

Inducción de enzimas de defensa en dos variedades de arroz (*Oryza sativa*) por el hongo micorrízico arbuscular *G. mosseae*

Inducing defence enzymes in two rice (*Oryza sativa*) varieties by *G. mosseae* arbuscular mycorrhizal fungus

Yakelín Rodríguez*, Arais Fernández**, Ernestina Solórzano**, Belkis Peteira**, Félix Fernández*

RESUMEN

Entre los beneficios que los hongos micorrízicos arbusculares proporcionan a las plantas se encuentra la protección contra patógenos, fundamentalmente radicales. Por lo que fue objetivo de este trabajo comparar el efecto de uno de estos hongos, *Glomus mosseae*, en la inducción de respuestas de defensa en dos variedades de arroz (*Oryza sativa*), LP-7 y J-104. Para lo cual se determinaron, tanto en tejido radical como foliar, las actividades enzimáticas de peroxidasa, polifenoloxidasas, quitinasa, β -1,3 glucanasa y fenilalanina amonio liasa; así como la expresión isoenzimática de peroxidasas y polifenoloxidasas. También se evaluaron los porcentajes de colonización micorrízica y densidad visual. Los resultados revelaron que el hongo *G. mosseae* provocó variaciones en las actividades enzimáticas evaluadas, donde se observaron diferencias en el comportamiento entre las variedades según el tiempo de evaluación y el área de la planta estudiada. Las diferencias detectadas en los patrones electroforéticos de peroxidasas y polifenoloxidasas se deben a las variedades y no al efecto de la micorrización. En general, la variedad de arroz LP-7 mostró una respuesta satisfactoria a la inoculación con el hongo micorrízico arbuscular *G. mosseae*, manifestando una mayor inducción de mecanismos defensivos, por lo que pudieran alcanzarse los mejores resultados aplicando esta combinación en cuanto a protección del cultivo.

Palabras clave: peroxidasa, polifenoloxidasas, quitinasa, β -1,3 glucanasa y fenilalanina amonio liasa.

ABSTRACT

Protecting plants against fundamentally radical pathogens is one of arbuscular mycorrhizal fungi's benefits. This work was aimed at comparing the effect of one such fungus (*Glomus mosseae*) on inducing a defensive response in two rice (*Oryza sativa*) varieties (LP-7 and J-104). Peroxidase, polyphenoloxidase, chitinase, β -1,3 glucanase and phenylalanine ammonium lyase enzymatic activity and peroxidase and polyphenoloxidase isoenzymatic expression were determined in both radical and foliar tissues. Mycorrhizal colonisation and visual density percentage were also evaluated. The results revealed that the *G. mosseae* fungus caused variations in enzymatic activity. Differences were observed in the two varieties behaviour patterns according to evaluation time and plant area studied. The differences detected in peroxidase and polyphenoloxidase electrophoretic patterns were due to the varieties and not to mycorrhisation effect. Rice variety LP-7 generally presented a successful response to inoculation with the *G. mosseae* arbuscular mycorrhizal fungus, manifesting higher defence mechanism induction. The best results for protecting crops could thus be obtained by using this combination.

Key words: peroxidase, polyphenoloxidase, chitinase, β -1,3 glucanase and phenylalanine ammonium lyase.

Recibido: julio 27 de 2006 Aceptado: septiembre 04 de 2006

* Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas. Carretera de Tapaste, km 3 ½, San José de Las Lajas, La Habana, Cuba. Correo electrónico: yakelin@inca.edu.cu yakelinry@yahoo.com

** Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria. Carretera de Jamaica, San José de Las Lajas, La Habana, Cuba.

INTRODUCCIÓN

El amplio uso de los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) como biofertilizantes en la actualidad está encaminado a promover la sostenibilidad de los sistemas agrícolas desde el punto de vista productivo, ecológico, económico y social, premisas de la agricultura orgánica; principalmente si tenemos en cuenta los precios tan elevados de los productos químicos, la ineficacia en algunos casos de éstos y la contaminación ambiental que afecta al hombre, animales y plantas. Estos microorganismos rizosféricos proporcionan numerosos beneficios a las plantas que colonizan, entre ellos estimula el crecimiento en suelos con bajo contenido de nutrientes por lo que aumentan los rendimientos del cultivo, confiere cierta protección contra patógenos radicales y favorece la absorción de nutrientes minerales y del agua (Linderman, 1994; Pozo, et ál., 1999; García-Garrido and Ocampo, 2002).

Por otra parte, entre los factores que afectan la producción arrocera en Cuba se encuentra el ataque de plagas y enfermedades, además de los daños ocasionados por las condiciones ambientales adversas. Para tratar de dar solución a este problema se ha trabajado en la obtención de nuevas variedades más resistentes, fue así como surgió la variedad LP-7, obtenida por el Departamento de Mejoramiento Genético del Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA). Esta variedad se destaca por su buen rendimiento en diferentes áreas afectadas por la salinidad donde ha sido evaluada, superando a la J-104 que tiene su mismo ciclo y es la más extendida en el país, mostrando además, adecuado comportamiento ante el ataque de *Sterneotarsonemus spinki* Smiley y resistencia intermedia a *Pyricularia grisea* Sacc (González, et ál., 2002).

En este contexto, la inoculación con los HMA podría ser una alternativa que potencie el uso de estas nuevas variedades, así como el de las variedades comerciales en explotación, entre las cuales se destaca la J-104 que es susceptible a un gran número de patógenos. El exitoso establecimiento y funcionamiento de esta simbiosis pudiera revertirse en un incremento de los rendimientos agrícolas e influir positivamente en la respuesta de las plantas al ataque de patógenos.

Estos hongos al interactuar con las plantas provocan cambios citológicos y metabólicos en las células hospederas, estando asociadas algunas de las modificaciones bioquímicas con alteraciones en los niveles de ciertos compuestos secundarios y enzimas involucradas en la defensa; aunque la respuesta es de menor magnitud en comparación con la patogénica, además de ser transiente (Salzer and Boller, 2000). Entre estas enzimas se destacan las peroxidasas, polifenoloxidasas, quitinasas, β -1,3 glucanasas y fenilalanina amonio liasas (PAL), cuyas actividades y expresión en algunos casos se ha detectado que sufren variaciones en raíces micorrizadas de tomate, alfalfa, frijol y ajo (Blee and Anderson, 1996; Harrison and Dixon, 1993; Pozo, et ál., 1998; Spanu and Bonfante-Fasolo, 1988; Spanu, et ál., 1989).

Por lo que fue objetivo del presente trabajo estudiar la inducción de mecanismos de defensa en dos variedades de arroz (J104 y LP7) al ser inoculadas con el HMA *Glomus mosseae*, a través del comportamiento de cinco sistemas enzimáticos (peroxidasas, polifenoloxidasas, quitinasas, β -1,3 glucanasas y PAL) y la expresión isoenzimática de peroxidasas y polifenoloxidasas, en la etapa donde más frecuentemente ocurre la invasión de patógenos en este cultivo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material fúngico y vegetal

Para la realización del experimento se utilizaron plántulas de arroz de las variedades J-104 y LP-7, cuyas semillas fueron suministradas por la Estación Experimental de Arroz "Los Palacios", Pinar del Río, y por el Departamento de Mejoramiento Genético del INCA, La Habana, respectivamente. El HMA inoculado fue *Glomus mosseae* (Nicol. & Gerd emendado por Gerdeman & Trappe), procedente del cepario del INCA (INCAM 2). Además, se estudió un tratamiento control sin inocular de cada variedad de arroz.

La siembra se efectuó en cajuelas metálicas (75 cm x 50 cm x 10 cm) que contenían una mezcla de suelo ferralítico rojo (Hernández, et ál., 1999) y cachaza en la proporción 1:1 (v:v), estériles ambos, empleando la técnica de recubrimiento de las semillas con un 10% de inóculo respecto al peso seco de las mismas. El inóculo poseía 250 esporas g⁻¹.

Condiciones de crecimiento y muestreo

Las plántulas crecieron en condiciones semicontroladas de casa de cristal a temperatura de 23 °C +/- 2 °C, humedad relativa entre 80-85% e iluminación natural, siendo fertilizadas con nitrógeno (urea) a los 15 y 28 días de germinadas, a razón de 10 g por cajuela.

La toma de muestras se realizó a los 30 y 35 días de germinadas las semillas que es el período más susceptible de sufrir ataques de patógenos fúngicos. Tanto en la zona aérea como radical se determinaron las actividades enzimáticas de peroxidasas, polifenoloxidasas, quitinasas, β 1-3 glucanasas y PAL; así como los patrones isoenzimáticos de peroxidasas y polifenoloxidasas.

Evaluaciones fúngicas

Aproximadamente 200 mg de raicillas fueron cuidadosamente lavadas, secadas a 70 °C y tenidas según Phillips and Hayman, (1970) para analizar los porcentajes de colonización micorrízica y densidad visual mediante el procedimiento descrito por Herrera, (1995).

La determinación de la densidad visual se basa en la evaluación de la intensidad de la colonización en seis niveles (0-5), para cada intercepto y se calculó según la ecuación:

$$\%DV = \frac{\sum Z}{\sum A}$$

donde: Z es el número de interceptos contados en cada nivel

A es el porcentaje de intensidad de la colonización

$$A_0 = Z_0 * 0\%, \quad A_1 = Z_1 * 1\%, \quad A_2 = Z_2 * 2.5\%, \\ A_3 = Z_3 * 15.5\%, \quad A_4 = Z_4 * 35.5\%, \quad A_5 = Z_5 * 47.5\%$$

Extracción y cuantificación de proteínas

La obtención del extracto enzimático foliar y radical se realizó según el protocolo descrito por Solórzano (1997), procesándose tres réplicas en cada caso. El material vegetal se maceró en nitrógeno líquido y se homogenizó con solución amortiguadora de extracción (acetato de sodio 0.1

M pH 5.2 conteniendo polivinilpirrolidona 5% y β -mercaptoetanol 0.05%), en proporción 1:1 (p:v). El homogenato se agitó en zaranda durante 45 min. en baño de hielo. Posteriormente se filtró a través de cuatro capas de gasa y se centrifugó a 14 000 gravedades a 4 °C durante 25 min. en centrífuga refrigerada (Beckman, modelo J2-21). El sobrenadante obtenido se usó para determinar las actividades enzimáticas y para el análisis de isoenzimas. La concentración de proteínas se determinó por el método de Bradford (Bradford, 1976) en un espectrofotómetro (Ultraspec 2100 pro).

Actividad peroxidasa

La cuantificación de esta actividad se realizó según método continuo descrito por Frick (1976), donde se utilizaron como sustratos el guayacol y el peróxido de hidrógeno. Para ello se determinó la velocidad de la reacción de oxidación del guayacol por la enzima, en presencia de peróxido de hidrógeno, midiendo la absorbancia a 470 nm (zona del espectro donde absorbe el guayacol oxidado de coloración carmelita). Se tomó la variación de densidad óptica en el tiempo ($\Delta D.O.$)/(Δt), durante un minuto a intervalos de 5 segundos.

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

$$\text{Actividad enzimática} = \frac{\Delta D.O. \cdot 1}{\Delta t} \cdot \frac{\text{Vens}}{k} \cdot \text{dil.}$$

Donde: k es el coeficiente de extinción molar del guayacol que es $5570 \times 10^{-6} \mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1}$

Vens- el volumen del ensayo,

Venz- el volumen de enzima

dil- la dilución de la muestra.

La actividad enzimática se expresó como $\mu\text{moles de producto formado/ min/ mL enz.}$

Polifenoloxidasas

Para la determinación de esta actividad enzimática se procedió según el método continuo descrito por Alexander (1964), donde el sustrato empleado fue el pirogallol. La velocidad de la reacción de oxidación del pirogallol por la enzima, se registró a 420 nm (donde absorbe el pirogallol oxi-

dado de coloración amarilla). Al igual que en la actividad peroxidasa, la variación de densidad óptica en el tiempo ($\Delta D.O./(\Delta t)$) se determinó durante un minuto a intervalos de 5 segundos, la actividad enzimática se calculó de la misma forma y se expresó como $\Delta D.O. / \Delta t / \text{min} / \text{mL enz}$, al no contar con el coeficiente de extinción molar del pirogallol.

Quitinasa

La actividad quitinasa se determinó según el método colorimétrico, discontinuo, descrito por Boller, et ál. (1983), donde se utilizó como sustrato la quitina coloidal obtenida a partir de quitina (reactivo Fluka). La misma fue medida a 585 nm. Para realizar la curva patrón se utilizó una solución de n-acetil glucosamina (1 mg. mL^{-1}), a partir de la cual se prepararon las diluciones, a las que se les realizó el mismo procedimiento. Posteriormente, la actividad se calculó según la expresión:

$$\text{Actividad enzimática} = \frac{D.O. \text{ Cot.} \cdot \text{Vens.} \cdot \text{dil.}}{t.\text{incub.} \cdot \text{Venz}}$$

Donde t incub. es el tiempo de incubación del ensayo

Cot es la cotangente de la curva patrón.

Se expresó como $\mu\text{moles de producto formado} / \text{min} / \text{mL enz}$.

β -1,3 glucanasa

Para la determinación de esta actividad se mezcló 50 μL de laminarin (β -1,3 glucano) (2 mg. mL^{-1}) y 50 μL del extracto enzimático, incubándose durante 30 min. en baño a 37°C . Posteriormente se cuantificaron los azúcares reductores formados a 660 nm según el método propuesto por Somogyi (1952). La curva patrón se realizó con el uso de glucosa (1 mg. mL^{-1}) como estándar, a partir de la cual se prepararon soluciones con distintas concentraciones.

El cálculo y la expresión de esta actividad fueron igual que para la quitinasa, determinando primero la diferencia entre los azúcares reductores formados y presentes en cada extracto.

Fenilalanina amonio liasa (PAL)

La actividad PAL fue cuantificada según el método discontinuo propuesto por Paynet, et ál.

(1971), que utiliza como sustrato la fenilalanina. En este caso la velocidad de la reacción se calculó a partir de las lecturas de absorbancia a 275 nm, donde se mide el ácido cinámico formado. Este mismo reactivo fue utilizado para hacer la curva patrón.

El cálculo y la expresión de esta actividad fueron igual que para la quitinasa.

La actividad específica en todos los casos se determinó de la siguiente forma:

$$\text{Act. Específica} = \text{Actividad enzimática} / \text{concentración de proteína}$$

Y se expresó como $\text{UAE. mg proteína}^{-1}$.

Análisis estadístico

Los datos del porcentaje de colonización micorrízica fueron transformados por la función $2\text{arcsen}\sqrt{x}$. Los mismos, además de los de densidad visual y actividades específicas fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA) de clasificación simple siguiendo un diseño completamente aleatorizado. Las medias con diferencias significativas se compararon según el test de Rangos Múltiples de Duncan $_{0.05}$. Para el procesamiento estadístico se utilizó el *software* SPSS, versión 7.5.

Estudio de los patrones isoenzimáticos

Se analizó la expresión de las isoenzimas peroxidadas y polifenoloxidasas. Las electroforesis en geles de poliacrilamida (reactivo Fluka) en condiciones no desnaturizantes fueron realizadas en equipo de electroforesis vertical minigel (BIORAD), según metodología desarrollada por Maribona, et ál. (1983) con las siguientes modificaciones: gel concentrador 4% y gel separador 7,5%. Se emplearon separadores de 0.75 mm.

En cada pocillo se depositó 10 μg de proteína por muestra, las cuales contenían en su solución amortiguadora glicerol al 0.05% y una pizca de bromofenol azul, este último empleado para marcar el frente de corrida.

Las electroforesis se corrieron a 25 mA, durante 60 - 90 minutos a 4°C . Se utilizó como solución

amortiguadora de corrida Tris - Glicina 19 mM pH 8.3. Posteriormente se realizaron las determinaciones para las diferentes isoenzimas y las electroforesis fueron repetidas tres veces para cada una.

Los geles se fotografiaron con una cámara Nikon F90X y se utilizó una película Konica (100 asa), posteriormente las fotos fueron escaneadas (Acer Slim6).

Peroxidasas

Para la tinción se procedió según lo reportado por Barreto and Simón, (1979). El gel se sumergió en 50 mL de una solución que contenía 5 mL de ácido acético glacial, 0.125 g de benzidina dihidroclórica y 0.5 mL de peróxido de hidrógeno, hasta la aparición de bandas azules entre los 5 - 10 minutos.

Polifenoloxidasas

En la tinción se utilizaron 0.05 g de L-Prolina y 0.1 g de dihidroxifenilalanina (DOPA) disueltos en 50 mL de solución amortiguadora fosfato de sodio 0.1 M pH 6.5 según Standford and Galston, (1970). Para la aparición de las bandas carmelitas se incubó en la oscuridad durante 2 - 3 horas.

Para detener ambas reacciones se utilizó ácido acético al 10% y los geles se lavaron con agua destilada.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Colonización fúngica

En la tabla 1 se muestran los porcentajes de colonización micorrízica y de densidad visual de los tratamientos evaluados en el presente estudio, donde no se observó presencia fúngica en las plantas controles puesto que las mismas no fueron inoculadas con el hongo, el sustrato utilizado se esterilizó previamente y las semillas fueron desinfectadas superficialmente antes de la siembra.

Los tratamientos inoculados no mostraron diferencias significativas en el porcentaje de colonización micorrízica con valores de 24 y 26%, sin embargo en la densidad visual se observaron diferencias significativas alcanzando el valor superior la variedad LP-7 inoculada, con un 0.45%. Estos resultados demuestran que las plantas de arroz se micorrizaron en los tratamientos donde se inoculó el hongo, mostrando las raíces de la variedad LP-7 una mayor ocupación fúngica, posiblemente propiciado por las propias condiciones en que se desarrolló el estudio.

Actividades enzimáticas en el tejido radicular

Peroxidasas y polifenoloxidasas

La actividad peroxidasa (PX) (figura 1) en las raíces inoculadas con el HMA, a los 30 días aumentó para ambas variedades destacándose la

Tabla 1. Porcentajes de colonización micorrízica y densidad visual en raíces de arroz controles e inoculadas con el HMA *Glomus mosseae*, a los 30 días después de la germinación.

Tratamientos	% Colonización micorrízica	% Densidad visual
Control LP-7	0b	0c
LP-7 + MA	26±0.014a	0.45±0.006a
Control J-104	0b	0c
J-104 + MA	24±0.009a	0.33±0.008b
Sig.	*	*

Medias seguidas por letras comunes no presentan diferencias significativas según la prueba de Duncan _{0.05}.

J-104; mientras que a los 35 días en la variedad LP-7 disminuyó y en la J-104 aumentó triplicando el valor de las plantas controles.

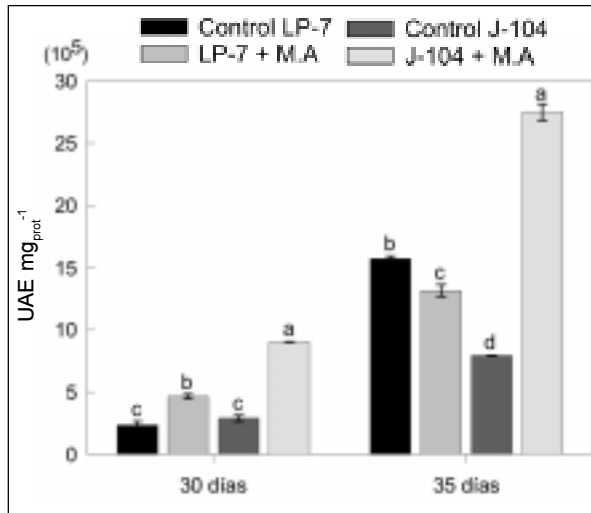


Figura 1. Actividad específica peroxidasa en raíces de dos variedades de arroz (LP-7 y J-104) controles e inoculadas con el HMA *Glomus mosseae*, a los 30 y 35 días después de la germinación.

Barras con letras comunes no presentan diferencias significativas según la prueba de Duncan _{0,05}.

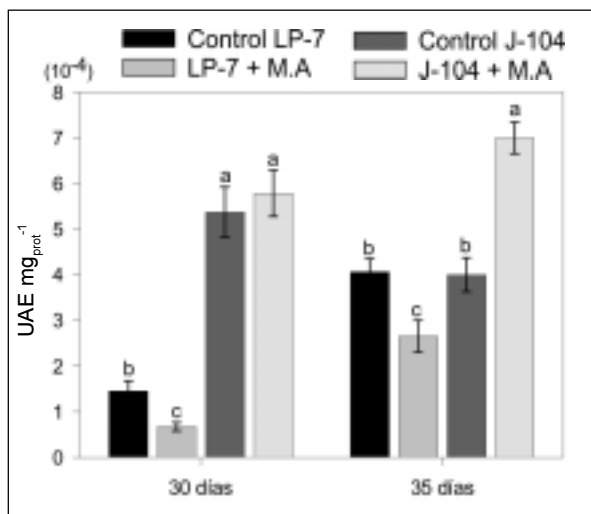


Figura 2. Actividad específica polifenoloxidasas en raíces de dos variedades de arroz (LP-7 y J-104) controles e inoculadas con el HMA *Glomus mosseae*, a los 30 y 35 días después de la germinación.

Barras con letras comunes no presentan diferencias significativas según la prueba de Duncan _{0,05}.

En cambio la actividad específica polifenoloxidasas (PPO) (figura 2), a los 30 días, disminuyó en las raíces micorrizadas de la variedad LP-7 y no se

observaron diferencias significativas entre los valores de las raíces inoculadas y sin inocular de la variedad J-104. A los 35 días el comportamiento fue similar al de la actividad peroxidasa, mostrando las raíces micorrizadas una disminución en la variedad LP-7 y un incremento en la J-104.

Las enzimas PXs (EC 1.11.1.7) y PPOs (EC 1.10.3.1 y EC 1.10.3.2) forman parte del sistema antioxidante de las plantas, estando involucradas en el proceso de reconocimiento y en la defensa frente a cualquier situación estresante para las mismas. La participación de ambos sistemas ha sido descrita tanto en interacciones patogénicas (García-Garrido and Ocampo, 2002; Kazan, et ál., 1998; Solórzano, et ál., 2004), como en las mutualistas, tal es el caso de la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa (Salzwedel and Dazzo, 1993) así como la formación de ectomicorrizas (Albrecht, et ál., 1994).

En cuanto a las asociaciones micorrízicas arbusculares la mayoría de los trabajos realizados muestran incrementos de estas enzimas, de carácter transitorio y localizado en raíz, en etapas iniciales de la colonización de diferentes cultivos (Fries, et ál., 1996; Ikram, et ál., 1998; Spanu and Bonfante-Fasolo, 1988). Sin embargo, algunos autores han encontrado aumentos en las actividades PX y PPO radical en estadios avanzados de la simbiosis, fundamentalmente en tomate (Mathur and Vyas, 1995; Pérez, et ál., 2004a; Rodríguez, et ál., 2001).

En este trabajo las evaluaciones se realizaron en un período avanzado, donde el hongo debe encontrarse ya establecido en el sistema radical, aunque el proceso de colonización puede acortarse o extenderse en dependencia de la cepa fúngica, del cultivo y la variedad estudiados.

Los incrementos observados, fundamentalmente en la actividad PX, en las plantas micorrizadas, parecen ser producto de la respuesta típica de la planta ante la llegada de un agente, en principio, "extraño". Dicha respuesta involucra la síntesis de especies reactivas de oxígeno como radicales superóxido (O₂⁻) y peróxido de hidrógeno (H₂O₂), que constituyen en bajas concentraciones moléculas señales pero en mayores concentraciones resultan altamente tóxicos para la célula (Doke, et ál., 1996), específicamente las PXs actúan eliminando estos compuestos. Los incrementos

superiores detectados en las plantas de la variedad J-104 sugieren que la colonización de su sistema radical por parte del hongo estudiado supone una mayor condición estresante, lo cual apunta hacia una menor compatibilidad de esta variedad con la cepa *G. mosseae*.

Por otra parte, es necesario destacar los distintos procesos fisiológicos en los que parecen estar implicadas ambas enzimas, como son el reforzamiento de la pared celular por la deposición de lignina y suberina, la acumulación de polifenoles, la formación de estructuras papilares y el entrecruzamiento de proteínas de pared (Pozo, 1999; Quiroga, et ál., 2000).

Según lo anterior, el hecho que las actividades PX y PPO disminuyan, en general, para la variedad LP-7, resulta conveniente para garantizar el éxito de la simbiosis y sugiere una mayor compatibilidad de esta variedad con la cepa fúngica inoculada.

Quitinasas y β -1,3 glucanasas

En la actividad quitinasa (figura 3) a los 30 días, las raíces micorrizadas y sin micorrizar de ambas variedades no presentaron diferencias significativas. Sin embargo, a los 35 días se encontró un aumento de la actividad en las dos variedades, provocado por el hongo, el cual fue mayor en la variedad J-104.

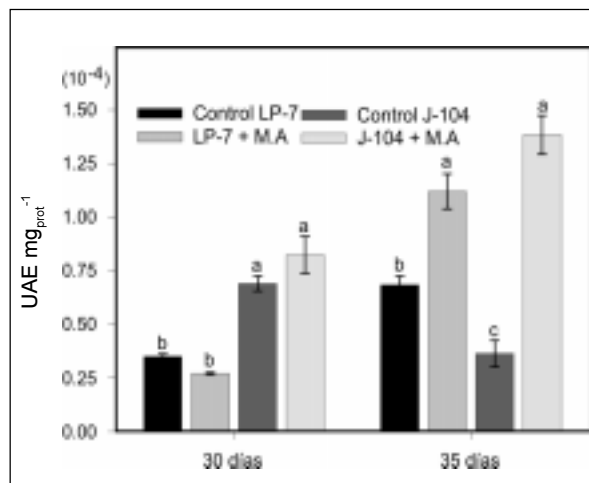


Figura 3. Actividad específica quitinasa en raíces de dos variedades de arroz (LP-7 y J-104) controles e inoculadas con el HMA *Glomus mosseae*, a los 30 y 35 días después de la germinación.

Barras con letras comunes no presentan diferencias significativas según la prueba de Duncan _{0,05}.

La actividad β -1,3 glucanasa en raíz (figura 4) se comportó de forma muy similar a la quitinasa en ambos periodos evaluados, coincidiendo, además, que los valores en las plantas de la variedad LP-7 fueron inferiores a los de la J-104 para las dos actividades a los 30 días. La única diferencia detectada fue que el incremento de esta actividad a los 35 días en las raíces micorrizadas fue mayor para la variedad LP-7.

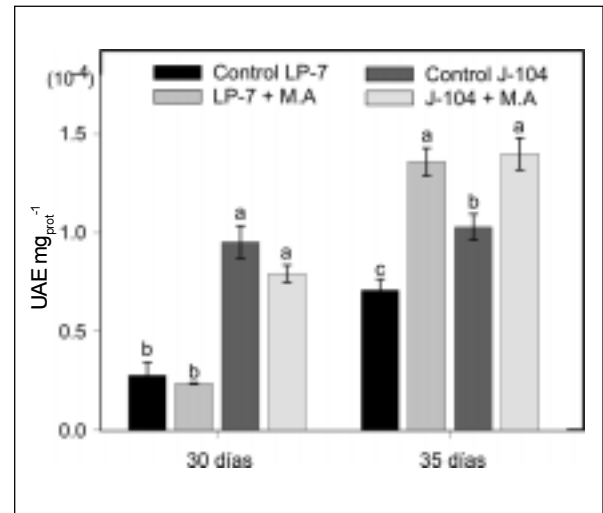


Figura 4. Actividad específica β -1,3 glucanasa en raíces de dos variedades de arroz (LP-7 y J-104) controles e inoculadas con el HMA *Glomus mosseae*, a los 30 y 35 días después de la germinación.

Barras con letras comunes no presentan diferencias significativas según la prueba de Duncan _{0,05}.

Las enzimas quitinasas (EC 3.2.1.14) y β 1,3-glucanasas (EC 3.2.1.39) pertenecen a la familia de las hidrolasas, catalizando la hidrólisis de la quitina y los β -1,3-glucanos, respectivamente. Estos polisacáridos constituyen componentes fundamentales de la estructura de la pared celular de los hongos, de ahí que se le atribuya a ambas enzimas un carácter antifúngico (Graham L.S. and Sticklen M.B. 1994).

Como se puede apreciar en los gráficos de estas dos actividades (figuras 3 y 4), estas enzimas presentan cierta actividad constitutiva, lo que no se contradice con la importante función protectora que realizan en las plantas ante los ataques de fitopatógenos, puesto que algunos autores han encontrado resultados similares en diversos tejidos vegetales (Collinge, et ál., 1993; Robertus and Hart,

1995), por lo que se deduce su participación en procesos de morfogénesis y en el desarrollo y crecimiento de plantas sanas (Suárez, et ál., 1998).

La inoculación con el hongo micorrízico arbuscular *G. mosseae* causó la inducción de las actividades quitinasa y β 1,3-glucanasa en las raíces de ambas variedades de arroz, que a pesar de manifestarse sólo en el segundo período evaluativo (35 días), es favorable para estas plantas ya que supone una predisposición de las mismas para enfrentar alguna invasión de patógenos fúngicos que pudiera producirse en la raíz. El comportamiento similar que exhiben ambos sistemas enzimáticos no es sorprendente debido a la estrecha relación funcional que poseen.

Autores como Pérez, et ál. (2004b) y Rodríguez, et ál. (2004) realizaron dinámicas de estas actividades enzimáticas, en tomate, y detectaron un comportamiento cíclico de inducción/represión, esto concuerda con los resultados del presente estudio, pudiendo constituir la respuesta encontrada uno de estos ciclos. Dichos autores relacionaron este comportamiento con cada ciclo re infectivo del hongo, donde cada uno involucraría estimulación de estas actividades seguido de represión.

Es necesario añadir que, en raíces micorrizadas, los incrementos en estas dos enzimas han sido asociados con otras funciones como el control del desarrollo del hongo dentro de la raíz, con la morfogénesis de las distintas estructuras fúngicas durante el establecimiento de la colonización y con la degradación de estructuras fúngicas colapsadas tales como los arbusculos (Bonfante – Fasolo, 1988; Lambais and Mehdy, 1993). De igual forma podrían participar en la degradación parcial de la pared vegetal, facilitando la penetración; así como en la degradación de compuestos que normalmente se acumulan en las interacciones patogénicas, en caso de formarse (Lambais, 2000).

Fenilalanina amonio liasa (PAL)

En cuanto a la actividad PAL (figura 5) en raíz a los 30 días, se observó que para la variedad LP-7 decreció en el tratamiento micorrizado y en la J-104 no mostró diferencias significativas. A los 35 días esta actividad manifestó la misma tendencia que en

los dos sistemas expuestos anteriormente, mostrándose incrementos en las dos variedades por efecto de la micorrización.

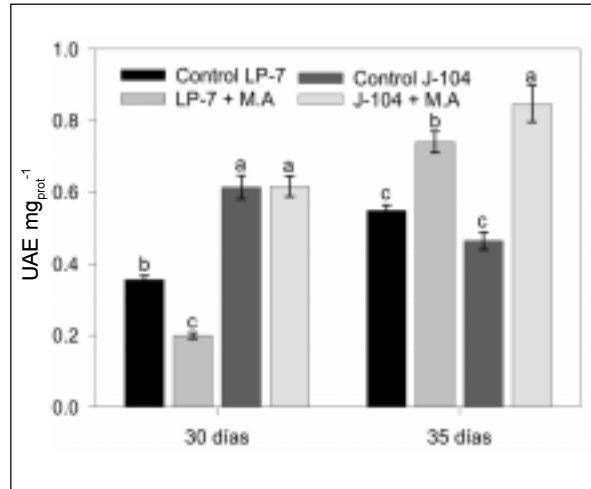


Figura 5. Actividad específica fenilalanina amonio liasa en raíces de dos variedades de arroz (LP-7 y J-104) controles e inoculadas con el HMA *Glomus mosseae*, a los 30 y 35 días después de la germinación.

Barras con letras comunes no presentan diferencias significativas según la prueba de Duncan _{0.05}*

La PAL (EC 4.3.1.5) pertenece a la clase de las liasas y cataliza la primera reacción de la biosíntesis de los fenilpropanoides en plantas superiores (Lister, et ál., 1996). Entre estos compuestos se encuentran la lignina, suberina, fitoalexinas, flavonoides y compuestos fenólicos en general, cuya síntesis y acumulación es parte de la estrategia desarrollada por las plantas para evitar la invasión de patógenos; siendo, por tanto, la inducción de esta enzima relevante en los mecanismos de defensa (Espinosa - Victoria, 2000).

Autores como Volpin, et ál. (1994) encontraron inducción de esta actividad en raíces micorrizadas de alfalfa y lo asociaron con la penetración del hongo en la raíz, al parecer como respuesta de la planta ante la llegada de este microorganismo, en principio, "extraño". De hecho, Blee and Anderson, 1996 observaron acumulación de transcritos de ARNm de esta enzima sólo en las células que contenían arbusculos. Estos resultados concuerdan con los incrementos detectados en este estudio.

Sin embargo, los niveles de actividad y transcritos de PAL en raíces micorrizadas son infe-

riores a los obtenidos en plantas inoculadas con patógenos, al punto que no interfieren en el éxito de la colonización; siendo favorable para las plantas de arroz mantener una cierta activación de ésta y otras enzimas defensivas, pues así se encuentran mejor preparadas para contrarrestar algún ataque de patógenos que pudiera producirse o responder favorablemente ante cualquier situación estresante, condición que propicia la micorrización.

Actividades enzimáticas en el tejido foliar

La actividad PX en hojas (figura 6) de la variedad de arroz LP-7, a los 30 días, no presentó diferencias significativas, pero a los 35 días decreció en las plantas micorrizadas. En la variedad J-104 sucedió lo contrario, en el primer período evaluativo disminuyó considerablemente y en el segundo no se manifestaron diferencias entre el tratamiento inoculado y sin inocular.

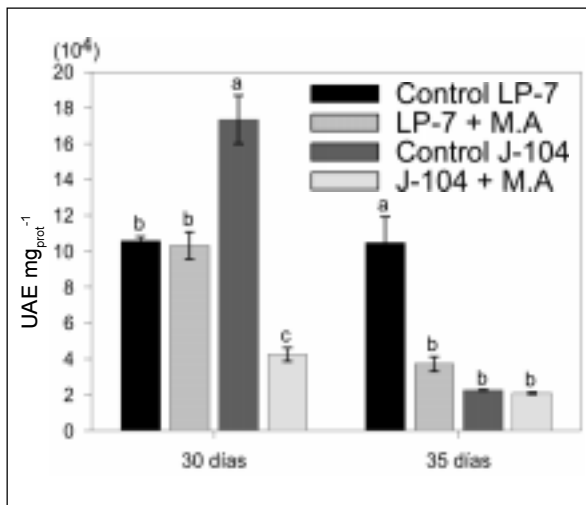


Figura 6. Actividad específica peroxidasa en hojas de dos variedades de arroz (LP-7 y J-104) controles e inoculadas con el HMA *Glomus mosseae*, a los 30 y 35 días después de la germinación.

Barras con letras comunes no presentan diferencias significativas según la prueba de Duncan _{0,05}.

En cuanto a la PPO (figura 7) a los 30 días no se observaron diferencias significativas entre las plantas micorrizadas y las controles, sin embargo a los 35 días se produjo un incremento en la variedad J-104.

Las escasas variaciones observadas en estas dos actividades, entre los tratamientos inoculados

y sin inocular, sugieren que no hubo prácticamente efecto de la micorrización sobre el sistema antioxidante en hojas; lo cual indica que el establecimiento de la colonización micorrízica no provocó un aumento de los procesos oxidativos en las hojas de arroz de las dos variedades estudiadas y, por tanto, no deben producirse los daños celulares que cualquier situación estresante puede ocasionar.

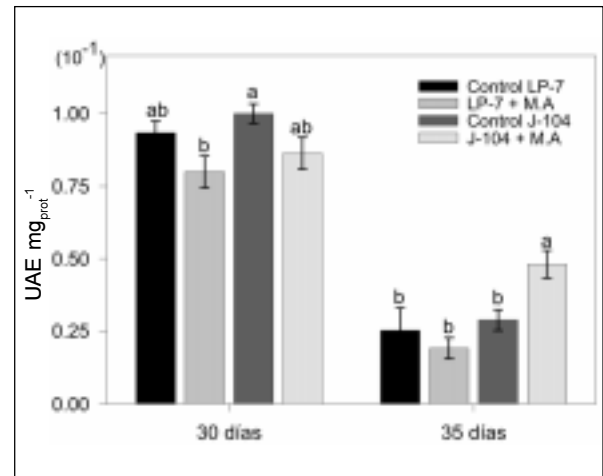


Figura 7. Actividad específica polifenoloxidasas en hojas de dos variedades de arroz (LP-7 y J-104) controles e inoculadas con el HMA *Glomus mosseae*, a los 30 y 35 días después de la germinación.

Barras con letras comunes no presentan diferencias significativas según la prueba de Duncan _{0,05}.

Además, los cambios detectados consistieron fundamentalmente en disminuciones marcadas de la actividad PX (figura 6) y un ligero incremento de la actividad PPO (figura 7), resultados que reafirman la idea anterior.

La actividad quitinasa (figura 8) en las plantas inoculadas de ambas variedades se incrementó ligeramente en el primer período de evaluación, pero en el segundo fue notable el aumento observado en la variedad LP-7 mientras que la J-104 no mostró diferencias significativas.

El comportamiento de la actividad β -1,3 glucanasa (figura 9) fue similar al de la quitinasa incrementándose en las plantas micorrizadas de ambas variedades a los 30 días, aunque fue más acentuado en la LP-7. A los 35 días sólo hubo au-

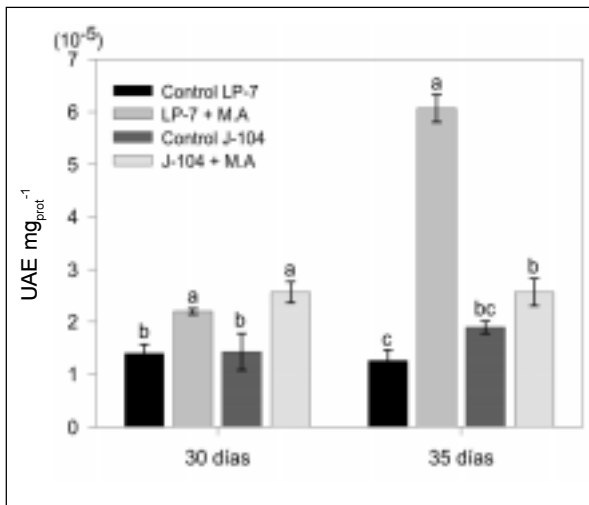


Figura 8. Actividad específica quitinasa en hojas de dos variedades de arroz (LP-7 y J-104) controles e inoculadas con el HMA *Glomus mosseae*, a los 30 y 35 días después de la germinación.

Barras con letras comunes no presentan diferencias significativas según la prueba de Duncan _{0.05}.

mento de esta actividad en las plantas de la variedad LP-7, la J-104 no presentó diferencias significativas.

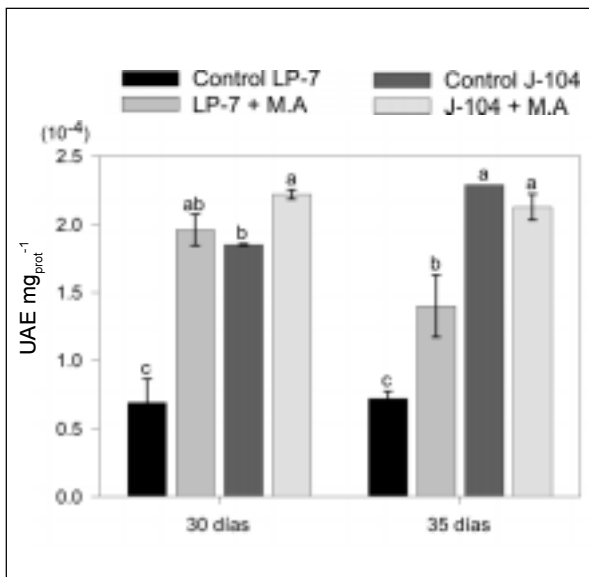


Figura 9. Actividad específica β-1,3 glucanasa en hojas de dos variedades de arroz (LP-7 y J-104) controles e inoculadas con el HMA *Glomus mosseae*, a los 30 y 35 días después de la germinación.

Barras con letras comunes no presentan diferencias significativas según la prueba de Duncan _{0.05}.

En el caso de la actividad PAL (figura 10) a los 30 días se produjo un incremento en las plantas micorrizadas de la variedad LP-7 y un decremento en la J-104, en el segundo periodo evaluativo aumentó en ambas variedades siendo superiores los valores en la J-104.

Los incrementos observados por efecto de la micorrización, en las tres actividades expuestas anteriormente, superiores en la variedad LP-7 en general, sugieren que estas plantas están mejor preparadas fisiológicamente para enfrentar una invasión patogénica que pudiera producirse por la parte aérea, de forma similar a lo que ocurre en raíz. Esto se debe al importante y conocido papel que juegan estas enzimas en la defensa y que el hongo micorrízico inoculado fue capaz de inducir tanto en raíz como en hojas.

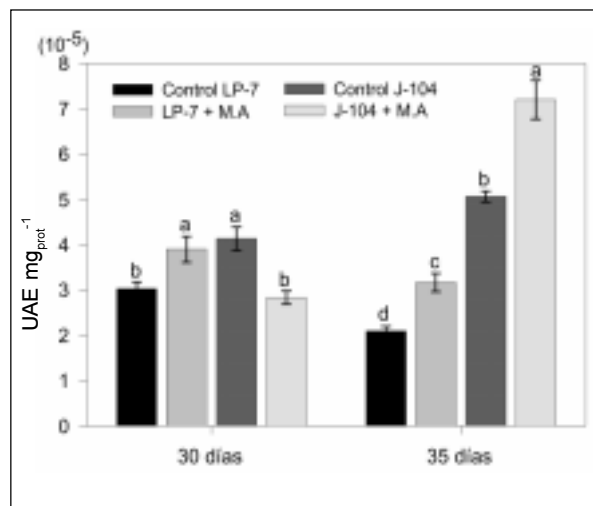


Figura 10. Actividad específica fenilalanina amonio liasa en hojas de dos variedades de arroz (LP-7 y J-104) controles e inoculadas con el HMA *Glomus mosseae*, a los 30 y 35 días después de la germinación.

Barras con letras comunes no presentan diferencias significativas según la prueba de Duncan _{0.05}.

Las diferencias de las actividades enzimáticas analizadas en el tejido foliar, entre los controles y los tratamientos inoculados, indican que se manifestó una respuesta sistémica, puesto que estos cambios se produjeron en sitios alejados de la zona colonizada, la raíz. Además, es importante resaltar que la respuesta de la planta está en dependencia de su compatibilidad con la cepa fúngica implicada, o sea, cada variedad puede mostrar diferente gra-

do de aceptación, pudiéramos decir, con el hongo en cuestión.

Existen algunas evidencias que apuntan hacia la inducción de estas enzimas defensivas en tomate, detectándose variaciones en sus actividades en hojas (Solórzano, et ál., 2001; Rodríguez, et ál., 2004).

Los resultados de este trabajo evidencian que las respuestas inducidas en las plantas micorrizadas exhiben patrones paralelos a la causada por bacterias y hongos no patógenos (Cordier, et ál., 1996; St-Arnaud, et ál., 1997). Así, de forma análoga, las fitohormonas pudieran participar como señales en la simbiosis micorrízica arbuscular, ya que son consideradas posibles mediadores en los efectos sistémicos dada su capacidad de ser transportadas a través del sistema vascular.

De hecho se han observado alteraciones en los niveles hormonales en plantas micorrizadas, ejemplo de ello lo constituyen el etileno, las citoquininas y algunas auxinas como los ácidos indolacético, indolbutírico y abscísico (Besner, and Koide, 1999; Danneberg, et ál., 1992; Ludwig – Müller, 2000), pudiendo estar involucradas en el proceso de señalización que conlleva a la respuesta defensiva.

Lo expuesto anteriormente indica la existencia de múltiples mecanismos de intercambio de señales entre la planta y el hongo, que son específicas de este tipo de simbiosis y presentan particularidades en dependencia de la interacción planta-cepa de HMA involucradas. Esto se refleja en los valores diferenciales en las actividades enzimáticas locales y/o sistémicas encontradas en este estudio.

Expresión de isoenzimas

Peroxidasas y polifenoloxidasas

Se observaron 9 isoenzimas de peroxidadas en hojas (figura 11) y 7 en raíz (figura 12), mientras que en polifenoloxidasas se detectaron 2 isoenzimas en hojas (figura 13) y 4 en raíz (figura 14). No se encontró inducción de una nueva isoforma por efecto de la inoculación con el HMA

G. mosseae, siendo las diferencias detectadas debidas a las variedades de arroz y no al efecto de la micorrización.

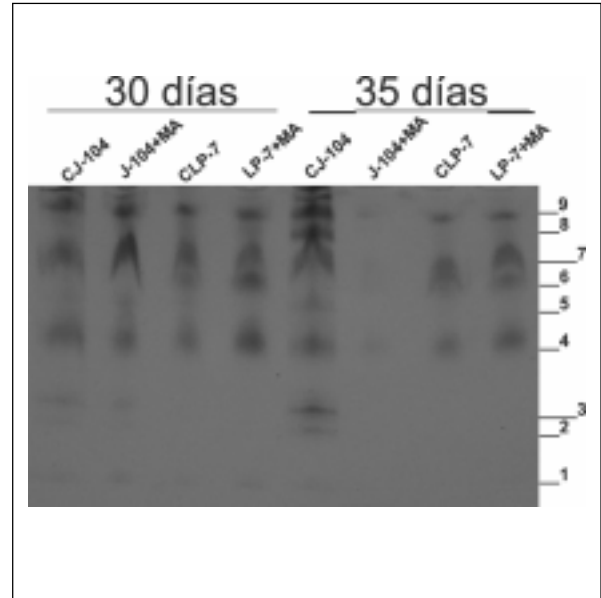


Figura 11. Patrón isoenzimático de peroxidadas en hojas de dos variedades de arroz (J-104 y LP-7), controles (C) e inoculadas con el HMA *Glomus mosseae* (+MA), a los 30 y 35 días después de la germinación.

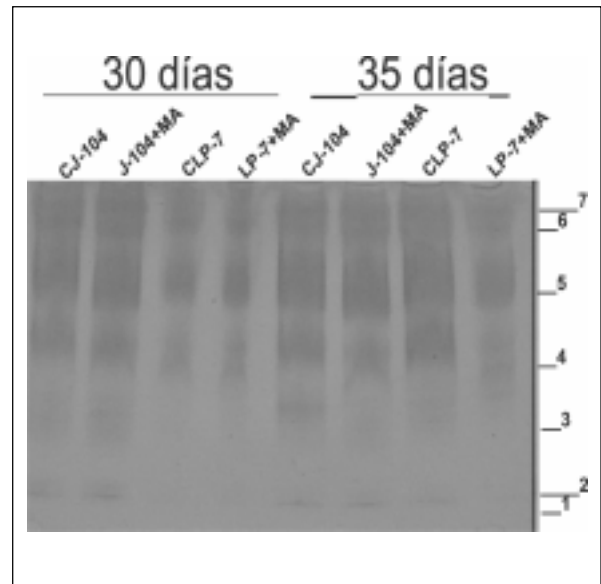


Figura 12. Patrón isoenzimático de peroxidadas en raíces de dos variedades de arroz (J-104 y LP-7), controles (C) e inoculadas con el HMA *Glomus mosseae* (+MA), a los 30 y 35 días después de la germinación.

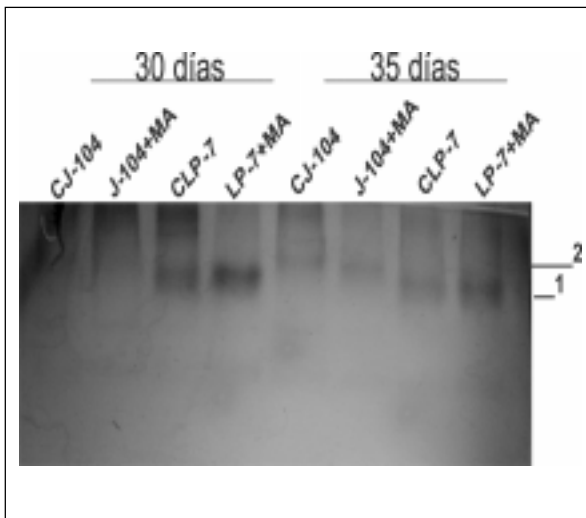


Figura 13. Patrón isoenzimático de polifenoloxidasas en hojas de dos variedades de arroz (J-104 y LP-7), controles (C) e inoculadas con el HMA *Glomus mosseae* (+MA), a los 30 y 35 días después de la germinación.

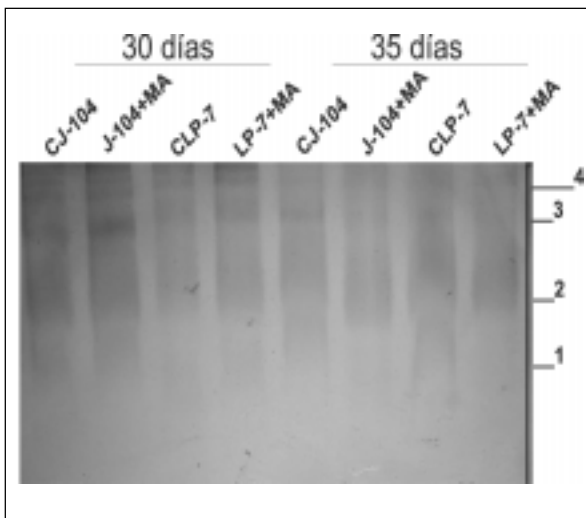


Figura 14. Patrón isoenzimático de polifenoloxidasas en raíces de dos variedades de arroz (J-104 y LP-7), controles (C) e inoculadas con el HMA *Glomus mosseae* (+MA), a los 30 y 35 días después de la germinación.

CONCLUSIONES

- La inoculación del hongo micorrízico arbuscular *Glomus mosseae* induce activación de enzimas relacionadas con la defensa en plantas de arroz, siendo más acentuada en la variedad LP-7, sugiriendo su mejor preparación para contrarrestar un ataque patogénico.

- Se indujo respuesta sistémica por parte del hongo micorrízico arbuscular inoculado en ambas variedades.
- No se detectaron isoformas específicas de la simbiosis con actividad peroxidasa o polifenoloxidasas.

BIBLIOGRAFÍA

- Albretch, C.; Burgess, T.; Dell, B.; Lapeyrie, F. 1994. Chitinase and peroxidase activities are induced in eucalyptus roots according to aggressiveness of Australian ectomycorrhizal strains of *Pisolithus* sp. *New Phytol.* 127: 217-222.
- Alexander, A.G. 1964. Sucrose enzyme relationship in immature sugar cane. *J. Agric. of Univ. of P. Rico.* 4813: 165-231.
- Barreto, A.; Simón, P.J. 1979. Utilización de las isoenzimas como marcadores genéticos en *Saccharum*. *Cultivos Tropicales.* 1: 111-129.
- Besner, Y.L.; Koide, R.T. 1999. Effect of mycorrhizal colonization and phosphorus on ethylene production by Snapdragon (*Antirrhinum majus* L) flowers. *Mycorrhiza.* 9: 161-166.
- Blee, K.A.; Anderson, A.J. 1996. Defense-related transcript accumulation in *Phaseolus vulgaris* L. colonized by the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. Schenk and Smith. *Plant Physiol.* 110: 675-688.
- Boller, T.; Geheri, A.; Mauch, F.; Vogeli, U. 1983. Chitinase in bean leaves: induction by ethylene, purification, properties and possible function. *Planta.* 157: 22-31.
- Bonfante-Fasolo, P. 1988. The role of the cell wall as a signal in mycorrhizal associations. Cell to cell signals in plant, animal and microbial symbiosis. (S. Scannerini /et ál./ eds.). Springer-Verlag. Berlin. Heidelberg. p. 219-235.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 73: 248-250.
- Collinge, D.B.; Kragh, M.; Mikkelsen, L.D.; Nielsen, K.K.; Rasmussen, U.; Vad, K. 1993. Plant chitinases. *Plant J.* 3: 31-40.
- Cordier, C.; Trouvelot, A.; Gianinazzi, S.; Gianinazzi-Pearson, V. 1996. Arbuscular mycorrhiza technology applied to micropropagated *Prunus avium* and to protection against *Phytophthora cinnamomi*. *Agronomie.* 16: 679-688.

- Danneberg, G.; Latus, C.; Zimme, W.; Hundeshagen, R.; Schreider-Poets, H.; Bothe, H. 1992. Influence of vesicular-arbuscular mycorrhiza on phytohormone balances in mayze (*Zea mays* L.). *J. Plant Physiol.* 141: 33-39.
- Doke, N.; Miura, Y.; Sánchez, L.M.; Park, H.J.; Toritake, T.; Yoshioka, H.; Kawakita, K. 1996. The oxidative burst protects plants against pathogen attack: Mechanism and role as an emergency signal for plant bio-defense. *Gene.* 179: 45-51.
- Espinosa-Victoria, D. 2000. Diálogo molecular: hongo micorrízico arbuscular-raíz. Ecología, fisiología y biotecnología de la micorriza arbuscular. Alarcón, A. y Ferrera-Cerrato, R. (eds.). IRENAT - Colegio de Posgraduados. Montecillo. Mundi Prensa. México. Págs. 93-116.
- Frick, F. 1976. Oxidative enzymes. Physiological Plant Pathology. Encyclopedia of Plant Pathology. Ed. Heitefuss, R. y Williams, P.H. New Series 4: 617-627.
- Fries, LL.M.; Pacovsky, R.S.; Safir, G.R. 1996. Expression of isoenzymes altered by both *Glomus intraradices* colonization and formononetin application in corn (*Zea mays* L.) roots. *Soil Biol. Biochem.* 28(8): 981-988.
- García-Garrido, J.M.; Ocampo, J.A. 2002. Regulation of the plant defense response in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Journal of Experimental Botany.* 53(373): 1377-1386.
- González, M.C.; Cristo, E.; Pérez, N.; Delgado, P. 2002. INCA LP-7, Nueva variedad de arroz para suelos afectados por la salinidad. *Cultivos Tropicales.* 23(3): 89.
- Graham, L.S.; Sticklen, M.B. 1994. Plant chitinase. *Can. J. Bot.* 72: 1057-1083.
- Harrison, M.J.; Dixon, R.A. 1993. Isoflavonoid accumulation and expression of defense gene transcripts during the establishment of vesicular-arbuscular mycorrhizal associations in roots of *Medicago truncatula*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 6: 643-654.
- Hernández, A.; Pérez, J.M.; Bosh, D.; Rivero, L. 1999. Nueva versión de clasificación genética de los suelos de Cuba. Instituto de Suelos. AGRINFOR. La Habana, 64 págs.
- Herrera, R.A. 1995. Estrategia de funcionamiento de la micorrizas VA en un bosque tropical. Biodiversidad en Iberoamérica. Ecosistemas, evolución y procesos sociales. (Maximina Monasterio) programa iberoamericano de ciencia y tecnología para el desarrollo. Subprograma XII, Diversidad biológica, Mérida.
- Ikram, B.; Bueno, P.; García-Garrido, J.M.; Ocampo, J.A. 1998. Catalase and peroxidase activities in tobacco roots inoculated by *Glomus mosseae*. En: Second International Conference on Mycorrhiza. Sweden. p. 120.
- Kazan, K.; Gulter, K.C.; Way, H.M.; Manners, J.M. 1998. Expression of a pathogenesis-related peroxidase of *Stylosanthes humilis* in transgenic tobacco and canola and its effect on disease development. *Plant Sci.* 136: 207-217.
- Lambais, M.R. 2000. Regulation of plant defense-related genes in arbuscular mycorrhizae. Current Advances in Mycorrhizae Research. Section II: Mycorrhizal fungi and plant defense. (G.K. Podilla y D.D. Douds Jr. eds.). APS Press USA. p. 45-60.
- Lambais, M.R.; Mehdy, M.C. 1993. Suppression of endochitinase, β -1,3-glucanase, chalcona isomerasa expression in bean vesicular-arbuscular mycorrhizal roots under different soil phosphate conditions. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 6: 75-83.
- Linderman, P.G. 1994. Role of VAM fungi in biocontrol. En: Pflieger, F.L.; Linderman, R.G. *Mycorrhizae and Plant health*. The American Physiopathological Society Press, St Paul, MN, USA, p. 1-27.
- Lister, C.E.; Lancaster, J.E.; Walker, J.R.L. 1996. Phenylalanine Ammonia-lyase (PAL) activities and its relationship to Anthocyanin and Flavonoids Levels in New Zealand-grown Apple Cultivars. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 121: 281-285.
- Ludwig-Müller, J. 2000. Hormonal balance in plants during colonization by mycorrhizal fungi. Arbuscular Mycorrhizas: Physiology and Function. (Y. Kapulnik y D.D. Douds Jr. eds.). Kluwer Academic Publishers. p. 263-285.
- Maribona, R.H.; Korneva, S.; Ruiz, A.; González, S. 1983. Obtention of sugar cane plants by tissue culture from different plant organs. *Proceeding XVIII Cong. ISSCT* 2: 610-621.
- Mathur, N.; Vyas, A. 1995. Changes in isoenzyme patterns of peroxidase and polyphenoloxidase by VAM fungi in roots of *ziziphus* species. *J. Plant Physiol.* 145: 498-500.
- Paynet, M.; Martin, C.; Girand, M. 1971. Activité phenylalanine ammoniae lyase et hypersensibilite an virus de la mosaïque du tabac. *Acad. Sci. Paris.* 273: 537-539.
- Pérez, E.; Rodríguez, Y.; Hernández, M.A.; De la Noval, B.M. 2004a. Dinámica de inducción de algunos sistemas de defensa en la interacción

- HMA-tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) var Amalia. II. Inducción y expresión de peroxidases y polifenoloxidasas en raíces de tomate. *Cultivos Tropicales*. 25(2): 45-52.
- Pérez, E.; Rodríguez, Y.; Hernández, M.A.; De la Noval, B.M. 2004b. 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*. 25(2): 37-44.
- Phillips, J.M.; Hayman, D.E. 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Trans. Br Mycol. Soc.* 55: 158-161.
- Pozo, M.J. 1999. Inducción de enzimas hidrolíticas en raíces de tomate (*Lycopersicon esculentum*) como respuesta a la formación de MA y su implicación en el control biológico de *Phytophthora parasitica*. Tesis de doctorado. Universidad de Granada. Facultad de Ciencias.
- Pozo, M.J.; Azcón-Aguilar, C.; Dumas-Gaudot, E.; Barea, J.M. 1999. β -1,3 glucanase activities in tomato roots inoculated with arbuscular mycorrhizal fungi and/or *Phytophthora parasitica* and their possible involvement in bioprotection. *Plant Science*. 141: 149-157.
- Pozo, M.J.; Azcón-Aguilar, C.; Dumas-Gaudot, E.; Barea, J.M. 1998. Chitosanase and chitinase activities in tomato roots during interactions with arbuscular mycorrhizal fungi or *Phytophthora parasitica*. *J. Exp. Bot.* 49: 1729-1739.
- Quiroga, M.; Guerrero, C.; Botella, M.A.; Barcelo, A.; Amaya, I.; Medina, M.I.; Alonso, J. 2000. A tomato peroxidase involved in the synthesis of lignin and suberin. *Plant Physiol.* 122(4): 1119-1127.
- Robertus, J.D.; Hart, J. 1995. Enzymatic degradation of insoluble carbohydrates. Three dimensional structure of an endochitinase from barley. Cap. 5. Edited by American Chemical Society. p. 59-65.
- Rodríguez, Y.; De la Noval, B.; Fernández, F.; Rodríguez, P. 2004. Estudio comparativo del comportamiento de seis cepas de hongos micorrízicos arbusculares en su interacción con el tomate (*Lycopersicon esculentum* M. Var "Amalia"). *Ecología Aplicada*, 3(1,2): 162-171.
- Rodríguez, Y.; Pérez, E.; Solórzano, E.; Meneses, A.; Fernández, F. 2001. Peroxidase and polyphenoloxidase activities in tomato roots inoculated with *Glomus clarum* or *Glomus fasciculatum*. *Cultivos Tropicales* 22 (1): 11-16.
- Salzer, P.; Boller, T. 2000. Elicitor induced reactions in mycorrhizae and their supresión. *Arbuscular Mycorrhizas: Physiology and Function*. (Y. Kapulnik y D.D. Douds Jr. eds.). Kluwer Academic Publishers. p. 1-10.
- Salzswedel, J.L.; Dazzo, F.B. 1993. pSym nod gene influence on elicitation of peroxidase activity from white clover and pea roots by rhizobia and their cell-free supernatants. *Mol. Plant Microbe Interact.* 6: 127-134.
- Solórzano, E. 1997. Inducción y caracterización parcial de proteínas asociadas con la patogénesis en la interacción tomate-*Alternaria solani*. Tesis para optar por el grado de Maestro en Ciencias en Bioquímica de las Proteínas. Facultad de Biología, Universidad de La Habana. CENSA. Dpto. Fisiopatología.
- Solórzano, E.; Chacón, O. y Fernández, A. 2004. Expresión diferencial de peroxidases, glucanasas y Fenilalanina amonio liasas en la interacción tabaco - *Phytophthora parasitica* variedad nicotianae. *Rev. Protección Veg.* 19(2): 86-96.
- Solórzano, E.; Meneses, A.; Rodríguez, Y.; Pérez, E.; Fernández, A.; Peteira, B.; León, O. 2001. Inducción de cinco sistemas enzimáticos en la simbiosis tomate-micorriza arbuscular. *Revista de Protección Vegetal* 16(1): 30-39.
- Somogyi, M. 1952. Notes on sugar determinations. *J. Biol. Chem.* 195: 19-23.
- Spanu, P.; Boller, T.; Ludwig, A.; Wiemken, A.; Faccio, A y Bonfante-Fasolo, P. 1989. Chitinase in roots of mycorrhizal *Allium porrum*: regulation and localization. *Planta*. 177: 447-455.
- Spanu, P.; Bonfante-Fasolo, S. 1988. Cell-wall bound peroxidase activity in roots of mycorrhizal *Allium cepa*. *New Phytologist* 109: 119-124.
- Standford, H.A.; Galston, A.W. 1970. Ontogeny and hormonal control of polyphenoloxidase isozymes in tobacco pith. *Plant Physiology* 46: 1505-1512.
- St-Arnaud, M.; Hamel, C.; Vimard, B.; Caron, M.; Fortin, J.A. 1997. Inhibition of *Fusarium oxysporum* f sp. *dianthi* in the non VAM species *Dianthus caryophyllus* by co-culture with *Tagetes patula* companion plants colonized by *Glomus intraradices*. *Can. J. Bot.* 75: 998-1005.
- Suárez, Vivian; Hofsteenge, J.; Meins, F. 1998. Structure-function relationships of plant class I

- chitinases. 5th International Workshop on Pathogenesis-Related Proteins, Plant Signalling Pathways and Biological Activities. Aussois, France.
- Vázquez-Garcidueñas, S.; Leal-Morales, C.; Herrera-Estrella, A. 1998. Analysis of β -1,3-glucanolytic system of biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 64(4): 1442-1446.
- Volpin, H.; Elkind, Y.; Okon, Y.; Kapulnik, Y. 1994. A vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus (*Glomus intraradix*) induces a defense response in alfalfa roots. *Plant Physiol.* 104: 683-689, 1994.