la disminución del daño en 1.6 grados (20 %) el que mostró diferencias significativas con relación al control inoculado y al control micorrizado con *G. fasciculatum* (C-Gf).

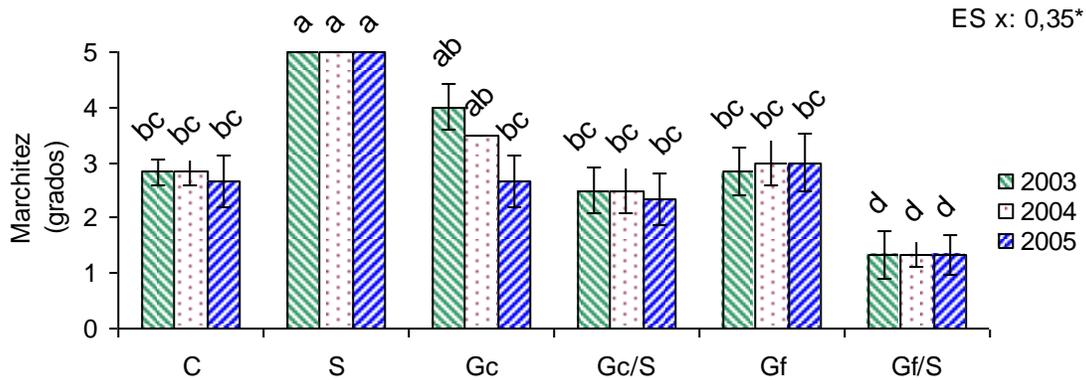


Figura 18: Grados de marchitez producido por *P. nicotianae* en plantas de tomate, var. Amalia, a los tres días post-inoculación del patógeno (24 días de germinadas), durante los tres años de evaluación.

C (control inoculado), S (sistemina), C-Gc (control micorrizado con *Glomus clarum*), Gc/S (*Glomus clarum* mas sistemina), C-Gf (control micorrizado con *Glomus fasciculatum*) y Gf/S (*Glomus fasciculatum* mas sistemina).

Medias con letras comunes no difieren significativamente según la prueba no paramétrica de comparación múltiple de Kruskal Wallis y la comparación de las medias mediante el método multivariado de Mann-Whitney con la corrección de Bonferroni ($p \leq 0.05$).

Las variantes correspondientes al combinación de *G. clarum* con el elicitor y el control micorrizado con *G. fasciculatum*, compartieron similitud estadística con el control inoculado. Mientras que el control micorrizado con *G. clarum* mostró una conducta intermedia en los dos primeros años de evaluación, entre el control inoculado y la variante donde se aplicó la sistemina de forma independiente. En este tratamiento (S) se incrementó significativamente la severidad de la afectación por este patógeno en dos grados, con relación al control absoluto (68.17%).

Se conoce que la resistencia a *Phytophthora*, en papa y tabaco, es dependiente de la activación de una 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 y col., 1998), produciéndose la activación de la muerte celular hipersensitiva, la cual tiene un efecto protector contra patógenos biotróficos (Govrin y Levine, 2000). Sin embargo, la sistemina produce la inducción de genes defensivos dependientes de la síntesis de novo de AJ (Ryan, 2000) la cual se ha observado posee un carácter antagónico con el AS (Pozo y col., 2005).

Por esta razón la aplicación exógena de la sistemina podría haber modificado, alterado o inhibido la generación de la HR dependiente de AS y por lo tanto, aumentado la susceptibilidad a la infección por *Phytophthora*, cuando se aplicó este elicitor de forma independiente.

Al analizarse la pudrición en las raíces (tabla 7), no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos, donde los porcentajes de daño observados fueron bajos.

Tabla 7: Porcentaje de pudrición radical en las plantas de tomate var. Amalia, que se enfrentaron a *P. nicotianae* a los tres días post-inoculación del patógeno (24 días de germinadas).

Tratamientos	Pudrición (%)
Control inoculado con <i>P. nicotianae</i>	3,17
Sistemina	2,77
Control micorrizado con <i>G. clarum</i>	2,83
<i>G. clarum</i> + sistemina	2,89
Control micorrizado con <i>G. fasciculatum</i>	4,22
<i>G. fasciculatum</i> + sistemina	3,83
<i>ES x</i>	0,71 n.s.

Medias con letras comunes no difieren significativamente según el Procedimiento de Tukey (HSD) ($p \leq 0.05$).

El uso de las MA en la protección de las plantas contra patógenos ha sido bien documentado en la literatura, la que se ha centrado, fundamentalmente en las enfermedades causadas por hongos (Dugassa y col., 1996; St-Arnaud y col., 1997; Judelson, 1997; Harrier y col., 2004; Fritz y col., 2006) y su relación con varios mecanismos de defensa que se activan en esta simbiosis. (Pozo y col., 1999, 2002; Cordier y col., 1998; Zheng y col., 2005; Yamamizo y col., 2006)

Todo parece indicar que las vías de señalización que participan en la activación de las respuestas defensivas ante cada uno de los patógenos estudiados son diferentes; sin que hasta el momento haya sido posible determinar cual es el mecanismo que explica porque en

la combinación con la sistemina la especie *G. fasciculatum* resultó ser mas efectiva contra *P. nicotianae*, mientras que contra *A. solani* se destacó *G. clarum*.

Los estudios previos generalmente se han referido al empleo de una sola especie de hongo micorrizógeno, diferentes a las del presente experimento, fundamentalmente *G. intrarradices* (Cordier y col., Dugassa y col., 1996; 1998; Pozo, 1999, 2002; Zheng y col., 2005; Yamamizo y col., 2006).

Se conoce que algunas respuestas de defensa son controladas por etileno y/o jasmonato, las que muestran un considerable solapamiento con otras como con las que son inducidas por daño mecánico. Las vías dependientes de AS, AJ y etileno poseen una gran interacción, donde el AS y el AJ son inhibitorios mutualistas de la expresión de muchos genes (Glazebrook, 2005).

A pesar de ello, es posible que la potenciación de la respuesta defensiva contra *P. nicotianae* observada en la combinación de *G. fasciculatum* con la sistemina (Gf/S) se deba a que en ella se haya favorecido la activación de las respuestas oxidativas necesarias para una acción eficiente contra este patógeno.

4.3.2.3. Cuantificación de las actividades enzimáticas evaluadas en las plantas inoculadas con los patógenos en las raíces y en las hojas

4.3.2.3.1. Determinación de la actividad de β -1,3-glucanasas y quitinasas

En todas las actividades enzimáticas estudiadas el análisis de varianza bifactorial, mostró interacciones entre los tratamientos.

En la figura 19A se presenta respuesta de las plantas a los tratamientos en cuanto a la inducción de las β -1,3-glucanasas en las raíces de las plantas inoculadas con *A. solani* y su comparación con las no enfrentadas (plantas sanas).

Al analizar la actividad de esta enzima en las plantas sanas, se observó que los mayores niveles se alcanzaron en el tratamiento donde se aplicó la sistemina de forma independiente, seguidos por los controles micorrizados con *G. clarum* y con *G. fasciculatum* (C-Gc y C-Gf), con los cuales mostró diferencias estadísticas.

En las plantas infectadas con *A. solani* se observó que los niveles de inducción fueron ligeramente superiores a los obtenidos en las testigo, donde se destacaron los tratamientos donde se aplicó la sistemina y el controles micorrizados con *G. fasciculatum*, con 12.11 y

9.54 $\mu\text{Kat}\cdot\text{mg}^{-1}$ proteína, respectivamente. Estos tratamientos produjeron un 76.28 y 60.31% de incremento, respectivamente, con relación a sus homólogos del grupo de las plantas sanas. En la combinación de *G. fasciculatum* con la sistemina (Gf/S) se produjo la disminución de la actividad, con relación a su respectivo controles micorrizados (C-Gf.).

Con relación a esta enzima en raíz se obtuvo un resultado interesante en el tratamiento donde se aplicó la sistemina de forma independiente, ya que fue éste en el que se alcanzó los niveles mas bajos de la severidad de la enfermedad, sin embargo, no se observó igual respuesta en la variante de la combinación de *G. clarum* con la sistemina, en la cual se produjo también una reducción de la necrosis foliar.

La actividad específica de β -1,3-glucanasa obtenida en las plantas que se enfrentaron a *P. nicotianae* se muestra en la figura 19B, en la cual se observó que no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos, en los que se obtuvo niveles similares a los alcanzados en los controles de las plantas sanas.

En la figura 20 se exponen los resultados de la inducción de esta enzima en hojas, en la que se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos, en los respectivos grupos. El análisis de las plantas sanas (figura 20A) reveló que tanto la aplicación de la sistemina como la micorrización produjeron la disminución de esta actividad, con relación al control, a excepción de la combinación de *G. fasciculatum* con la sistemina (Gf/S), la cual mostró similitudes estadísticas con el mismo.

Cuando se realizó el enfrentamiento de las plantas a *A. solani*, se observó que la actividad de β -1,3-glucanasa en hoja mostró una tendencia diferente a la obtenida en las plantas sanas, con niveles inferiores a este. En este grupo los tratamientos en estudio alcanzaron niveles de actividad enzimática similares o inferiores al control inoculado con el patógeno, a excepción de la combinación de *G. clarum* con la sistemina (Gc/S), en la cual se obtuvo valores superiores, con diferencia estadísticas entre si.

Estos resultados reafirman los obtenidos por diferentes autores como Lawrence y col. (1999) y Solórzano (2002) quienes plantean que estas enzimas poseen diferentes funciones, pero en la interacción con *A. solani* no parecen tener una clara relación con los mecanismos defensivos.

En la figura 20B se muestra el efecto de la aplicación de *P. nicotianae* y su comparación con las plantas sanas. Se observó que tanto los HMA como el elicitor produjeron la

disminución de la actividad, con relación al control inoculado con el patógeno, a excepción de la combinación de *G. fasciculatum* con la sistemina (Gf/S) la cual mostró similitud estadística con el mismo. Esta fue la variante donde se alcanzó el nivel más bajo de severidad de la enfermedad causada por *P. nicotianae*.

Contrario a estos resultados Yi, y Hwang, (1997) cuantificaron la actividad de esta enzima y encontraron que los hipocotilos de soja infectados con una raza incompatible de *Phytophthora soja* mostraban niveles más elevados que los sanos.

De forma general, en el presente estudio se encontró que los HMA indujeron respuestas diferentes, en la cual influyó tanto el órgano donde se cuantificó, como el patógeno. De esta forma, se observó que cuando las plantas se enfrentaron a *A. solani* en la aplicación conjunta de *G. clarum* con la sistemina (Gc/S) fue donde se alcanzó los mas elevados niveles de actividad en hoja, sin embargo, esta combinación no tuvo una influencia positiva sobre la reducción de la severidad de los síntomas causados por este patógeno.

Los resultados de la determinación de la actividad quitinasa en las raíces de las plantas sanas y de las que fueron enfrentadas a *A. solani* se muestran en la figura 21A. En este grupo no se obtuvieron diferencias entre los tratamientos con relación al control absoluto, a excepción de la sistemina, la cual en las plantas testigo mostró un incremento de actividad (482.78 pKat.mg⁻¹ proteína). A pesar de ello en este grupo fue donde se obtuvieron los mayores niveles para esta enzima.

En las plantas enfrentadas a *P. nicotianae* se pudo observar la misma respuesta obtenida por el grupo anterior, aunque con niveles de actividad más bajos que los de las plantas sanas (figura 21B).

La cuantificación de la actividad de estas enzimas en las hoja reveló que se obtuvieron diferencias significativas entre los tratamientos, en las plantas testigo (figura 22A). En la variante de la combinación de *G. fasciculatum* con la sistemina (Gf/S) se alcanzaron los valores mas bajos, los que mostraron diferencias estadísticamente significativas con el controles micorrizados con *G. clarum*.

La inoculación de las plantas con *A. solani* produjo un incrementó generalizado de la actividad quitinasa con relación a las plantas sanas, en las que no se observó diferencias estadísticas entre los tratamientos. Se destacó la combinación de *G. clarum* con la sistemina

(Gc/S) ($276.6 \mu\text{pKat.mg}^{-1}$ proteína) que mostró un 339.77 % de incremento con relación a su homólogo sin enfrentar al patógeno, seguido por la aplicación conjunta de *G. fasciculatum* y la sistemina (Gf/S) ($245.39 \text{pKat.mg}^{-1}$ proteína).

Los resultados de la cuantificación de esta enzima en las plantas donde se aplicó *P. nicotianae* se muestran en la figura 22B, en las cuales los tratamientos no mostraron diferencias estadísticas, con niveles inferiores a los de las plantas enfrentadas a *A. solani*.

Al realizar un análisis global de la cuantificación de las quitinasas en las plantas que fueron enfrentadas a los diferentes patógenos, se pudo observar que los tratamientos en estudio produjeron cambios en su inducción, en las hojas. En el grupo de plantas enfrentadas a *A. solani* se obtuvo un incremento en hoja con relación a las plantas sin enfrentar, lo cual es un resultado a esperar pues este es un patógeno foliar.

Debido a su capacidad de hidrolizar quitina, las quitinasas pueden degradar parcialmente la pared fúngica y por ende inhibir el crecimiento de hongos patógenos (Agrios, 2005) por esta razón estas enzimas han sido ampliamente estudiadas en diferentes interacciones planta-patógeno. Sin embargo, con relación a los tratamientos en el grupo de plantas inoculadas con *A. solani* ninguno produjo incrementos de la actividad, por lo cual, esta enzima de forma independiente no logra explicar la respuesta que se observó sobre la reducción de la severidad del Tizón temprano cuando se aplicó la sistemina.

La inducción de quitinasas podría ser uno de los mecanismos por los cuales esta variedad manifiesta una resistencia intermedia ante *A. solani* (grado 3), si se tiene en cuenta que se alcanzaron valores superiores al observado en las testigo. La expresión constitutiva de genes que codifiquen para esta PR es una de las estrategias propuestas para obtener un nivel amplio y durable de resistencia a diferentes hongos patógenos (Solórzano, 2002).

En el grupo de plantas que se enfrentaron a *P. nicotianae*, la actividad de la quitinasa no se vio alterada por la influencia del patógeno, resultados que son consistentes si se tiene en cuenta que la pared de los Oomycetes contiene muy bajo contenido de quitina (Barnicki-García, 1968). Contrario a los resultados observados en este experimento, Salzer y col., (2000) informaron la expresión de ocho genes diferentes de quitinasa, miembros de cinco clases de esta enzima, en raíces del *Medicago truncatula* micorrizadas con *Glomus*

intraradice. En dicho trabajo encontraron que los patógenos *Phytophthora megasperma* y *Fusarium solani* produjeron el incremento de la expresión de quitinasas de las clases I, II, y IV, las cuales no se observaron en las plantas micorrizadas.

Al analizar de forma conjunta la cuantificación de la actividad en ambas proteínas PRs, en las plantas que no se enfrentaron a los patógenos, se encontró una inducción en el tiempo en las plantas controle, tanto en raíz como en hoja. Este resultado coincidió con el nivel basal de estas enzimas observado y discutido con anterioridad, lo que corrobora lo informaron por Collinger y col., (1993).

4.3.2.3.2. Determinación de la actividad de peroxidasas

En la figura 23A se presenta la cuantificación de la actividad peroxidasa en las raíces, en el grupo de las plantas sanas, donde se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos. En las variantes micorrizadas con *G. fasciculatum* fue donde se observó los niveles más elevados, los que mostraron diferencias significativas con el resto de los tratamientos.

Contrario a lo observado, en el grupo de plantas que se enfrentaron a *A. solani* los mayores niveles de actividad se alcanzaron con la aplicación de la sistemina, de forma independiente, la que mostró diferencias significativas con todos los tratamientos, seguido por las plantas micorrizadas con *G. fasciculatum*. Es importante señalar que el nivel más bajo de severidad del Tizón temprano se alcanzó en la variante donde se aplicó el elicitor de forma independiente, por lo que los resultados en estas variante resulta interesante, mas si se tiene en cuenta que este es un patógeno con incidencia foliar.

En las plantas inoculadas con *P. nicotianae* se obtuvieron valores de actividad superiores a los obtenidas en las plantas sanas (figura 23B). En este caso, tanto la sistemina como su combinación con *G. clarum* (Gc/S) mostraron niveles más bajos que los alcanzados por el control absoluto, con diferencias estadísticamente significativas.

La cuantificación de la actividad enzimática de las enzimas peroxidasas en hojas se muestra en la figura 24. En las plantas sanas (figura 24A) se destacan las variantes micorrizadas en las que se obtuvo los mayores valores con similitud estadística entre ellas, a excepción de la combinación de *G. fasciculatum* con la sistemina, la cual mostró los valores más bajos.

En las plantas que se enfrentaron a *A. solani* se destacó el tratamiento del control de *G. clarum* (C-Gc), seguido por el grupo de plantas donde se aplicó la sistemina de forma independiente y su combinación de *G. fasciculatum* (Gf/S). Estos últimos produjeron porcentajes de incremento de 107.9% y 98.65%, respectivamente, con relación al control inoculado y enfrentado al patógeno.

Este resultado es interesante, pues en la variante donde se aplicó el elicitor de forma independiente fue en la que se produjo la reducción de la afectación por este patógeno en dos grados, por lo que es posible que la peroxidasa participe en la obtención de la protección contra esta enfermedad, inducida por la sistemina, sin embargo, no puede explicar la respuesta observada en la combinación de *G. clarum* con la sistemina (Gc/S).

En el grupo de plantas inoculadas con *P. nicotianae* (figura 24B) se observó que las variantes en estudio produjeron una depresión de la actividad con relación al control inoculado. Sin embargo, en este grupo se cuantificaron mayores niveles que los observados en el testigo, con porcentajes de incremento de 316.13% (control inoculado) y 148.31% (Gc/S), con relación a sus homólogos en las plantas sanas. El resto de las variantes mostraron entre 41.98% y 125.17%.

La cuantificación de la actividad de esta enzima en hojas demostró una vez más que los tratamientos fueron capaces de activar los mecanismos de respuesta sistémica, ya que los inductores fueron aplicados en las raíces, lo cual puede resultar importante en la protección ante *A. solani*, por ser este órgano su blanco de ataque.

Ante la presencia de un patógeno se inducen una serie de respuestas rápidas que incluyen la liberación de proteínas estructurales insolubles provenientes de la pared celular, proceso que es catalizado por la enzima peroxidasa, en la presencia de H₂O₂, la cual es regulada a nivel transcripcional y post-transcripcional (Lambais, 2000).

Asociada a esta interacción se ha observado la ocurrencia de un proceso que conlleva a la activación de las vías oxidativas con la formación de especies activas de oxígeno (AOS), como el peróxido de hidrógeno (Davies y col., 2006, Demidchik y col, 2003, Mori y Schroeder, 2004). Jones y Dangl, (2006) han planteado la participación de la HR en la resistencia ante este patógeno, vinculada con la activación de la enzima peroxidasa y la producción de especies activas de oxígeno (Davies y col., 2006).

Estas enzimas catalizan, además, la polimerización oxidativa de los fenilpropanoides al producir la liberación de lignina, la que se encuentra involucrada en el entrecruzamiento de las proteínas de la pared celular, durante la penetración fúngica (Lambais, 2000). Ante el ataque por patógenos, estas modificaciones producen el reforzamiento de las paredes celulares y de esta forma las hacen resistentes a la acción de las enzimas hidrolíticas de origen microbiano (Brisson y col., 1995).

Las plantas infectadas por microorganismos logran limitar su diseminación en el tejido vegetal mediante este mecanismo, restringiéndolo a la célula hospedante, en la cual se induce la muerte celular hipersensible (Penninckx, 1998). Este fenómeno no se produce durante la micorrización, pues el establecimiento del HMA en las raíces no se ve afectado, lo cual corrobora su condición de simbiote.

Un resultado contradictorio fue el observado en la cuantificación de la actividad de esta enzima en las plantas retadas con *A. solani*, en las cuales no existió una correspondencia entre estos resultados y los obtenidos en la evaluación de la severidad del tizón temprano. La aplicación de la sistemina de forma independiente produjo la reducción de la necrosis foliar en dos grados, sin embargo se obtuvieron niveles intermedios de actividad peroxidasa.

Se plantea que la enfermedad causada por microorganismos potencialmente parasíticos ocurre cuando ellos son capaces de evadir la defensa constitutiva y eluden la activación de la respuesta inducida en el tejido infectado o inhiben la inducción de estas repuestas mediante la secreción de toxinas metabólicas u otros factores necrotizantes (Jackson y Taylor, 1996; Knogge, 1996). Las especies de *Alternaria* son capaces de producir diferentes toxinas mediante las cuales pueden eludir los mecanismos de defensa y causar la enfermedad (Scott, 2001; Thomma, 2003).

La inducción de esta enzima tuvo como objetivo no solo circunscribir al patógeno al sitio de infección, como se observó en las plantas enfrentadas a *P. nicotianae* (grado tres de marchitez), sino también de preparar a la planta para evitar la infección por patógenos en zonas alejadas al sitio de inducción, como fue el caso de *A. solani*. En este último se produjo el incremento de la actividad en hoja con la aplicación de la sistemina, la variante

donde se obtuvo reducción de los síntomas de las enfermedades producidos por estas plagas.

En el presente estudio se produjo un incremento en la actividad de esta enzima en las plantas que fueron enfrentadas a *P. nicotianae* en raíz, lo cual es consistente con el hecho de que este es un patógeno radical, aunque no se observó una correspondencia entre la actividad y la reducción del tizón tardío.

Santos y col (2001) estudiaron los patrones de peroxidasa y no encontraron isoformas diferenciales de la micorrización. De forma general, se ha observado que el patrón de expresión de las peroxidases en varios cultivos durante el desarrollo de las MA es muy similar al observado para las quitinasas, con una inducción transiente, seguida por la supresión de la actividad (Dumas-Gaudot, 1998, citado por Dumas-Gaudot y col., 2000; Lambais, 2000).

En nuestro caso, a pesar de alcanzarse porcentajes de colonización inferiores, se observó una respuesta sistémica con relación a la incidencia de *A. solani*, que se manifestó en la inducción de peroxidasa foliar. Se comprobó además que la enzima β -1,3-glucanasa no participa en los mecanismos de defensa contra este patógeno, tal y como ha sido informado por otros autores.

De forma general, se observó la ocurrencia de una respuesta diferencial ante cada patógeno, con relación a los sistemas enzimáticos estudiados, lo cual está dado por poseer diferentes modos de infección y producción de la enfermedad. Los patógenos inducen diferentes cascadas de transducción de señales con la participación de hormonas diferentes, *A. solani* con AJ y etileno y *P. nicotianae* con AS.

En este experimento se observó un efecto sinérgico entre el elicitor y los HMA, manifestado sobre la severidad de la enfermedad, al producir la reducción de la misma. La interacción con *G. clarum* resultó ser mejor con relación a *A. solani* mientras que ante *P. nicotianae* lo fue *G. fasciculatum*. Este HMA tuvo, de forma general, un buen comportamiento sobre la reducción de las enfermedades causadas por ambos patógenos.

El empleo de la sistemina de forma independiente produjo una reducción importante (dos grados) de la severidad del Tizón temprano.

Se encontró que en ninguno de los tres sistemas enzimáticos existió correspondencia entre los incrementos de actividad enzimática y el resultado de la severidad de las enfermedades, por lo que no pueden ser empleados para caracterizar estas interacciones.

5. DISCUSION GENERAL

En la agricultura moderna existe la tendencia creciente del uso de los bioproductos con fines diversos. Las micorrizas arbusculares han sido ampliamente utilizadas en la búsqueda de tecnologías orgánicas, ya que permiten la sustitución de fertilizantes químicos sin producir afectación de los niveles de productividad.

En las últimas décadas investigadores y productores de diversos países han trabajado en el manejo de plagas de importancia económica por los daños que estos causan en los cultivos. Dentro del mismo se presta atención al uso de controles biológicos y de bioproductos que permiten mejorar las respuestas ante estrés bióticos y abióticos.

Las micorrizas aunque no actúan directamente sobre las plagas, son de gran utilidad, debido al impacto ecológico positivo que produce su aplicación (Rivera, 2003). Estos hongos, crean un nicho en las raíces de las plantas que favorece el desarrollo de grupos microbianos diversos, que colaboran en el desarrollo del ecosistema, a este nivel. Por otra parte, sensibilizan a la planta mediante la activación de diferentes respuestas de defensa, las que pueden ser potenciadas por elicitores diversos, como por ejemplo la sistemina, como se logró demostrar en el presente trabajo.

Por primera vez a nivel mundial se estudió la acción conjunta de los HMA y la sistemina en plantas de tomate, no existiendo antagonismo entre ellos. Se obtuvo un buen desarrollo vegetativo y los tratamientos permitieron y promovieron la colonización micorrízica, tanto en estadios tempranos (dos a ocho días de germinadas las plantas), como en las fases más avanzadas (24 días). Se alcanzaron niveles de micorrización elevados si se comparan con los informados por diferentes autores (Rodríguez y col., 2004), los que fueron incrementados con la aplicación de la sistemina.

El estudio de tres sistemas enzimáticos relacionados con los mecanismos de defensa en las plantas demostró que ellos fueron inducidos de forma local, en raíz, los que mostraron una respuesta diferencial con relación al proceso de establecimiento de la simbiosis MA. De forma general, las enzimas β -1,3-glucanasas y quitinasas mostraron los mayores niveles de actividad en etapas tempranas en raíz, mientras que las peroxidasas lo fueron en estadios tardíos.

En los tratamientos control se detectaron niveles basales de las enzimas PR-2 y PR-3, desde la primera hora de evaluación hasta los 24 días, lo cual corrobora lo descrito por otros autores en relación con su vínculo a otros procesos metabólicos, como la diferenciación celular (Vázquez-Garcidueñas y col., 1998; Bisseling, 1999).

La aplicación de la sistemina en las raíces promueve dos tipos de respuestas relacionadas con las actividades de las enzimas β -1,3-glucanasas y quitinasas, una transitoria temprana en raíz que coincide con la expresión de una isoforma adicional de β -1,3-glucanasa, ligeramente ácida (pI 6.2) y otra tardía, a los 24 días posteriores a su aplicación. Estos resultados corroboran el carácter sistémico de las respuestas inducidas por este elicitor informada por Schillmiller y Howe (2005).

En el presente trabajo se observa un efecto sinérgico interesante entre *G. clarum* y la sistemina, que se manifestó sobre la actividad de las proteínas PRs en raíz. Este efecto se observó durante los primeros días de haber germinado las plantas, tanto en los niveles de actividad, como en los patrones isoenzimáticos. Con relación a la enzima β -1,3-glucanasa se indujo una isoforma ácida (pI 4.0) a los seis días y en las peroxidasas como una isoenzima adicional a los 12 días, con diferencias, además en los niveles de intensidad. Al parecer este sinergismo está influenciado por las respuestas que son inducidas por el péptido y alguno de los componentes que participan en los eventos de reconocimiento, durante las primeras fases del establecimiento de la simbiosis MA.

Como se conoce, la sistemina, luego de su reconocimiento por el receptor, produce la activación de una cascada de señales que conllevan a la síntesis de AJ (Scheer y Ryan, 1999, citado por Scheer y Ryan, 2002), el cual tiene una estrecha relación con el etileno, al producir su modulación. Estudios de los genes PRs demuestran que múltiples vías de señales cooperan para dar una respuesta de defensa, en las cuales participan las hormonas AS, AJ y etileno. Ellas responden con la activación de señales de alarma específicas después del ataque del patógeno, que varían en intensidad y composición, resultando en la activación diferencial de genes relacionados con la defensa (Rojo y col., 2003). Se ha informado que las vías de señalización donde participan el AS y el AJ podrían ser comunes, lo cual permitiría su modulación (García-Brugger y col., 2006).

En el presente trabajo de tesis se encontró que en las plantas inoculadas con *G. clarum* se produjo un incremento transiente de la actividad peroxidasa a los 12 días, la que estuvo muy relacionada con el aumento de los indicadores de la colonización micorrízica. Se ha informado que en las plantas micorrizadas se produce la acumulación de AS, el que se encuentra relacionado con actividad de esta enzima en los primeros estadios de la formación de la simbiosis (Blilou y col., 2000). Estos resultados evidencian la importancia de esta hormona y de las especies activas de oxígeno como segundos mensajeros en la asociación MA, como ha sido informado por García-Garrido y Ocampo (2002).

De forma similar a lo que ocurre con la acumulación de β -1,3-glucanasa y quitinasa, se ha observado la presencia de peróxido en las células que contiene arbusculos, lo que sugiere que el control de la diseminación del hongo micorrizógeno intracelularmente está asociado con la explosión oxidativa. Este fenómeno localizado puede también explicar la inducción de la acumulación de transcriptos relacionados con la defensa en estas células o en su vecindad inmediata (Lambais y col., 2003).

Esta diferencia en la expresión de peroxidasa inducida por la aplicación combinada del hongo micorrízico arbuscular y el elicitor no había sido informada con anterioridad para el cultivo del tomate. Rodríguez y col. (2003) estudiaron el patrón de expresión de seis HMA y encontraron que plantas micorrizadas con *G. clarum* y *G. fasciculatum* mostraron la presencia de una sola isoforma, que se manifestó a los dos y tres meses posteriores a la inoculación de los mismos.

El papel del JA durante la micorrización no ha sido esclarecido aún, aunque se informa que su aplicación en hojas promueve la colonización por los HMA y el desarrollo de los arbusculos, mientras que el etileno a bajas concentraciones es capaz de estimular la germinación de las esporas y el crecimiento hifal de HMA (Ludwig-Müller, 2000). Estos resultados explican porque la aplicación de la sistemina promovió el desarrollo de las estructuras fúngicas, a partir de los 12 días. El etileno es una hormona poco estudiada en la simbiosis micorrízica arbuscular, sin embargo se conoce que participa en la inducción de β -1,3-glucanasas y quitinasas en plantas durante la infección con patógenos.

Al realizarse el enfrentamiento con los patógenos *A. solani* y *P. nicotianae* se observa que los HMA aplicados de forma independiente no tuvieron influencia sobre la severidad de las enfermedades causadas por estos patógenos. Sin embargo cuando se combinaron con la sistemina se obtiene un efecto diferencial dado por la especie de hongo micorrizógeno. La acción conjunta de *G. clarum* con el elicitor produjo la reducción de la necrosis producida por *A. solani* en un grado, mientras que ante *P. nicotianae* el mejor resultado se obtuvo en la combinación con *G. fasciculatum*.

Estos resultados sugieren, que los mecanismos responsables de la resistencia inducida por estos HMA antes estos patógenos son diferentes, los cuales con los trabajos informados por otros autores no logran ser explicados.

Son pocos los trabajos que relacionan la influencia de diferentes especies de HMA sobre la inducción de proteínas de defensa y su efecto bioprotector contra patógenos (Pozo y col, 2002). Rodríguez y col., (2004) encontraron una respuesta diferencial en las plántulas de tomate con relación a la inducción de PR-2 y PR-3, que estuvo en función de la especie de HMA, donde se destacó *G. fasciculatum* como la más efectiva.

Pozo y col. (2002) estudiaron la influencia de dos hongos micorrizógenos sobre la inducción de respuestas de defensa en tomate (*L. esculentum*) inoculado con *Phytophthora nicotianae* y encontraron que *G. mosseae* fue más efectiva en la reducción de los síntomas producidos por la infección con este patógeno que *G. intrarradices*, lo que se evidenció en la inducción de mecanismos locales y sistémicos que podrían ser los responsables del efecto bioprotector.

Rodríguez y col., (2004) encontraron, además, en las plántulas de tomate una respuesta diferencial en función de la especie de HMA con relación a la inducción de β -1,3-glucanasa y quitinasa, donde se destacó *G. fasciculatum* como la más efectiva. De forma similar Gao y col., (2004) encontraron diferencias en la expresión de los genes que codifican para estas enzimas al estudiar seis hongos micorrizicos pertenecientes a *Glomus* y *Acaulospora*.

Existen diferentes evidencias descritas en la literatura que podrían explicar el sinergismo observado entre la sistemina y los HMA, con relación a la obtención de respuestas de defensa de las plantas, en particular la acción coordinada del AJ y el etileno y el AS,

aunque es posible que además, participen otros componentes involucrados en las vías de señalización a partir del reconocimiento de las micorrizas y la sistemina en la planta. Tanto el AJ como el AS participan en la respuesta hipersensitiva que se produce contra los patógenos, con la consecuente expresión de proteínas PRs (Peña-Cortés y col., 2005). Los estudios genéticos en *Arabidopsis* han hecho posible la identificación de numerosos genes involucrados en las vías del AJ, el etileno y el AS, las cuales posiblemente estén interconectadas entre ellas (Lorrain y col, 2003). Se ha informado que las respuestas de defensa dependiente de AS son más efectivas contra un amplio espectro de patógenos (Ricci, 1997, citado por García-Brugger y col., 2006).

La aplicación de la sistemina de forma independiente indujo una respuesta diferencial para cada patógeno estudiado, produciendo una disminución de la severidad de la enfermedad en las plantas infectadas con *A. solani*, mientras ante *P. nicotianae* produjo un incremento de la susceptibilidad. Se plantea que las respuestas de defensa pueden ser adaptadas según el patógeno en cuestión, las dependientes de AS cuando se trata de un biótrofo (*P. nicotianae*) y las dependientes de AJ y etileno cuando el ataque es producido por un necrótrofo (*A. solani*) (Glazebrook, 2005; García-Brugger y col., 2006). Se conoce que el AJ es un elemento importante de la vía de transducción de señales, inducida por el elicitor lo que puede explicar la respuesta observada ante el Tizón temprano.

Se conoce que la sistemina es transportada a nivel de floema (Schaller, 1999), donde activa la liberación de nueva sistemina endógena a partir de su precursor, la prosistemina (McGurl y col., 1992), lo cual es posible ocurran también cuando se aplica en las raíces. Este proceso puede ser el responsable de la respuesta sistémica que se ha observado con relación a la protección contra *A. solani*.

Los estudios genéticos en *Arabidopsis* han hecho posible la identificación de numerosos genes involucrados en las vías del AJ, el etileno y el AS, las cuales posiblemente estén interconectadas entre ellas (Lorrain y col, 2003). Las respuestas de defensa pueden dispararse en la resistencia sistémica adquirida duradera la cual es dependiente de AS y es efectiva contra un amplio espectro de patógenos (Ricci, 1997, citado por García-Brugger y col., 2006).

Se encontró que en las plantas inoculadas con los patógenos se produjo un incremento de la actividad peroxidasa que se relacionó con el órgano diana (*A. solani*, en hoja y *P. nicotianae* en raíz). Sin embargo, no se encontró correspondencia entre los incrementos de actividad enzimática y el resultado de la severidad de las enfermedades, por lo que no pueden ser empleados para caracterizar estas interacciones. No son abundantes los trabajos que profundizan en el análisis integral de la inducción de proteínas de defensa y los síntomas causados por patógenos (Lawrence y col. 1999 y Solórzano, 2002).

De forma general, los elementos básicos que aporta el presente trabajo sobre el empleo de estos bioproductos puede resultar de gran utilidad en la agricultura, pues han mostrado tener una influencia positiva en la inducción de respuestas de defensa local en las plantas de tomate, con una reducción de la severidad de las enfermedades causadas por dos de los principales patógenos que afectan a este cultivo.

Los resultados de esta tesis constituyen el primer informe mundial de la interacción tomate-micorrízica arbuscular-sistemina, así como de su influencia sobre proteínas relacionadas con la patogénesis y la reducción de las enfermedades producidas por *A. solani* y *P. nicotianae*.

Constituyen los primeros experimentos en que se realizó la aplicación del elicitor en las plantas vía raíz con un efecto determinado, lo que implica que en este órgano debe existir un receptor, el que podría ser la propia proteína SR 160 identificada en hoja (Scheer y Ryan, 2002) u otra diferente, aspecto este que debe ser esclarecido en futuras investigaciones

Los resultados obtenidos en esta tesis se insertan dentro de las investigaciones priorizadas que se realizan en el país con vistas a mejorar el potencial de algunos bioproductos que se emplean en la agricultura. Actualmente las micorrizas han sido ampliamente aplicadas como biofertilizantes pero pueden también ejercer un efecto protector sobre diferentes enfermedades que afectan el cultivo del tomate, a partir de su uso combinado con elicitores como la sistemina, lo cual debe ser evaluado en condiciones de parcela experimental y de producción en futuras investigaciones.

El uso de elicitores en la práctica agrícola ha tomado mucho auge en la última década, los cuales han sido empleados con objetivos diversos. La sistemina constituye uno de los inductores con grandes posibilidades de ser aplicados en la búsqueda de la protección contra patógenos. Se aplica a muy bajas concentraciones (Ryan, 2000; Orozco-Cárdenas y col., 2001), además, puede ser aplicado unido a otro producto mediante la metodología del recubrimiento de semillas o por fertirriego, lo cual permite ser utilizado a gran escala.

Su empleo de forma conjunta con las micorrizas arbusculares, permitirían obtener un nuevo producto con grandes potencialidades como biofertilizante y en la protección contra patógenos diversos.

Este trabajo establece las bases para futuras investigaciones a nivel molecular que permitan caracterizar mejor el proceso de defensa inducidos por los HMA y por la sistemina, así como estudios a nivel de parcela experimental y de campo, con vistas a determinar su posible aplicación en la práctica agrícola.

6. CONCLUSIONES

1. La aplicación exógena de sistemina en raíces de plantas de tomate de la variedad “Amalia” potenció el proceso de colonización del hongo micorrizógeno *Glomus clarum* de acuerdo al porcentaje de colonización y de densidad visual.
2. La micorrización de plantas de tomate con *Glomus clarum*, la aplicación de la sistemina y su combinación provocó una respuesta diferencial de proteínas relacionadas con la patogénesis durante el proceso de establecimiento de la simbiosis. Las actividades enzimáticas de β -1,3-glucanasa y quitinasa fueron superiores a nivel local (radical) y sistémico (hojas) en etapas tempranas.
3. La aplicación combinada de los HMA y la sistemina provocó la reducción de la severidad de enfermedades en *Solanum lycopersicum* L, con un efecto diferencial, de acuerdo a la especie de hongo micorrizógeno y del patógeno. La combinación con *G. clarum* fue la más efectiva con *A. solani*, mientras que para *P. nicotianae* el mejor resultado se obtuvo con *G. fasciculatum*.
4. La sistemina *per se* tuvo un efecto positivo sobre la disminución de la afectación por el Tizón temprano pero incrementó la severidad del daño en las plantas inoculadas con *P. nicotianae*.
5. No existió correspondencia entre los resultados de la evaluación de los síntomas y las actividades de β -1,3-glucanasa, quitinasa y peroxida en la variedad de tomate “Amalia”, por lo que al parecer estas enzimas, no parecen estar involucradas de forma independiente con los mecanismos defensivos frente a la infección por *A. solani* y *P. nicotianae*, en ninguno de los tratamientos estudiados.
6. Se logró detectar los estadios iniciales del establecimiento de la simbiosis micorrícica, los que ocurrieron entre las 24 y 48 horas.

RECOMENDACIONES

1. Profundizar a nivel molecular el estudio de la interacción micorriza arbuscular-sistemina, en la búsqueda de la expresión de genes relacionados con la defensa, en las diferentes fases del proceso de establecimiento de la simbiosis y en la protección contra patógenos radicales y foliares.
2. Evaluar la factibilidad técnica y económica del empleo de los HMA y la sistemina en condiciones de parcela experimental y de producción, con vistas a ser empleados en la reducción de la incidencia de *A. solani* y *P. parasitica*, dentro del manejo de las plagas en el cultivo del tomate.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Agrios, G.N. Plant Pathology. Fifth edition. Academic Press. San Diego. 2005.
2. Alexander, T., Meier, R., Toth, R., Weber H.C. Dynamics of arbuscule development and degeneration in mycorrhizas of *Triticum aestivum* L. and *Avena sativa* L. with reference to *Zea mays* L. New Phytologist. 1988. Vol. 110 (3): 363-370.
3. Alvarez, M, Moya, C., Domini, M.E., Arzuaga, J., Matínez, B., Cuartero, J. "Amalia": A medium-fruit-size, Heat-tolerant tomato cultivar to tropical conditions. HortScience. 2004. 39(6): 1503-1504.
4. Alvarez, M. Comunicación personal. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, carr. Tapaste, Km. 3.5. Gaveta Postal 1. San José de las Lajas, La Habana, Cuba. C.P. 32700. 2007.
5. Alvarez, M., De Armas, G., Martínez, B. Informe de nuevas variedades. Amalia y Mariela, dos nuevas variedades de tomate de consumo fresco. Cultivos Tropicales. 1997. 18 (1): 83.
6. Andrews, J., Adams, S. R., Burton, K. S., Evered, C. E. Subcellular localization of peroxidase in tomato fruit skin and the possible implications for the regulation of fruit growth. J. Exp. Bot. 2002. 53: 2185-2191.
7. Artursson, V., Finlay, R.D., Jansson, J.K. Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and bacteria and their potential for stimulating plant growth. Environ. Microbiol. 2006. 9 (1): 1-10.
8. Bago, B., Azcón-Aguilar, C., Goulet, A., Piché, Y. Branched absorbing structures (BAS): a feature of the extraradical mycelium of symbiotic arbuscular mycorrhizal fungi. New Phytol. 1998. 139: 375-388.
9. Bago, B., Shachar-Hill, Y., Pfeffer, P.E. Dissecting carbon pathways in arbuscular mycorrhizas with NMR spectroscopy. En: Current Advances in Mycorrhizae Research. Section IV: Carbon metabolism and cost of arbuscular mycorrhizas. (eds) Podilla, G.K. y Douds, D.D. Jr. APS Press USA, 2000. p. 111-126.
10. Barea, J.M., Azcón-Aguila, C., Ocampo, J.A., Azcón, R. Morfología, anatomía y citología de las micorrizas arbusculares. En: Fijación y Movilización Biológica de Nutrientes. II. Fijación de N y Micorrizas. Madrid: CSIC, 1991. p.149-173.
11. Barnicki-Garcia, S. Cell wall chemistry, morphogenesis and taxonomy of fungi. Annu. Rev. Microbiol. 1968. 22: 87-108.
12. Barrer, S.J., Tagu, D. The roles of auxins and cytokinins in mycorrhizal symbiosis. J. Plant Growth Regul. 2000. 19: 144-154.

13. Barreto, A., Simón, P.J. Utilización de las isoenzimas como marcadores genéticos en *Saccharum*. Cultivos Tropicales. 1979. 1: 111-119.
14. Benedetto, A., Magurno, F., Bonfante, P., Lanfranco, L. Expression profiles of a phosphate transporter gene (*GmosPT*) from the endomycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. Mycorrhiza. 2005.15: 620-627.
15. Bergey, D., Ryan, C.A. Wound-and systemin-inducible calmodulin gene expression in tomato leaves. Plant Mol. Biol. 1999.
16. Birch, P.R.J., Whisson, S.C. *Phytophthora infestans* enters the genomics era. Molec. Plant Pathol. 2001. 2(5): 257-263.
17. Bisseling, T. The role of plant peptides in intercellular signaling. Curr. Opin. Plant Biol. 1999. 2: 365-368.
18. Blee, K.A., Anderson, A.J. Defense responses in plants to arbuscular mycorrhizal fungi. En: Current Advances in Mycorrhizae Research. Section II: Mycorrhizal fungi and plants defense. (eds) Podilla, G.K. y Douds, D.D. Jr. APS Press USA, 2000. p. 27-44.
19. Blilou, I., Ocampo, J.A., García-Garrido, J.M. Induction of *Ltp* (lipid transfer protein) and *Pal* (phenylalanine ammonia-lyase) gene expression in rice roots colonized by the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. J. Exp. Bot. 2000. 51: 1969-1977.
20. Boller, T. Chemoperception of microbial signals in plant cells. Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 1995. 46:189-214.
21. Boller, T., Gehri, A., Mauch, F., Vogeli, U. Chitinase in bean leaves: Induction by ethylene, purification, properties and possible function. Planta. 1983. 157: 22-31.
22. Bonanomi, A., Oetiker, J.H., Guggenheim, R., Boller, T., Wiemken, A., Vögeli-Lange, R. Arbuscular mycorrhizas in mini-mycorrhizotrons: first contact of *Medicago truncatula* roots with *Glomus intraradices* induces chalcone synthase. New Phytol. 2001. 150: 573-582.
23. Bonfante, P., Perotto, S. Outside and inside the roots: cell-cell interactions among arbuscular mycorrhizal fungi, bacteria and host plants. En: Current Advances in Mycorrhizae Research. Section V: Ultrastructural changes during mycorrhizal symbiosis. (eds) Podilla, G.K. y Douds, D.D. Jr. APS Press USA, 2000. p. 141-156.
24. Bonfante, P., Perotto, S. Strategies of arbuscular mycorrhizal fungi when infecting host plants. New Phytol. 1995. 130: 3-21.

25. Bonfante-Fasolo, P. The role of the cell wall as a signal in mycorrhizal associations. En: Cell to cell signals in plant, animal and microbial symbiosis. (eds) Scannerini S. Springer-Verlag. Berlin Heidelberg. 1988. p. 219-235.
26. Botella, M.A., Quesada, M.A., Medina, M.I., Pliego, F., Valpuesta, V. Induction of a tomato peroxidase gene in vascular tissue. FEBS Lett. 1994. 347:195-198.
27. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. Anal. Biochem. 1976. 73: 248-250.
28. Brisson, L.F., Tenhaken, R. y Lamb, C. Function of oxidative cross-linking of cell wall structural proteins in plants disease. Plant Cell. 1995. 6: 1703-1712.
29. Brownleader, M.D., Ahmed, N., Trevan, M., Martin, F., Chaplin, M.F., Dey, P.M. Purification and partial characterization of tomato extensin peroxidase. Plant Physiol. 1995. 109: 1115-1123.
30. Buée, M., Rossignol, M., Jauneau, A., Ranjeva, R., Bécard, G. The pre-symbiotic growth of arbuscular mycorrhizal fungi is induced by a branching factor partially purified from plant root exudates. Mol. Plant-Microbe Interact. 2000. 13: 693-698.
31. Castaño-Zacata, J., del Río Mendoza, L. Guía para el Diagnóstico y Control de Enfermedades en Cultivos de Importancia Económica. 3ra. Edición. Zamorano, Honduras: Zamorano Academic Press, 1994. 302p.
32. Código Internacional de Nomenclatura Botánica. [Consultado 16 de julio del 2008]. Disponible en: http://Código_Int_Nomen_Bot\Solanum_lycopersicum - Wikipedia, la enciclopedia libre.htm.
33. Collinger, D.B., Kragh, K.M., Mikkelsen, L.D., Nielsen, K.K., Rasmussen, U., Vad, K. Plant chitinases. Plant J. 1993. 3: 31-40.
34. Conconi, A., Miquel, M., Ryan, C.A. Changes in the intracellular lipid composition and free fatty acids of tomato leaves in response to wounding. Plant Physiol. 1996. 111: 797-803.
35. Corbera, J., Nápoles, M.C. Evaluación agronómica de la coinoculación de *Bradyrhizobium japonicum* y hongos micorrizógenos arbusculares en el cultivo de la soya sobre suelo ferralítico rojo compactado. Cultivos Tropicales. 2000. 21: 21-25.
36. Cordier, C., Pozo, M.J., Barea, J.M., Gianinazzi S., Gianinazzi-Pearson, V. cell defense responses association with localized and systemic resistance to *Phytophthora parasitica* induced in tomato by an arbuscular mycorrhizal fungus. Mol. Plant-Microbe. Interact. 1998. 11: 1017-1028.

37. Cordier, C., Trouvelot, A., Gianinazzi, S., Gianinazzi-Pearson, V. Arbuscular mycorrhiza technology applied to micropropagated *Prunus avium* and to protection against *Phytophthora cinnamomi*. *Agronomie*. 1996. 16:679-688.
38. Creelman, R.A., Mullet, J.E. Biosynthesis and action of jasmonate in plants. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 1997. 48: 355-381.
39. Dangl, J.L., Jones, J.D.G. Plant pathogens and interated defence responses to infection. *Nature*. 2001. 411 (14): 826-833.
40. David, R., Itzhaki, H., Ginzberg, I., Gafni, Y., Galili, G., Kapulnik, Y. Suppression of tobacco basic chitinase gene expression in response to colonization by the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *Mol. Plant-Microbe. Interact.* 1998. 11: 489-497.
41. Délano, J. P. Comunicación personal. Centro de Investigaciones y de Estudios Avanzados, Unidad Irapuato. K. 9.6, Libramiento Norte, Carr. Irapuato-León, A.P. 629, C.P. 36500, Irapuato, Gto. México. 2000.
42. Demidchik, V., Shabala, S.N., Coutts, K.B., Tester, M.A., Davies, J.M. Free oxygen radicals regulate plasma membrane Ca^{2+} -and K^{+} - permeable channels in plant roots cells. *J. Cell. Sci.* 2003. 116: 81-88.
43. Diedhiou, P.M., Hallmann, J., Oerke, E.C., Dehne, H.W. Effects of arbuscular mycorrhizal fungi and a non-pathogenic *Fusarium oxysporum* on *Meloidogyne incognita* infestation of tomato. *Mycorrhiza*. 2003. 13(4):199-204
44. Dillard, H.D., Cole, T., Hedges, A., Turner, D., Utete, B., Mvere, A., Wilkinson, P. Early Blight of Tomatoes. Zimbabwe. Horticultural Crops Pest. management. NYSAES, Geneva NY, 1995. 22 pp.
45. Douds, D.D. Jr., Nagahashi, G. Carbon partitioning cost, and metabolism of arbuscular mycorrhizas. En: *Current Advances in Mycorrhizae Research*. (eds) Podilla, G.K. y Douds, D.D. Jr. APS Press USA, 2000. p.107-130.
46. Dugassa, G.D., von Alten, H., Schönbeck, F. Effects of arbuscular mycorrhiza (AM) on health of *Linum usitatissimum* L. infected by fungal pathogens. *Plant Soil*. 1996. 185: 173-182.
47. Dumas-Gaudot, E., Asselin, A., Gianinazzi-Pearson, V., Gollotte, A., Gianinazzi, S. Chitinase isoforms in roots of various pea genotypes infected with arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Sci*. 1994. 99: 27-37.
48. Dumas-Gaudot, E., Gollotte, A., Cordier, C., Gianinazzi, S., Gianinazzi-Pearson, V. Modulation of host host defence systems. En. *Arbuscular Mycorrhizas: Physiology and*

- Function. (eds) Kapulnik Y. y Douds Jr. D.D. Kluwer Academic Publishers, 2000. p.173-200.
49. Durner, J., Shah, J., Klessig, D.F. Salicylic acid and disease resistance in plants. *Trends Plant Sci.* 1997. 2: 266-274.
 50. Eckardt, N.A. Insights into plant cellular mechanisms: of phosphate transporters and arbuscular mycorrhizal infection. *Plant Cell.* 2005. 17: 3213-3216.
 51. Falcón, A.B., Ramírez, M.A., Márquez, R., Hernández, M. Chitosan and its hydrolysate at tobacco-*Phytophthora parasitica* interaction. *Cultivos Tropicales.* 2002. 23: 61-66.
 52. FAOSTAT. [Consultado 17 de abril 2007]. Disponible en: <http://faostat.fao.org/>
 53. Farmer, E.E., Ryan, C.A. Octadecanoid precursors of jasmonic acid activate the synthesis of wound-inducible proteinase inhibitors. *Plant Cell.* 1992. 4: 129-134.
 54. Fernández, F., Gómez, R., Vanegas, L.F., Noval, B.M. de la, Martínez, M.A. Producto inoculante micorrizógeno. Oficina Nacional de Propiedad Industrial. Cuba, Patente No. 22641. 2000.
 55. Fernández, F., Rodríguez, E.L., Gómez, R. Caracterización de la efectividad de un nuevo inoculante micorrizógeno en poaceas. *Cultivos Tropicales.* 1999. 20: 9-14.
 56. Fernández, K., Fernández, F., González, M.E., Pérez, E., Mirabal, L., Pazos, M. Micorrización *in vitro* de plántulas de *Coffea canephora* var. Robusta: ¿Una realidad? *Cultivos Tropicales.* 2002. 23: 47-52.
 57. Fernández, F., Dell'Amico, J.M., Rodríguez, P. Efectividad de algunos tipos de inoculantes micorrizicos a base de *Glomus hoi* "like" en el cultivo del tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill. Var. Amalia). *Cultivos Tropicales.* 2006. 27 (3): 25-30.
 58. Ferrol, N.; Pozo, J.M.; Antelo, M; Azcón-Aguilar, C. Arbuscular mycorrhizal symbiosis regulates plasma membrane H⁺-ATPase gene expression in tomato plants. *J. Exp. Bot.* 2002. 53 (374): 1683-1687.
 59. Florido, M., Álvarez, M., Lara, R.M., Plana, D., García, A. Patrones electroforéticos de PO, Cat, SOD y proteínas totales en plántulas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) sometidas a estrés de temperaturas. *Cultivos Tropicales.* 2002. 23 (1): 45-48.
 60. Foreman, J., Demidchik, V., Bothwell, J.H.F., Mylona, P., Miedema, H., Torres, M.A., Linstead, P., Costa, S., Brownlee, C., Jones, J.D.C. Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. *Nature.* 2003. 422: 442-446.
 61. Fric, F. Review article: Oxidative enzymes. *Encyclopedia of Plant Physiol.* 1976. 4: 617-631.
 62. [Fritz, M.](#), [Jakobsen, I.](#), [Lyngkjaer, M.F.](#), [Thordal-Christensen, H.](#), [Pons-Kuhnemann, J.](#) Arbuscular mycorrhiza reduces susceptibility of tomato to *Alternaria solani*. *Mycorrhiza.*

2006. 16: 413-419.

63. Gadkar, V., David-Schwartz, R., Kunik, T., Kapulnik, Y. Arbuscular mycorrhizal fungal colonization. factors involved in host recognition. *Plant Physiol.* 2001. 127: 1493-1499.
64. Gao, L.L., Knogge, W., Delp, G., Smith, F.A., Smith, S.E. 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.* 2004. 17(10):1103-1113.
65. García-Garrido, J.M., Ocampo, J.A. Regulation of the plant defence response in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *J. Exp. Bot.* 2002. 53(373): 1377-1386.
66. Geil, R.G. Effects of exogenous ethylene on the formation of arbuscular mycorrhizae. Tesis presentada para optar por el grado de Maestro en Ciencias. Univ. Guelph, Canada. 2000.
67. Giovanetti, M., Mosse, B. An evaluation of techniques to measure vesicular-arbuscular infection in roots. *New Phytologist.* 1980. 84: 489-500.
68. Giovanetti, M. Spore germination and pre-symbiotic mycelial growth. E: Arbuscular mycorrhizas: Physiology and function. (eds) Kapulnik, Y. y Douds, D.D. Jr. Kluwer Academic Publishers, London, 2000. p. 47-68
69. Glazebrook, J. Contrasting mechanism of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 2005. 43: 1-23.
70. Gómez, L., Rodríguez, M. Evaluación de un esquema de rotación de cultivos para el manejo de *Meloidogyne* spp. en sistemas de cultivos protegidos. *Rev. Protección Veg.* 2005. 1: 67-69.
71. Gongala, N. Regulation of mycorrhizal infection by hormonal factors produce by hosts and fungi. *Experientia.* 1991. 47: 331-340.
72. González, C. Detección del polimorfismo genético mediante marcadores bioquímicos en plantas. En: Cornides, M.T. Marcadores moleculares, nuevos horizontes en la genética y la selección de las plantas. C. Habana, Editorial Félix Varela, 2002. p.36-66.
73. Govrin, E.M., Levine, A. The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. *Curr. Biol.* 2000. 10: 751-757.
74. Hahn, M.G. Microbial elicitors and their receptors. *Annu. Rev. Phytopathol.* 1996. 34: 387-412.
75. Hamilton, D.A., Hills, A., Köhler, B., Blatt, M.R. Ca²⁺ channels at the plasma membrane of stomatal guard cells are activated by hyperpolarization and abscisic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2000. 97: 4967-4972.
76. Harrier, L.A. The arbuscular mycorrhizal symbiosis: a molecular review of the fungal dimension. *J. Exp. Bot.* 2001. 52: 469-478.

77. Harrier, L.A., Watson, C.A. 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.* 2004. 149-57.
78. Harrison, M.J. Molecular and cellular aspects of the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 1999. 50: 361-389.
79. Harrison, M.J. Signaling in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Annu. Rev. Microbiol.* 2005. 59: 19-42.
80. Hause, B.; Maier, W.; Miersch, O.; Kramell, R.; Strack, D. Induction of jasmonate biosynthesis in arbuscular mycorrhizal barley roots. *Plant Physiol.* 2002. 130: 1213-1220.
81. Hause, B.; Fester, T. Molecular and cell biology of arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Planta.* 2005. 221: 184-196.
82. Hernández, M.I., Chailloux, M. Las micorrizas arbusculares y las bacterias rizosféricas como alternativa a la nutrición mineral del tomate. *Cultivos Tropicales.* 2004. 25: 5-12.
83. Hutcheson, S.N. Current Concepts of active defense in plants. *Ann. Rev. Phytopathol.* 1998. 36: 59-90.
84. Isayenkov, S.; Mrosk, C.; Stenzel, I.; Strack, D.; Hause, B. Suppression of allene oxide cyclase in hairy roots of *Medicago truncatula* reduces jasmonate levels and the degree of mycorrhization with *Glomus intrarradices*. *Plant Physiol.* 2005. 139: 1401-1410.
85. Jackson, A.O., Taylor, C.B. Plant-microbe interactions: life and death at the interface. *Plant Cell.* 1996. 8:1651-1668.
86. Jaizme-Vega, M.C., Tenoury, P., Pinochet, J., Jaumot, M. Interactions between the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* and *Glomus mosseae* in banana. *Plant Soil.* 1997. 196: 27-35.
87. Jerez, E., Barrosos, L., Cartaya, O. Efectos de períodos cortos de estrés e inoculación micorrizica en el comportamiento de la albahaca blanca (*O. basilicum* L.). *Cultivos Tropicales.* 2004. 25 (2): 29-35.
88. Jones, J.B., Jones, J.P., Stall, R.E., Zitter, T.A. Compendium of tomato diseases. American Phytopathological Society. St Paul, Minn, USA. 1993.
89. Jones, J.D.L., Dangl, J.L. The plant immune system. *Nature.* 2006. 444 (16): 323-329.
90. Judelson, H. The genetics and biology of *Phytophthora infestans*: Modern approaches to a historical challenge. *Fungal Genetic and Biology.* 1997. 22: 65-76.

91. Kalloo, G., Banerjee, M.K. Early blight resistance in *Lycopersicon esculentum* Mill. transferred from *L. pimpinellifolium* (L.) and *L. hirsutum* f. *glabratum* (Mill.). Gartenbauwissenschaft. 1993. 58: 238-240
92. Karandashov, V., Bucher, M. Symbiotic phosphate transport in arbuscular mycorrhizas. TRENDS Plant Sci. 2005. 10: 22-29.
93. Kessler, A., Baldwin, I.T. Herbivore-induced plant vaccination. Part I. The orchestration of plant defenses in nature and their fitness consequences in the tobacco *Nicotiana attenuata*. Plant J. 2004. 38: 639-649.
94. Knoogge, W. Fungal infection of plants. Plant Cell. 1996. 8: 1711-1722.
95. Kramadibrata, K., Walker, C., Schwarzott, D., Schussler, A. A new species of *Scutellospora* a with a coiled germination shield. Ann. Bot. 2000. 86: 21-27.
96. Lambais, M.R. Regulation of plant defense-related genes in arbuscular mycorrhizae. En: Current Advances in Mycorrhizae Research. Section II: Mycorrhizal fungi and plants defense. (eds) Podilla, G.K. y Douds, D.D. Jr. APS Press USA, 2000. p. 45-60.
97. Lambais, M.R., Ríos-Ruiz, W.F., Andrade, R.M. Antioxidant responses in bean (*Phaseolus vulgaris*) roots colonized by arbuscular mycorrhizal fungi. New Phytol. 2003. 160: 421-428.
98. Lara, R.M., Florido, M., Plana, D., Moré, O., González, M.E., Alvarez, M., Hernández, M.M. Isoenzymatic analysis for detecting *in vitro* variability and/or stability of economically important crops. Cultivos Tropicales. 2003. 24: 39-47.
99. Lawrence, C.B., Singh, N.P., Qiu, J., Gardner, R.G., Tuzun, S. Constitutive hydrolytic enzymes are associated with polygenic resistance of tomato to *Alternaria solani* and may function as elicitor release mechanism. Physiol Mol Plant Pathol. 2000. 57: 211-220.
100. Lee, G.I.; Howe, G.A. The tomato mutant *spr1* is defective in systemin perception and the production of a systemic wound signal for defense gene expression. Plant J. 2003. 33: 567-576.
101. Lévy, J.; Bres, C.; Geurts, R.; Chalhoub, B. ; Kulikova, O. ; Duc, G. ; Journet, E.P. ; Ané, J.M. ; Lauber, E. ; Bisseling, T. ; Dénarié, J.; Rosenberg, C.; Debelle, F. A putative Ca²⁺ and calmodulin-dependent protein kinase required for bacterial and fungal symbioses. Science. 2004. 303: 1361-1364.
102. [Li, H.Y.](#), [Yang, G.D.](#), [Shu, H.R.](#), [Yang, Y.T.](#), [Ye, B.X.](#), [Nishida, I.](#), [Zheng, C.C.](#) 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*. 2006. 47: 154-163.
103. Li, L., Li, C., Lee, G.I., Howe, G.A. Distinct roles for jasmonate synthesis and action in the systemic wound response of tomato. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2002. 99: 6416-6421.
104. [Lingua, G.](#), [D'Agostino, G.](#), [Massa, N.](#), [Antosiano, M.](#), [Berta, G.](#) Mycorrhiza-induced differential response to a yellows disease in tomato. *Mycorrhiza*. 2002. 12: 191-198.
105. Lovisolo, O., Hull, R., Rosler, O. Coevolution of viruses with hosts and vectors and possible paleontology. *Adv. Virus Res.* 2003. 62: 325-79.
106. Maiero, M., Bean, G.A., Ng, T.J. Toxin production by *Alternaria solani* and its related phytotoxicity tomato breeding lines. *Phytopathol.* 1991. 81: 1030-1033.
107. Market, C.L., Moller, F. Multiple form of enzyme. Tissue ontogenetic and species specific patterns. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1959. 5: 753-763.
108. Martínez, B., Bernal, A., Pérez, S., Muñiz, Y. Variabilidad patogénica de aislamientos de *Alternaria solani* Sor. *Rev. Protección Veg.* 2002. 17: 45-53.
109. McGurl, B., Pearce, G., Orozco-Cardenas, M., Ryan, C.A. Structure, expression and antisense inhibition of the systemin precursor gene. *Science*. 1992. 255: 1570-1573.
110. Minosky, P.V. Jasmonic acid and the establishment of arbuscular mycorrhizae. *Plant Physiol.* 2005. 139: 1097-1098.
111. Mohr, U., Lange, J., Boller, T., Wiemken, A., Vögeli-Lange, R. Plant defence genes are induced in the pathogenic interaction between bean roots and *Fusarium solani*, but not in the symbiotic interaction with the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *New Phytol.* 1998. 138: 589-598.
112. Morales, C., Román, M.I., Santana, N., Xiqués, X., González, C. Isoenzymatic characterization of somaclones of tomato (*Lycopersicon esculentum*, Mill). *Cultivos Tropicales*. 1999. 20: 45-48.
113. Mori, I.C., Schroeder, L.I. Reactive oxygen species activation of plant Ca²⁺ channels. A signaling mechanism in polar growth, hormone transduction, stress signaling and hypothetically mechanotransduction. *Plant Physiol.* 2004. 135: 702-708.
114. Morton, J.B., Benny, G.L. Revised classification of arbuscular mycorrhizal fungi (Zygomycetes): a new order, Glomales, two new suborders, Glomineae and Gigasporineae, and two new families, Acaulosporaceae and Gigasporaceae, with an amendment of Glomaceae. *Mycotaxon*. 1990. XXXVII: 471-491.

115. Moyen, C., Hammond-Kosack, K.E., Jones, J., Knight, M.R., Johannes, E. Systemin triggers an increase of cytoplasmic calcium in tomato mesophyll cells: Ca²⁺ mobilization from intra- and extracellular compartments. *Plant Cell Environ.* 1998. 21: 1101-1112.
116. [Nagesh, M.](#), [Parvatha, R. P.](#) Biochemical changes in *Glomus fasciculatum* colonized roots of *Lycopersicon esculentum* in presence of *Meloidogyne incognita*. [Indian J. Exp. Biol.](#) 2004. 42: 721-727.
117. Narváez-Vázquez, J., Ryan, C.A. The cellular localization of prosystemin: a functional role for phloem parenchyma in systemic wound signalling. *Planta.* 2004. 218: 360-369.
118. Nelson, D.L., Cox, M.M. *Lehninger Principles of Biochemistry*. Fourth edition. New York, Ed Worth Publishers, 2003.
119. O'Donnell, P.J., Calvert, C., Atzorn, R., Wasternack, C., Leyser, H.M.O., Bowles, D.J. Ethylene as a signal mediating the wound response of tomato plants. *Science.* 1996. 274: 1914-1917.
120. Orozco-Cárdenas, M.L., Narváez-Vázquez, J., Ryan, C. Hydrogen peroxide acts as a second messenger for the induction of defense genes in tomato plants in response to wounding, systemin, and methyl jasmonate. *Plant Cell.* 2001. 13: 179-191.
121. Ortiz, R., Fernández, F. Efectividad del recubrimiento de semilla de arroz pregerminado con inoculante micorrizógeno arbuscular (Ecomic). *Cultivos Tropicales.* 1998. 19(2):15-18.
122. Pan, S.Q., Ye, X.S., Kúc, J. Direct detection of β -1,3-glucanase isozymes on polyacrilamide electrophoresis and isoelectrofocusing gels. *Anal. Biochem.* 1989. 182: 136-140.
123. Pearce, G., Ryan C.A. Systemic signaling in tomato plants for defense against herbivores. Isolation and characterization of three novel defense-signaling glycopeptide hormones codes in a single precursor gene. *J. Biol. Chem.* 2003. 278: 30044-30050.
124. Peña-Cortés, H., Barrios, P., Dorta, F., Polanco, V., Sánchez, C., Sánchez, E., Ramírez, I. Involvement of jasmonic acid and derivatives in plant responses to pathogens and insects and in fruit ripening. *J. Plant Growth Regul.* 2005. 23:246-260.
125. Penninckx, I. Analysis of the signal transduction pathway leading to pathogen-induced activation of a plant defensin gene in *Arabidopsis thaliana*. Katholieke Universiteit Leuven. 1998. p.1-46.
126. Pérez, S. 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. 2003.

127. Peterson, R.L., Guinel, F.C. 2000. The use of mutants to study regulation of colonization by AM fungi. Physiology and function. (eds) Kapulnik, Y. y Douds, D.D. Jr. Kluwer Academic Publishers, London, 2000. p. 147-171.
128. Phillips, J.M., Hayman, D.S. Improve procedures for cleaning root and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infections. Transfer. Britanic. Micology Society. 1972. 55: 159-11.
129. Pitson, S.M., Servior, R.J., McDougall, B.M. Noncellulolytic fungal β -glucanases: their physiology and regulation. Enzyme Microb. Technol. 1993. 15:178-192.
130. Pozo, M. J. Inducción de enzimas hidrolíticas en raíces de tomate (*Lycopersicum esculentum*) como respuesta a la formación de M.A y su implicación en el control biológico de *P. parasítica*. Tesis Doctoral. Universidad de Granada. Facultad de Ciencias. 1999.
131. Pozo, M.J., Azcón-Aguilar, C., Dumas-Gaudot, E., Barea J.M. β -1,3-Glucanase activities in tomato roots inoculated with arbuscular mycorrhizal fungi and/or *Phytophthora parasitica* and their possible involvement in bioprotection. Plant Sci. 1999.141: 149-157.
132. Pozo, M.J., Cordier, C., Dumas-Gaudot, E., Gianinazzi, S, Barea J.M., Azcón-Aguilar, C. Localized versus systemic effect of arbuscular mycorrhizal fungi on defence responses to *Phytophthora* infection in tomato plants. J. Exp. Bot. 2002. 53: 525-534.
133. Pozo, M.J., Van Loon, L.C. y Pieterse, C.M.J. Jasmonates-signals in plant-microbe interactions. J. Plant Growth Regul. 2005. 23: 211-222.
134. Pulido, L.E., Cabrera, A., Medina, N. Biofertilization using rhizobacteria and AMF in the production of seedling tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill) and onion (*Allium cepa*) seedlings. II. Root colonization and nutritional status. Cultivos Tropicales. 2003. 24: 5-13. (a).
135. Pulido, L.E., Medina, N., Cabrera, A. 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. 2003 b. 24: 15-24. (b).
136. Read, D.J. Mycorrhiza-The state of the art. En: Mycorrhiza 2nd. (A. Varma y B. Hock, eds.). Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, p. 3-34, 1999.
137. Remy, W., Taylor, T.N., Hass, H., Kerp, H. Four hundred-million-year-old vesicular arbuscular mycorrhizae. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1994. 91: 11841-11843.

138. Rivera, R. Resultados de las campañas de validación En: Sistemas Agrícolas Micorrizados Eficientemente, una vía hacia la agricultura sostenible. Un estudio de Caso: el Caribe. Ed: Rivera, R., Fernández, K. Ediciones INCA, 2003. p.115-123.
139. Rodríguez, A.T., Ramírez, M.A., Falcón, A., Utria, E., Bautista, S. Estimulación de algunas enzimas en plantas de arroz (*Oriza sativa* L.) tratadas con un hidrolizado de quitosana. Cultivos Tropicales. 2006. 27: 87-91. (b).
140. Rodríguez, Y. Aspectos relacionados con las bases bioquímicas de la simbiosis micorrízica arbuscular. Cultivos Tropicales. 2005. 26: 11-19.
141. Rodríguez, Y. Caracterización bioquímica de la interacción entre hongos micorrízicos arbusculares y plántulas de tomate (*Lycopersicon esculentum* M. var. Amalia). Tesis para optar por el grado de Maestro en Ciencias. Fac. Biología. 2003.
142. Rodríguez, Y., Noval, B.M. de la, Ramírez, M.A., Rodríguez, P. Efecto de dos fuentes de quitina sobre la germinación, el crecimiento y desarrollo de plántulas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.). Cultivos Tropicales. 1998. 19: 11-13.
143. Rodríguez, Y., Noval, B.M. de la, Fernández, F., Rodríguez, P. Estudio comparativo del comportamiento de seis cepas de hongos micorrízicos arbusculares en su interacción con el tomate (*Lycopersicon esculentum* M. var “Amalia”) Ecol. Apl. 2004. V.3 (1-2).
144. Rodríguez, Y., Noval, B.M. de la, Pérez, E., Fernández, F. Peroxidase and polyphenoloxidase expression in *Sorghum bicolor* roots, inoculated with different arbuscular mycorrhizal fungus species. Cultivos Tropicales. 2003. 24: 23-28.
145. Rodríguez, Y., Pérez, E., Solórzano, E., Meneses, A.R., Fernández, F. Peroxidase and polyphenoloxidase activities in tomato roots inoculated with *Glomus clarum* or *Glomus fasciculatum*. Cultivos Tropicales. 2001. 22: 11-16.
146. Rodríguez, Y., Quiñones, Y., Hernández, M.M. Efecto de la inoculación con tres cepas de hongos micorrízicos arbusculares sobre la aclimatación de vitroplantas de papa (*Solanum tuberosum*). Cultivos Tropicales. 2006. 27: 19-24. (a).
147. Rojo, E., Solano, R., Sánchez-Serrano, J.J. Interactions between signaling compounds involved in plant defense. Plant Growth Regul. 2003. 22: 82-98
148. Ryan, C.A. The systemin signaling pathway: a differential activation of plant defensive genes. Bioch. Biophys. Acta. 2000. 1477: 112-121.
149. Ryan, C.A., Pearce, G., Scheer, J., Moura, D.S. Polypeptide hormones. Plant Cell. 2002. S251-S264.

150. Ryan, C.A., Pearce, G. Systemin, a polypeptide signal for plant defensive genes. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 1998.14: 1-17.
151. Salzer, P., Boller, T. 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, 2000. p.1-10.
152. [Salzer, P.](#), [Bonanomi, A.](#), [Beyer, K.](#), [Vogeli-Lange, R.](#), [Aeschbacher, R.A.](#), [Lange, J.](#), [Wiemken, A.](#), [Kim, D.](#), [Cook, D.R.](#), [Boller, T.](#) Differential expression of eight chitinase genes in *Medicago truncatula* roots during mycorrhiza formation, nodulation, and pathogen infection. [Mol. Plant Microbe Interact.](#) 2000. 13:763-777.
153. Santos, B.A., Maia, L.C., Cavalcante, U.M.T., Correia, M.T.S. y Coelho, L.C.B.B. Effect of arbuscular mycorrhizal fungi and soil phosphorus level on expression of protein and activity of peroxidase on passion fruit roots. *Braz. J. Bio.* 2001. 6 (4) versión on line.
154. Schaefer, S.C., Basic, K., Cammue, B., Broekaert, W., van Damme, E.J.M., Peumans, W.J., Korban, S.S. Enhanced resistance to early blight in transgenic tomato lines expressing heterologous plant defense genes. *Planta.* 2005. 222: 858-866.
155. Schaller, A. Oligopeptide signalling and the action of systemin. *Plant Mol. Biol.* 1999. 40: 763-769.
156. Schaller, A., Oecking, C. Modulation of plasma membrane H⁺-ATPase activity differentially activates wound and pathogen defense responses in tomato plants. *Plant Cell.* 1999. 11: 263-272.
157. Schaller, F.; Schaller, A.; Stintzi, A. Biosynthesis and metabolism of jasmonates. *J. Plant Growth Regul.* 2005. 23: 179-199.
158. Scheer, J.M., Ryan, C.A. A 160-kD systemin receptor on the surface of *Lycopersicon peruvianum* suspension culture cells. *Plant Cell.* 1999. 11: 1525-1535.
159. Scheer, J.M., Ryan, C.A. Jr. The systemin receptor SR160 from *Lycopersicon peruvianum* is a member of the LRR receptor kinase family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2002. 99: 9585-9590.
160. Schillmiller, A.L., Howe, G.A. Systemic signaling in the wound response. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2005. 8: 369-377.
161. Schüßer, A., Schawarzott, D., Walker, C. A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. *Mycol. Res.* 2001. 105: 1414-1421.
162. [Scott, P.M.](#) Analysis of agricultural commodities and foods for *Alternaria* mycotoxins.

[J.A.O.A.C. Int.](#) 2001. 84: 1809-1817.

163. Shaul, O., David, R., Sinvani, G., Ginzberg, I., Ganon, D., Wininger, S., Ben-Dor, B., Badani, H., Ovdad, N., Kapulnik, Y. Plant defence responses during arbuscular mycorrhiza symbiosis. En: Current Advances in Mycorrhizae Research. Section V: Ultrastructural changes during mycorrhizal symbiosis. (eds) Podilla, G.K. y Douds, D.D. Jr. APS Press USA, 2000. p.61-68.
164. Siqueira, J.O., Franco A.A. Biotecnología do solo, Fundamentos y perspectivas. Ministerio da Educacao, ADEAS, Luras: ESAL: FAEPE. 1988. 234p.
165. Solórzano, E., Meneses, A.R., Rodríguez, Y., Pérez, E., Fernández, A., Peteira, B., León, O. Inducción de cinco sistemas enzimáticos en la simbiosis tomate-micorriza arbuscular (MA). Rev. Protección Veg. 2001. 16 (1): 30-39.
166. Solórzano, E. 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. 2002.
167. Spanu P., Boller T., Ludwiwg A., Wiemken A., Faccio A., Bonfante-Fasolo P. Chitinase in mycorrhizal *Allium porrum*: regulation and localization. Planta. 1989. 177: 447-455.
168. 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* comparion plants colonized by *Glomus intraradices*. Can J. Bot. 1997. 75: 998-1005.
169. Staskawicz B.J., Ausubel F.M., Baker B.J., Ellis J.G., Jones J.D.G. Molecular genetics of plant disease resistance. Science. 1995. 268: 661-667.
170. Stennis, M.J., Chandra, S., Ryan, C.A., Low, P. Systemin potentiates the oxidatives burst in cultured tomato cells. Plant Physiol. 1998. 117: 1031-1036.
171. Sticher L., Mauch-Mani B., Métraux J.P. Systemic acquired resistance. Annu. Rev. Phytopathol. 1997. 35: 235-270.
172. Strack, D., Fester, T., Hause, B., Schliemann, W., Walter, M.H. Arbuscular mycorrhiza: biological, chemical, and molecular aspects. J. Chem. Ecol. 2003. 29: 1955-1979.
173. Stracke, S.; Kistner, C.; Yoshida, S.; Mulder, L.; Sato, S.; Kaneko, T.; Tabata, S.; Sandal, N.; Stougaard, J.; Szczglowski, K.; Parniske, M. A plant receptor-like kinase required for both bacterial and fungal symbiosis. Narure. 2002. 417 (27): 959-962.
174. Stratmann, J.W. Long distance run in the wound response-jasmonic acid is pulling ahead. Trends Plant Sci. 2003. 6: 247-250.

175. Stratmann, J.W., Ryan, C.A. Myelin basic protein kinase activity in tomato leaves is induced systemically by wounding and increases in response to systemin and oligosaccharide elicitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1997. 94: 11085-11089.
176. Sylvia, D.M., Fuhrmann, J.J., Hartel, P.G., Zuberer, D.A. (eds) Principles and Applications of Soil Microbiology. Prentice Hall, Upper Saddle River, N.J. Chapter III, 1998.
177. Talano, M.A., Agostini, E., Medina, M.I., Reinoso, H., Tordable, M.C., Tigier, H.A., de Forchetti, S.M. Changes in ligno-suberization of cell walls of tomato hairy roots produced by salt treatment: the relationship with the release of a basic peroxidase. *J. Plant Physiol.* 2006. 163: 740-749.
178. Templeton, M.D., Dixon, R.A., Lamb, C.J., Lawton, M.A. Hydroxyproline-rich glycoprotein transcripts exhibit different spatial patterns of accumulation in compatible and incompatible interactions between *Phaseolus vulgaris* and *Colletotricum lindemuthianum*. *Plant Physiol.* 1991. 94: 1265-1269.
179. Terry, E. Efectividad agronómica de biofertilizantes en el cultivo del tomate. Tesis presentada en opción al título académico de Maestro en Ciencias Agrícolas. ISCAH. 2001.
180. Thoma, I.; Loeffler, C.; Sinha, A.K.; Gupta, M.; Krischke, M.; Steffan, B.; Roitsch, T.; Mueller, M.J. Cyclopentenone isoprostanes induced by reactive oxygen species trigger defense gene activation and phytoalexin accumulation in plants. *Plant J.* 2003. 34: 363-375.
181. Thomma, B.P.H.J. *Alternaria* spp.: from general saprophyte to specific parasite. *Mol. Plant Pathol.* 2003. 4: 225-236
182. Tian, C.Y.; Feng, G.; Li, X.L.; Zhang, F.S. Different effects of arbuscular mycorrhizal fungal isolates from saline or non-saline soil on salinity tolerance of plants. *Appl. Soil Ecol.* 2004. 26: 143-148.
183. Tipton, K. Principles of enzymes assays and kinetic studies. In: *Enzymes assays: a practical approach*. PAS series. Eisenthal, R., Danson, M.J. (eds). Oxford Univ. Press, UK. 1993. pp. 1-58.
184. Toledo, 2003. Comunicación personal. Instituto de Investigaciones del Tabaco. Carr Tumbadero, Km 8.5. San Antonio de los Baños.
185. Trouvelot, A., Kough, J., Gianinazzi-Pearson, V. Mesure du Taux de Mycorhization VA d'un Systeme Radiculaire. Recherche de Methodes d'estimation ayant une Signification Fonctionnelle. En: *Proceedings of the 1st European Symposium on Mycorrhizae:*

- Physiological and Genetical Aspects of Mycorrhizae, Dijón, 1-5 July, 1985. eds. V. Gianinazzi-Pearson y S. Gianinazzi. INRA, Paris, 1986. pp. 217-222.
186. Trusov, Y., Rookes, J.E., Chakravorty, D., Armour, D., Schenk, P.M., Botella, R. Heterotrimeric G proteins facilitate Arabidopsis resistance to necrotrophic pathogens and are involved in jasmonate signaling. *Plant Physiol.* 2006. 140: 210-220.
 187. Van Loon, L.C., Rep, M., Pieterse, C.M.J. Significance of inducible defence-related proteins in infected plants. *Ann. Rev. Phytopathol.* 2006. 44 (7): 1-7.
 188. Vázquez-Garcidueñas, M.S., Leal-Morales, C., Herrera-Estrella, A. Analysis of β -1,3-glucanolytic system of biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 1998. 64(4): 1442-1446.
 189. Vera-Estrella, R., Higgins, V.J., Blumwald, E. Plant defense response to fungal pathogens. *Plant Physiol.* 1994. 106: 97-102.
 190. Vierheiling, H., Knoblauch, M., Juergensen, K van Bel, A.J.E., Grundler, F.M.W., Piché, Y. Imaging arbuscular mycorrhizal structures in living of *Nicotiana tabacum* by light, epifluorescence and confocal laser scanning microscopy. *Can. J. Bot.* 2001. 79: 231-237.
 191. Vierheiling, H., Lerat, S., Piché, Y. Systemic inhibition of arbuscular mycorrhiza development by root exudates of cucumber plants colonized by *Glomus mosseae*. *Mycorrhiza.* 2003. 13: 167-170.
 192. Volpin, H., Elkind., Okon, Y., Kapulnik, Y. A vesicular arbuscular mycorrhizal fungus (*G. intraradix*) induces a defense response in alfalfa roots. *Plant Physiol.* 1994. 104: 683-689.
 193. Yamamizo, C., Kuchimura, K., Kobayashi, A., Katou, S., Kawakita, K., Jones, J.D.G., Doke, N., Yoshioka, H. Rewiring mitogen-activated protein kinase cascade by positive feedback confers potato blight resistance. *Plant Physiol.* 2006.140: 681-692
 194. Yi, S.Y., Hwang, B.K. Purification and antifungal activity of a basic 34 kDa β -1,3-glucanase from soybean hypocotyls inoculated with *Phytophthora sojae* f. sp. glycines. *Mol Cells.* 1997. 7(3): 408-413.
 195. Yoshida, S.; Parniske; M. Regulation of plant symbiosis receptor kinase through serine and threonine phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 2005. 28. 10: 9203-9209.
 196. Zheng, H.Z., Cui, C.I., Zhang, Y.T., Wang, D., Jing, Y., Kim, K.Y. Active changes of lignification-related enzymes in pepper response to *Glomus intraradices* and/or *Phytophthora capsici*. *J. Zhejiang Univ. Sci. B.* 2005. 6(8): 778-786.

197. Zheng, Y., Wozniak, C.A. Adaptation of a β -1,3-glucanase assay to microplate format. *Biotechniques*. 1997. 22 (5): 922-926.

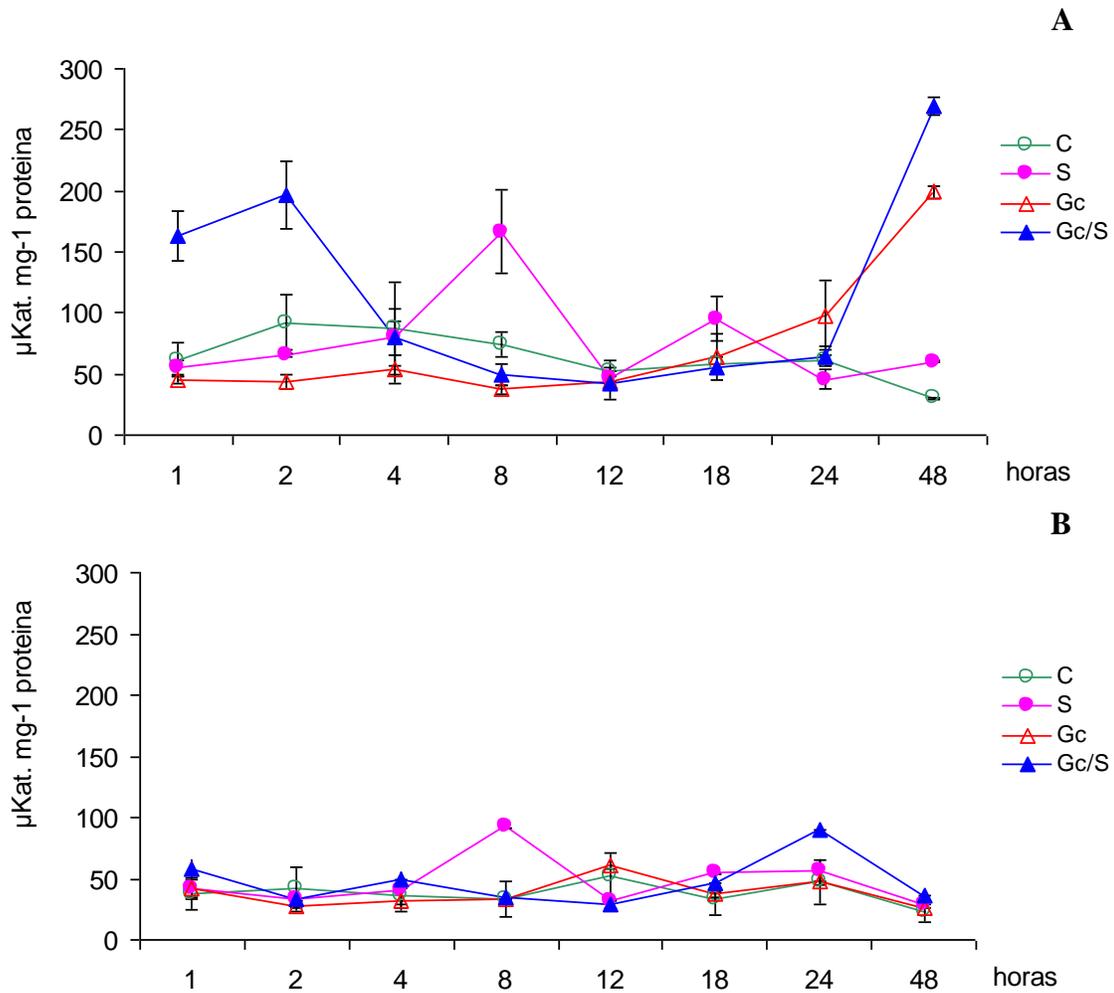


Figura 7: Actividad β -1,3-glucanasa en plantas de tomate a los diferentes momentos de evaluación (horas post aplicación de los HMA y de la sistemina), durante el periodo de pre-colonización. Raíz (A) y hoja (B).

Leyenda: C (control), S (sistemina), Gc (*Glomus clarum*) y Gc/S (*Glomus clarum* con sistemina).

Las barras verticales indican los intervalos de confianza para cada media ($p \leq 0.05$).

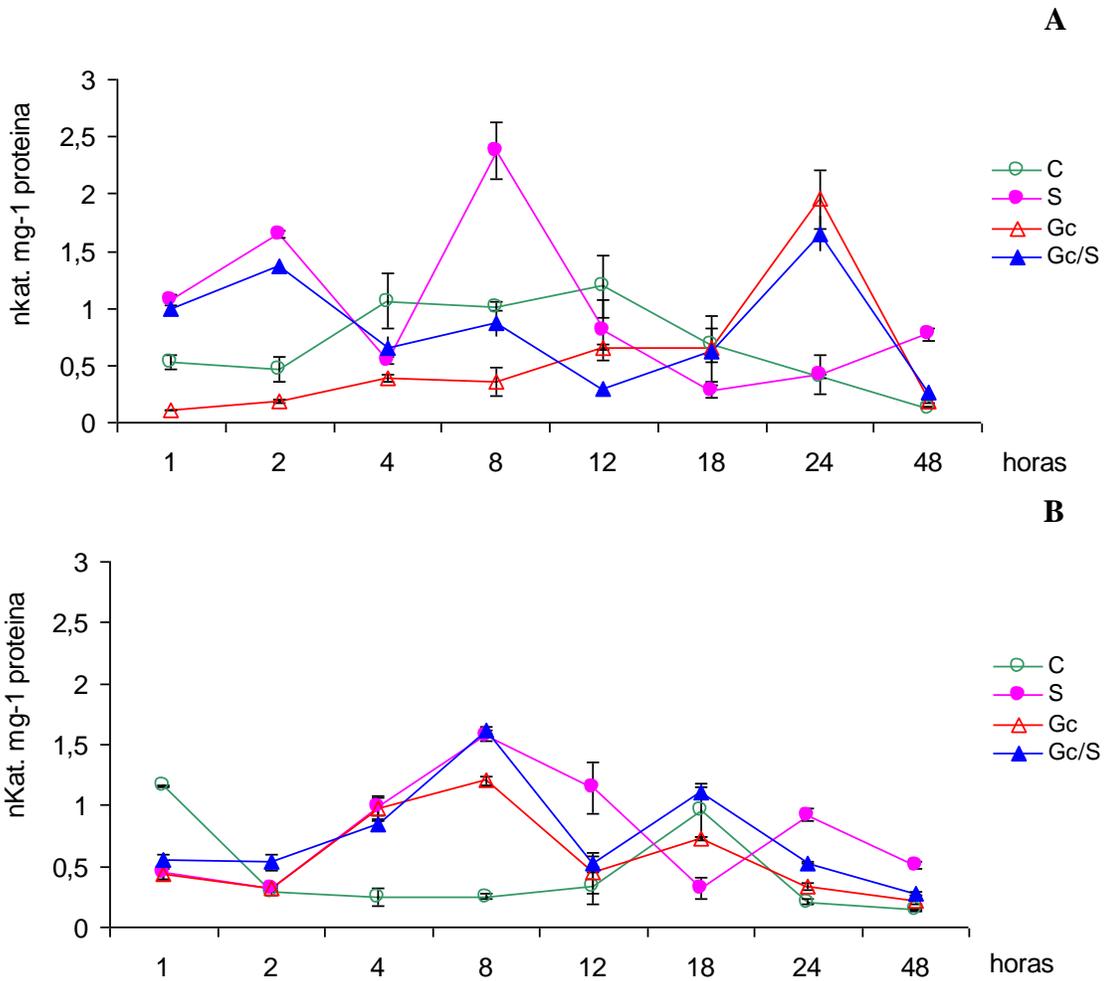


Figura 8: Actividad quitinasa en plantas de tomate a los diferentes momentos de evaluación (horas post aplicación de los HMA y de la sistemina), durante el periodo de pre-colonización. Raíz (A) y hoja (B).

Leyenda: C (control), S (sistemina), Gc (*Glomus clarum*) y Gc/S (*Glomus clarum* con sistemina).

Las barras verticales indican los intervalos de confianza para cada media ($p \leq 0.05$).

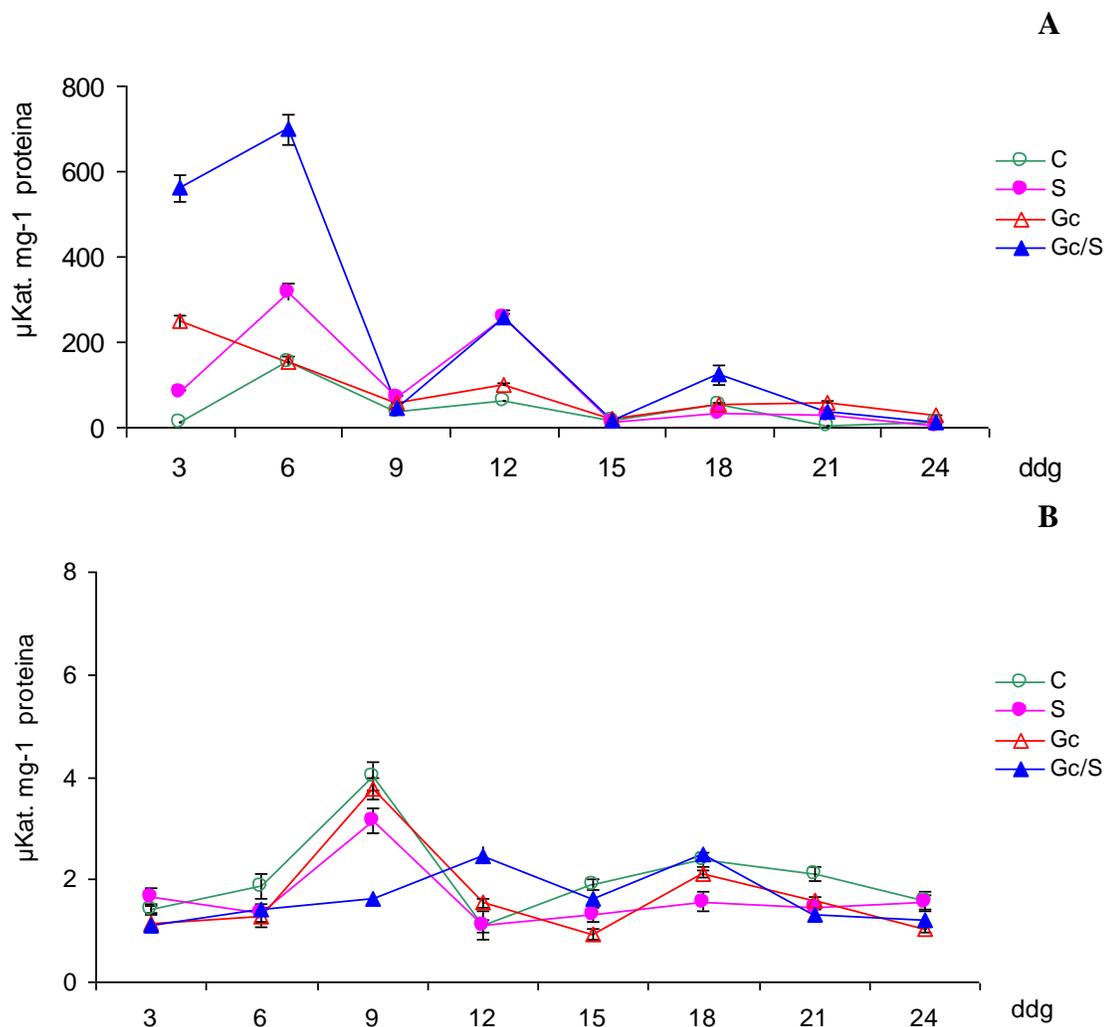
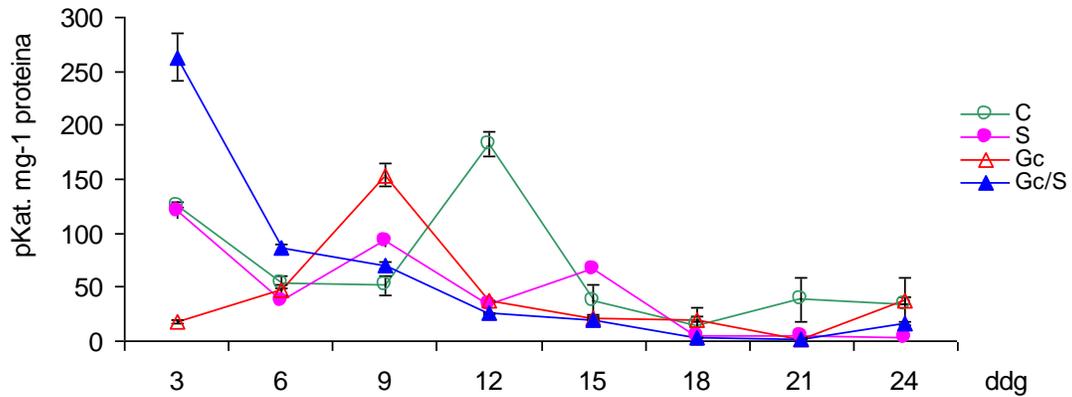


Figura 10: Actividad β -1,3-glucanasa en plantas de tomate en los diferentes momentos de evaluación (días después de la germinación, ddg), durante el periodo de colonización. Raíz (A) y hoja (B).

Leyenda: C (control), S (sistemina), Gc (*Glomus clarum*) y Gc/S (*Glomus clarum* con sistemina).

Las barras verticales indican los intervalos de confianza para cada media ($p \leq 0.05$).

A



B

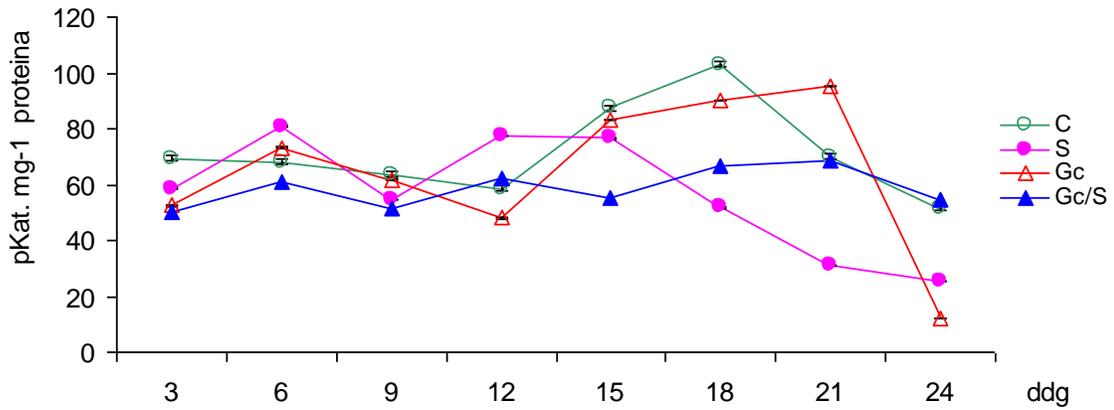


Figura 11: Actividad quitinasa en plantas de tomate a los diferentes momentos de evaluación (días después de la germinación, ddg), durante el periodo de colonización. Raíz (A) y hoja (B).

Leyenda: C (control), S (sistemina), Gc (*Glomus clarum*) y Gc/S (*Glomus clarum* con sistemina).

Las barras verticales indican los intervalos de confianza para cada media ($p \leq 0.05$).

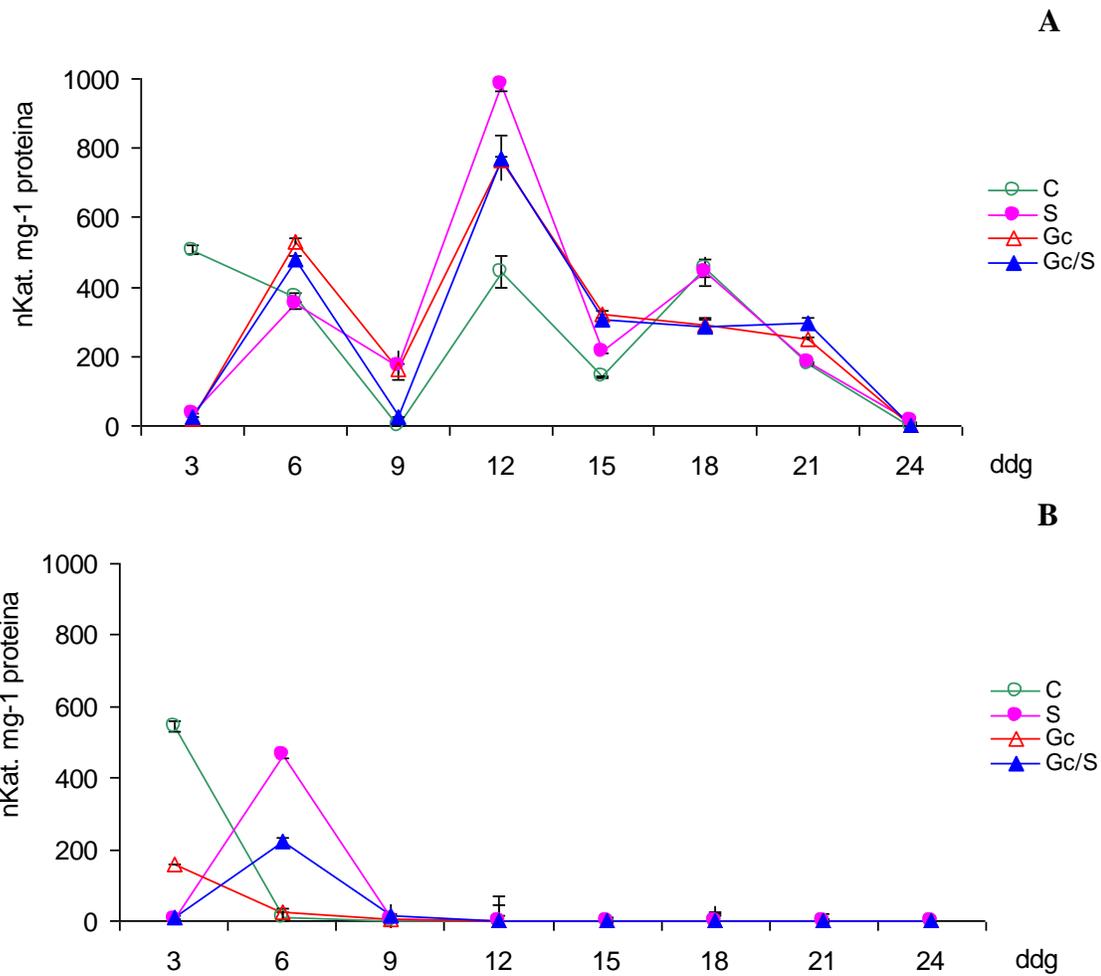


Figura 12: Actividad peroxidasa en plantas de tomate a los diferentes momentos de evaluación (días después de la germinación, ddg), durante el periodo de colonización. Raíz (A) y hoja (B).

Leyenda: C (control), S (sistemina), Gc (*Glomus clarum*) y Gc/S (*Glomus clarum* con sistemina).

Las barras verticales indican los intervalos de confianza para cada media ($p \leq 0.05$).

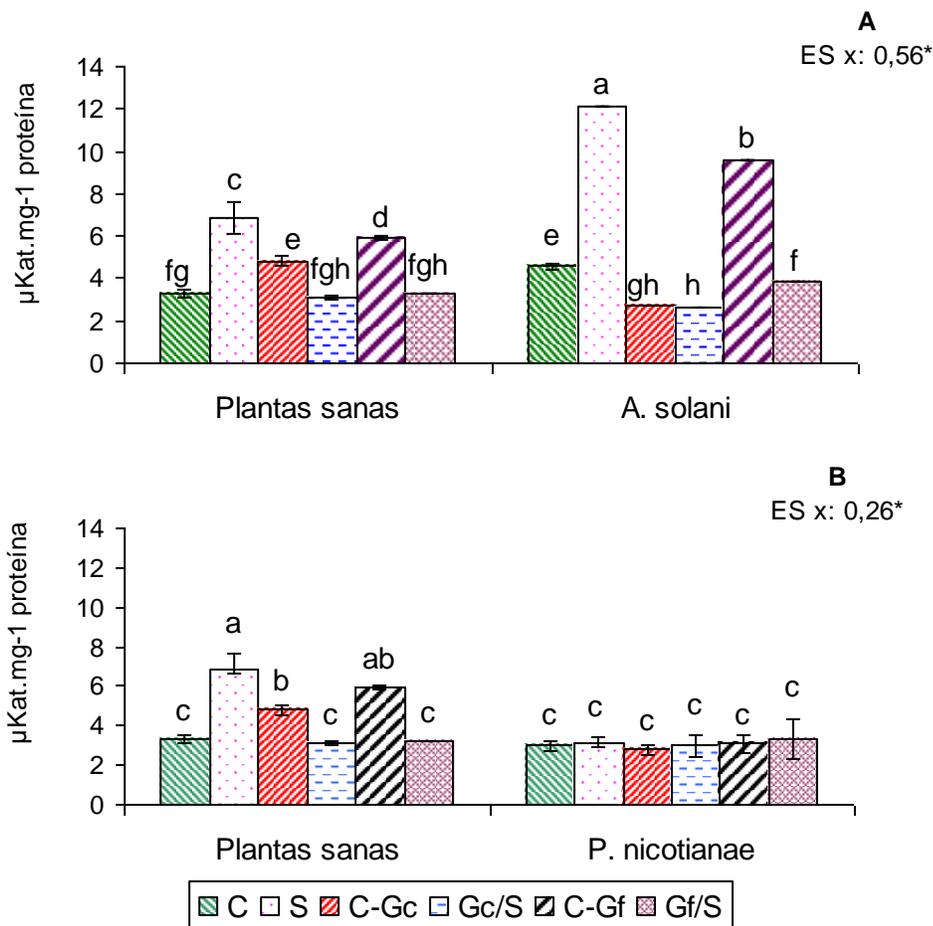


Figura 19: Actividad β -1,3-glucanasa en raíces de tomate, a los tres días post-inoculación del patógeno (24 días de germinadas). *Alternaria. solani* (A) y *Phytophthora nicotianae* (B).
 Leyenda: C (control inoculado), S (sistemina), C-Gc (control micorrizado con *Glomus clarum*), Gc/S (*Glomus clarum* mas sistemina), C-Gf (control micorrizado con *Glomus fasciculatum*) y Gf/S (*Glomus fasciculatum* mas sistemina).

Medias con letras comunes no difieren significativamente según el Procedimiento de Tukey (HSD) ($p \leq 0.05$). Las barras verticales indican la desviación estándar.

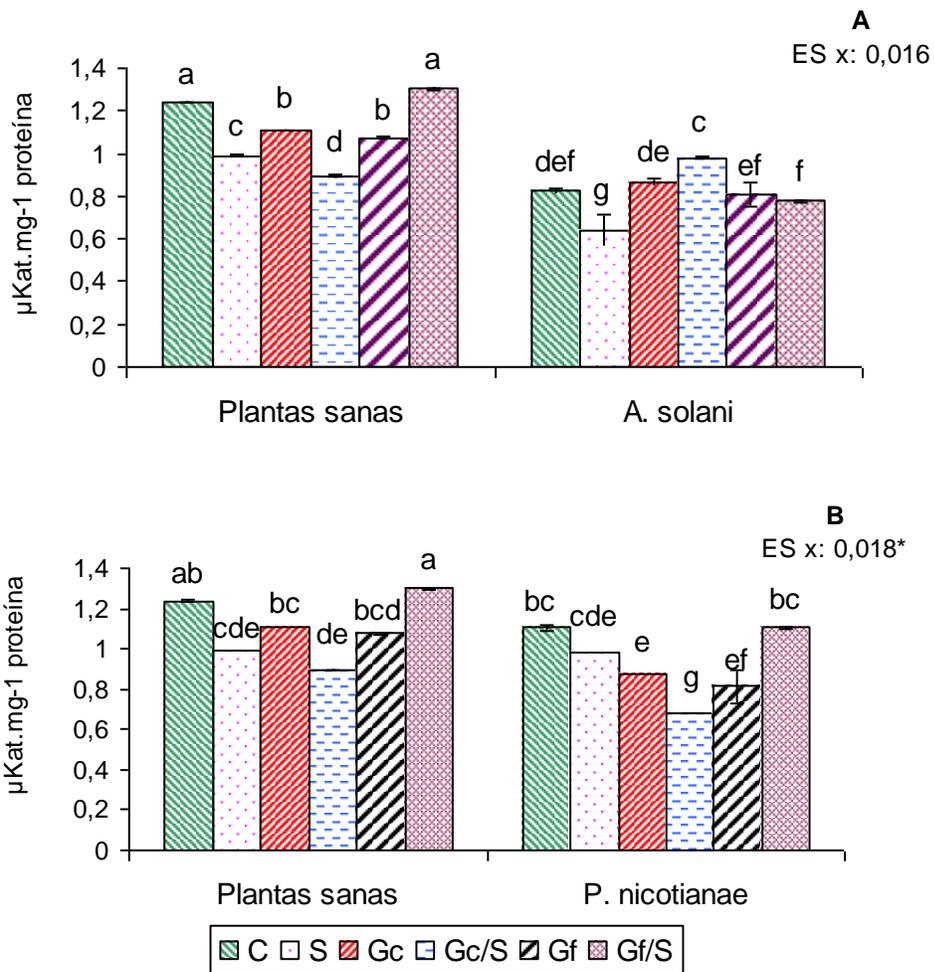


Figura 20: Actividad β -1,3-glucanasa en hojas de tomate, a los tres días post-inoculación del patógeno (24 días de germinadas). *Alternaria. solani* (A) y *Phytophthora nicotianae* (B).

Leyenda: C (control inoculado), S (sistemina), C-Gc (control micorrizado con *Glomus clarum*), Gc/S (*Glomus clarum* mas sistemina), C-Gf (control micorrizado con *Glomus fasciculatum*) y Gf/S (*Glomus fasciculatum* mas sistemina).

Medias con letras comunes no difieren significativamente según el Procedimiento de Tukey (HSD) ($p \leq 0.05$). Las barras verticales indican la desviación estándar.

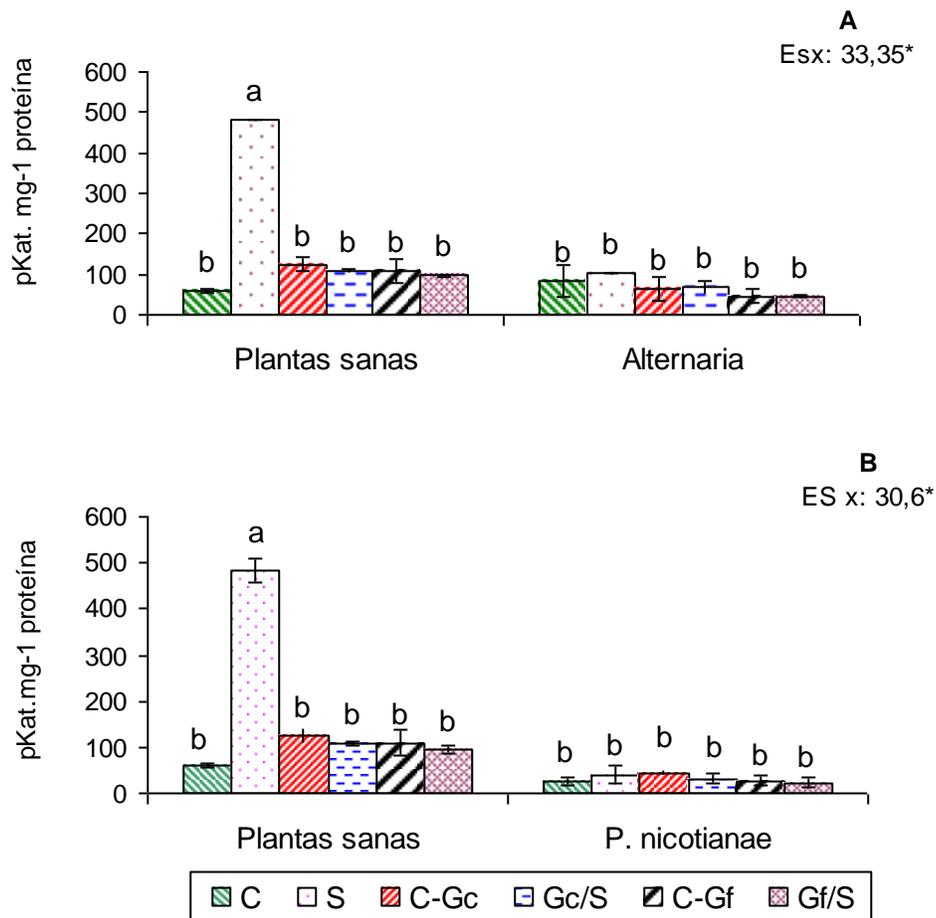


Figura 21: Actividad quitinasa en raíces de tomate, a los tres días post-inoculación del patógeno (24 días de germinadas). *Alternaria. solani* (A) y *Phytophthora nicotianae* (B).

Leyenda: C (control inoculado), S (sistemina), C-Gc (control micorrizado con *Glomus clarum*), Gc/S (*Glomus clarum* mas sistemina), C-Gf (control micorrizado con *Glomus fasciculatum*) y Gf/S (*Glomus fasciculatum* mas sistemina).

Medias con letras comunes no difieren significativamente según el Procedimiento de Tukey (HSD) ($p \leq 0.05$). Las barras verticales indican la desviación estándar.

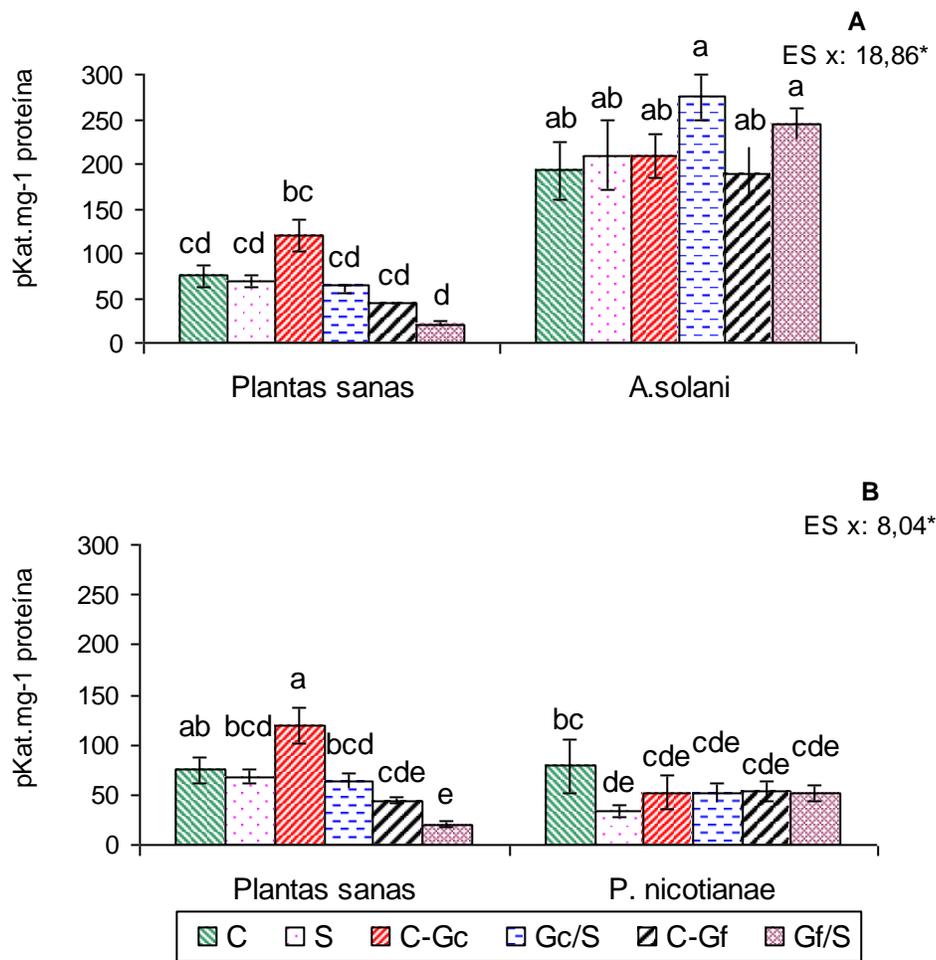


Figura 22: Actividad quitinasa en hojas de tomate, a los tres días post-inoculación del patógeno (24 días de germinadas). *Alternaria. solani* (A) y *Phytophthora nicotianae* (B).
Leyenda: C (control inoculado), S (sistemina), C-Gc (control micorrizado con *Glomus clarum*), Gc/S (*Glomus clarum* mas sistemina), C-Gf (control micorrizado con *Glomus fasciculatum*) y Gf/S (*Glomus fasciculatum* mas sistemina).

Medias con letras comunes no difieren significativamente según el Procedimiento de Tukey (HSD) ($p \leq 0.05$). Las barras verticales indican la desviación estándar.

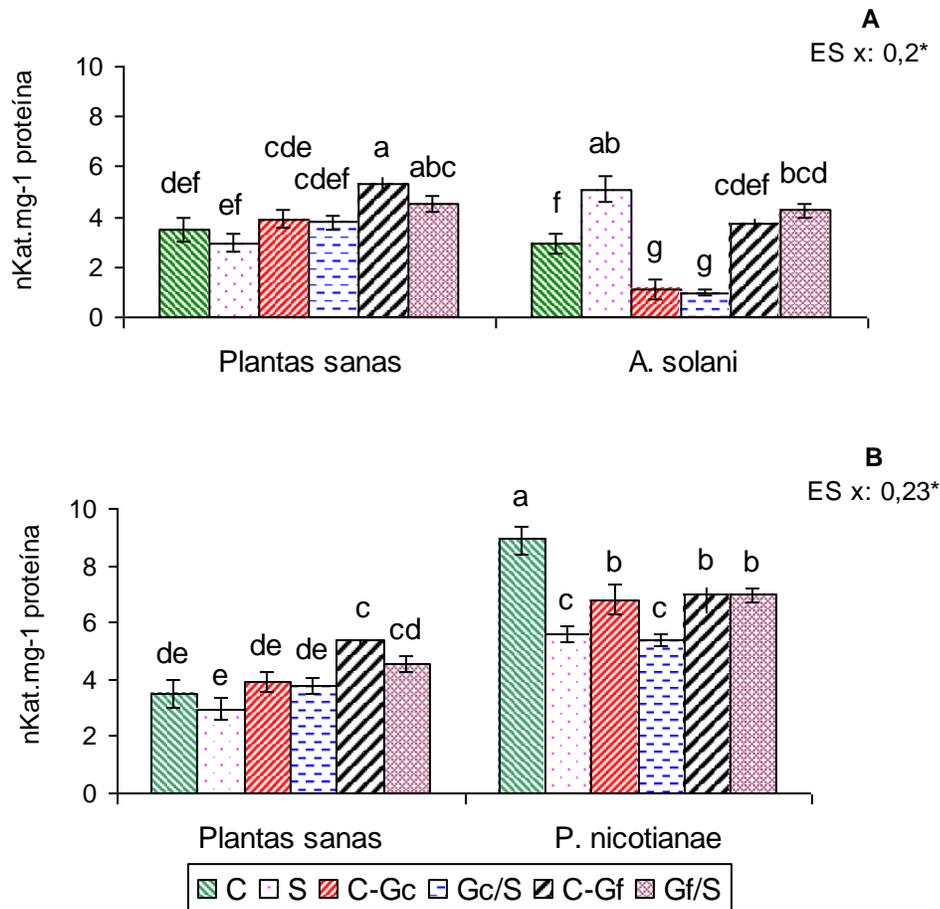


Figura 23: Actividad peroxidasa en raíces de tomate, a los tres días post-inoculación del patógeno (24 días de germinadas). *Alternaria solani* (A) y *Phytophthora nicotianae* (B).

Leyenda: C (control inoculado), S (sistemina), C-Gc (control micorrizado con *Glomus clarum*), Gc/S (*Glomus clarum* mas sistemina), C-Gf (control micorrizado con *Glomus fasciculatum*) y Gf/S (*Glomus fasciculatum* mas sistemina).

Medias con letras comunes no difieren significativamente según el Procedimiento de Tukey (HSD) ($p \leq 0.05$). Las barras verticales indican la desviación estándar.

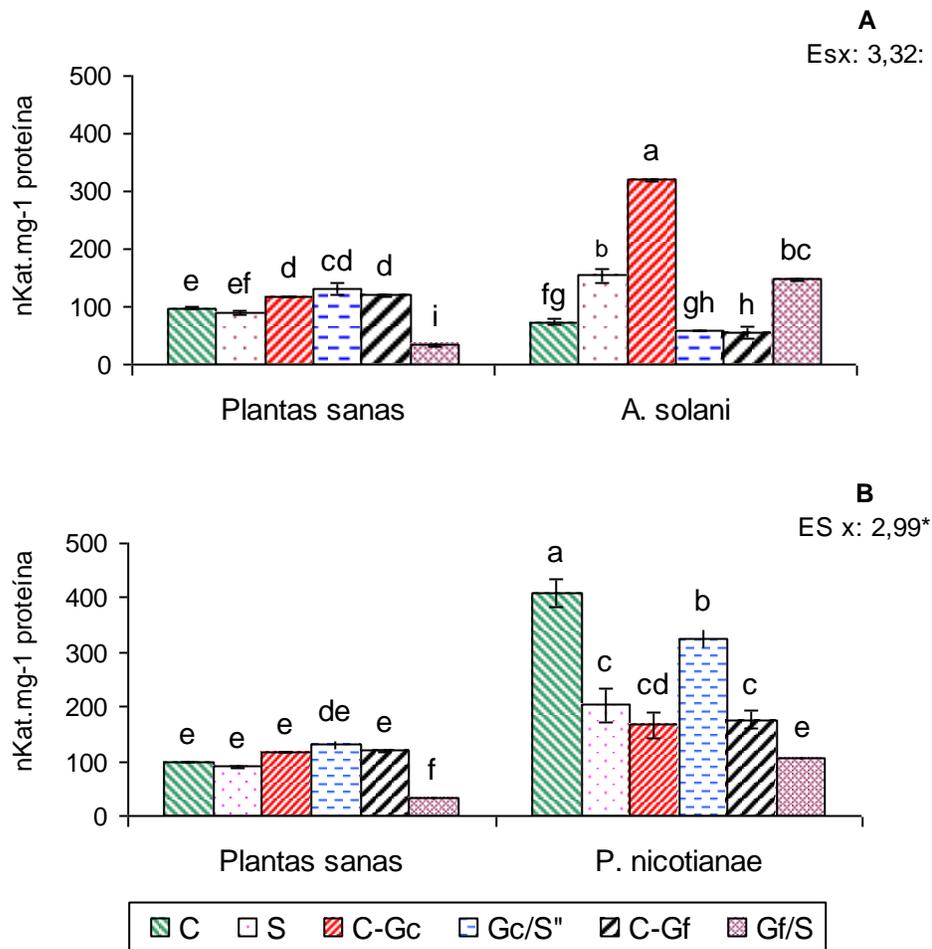


Figura 24: Actividad peroxidasa en hojas de tomate, a los tres días post-inoculación del patógeno (24 días de germinadas). *Alternaria solani* (A) y *Phytophthora nicotianae* (B).

Leyenda: C (control inoculado), S (sistemina), C-Gc (control micorrizado con *Glomus clarum*), Gc/S (*Glomus clarum* mas sistemina), C-Gf (control micorrizado con *Glomus fasciculatum*) y Gf/S (*Glomus fasciculatum* mas sistemina).

Medias con letras comunes no difieren significativamente según el Procedimiento de Tukey (HSD) ($p \leq 0.05$). Las barras verticales indican la desviación estándar.