

RESPUESTA DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES Y CRECIMIENTO DE VITROPLANTAS DE PAPA MICORRIZADAS *In Vitro*

Yakelín Rodríguez✉, Aracelys Mena, Francys L. Marentes y Kalyanne Fernández

ABSTRACT. The technology used for potato (*Solanum tuberosum*) micropropagation still has some problems, so that it does not fully guarantee the conditions for the further development of derived plants under natural environments. Inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) at *in vitro* phase could be an alternative to eliminate some of these problems, by its positive influence on vitroplants obtained with a greater ability of survival and adaptation. This work was aimed at evaluating the behaviour of antioxidant enzymes -peroxidase, polyphenoloxidase and superoxide dismutase- and vitroplant growth mycorrhized *in vitro* with two AMF species: *Glomus mosseae* and *Glomus hoi*-like. Thus, potato vitroplants of Desirée cv. were cultivated in sterile containers with a mixture of vermiculite and twice the components of M (minimum) culture media. In this stage, disinfected spores of both AMF were inoculated, which together with the control without inoculation constituted the three treatments studied. Once mycorrhized, vitroplants were transferred to the acclimatization phase and transplanted to pots. Results indicate *G. mosseae* is the best species in both phases; since greater intraradical fungal growth as well as superior values of aerial fresh mass and leaf number were observed in plants inoculated with this species. Differences detected among treatments were biochemically corroborated with the changes found in enzymatic activities and mainly in isoenzymatic expression. This suggests the use of AMF for obtaining micropropagated potato plants mycorrhized at *in vitro* stage, which should have a greater ability for survival and adaptation.

Key words: *Solanum tuberosum*, fungi, arbuscular mycorrhizae, micropropagation, enzymes, antioxidants

RESUMEN. La tecnología empleada para la micropropagación de la papa (*Solanum tuberosum*) presenta aún determinados problemas, que no garantizan totalmente las condiciones para el posterior desarrollo de las plantas derivadas en ambientes naturales. La inoculación con hongos micorrízicos arbusculares (HMA) en la fase *in vitro* pudiera ser una alternativa para eliminar algunos de estos problemas, al influir positivamente en la obtención de vitroplantas, en principio, con mayor capacidad de supervivencia y adaptación. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el comportamiento de enzimas antioxidantes -peroxidasa, polifenoloxidasa y superóxido dismutasa- y el crecimiento de vitroplantas de papa micorrizadas *in vitro* con dos especies de HMA: *Glomus mosseae* y *Glomus hoi*-like. Para ello, se cultivaron las vitroplantas de papa, var. Desirée, en frascos estériles que contenían una mezcla de vermiculita y el doble de los componentes del medio de cultivo M (mínimo). En esta etapa se inocularon las esporas desinfectadas de los dos HMA, constituyendo conjuntamente con el control sin inocular los tres tratamientos estudiados. Una vez micorrizadas, las vitroplántulas pasaron a la fase de aclimatización, siendo trasplantadas a macetas. Los resultados señalan a *G. mosseae* como la especie de mejor comportamiento en ambas fases, observándose un mayor crecimiento fúngico intraradical en las plantas inoculadas con ella, así como valores superiores de masa fresca aérea y número de hojas. Las diferencias detectadas entre los tratamientos se corroboraron bioquímicamente con los cambios encontrados en las actividades enzimáticas y, principalmente, en la expresión de isoenzimas, los cuales sugieren el uso de este HMA en la obtención de plantas de papa micropropagadas, que sean micorrizadas durante el estadio *in vitro*, las que deben tener una mayor capacidad de supervivencia y adaptación.

Palabras clave: *Solanum tuberosum*, hongos, micorrizas arbusculares, micropropagación, enzimas, antioxidantes

INTRODUCCIÓN

Las tecnologías de propagación de plantas a través del cultivo de tejidos han sido desarrolladas desde hace

Ms.C. Yakelín Rodríguez y Ms.C. Kalyanne Fernández, Investigadores Agregados y Aracelys Mena, Especialista del Departamento de Biofertilizantes y Nutrición de las Plantas, Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA), Gaveta Postal 1, San José de las Lajas, La Habana, Cuba, CP 32 700; Francys L. Marentes, Ingeniero Agrónomo de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá, Colombia.

✉ yakelin@inca.edu.cu

30 ó 40 años aproximadamente y aplicadas a una gran variedad de cultivos, con objetivos precisos encaminados fundamentalmente a la propagación rápida y en masa de clones específicos, y al mejoramiento de plantas para incrementar la resistencia a enfermedades, plaguicidas y condiciones de sequía y salinidad (1). Particularmente, la papa forma parte de la dieta de más de un billón de personas en el mundo, constituyendo la micropropagación una de las técnicas más empleadas para su producción, con vistas a satisfacer esta elevada demanda.

Sin embargo, las condiciones artificiales en que se desarrollan las vitroplantas las hacen más susceptibles durante el trasplante, por lo que esta fase del proceso constituye uno de los factores más críticos que inciden sobre el éxito de la micropropagación y la causa principal de los altos costos de producción.

Son bien conocidas las bondades atribuidas a los hongos micorrízicos arbusculares (HMA), no solo por su incidencia directa sobre la nutrición de las plantas a partir de un aumento de la capacidad de absorción de estas (2), sino también por la posibilidad de incrementar la resistencia a enfermedades de las raíces (3), aumentar la tolerancia a la sequía (4), entre otras. Algunos estudios han demostrado que la inoculación de plantas micropropagadas con estos hongos, durante los estadios *in vitro*, produce incrementos significativos sobre las tasas de crecimiento, el enraizamiento y la supervivencia (5, 6).

En particular, nuestro grupo ha trabajado en la inoculación de algunos de estos hongos en papa, específicamente en la fase de aclimatización, obteniéndose resultados alentadores que varían en dependencia de la especie inoculada (7, 8). Sin embargo, a pesar de que se viene estudiando hace unos años la factibilidad de obtener vitroplantas de papa micorrizadas durante la propia fase *in vitro*, ha sido un reto debido, fundamentalmente, a la carencia de un medio de cultivo adecuado, que permita un buen desarrollo tanto de las vitroplantas como del hongo (8). En estas investigaciones se ha utilizado la especie de HMA *Glomus mosseae*, que conjuntamente con *Glomus hoi-like* constituyen las más destacadas del cepario del Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA), por sus efectos positivos sobre el incremento del rendimiento en numerosos cultivos de interés económico (2).

Entre las dos especies mencionadas existen marcadas diferencias estructurales y funcionales, las cuales han sido detectadas en estudios bioquímicos realizados en tomate y sorgo (9, 10), básicamente mediante la evaluación de la actividad enzimática y expresión isoenzimática de sistemas involucrados en la defensa de las plantas y en la eliminación de especies reactivas de oxígeno. Entre estas enzimas resaltan las peroxidases (EC 1.11.1.7), polifenoloxidasas (EC 1.10.3.1 y EC 1.10.3.2) y superóxido dismutasas (EC 1.15.1.1). Aunque numerosos trabajos señalan la implicación de estas enzimas en la simbiosis micorrízica arbuscular, hasta hoy se desconoce el papel que juegan dentro de esta, lo que sugiere que la inducción/supresión de mecanismos asociados con la defensa juegan un rol clave en el proceso de colonización por estos hongos y en la compatibilidad con su hospedero (11). Además, la activación de enzimas que participan en la eliminación de especies reactivas de oxígeno, durante la asociación micorrízica, pudiera ser un mecanismo eficiente para atenuar las respuestas defensivas, permitiéndole al hongo colonizar la raíz (12).

Teniendo en cuenta todo lo anterior, el presente trabajo tuvo como objetivo evaluar el crecimiento y comportamiento de enzimas antioxidantes, como la peroxidasa, polifenoloxidasa y superóxido dismutasa, en vitroplantas de papa micorrizadas *in vitro* con dos especies de HMA: *Glomus mosseae* y *Glomus hoi-like*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para la realización del experimento, se utilizaron vitroplantas de papa (*Solanum tuberosum* L. var Desirée) de siete días de subcultivadas, las cuales fueron trasplantadas a frascos de cristal estériles de 250 mL de capacidad, que contenían vermiculita y el doble de los componentes del medio de cultivo M (mínimo). Se inocularon esporas previamente desinfectadas con la metodología descrita por Bécard y Piché (13), de dos especies de hongos micorrízicos arbusculares: *Glomus mosseae* y *Glomus hoi-like*, las cuales se inocularon directamente sobre las raíces en el momento del trasplante. Estas esporas fueron extraídas de cultivos de *Sorghum bicolor* en etapa de cosecha, previamente inoculado con las cepas empleadas, utilizando la técnica de tamizado húmedo y decantado (14).

Se estudiaron tres tratamientos: plántulas controles sin inocular, plántulas inoculadas con *G. mosseae* y las inoculadas con *G. hoi-like*. Se empleó un diseño completamente aleatorizado a razón de 20 plántulas por tratamiento con dos réplicas. Las plántulas se colocaron durante 20 días en un cuarto de crecimiento con un fotoperíodo de 16 horas, temperatura de 22/18 °C (día/noche) y 70 % de humedad relativa. A los 20 días de crecidas las plántulas, se realizó un muestreo para comprobar la presencia de micorrización a cinco plántulas por tratamiento. Para ello, se procedió a la tinción de las raicillas siguiendo las modificaciones (8) de la metodología descrita por Elmeskaoui *et al.* (15), analizando la presencia o ausencia de estructuras fúngicas en la raíz.

Una vez obtenidas las vitroplantas micorrizadas, se pasó a la fase de aclimatización. Las plántulas fueron trasplantadas a macetas de 5 L, que contenían un sustrato estéril compuesto por una mezcla de suelo Ferralítico Rojo lixiviado y humus de lombriz (2/1, v/v). En esta fase también se utilizó un diseño completamente aleatorizado con 15 plantas por tratamiento y dos réplicas. A los 40 días se procedió a la toma de muestras, para determinar las variables fúngicas y del crecimiento, tales como los porcentajes de colonización micorrízica y densidad visual (16, 17), la altura de las plántulas, el número de hojas y las masas fresca y seca aéreas. Se evaluaron, además, las variables bioquímicas en hojas y raíces, tales como la actividad enzimática de peroxidases (18) y polifenoloxidasas (19), así como los patrones isoenzimáticos de estas dos enzimas (20, 21) y de las superóxido dismutasas (22). Las actividades específicas se expresan como actividad enzimática.g de masa fresca⁻¹.

Para la toma de fotos de los geles se utilizó una cámara digital SONY FDMavica, 2.1 megapíxeles.

La interpretación de los datos se realizó mediante un Análisis de Varianza de Clasificación Simple con posterior prueba de Duncan ($p < 0.05$), en caso de existir diferencias significativas entre las medias, con el auxilio del software SPSS para Windows (SPSS 11.5).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Tabla I se recoge de manera cualitativa la variable colonización micorrízica expresada como presencia o no de estructuras fúngicas, debido a que no se contaba con datos suficientes para realizar una valoración cuantitativa.

Tabla I. Colonización micorrízica en los diferentes tratamientos en el estadio *in vitro*

| Tratamientos | Presencia |
|------------------------|-----------|
| Control | - |
| <i>Glomus mosseae</i> | +++ |
| <i>Glomus hoi-like</i> | ++ |

A pesar de las dificultades en la búsqueda de un medio nutricional apropiado, para el desarrollo de un cultivo dual entre los HMA y vitroplantas, durante el estadio *in vitro*, es importante mencionar las evidencias existentes sobre la micorrización de plántulas de café y papa en esta fase, específicamente con la cepa *Glomus mosseae* (6, 8), aunque no se puede comparar la valoración cualitativa de la colonización micorrízica observada en este estudio, con la realizada en papa por Fernández (8), porque las raicillas en este último fueron destruidas, debido a la agresividad del método de tinción empleado. En cuanto a la colonización micorrízica de vitroplantas de café (6), fue más pobre el desarrollo fúngico observado en el interior de sus raicillas, probablemente debido a diferencias en la textura de la pared celular de ambos cultivos, siendo la de papa más fina y con menor reforzamiento (Figura 1).

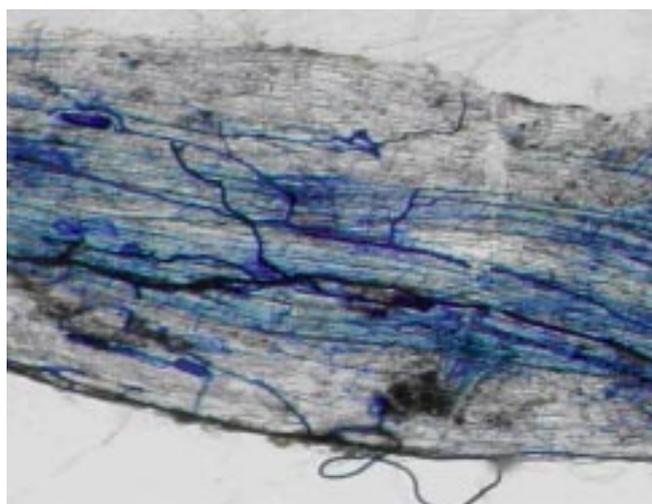


Figura 1. Raíz de una vitroplanta de papa aclimatizada, micorrizada con el HMA *Glomus mosseae* (estructuras fúngicas)

Cabe resaltar que respecto a *Glomus hoi-like*, no se cuenta con experiencias previas para esta especie, por lo que este constituye el primer informe sobre la detección de estructuras pertenecientes a este HMA en raicillas de vitroplantas en estadio *in vitro*. Si bien en el cultivo de la papa en este estadio parece estar favorecida la micorrización con *G. mosseae*, siendo más abundante la presencia de estructuras fúngicas en este tratamiento, es válido aclarar que se inoculó la misma cantidad de esporas por vitroplanta en ambos tratamientos.

El hecho de que se haya detectado colonización micorrízica en las vitroplantas de papa inoculadas en estadio *in vitro* indica que estas se encuentran listas para ser trasplantadas, cumpliendo las expectativas según los objetivos propuestos y así continuar el proceso de micropropagación con la siguiente fase: aclimatización.

Tanto el porcentaje de colonización micorrízica como el de la densidad visual de las vitroplantas de papa aclimatizadas muestran diferencias significativas entre los tratamientos (Tabla II). Los valores alcanzados en las raíces inoculadas con la especie *G. mosseae* duplican a las inoculadas con *G. hoi-like* en ambas variables. Este comportamiento se corresponde con los resultados de la Tabla I, demostrando que la interacción de las vitroplantas de papa (var. Desirée) con la especie de HMA *G. mosseae* es mayor que con *G. hoi-like* en las condiciones estudiadas.

Tabla II. Porcentajes de colonización micorrízica (% C) y densidad visual (% DV) de las vitroplantas de papa aclimatizadas en los diferentes tratamientos

| Tratamientos | %C | %DV |
|------------------------|------------|--------------|
| Control | 0 c | 0 c |
| <i>Glomus mosseae</i> | 17±0,176 a | 0.17±0,017 a |
| <i>Glomus hoi-like</i> | 8±0,100 b | 0.09±0,010 b |

Los datos del porcentaje de colonización micorrízica fueron transformados por la función $2\arcsen\sqrt{x}$. Valores con letras comunes en una misma columna no difieren significativamente según prueba de Duncan $p=0.05$

Numerosos autores coinciden en que la colonización radical por un HMA involucra un complejo intercambio de señales, que está regulado por los genomas fúngico y vegetal, así como por factores ambientales (23, 24) y, en consecuencia, cepas de HMA diferentes pueden desarrollar distintas estrategias de colonización de un mismo sistema radical. Este hecho condiciona diversos niveles de compatibilidad planta-HMA y, principalmente, el mejor funcionamiento de un cultivo en simbiosis con una cepa de HMA determinada. Otros trabajos realizados así lo corroboran (10, 25, 26, 27).

Según lo anterior este estudio no constituye la excepción, apreciándose diferencias en las variables fúngicas dependientes de la cepa y las condiciones de estrés que supone el cultivo *in vitro*, las cuales determinaron, en primera instancia, la mayor compatibilidad de las vitroplantas de papa con *G. mosseae* encontrada aquí.

Esta afirmación se basa en experiencias similares con papa inoculada durante la aclimatización (7, 8), donde se obtuvieron resultados distintos, siendo el tratamiento micorrizado con la cepa *G. hoi-like* el de mejor comportamiento, tanto en las variables del crecimiento como en las fúngicas; incluso los valores de colonización micorrízica y densidad visual fueron notablemente superiores a los de este trabajo. Estas diferencias pudieran atribuirse fundamentalmente a: I) fase de la micropropagación en que se inocula (*in vitro* o aclimatización); II) características del sustrato en que se realiza la inoculación; III) condiciones de esterilidad o no del sustrato durante la aclimatización.

Es válido aclarar que en condiciones de suelo Ferralítico Rojo lixiviado, la mayor agresividad y eficiencia micorrízica de la especie *G. hoi-like* en numerosos cultivos de interés económico han sido constatados (7, 10, 28, 29, 30).

En lo referente al crecimiento y desarrollo de las vitroplantas de papa, la Figura 2 refleja claramente que no hubo efecto de los tratamientos sobre la altura en el momento de la toma de muestras. Sin embargo, la Figura 3 muestra el incremento en el número de hojas de las vitroplantas inoculadas con la cepa *G. mosseae*.

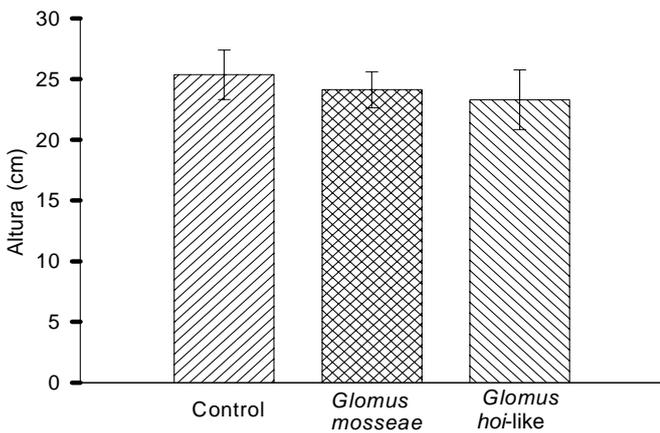


Figura 2. Altura de las vitroplantas de papa aclimatizadas en los diferentes tratamientos

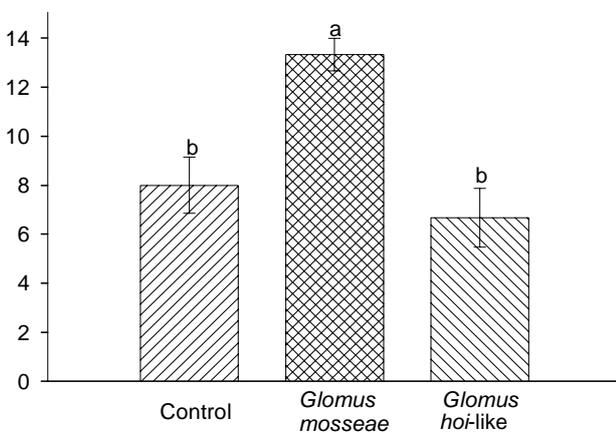


Figura 3. Número de hojas de las vitroplantas de papa aclimatizadas en los diferentes tratamientos

En cuanto a la masa fresca aérea (Figura 4), sobresalen por su elevado valor las plántulas tratadas con *G. mosseae*. En esta misma figura aparece la variable masa seca aérea, con valores estadísticamente similares en las vitroplantas controles e inoculadas con *G. mosseae*. En contraste, ambas variables reflejan el efecto negativo de la cepa *G. hoi-like* sobre las plantas de papa a los 40 días de aclimatizadas.

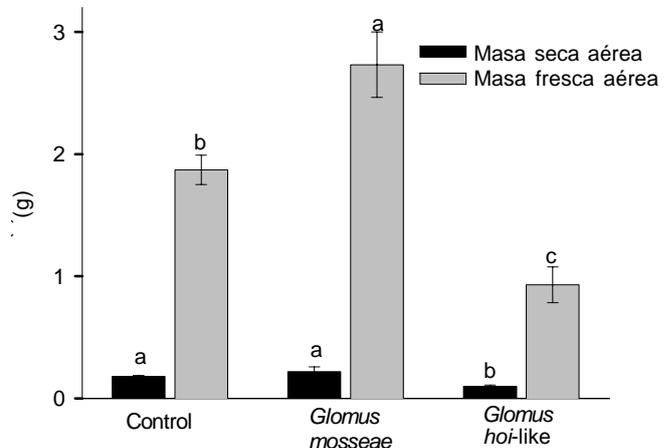


Figura 4. Masas fresca y seca aéreas de las vitroplantas de papa aclimatizadas en los diferentes tratamientos

Si bien el número de hojas y la masa fresca aérea indican que *G. mosseae* es la cepa más beneficiosa en esta interacción, se debe reconocer que fueron pocas las variables del crecimiento analizadas, aunque estos resultados no son sorprendentes, si se tiene en cuenta que fue esta cepa la que mayor colonización y ocupación fúngica alcanzó. Se debe considerar, además, el pobre desarrollo del hongo dentro de las raíces en el momento de evaluación, lo cual pudiera enmascarar el efecto positivo de los HMA sobre las vitroplantas.

Las determinaciones bioquímicas realizadas manifiestan cambios tempranos a nivel celular, pudiendo ser un indicativo del efecto de estos hongos para la planta. En la actividad peroxidasa (Figura 5), se observó un mayor efecto de los tratamientos en la raíz, donde ambas cepas de HMA provocaron decremento, siendo superior la represión inducida por *G. mosseae*. En cambio, en las hojas, esta fue la única cepa que reprimió la actividad, mientras que las plántulas tratadas con *G. hoi-like* no presentaron diferencias significativas con las controles.

La Figura 6 muestra el efecto de la inoculación sobre la actividad polifenoloxidasas, que se detectó solo en la raíz, con un incremento similar de esta actividad en las vitroplantas de papa inoculadas con ambas cepas. En las hojas no hubo diferencias significativas entre los tratamientos.

Por otro lado, el patrón de isoenzimas peroxidadas reveló un total de nueve bandas (Figura 7), de las cuales tres son específicas de raíz (bandas 1, 2 y 3) y dos son específicas de hojas (bandas 8 y 9). La inducción de las isoenzimas no. 9 en hojas y no. 6 y 7 en raíz fue de menor magnitud para la cepa *G. mosseae*, apreciándose bandas más tenues.

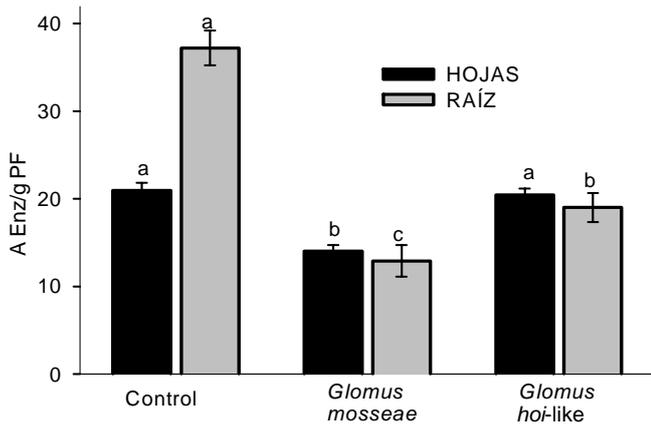


Figura 5. Actividad peroxidasa en hojas y raíz de las vitroplantas de papa aclimatizadas en los diferentes tratamientos

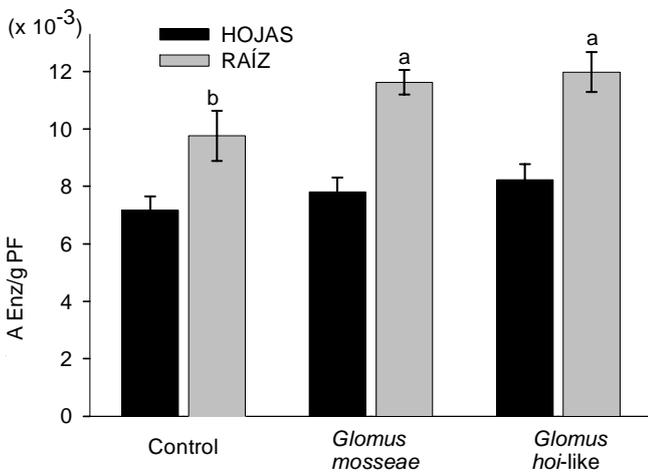


Figura 6. Actividad polifenoloxidasas en hojas y raíz de las vitroplantas de papa aclimatizadas en los diferentes tratamientos

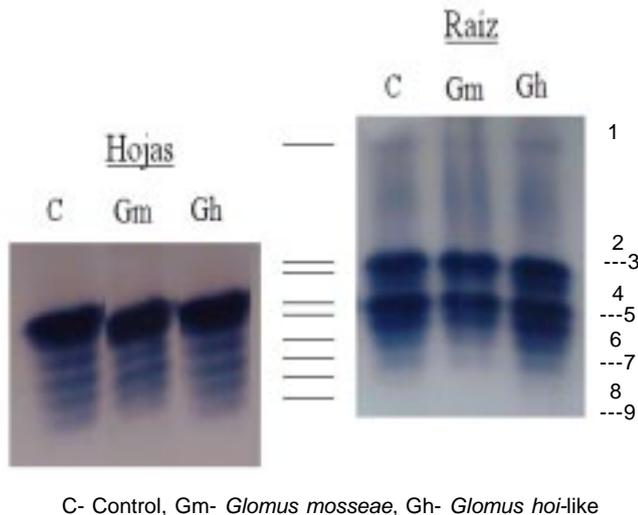


Figura 7. Patrón isoenzimático de peroxidasas en vitroplantas de papa aclimatizadas

En la Figura 8 se observan cinco isoenzimas con actividad polifenoloxidasas, las no. 1 y 2 son específicas de raíz y aparecen en los tres tratamientos. En las hojas se detectaron tres isoenzimas, siendo la no. 5 reprimida por ambas especies de HMA. En cambio en la raíz, esta misma isoenzima (5) solo fue inducida por *G. hoi-like*, considerándose en este tejido una isoenzima específica de la simbiosis con esta especie.

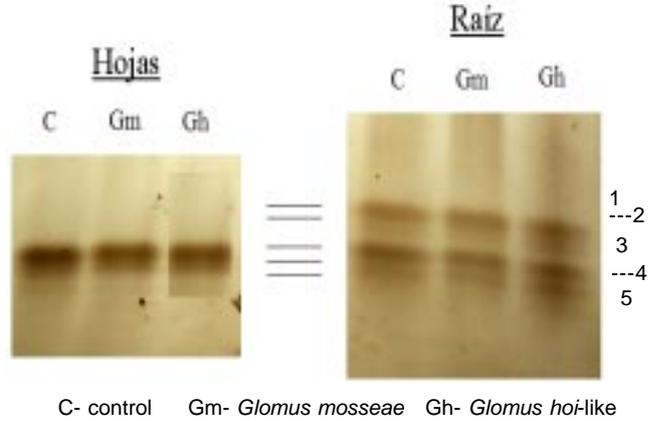


Figura 8. Patrón isoenzimático de polifenoloxidasas en vitroplantas de papa aclimatizadas

En cuanto a las superóxido dismutasas (Figura 9), se detectaron siete isoenzimas, de las cuales la no. 1 es específica de raíz, mientras que las no. 6 y 7 solo se observaron en hojas. En raíz, la isoenzima no. 3 fue reprimida por la cepa de HMA *G. mosseae*, en tanto que la no. 5 fue reprimida por ambas cepas. Similarmente, en hojas se manifestó una represión de la isoenzima no. 7 en los dos tratamientos inoculados.

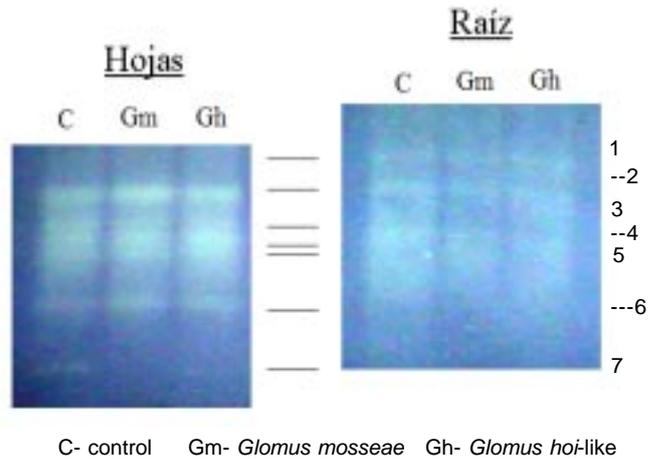


Figura 9. Patrón isoenzimático de superóxido dismutasa en vitroplantas de papa aclimatizadas

Es importante destacar que las tres enzimas analizadas pertenecen al sistema antioxidante de las plantas, participando como una primera línea de defensa de estas ante cualquier situación estresante, ya sea biótica, como la inoculación de un microorganismo, o abiótica, como la sequía y escasez de nutrientes. Por su implicación en ambos estrés, se seleccionaron estos sistemas enzimáticos.

El efecto de las cepas de HMA inoculadas sobre las actividades enzimáticas determinadas fue más evidente en el sistema radical, lo cual era de esperarse si se tiene en cuenta que es por este órgano donde se establece el contacto directo entre los simbioses (planta-hongo). Adicionalmente, resalta el marcado efecto de la cepa *G. mosseae*, al reprimir la actividad peroxidasa tanto en raíces como en hojas, e inducir la polifenoloxidasas en raíz.

Asimismo, las actividades evaluadas cualitativamente, expresadas a través de los patrones isoenzimáticos, reflejaron mejor los cambios inducidos por la presencia de los hongos inoculados en la zona radical que en la aérea, incluso mejor que las actividades enzimáticas. Esta afirmación se basa en la mayor inducción/supresión de isoenzimas encontrada en la raíz, donde sobresale también el tratamiento inoculado con *G. mosseae*.

De igual forma, en las hojas, las evaluaciones cualitativas revelaron más las alteraciones entre las vitroplantas controles e inoculadas que las actividades medidas cuantitativamente, lo que sugiere que la expresión isoenzimática puede ser más conveniente que la actividad de la enzima, para detectar variaciones bioquímicas tempranas en la interacción planta-HMA, aun cuando los niveles de colonización son bajos.

Se manifestó cierta correspondencia entre la actividad y la expresión isoenzimática de las peroxidases. Así, la actividad superior detectada en la raíz, principalmente en el tratamiento control, se corresponde con el mayor número de isoenzimas expresadas en este órgano. Además, algunas de las isoenzimas observadas en el tratamiento con *G. mosseae* presentaron menor intensidad, coincidiendo con las represiones de actividad encontradas en este tratamiento en ambos tejidos.

De modo similar, la baja actividad polifenoloxidasas en las hojas coincidió con el menor número de isoenzimas. No obstante, el comportamiento de esta enzima resultó interesante, ya que contrasta el escaso efecto de la inoculación sobre la actividad enzimática con la respuesta diferenciada en la expresión de isoenzimas, en particular de la no. 5, que en las hojas fue reprimida por las dos cepas inoculadas y en la raíz solo fue inducida por *G. hoi*-like. Esta discordancia sugiere que, de alguna forma, la isoenzima polifenoloxidasas no. 5 está involucrada directamente en el proceso simbiótico, quizás mediante la síntesis o liberación de fenoles específicos, que pudieran jugar otro papel en la interacción planta-HMA, como ha sido sugerido por Blee y Anderson (31).

En cuanto a la superóxido dismutasa, se destaca la represión de tres isoenzimas por efecto de la inoculación: una en la raíz y otra en las hojas en ambos tratamientos inoculados, así como una en la raíz solo en el inoculado con *G. mosseae*. En este caso, no se cuenta con actividad cuantitativa para establecer una comparación; sin embargo, es notoria la mayor respuesta de las vitroplantas de papa tratadas con esta cepa.

Algunos de estos sistemas enzimáticos fueron estudiados en vitroplantas de café micorrizadas en la fase

in vitro (6) y en papa inoculada con tres cepas de HMA durante la aclimatización (7). Si bien no se puede establecer una comparación detallada, pues las actividades solo fueron analizadas en hojas, además de las diferencias en las condiciones en que se desarrollaron los experimentos, sí resulta curioso el mayor número de isoenzimas peroxidasa y polifenoloxidasas detectadas en ese trabajo, aun cuando la colonización micorrízica era más baja, así como el mayor efecto de la inoculación en la inducción/supresión isoenzimática. Esta discrepancia pudiera deberse principalmente a diferencias en el momento de aplicación del inóculo; al parecer, el hecho que el contacto entre los simbioses se haya producido apenas comenzando a emerger las raicillas de las vitroplantas indujo alteraciones en eventos bioquímicos relacionados con mecanismos de defensa y antioxidantes, no solo en este tejido sino también en las hojas.

Aunque el rol de estas enzimas en la simbiosis micorrízica se desconoce aún, es posible especular con los resultados alcanzados, considerando los diferentes procesos fisiológicos en que participan, tales como: la polimerización oxidativa de fenilpropanoides para producir lignina, la formación de estructuras papilares y el entrecruzamiento de proteínas de pared contribuyendo al reforzamiento de esta, así como la eliminación de especies reactivas de O_2 como el ión superóxido (32, 33). La represión de la actividad peroxidasa y la expresión de isoformas más tenues en raíces inoculadas pueden indicar el establecimiento exitoso de la simbiosis, ya que estos hongos no pueden penetrar las paredes reforzadas por estos compuestos, debido a su incapacidad para degradarlos; de hecho, no se ha detectado deposición de lignina en células que contienen arbusculos (34). Asimismo, la represión de isoformas SOD en las vitroplantas micorrizadas sugiere una producción más baja de radicales tóxicos y, por tanto, un menor estrés durante el período de adaptación de estas vitroplantas a las condiciones naturales.

Los valores superiores en las evaluaciones de los porcentajes de colonización micorrízica y densidad visual, así como en las variables del crecimiento número de hojas y masa fresca aérea, se corresponden con las represiones de la actividad peroxidasa y de la expresión de las isoenzimas analizadas en las vitroplantas inoculadas con la cepa *G. mosseae*.

Se puede concluir que la cepa de HMA *G. mosseae* tuvo un mejor efecto que la cepa *G. hoi*-like, atenuando la situación de estrés que suponen las condiciones artificiales en que se cultivaron las vitroplantas de papa. Esto sugiere la aplicación de esta cepa en la obtención de plantas micropropagadas que sean micorrizadas durante el estadio *in vitro*, las cuales, en principio, tendrían una mayor capacidad de supervivencia y adaptación.

REFERENCIAS

1. Struik, P. C. y Wiersema, S. G. Seed potato technology. Wageningen, Wageningen Press, 1999. 383 p.
2. Rivera, R. /et al./ El manejo efectivo de la simbiosis micorrízica, una vía hacia la agricultura sostenible. Estudio de caso: El Caribe. La Habana, Cuba. 2003.

3. Pozo, M. J.; Cordier, C.; Dumas-Gaudot, E.; Gianinazzi, S.; Barea, J. M. y Azcon-Aguilar, C. Localized versus systemic effect of arbuscular mycorrhizal fungi on defence responses to *Phytophthora* infection in tomato plants. *J. Exp. Bot.*, 2002, vol. 53, p. 525-534.
4. Ruiz-Lozano, J. M. Arbuscular mycorrhizal symbiosis and alleviation of osmotic stress. New perspectives for molecular studies. *Mycorrhiza*, 2003, vol. 13, no. 6, p. 309-317.
5. Rai, M. K. Current advances in mycorrhization and micropropagation. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant.*, 2001, vol. 37, p. 158-167.
6. Fernández, K.; Fernández, F.; González, M.E.; Pérez, E.; Mirabal, L. y Pazos, M. Micorrización *in vitro* de plántulas de *Coffea canephora* var. Robusta: ¿Una realidad? *Cultivos Tropicales*, 2002, vol. 23, no. 3, p. 47-52.
7. Rodríguez, Y.; Quiñones, Y. y Hernández, M.M. Efecto de la inoculación con tres cepas de hongos micorrízicos arbusculares sobre la aclimatización de vitroplantas de papa (*Solanum tuberosum*). *Cultivos Tropicales*, 2006, vol. 27, no. 1, p. 19-24.
8. Fernández, K. Efectos de la micorrización sobre el desarrollo de vitroplantas de papa (*Solanum tuberosum* L. var. Alfa) en estadios *in vitro* y *ex vitro*. (Tesis de Maestría). Universidad de La Habana, 2003. 103 p.
9. Rodríguez, Y.; Noval, B.M. de la; Pérez, E. y Fernández, F. Peroxidase and polyphenoloxidase expression in *sorghum bicolor* roots, inoculated with different arbuscular mycorrhizal fungus species. *Cultivos Tropicales*, 2003, vol. 24, no. 2, p. 23-28.
10. Rodríguez, Y.; Noval, B.M. de la; Fernández, F. y Rodríguez, P. Estudio comparativo del comportamiento de seis cepas de hongos micorrízicos arbusculares en su interacción con el tomate (*Lycopersicon esculentum* M. var Amalia). *Ecología Aplicada*, 2004, vol. 3, no. 1-2, p. 162-171.
11. García-Garrido, J. M. y Ocampo, J. A. Regulation of the plant defence response in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *J. Exp. Bot.*, 2002, vol. 53, p. 1377-1386.
12. Lambais, M. R.; Ríos-Ruiz, W. F y Andrade, R.M. Antioxidant responses in bean (*Phaseolus vulgaris*) roots colonized by arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist*, 2003, vol. 160, p. 421-428.
13. Bécard, G. y Piché, Y. Establishment of vesicular-arbuscular mycorrhiza. En: Root organ culture: Review and proposed methodology. *Methods in Microbiology*, 1992, vol.24, p. 89-108.
14. Gerdemann, J.W. y Nicholson, T.H. Spore of mycorrhizae endogone species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Trans Br. Mycol. Soc.*, 1963, vol. 46, p. 235-244.
15. Elmeskaoui, A.; Damont, J.P.; Piché, Y. /et al./ A culture system for endomycorrhizal inoculation of micropropagated strawberry plantlets *in vitro*. *Mycorrhiza*, 1995, vol. 5, p. 313-319.
16. Phillips, J.M. y Hayman, D.E. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Trans. Br Mycol. Soc.*, 1970, vol. 55, p. 158-161.
17. Herrera, R.A. /et al./ Estrategia de funcionamiento de las micorrizas VA en un bosque tropical. Biodiversidad en Iberoamérica. Ecosistemas, evolución y procesos sociales. En: Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el desarrollo. Subprograma, Diversidad Biológica. Mérida. (12:1995), 1995.
18. Frick, F. Oxidative enzymes. En: Physiological Plant Pathology. Encyclopedia of Plant Pathology. Ed. Heitefuss, R. y Williams, P.H. *New series*, 1976, t. 4, p. 617-627.
19. Alexander, A.G. Sucrose enzyme relationship in immature sugar cane. *J. Agric. of Univ. of P. Rico.*, 1964, vol. 4813, p. 165-231.
20. Barreto, A. y Simón, P. J. Utilización de las isoenzimas como marcadores genéticos en *Saccharum*. *Cultivos Tropicales*, 1979, vol. 1, p. 111-129.
21. Standford, H. A. y Galston, A. W. Ontogeny and hormonal control of polyphenoloxidase isozymes in tobacco pith. *Plant Physiology*, 1970, vol. 46, p. 1505-1512.
22. Iglesias, L. Estudio de la variabilidad morfoagronómica y bioquímica en soya (*Glycine max* L. Merrill). (Tesis de Doctorado), INCA, 1986.
23. Harrison, M. J. Signaling in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Annu. Rev. Microbiol.*, 2005, vol. 59, p. 19-42.
24. Hause, B. y Fester, T. Molecular and cell biology of arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Planta*, 2005, vol. 221, p. 184-196.
25. Fundora, L.R. La biofertilización micorrízica: una alternativa ecológica para producir tomate en condiciones de limitados recursos hídricos. (Tesis de Maestría), INCA, 2007.
26. Scervino, J.M.; Ponce, M.A.; Erra-Bassels, R.; Vierheilig, H.; Ocampo, J.A. y Godeas, A. Flavonoids exhibit fungal species and genus specific effects on the presymbiotic growth of *Gigaspora* and *Glomus*. *Mycol. Res.*, 2005, vol. 109, p. 789-794.
27. Scervino, J.M.; Ponce, M.A.; Erra-Bassels, R.; Vierheilig, H.; Ocampo, J. A. y Godeas, A. Arbuscular mycorrhizal colonization of tomato by *Gigaspora* and *Glomus* species in presence of roots flavonoids. *J. Plant Physiol.*, 2005, vol. 162, p. 625-633.
28. Pérez, E.; Rodríguez, Y.; Hernández, M.A. y Noval, B.M. de la. Dinámica de inducción de algunos sistemas de defensa en la interacción HMA-tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) var. Amalia. II. Inducción y expresión de peroxidasas y polifenoloxidasas en raíces de tomate. *Cultivos Tropicales*, 2004, vol. 25, no. 2, p. 45-52.
29. Pérez, E.; Rodríguez, Y.; Hernández, M. A. y Noval, B. M. de la. Dinámica de inducción de algunos sistemas de defensa en la interacción HMA-tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) var. Amalia. I. Inducción de PR2, PR3 y fenilalanina amonio-liasas en raíces de tomate. *Cultivos Tropicales*, 2004, vol. 25, no. 2, p. 37-44.
30. Llonín, D. y Medina, N. Nutrición mineral con N, P y K en la simbiosis hongos micorrizógenos-tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) en Ferralsol. *Cultivos Tropicales*, 2002, vol. 23, no. 4, p. 83-88.
31. Blee, K. A.; Anderson, A. J. Defense responses in plants to arbuscular mycorrhizal fungi. En: St. Paul, Minn. The American Phytopathological Society. Current advances in mycorrhizae research. Ed. by G.K. Podila, D.D. Douds, 2000. p. 27-44.
32. Quiroga, M.; Guerrero, C.; Botella, M.A.; Barcelo, A.; Amaya, I.; Medina, M.I. y Alonso, J. A tomato peroxidase involved in the synthesis of lignin and suberin. *Plant Physiol.*, 2000, vol. 122, no. 4, p. 1119-1127.
33. Mittler, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*, 2002, vol. 7, p. 405-410.
34. Harrison, M. J. y Dixon, R. A. Isoflavonoid accumulation and expression of defense gene transcripts during the establishment of vesicular-arbuscular mycorrhizal associations in roots of *Medicago truncatula*. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 1993, vol. 6, p. 643.654.

Recibido: 28 de noviembre de 2007

Aceptado: 20 de mayo de 2008