

T. Prov. 23/3

T
17
9

Universidad de Granada
Facultad de Ciencias

UNIVERSIDAD DE GRANADA
Facultad de Ciencias
Fecha ... 2/7/99
ENTRADA NUM. ... 2193

**Alteraciones bioquímicas inducidas en membranas de células
radicales de tomate (*Lycopersicon esculentum* L.) por la formación
de micorrizas arbusculares**

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA
GRANADA
Nº Documento 619687655
Nº Copia 021239502

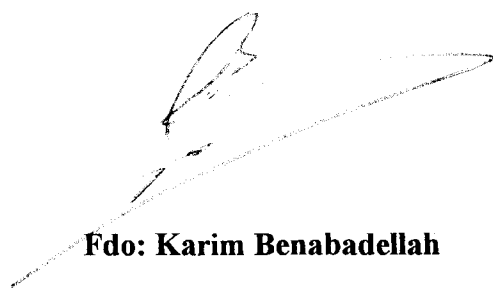
KARIM BENABDELLAH

Tesis Doctoral
1999

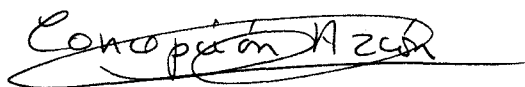
UNIVERSIDAD DE GRANADA
21 JUN. 1999
COMISION DE DOCTORADO

Alteraciones bioquímicas inducidas en membranas de células radicales de
tomate (*Lycopersicon esculentum* L.) por la formación de micorrizas
arbusculares

Memoria que presenta el licenciado en Ciencias Biológicas
Karim Benabdellah para aspirar al grado de Doctor



Fdo: Karim Benabdellah



**Fdo: Dr. Concepción Azcón Gonzáles de
Aguilar**



Fdo: Dr. Nuria Ferrol Gonzáles

Esta Memoria ha sido realizada durante los años 1994-1999 en el Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos de la Estación Experimental del Zaidín (CSIC), Granada, Con la ayuda de una Beca predoctoral con cargo a Proyecto de Investigación de la Unión Europea.

A MIS PADRES Y A MI HERMANO.
A MERCEDES, POR APOYARME Y CONFIAR
EN MI
A ELLOS CUATRO... GRACIAS.

Indice

I. Interés y Objetivos

II. Introducción

1. Tipos de micorrizas.....	1
<i>a. Ectomicorrizas</i>	2
<i>b. Endomicorrizas</i>	2
<i>c. Ectendomicorrizas</i>	3
2. Papel de las micorrizas arbusculares en la mejora de las plantas.....	4
2.1 Biofertilizante.....	4
2.2. Bioprotector.....	4
2.3. Papel de las micorrizas en la resistencia a estrés abióticos	
<i>a. Estrés hídrico</i>	5
<i>b. Estrés salino</i>	5
<i>c. Estrés por metales pesados</i>	
3. Formación de la simbiosis.....	6
3.1. Fase de contacto.....	6
3.2. Fase de penetración.....	7
3.3. Fase intracelular.....	7
4. Modificaciones celulares.....	8
4.1. Modificaciones en la estructura del hongo.....	8
4. 2. Modificaciones en la estructura de las células vegetales.....	9
5. Cambios en la expresión génica.....	10
5.1. Genes implicados en la síntesis de nuevos componentes celulares (membranas y paredes).....	11
5.2. Genes implicados en el metabolismo funcional de las micorrizas.....	11
5.3. Genes implicados en la respuesta de defensa de la planta.....	13
6. Fisiología de las micorrizas arbusculares.....	15
6. 1. Transferencia de nutrientes entre los simbiontes.....	15
6.1.1. Intercambio de fósforo.....	16
6.1.2. Intercambio de carbono.....	18
6.1.3. Intercambio de nitrógeno.....	19
6.1.4. Intercambio de otros nutrientes.....	19

6. 2. Fisiología del agua en MA.....	20
6.3. Cambios en la composición lipídica.....	21
7. Sistemas de transporte iónico a través de las membranas celulares.....	21
7. 1. ATPasas asociadas a membrana.....	22
7.1.1. Propiedades de la H ⁺ -ATPasa asociada a la membrana plasmática	
a. <i>Características bioquímicas</i>	23
b. <i>Características moleculares</i>	24
c. <i>Funciones fisiológicas</i>	25
d. <i>Regulación de la H⁺-ATPasa</i>	26
7.1.2. Propiedades de la ATPasa asociada al tonoplasto	
a. <i>Características bioquímicas</i>	26
b. <i>Características moleculares</i>	28
7.2. Propiedades de los sistemas Redox.....	28

Plan de trabajo

Material y Métodos

1 Medida del grado de dependencia de tomate a la formación de la micorrizas.....	31
1.1. Preparación del material.....	31
1.1.1. Sustrato.....	31
1.1.2. Material biológico.....	32
1.1.2.1. Material vegetal.....	32
1.1.2.2. Material fúngico.....	32
1.1.2.3. Inoculación con los hongos de la micorriza.....	33
1.2. Procedimiento.....	33
1.3. Parámetros determinados.....	34
1.3.1. Crecimiento de las plantas.....	34
1.3.2. Determinación del contenido en fósforo y nitrógeno.....	34
1.3.3. Colonización micorrizica.....	34
1.4. Análisis estadístico de los datos	35
2. ESTUDIOS BIOQUÍMICOS.....	35
2.1. Obtención del material biológico.....	35

2.1.1. Obtención de raíces controles y micorrizadas.....	36
2.1.2. Obtención de esporas y micelio extraradical.....	35
2.2. Obtención de las distintas fracciones subcelulares.....	37
2.2.1. Obtención de la fracción soluble y microsomal.....	37
2.2.2. Purificación de la membrana plasmática.....	39
2.2.3. Determinación del contenido en proteínas.....	40
2.3. Medida de las actividades enzimáticas asociadas a las fracciones de membrana aisladas.....	41
2.3.1. Actividad ATPasa.....	41
2.3.1.1. Actividad ATPasa sensible a NO ₃	43
2.3.1.2. Actividad ATPasa sensible a N ₃	43
2.3.1.3. Actividad ATPasa sensible VO ₄ e insensible a NO ₃ y N ₃	
2.3.2. Actividad UDPasa latente.....	44
2.3.3. Actividad NADH-citocromo c reductasa insensible a antimicina A.....	
2.3.4. Actividad NADH-ferricianuro óxidoreductasa.....	46
2.3.5. Actividad alcohol deshidrogenasa.....	47
2.4. Determinación del transporte de protones en vesículas de membrana.....	48
2.4.1. Procedimiento.....	48
2.4.2. Parámetros determinados.....	50
2.5. Detección inmuológica de la H ⁺ -ATPasa del plasmalema y del tonoplasto.....	
2.5.1. Solubilización de las proteínas de membrana.....	51
2.5.2. Electrotransferencia a membranas de nitrocelulosa (Western blotting).....	51
2.5.3. Inmunorevelado de la H ⁺ -ATPasa de plasmalema y de la H ⁺ ATPasa del tonoplasto.....	53
2.6. Electroforesis bidimensional.....	55
2.6.1. Solubilización y preparación de las muestras.....	55
2.6.2. Cuantificación de las proteínas solubilizadas.....	56
2.6.3. Isoelectroenfoco.....	57
2.6.4. Equilibración de los geles.....	58
2.6.5. Segunda dimensión en geles de poliacrilamida.....	58
2.6.6. Secado y tinción de los geles.....	58
2.6.7. Análisis de los geles.....	59

3.1.2. Análisis de lípidos totales del hongo MA.....	85
3.1.3. Análisis cuantitativo de las distintas moléculas lipídicas.....	86
3.1.4. Análisis de los ácidos grasos de la distintas moléculas lipídicas.....	87
3.2. Caracterización a nivel de membranas.....	88
3.2.1. Análisis de lípidos totales de membranas.....	88
3.2.2. Análisis cuantitativo de las distintas moléculas lipídicas.....	89
3.2.3. Análisis de los ácidos grasos de la distintas moléculas lipídicas.....	90
4. Efecto de la colonización sobre la síntesis de proteínas	
4.1. Análisis del perfil proteico correspondiente al extracto crudo de las raíces controles e inoculadas con el hongo MA <i>G. mosseae</i>	92
4.2. Análisis del perfil proteico correspondiente a las proteínas solubles.....	93
4.3. Análisis del perfil proteico correspondiente a las proteínas de membrana correspondiente a las raíces controles y micorrizadas.....	95
4.4. Análisis electroforético de las proteínas de membrana plasmática extraídas de plantas controles y micorrizadas.....	96
4.5. Análisis del perfil proteico de las proteínas del extracto crudo y de membrana correspondiente al micelio externo de <i>Glomus</i> <i>mosseae</i>	99
4.6. Análisis de la secuencia amino terminal.....	101
 <u>Discusión</u>	103
 <u>Conclusiones</u>	118
 <u>Bibliografía</u>	119

Revisión bibliográfica

La micorriza arbuscular es una de las simbiosis mutualística más extendidas en el ecosistema terrestre, la cual se establece entre las raíces de la mayoría de las plantas vasculares que poseen un sistema radical propiamente dicho, como las angiospermas, gymnospermas y pteridofitos, y ciertos hongos del suelo pertenecientes al orden Glomales (Harley y Smith, 1983; Azcón-Aguilar y col., 1991).

La primera descripción científica de las micorrizas fue hecha en el siglo 19 por Galaud (1905). Mientras que su omnipresencia, no ha sido descrita hasta los años 50. En 1923, Peyronel describió por primer vez la existencia de esporocarpos en el suelo que dan lugar a una serie de hifas que se diseminan en los suelos colindantes. Sin embargo había que esperar hasta 1953, para que Mosse, estudiando plantas de fresa, hiciera una verdadera descripción de la colonización micorrízica por una especie *Enodgonal* llamada ahora *Glomus*. Ello permitiría entrar en la era moderna de la investigación en el campo de las micorriza. Tal es la universalidad de esta simbiosis, que se da por hecho que, en la naturaleza, el órgano mediante el cual las plantas absorben nutrientes del suelo no es la raíz propiamente dicha, sino el "sistema" resultante de la modificación de la raíz, por el hongo formador de micorrizas, o sea la micorriza (Smith y Read 1997). Esta universalidad es debida, por una parte, a que la gran mayoría de las especies vegetales la forman, y por otra parte su omnipresencia en casi todas los ecosistemas climáticos.

El estudio de restos fósiles, concretamente el descubrimiento de arbusculos en restos de plantas fosilizados de *Aglaophyton major*, planta terrestre del devoniano, así como los estudios llevados a cabo mediante el análisis de ARNr del 18S, han demostrado que el origen de estos hongos remonta a entre 353 y 462 millones de años atrás, y que la simbiosis data aproximadamente de la misma época, por lo que se ha sugerido que estos hongos simbiotes han jugado un papel determinante en la estructuración de los ecosistemas terrestres tal y como los conocemos hoy en día. (Pirozynski col., 1989; Simon y col., 1993; Reynol y col., 1994).

1. Tipos de micorrizas

Según el tipo de simbiosis que forman y de las plantas que la establecen, se puede distinguir fundamentalmente 3 grupos principales, de micorriza (Figura1):

a. Ectomicorrizas

Las ectomicorrizas, son unas asociaciones simbióticas que se forman entre hongos superiores tipo Basidiomicetos, Ascomicetos y Zygomycetos y las raíces de las plantas leñosas. Estas asociaciones son formadas por un 5-10 % de las especies vegetales (Harley y Smith, 1983). Las hifas del hongo no penetran dentro de las células de la raíz. Las ectomicorrizas se caracterizan por la formación de un plectenchima fúngico alrededor del sistema radical de la planta. A partir de la zona interna de la raíz el micelio fúngico se desarrolla entre las células corticales de la raíz, sin penetración intracelular, pero con la rotura de los plasmodesmos creando lo que se llama la red de Harting (Harley y Smith, 1983; Kottle y Oberwinkler, 1986; Massicotte y col 1987; Smith y Read 1997).

b. Endomicorrizas

El grupo de la endomicorrizas, al contrario que en las ectomicorrizas, la colonización intraradicular es más importante, mientras que el desarrollo de las hifas externas es bastante limitado. En este tipo de simbiosis además de recorrer longitudinalmente la raíz en el córtex medio, las hifas penetran en el córtex interno, y allí continúan desarrollándose longitudinalmente, aunque a la vez se ramifican lateralmente para penetrar en las células, donde se dividen profusa y dicotómicamente, dando lugar a la estructura mas característica y compleja de esta simbiosis: el arbusculo (Werner 1992; Smith y Read 1992).

Esta simbiosis concierne al 90 % de las especies vegetales. Concretamente, forman MA la gran mayoría de las plantas de importancia económica tales como cereales, frutales y plantas hortícolas (Smith y Read 1997; Barea y Jeffries 1997). En contraste con la gran diversidad de especies vegetales que forman MA, solo alrededor de 125 especies de hongos son capaces de inducirlos. Los hongos formadores de micorrizas son simbiosiontes obligados, y no pueden crecer axénicamente sin presencia de raíz hospedadora; las esporas germinan en el suelo, y su desarrollo saprofitico es bastante limitado puesto que requiere la presencia de una planta hospedadora para completar su ciclo vital. La taxonomía de los hongos formadores de micorriza se ha basado en estudios morfológicos, mediante la presencia o no de vesículas, o la morfología de las esporas (color, talla...) (Morton y col., 1990), o bien mediante el uso

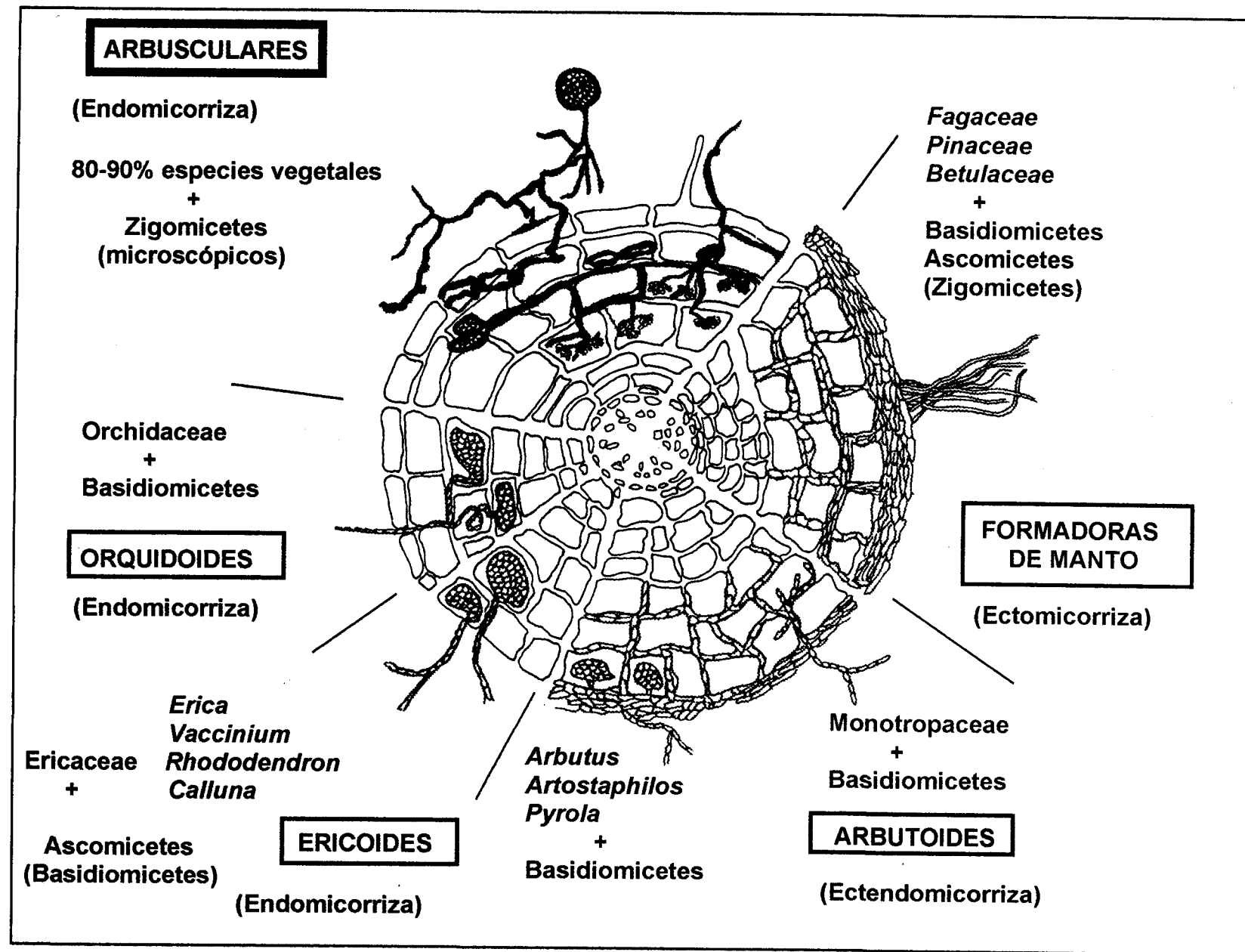


Figura 1. Tipos de micorrizas

de marcadores moleculares, como el perfil de isoenzimas (Hepper y col., 1988; Rosendahl y col., 1993), o la composición en ácidos grasos (Bentivenga y Morton 1996)

El conjunto de estos estudios ha permitido separar los hongos formadores de micorriza en tres familias distintas (Tabla1).

Familias que forman simbiosis MA	Géneros
<i>Glomaceae</i>	<i>Glomus</i>
	<i>Sclerocistis</i>
<i>Acaulosporaceae</i>	<i>Acaulospora</i>
	<i>Entrofospora</i>
<i>Gigasporinae</i>	<i>Giaspora</i>
	<i>Scutelospora</i>

Tabla1. Distintas familias que forman simbiosis MA.

Esta asociación implica principalmente las plantas herbáceas, principalmente las Angiospermas, aunque se han descrito también en los Gymnospermas, Pteridofitos y los Briofitos (Bonfante-Fasolo, 1984). Los Glomales son fuertemente dependientes de la planta hospedadora, de allí su baja capacidad de vivir saprofiticamente en el suelo. su forma de resistencia consiste en la formación de esporas libres o en esporocarpos en el suelo, o por el mantenimiento de las hifas dentro de las raíces colonizadas.

c. Ectendomicorrizas

Este tipo de simbiosis implica un numero menos importante de plantas, son asociaciones intermedias, en los cuales, el hongo desarrolla un manto alrededor de la raíz, pero al mismo tiempo penetra dentro de las células corticales, donde es capaz de desarrollar coils. (Harley y Smith, 1983; Smith y Read 1997)

Sea cual sea el tipo de micorriza, los dos simbioses obtienen un beneficio mutuo. En las condiciones naturales el hongo recibe los compuestos carbonados cedidos por la planta, en cambio la planta hospedadora se beneficia de:

1. Una mejor nutrición mineral, gracias a la red de hifas que se extienden mas allá de la zona donde pueda llegar la raíz de la planta, y que absorben elementos

nutritivos, los cuales son trasladados hacia las células de la raíz (Smith y Gianinazzi-Pearson, 1988)

2. Un aumento del crecimiento y del desarrollo, que se manifiesta sobre todo en condiciones de deficiencia en fosfato (Smith y Gianinazzi-Pearson, 1988; Smith y Smith, 1996)

3. Mayor resistencia a estreses bióticos y abióticos (Mitchell, 1993).

2. Papel de las micorrizas arbusculares en la mejora de las plantas

2.1. Biofertilizante

Las hifas de los hongos de la micorriza arbuscular (MA), son un componente vital en el ecosistema del suelo. Este micelio es un órgano funcional para la absorción y translocación de nutrientes desde y para las micorrizas (Barea y Jeffries, 1995). Los principales elementos minerales que el hongo aporta o contribuye a su mejor absorción por la planta son aquéllos, que por su baja movilidad en la solución del suelo, dependen de los mecanismos de difusión para su llegada a la raíz, tales como el potasio, zinc, cobre y el fósforo. Las hifas fúngicas presentes en el suelo al desarrollarse exploran un diámetro de suelo no accesible al sistema radical, lo que junto con el pequeño diámetro de las hifas incrementa la superficie de contacto con los elementos minerales presentes en la solución del suelo. A través de estas hifas los elementos minerales son transportados hacia la raíz de las plantas (Pearson y Jakobsen, 1993; Smith, 1980). Así, se ha comprobado que las plantas micorrizadas presentan una mejor nutrición fosforada (Gianinazzi-Pearson y Gianinazzi, 1983; Harley y Smith, 1983; Pearson y Jakobsen, 1993; Smith y Gianinazzi-Pearson, 1988) y en micronutrientes como el zinc (Faber y Col, 1990; Pacovsky, 1986), y cobre (Gildon y Tinker, 1983b; Manjunath y Habte, 1988) el cobalto (Kilhan, 1985; Leyval y Col 1991; Weissenhorn y col 1993). Por todo esto, se puede calificar el hongo de la micorriza como un biofertilizante.

2.2. Bioprotector

Durante los últimos años, varios estudios han demostrado que la preinoculación de las plantas con los hongos MA reduce los daños provocados por ciertos hongos patógenos tales como *Fusarium*, *Phytophthora*, *Chalara* o *Aphanomyces* y por nematodos como *Rotylenusa Pratylencus* o *Meloidogyne* (Bethlenfalvay y Linderman, 1992; Barea y Jeffries, 1995; Azcón-Aguilar y Barea, 1996; Cordier y col., 1996). Aunque estos estudios han demostrado que los hongos de la micorriza pueden utilizarse como agentes

de control biológico, poco se sabe sobre los mecanismos por los cuales se produce dicha bioprotección. Los resultados derivados de estas investigaciones han llevado a proponer que el control que los hongos MA ejercen sobre el ataque por patógenos puede ocurrir como consecuencia del mejor estado nutritivo de la planta, competición por fotosintatos o por sitios de colonización, compensación del daño causado por el patógeno en el sistema radical, inducción de cambios anatómicos o morfológicos en el sistema radical, cambios en las poblaciones microbianas de la micorrizaosfera y activación de los mecanismos de defensa (Azcón-Aguilar y Barea, 1996)

2.3. Papel de las micorrizas en la resistencia a estreses abióticos

a. Estrés hídrico

Numerosos estudios han demostrado que las plantas micorrizadas resultan menos afectadas por el déficit hídrico o se recuperan más rápidamente de la sequía que las plantas controles (Sanchez-Díaz, 1997; Ley y Krikun, 1980; Sweatt y Davies, 1984). este efecto podría ser atribuible a la baja resistencia que tiene las raíces micorrizadas para la captación de agua (Hardie y Leyton, 1981; Nelsen y Safir 1982). además parece ser que al igual que en la captación de nutrientes, el pequeño diámetro de las hifas fúngicas podría jugar un papel importante ya que su reducido diámetro le permitiría acceder a pequeños acuíferos que la planta por su sistema radical no podría disponer. De una forma o de otra la simbiosis MA mejora el estado hídrico de las plantas, sin embargo sigue siendo una incógnita si el hecho es atribuible a que incrementan los flujos de entrada de agua, o es una respuesta secundaria, consecuencia de la mejora del estado nutricional de la planta o de algún cambio fisiológico en la planta hospedadora que, indirectamente, incrementa la resistencia a la sequía.

b. Estrés salino

Las plantas micorrizadas son mas resistentes que las plantas controles, (Moss, 1986; Rosendahl & Rosendhal, 1991). Se piensa que este efecto podría deberse una vez mas el mejor estado nutricional de las plantas micorrizadas, y especialmente en el caso de K^+ . El mayor contenido de K^+ relativo al Na^+ , ayuda a las plantas micorrizadas a paliar la toxicidad del Na, presente en altas concentraciones en condiciones de estrés salino (Barea y col., 1993; Barea y Jeffries, 1995).

c. Estrés por metales pesados

En lo que concierne los metales pesados, se ha descrito que las micorrizas arbusculares puede aliviar o atenuar la toxicidad de ciertos metales en las plantas (Jeffries 1987, Barea, 1991, 1993). Este es el caso con el Zn, (Kothari y col., 1991b); Cd (Schuepp y Col., 1987); Al (Koslowsky y Boerner 1989), Mn en suelo ácido (Arines y Valiriño, 1989). Este efecto positivo de la simbiosis puede ser debido a la formación de complejos y precipitados de metales alrededor de las raíces micorrizadas lo que disminuye su toxicidad (Maley y Orait, 1987). Por otra parte la acumulación de estos metales en las vacuolas de los hongos MA, podría impedir su transferencia hacia la planta (Turnau y col., 1993). Por otra parte el alto aporte nutricional del cual se beneficia las plantas micorrizadas podría diluir el efecto de estos metales pesados (El-Karrawy y Col., 1989)

3. Formación de la simbiosis

El hongo formador de micorriza, como simbiote obligado, necesita asociarse con una planta huésped, para completar el ciclo de vida. Aunque durante el desarrollo de la estructura fúngica dentro de la raíz tienen lugar cambios anatómicos y citológicos profundos en la misma, la expresión morfológica de estos cambios, normalmente, no se detecta a simple vista (Figura 2). El hongo solamente coloniza la epidermis y el parénquima cortical de la raíz. Sin penetrar en la endodermis ni por tanto en los tejidos vasculares. En general el proceso de colonización se forma por tres etapas cronológicas bien diferenciadas:

3.1. Fase de contacto

La colonización de las raíces de las plantas superiores por los hongos MA tiene lugar a partir de tres fuentes de inóculo presentes normalmente en la mayoría de los suelos: esporas, fragmentos de raíces colonizados e hifas, colectivamente llamados propágulos. Durante muchos años se ha asumido que las esporas eran la fuente de colonización si no la única, la más importante, pero se ha demostrado que tanto las esporas como el micelio procedente de esporas germinadas o de raíces colonizadas podrían desencadenar la formación de las micorrizas. La germinación de las esporas fúngicas, esta condicionada por determinados factores como pueden ser la humedad y la

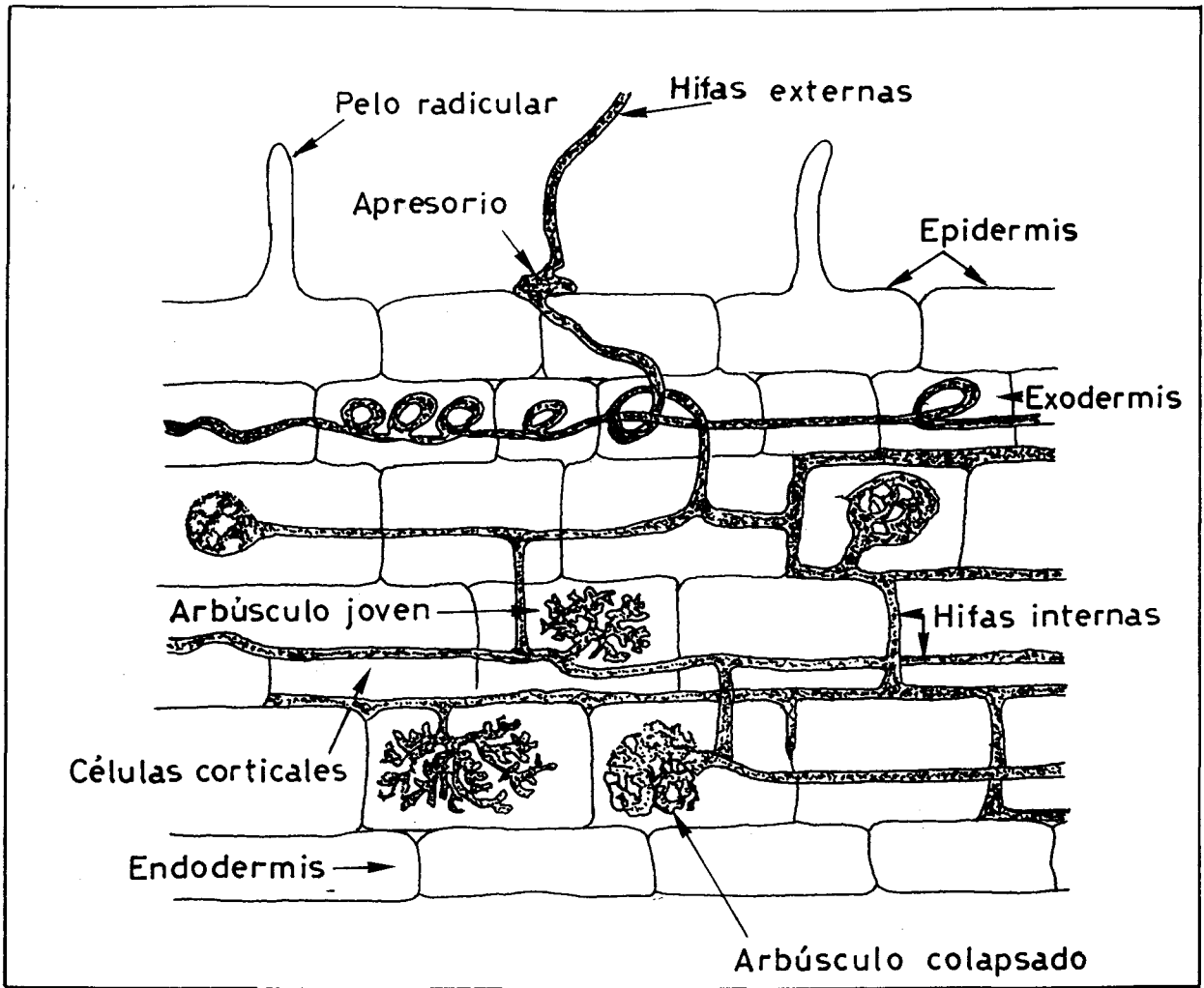


Figura 2. Anatomía de las micorrizas arbusculares.

temperatura, así como puede ser favorecida por la presencia de exudados radicales y de determinados organismos del suelo (Mosse, 1959; Azcón-Aguilar, 1998; Requena y Franken, 1999). Una vez formado el tubo de germinación, se desarrollan una serie de hifas radiales (Sandres y Sheikh, 1983), que se dirigen hacia las raíces hospedadoras, en este sentido el quimotropismo de las hifas de *G. gigantea* hacia las raíces huéspedes, sugiere la existencia de exudados radicales volátiles (Koske, 1982; Gemma y Koske, 1988). Cuando una hifa fúngica presente en el suelo llega a la rizosfera de una planta hospedadora, sufre una serie de modificaciones (Barea 1986, Becrad y Fortin 1988), y se adhiere a la raíz de la planta hospedadora, dando lugar a la formación del apresorio, 2 o 3 días tras el contacto (Bécard y Smith, 1988; Giovannetti y col., 1993b), esta estructura da lugar a la aparición de los primeros signos visibles de la formación de la simbiosis. Giovannetti y col., (1993) han demostrado que la formación del apresorio es inducida por los exudados radicales producidos por las plantas hospedadoras compatibles. Hay que resaltar que el apresorio no se forma en las plantas no hospedadoras, lo que indica la existencia de mecanismos de reconocimiento específicos (Giovannetti y col., 1993; Gollotte y col., 1996).

3.2. Fase de penetración

La penetración puede ocurrir a través de la pared de una célula epidérmica (intracelularmente), entre dos células epidérmicas (intercelularmente), o bien a través de un pelo radical (Bonfante Fasolo, 1984). Los mecanismos de penetración en la raíz parecen ser la suma de procesos mecánicos, por la presión ejercida por las hifas (Harley y Smith, 1983) y enzimáticos, mediante la producción de enzimas pectinolíticas y celulolíticas por parte del hongo (Giovannetti y col., 1995). Esta producción de enzimas hidrolíticas, a diferencia del patrón de colonización por hongos patógenos donde la producción de estas enzimas es incontrolada (Walton, 1994), en el caso de los hongos formadores de micorriza, es controlada, ya que investigaciones llevadas a cabo con *G. mosseae* demostraron que se producen en pequeñas cantidades de pectinasas y celulasas (García-Romero 1992, García-Garrido y Ocampo., 1991 a,b).

3.3. Fase intracelular

Tras la formación del apresorio, y de la penetración de las hifas fúngicas dentro de la raíz, el hongo procede a la colonización biotrófica del córtex de dicha raíz y usualmente desarrolla estructuras intracelulares específicas como ovillos (coils) por el

enrollamiento de las hifas en las células de la epidermis, o arbusculos (estructura en forma de árboles) que se forman por divisiones dicotómicas repetidas de las hifas intercelulares en la parte del córtex más cercana al cilindro vascular. Durante la formación del arbusculo, la membrana plasmática de la planta no llega a romperse, la cual engloba en todo momento las hifas del hongo que se queda siempre fuera del citoplasma de la célula en un compartimiento apoplástico. El hecho de que el arbusculo aumenta considerablemente la superficie de contacto entre el hongo y la planta hace pensar que es el lugar preferencial del intercambio bidireccional de nutrientes entre los dos simbioses. (Smith y Gianninazzi, 1988). La colonización se extiende a través del micelio interno inter- e intra-celularmente, mientras que el micelio externo se desarrolla fuera de la raíz y es el encargado de la exploración del suelo en busca de nutrientes

4. Modificaciones celulares

4.1. Modificaciones en la estructura del hongo

Las modificaciones del tejido fúngico se manifiestan principalmente en la morfogénesis de las hifas y la estructura de su pared celular. Así se ha demostrado que las hifas que se encuentran fuera de la raíz, contienen quitina fibrillar pluriestratificada de un espesor de 500 nm, la cual esta asociada con polímeros de β -1-3-glucano en hongos pertenecientes a la familia de las Glomaceae y Acaulosporaceae, mientras que a nivel de las hifas intraradicales el espesor de la pared celular decrece hasta 50 nm convirtiéndose en una estructura casi amorfa (Bonfante-Fasolo y col., 1990; Lemoine y col., 1995). Esto sugiere que la planta hospedadora altera el metabolismo de fúngico con el propósito de evitar la formación de una pared propiamente dicha a nivel del arbusculo, dando lugar a una estructura simplificada, similar a los hongos filamentosos (Gollotte y col., 1996). Permitiendo la formación de una interfase de contacto entre los dos simbioses.

Todos estos cambios en la morfogénesis de hongo esta bajo el control del genoma de la planta hospedadora (Bonfante y Perotto 1992). En este sentido la utilización de plantas de guisante o de alfalfa (Bradbury y col., 1991). mutantes (*myc-*) incapaces de formar una simbiosis completa (Duc y col., 1989; Gianinazzi-Pearson y col 1991), ha demostrado que la morfogénesis del hongo está bajo control del genoma de la planta hospedadora, y que la colonización sólo puede proceder si algunos genes específicos de la planta son funcionales (Gianinazzi y col, 1995). Por otro lado se ha demostrado que factores del hospedador pueden regular la expresión de proteínas del

hongo. Así durante la fase pre-simbiótica se ha detectado actividad ATPasa limitada al ápice del micelio externo (Lei y col., 1991), mientras que dentro de la raíz, se ha detectado actividad a lo largo de casi toda la membrana plasmática del hongo.

Por otra parte, a pesar de la extensiva colonización del hongo MA en la raíz de la planta, ésta debe de ejercer algún tipo de control sobre el progreso del micelio, puesto que éste se queda confinado al parénquima cortical, y puesto que la proliferación del micelio en el tejido epidermal o hipodermal es muy restringida, y las hifas nunca penetran en el tejido meristemático o cilindro central. Estos genes deben de tener un amplio rango de acción, ya que su mutación afecta por lo menos, a dos tipos de interacciones planta-microbio, nódulos, y micorriza.

4. 2. Modificaciones en la estructura de las células vegetales

Respecto a las células vegetales, la formación de los arbusculos dentro de las mismas, provoca una extensa reorganización estructura, como la invaginación del plasmalema, la fragmentación de la vacuola, un aumento en el volumen del citoplasma y en él numero de orgánulos, como el aparato de Golgi (Bonfante y Perotto 1995). Además la presencia del hongo dentro de las células vegetales afecta la morfología de los núcleos (Berta y col., 1996). Por otra parte, la presencia del hongo afecta la posición del núcleo dentro de la célula, el cual se mueve de la zona periférica a la zona central de la célula y aumentando su actividad transcripcional (Balestrini y col., 1992; Berta 1996).

Pero el cambio más relevante que se produce en las células vegetales cuando son colonizadas por los hongos MA, es la formación de una interfase simbiótica entre la planta y el hongo, esta estructura, se forma por la membrana plasmática de la planta o membrana-periarbuscular, y la membrana plasmática fúngica separadas por una región apoplástica (Balestrini y col., 1996; Gianinazzi-Pearson y col., 1996). La membrana periarbuscular mantiene la propiedad de sintetizar polisacáridos, los cuales no se polimerizan formando paredes, debido a la acidificación de las de la interfase o a la presencia de poligalacturonasa (Perotto y col., 1995).

Es asumido que, el papel fundamental de esta interfase es de permitir el intercambio bidireccional de nutrientes entre el hongo y la planta (Smith 1994). Ya que se ha observado una alta actividad H^+ -ATPasas en las membranas que rodean los arbusculos (Gianinnazi-Pearson., 1991). Además, los mismos autores han observado que dicha actividad era ausente en las membranas que rodean arbusculos abortivos (no

funcionales). La presencia de actividad H^+ /ATPasas alrededor de las estructuras del microsimbionte parece ser una propiedad típicamente simbiótica ya que dicha actividad ha sido observada en las membranas que rodean las bacterias dentro de los nódulos de las leguminosas (Brewin., 1990). En cambio en asociación no simbióticas, esta actividad no ha sido detectada en las membranas que rodean los austorios de los hongos patógenos, lo que confirma el flujos unidireccional e incontrolado de nutrientes hacia el patógeno (Smith, Smith 1990).

5. Cambios en la expresión génica

La gran diferencia existente entre una célula cortical y una célula conteniendo un arbusculo (aumento en el numero de orgánulos, fragmentación de la vacuola y desplazamiento de los núcleos hacia el centro de la célula), llamó la atención de los investigadores en los años setenta. Muchas de estas observaciones han sido descritas como respuesta del hospedador a la colonización fúngica (Scannerini y Bonfante, 1983; Toth, 1991, Balestrini y col. , 1992), en respuesta al intercambio de señales entre los dos simbioses, lo que activa una cascada de respuestas que permiten los cambios y metabólicos que sufre la planta. En este sentido, se ha visto que la presencia del hongo dentro de las células hospedadoras causa una significativa hipertrofia del núcleo en varias plantas en simbiosis (Thot y Mileer, 1984; Berta y col., 1990b, Sgorbati y col., 1993), este aumento en el tamaño del núcleo no se debe a una pulipluoridad del núcleo de las plantas, ya que ni la tinción de núcleos con DAPI (Berta y col., 1986; 1990b; Sgorbati y col., 1989), ni con feulgen (Blair y col., 1988) han puesto en evidencia cambios en la pluidad de los núcleos. Por otro lado se ha comprobado que los núcleos de las raíces micorrizadas son muy sensibles a la digestión con DNAasa (Berta y col., 1990, 1996), lo que sugiere que las células colonizadas tiene una mayor actividad transcripcional mucho mayor que las células control.

Una de las técnicas mas acertadas adoptadas para el estudio de cambios en la expresión génica fue la utilización de electroforesis bidimensional (2D-PAGE), bien de polipéptidos extraídos tanto de las plantas micorrizadas como de plantas controles, o bien tras una translación *in vivo* o bien mediante marcaje radioactivo. Estos análisis han puesto en evidencia la inducción de proteínas nuevas o endomicorrizas o la alteración de proteínas ya existentes en los tejidos no simbióticos o constitutivas (Garcia-Garrido y col., 1993; Dumas-Gaudot y col., 1994; Samra 1997). Sin embargo, uno de los retos más interesantes en este campo es por una parte la distinción entre las proteínas

fúngicas y de la planta, para ello, se han utilizado plantas mutante *myc⁻* (Samra y col 1997; Samra y col., 1996), y por otra parte asignar un papel fisiológico de las proteínas diferencialmente inducidas, para ello, una interesante aproximación, podría ser la purificación de dichos polipeptidos y la secuenciación del amino terminal (Dumas-Gaudot, 1998).

Por otra parte, la investigación de los genes que se regulan por la simbiosis MA es otro de los campos más prometedores actualmente. Los estudios llevados a cabo en este campo han puesto en evidencia que los genes diferencialmente expresados son mayoritariamente relacionados con respuestas de defensa (Gianinazzi-Pearson y col., 1996), o relacionados con el metabolismo celular de las plantas (Fries y col., 1996; Murphy y col., 1997; Burleigh y Harrison. 1997).

5.1. Genes implicados en la síntesis de nuevos componentes celulares (membranas y paredes)

Los cambios cualitativos y cuantitativos, en los patrones proteicos de proteínas reflejan las modificaciones funcionales y morfológicas producidas en la células colonizadas (Pacovsky, 1989; Schellenbaum, y col., 1992; Dumas Gaudot y col 1994; Simoneau y col. , 1994). Aunque el papel de la mayoría de estas proteínas todavía es desconocido, algunas proteínas podrían estar implicadas en las modificaciones de las paredes celulares, en este sentido, se ha descrito que proteínas HRGP (glicoproteínas ricas en hidroxiprolina), son acumuladas en los estadios tempranos de la colonización. No se conoce con exactitud el modo de acción de estas proteínas en las simbiosis MA, pero el hecho de que elicitores fúngicos producen un estimulación en su síntesis, revela su posible implicación en respuestas defensivas (García Muñoz y col., 1998).

5.2. Genes implicados en el metabolismo funcional de las micorrizas

Algunos trabajos recientes han sido enfocados hacia genes cuya expresión juega un papel importante en el intercambio de nutrientes entre el hongo y la planta. Dichos trabajos, utilizando métodos genéticos y moleculares han demostrado que algunos genes se estimulan o se reprimen en respuesta a la colonización MA, mientras que otros aparecen nuevos en las plantas micorrizadas una (Tabla 2).

Nombre de gen	Función de la proteína	Planta	Regulación	Localización	Referencia
-BMR ₇₈	Procesos de transporte (H ⁺ -ATPasa)	<i>H. vulgare</i>	+	¿membrana periarbusclar?	Murphy y col., 1997
-BMR ₆	Respuesta a esters hídrico, y pathogenos	<i>H. vulgare</i> *	+	???	Murphy y col., 1997
-PR-b1	Metabolismo Flavon./isoflavon.	<i>M. truncatula</i>	+	Células colonizadas por arbusculos	Harrison y Dixon 1994
-MT ₄	¿implicado en el transporte de P?	<i>M. truncatula</i>	-	???	Burleight y Harrison 1997
-NR	Nitrato-Reductasa	<i>Zea mays</i> L.	+	Arbusculos	Kaldrof y col., 1998
-Mtst ₁	Transporte de hexosa	<i>M. truncatula</i>	+	Células corticales (Zonas colonizadas)	Harrison 1996
-psam ₁	???	<i>Pisum sativum</i>	+	???	Martin-Lauren y col., 1998
-pcrb	¿ Aquaporina? ¿ Intercambio de pequeñas moléculas?	<i>Petroselinum crispum</i>	+	¿membrana?	Roussel y col., 1997
VjLb29	Transporte de oxígeno ¿Respiración micorsimbionte?	<i>Vicia faba</i>	+	???	Frühling y col., 1997
MtPT1 MtPT2	Transportador de fosfatos	<i>M. truncatula</i>	+	¿membrana?	Liu y col., 1997

Tabla 2. Recopilación de algunos de los genes analizados, y que se expresan diferencialmente en la simbiosis MA.

En la Tabla 2 se puede observar la mayoría de los genes que se expresan diferencialmente en respuesta a la colonización MA. En este sentido se ha identificado y clonado, un gen el Mtst1, rastreando la librería del cDNA de *Medicago truncatula*, y que muestra una alta homología con un transportador de hexosa de *Arabidopsis*, y cuya expresión está relacionada con el intercambio de nutrientes entre el hongo y la planta (Harrison, 1996). La expresión de dicho gen incrementa de dos a cuatro veces en las raíces micorrizadas en comparación con los controles y las mutantes *myc*⁻ de *Medicago truncatula*. Por otro lado, el análisis diferencial de una librería representativa del cDNA de la cebada colonizada con *G intraradices* ha permitido la identificación del gen BMR₇₈, que presenta una alta homología con una H⁺-ATPasa (Murphy y col 1995).

Por otro lado se ha demostrado que algunos genes se reprimen en respuesta al establecimiento de la simbiosis, este es el caso de dos genes relacionados con el transporte de fósforo (MtPT₁, MtPT₂), que se reprimen en respuesta al establecimiento, de la micorriza arbusculares, por una parte, y se inducen por deficiencia en fósforo, por otra parte (Liu y col, 1998). Otro de los genes que sufre la misma regulación por fósforo y la colonización MA es el Mt₄, sin embargo la función de este último no está muy definida, posiblemente esté implicado en fenómenos de transporte (Burleigh y col, 1997). Por otro lado se ha clonado un gen el PcrB7, que codifica una proteína intrínseca de membrana, posiblemente una acuaporina, y que se activa por la presencia del hongo arbuscular en la raíz, y por la presencia de sustancias inductoras provenientes de hongos patógenos en un cultivo de suspensiones celulares (Roussel y col., 1997).

5.3. Genes implicados en la respuesta de defensa de la planta

En lo que a respuestas de defensa, ha sido tema de debate durante muchos años, su inducción en las plantas micorrizadas. Los genes de defensa incluyendo aquellos que codifican enzimas que degradan las paredes fúngicas, como pueden ser las quitinasas (Dumas-Gaudot y col., 1992; Dassi y col., 1995) y las β-1,3 glucanasas (Gianinazzi-Pearson y col., 1996; Lambais y Mehdi 1995), enzimas implicadas en la biosíntesis de fitoalexinas como fenil alanina amonioliasa (PAL), la chalcon sintasa (CHS) y la chalcon isomerasa (CHI) (Harrison y Dixon y col., 1993, Volpin y col., 1995), así como

proteínas como las glicoproteínas ricas en hidroxiprolina (HRGPs), las cuales en combinación con las β 1-3 glucanasas podrían reforzar las paredes celulares.

Estas respuestas han sido estudiadas en la simbiosis micorrízica (Spanu y col 1989; Dumas Gaudot y col 1992, Harrison y dixon 1993, 1994; Lambais y Mehdy, 1990; Volpin y col 1994; Franken y Gnadinger, 1994; Vierheilig y col., 1994). En este sentido hibridaciones *en situ* en *M truncatula* han mostrado que el incremento en el nivel del PAL y de CHS, es significativo en las células que contienen arbusculos (Harrison y Dixon 1994). En contraste, otras enzimas, no parecen estar activadas por el establecimiento de la simbiosis, como puede ser el caso de las peroxidasas (Franken y Gnadinger, 1994), puesto que estas enzimas están implicadas en el reforzamiento de la pared en respuesta a patógenos, indica que los hongos y su planta hospedadora producen una alta compatibilidad, donde la respuesta defensiva de la planta es extremadamente pequeña. Además parece ser que la actividad de estas enzimas no está relacionada con el control de la micorrización, puesto que se ha visto que una colonización normal en plantas transgénicas de tabaco expresando diversas isoformas de quitinasas (Gianinazzi-Pearson y col 1996). Vierheiligat y col (1993), fueron los primeros en comprobar que aunque las raíces de plantas transgénicas de *Nicotiana sylvestris* expresando una cantidad muy alta de quitinasas haciéndolas muy resistentes a *Rhizocotonia solani*, son colonizadas por *G mosseae* con una intensidad similar a plantas transformadas con un vector vacío. Consecuentemente una estimulación de la resistencia a patógenos con la expresión de genes de defensa en plantas transgénicas no afecta al potencial simbiótico de las mismas, las razones de esto no se conocen, pero la localización de la quitinasa dentro de las vacuolas y puesto que el arbusculo nunca entra en contacto directo con la vacuola de la planta podría ser una de las razones (Gianinazzi-Pearson y col., 1996).

En conclusión, el establecimiento de la simbiosis MA es acompañado por la activación temprana de algunos genes de defensa, pero la inducción es transitoria, las respuestas de defensa difieren en muchos aspectos de aquellos descritos por interacciones patógenas compatibles o no, sugiriendo que mecanismos distintos son activados. En las AM, parece ser basado en la elicitación de respuestas de invasión por el hongo, los cuales son suprimidos o mantenidos a un nivel bajo compatible con una interacción simbiótica (Gianinazzi y col., 1995).

6. Fisiología de las micorrizas arbusculares

Una de las características más importantes de la simbiosis micorrícica, es la transferencia de nutrientes que se produce entre el hongo y la planta. El transporte bidireccional de nutrientes que tiene lugar preferencialmente a nivel de la interfase arbuscular (Smith y Smith, 1990), provee al hongo, heterótrofo, compuestos carbonados producto de la fotosíntesis, mientras que el hongo por su parte proporciona a la planta agua y nutrientes minerales del suelo, principalmente fósforo (Gianinazzi-Pearson y Col. , 1993).

6. 1. Transferencia de nutrientes entre los simbioses

La captación de nutrientes del suelo por una planta depende de una serie de procesos, tanto propios de la planta como del suelo. Así, la disponibilidad del nutriente a la planta depende de la concentración del mismo en el suelo, la capacidad tamponadora del suelo, y fundamentalmente de su ritmo de desplazamiento hacia la superficie de la raíz. Además de los factores edáficos, la estructura de la raíz, longitud y diámetro, tiene una incidencia directa sobre la eficacia en la adquisición de nutrientes.

En condiciones limitantes en alguno de estos nutrientes, las plantas recurren a una serie de estrategias para paliar estas limitaciones, la presencia de las hifas fúngicas que se desarrollan por una parte dentro de la raíz, y por otra parte en el suelo, llega a paliar en cierta medida estas limitaciones nutricionales.

Los nutrientes derivados del suelo, y captados por el micelio presente en dicho suelo, son transferidos desde el hongo a la planta y varían en importancia en los distintos tipos de asociaciones. En las ectomicorrizas y las ericoides por ejemplo la transferencia del Nitrógeno es más importante que la del P, sin embargo ocurre lo contrario en el caso de la simbiosis MA.

En la mayoría de las micorrizas, el carbono orgánico se mueve desde el autotrofo (planta) hacia el heterotrofo (hongo), mientras que nutrientes provenientes de la solución del suelo, se mueven en el sentido contrario. Esta en general asumido que este flujo bidireccional de nutrientes se produce en la misma interfase. Aunque la distribución de la actividad ATPasa ha dado algunas evidencias respecto al los procesos que ocurren en las interfases, sin embargo se dispone de muy poca información sobre la magnitud de este flujo, y las condiciones en las cuales ocurre.

Asumiendo que este movimiento ocurre en la misma interfase, los dos simbiontes deben de tener una membrana plasmática funcional capaz de absorber nutrientes desde el apoplasto.

En este sentido, los resultados de Marx y col., (1982) sugieren que ATPasas activas están presentes tanto en las membranas de la planta como la del hongo sobre todo en las interfases arbuscular. Y que el movimiento bidireccional esta facilitado por la presencia de la H^+ -ATPasas, las cuales, generan la fuerza motriz necesaria para el transporte de solutos (Smith y smith 1997).

6. 1.1. Intercambio de fósforo

La simbiosis entre plantas y hongos formadores de micorrizas incrementa la habilidad de estas a captar nutrientes del suelo, especialmente aquellos que por su baja movilidad en la solución del suelo, no son fácilmente absorbidos por las raíces de las plantas como es el caso del fósforo (Jackobsen y col., 1993; Barea y Jeffries, 1995; Bethlenfalvay y Linderman, 1992; Miller y col., 1995). Cuando la exploración radicular es restringida, más del 80 % de la necesidad de la planta puede ser suministrado por las hifas externas de las MA (Li y col. , 1991a). La efectividad de la adquisición del fósforo por las hifas del hongo es debida:

- (a) La formación del polifosfatos en las hifas lo que mantiene una baja concentración de P_i dentro de las mismas.
- (b) El pequeño diámetro de las hifas lo permite un aumento de cantidad de P adquirido por unidad de superficie comparado con la de la raíz (Junk y col.,1989).
- (c) la producción de fosfatasas ácidas los cuales catalizan la liberación de P de los complejos orgánicos.

El transporte del fósforo desde el suelo, hasta la planta se produce en tres fases; cronológicas (Figura 3); la absorción del fósforo desde el suelo, su translocación a través de las hifas, y finalmente su transferencia hacia la planta a través de la interfase hongo planta. (Cooper et Tinker, 1978).

El micelio externo de la micorriza juega un papel importante en la absorción del fósforo del suelo, gracias a la existencia de transportadores de alta afinidad, como ha sido demostrado por Beever y Bruns (1980). Estos autores han descrito dos posibles mecanismos, de captación de fósforo por las hifas de esporas germinadas de *Gi*

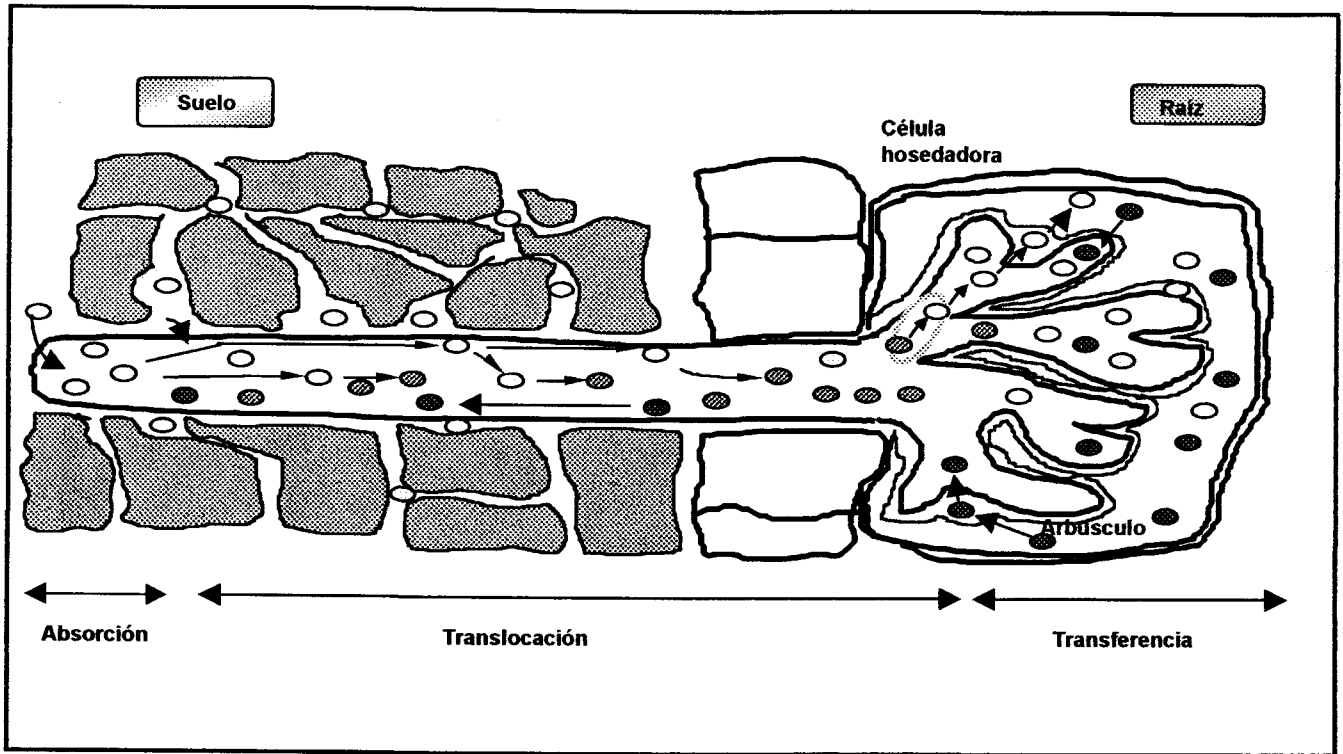


Figura 3. Transporte de nutrientes en la simbiosis MA.

○ Pi ◐ PPi ● CH.

margarita, uno activo de gran afinidad, y otro pasivo. Así mismo, Harrison y van Buuren (1995) han identificado un clon de ADN complementario (GvPT) del hongo *G. versiforme* que codifica un transportador de fosfato de alta afinidad y con expresión restringida al micelio externo por lo que se le atribuye una función esencial en la captación del fósforo del suelo. La absorción del fósforo debe ser activa en todos casos, puesto que la diferencia del potencial electroquímico entre el suelo, y las hifas es desfavorable a una entrada pasiva del mismo. Por lo que se ha propuesto que esta absorción es facilitada vía cotransporte de protones, con la fuerza motriz (PMF) generada por la H^+ -ATPasa liada a la membrana plasmática (Beever y Bruns, 1980 Sanders, 1988, Smith y Smith 1990; Garriel 1995; Murphy y col., 1997; Ferrol y col., 1998).

Una vez captado el fósforo, éste es trasladado hacia las interfases en forma de polifosfatos a través de un gradiente de concentración existente a lo largo del micelio (Tinker, 1975), favorecido por el drenaje que se produce por la planta a nivel del arbusculo, este transporte parece ser mediante corrientes citoplasmáticas rápidas (Azcón-Aguilar, 1991). El tercer paso consiste en la transferencia del fosfato hacia la planta a través de las interfases que se produce mediante varios mecanismos (Figura 4). Como ya habían citado los autores Cox y Tinker en 1976, la transferencia del fosfato hacia la planta se produce mediante un transporte pasivo desde el hongo hacia la planta seguido por la captación activa hacia la célula de la planta. Sin embargo, no son habituales en los sistemas celulares flujos tan elevados de salida de P_i hacia el exterior de la célula (Cox y Tinker, 1976 Smith y Smith, 1990), por lo que es más lógico pensar que la planta induce algún tipo de modificaciones en las membranas arbusculares fúngicas como puede ser un incremento en la permeabilidad (Gianninazzi-Pearson y Azcón-Aguilar, 1991; Smith y Read 1997).

Todavía se desconoce el mecanismo mediante el cual el fósforo es transferido hacia la planta. Sin embargo se asume que ocurre a lo largo de la interfase periarbuscular, y que transportes activos tienen lugar en dicha interfase, para permitir el transporte del fósforo hacia las células de la planta (Smith y Smith, 1989; 1990; 1996).

6. 1. 2. Intercambio de carbono

La transferencia del carbono desde la planta hospedadora hacia el microsimbionte ha sido demostrada, hace, mas de 20 años, exponiendo el tallo de una planta a una atmósfera conteniendo ^{14}C (Ho y Trappe 1973, Beverge y col, 1975). Este carbono debe atravesar la interfase hongo-planta incluyendo las dos membranas, para llegar al hongo. Es asumido que el carbono es "perdido" por la planta por un flujo pasivo, hidrolizado en la interfase apoplástica, y posteriormente absorbido por un mecanismo activo en forma de hexosa por el hongo. Sin embargo, parece inusual para el comportamiento de una célula, lo que hace pensar que, al igual que pasa con el transporte del fósforo, exista algún tipo de modificaciones en la permeabilidad de la membrana vegetal y/o la presencia de algún portador específico que justifique la liberación de estos compuestos tan esenciales. En relación con este transporte, estudios recientes llevados a cabo por Harrison y col., (1996) han permitido la identificación de un ADNc que codifica un transportador vegetal de hexosa, cuya expresión se incrementa en raíces de *Medicago truncatula* colonizadas por el hongo arbuscular *G. Versiforme*, puesto que este incremento no ha sido observado en plantas mutantes mic sugiere que este gen esta relacionado con el establecimiento de una simbiosis micorriza arbuscular funcional. Como en el caso de la transferencia de otros nutrientes en la interfase, es imprescindible la presencia de H^+ -ATPasas que generan la fuerza motriz necesaria para dicho transporte. Una vez en el citoplasma fúngico, los compuesto carbonados, son transformados en orgánulos de reserva, glucógeno y lípidos (Cooper, 1984), y al igual que ocurre con los otros nutrientes, la translocación del compuesto carbonados captados por las hifas del hongo, son transportados mediante corrientes citoplasmáticas, gracias a la diferencia de concentración existente entre el micelio interno y el externo que se desarrolla en el suelo. (Gianinazzi-Pearson y Azcón-aguilar, 1991).

6. 1. 3. Intercambio de nitrógeno

La nutrición nitrogenada en las MA ha sido enfocada principalmente hacia las plantas leguminosas; cuando la simbiosis MA favorece la nutrición fosforada de la planta hospedadora esto se refleja en un incremento de la nodulación, fijación de Nitrógeno y de finalmente en el crecimiento (Robson y col., 1981), En vista del alto requerimiento de P para la nodulación, muchas leguminosas, en condiciones limitantes

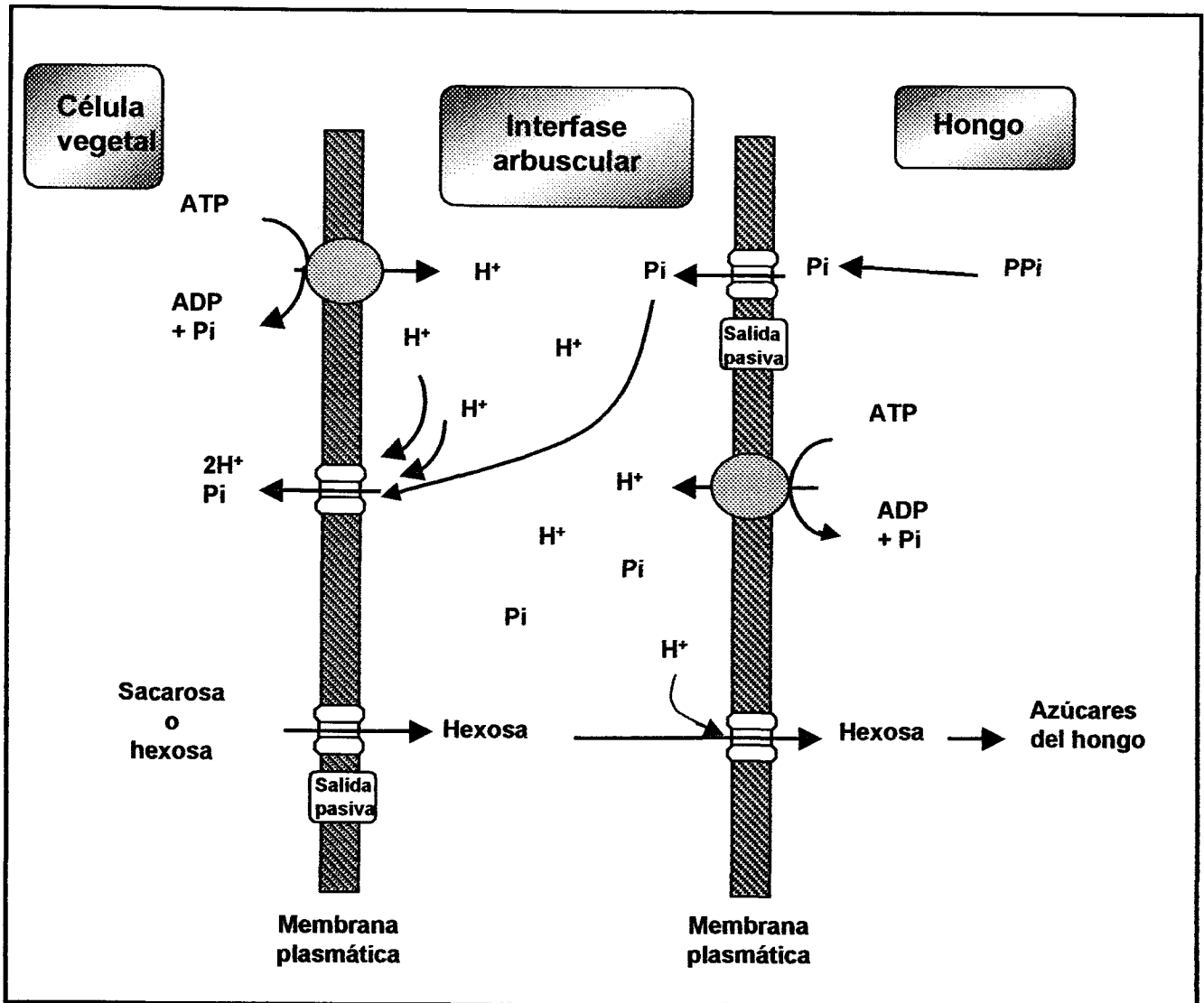


Figura 4. Intercambio de nutrientes en la simbiosis

de fósforo son muy dependientes de las MA. En el caso contrario de las no leguminosas, existen pocas referencias del papel de las MA en la captación del nitrógeno.

En la mayoría de los suelos el nitrato es la forma mas predominante en los mismos, y al contrario que el amonio, es muy difusible en la solución del suelo, lo que puede ayudar a formar zonas de agotamiento en el mismo alrededor de la raíz. Por ello se podría esperar que las hifas de la micorriza jueguen un papel importante en su captación. (Azcón-Aguilar 1991), ya que se ha demostrado mediante experimentos llevados acabo marcando radioactivamente del amonio (^{15}N), que el amonio es la forma bajo la cual el micelio absorbe el nitrógeno del suelo y lo transporta hacia la planta (Ames y col., 1983; Barea y col., 1987; Johansen y col., 1992).

En relación con la nutrición nitrogenada de plantas micorrizadas, se han descrito incrementos en la actividad de enzimas implicadas en la asimilación del N, concretamente la nitrato reductasa y la glutamina sintetasa (Azcón-Aguilar 1990; Carling y col., 1978; Olivier y col., 1983), en el caso de la nitrato reductasa, el efecto de la micorriza parece ser exclusivamente a la mejora de la nutrición fosforada de la planta, (Cliquet y col., 1993). Estudios mas recientes utilizando técnicas de PCR han demostrado la existencia de ARNm de la nitrato reductasa de origen fúngico alrededor del arbusculo, lo que afirma la intervención al igual que el fósforo y el carbono, en la translocación de este nutriente hacia la planta.

6. 1. 4. Intercambio de otros nutrientes

No se sabe mucho sobre el papel de las micorrizas en la absorción del K, Ca, Mg y S. En el caso del potasio, se ha demostrado que más del 10 % del total de K adquirido por las plantas micorrizadas es atribuido al aporte por el micelio de los hongos MA. (Marschener y Dell 1994). En lo que a Ca y S, se ha demostrado mediante el uso de radioisótopos, que el micelio de los hongos MA tiene cierta capacidad para la absorción y el transporte de Ca (Rhodes y Gerdemann, 1978) y S (Cooper y Tinker, 1978).

En lo que al efecto positivo de la simbiosis micorrízica sobre la absorción de otros micronutrientes, por ejemplo el Zn y el Cu, por lo menos parte del efecto es atribuido a la absorción y transporte por el micelio. (Marscher y Dell 1994)

6. 2. Fisiología del agua en MA

Se ha descrito en numerosos estudios que las MA mejoran las relaciones hídricas de las plantas crecidas en condiciones de mésicas, las cuales incrementan la resistencia

al estrés hídrico (Allen y Allen, 1986; Nelsen 1987; Sánchez-Díaz y col., 1990). Aunque no se conoce el papel exacto de las micorrizas en este fenómeno, Cooper (1984) había descrito que las MA inducen una disminución de la resistencia al transporte de agua en las plantas, en condiciones nutricionales adversas. Un aspecto clave en los efectos de las MA en suelos con bajo potencial de agua está basado en la capacidad de las hifas externas del hongo para captar agua más lejos de la zona de deficiencia que normalmente rodea la raíz en condiciones de sequía. Los flujos del transporte de agua por las hifas hacia la raíz medida hasta el momento, no justifican la mayor resistencia de la planta a la sequía (Safir, 1985, Goerge y col., 1992) salvo algunas excepciones (Faber y col., 1991).

6.2. Cambios en la composición lipídica

Las membranas celulares siendo la barrera que separa el citoplasma de apoplasto, juegan un papel fundamental en procesos celulares claves. Tras una exhaustiva investigación sobre la organización estructural de las membranas vegetales, Singer y Nicholson (1972) propusieron el modelo del mosaico fluido para la estructura de las membranas, en la que ésta se organiza como una bicapa lipídica, en la que nada parcial o completamente las proteínas, conformando una estructura más o menos fluida. Aunque esta descripción es generalizada para la totalidad de las biomembranas, hay una gran variabilidad en lo que a composición lipídica se refiere, tanto entre el mismo órgano de especies distintas (Lynch y Steponkus 1987; Rochester y col., 1987), así como distintos órganos de la misma especie (Rochester y col., 1987; Sandstrom y Cleland 1989). Estas membranas contienen proteínas claves implicadas en la transferencia selectiva de aniones y de moléculas, una de las enzimas es la H^+ -ATPasa, el transporte de protones hacia el apoplasto es importante tanto para la posterior absorción de amino ácidos, como un componente clave en la regulación del crecimiento celular (Serrano 1988). La actividad de esta enzima, así como de otras proteínas de la membrana, es influenciada por la composición lipídica en la cual está sumergida. La influencia de la composición lipídica sobre la actividad de estas enzimas ha sido demostrado mediante la reconstitución de estas enzimas en bicapas lipídicas sintéticas con diferentes composiciones lipídicas (Cocucci y Marre 1984, Kasamo y Nouchi 1987, Serrano y col 1988), y por experimentos en los cuales los componentes lipídicos son parcialmente retirados por detergentes (Sandstrom y col., 1987).

Se ha demostrado que la composición lipídica también puede cambiar en respuesta a múltiples estreses ambientales, en este sentido numerosos trabajos han demostrado que el esteres salino, por ejemplo, altera la composición lipídica de las biomembranas (Kuiper 1984, Hirayama y Mihara 1987).

En el caso de la simbiosis micorrízica, casi todas las aproximaciones han sido enfocadas hacia el análisis taxonómico de las distintas especies mediante el uso de las distintas moléculas lipídicas como posibles marcadores bioquímicos. (Bielby 1980; Bielby y Kidby, 1980; Jabaji-Hare y col., 1984; Jabaji-Hare 1988; Bentivenga y Morton., 1996), salvo algunos trabajos que se han enfocado en la composición lipídica de raíces micorrizadas como el caso de Gaspar y col., 1997, que estudio la composición lipídica de las raíces de alfalfa colonizadas con *Glomus versiforme*, estos autores han demostrado que las plantas inoculadas con este hongo presentan un aumento en la cantidad de lípidos totales proporcional a la desarrollo del hongo dentro de la raíz. Usando distintos cultivares de limon (*Citrus limon* L.), Nagy y Norby (1979), han demostrado que la inoculación con *Glomus mosseae*, induce un incremento significativo en Triglyceridos, y lípidos neutros, en comparación con raíces control. En cuanto a los esteroides se ha demostrado, también trabajando con homogeneizados de raíz entera de micorriza y raíces control, un aumento significativo en este ácido graso en respuesta a la colonización micorrhízica (Schmitz et al., 1991; Frey et al., 1992), cabe resaltar el que la composición de esteroides en las membranas celulares esta estrechamente relacionada con fenómenos de permeabilidad en membranas. Aunque estos autores han demostrado un cambio en la composición lipídica en respuesta a la colonización micorrízica, todas estas observaciones han sido realizadas con homogeneados de raíces enteras lo que no permite identificar las alteraciones lipídicas que se producen a nivel de las membranas. Sin embargo (Bago y col., 1994), aislando microsomas de raíces de Cebolla (*Allium cepa* L.) y de Girasol (*Heliantus annuus* L.) ha demostrado alteraciones en la composición lipídica en las membranas, así como de sus propiedades físicas.

7. Sistemas de transporte iónico a través de las membranas celulares

La permeabilidad selectiva a los aniones y solutos que presentan las membranas celulares se debe a la presencia de ciertos sistemas de transporte que regulan la composición iónica y molecular del medio intracelular. Estos sistemas de transporte están ubicados principalmente en el plasmalema y el tonoplasto (Poole 1987, Spanswick 1981, Serrano 1985, Sze 1985). El funcionamiento de estos sistemas crea una diferencia

de potencial eléctrico a través de estas membranas, así como una diferencia de pH, neutro en el citoplasma, y ácido en la vacuola. El gradiente electroquímico generado por el transporte de H^+ mediado por estos sistemas bioelectrogénicos, proporciona la fuerza motriz para el transporte de diferentes solutos (cationes aniones, azúcares... etc.), mediante transportadores secundarios ubicados en dichas membranas (Figura 5) (Serrano 1989, Sze y Col., 1992).

El potencial electroquímico creado por estos sistemas tiene dos componentes bien diferenciados; un gradiente de pH y un potencial eléctrico. Existen dos vías bioelectrogénicas bien diferenciadas en las células vegetales. Una mediada por el bombeo de protones dependiente de la hidrólisis de ATP o PPI, catalizado por enzimas H^+ -ATPasa asociadas al plasmalema o al tonoplasto principalmente (Serrano 1985, Sze 1985). Y otro mediado por los sistemas redox, dependiente de la oxidación de sustratos reducidos (NADH... etc.) (Lassy y Col., 1986; Barr, 1988). En el caso de los sistemas redox asociados a las membranas, estos son capaces de proporcionar la energía necesaria para el desarrollo de las mismas funciones que la H^+ -ATPasa, constituyendo un sistema alternativo de energetización de las membranas que puede actuar, en el transporte de iones (Lin., 1982; Pool., 1978). Está demostrado que tanto los sistemas redox como los enzimas endomembranarios H^+ -ATPasa son claves para el acoplamiento de la energía metabólica al transporte de solutos a nivel de la membrana plasmática, aunque su modo de generar este gradiente es diferente; mediante la hidrólisis de ATP en el caso de las ATPasa, y mediante oxidación del sustrato NAD(P)H en el caso de los sistemas redox (Bienfait y Lutttge, 1988; Rubinstein y Luster 1993), en todos caso los dos sistemas, tanto los sistemas Redox, como las H^+ -ATPasa, son responsables de la generación de un gradiente electroquímico mediante el flujo de H^+ .

7. 1. Propiedades de las ATPasas asociadas a membrana

Se puede considerar la ATPasa, como una enzima clave en el control de muchas funciones vitales en la células (Serrano 1989). El trabajo pionero de *Hodges y Col* (1972) ha demostrado por primera vez la existencia de actividad ATPásicas en vesículas de membrana. Este trabajo representó el primer paso hacia la caracterización bioquímica de la H^+ -ATPasa, primero en vesículas (Serrano 1984) y luego en enzimas solubilizadas con detergentes (serano 1985), finalmente una caracterización molecular. Dichas

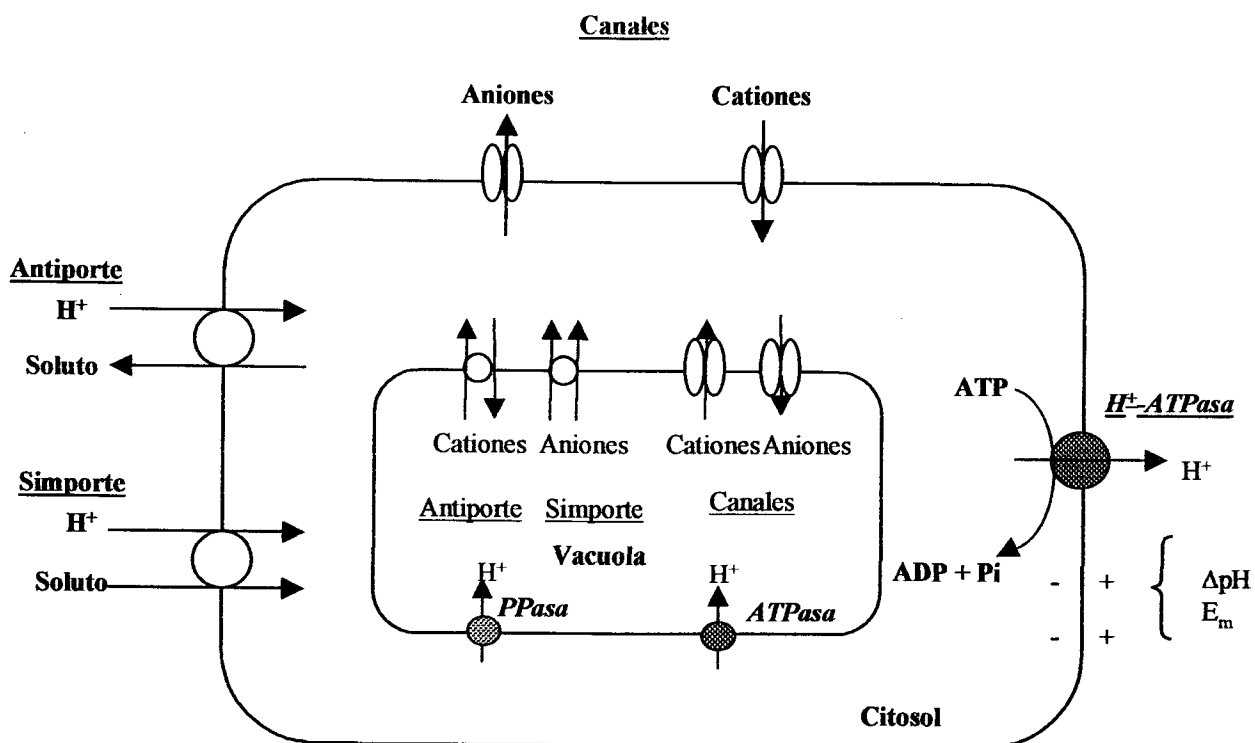


Figura 5. Modelo simplificado de las bombas primarias de H^+ , transportadores acoplados a flujo de H^+ y canales existentes en la membrana plasmática y tonoplasto de las células vegetales tomado de Sze y col (1992).

caracterizaciones mostraron una gran similitud entre las H^+ -ATPasa asociadas a membranas de las plantas y los de los hongos.

La H^+ -ATPasa a sido considerada como una enzima clave en la fisiología de la plantas y de los hongos debido al importante papel que juega en numerosos procesos (Figura 5), la bomba de protones controla directamente el pH intra- y extra-celular (Smith 1979). la absorción de nutrientes y el turgor celular (Marre, 1979; Poole 1978; Serrano 1985). los cambios del pH intracelular controlados por la H^+ -ATPasa de la membrana plasmática parece ser implicado en la interrupción de la dormancia y la germinación de las esporas fúngicas (Busa 1982) y de las semillas de plantas (Marre 1979), Además, se ha demostrado el papel que juegan estas enzimas en la carga de nutrientes inorgánicos en el xylema, la carga de nutrientes orgánicos en el floema de las hojas (Luttge y col 1979; Maree y Col 1979; Serrano y col 1985, Zeiger 1983). Finalmente ha sido sugerida la participación de la bomba de protones en el desarrollo de la polaridad de células en crecimiento y órganos como pueden ser raíces, pelos radicales, tubos polínicos, y hifas fúngicas. (Harold 1986; Jaffe 1981.).

Existen por lo menos, dos clases de ATPasas electrogénicas en vesículas microsomales, extraídas, de distintas plantas, en función de su sensibilidad a algunos inhibidores (Tabla3) (Benett y col., 1984; Churchill y Sze 1984); El primer tipo es sensible a vanadato y el segundo tipo es insensible este inhibidor. Aunque existen varios tipos de ATPasas, las ligadas a membrana plasmática juegan un papel capital en la captación de nutrientes, puesto que son estas clases de ATPasa, las que se encuentran en contacto directo con el medio externo. Mientras que las ligadas al tonoplasto juegan un papel en el mantenimiento del turgor de la vacuola,

7.1.1. Propiedades de la H^+ -ATPasa asociada a la membrana plasmática

a. Características bioquímicas

La H^+ -ATPasa de la membrana plasmática forma un intermediario fosforilado identificable durante su ciclo catalítico, en el cual el fosfato en la posición terminal de la molécula de ATP es ligado al residuo aspartato de la proteína. (Palmgreen y col., 1991) Esta, es una característica común de una gran familia de ATPasa llamada P-ATPasas (Pederson y col., 1987; Serrano 1990).

Como se aprecia en la Figura 6, la H^+ -ATPasa es una proteína de un peso molecular de 100 KDa, y que se compone de un solo polipéptido de que se predice que se ancla a la membrana por 10 dominios intremembranales (Figura 6) (Wach y col.,

1992). Esta proteína transporta 1 H⁺ por ATP hidrolizado. Estudios bioquímicos han demostrado que la actividad de la ATPasa asociada a la membrana plasmática es sensible a ortovanadato (Gallagher y Leonard 1982), pero no es sensible a oligomicina, inhibidor de la ATPasa mitocondrial (Hodges 1976), ni al nitrato inhibidor del tonoplasto. La actividad basal de la Mg-ATPasa es estimulada por cationes alcalinos en esta secuencia: K⁺ > NH₄⁺ > Rb⁺ > Na⁺ > Cs⁺ > Li⁺ (Hodge 1976), mientras que los aniones no tienen ningún efecto sobre la actividad de la ATPasa asociada a la plasmalema. El pH óptimo de la H⁺-ATPasa es de 6.5 (Hodges 1973, 1976).

b. Características moleculares

Las características bioquímicas de las H⁺-ATPasas pueden variar en función del tejido en el cual se encuentran, estos cambios podrían ser atribuibles a las distintas isoformas que presenta la H⁺-ATPasa. En este sentido la secuencia de amino ácidos de la H⁺-ATPasa deducidas de las secuencias de nucleótidos ha puesto en evidencia que el gen de la H⁺-ATPasa presenta una gran complejidad y diversidad, codificando varias isoformas distintas. Estudios genéticos y moleculares han demostrado que, la existencia de varios genes que codifican para la H⁺-ATPasa (por lo menos 7 genes en tomate (Ewing y Bennett, 1994, y 10 en *Arabidopsis thaliana* (Sussman y col 1994), es el principal factor que regula la actividad de la H⁺-ATPasas en los distintos tejidos y células. Por otro lado los estudios de *Northern Blott* del RNAm extraído de varios tejidos celulares demostraron que la expresión de tres isoformas conocidas en *A. thaliana* y cuatro en tabaco son reguladas diferencialmente en función del órgano en cuestión (Harper y col., 1990; Moriau y col., 1993; Perez y col., 1992).

La utilización de genes informadores (GUS) fusionados con las distintas isoformas (aunque no permite la detección de la regulación postranscripcional), permite la localización subcelular de dichas isoformas mediante técnicas histoquímicas. Así mediante análisis microscópico se pudo revelar que la isoforma AHA-1 se expresa únicamente en el floema de los tejidos vegetativos y posiblemente codifica para una ATPasa que genera la fuerza motriz necesaria para el transporte de azúcares, mientras que la AHA-2 se expresa preferencialmente en los pelos y otros tejidos radicales y por consecuencia codifican ATPasas responsables de la absorción de nutrientes minerales del suelo, por otra parte la AHA-10 se expresa únicamente en las semillas, y codifica para una ATPasa relacionada con la nutrición de los embriones (Harper y col., 1994). En el caso de la simbiosis MA los datos obtenidos usando la misma técnica en plantas

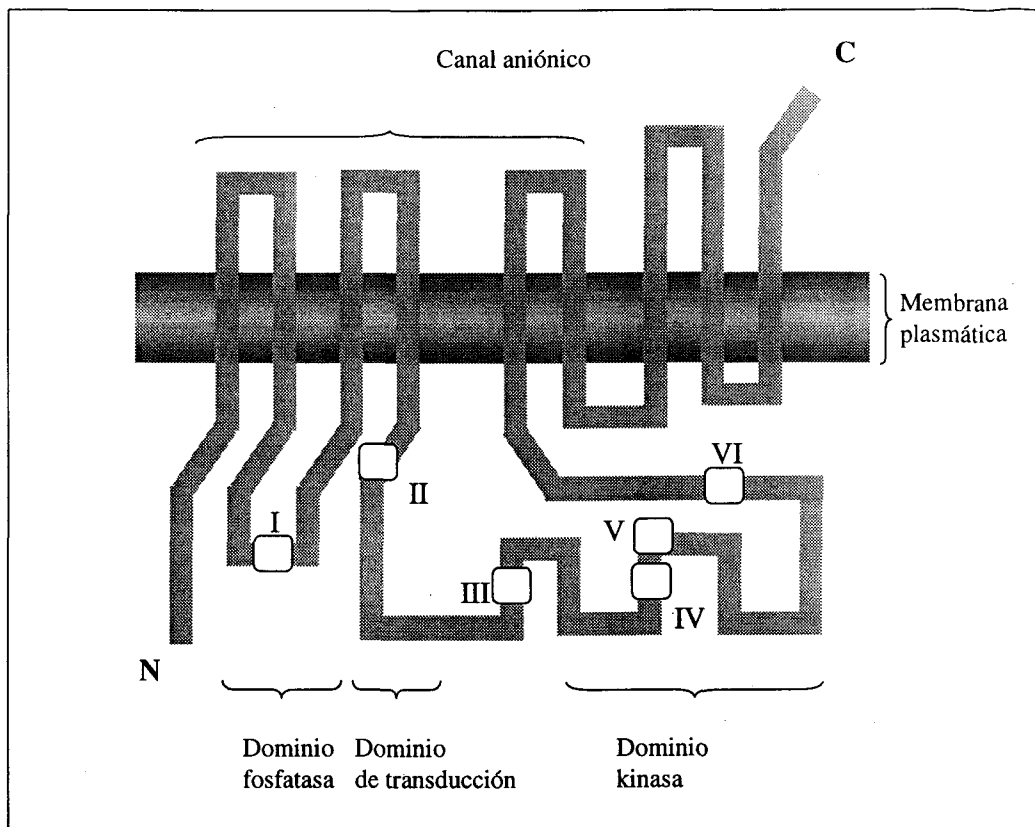


Figura 6. Estructura transmembranaria y dominios funcionales de la H⁺-ATPasa de la membrana plasmática. Tomado de Serrano (1989).

UNIVERSIDAD DE CHILE
 21 JUN. 1998
 COMISION DE DOCTORADO

transgénicas de tabaco, pudo confirmar la implicación de dos isoformas PAM1 y PAM2 en el transporte de nutrientes entre los dos simbiontes a nivel del arbusculo. lo que refuerza la idea de la implicación de la interfaces en el intercambio de nutrientes en la interfaces arbuscular (Gianinnazzi-Pearson. y col., 1998).

c. Funciones fisiológicas

La energía ligada al gradiente electroquímico que se forma a raíz de la actividad de las ATPasa codificadas por estas distintas isoformas, proporciona la fuerza motriz necesaria para la translocación los nutrientes a través de la membrana, en contra de su gradiente electroquímico, mediante transportadores secundarios ubicados en la misma, según se esquematiza en la Figura 8a.

En este sentido, se ha demostrado que nutrientes vitales para la planta como puede ser el K^+ , el NO_3^- , sacarosa y nitrógeno, son transportados mediante alguno de estos sistemas de transporte. En el caso del K^+ , se ha descrito un sistema de transporte de alta afinidad, que funciona con una estequiometría de $1H^+/K$ (Schachtman y Schroeder, 1994). Por otro lado la absorción de aniones como el NO_3^- tiene lugar en condiciones de baja concentración del mismo modo gracias un sistema simporte H^+/NO_3^- , posiblemente con una estequiometría de dos o más protones por molécula de NO_3^- translocada (Tsay y col., 1993). Por otra parte, el transporte de nutrientes orgánicos como los azúcares y los aminoácidos, en contras de su gradiente de concentraciones tiene lugar gracias a la fuerza motriz que proporciona la H^+ -ATPasa. Tanto la sacarosa como los amino ácidos son activamente transportados, a través de la membrana plasmática, por sistemas de simporte H^+ /azúcar y H^+ /aminoácido. Las mayores evidencias que apoyaron la existencia de estos sistemas fueron, por una parte la, la despolarización en el potencial de membranas provocado por la adición de sacarosa a las vesículas de membrana (Lin, 1985; Wright y Ficher, 1985), y por otra parte la alcalinización de los medios extracelulares provocada por la adición de sacarosa (Lin, 1985; Wright y Fisher, 1985).

d. Regulación de la H^+ -ATPasa

Teniendo en cuenta el importante papel que juegan las H^+ -ATPasa en el metabolismo celular de las plantas cabe esperar que esta enzima esté bajo un control riguroso de factores de crecimiento de las plantas como pueden ser hormonas de crecimiento, luz y toxinas producidas por patógenos.

En el caso de las hormonas, hace mas de dos decadas que se ha visto que las auxinas promueven el crecimiento mediante la estimulación del bombeo de protones en avena (Cleland 1973, Rayle 1973), en trigo (Marré y col, 1973,, Lado 1973) y mas recientemente en hipocotilo de soja (Raylan 1980), en los últimos años se ha demostrado que las auxinas estimulan el flujo de membranas desde el retículo hacia la membrana plasmática (Hager y col., 1991),y puesto que las auxinas inducen también un aumento en la actividad y la cantidad de las H^+ -ATPasas en la membrana plasmática, resulta lógico pensar que el mayor flujo de membranas provocado por las auxinas podría estar implicado en la inducción por dichas hormonas. Por otro lado fitotoxinas como la fusicoccina, producida por un microorganismo patógeno *Fusicoccum amygdalii*, activan las H^+ -ATPasa (Marre y col., 1985). Posiblemente vía dominio C-terminal autoinibitorio (Johanson, y col., 1993)

La luz es también otro factor potencial que regula la actividad H^+ -ATPasa ya que se ha visto que las células guardas de las estomas se activan directamente por la actividad de la H^+ -ATPasa de la membrana plasmática sin que intervengan la maquinaria fotosintética (Volved y col. 1985; Shimazaki y col,1986).

7.1. 2 ATPasa asociada al tonoplasto

En las células de las plantas superiores, la vacuola juega un papel fundamental en el mantenimiento, la regulación del turgor celular y en el transporte y acumulación del iones y metabolitos. Gran parte de estos parece ser mediados por dos enzimas diferentes que transportan H^+ a través del tonoplasto (Rea., 1986); una H^+ -ATPasa (Sze., 1986) y una H^+ -Pirofosfatasa (Sze., 1985), El gradiente electroquímico de protones generado por la actividad de la H-ATPasa ligada a la vacuola, acidifica el lumen vacuolar y conduce la acumulación de solutos dentro de la vacuola, como el calcio y aniones Figura 5, (Sze., 1992).

a. Características bioquímicas

La ATPasa asociadas al tonoplasto o V-ATPasa es sensible a los aniones y es insensible a inhibidores de las H^+ -ATPasa del tipo P (vanadato), y a inhibidores de la H^+ -ATPasas de la mitocondria (Azida, oligomicina), al contrario es sensible a nitrato y a la bafilomicina (Bowmany col., 1988; Ward y Zse, 1992). Además numerosos aniones inorgánicos la estimulan en este orden $Cl^- > Br^- > L^- > HCO_3^-$, SO_4^- , su insensibilidad al vanadato afirma que al contrario de las P-ATPasa, las V-ATPasa no forman

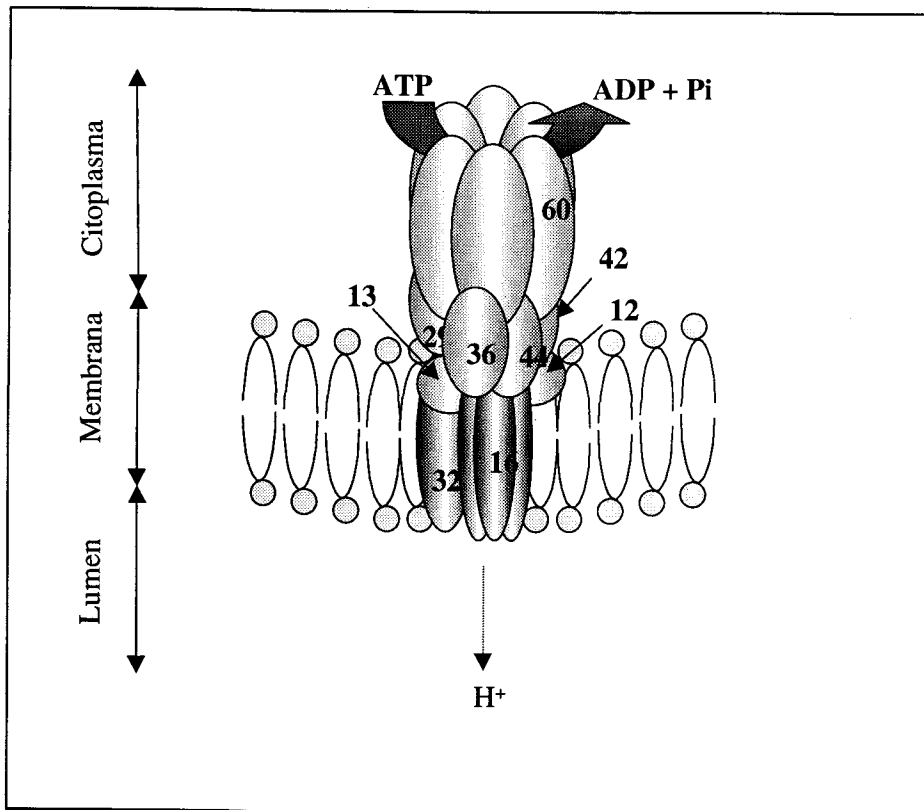


Figura 7. Estructura de la V-ATPasa. El complejo periférico, V₁, incluye las subunidades catalíticas (70 kDa) y reguladora (60 kDa), y varias subunidades accesorias de funciones desconocidas. El complejo integral embebido en la membrana, V₀, lo forman 6 copias del proteolípido de 16 kDa junto con las otras subunidades integrales, formando el canal para el transporte de H⁺.

intermediario fosforilado en la ciclo catalítico. El pH óptimo de esta clase de ATPasas es de 7.0 a 8.0 (O'Neilly col., 1983; Wang y col., 1984).

La enzima V-ATPasa es multimérica, y posee una típica estructura de cabeza y pedúnculo (Figura 7), para la estructura de la V-ATPasa de raíces de avena, las subunidades se organizan en un complejo integral embebido en la membrana y que forma el canal de H^+ (V_0 , y el complejo periférico V_1), conformando una estructura similar a las F-ATPasa (Gorgarten y Taiz 1992, Sze y col. 1992).

Actualmente existe un gran consenso acerca de la composición en subunidades de las V-ATPasa, las cuales parecen ser similares en todas las eucariotas. En la Tabla 4, se muestra una recopilación de lo que hasta ahora se conoce de las composición en subunidades de diferentes orígenes vegetales y en comparación con el enzima de algunas fuentes de origen animal (Sze y col., 1992). Los tres polipéptidos mayoritarios (60-70, 55-60 y 16-17 kDa) inicialmente definidos como subunidades, son comunes a todas a todas las V-ATPasas (Mandala y Taiz. 1985; randall y Sze, 1986; Manolson y col., 1985; Forgac; 1989). La subunidad 70 kDa, en base a la secuencia de oligonucleótidos es probablemente el sitio de hidrólisis de ATP (Mandalay Taiz., 1986; Zimniak y col., 1998; Bowman y col. 1988). La subunidad 60 kDa parece tener un papel en la regulación (Manolson y col., 1985; 1988). En lo que al papel de la unidad 16 kDa, se ha visto que la inhibición por DCCD es resultado de la modificación covalentes en dicha subunidad (Kaestern y col., 1988; Rea y col., 1987). La secuencia de amino ácidos de dicha subunidad ha puesto en evidencia que es una molécula con cuatro dominios transmembranarios (Lai y col., 1991), uno de los dominios esta implicado en conductancia de los protones. Todavía no se conoce el papel exacto de las otras subunidades, que podrían tener funciones estructurales, como la de ligar el complejo periférico al transmembranario, o en algún tipo de regulación. El papel de estas subunidades podría determinarse mediante mutagénesis en dichas subunidades, en este sentido, mutaciones en las subunidades 70-, 60- 31-, y 16 Kda, han demostrado que estas subunidades juegan un papel esencial en el crecimiento, ya que su ausencia, o disfuncionalidad, limita el crecimiento de levaduras a altos pH (7.5) o a altas concentraciones de calcio (Nelson y Nelson 1990; Noumi y col., 1991; Foury y col., 1990).

b. Características moleculares

Muchas evidencias sugieren que las plantas contienen una familia génica de las V-ATPasas. En lo que respecta la subunidad 16 kDa, se han descrito por lo menos cuatro isoformas distintas (Lai y col., 1991), por otro lado se ha descrito el mismo número de subunidades para la subunidad 70 kDa (Narasimahm y col., 1991), lo que afirma que al igual que la P-ATPasa, la V-ATP es codificada por una familia génica importante, y que las distintas isoformas podrían tener algún papel en la regulación de dicha enzima (Zse y col., 1992).

Fuente	Composición en subunidades												
<i>Remolacha</i>	100	67	55	52	44	38	37	32	32	16		1	
<i>Vigna</i>		68	57		44	42	34	32		16	13	12	2
<i>Cebada</i>	115	68	53		45	42	36	32		17	13	12	3
<i>avena</i>		70	60		44					29	16	13	4

Tabla 3. Composición en subunidades de la H⁺-ATPasa vacuolar de distintas plantas.

7.2 Sistemas redox de la membrana plasmática

Esta bien establecido que el gradiente electroquímico de protones a través de la membrana plasmática proporciona directa o indirectamente la energía necesaria para el transporte de iones y metabolitos dentro y fuera de las células vegetales (Figura 8 b). La generación de este gradiente depende de la actividad de las bombas de protones ubicadas principalmente en la membrana plasmática. Tanto en células vegetales como animales, se atribuye la extrusión de H⁺ exclusivamente a la H⁺-ATPasa (Spanswick, 1981, 1985; Sze, 1984). Sin embargo, se había propuesto que además de la actividad H⁺-ATPasa, el transporte de electrones asociado a los sistemas redox la membrana plasmática podría estar implicado en la generación y la regulación del transporte de protones (Ivankina y Novak 1981, Federico y Giartoso, 1983; Rubinstein y col, 1984, Bottger y Luthen 1986). Evidencias de la existencia de transporte de protones en la membrana plasmática, ha sido proporcionado en experimentos llevados a cabo en raíz (Dorig y col., 1992, Klobus y Buczek, 1992, Grabov y col., 1993), segmentos de raíz

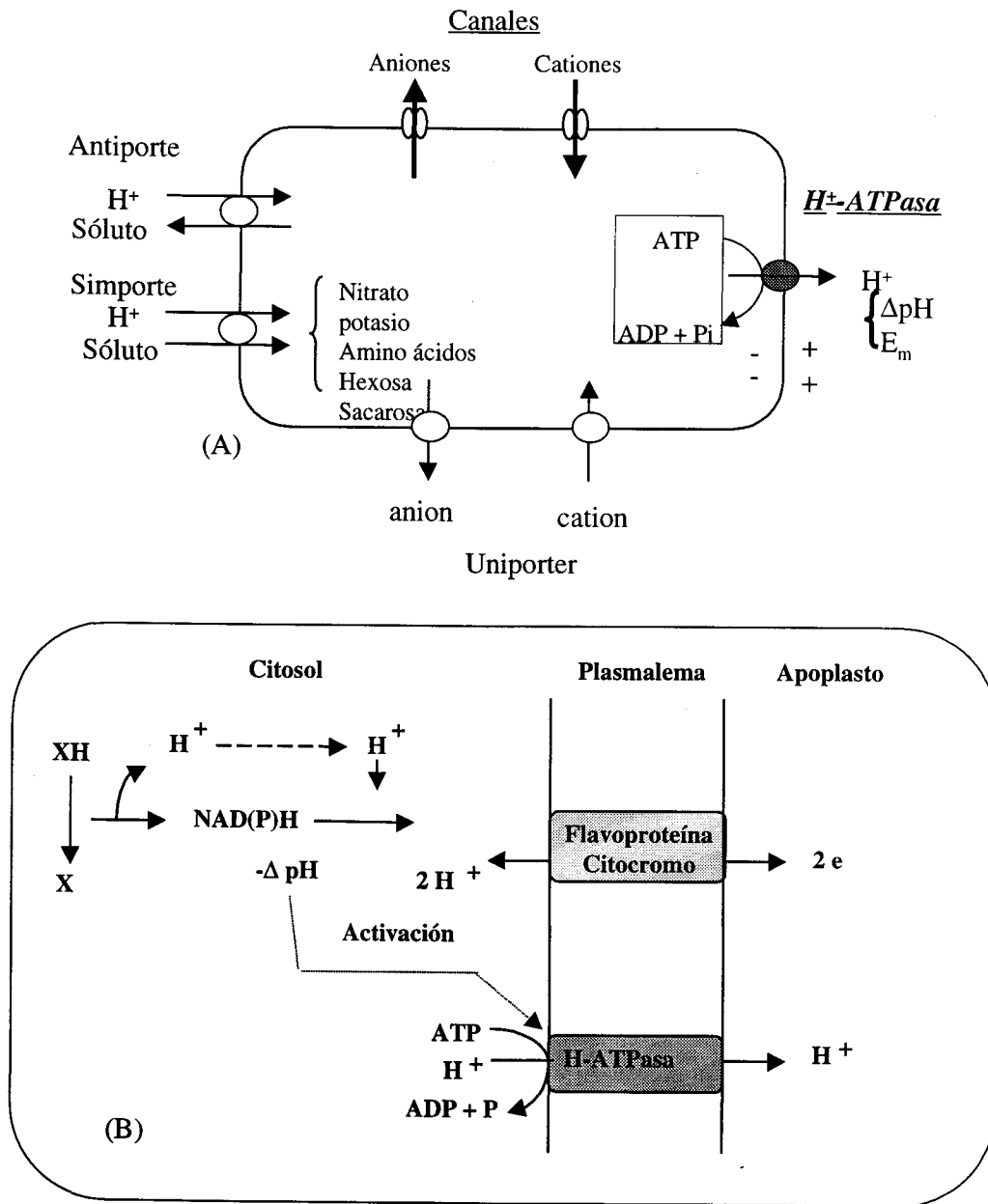


Figura 8. Esquema teórico de los sistemas de transportadores secundario, energizados por la actividad de la H⁺-ATPasa. La H⁺-ATPasa actúa como transportador primario creando una fuerza protón motriz que se compone de dos componentes diferenciados: una diferencia de pH (ΔpH), y una diferencia de potencial eléctrico (E_m), la cual proporciona la energía necesaria para el funcionamiento de los transportadores secundarios (A). Además se pone en evidencia la relación existente entre los sistemas Redox de la membrana plasmática y la enzima H⁺-ATPasa (B).

(Federico y Giartosio, 1983), protoplastos aislados (Vani y Raghavenda, 1992) y vesículas de membrana plasmática (Bottger, 1989, Askerlund y Larsson , 1991).

Las reacciones de oxidoreducción ocurren cuando los electrones son transferidos desde una sustancia donadora a una receptora. Estas reacciones son cruciales para las reacciones bioquímicas de cualquier organismo, ya que son requeridas para la transducción de energía y la asimilación de nutrientes. Dado su elevada importancia, los sistemas redox han sido investigados intensamente en la última década, aunque estas investigaciones han sido enfocadas principalmente en el estudio de los sistemas redox de la mitocondria el cloroplasto y el retículo endoplasmático, se ha descubierto recientemente que el transporte de electrones también ocurre en la membrana plasmática.

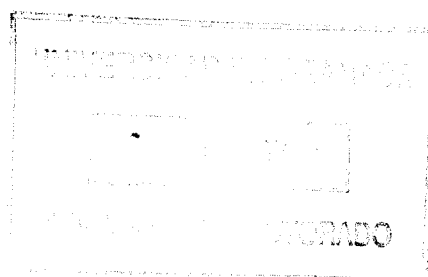
Plan de Trabajo

Plan de Trabajo

Según los objetivos planteados anteriormente se realizó el siguiente Plan de Trabajo:

- 1- Determinación del grado de dependencia del tomate a la formación de micorrizas arbusculares.
- 2- Determinación del papel de la H^+ -ATPasa del plasmalema en la simbiosis a nivel de membranas purificadas.
- 3- Análisis de los cambios inducidos por la formación de micorrizas en la composición lipídica de raíces y fracciones de membrana.
- 4- Detección e identificación de proteínas asociadas al desarrollo de la simbiosis micorrícica.

Material y Métodos



Para la realización de la presente memoria de tesis Doctoral se eligió como planta hospedadora el tomate (*Lycopersicon esculentum* var *Eaerly meach*), planta de alto interés económico y cuya caracterización fisiológica, bioquímica y genética esta bastante avanzada, por lo que se podría considerar como planta de referencia bioquímica.

Los hongos MA utilizados en los distintos ensayos fueron *G. intraradices* (Nicol. & Gerd.) Gerd. & Trappe (BEG), o *Glomus mosseae* (Nicol. & Gerd.) Gerd. & Trappe (BEG), Como se explicará más adelante, los cuales pertenecen a la colección del Departamento de Microbiología del Suelo de la Estación Experimental del Zaidín.

1 MEDIDA DEL GRADO DE DEPENDENCIA DEL TOMATE A LA FORMACIÓN DE MICORRIZAS

La determinación del grado de dependencia del tomate a la formación de la simbiosis MA se llevó a cabo mediante la comparación de plantas controles y micorrizadas crecidas en presencia de diferentes niveles de P en el suelo, y evaluando la respuesta que se produce en el desarrollo de las plantas y en su asimilación de éste y otros nutrientes (Barea y col, 1983; Azcón-Aguilar y col, 1993).

1.1. Preparación del material

1.1.1. Sustrato

Como sustrato se utilizó una mezcla 1:1 (v:v) de suelo procedente de una de las parcelas de la Estación Experimental del Zaidín, y cuya composición se presenta la Tabla 4, con arena de cuarzo libre de nutrientes. Dicha mezcla se tinalizó durante una hora a vapor fluente durante tres días consecutivos, a fin de eliminar los propágulos de micorrizas presentes en la misma. El sustrato estéril se dividió en tres lotes iguales, a cada uno de los cuales se le adicionaron 0, 125 o 250 mg de KH_2PO_4 por Kg de suelo. Una vez adicionado el fosfato al suelo, la mezcla se dejó reposar durante tres semanas, para permitir la equilibración de sus componentes, antes de su empleo definitivo.

pH (H ₂ O)	8.09	
Arcilla	21.53	(%)
Limo	24.35	(%)
Arena	54.13	(%)
Materia orgánica	1.81	(%)
Nitrógeno total	0.25	(%)
Fósforo disponible	0.25	(ppm)
Potasio	332.00	(mg/Kg suelo)

1.1.2. Material biológico

1.1.2.1. Material vegetal

Las semillas de tomate (*Lycopersicon esculentum* var Earlymech) se desinfectaron superficialmente con lejía comercial durante 3 min.. Después de sucesivos lavados con agua destilada estéril hasta eliminar totalmente el esterilizante, las semillas se depositaron en un semillero con vermiculita estéril y se germinaron durante 3 días a 28 °C en oscuridad.

1.1.2.2. Material fúngico

El inóculo MA utilizado consistió en una mezcla de suelo rizosférico conteniendo esporas, micelio y raíces colonizadas por *Glomus intraradices*. Para su obtención, plántulas hospedadoras de lechuga se inocularon con esporas de *G. intraradices* y se cultivaron durante 4 meses en una mezcla estéril arena suelo Zaidín (1:1, v.v) en condiciones controladas de invernadero (18-25 °C, 16 h de luz) y una humedad relativa de 60-70%. Tras determinar que el grado de micorrización era adecuado, la parte aérea de la planta hospedadora se desechó, dejándose secar el resto durante 4 días a temperatura ambiente. El sustrato conteniendo raíces colonizadas, micelio y esporas (inóculo bruto), se conservó a 4 °C hasta su posterior uso.

1.1.2.3. Inoculación con los hongos de la micorriza:

Las plántulas de tomate se inocularon con el hongo MA mediante la adición al sustrato de un 20 % de inóculo bruto de *G. Intraradices*. En el caso del tratamiento control, se adicionaron 10 ml de un filtrado del inóculo MA. Dicho filtrado se obtuvo tras maceración durante 12 h y a temperatura ambiente de 10 g de inóculo en 100 ml de agua estéril.

1.2 Procedimiento

El suelo suplementado con las diferentes dosis de P utilizadas en el ensayo se repartió en macetas de 2 Kg de capacidad. Para cada dosis de P, la mitad de las macetas se inocularon con el hongo MA (tratamiento micorriza) y la otra mitad con el filtrado del inóculo (tratamiento control). En cada maceta se colocaron dos plántulas de tamaño uniforme de aproximadamente 4 cm de longitud.

Las plantas se mantuvieron en régimen de invernadero (18-25 °C, 16 h de luz), humedad relativa 60-70%, y se regaron con agua destilada para mantener el suelo a una humedad constante, próxima a la capacidad de campo del mismo. A lo largo del ensayo las plantas se fertilizaron semanalmente con 20 ml de la solución nutritiva de Hewitt, carente de P y cuya composición se indica en la Tabla 5 (Hewitt, 1952). Las macetas se distribuyeron al azar rotándolas semanalmente con objeto de eliminar las posibles diferencias posicionales

Compuesto (g/l)	Solución madre (ml)	Para 1 Litro
KNO ₃	30.30	10.0
Ca(NO ₃) ₂	70.80	20.0
MgSO ₄	18.40	20.0
Fe-EDTA	2.50	10.0
MnSO ₄	2.23	1.0
CuSO ₄	2.40	0.1
ZnSO ₄	2.90	0.1
H ₃ BO ₃	18.60	20.0
NaNH ₄ MoO ₄	0.35	0.1

Tabla 5. Solución nutritiva de Hewitt (-P)

1.3. Parámetros determinados

1.3.1. Crecimiento de las plantas

El crecimiento de las plantas se evaluó mediante la determinación de la altura, peso fresco y peso seco, tanto de la parte aérea como del sistema radical. Para la determinación de los pesos secos, el material vegetal se secó durante 24 h a 70 °C, y se dejó enfriar a temperatura ambiente durante 24 h en un desecador.

1.3.2. Determinación del contenido en fósforo y nitrógeno

Una vez seco, se procedió a la molienda del material vegetal mediante un molino de martillos móviles (Culatte, DFH48). La mineralización del mismo se realizó mediante eliminación del material orgánico con ácido sulfúrico SO_4H_2 y peróxido (H_2O_2). Para ello sobre 0.25 de peso seco del material vegetal se añade 5 ml de ácido sulfúrico concentrado y se calienta la mezcla en microondas a presión atmosférica (Maxidigest MX 4350, Prolabo, potencia de 800W) al 50 % de potencia durante 4 minutos. Tras enfriar, se adicionaron cuidadosamente 3 ml de H_2O_2 y se incubó la mezcla durante dos minutos antes de calentar 5 minutos al 80 % de potencia y posteriormente al 90 % de potencia. Tras enfriar de nuevo, se lleva el extracto a un volumen de 50 ml con agua demineralizada (Mingorance y col., 1999). La concentración de N y P se determinó colorimétricamente utilizando un auto analizador de flujo continuo Bran+Luebbe (mod Traacs 2000).

1.3.3. Colonización micorrízica

La extensión del sistema radical que poseía colonización MA se evaluó en una alícuota de fragmentos de raíz elegidos al azar entre una mezcla de fragmentos del sistema radical utilizando con el método desarrollado por Philips y Hayman (1970). Para ello, tras digestión parcial de las paredes y cubiertas celulares de la raíz con una solución de KOH al 10% durante 30 min. a 90 °C, y neutralización con 0.1 N HCl durante 5 min en frío, las raíces se tiñeron con una solución de azul de tripan al 0.05% en ácido láctico, colorante que tiene afinidad por la quitina de la pared fúngica, durante 10 min. a 90 °C. Las raíces teñidas se conservaron en ácido láctico puro para su posterior análisis.

La cuantificación micorrízica se realizó usando la técnica descrita por Giovannetti y Mosse (1980), la cual utiliza una placa cuadrada de 10 cm de lado dividida en cuadrículas de 1 cm de lado. Para ello, fragmentos de las raíces teñidas se extendieron al

azar sobre esta placa y mediante examen con lupa binocular se determinó el número de intersecciones de las raíces con las líneas de las cuadrículas, contándose tanto los puntos de las raíces que presentan micorrización como las que no lo presentan. El porcentaje de intersecciones micorrizadas con respecto al total de intersecciones se considera el porcentaje de longitud de raíz que esta colonizada.

1.4. Análisis estadístico de los datos

Los resultados de peso seco, peso fresco, longitud y contenido en macronutrientes se analizaron utilizando un test de Varianza de dos vías (ANOVA) y el test de Fisher, menor diferencia significativa (LSD), cuando fue necesario.

2. ESTUDIOS BIOQUÍMICOS

2.1. Obtención del material biológico

2.1.1. Obtención de raíces controles y micorrizadas

Las plantas utilizadas para realizar los estudios a nivel de membranas se obtuvieron básicamente como se detalla en el apartado 1.1. (Figura 9), aunque en este caso el sustrato utilizado fue una mezcla arena vermiculita (1:1, v:v). La elección de dicho sustrato se basó en la necesidad de utilizar un sustrato que provoca un daño mínimo a las raíces durante la cosecha, ya que las posibles heridas producidas durante su manipulación podrían alterar los resultados de los ensayos programados. Además, en ensayos preliminares, se pudo comprobar la eficacia de este sustrato para la obtención de niveles óptimos de micorrización.

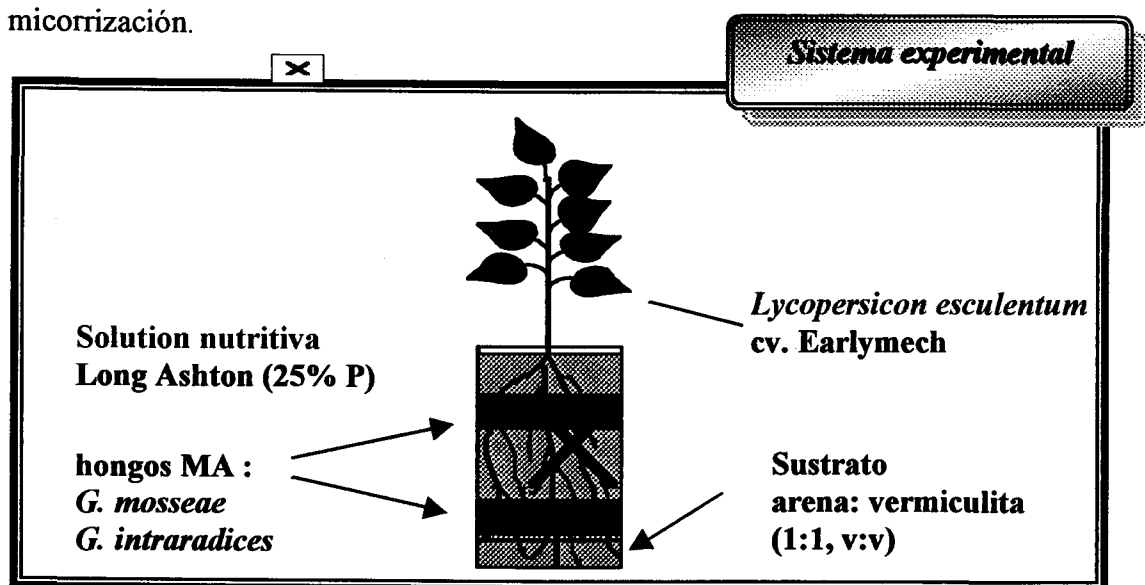


Figura 9. Modelo experimental utilizado para la obtención de las plantas micorrizadas usadas en los estudios bioquímicos

En este caso, para la obtención de un buen nivel de micorrización, plántulas de tamaño uniforme de aproximadamente 4 cm se inocularon con 200 g de inóculo bruto de *G. mosseae* o *G. intraradices* distribuido en dos capas, en contenedores de 1 litro de capacidad (Figura 9). En el caso del tratamiento control, se adicionaron 20 ml/maceta de un filtrado del inóculo MA, obtenido como se detalla en el apartado 1.2.

Las plantas se crecieron en una cámara de cultivo con temperatura y humedad relativa de 25 °C y 70 %, respectivamente, durante el día y de 15 °C y 80% durante la noche. El fotoperiodo fue de 14 h y la intensidad luminosa de 500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Durante las cuatro semanas que duraron los ensayos, las plantas se regaron tres veces por semana con 20 ml de la solución Hewitt, con el contenido en fósforo reducido al 25%, para favorecer el desarrollo de la micorriza.

2.1.2 Obtención de esporas y micelio extraradical

La recolección de esporas se realizó mediante tamizado húmedo y decantación según la técnica de Gerdman y Nicolson (1963). Para ello, 20 a 50 gramos de inóculo bruto fueron homogeneizados en 250 ml de agua destilada y centrifugados durante 2 min. a 2000 rpm. El sedimento obtenido se resuspendió en 250 ml de sacarosa al 50 % y se volvió a centrifugar durante 2 min. a 2000 rpm. El sobrenadante se decantó a través de una serie de tamices de 500, 250 y 50 μm de luz de malla donde se recogieron las raíces, esporocárpodos y esporas respectivamente. Los esporocarpos y esporas se lavaron con abundante agua destilada hasta eliminar completamente la sacarosa y se transfirieron a una placa de Petri conteniendo un papel de filtro húmedo y se rompieron con un la ayuda de una aguja. Las esporas liberadas de los esporocarpos y las esporas recogidas en el tamiz de 50 μm se cogieron con pinzas ultrafinas bajo la lupa binocular y se transfirieron a un tubo Eppendorf conteniendo 500 μl de agua destilada.

En lo que se refiere al micelio extraradical, este último se recogió directamente a partir de las raíces micorrizadas bajo la lupa binocular con pinzas ultrafinas. La viabilidad del micelio obtenido se evaluó mediante tinción vital de Hamel, y col (1990). Para ello, el micelio se incubó en constante agitación durante 24 horas en 10 ml de una solución conteniendo 0.2 M Tris pH 7.4, 4 mg/ml azul de tetrazolió, y 0.05 M de MgCl_2 . Transcurrido el tiempo de incubación, las hifas se lavaron con agua destilada. La viabilidad

de las hifas se determinó mediante análisis microscópico utilizando un porta objetos cuadrado.

2.2. Obtención de las distintas fracciones subcelulares

2.2.1. Obtención de la fracción soluble y microsomal

Para la obtención de la fracción soluble y microsomas se utilizó la metodología descrita por De Michelis y Spanswick (1986), la cual se esquematiza en el Figura 10. Para ello, 10 g de raíces de plantas controles y micorrizadas, a las que se le quitó la zona de los ápices para evitar la dilución de las partes de raíz micorrizada, se lavaron con abundante agua destilada hasta eliminar cualquier resto de arena o vermiculita. Tras mantener las raíces durante 2 h en una solución acuosa de 2 mM CaSO_4 a temperatura ambiente y bajo continua aireación, las raíces se cortaron en fragmentos de 2 a 3 cm y se homogenizaron en un mortero a 4 °C en presencia del medio de homogeneización que se detalla en la Tabla 6, manteniendo una proporción 1/4 de peso fresco de raíces por volumen del medio de homogeneización. El homogenado se filtró a través de cuatro capas de gasa y el extracto celular obtenido se centrifugó a 13,000 g durante 10 min. en una centrífuga refrigerada Sorvall. Parte del sobrenadante obtenido (extracto crudo) se alicuotó y se almacenó a -80 °C para su posterior análisis, mientras que el resto se utilizó para la obtención de las fracciones solubles y de membrana utilizadas en la presente Memoria. Para ello, el extracto crudo se centrifugó a 100.000 g durante 45 min. en un centrífuga Beckman. El sobrenadante obtenido (fracción soluble) fue alicuotado y almacenado a -80°C para su posterior análisis, mientras que parte del sedimento (fracción microsomal) fue resuspendido en 2 ml del medio de conservación indicado en la Tabla 7 y almacenando a -80 °C para su posterior uso en ensayos posteriores. El resto de la fracción microsomal fue resuspendida en tampón fosfato detallado en la Tabla 8, y utilizada para la posterior purificación de la membrana plasmática.

Compuesto	Concentración	
Glicerol	10	%
BSA	0.1	% (p/v)
Tris-MES pH 8.0	25	mM
Sacarosa	250	mM
DTT	2	mM
Mg SO ₄	2	mM
ATP	2	mM
Na ₂ -EGTA	2	mM
PMSF	1	mM
PVPP	10	% (p/v)

Tabla 6. Composición del medio de extracción utilizado para la homogeneización de las raíces

Compuesto	Concentración	
BTP-Tris pH 7.0	2	mM
Sacarosa	250	mM
Glicerol	10	% (v/v)
PMSF	100	μM

Tabla 7. Composición del tampón de conservación utilizado para resuspender las membranas

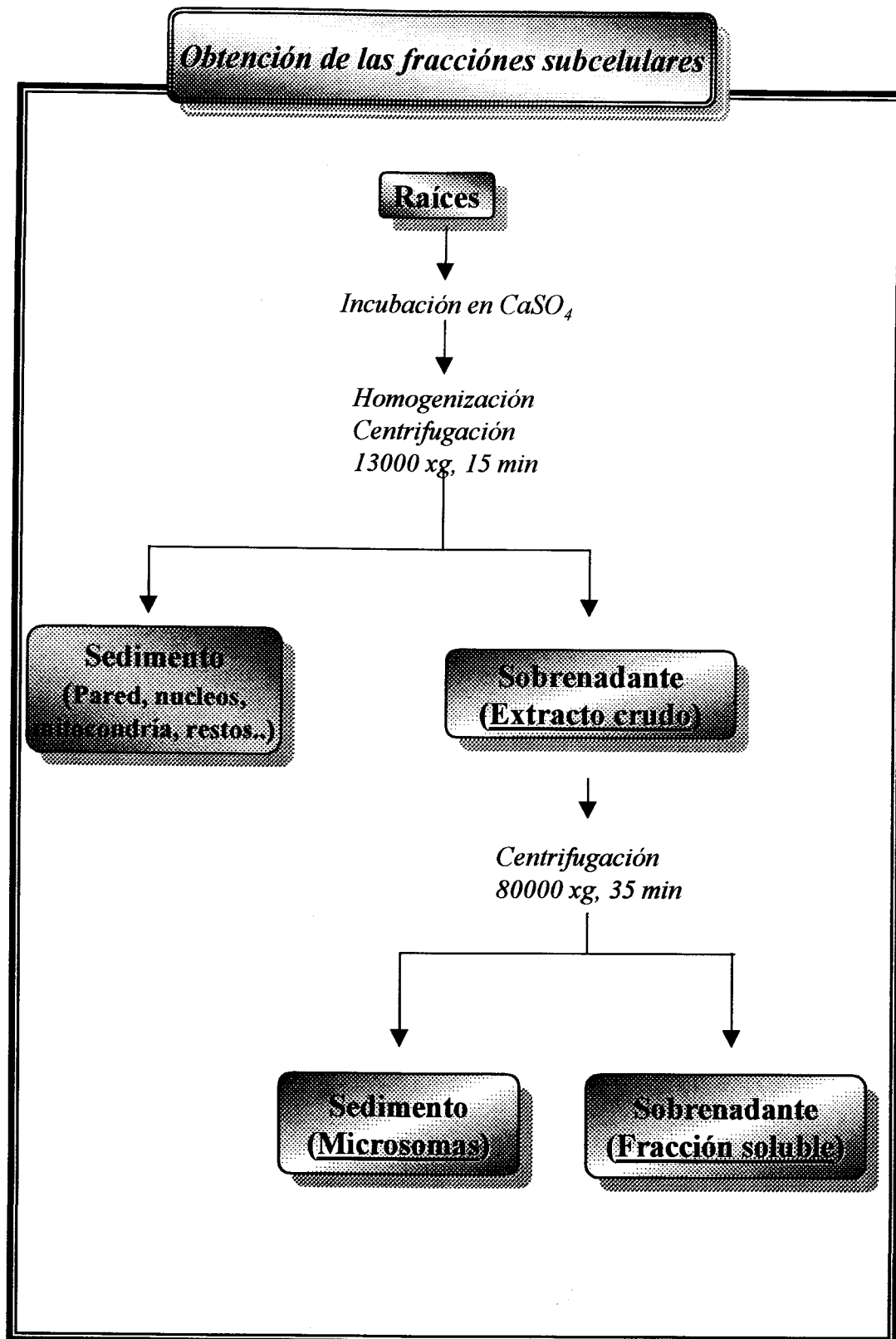


Figura 10. Esquema del proceso seguido para la obtención del extracto crudo fracción soluble y microsomal de raíces de tomate.

2.2.2. Purificación de la membrana plasmática

La purificación de la membrana plasmática de las raíces control y plantas micorrizadas fue realizada según el método de Larsson (1987), utilizando un sistema de partición de doble fase polímero acuosa. La Figura 4 detalla el proceso seguido para la obtención de fracciones de membrana plasmática. Para ello, 1 ml de la fracción microsomal, resuspendido en tampón fosfato y conteniendo aproximadamente 2 mg de proteína, se adicionó sobre 9 gr del sistema de partición de fases indicado en la Tabla 9.

Compuesto	Concentración
KH ₂ PO ₄ pH 7.8	5 mM
Sacarosa	330 mM
PMSF	5 mM

Tabla 8. Composición del tampón utilizado para resuspensión de los microsomas que iban a ser posteriormente sometidos al sistema de doble partición.

Compuesto	Concentración	
Dextrano	6.3	% (p/p)
PEG	6.3	% (p/p)
Sacarosa	330	mM
KH ₂ PO ₄ pH 7.8	5	mM
KCl	4.5	mM

Tabla 9. Composición del sistema de partición de fases utilizado para la purificación de la membrana plasmática

Una vez mezcladas las fases por inversión, se separaron mediante una centrifugación en rotor basculante a 2000 g durante 5 min. La fase superior de PEG (U₁), enriquecida en membrana plasmática fue sometida a una segunda partición de fases. Para este propósito, el 90 % de la fase U₁ fue recogida cuidadosamente con la ayuda de una pipeta Pasteur y adicionada sobre una nueva fase inferior de dextrano. Una vez mezcladas las dos fases, se separaron de nuevo mediante una centrifugación a 2000 g durante 5 min.. La nueva fase superior (U₂) conteniendo la membrana plasmática, y la fase inferior L1 de la primera partición, fueron diluidas 6 veces con el tampón de lavado indicado en la Tabla 10.

Compuesto	Concentración	
BTP-Tris pH 7.6	2	mM
Sacarosa	250	mM
DTT	1	mM
PMSF	0.1	mM

Tabla 10. Composición del tampón de lavado utilizado para el lavado de las fracciones de PEG y de dextrano obtenidas tras la partición de fases.

Tras centrifugar a 105,000 g durante 45 min., los sedimentos obtenidos fueron resuspendidos en el tampón de conservación indicado en la Tabla 7, y alicuotados y conservados a -80 °C hasta su posterior utilización.

2.2.3. Determinación del contenido en proteínas

La cuantificación de las proteínas se llevó a cabo por el método de Bradford (1976), para la cuantificar las proteínas de membrana se utilizó la modificación de Gogstad y Krutnes (1982) consistente en la adición de 0.1 % Tritón X-100 (v:v), para solubilizar las proteínas de membrana, que se encuentran ancladas en la bicapa lipídica. empleándose el reactivo de color de BioRad diluido 5 veces. La determinación del contenido en proteínas se realizó mediante interpolación de la absorbancia obtenida para cada una de las suspensiones de proteínas problema en una recta patrón de absorbancia obtenida a partir de

concentraciones conocidas de albúmina bovina. Esta medida se realizó en un espectrofotómetro Shimadzu (mod. 160) a una longitud de onda de 595 nm.

2.3. Medida de las actividades enzimáticas asociadas a las fracciones de membrana aisladas

2.3.1. Actividad ATPasa

Para la determinación de la actividad H^+ -ATPasa se utilizó el método de Galtier y col (1988), basado en la determinación del Pi liberado por la hidrólisis del sustrato ATP. Para ello, una alícuota de la suspensión de membranas (8 μ g de proteínas microsomales y 5 μ g de proteínas de membrana plasmática) se incubaron durante 30 min. a 30 °C en 500 μ l del medio de reacción detallado en la Tabla 11. La reacción se detuvo mediante la adición de 1 ml del reactivo de Ames (Tabla 12), determinándose espectrofotométricamente a 820 nm el Pi liberado frente a una curva patrón de KH_2PO_4 . Los resultados se expresaron en μ mol Pi/mg proteína/h y en μ mol Pi/g.p.f/h.

Compuesto	Concentración	
BTP-MES pH (6.5-8.0)	25	mM
Na_2MoO_4	100	μ M
ATP-BTP	3	mM
$MgSO_4$	3	mM

Tabla 11. Medios de reacción comunes para la determinación de las actividades ATPasas de plasmalema, tonoplasto y mitocondria.

Compuesto	Concentración	
Ácido ascórbico	25	mM
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₇	100	mM
SDS	3	%

Tabla 12. Composición del Reactivo de Ames (1966)

La proporción de vesículas con orientación invertida, hecho que se produce como consecuencia del proceso de extracción, se determinó midiendo a pH 6.5 la actividad ATPasa en presencia de 10 µg/ml de Brij 58, detergente que actúa como agente permeabilizante de las membranas, disuelto en 1mM BTP-MES, pH 7.0, 1mM DTT y 50 % (v/v) etanol, (Palmgreen y col. 1990). La actividad ATPasa latente se definió como la diferencia entre la actividad determinada en presencia y en ausencia de Brij 58 y la latencia como la actividad ATPasa latente expresada como porcentaje de la actividad ATPasa en presencia de detergente.

$$\% \text{ Latencia} = \frac{\text{Actividad (+Brij)} - \text{Actividad (-Brij)}}{\text{Actividad (+Brij)}} \times 100$$

Puesto que las células vegetales presentan actividades ATPasa asociadas a diferentes membranas (membrana plasmática, tonoplasto y mitocondria), la distinción entre ellas requiere el uso de inhibidores específicos. Además, la determinación de la actividad ATPasa en presencia de inhibidores específicos de las ATPasas presentes en las diferentes membranas celulares, nos ha permitido establecer la proporción en que estas se

encuentran, tanto en la fracción microsomal como en la obtenida mediante el sistema de doble partición de fases.

2.3.1.2. Actividad ATPasa sensible a NO_3^-

La actividad ATPasa asociada al tonoplasto fue definida como la actividad Mg^{2+} -ATPasa sensible a nitrato e insensible a azida y molibdato y vanadato (O'NEIL y col., 1983). La actividad se determinó a pH 7.5 en presencia de Brij 58 y de 100 ml de KCl o de 100 mM KNO_3 , y se calculó como la diferencia entre la actividad medida en presencia de KCl y de KNO_3 .

$$\Delta\text{NO}_3 = \text{Actividad (KCl)} - \text{Actividad (KNO}_3)$$

2.3.1.2. Actividad ATPasa sensible a N_3^-

La actividad ATPasa asociada a la mitocondria fue definida como la actividad Mg^{2+} -ATPasa sensible a azida e insensible a nitrato, molibdato y vanadato (Galtier y col., 1983). Dicha actividad se determinó a pH 8.5 en el medio de reacción conteniendo Brij 58 tanto en presencia como en ausencia de 2 mM NaN_3 y se definió como la diferencia entre ambas actividades (Tabla 11).

$$\Delta\text{N}_3 = \text{Actividad (N}_3^-) - \text{Actividad (N}_3^-)$$

2.3.1.3. Actividad ATPasa sensible VO_4^- e insensible a NO_3^- y N_3^-

La actividad ATPasa asociada a la membrana plasmática fue definida como la actividad Mg^{2+} -ATPasa sensible a vanadato e insensible a nitrato, azida y molibdato (Galtier y col., 1988). La actividad se determinó a pH 6.5 utilizando un medio de reacción conteniendo 10 % de Brij 58, 1 mM NaN_3 , 100 mM KNO_3 , tanto en presencia como en ausencia 250 mM ortovanadato y se calculó como la diferencia entre las actividades medidas en presencia y ausencia de ortovanadato (Tabla 11).

$$\Delta Va = \text{Actividad (+KNO}_3\text{+NaN}_3\text{)} - \text{Actividad (+KNO}_3\text{+NaN}_3\text{+Va)}$$

2.3.2 Actividad UDPasa latente

La actividad UDPasa latente, utilizada como marcador del aparato de Golgi (Grec, 1983) fue analizada incubando una alícuota de la suspensión de membranas (20 μg de proteína microsomales y 10 μg de proteína de membrana plasmática) durante 30 min. a 30 $^{\circ}\text{C}$ en 500 μl del medio de reacción indicado en la Tabla 13, Tanto en presencia como en ausencia de Triton X-100 al 0.1 %. La reacción se detuvo mediante la adición de 1 ml del reactivo de Ames (Tabla 12), determinándose el Pi liberado espectrofotométricamente a 820 nm frente a una curva patrón de KH_2PO_4 . La actividad UDPasa latente se definió como la diferencia entre las actividades medidas en presencia y en ausencia de Tritón X-100.

Compuesto	Concentración	
Tris-Mes pH 6.5	30	mM
MnCl ₂	3	mM
UDP	30	mM

Tabla 13 Medio de reacción utilizado para determinar la actividad UDPasa

2.3.3. Actividad NADH-citocromo c reductasa insensible a antimicina A

La determinación de esta actividad permite cuantificar el contenido de retículo endoplasmático en las fracciones de membrana aisladas. Para determinar dicha actividad, una alícuota de la suspensión de membranas (30 μg de proteínas de membrana plasmática y 50 μg de microsomas) se adicionó a 1 ml del medio de reacción indicado en la Tabla 14 y se midió espectrofotométricamente a 500 nm el aumento de densidad óptica debido a la reducción del citocromo c exógeno (Hodges y Leonard, 1974). La utilización de un coeficiente de extinción molar de $18.5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ha permitido expresar los datos en μmoles de citocromo c reducidos/mg proteína/h.

Compuesto	Concentración	
KH_2PO_4 pH 7.5	50	mM
KCN	1.66	mM
Citocromo c	30	mM
Antimicina A	1	mM
NADH	100	mM

Tabla 14. Medio de reacción utilizado para determinar de la actividad NADH-citocromo c óxido reductasa

2.3.4. Actividad NADH-ferricianuro óxidoreductasa

La actividad NADH-ferricianuro óxidoreductasa de la membrana plasmática fue analizada espectrofotométricamente a 420 nm en el medio de reacción detallado en la Tabla 15 (Sandelius y col., 1986) 30 μg de proteína se incubaron durante 3 min. a 25 °C en 1 ml del medio de reacción en ausencia de NADH, iniciándose la reacción mediante la adición del mismo. Las actividad se expresó en nmoles de ferricianuro reducidos/mg de proteína /minuto utilizando un coeficiente de extinción molar de $1 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Compuesto	Concentración	
Tris-Mes pH 7.0	25	mM
KCN	1.25	mM
Antimicina A	25	mM
$\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$	100	mM

Tabla 15. Medio de reacción utilizado para determinar la actividad de la NADH ferricianuro óxidoreductasa

2.3.5. Actividad alcohol deshidrogenasa

Esta actividad se utilizó como marcador citosólico y se basa en la determinación espectrofotométrica a 340 nm de la reducción de NAD en presencia de un alcohol (Suzuki y Kyuwa, 1972). La actividad se determinó en el medio de reacción indicado en la Tabla 16. Los resultados se expresaron en μmol NAD reducido/mg de proteína/min. usando un coeficiente de extinción molar de 340 nm.

Compuesto	Concentración	
KH_2PO_4 pH 7.0	50	mM
MgCO_2	4.5	mM
NAD	100	μM

Tabla 16 Composición del medio de reacción utilizado para determinar las actividades alcohol deshidrogenasa

2.4 Determinación del transporte de protones en vesículas de membrana

El transporte de H^+ dependiente de ATP a nivel de las vesículas de membrana aisladas se determinó midiendo la velocidad inicial de extinción de fluorescencia del fluoróforo 9-amin.o-6-acloro-2-metoxiacridine (ACMA) producida como consecuencia de la unión de los H^+ a dicha molécula en el interior de las vesículas (Figura 6; tomada de Bennett y Spanswick, 1983). La facilidad que tiene este cromóforo para atravesar las membranas biológicas hace del ACMA un indicador ideal para la medida del gradiente de pH que se establece a ambos lados de las membranas en las que actúa la H^+ -ATPasa.

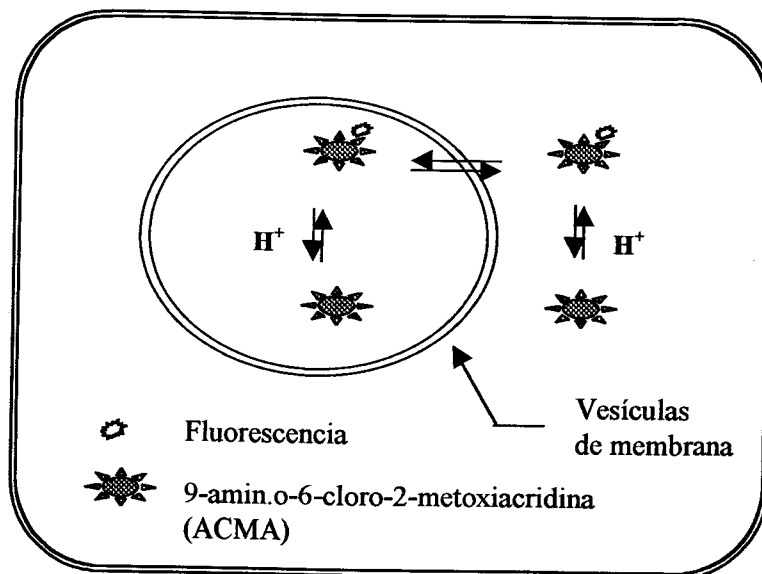


Figura 10. Esquema de la pérdida de fluorescencia de la sonda ACMA

Los ensayos de bombeo de protones se realizaron con las mismas vesículas en las que fueron determinadas las actividades ATPásicas. La conjunción de ambas técnicas hace posible obtener una estequiometría de los H^+ bombeados en función del ATP hidrolizado, lo que nos permite caracterizar de forma más completa estos sistemas bioelectrogénicos de membrana.

2.4.1. Procedimiento

La extinción de la emisión de fluorescencia del ACMA se midió utilizando un espectrofluorímetro marca Shimatzu mod. RF 540, provisto de un sistema de agitación

magnética y termostatación, en el que se habían fijado las siguientes condiciones: $\lambda_{\text{exit.}} = 415$, $\lambda_{\text{emis.}} = 495$, rendija 10 nm.

Para la determinación del transporte de H^+ , una alícuota de la suspensión de membrana (50 μg de proteínas microsomiales y 10 μg de proteínas de membrana plasmática) se incubó durante 20 min. en agitación y oscuridad a 25 °C, en el medio de reacción indicado en la Tabla 17 en ausencia de MgSO_4 . Transcurrido este tiempo, la reacción se inició mediante la adición de 5 mM de MgSO_4 . Alcanzado el estado de equilibrio, el gradiente se disipó mediante la adición de NH_4Cl en los ensayos llevados a cabo con vesículas microsomiales. Sin embargo, los ensayos llevados a cabo con vesículas de membrana plasmática el gradiente se disipó mediante inhibición de la actividad enzimática tras la adición de 1 mM de glucosa y 42 unidades/ml de hexokinasa, lo que nos permitió estimar así mismo la permeabilidad pasiva de las membranas a los H^+ .

Compuesto	Concentración	
BTP-MES pH 6.5	50	mM
KCl	100	mM
ACMA	1	μM
ATP-BTP	5	mM
Sacarosa	250	mM
NaN_3	2	mM
Valinomicina	0.1	μM

Tabla 17. Medio de reacción utilizado para determinar el flujo de H^+ dependiente de ATP en las vesículas de membrana aisladas.

2.4.2 Parámetros determinados

En función del registro gráfico obtenido (Figura 11), se calcularon los parámetros que definen la actividad bombeadora de H^+ en las vesículas de membrana analizadas.

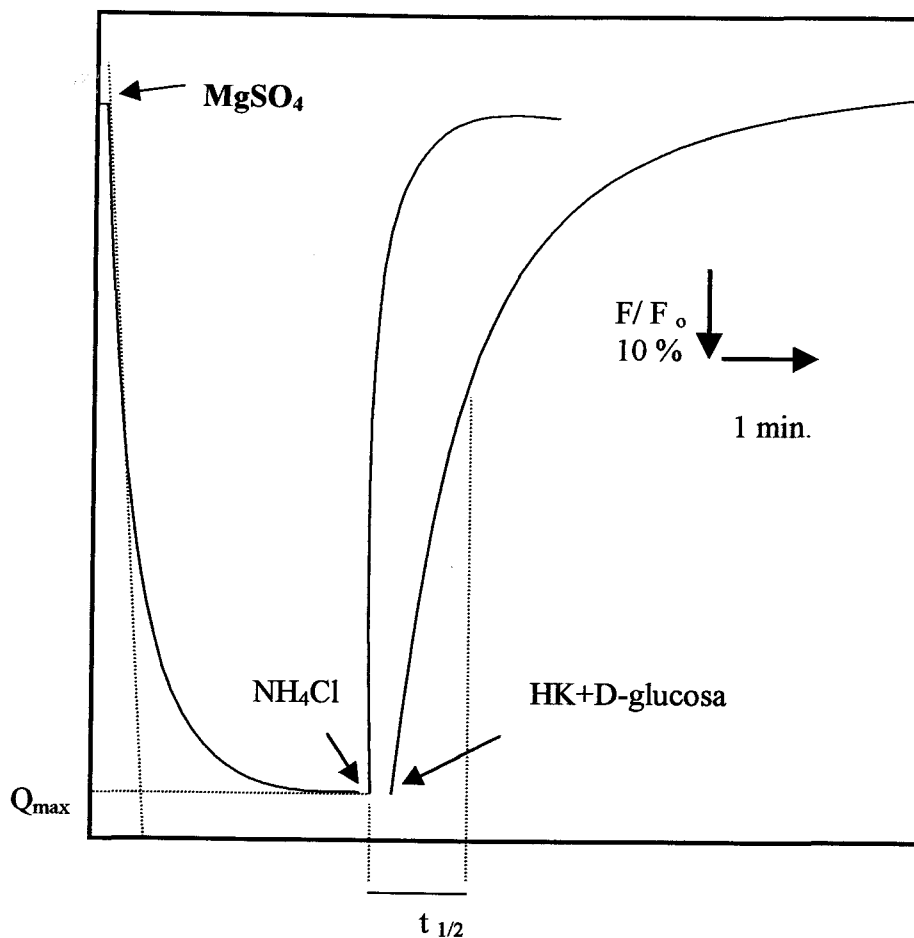


Figura 12. Registro representativo obtenido por espectrofluorimetría para la determinación del transporte de H^+ , dependiente de ATP.

a. Velocidad inicial de extinción (VQ_i)

Define la pendiente inicial de la curva que resulta del cociente entre la emisión inicial F_0 (100%, en unidades arbitrarias) y el tiempo (t_i) necesario para que dicha emisión se extinguiera por completo, a la velocidad inicial que marca dicha pendiente. VQ_i es expresado como $\% Q \text{ min}^{-1}$

$$VQ_i = F_0 / t_i$$

b. Velocidad específica de Extinción (VQs):

Corresponde a la velocidad específica de extinción (VQs): velocidad inicial expresada por mg de proteína (%Q min⁻¹mg prot⁻¹).

$$VQs = VQi / Prot.$$

c. Extinción máxima Qmax:

Representa la proporción de emisión extinguida (F) respecto a la emisión inicial (Fo), expresado en %:

$$Qmax = F / Fo$$

e. t_{1/2}

Representa el tiempo necesario para que se disipe la mitad de la emisión de fluorescencia.

$$t_{1/2} = t_1 - t_0$$

2.5. Detección inmuológica de la H⁺-ATPasa del plasmalema y del tonoplasto

La detección inmuológica de la H⁺-ATPasa de plasmalema se llevó a cabo utilizando anticuerpos policlonales obtenidos frente a la H⁺-ATPasa de *Arabidopsis thaliana* generosamente cedidos por el Dr. Ramón Serrano de la universidad Politécnica de Valencia. La H⁺-ATPasa del tonoplasto se inmunodetectó utilizando los anticuerpos policlonales obtenidos frente a la subunidad catalítica de 69 kDa de remolacha generosamente cedidas por el Dr. Alan B. Bennett de la Universidad de California, Davis.

2.5.1. Solubilización de las proteínas de membrana

Las proteínas de membrana fueron en primer lugar precipitadas con TCA para eliminar los componentes lipídicos que podrían interferir en su posterior separación

electroforética. Para ello, a 100 µg de proteínas microsomales se les adicionó 200 µl de ácido tricloroacético al 10 % y se incubaron durante 20 min. a 4 °C. Tras centrifugación durante 20 min. a 13.000g, el sedimento obtenido se lavó mediante incubación durante 20 min. a 4 °C en presencia de 1 ml de agua. Tras centrifugar durante 20 min. a 13.000g, el sedimento proteico fue resuspendido y solubilizado mediante incubación a 37 °C durante 30 min. en el tampón de Laemli, cuya composición se indica en la Tabla 18.

2.5.2. Electroforesis monodimensional en geles de poliacrilamida

La separación electroforética fue realizada en un equipo de electroforesis Mini-Protean (BioRad) para geles de 8 cm de ancho x 7 cm de longitud x de 1 mm de espesor, utilizando el método discontinuo de Laemmli (1970). Las proteínas solubilizadas y las proteínas patrones de peso molecular conocidos (BioRad) se separaron en un gel de poliacrilamida al 10 % (2 cm de gel de concentración y 5 cm de gel de resolución) durante una hora a 100 V. La composición de los geles de concentración y de separación, así como del tampón de migración se indican en las Tablas 13 y 14, respectivamente.

El desarrollo electroforético se paro una vez que el frente de azul de bromofenol llegó a 1 cm del borde inferior del gel.

	Gel de concentración		Gel de separación	
Poliacrilamida	10	%	3.75	%
Tris-HCl pH 6.8	125	mM	-----	mM
Tris-HCl pH 8.8	-----		375	
SDS (10%)	0.10	%	0.10	%
Persulfato amónico	0.05	%	0.05	%
TEMED	0.05	%	0.05	%

Tabla 18 Composición de los geles de concentración y de separación utilizados para electroforesis monodimensional SDS-PAGE.

Compuesto	Concentración	
Tris-HCl pH 8.3	0.02	M
Glicina	0.19	M
SDS	0.10	% (P/V)

Tabla 19. Composición del tampón de migración de Laemmli utilizado para electroforesis monodimensional SDS-PAGE

2.5.2. Electrotransferencia a membranas de nitrocelulosa (Western blotting)

Tras el desarrollo electroforético las proteínas se electrotransfirieron a una membrana de nitrocelulosa en una cubeta de transferencia Transblot (Biorad) siguiendo el método de Towbin y col (1979). Una vez separadas las proteínas electroforéticamente, el gel se incubó durante 20 min. en el tampón de transferencia compuesto por 10 mM CAPS pH 11 y metanol al 10 %, realizándose la transferencia a 100 V durante 1.5 h. Finalizada la transferencia, y tras un breve lavado con agua destilada, la membrana de nitrocelulosa se tiñó reversiblemente con Ponceau S al 0.1 % (P/V) en 1% de ácido acético, para visualizar las proteínas transferidas. La membrana lavada con agua destilada hasta eliminar totalmente el colorante, se procesó inmediatamente para el inmunoensayo.

2.5.3 Inmunorevelado de la H^+ -ATPasa de plasmalema y de la H^+ -ATPasa del tonoplasto.

Una vez realizada la electrotransferencia, la membrana de PVDF se incubó en una solución TBST cuya composición se indica en la Tabla 20 durante 5 min. para bloquear las uniones inespecíficas del anticuerpo a la membrana de nitrocelulosa. Esta operación se repitió dos veces. A continuación, se procedió a la incubación con el anticuerpo primario diluido en HST (Tabla 20) durante 16 H a 4 °C. Las diluciones de anticuerpos empleadas

fueron las siguientes; 1:1000 para el anticuerpo de la H⁺-ATPasa del plasmalema 1:500 para el anticuerpo de la subunidad 69 kDa de la V-ATPasa.

Tras la incubación, la membrana se lavó 2 veces durante 5 min en TBST, una vez durante 5 min. en HST y 2 veces durante 5 min. en TBST, para eliminar tanto el exceso de anticuerpo no fijado como el anticuerpo fijado inespecíficamente a la membrana. A continuación la membrana se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación constante con el anticuerpo secundario (anti IgG de conejo ligado a fosfatasa alcalina) diluido 1:1000 en HST. Para eliminar el exceso de anticuerpo secundario, la membrana se lavó 2 veces durante 5 min. en TBST, 1 vez durante 5 min. en HST, una vez durante 5 min. con TBST, y por último tres veces seguidas durante 5min. con TBS.

	TBS		HST		TBST	
Tris	20	mM	20	mM	20	mM
NaCl	500	mM	1	M	500	MM
Tween	-----		0.5	%	0.1	%

Tabla 20. Composición de las soluciones salinas utilizadas en el inmunorevelado.

El revelado de la reacción de la fosfatasa alcalina se llevo acabo añadiendo los sustratos cromogénicos 5-Bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (33 µg/ml) y azul de tetrazolio (16.5 µg/ml) en el tampón de la fosfatasa alcalina (0.2 M Tris pH 8.8, 4 mM MgCl₂), desarrollándose el color en oscuridad y a temperatura ambiente. La reacción se detuvo lavando la membrana con agua destilada.

La cuantificación de la intensidad de las bandas detectadas fue realizada utilizando un densitómetro Shimadzu mod. CS-9000.

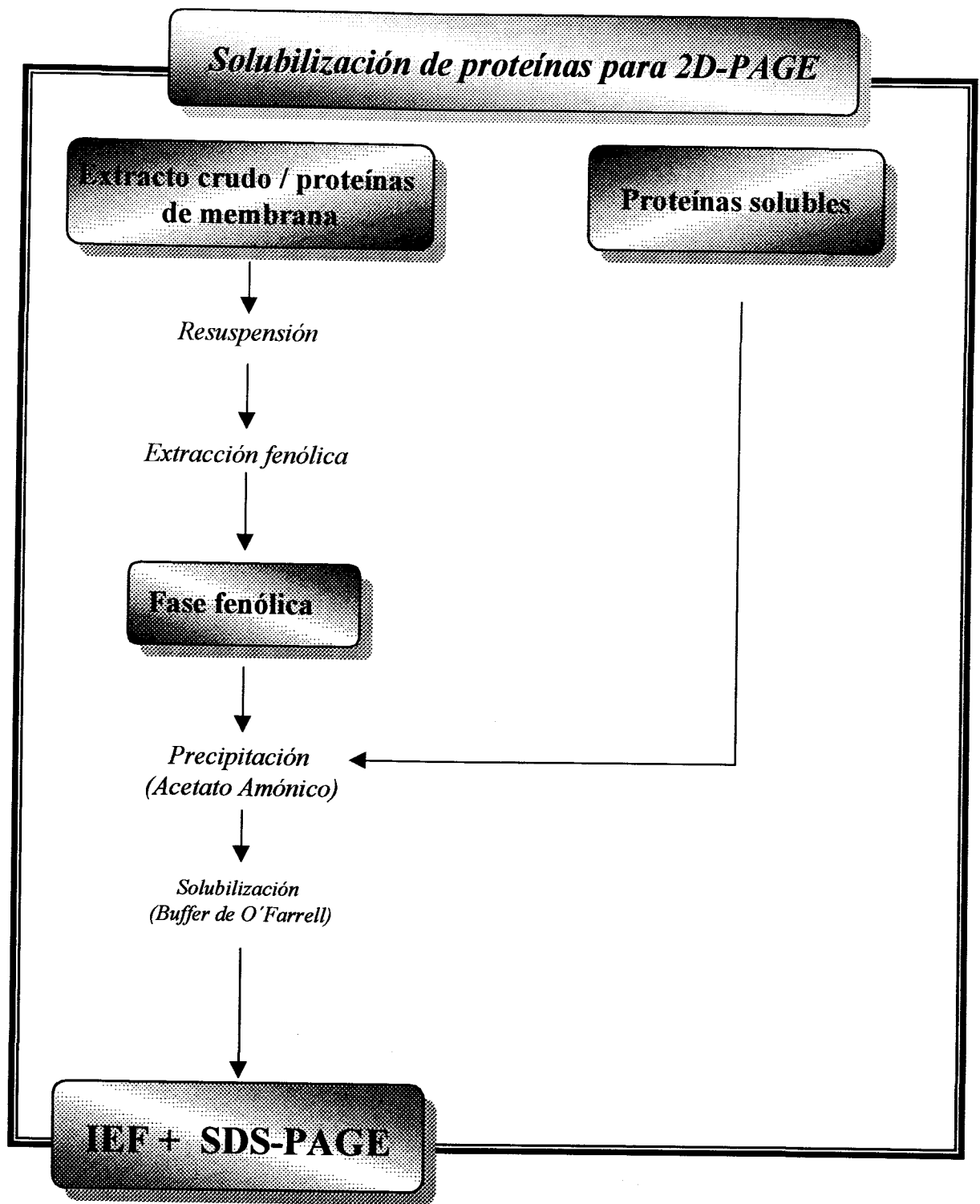


Figura 14. Esquema del proceso seguido para la solubilización de proteínas solubles y de membrana para el análisis mediante 2D-PAGE. Basado en O'Farrell y col., 1970.

2.6 Electroforesis bidimensional

Los perfil proteicos de los extractos crudos, así como de las fracciones solubles, microsomales y de membrana plasmática aislados de las raíces controles y micorrizadas, y de los extractos crudo y de membrana extraídos del micelio de *G. mosseae*, fueron analizados mediante electroforesis bidimensional 2D-PAGE y posterior tinción con nitrato de plata

2.6.1. Solubilización y preparación de las muestras.

Las proteínas fueron solubilizadas según el método de Hurkman y Tanaka (1986), adaptado a nuestro material biológico de acuerdo con el esquema presentado en la Figura 14. Las proteínas correspondientes al extracto crudo, fracción microsomal y membrana plasmática fueron resuspendidas en el medio de solubilización descrito en la Tabla 21, e incubadas durante 10 min. a 4 °C.

Compuesto	Concentración	
Tris	0.5	M
HCl	30	mM
EDTA	50	mM
KCl	0.1	M
Mercaptoetanol	2	%
PMSF	4	mM
Sacarosa	0.7	M

Tabla 21. Composición del tampón de solubilización.

Las proteínas solubilizadas fueron extraídas mediante la adición de un volumen de fenol saturado con agua. Tanto las proteínas extraídas como las de la fracción soluble fueron precipitadas mediante la adición de 5 volúmenes de 0.1 M acetato amónico en metanol. Tras centrifugación a 13.000 rpm, el sedimento obtenido fue lavado 5 veces con acetato amónico 0.1 M, una vez acetona a -20 °C, y finalmente secado bajo una corriente de nitrógeno. El sedimento obtenido fue resuspendido en el tampón de O'Farrell, cuya composición se indica en la (Tabla 21), e incubado durante 1 h a 30 °C. Finalmente, el material insoluble fue retirado mediante centrifugación durante 30 min. a 13,000 rpm.

Compuesto	Concentración	
Urea	9.5	mM
CHAPS	4	%
Nonidet P-40	0.5	%
<u>Anfolitos:</u>		
pH 5-8	20	%
pH 3.5-10	40	%
pH 3-10	40	%

Tabla 22. Composición del tampón de O'Farrell utilizado para la solubilización de las proteínas para su análisis por electroforesis bidimensional.

2.6.2. Cuantificación de las proteínas solubilizadas

Las proteínas solubilizadas en el tampón de O'Farrell fueron cuantificadas mediante el método Bradford, modificado por Ramagli y Rodríguez (1985) consistente en la adición de 10 µl 0.1N del HCl para eliminar la interferencia producida por los componentes del tampón de solubilización en el proceso de cuantificación. La cantidad de proteínas de la muestra fue cuantificada frente a una curva patrón realizada con concentraciones conocidas de albúmina bovina (BSA, Sigma). Esta medida se realizó en un espectrofotómetro Shimadzu mod. 160 a una longitud de onda de 595 nm.

2.6.3. Isoelectroenfoque.

Los geles de isoelectroenfoque, cuya composición se indica en la Tabla 20 fueron preparados en tubos de cristal de 18 cm de longitud x 1.5 mm de diámetro, los cuales se habían lavados previamente, mediante inmersión durante 2 h en una solución de 0.1 M KOH en etanol y posteriores lavados con agua milli Q.

Compuesto	Concentración	
Urea	9.5	mM
Poliacrilamida	3.75	%
CHAPS	4	%
Nonidet P-40	0.5	%
<u>Anfolitos:</u>		
pH 5 - 8	20	%
pH 3.5 - 10	40	%
pH 3 - 10	40	%
Persulfato amónico	0.2	%
TEMED	0.1	%

Tabla 23. Composición de los geles de isoelectroenfoque.

Para la realización del isoelectroenfoque 100 µg del extracto crudo soluble y de membrana fueron cargadas en el extremo básico de los geles, adicionándose posteriormente, 40 µl de 4M de urea para evitar la difusión de las proteínas. El tanque inferior, correspondiente al ánodo, fue llenado con una solución compuesta de 10 mM de ácido orto-fosfórico, mientras que el tanque superior, correspondiente al cátodo, se llenó con una solución de 50 mM de NaOH desgasificada. La separación electroforética se desarrolló a voltaje constante: de 100V durante 25 min., 300 V durante 16 hora y 800 V durante 1 hora. Una vez finalizado el desarrollo, los geles se sacaron de los tubos con la ayuda de una jeringa conteniendo agua milliQ.

2.6.4. Equilibración de los geles:

Una vez extraídos los geles de los tubos de isoelectroenfoque, se equilibraron dos veces durante 10 min. con 5 ml de tampón de equilibración indicado en la Tabla 23. Los geles fueron conservados a - 80 °C en el tampón de equilibración hasta su utilización para la segunda dimensión.

Compuesto	Concentración	
Tris-HCl pH 6.8	70	mM
SDS	5	%
β -Mercaptoetanol	0.03	%
Azul de Bromofenol	0.05	%

Tabla 23. Composición del tampón de equilibración

2.6.5. Segunda dimensión en geles de poliacrilamida

El desarrollo de la segunda dimensión se realizó en geles de poliacrilamida de 20 cm de ancho x 20 cm de longitud x 1.5 mm de espesor, constituidos por 15 cm de un gel de separación al 11% para separar las proteínas del extracto crudo y de membrana y al 12% para las proteínas solubles y por 5 cm de un gel de concentración al 4 % (Tabla 20). Los geles procedentes del isoelectroenfoque, tras ser descongelados fueron nuevamente equilibrados en el tampón de equilibración y colocados sobre la superficie del gel de concentración y sellados con agarosa al 1%. El desarrollo electroforético se realizó a corriente constante de 24 mA/gel utilizando el tampón de migración indicado en la Tabla 21.

2.6.6. Secado y tinción de los geles.

Los geles fueron fijados y teñidos con AgNO_3 , según el procedimiento descrito por Blum y Col (1987). La fijación se realizó mediante incubación durante al menos 1 hora en una solución de $\text{MeOH}:\text{AcH}:\text{H}_2\text{O}:\text{HCHO}$ (50:12:37:0.2, v:v:v:v). Para eliminar los restos

de acético que pudieran interferir en la tinción, los geles se lavaron dos veces durante 20 min. con etanol al 50 % y una vez durante 10 min. con etanol al 30 %.

Los geles fueron tratados durante 1 minuto con una solución al 0.02 % (p/v) de tiosulfato de sodio, para mejorar la sensibilidad y el contraste de la tinción. Después de tres lavados sucesivos de 20 segundos con agua destilada, los geles fueron incubados en oscuridad durante 20 min. en la solución de tinte conteniendo 0.2 % (p/v) de nitrato de plata y 0.075 % (v/v) de formaldehído. Después de tres lavados sucesivos durante 20 segundos cada uno, con agua destilada, los geles fueron revelados con una solución compuesta por Na_2CO_3 al 6 %, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ al 0.4 % y formaldehído al 0.05%. Una vez detectados los polipéptidos, los geles fueron lavados dos veces, durante 20 segundos con agua destilada. El revelado se detuvo mediante incubación durante 20 min. en una solución de $\text{MeOH}:\text{AcH}:\text{H}_2\text{O}$ (50:12:38, v:v:v). Finalmente, los geles se lavaron durante 20 min. con MeOH al 50 %. Y se conservaron a 4 °C hasta su secado.

El secado de los geles teñidos se llevó a cabo mediante previa incubación en una solución de MeOH al 30 % y, posteriormente, con glicerol al 3 %, ambas durante 30 min. Finalmente, los geles fueron secados a 37 °C durante 16 h entre dos hojas de papel de acetato de celulosa utilizando dos marcos de metacrilato de BioRad.

2.6.7. Análisis de los geles

El análisis de los geles bidimensionales se realizó en un ordenador Macintosh Performa 5200 usando el programa de análisis de imagen NIH (*US National Institute of Health*). Las diferencias fueron confirmadas posteriormente mediante análisis visual de las mismas. El peso molecular de las proteínas fue determinado mediante el uso de marcadores de peso molecular definido de amplio rango (Bio-Rad 161-0371), mientras que el punto isoelectrónico fue determinado midiendo directamente el rango de pH en los geles de isoelectroenfoque.

2.7. Secuenciación de polipéptidos:

La secuencia amino terminal de algunos de los polipéptidos cuya síntesis se modifica en las raíces micorrizadas se obtuvo mediante degradación de Edman del polipéptido inmovilizado en membrana de PVDF.

2.7.1. Electroforesis bidimensional preparativa

La purificación de los polipéptidos de interés se llevó a cabo mediante electroforesis bidimensional preparativa. Para ello, 2 mg de proteínas microsomales o de membrana plasmática se separaron electroforéticamente mediante 2D-PAGE como se describe en el apartado 3.6.2, pero utilizando geles preparativos. En este caso, el isoelectroenfoco se realizó en geles de disco de 18 cm de longitud y 3 mm de diámetro y la separación en SDS-PAGE en geles de poliacrilamida de 20 cm de longitud 3 mm de espesor 16 cm de ancho. El isoelectroenfoco se desarrolló a voltaje constante de 100V durante 25 min. , 300V durante 16 horas y 800 V durante, 1 hora, y la segunda dimensión a corriente constante de 48 mA por gel.

2.7.2. Electrotransferencia a membrana de PVDF.

La electrotransferencia se realizó como se indica en el apartado 2.5.2 a voltaje constante de 100 V durante 2 horas. Utilizando el medio de transferencia detallado en la Tabla 23.

Compuesto	Concentración	
Tris-Bórico pH 8.3	0.025	M
Glicina	0.192	M
SDS	0.100	% (p/v)

Tabla 23. Medio de transferencia utilizado para posterior secuenciación de proteínas

2.7.3. Tinción de la membrana de PVDF

Los polipeptidos transferidos a la membrana de PVDF se visualizaron mediante tinción durante 5 min. con azul de Comassie R250 al 0.1 % en 50 % metanol. Posteriormente la membrana fue desteñida con 50 % metanol, lavada varias veces con agua destilada una vez seca la membrana se almacenó a -20°C hasta su posterior uso.

2.7.4. Obtención de secuencia amino-terminal.

Los polipeptidos seleccionados para ser secuenciados fueron cortados y guardados a -20°C hasta su secuenciación. La secuenciación del amino terminal se obtuvo mediante degradación de Edman utilizando un secuenciador Applied Biosystems Procise, en el Departamento de Estructura de las Proteínas, del Centro de Investigaciones Biológicas, CISC, Madrid.

2.7.5 Análisis de las secuencias

Para la búsqueda de homologías en las secuencias de proteínas se utilizaron los programas FASTA (Pearson y Lipman, 1988) y BLAST (Altschul y col., 1990).

3. COMPOSICIÓN LIPÍDICA DE LAS RAÍCES Y DE MEMBRANAS DE TOMATE

3.1. Extracción de lípidos totales

La extracción de lípidos totales de las fracciones de membrana y de raíces se llevó a cabo por el método de Vorbeck y Martinetti (1965), modificado por Burgos (1993). Un mg de proteínas de membrana o 1 gramo de raíces se adicionaron a 2 ml de isopropanol hirviente y se mantuvieron en ebullición durante 2 min. para inactivar las fosfolipasas (Douce 1964). En el caso de las membranas, la mezcla se homogeneizó en un Potter-Elvehjem mediante 10 subidas y bajadas del émbolo, mientras que las raíces se homogeneizaron durante 1 minuto en un omnimixer. A continuación, se añadieron sucesivamente 1.5 ml de isopropanol, 1.5 ml de cloroformo:isopropanol (1:1, v:v) dos veces y 1.5 ml de cloroformo, siguiendo a cada adición una homogeneización similar a la descrita anteriormente. Posteriormente, el homogenado se filtró a vacío a través de papel Whatman 1, y evaporado en un rotavapor a 30 °C. El residuo lipídico extraído con 3 ml de cloroformo conteniendo 1 ml de NaCl al 1%, se agitó y centrifugó durante 5 min. a 2000 g

para separar las fases. La fase inferior clorofórmica, conteniendo los lípidos totales fue recogida con la ayuda de una pipeta Pasteur, y evaporada en un rotavapor a 30 °C. El residuo lipídico obtenido se disolvió en 500 µl de benceno-etanol (4/1, v:v), conservándose a -20 °C en viales herméticamente cerrados en una atmósfera de N₂ o argón para evitar posibles oxidaciones lipídicas (Vorbeck y Martinetti 1965) (Esquema 15).

3.2. Saponificación y metilación de los ácidos grasos de los lípidos totales

Tanto la saponificación como la metilación de los ácidos grasos es imprescindible para el análisis mediante cromatografía gaseosa, puesto que el cromatógrafo de gases solo es capaz de detectar los ésteres metilados de los ácidos grasos problema. El extracto lipídico previamente almacenado en benceno:etanol, se llevó a sequedad en tubos de metilación mediante una corriente de nitrógeno N₂, y a continuación, se procedió a la saponificación, mediante la adición de 2 ml de sosa metanólica al 2 % por tubo, e incubación durante 30 minutos a 80 °C. Tras la saponificación, se procedió a la metilación de los ácidos grasos obtenidos mediante la adición de 2.5 ml de trifluoruro de boro en metanol (14 %), e incubación a 80 °C durante 30 min. A continuación se añadieron 5 ml de n-pentano y 1 ml de agua destilada con el objeto de recoger los ácidos grasos metilados. Los tubos se agitaron y se centrifugaron a 2000 xg durante 5 min. para separar las fases acuosa y pentánica. La fase superior pentánica contiendo los estéres metilados de los ácidos grasos se llevó a tubos de metilación de base cónica, donde se le añadió 20 µg del ester metílico del ácido heptadecanoico (17:0) el cual se utiliza como patrón interno ya que no se encuentra presente en las muestras problema. Las muestras se desecaron primeramente en un rotavapor, y finalmente bajo una corriente de nitrógeno. La muestra se almacenó a 4 °C hasta su posterior análisis cromatográfico

3.3. Separación de las distintas categorías lipídicas

Las diferentes categorías lipídicas se separaron por cromatografía en capa fina a partir del extracto de lípidos totales. Una vez activada la placa del gel de sílice (silicagel G, Merck; 0.5 mm de espesor) durante 30 min. a 110 °C, una alicuota del extracto de lípidos totales disuelta en cloroformo, se depositó en el origen de la placa bajo corriente de nitrógeno.

Para la separación satisfactoria de diferentes moléculas fosfolipídicas de los lípidos neutros y galactolípidos se utilizó la mezcla de disolventes usada por Lepage (1967). Para ello, la placa se desarrolló en cloroformo:acetona:metanol:ácido acético:agua

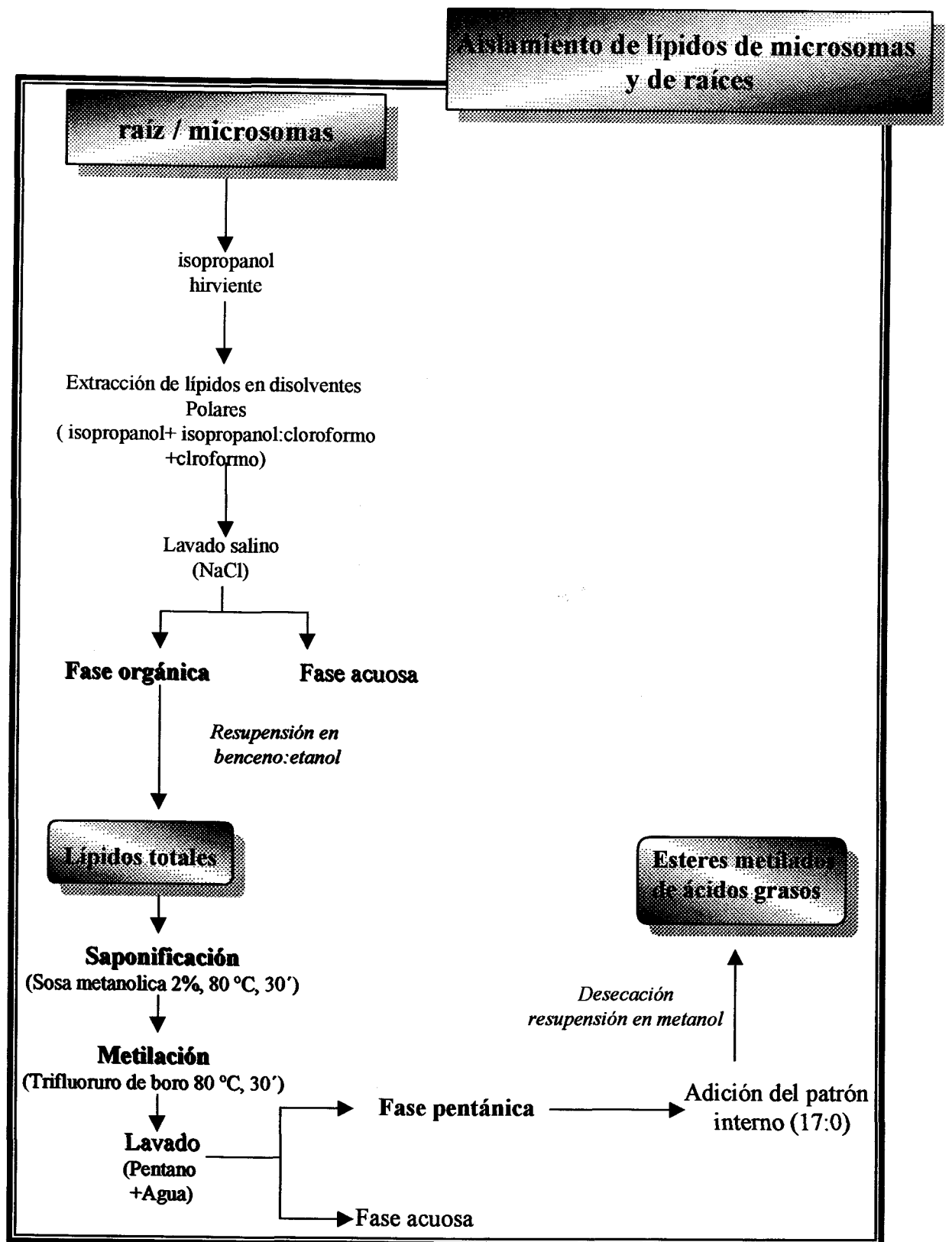


Figura 15. Esquema del proceso de obtención de lípidos totales y sus ésteres metílicos, basado en *Vorbeck y Martinetti (1965)*.

(50:20:10:10:5 v.v.v.v.v), hasta que el disolvente alcanzó el final de la placa (1 h aproximadamente). La placa se secó con nitrógeno, revelándose con rodamina 66 al 0.0012%, visualizándose las diferentes moléculas lipídicas con luz ultravioleta. La identificación de las diferentes moléculas lipídicas se realizó mediante el desarrollo cromatográfico de diferentes patrones.

3.4. Saponificación y metilación de ácidos grasos de las diferentes categorías lipídicas

Para determinar la composición y contenido de ácidos grasos de las distintas moléculas lipídicas, separadas por cromatografía en capa fina, las bandas correspondientes a cada una de las moléculas lipídicas se rasparon con la ayuda de una espátula y se metilaron directamente sus ácidos grasos con 2.5 ml de trifluoro de boro en metanol al 14 % a 85 °C durante 30 min.. Una vez enfriados los tubos, se añadieron 5 ml de n-pentano, se agitó y se centrifugó durante 5 min. a 2000 g para separa las fases acuosa y pentánica. La fase superior pentánica conteniendo los esteres metílicos de los ácidos grasos se recogió y se le adicionaron 4 µg del éster metílico del ácido heptanoico (patrón interno). Finalmente el pentano se evaporo en un rotavapor.

3.5. Análisis cromatográfico:

Los esteres metílicos obtenidos, se separaron, identificaron y cuantificaron mediante cromatografía en fase gaseosa, utilizando una columna semicapilar de vidrio de 30 m (Supelco SP-2330) a una temperatura programada entre 150 y 170°C, con incrementos de temperatura de 0.4 °C por minuto.

3.6. Dosificación de fosfolípidos, glucolípidos y lípidos neutros

La dosificación de las moléculas lipídicas presentes en una solución de lípidos totales, así como la determinación de los contenidos relativos de los diversos fosfolípidos glucolípidos y lípidos neutros fue realizada a partir del contenido en ácidos grasos de cada una de dichas moléculas (Tremolieres, 1970). Para ello, se estima que los ácidos grasos representa el 95 % de la masa de los lípidos neutros, el 70 % de los polipéptidos y el 50 % de los galactolípidos .

Resultados

1. DETERMINACION DEL GRADO DE DEPENDENCIA DEL TOMATE A LA FORMACION DE MICORRIZAS

La Figura 16 muestran el efecto positivo de la fertilización con P y de la inoculación con el hongo MA sobre el desarrollo y crecimiento de las plantas de tomate.

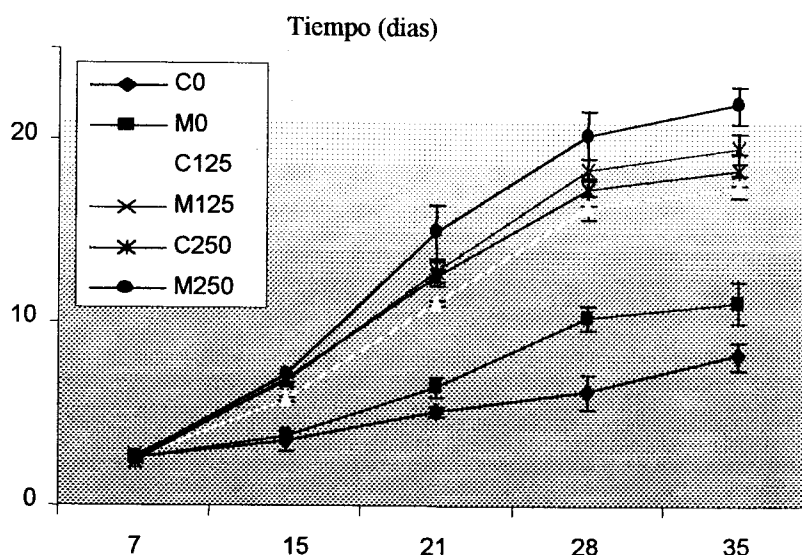


Figura 16 Evolución a lo largo del tiempo de la longitud de plantas de tomate, micorrizadas o no.

La evolución a lo largo del tiempo de la altura de las plantas de tomate controles e inoculadas con el hongo formador de micorrizas *Glomus* sp y fertilizadas con diferentes niveles de P (Figura 16), ponen de manifiesto que, en ausencia de P, el crecimiento de dichas plantas fue muy lento y que la fertilización, tanto con 125 como con 250 mg P/Kg de suelo, provocó una estimulación del mismo. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre estos dos últimos tratamientos. Además, pudo observarse una estimulación del desarrollo de las plantas no fertilizadas a los 14 días de ser inoculadas con el hongo MA. Sin embargo, la altura de las plantas micorrizadas no varió con respecto a la de las controles cuando fueron fertilizadas con cualquiera de las dos dosis de P empleadas en el ensayo. Estos resultados indican una cierta dependencia del tomate a la formación de micorrizas.

Por otra parte, los resultados de peso seco presentados en la Tabla 24 muestran claramente que la inoculación con los hongos MA estimula el crecimiento de las plantas de

tomate y que esta estimulación es mayor cuanto menor es el aporte exógeno de P. Así, en ausencia de un aporte exógeno de P, la planta micorrizada presentó una biomasa 79% mayor que las plantas controles, mientras que en los tratamientos con 125 y 250 mg P/Kg suelo el incremento fue tan sólo del 25 y 20 %, respectivamente. La observación de que en las plantas fertilizadas con P, el incremento en biomasa se debe a un incremento de la parte aérea pero no del sistema radical, sugiere que la estimulación del crecimiento por la simbiosis se debe, más bien a una exploración más eficaz de los nutrientes del suelo que a un incremento en la zona del suelo explorada.

Tabla 24. Efecto de las distintas dosis de fósforo (0, 125 y 250 mg/Kg de suelo), y de la micorrización sobre el peso seco y la relación parte aérea/raíz de las plantas de tomate.

Dosis de fósforo (mg/Kg suelo)	Tratamiento micorrízico	Raíz (g/planta)	P. aérea (g/planta)	Planta total (g)	S/R
0	-	0.067 a	0.183 a	0.249 a	2.731 a
	+	0.260 b	0.887 b	1.115 b	3.352 b
125	-	0.760 c	2.881 c	3.641 c	3.791 b
	+	0.793 c	3.848 ed	4.639 de	4.852 c
250	-	0.687 c	3.874 d	4.611 e	5.639 d
	+	0.817 c	4.983 f	5.815 f	6.099 e

Letras iguales dentro de cada columna representan valores homogéneos según el test de Fisher (LSD < 0.05).

Además, pudo observarse que el crecimiento de las plantas del tratamiento C250 era similar al de las del tratamiento M125, lo que refleja el aporte adicional de P que proporciona el hongo MA a las plantas de tomate.

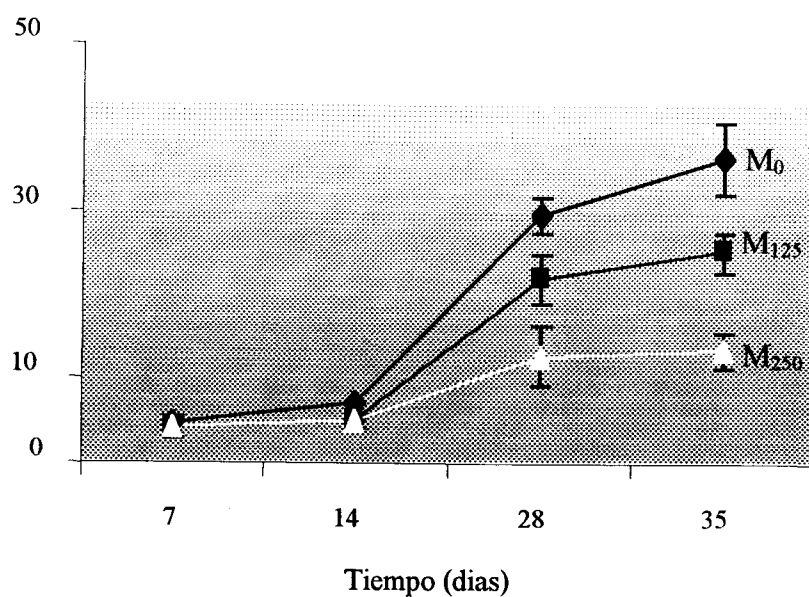


Figura 17. Evolución a lo largo del tiempo del grado de micorrización en las plantas de tomate crecidas en presencia de varios niveles de fósforo.

El porcentaje de colonización radical por el hongo MA disminuyó al incrementar el nivel de P en el suelo (Figura 17). En las plantas no fertilizadas y, en aquellas fertilizadas con 125 mg P/Kg suelo, el nivel de micorrización incrementó con el tiempo, siendo este incremento mayor en las plantas no fertilizadas. Sin embargo, en las plantas fertilizadas con 250 mg P/Kg de suelo, los niveles de micorrización disminuyeron a partir de los 28 días de la inoculación.

Para estudiar con profundidad el efecto de las distintas dosis de fósforo y de la inoculación con los hongos MA se determinó el contenido de fósforo y nitrógeno de las mismas (Tabla 25).

Tabla 25. Contenido en fósforo y nitrógeno de la parte aérea de las plantas de tomate controles (-) y micorrizadas (+), y fertilizadas con diferentes dosis de fósforo.

Dosis de fósforo (mg/Kg suelo)	Tratamiento micorrícico	Fósforo		Nitrógeno		N/P
		%	Contenido (mg)	%	Contenido (mg)	
0	-	0.13 a	0.24 a	3.54 a	6.35 a	27.42 a
	+	0.22 b	1.91 b	3.60 a	30.94 b	16.78 b
125	-	0.36 c	10.81 c	2.15 b	63.71 c	5.95 c
	+	0.37 c	14.17 d	2.57 b	99.12 de	6.79 d
250	-	0.53 e	20.36 e	2.20 b	83.96 d	4.12 e
	+	0.44 d	22.22 e	2.30 b	114.76 e	5.21 c

Letras iguales dentro de cada grupo representa valores homogéneos según el análisis de la varianza de Fisher (LSD <0.05).

La Tabla 25 refleja, por una parte, el efecto de las distintas dosis de fósforo, y, por otra, el efecto de la inoculación de las plantas de tomate con el hongo MA, sobre el contenido en fósforo y el nitrógeno.

En lo que respecta al contenido en fósforo de la parte aérea, se observó un incremento en la asimilación de este nutriente a medida que se incrementa la dosis de fósforo aplicada al suelo. Las plantas micorrizadas presentaban un mayor contenido en fósforo que las controles 5 semanas después de la cosecha. Este efecto positivo de la micorrización fue más evidente en condiciones limitantes, ya que, en el nivel 0 mg/Kg de suelo, el contenido en fósforo de las plantas micorrizadas fue 8 veces mayor que en las

controles, mientras que cuando las plantas fueron fertilizadas con 125 mg/Kg de suelo, dicho valor fue de 1.3 veces mayor en las plantas micorrizadas.

En dicha tabla se puede observar también el efecto de la fertilización fosforada así como el efecto de la inoculación con el hongo formador de micorriza sobre la concentración y contenido de nitrógeno, en dicha tabla se observa claramente que la fertilización fosforada altera significativamente la concentración en nitrógeno, tanto en las plantas controles como en las micorrizadas, ya que las plantas crecidas con un aporte de 125 o 250 mg/Kg. de suelo, presentan una concentración de nitrógeno 30-40 % menor que aquellas crecidas sin fertilización fosforada. Este efecto no parece atribuible a la colonización MA, ya que tanto las plantas controles como las plantas micorrizadas sufren una reducción en la concentración de nitrógeno. Esta observación podría ser atribuible al limitado crecimiento que padecen las plantas crecidas con un aporte limitado de fósforo. Sin embargo, en cuanto al contenido total de nitrógeno, las plantas micorrizadas crecidas en los tres niveles de fertilización presentan un elevado contenido de nitrógeno en comparación con los controles. Así mismo cabe resaltar que tanto el contenido como la concentración de nitrógeno del tratamiento M₁₂₅ es mayor que la del C₂₅₀, por lo que refleja una vez más los efectos beneficiosos de la inoculación MA.

Otro dato relevante que se expresa en la Tabla 25 es el factor N/P, ya que proporciona información sobre la nutrición nitrogenada y fosforada simultáneamente. Así pudo observarse que cuando las plantas no fueron fertilizadas con P, la relación N/P fue menor en plantas micorrizadas que en las controles. Sin embargo cuando las plantas fueron fertilizadas con P, el valor de dicha proporción fue menor en las raíces micorrizadas que en los controles. Estos datos muestran que la simbiosis MA ejerce efectos positivos sobre otros factores limitantes como el nitrógeno.

2. ACTIVIDADES ENZIMATICAS ASOCIADAS A MEMBRANA

Para estudiar los posibles mecanismos por los cuales los hongos formadores de micorriza mejoran el desarrollo y la nutrición de las plantas que colonizan se determinó el efecto de la formación de la simbiosis sobre la actividad de la H⁺ATPasa de la membrana plasmática principal directora del transporte iónico.

2.1. Estudios preliminares a nivel de membranas microsomales

El estudio del papel de la H^+ -ATPasa del plasmalema en la simbiosis MA se abordó inicialmente a nivel de membranas microsomales aisladas de raíces controles y micorrizadas con el hongo MA *G. mosseae* o *G. intraradices*, las cuales mostraban un 37% y un 50% de raíz colonizada, respectivamente. La Figura 18 muestra que, a las 4 semanas de la inoculación, ambos hongos mostraban un patrón de colonización muy diferente. Así, mientras la colonización por *G. mosseae* era fundamentalmente arbuscular, las raíces colonizadas por *G. intraradices* presentaban, además, un elevado porcentaje de vesículas.

Además, pudo comprobarse que el efecto ejercido por ambos hongos sobre el crecimiento de las plantas de tomate fue diferente, observándose tan solo una estimulación del crecimiento en aquellas plantas colonizadas por *G. mosseae* (Tabla 26).

Tabla 26. Peso fresco de la parte aérea y raíz y la relación S/R de plantas de tomate controles e inoculadas con el hongo MA *G. mosseae* y *G. intraradices*.

	Control	Tratamiento micorrizado	
		<i>G. mosseae</i>	<i>G. intraradices</i>
P.F. parte aérea (g planta ⁻¹)	10.25 a	12.97 b	11.26 ab
P.F. raíz (g planta ⁻¹)	4.06 a	4.90 b	3.49 a
S/R	2.52 a	2.64 a	3.23 b

Los resultados son la media de 3 experimentos independientes. Letras iguales dentro de cada línea no difieren significativamente ($LSD < 0.05$) según el test de Fisher.

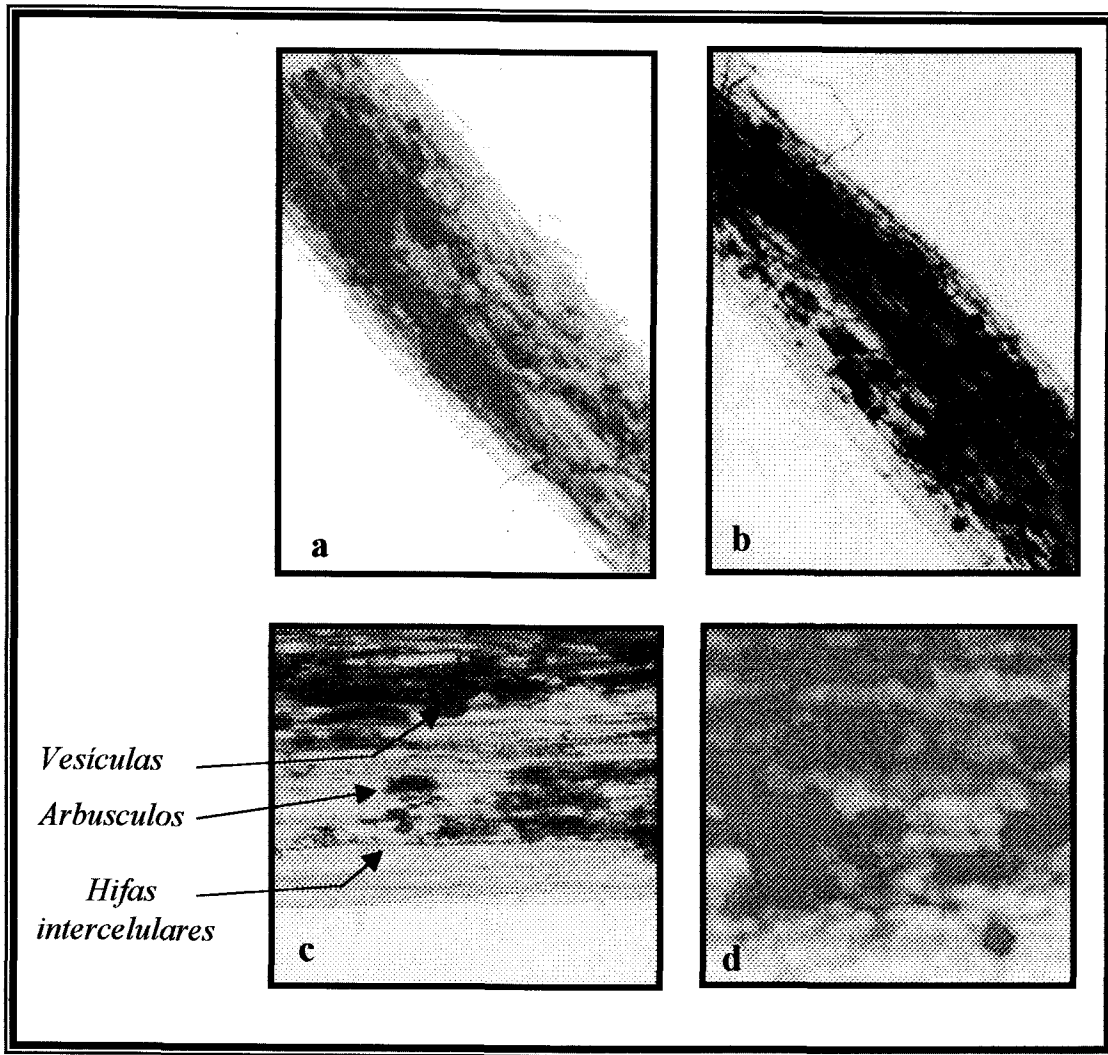


Figura 18. Raíces de tomate colonizadas con *G. mosseae* (a,c) o con *G. intraradices* (b,d); la foto c y d muestran detalles de dicha colonización.

2.1.1. Efecto de la micorrización sobre el contenido en proteínas microsomales

Los resultados presentados en la Tabla 27 ponen de manifiesto que las raíces micorrizadas siempre presentaron un mayor contenido en proteínas de membrana que las controles, siendo este incremento mayor en las raíces micorrizadas con *G. intraradices* que con *G. mosseae*.

Tabla 27. Contenido en proteínas microsomales de las raíces de tomate controles e inoculadas con el hongo *G. mosseae* o *G. intraradices*

	Contenido en proteínas (mg/g Peso fresco)
Control	0.19 a
<i>G. mosseae</i>	0.23 b
<i>G. intraradices</i>	0.28 c

Los resultados expresados en mg de proteína/ g peso fresco, son la media de 3 repeticiones de 3 ensayos independientes. Letras iguales representan grupos homogéneos según el test de Fisher (LSD < 0.05).

2.2.2. Actividad ATPasa

Los valores de actividad específica de la ATPasa basal y de la ATPasa total, actividad medida en presencia de Brij58, eran iguales en las raíces controles que en las micorrizadas por cualquiera de los dos hongos utilizados. Por tanto, los valores de latencia, es decir, el porcentaje de vesículas con orientación invertida como consecuencia del proceso de extracción fue la misma en todos los tratamientos.

Tabla 28. Efecto del establecimiento de la simbiosis MA sobre la actividad ATPasa en ausencia (actividad Basal) y en presencia (actividad total) de Brij 58, así como sobre la latencia de las vesículas.

	Control	Tratamiento micorrizado	
		<i>G. mosseae</i>	<i>G. intraradices</i>
ATPasa Basal $\mu\text{mol P}_i \text{ mg}^{-1} \text{ prot. h}^{-1}$	18.51 a	17.21 a	16.57 a
Total ATPase $\mu\text{mol P}_i \text{ mg}^{-1} \text{ prot. h}^{-1}$	36.94 a	37.98 a	35.56 a
Latencia (%)	49.89	54.68	53.40

Los resultados expresados en $\mu\text{mol P}_i \text{ mg}^{-1} \text{ prot. h}^{-1}$ son la media de tres experimentos independientes. Letras iguales en cada línea representan grupos homogéneos determinados según el análisis multifactorial de la varianza de Fisher (LSD < 0.05).

Puesto que la preparación microsomal utilizada para determinar la actividad ATPasa incluye una mezcla de membranas celulares: plasmalema, tonoplasto, mitocondria, retículo endoplasmático y aparato de Golgi, y teniendo en cuenta que tanto la membrana plasmática como el tonoplasto y la mitocondria presentan actividad ATPasa, la discriminación entre las diferentes actividades ATPásicas presentes en los microsomas requirió la utilización de inhibidores específicos para cada una de ellas.

La Tabla 29 muestra que las actividades específicas de las ATPasas del plasmalema (Δ vanadato), del tonoplasto (Δ nitrato) y de la mitocondria (Δ azida) en raíces de tomate no se afectaban por la formación de la simbiosis MA.

Tabla 29. Actividades ATPasas de la membrana plasmática (Δ Va) tonoplasto (Δ NO₃) y de la mitocondria (Δ N₃) asociados a las fracciones microsomales aisladas de raíces de tomate control y micorrizadas con los hongos MA *G. mosseae* o *G. intraradices*.

	Control	Tratamiento micorrizado	
		<i>G. mosseae</i>	<i>G. intraradices</i>
Δ Vanadato $\mu\text{mol P}_i \text{ mg}^{-1} \text{ prot. h}^{-1}$	22.24 a	23.15 a	21.53 a
Δ Nitrato $\mu\text{mol P}_i \text{ mg}^{-1} \text{ prot. h}^{-1}$	4.59 a	4.71 a	4.23 a
Δ Azida $\mu\text{mol P}_i \text{ mg}^{-1} \text{ prot. h}^{-1}$	7.82 a	9.03 a	7.24 a

Los resultados expresados en $\mu\text{mol P}_i \text{ mg}^{-1} \text{ prot. h}^{-1}$ (actividad específica) son la media de tres experimentos independientes. Letras iguales dentro de cada grupo representan valores homogéneos según el análisis de la varianza de Fisher (LSD < 0.05).

Sin embargo cuando los datos de actividades específicas se expresado por gramo de peso fresco, la actividad fisiológica, se observó un incremento de las actividades ATPasas de la membrana plasmática y de la mitocondria.

Tabla 30. Actividades ATPasas de la membrana plasmática (ΔVa) tonoplasto (ΔNO_3) y de la mitocondria ($\Delta N3$) asociados a las fracciones microsomales aisladas de raíces de tomate control y micorrizadas con los hongos MA *G. mosseae* o *G. intraradices*.

	Control	Tratamiento micorrizado	
		<i>G. mosseae</i>	<i>G. intraradices</i>
Δ Vanadato $\mu\text{mol P}_i \text{ g}^{-1} \text{ p.f. raíz h}^{-1}$	4.22 a	5.32 b	6.03 b
Δ Nitrato $\mu\text{mol P}_i \text{ g}^{-1} \text{ p.f. raíz h}^{-1}$	0.87 a	1.08 a	4.23 a
Δ Azida $\mu\text{mol P}_i \text{ g}^{-1} \text{ p.f. raíz h}^{-1}$	1.48 a	2.07 b	2.02 b

los resultados expresados en $\mu\text{mol P}_i \text{ g}^{-1} \text{ p.f. raíz h}^{-1}$ (actividad fisiológica), son la media de tres experimentos independientes, letras iguales en cada columna representan grupos homogéneos determinados según el análisis de varianza de Fisher (LSD < 0.05)

2.1.3. Detección inmunológica de la H^+ -ATPasa del plasmalema

La cuantificación de la cantidad de la H^+ -ATPasa de la membrana plasmática de tomate en las raíces controles y micorrizadas se llevó a cabo mediante experimentos de Western blot utilizando anticuerpos desarrollados frente al dominio C-terminal de la H^+ -ATPasa de *Arabidopsis thaliana*. Dichos anticuerpos no reaccionaban con ninguna proteína presente en la fracción microsomal aislada de micelio externo del hongo MA, sin embargo en las fracciones microsomales aisladas, tanto de raíces controles como de las micorrizadas reaccionaban con una proteína de 100 KDa.

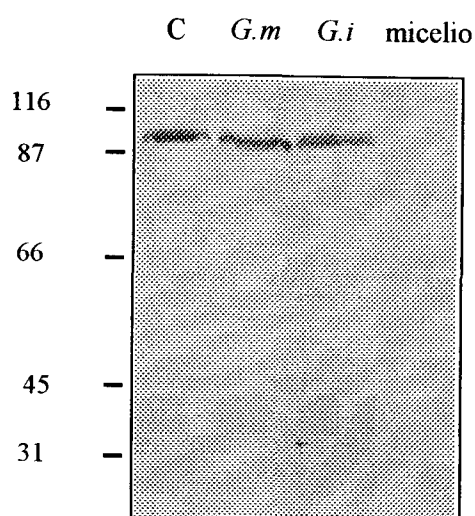


Figura 19. Análisis inmunológico de las proteínas de membrana microsomaes correspondientes a las plantas control (C) e inoculadas con *G. mosseae* (G.m) o con *G. intraradices* (G.I), y aquellas correspondientes a micelio extraradical de *G. intraradices*, realizado con anticuerpos frente a la H⁺-ATPasa de la membrana plasmática de *Arabidopsis thaliana*.

El análisis densitométrico de las bandas inmunodetectadas (Tabla 31) reveló que la cantidad de proteína antigénica por mg de proteína microsomal era la misma en las raíces controles que en las micorrizadas; sin embargo, la cuantificación referida a g de peso fresco de raíz mostró que en las raíces micorrizadas la cantidad de la H⁺-ATPasa de tomate incrementó 1.6 veces respecto a la de las raíces controles.

Intensidad de la banda	
Control	7459 ± 836
<i>G. intraradices</i>	7648 ± 765
<i>G. mosseae</i>	6580 ± 678

Tabla 31. Análisis densitométrico de la banda inmunorevelada con el anticuerpo de específico contra la H⁺-ATPasa de plasmalema de *Arabidopsis thaliana* (100kDa).

Estos resultados indican que el aumento observado en la actividad fisiológica, actividad por gramo de peso fresco, se debe a un incremento en la síntesis de la proteína.

2.1.4. Transporte de H⁺ dependiente de ATP

La actividad transportadora de H⁺ dependiente de ATP de la membrana plasmática, es decir sensible a vanadato, medida como la velocidad inicial de extinción de la fluorescencia (VQ_s) por mg de proteína, mostró un incremento del 38 % y del 32 % en los microsomas aislados de raíces colonizadas por el hongo *G. mosseae* y *G. intraradices*, respectivamente, con respecto a los valores obtenidos para las raíces controles (Tabla 32). Este caso la actividad fisiológica por gramo de peso fresco también incremento en los tratamientos micorrizados.

Table 32. Actividad fosfohidrolítica y transportadora de H⁺ de la H⁺-ATPasa de plasmalema asociada a las vesículas microsomales, aisladas de raíces de tomate controles e inoculadas con *G. intraradices* o *G. mosseae*. La razón entre la velocidad inicial de transporte de H⁺ y la actividad basales (en ausencia de detergentes) también se indican

	Control	Tratamiento micorrizado	
		<i>G. mosseae</i>	<i>G. intraradices</i>
$\Delta V_a - VQ_s$			
% Q mg ⁻¹ prot .min ⁻¹	64.90 a	121.15 b	109.14 b
Actividad Basal			
μmol Pi mg ⁻¹ prot .h ⁻¹	10.89 a	12.50 a	11.41 a
Acumulación de H ⁺ (%Q _{max})	26.18 a	48.89 b	44.20 b
H ⁺ /ATP	5.95 a	9.72 b	9.56 b

Los resultados son la media de tres experimentos independientes, letras iguales en cada línea representan grupos homogéneos determinados según el análisis multifactorial de la varianza de Fisher (LSD<0.05).

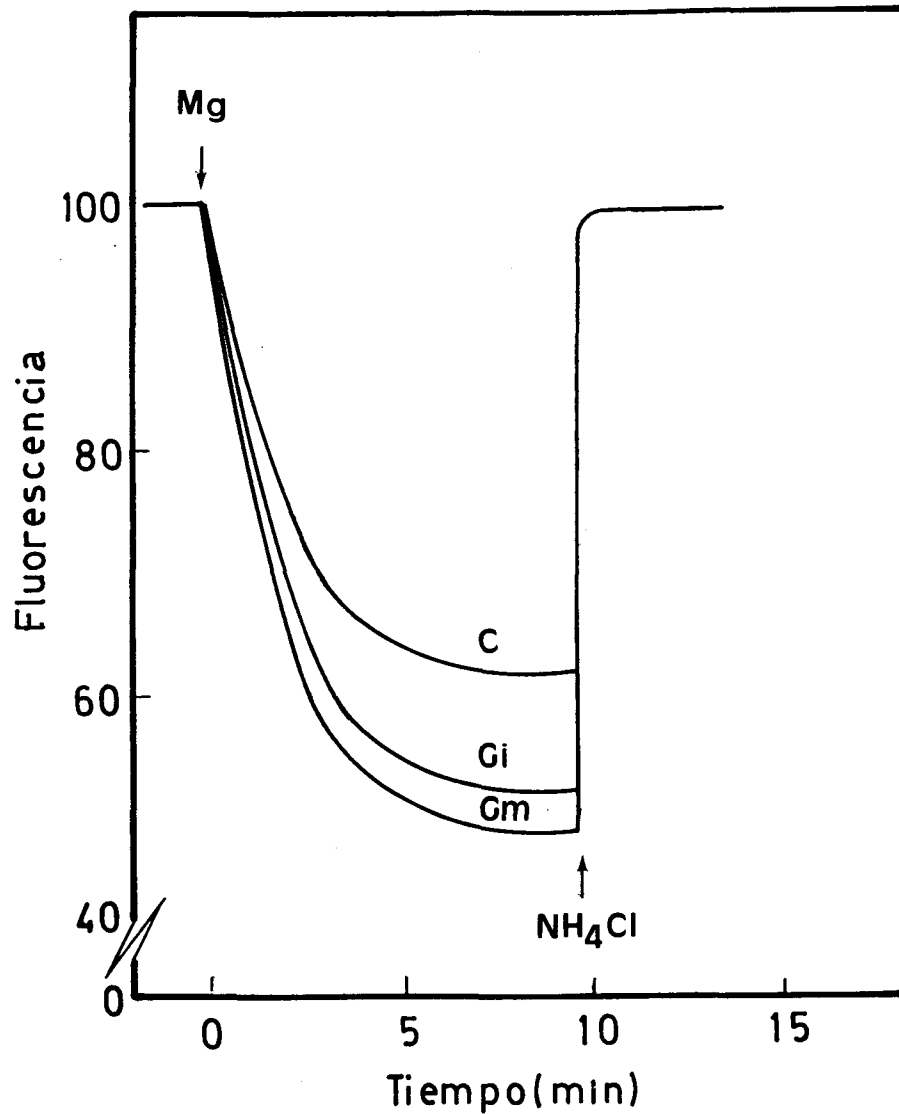


Figura 19. Actividad transportadora de H^+ dependiente de ATP, medida como extinción de la fluorescencia del ACMA, en microsomas extraídos de raíces de tomate controles e inoculadas con *G. mosseae* o *G. intraradices*. Las reacciones se iniciaron mediante adición de 3 mM de $MgSO_4$ al medio normal de reacción. La fluorescencia se restauró tras la adición de 10 mM NH_4Cl , una vez la fluorescencia alcanzaba el estado estacionario.

Los resultados obtenidos a nivel de las actividades específicas sugieren que, como consecuencia de la simbiosis, se produce un incremento en la capacidad bombeadora de H^+ de la H^+ -ATPasa sin que se produzca un incremento en la actividad fosfohidrolítica, y por tanto, de la relación H^+/ATP . Dicho incremento podría deberse a un efecto directo sobre la H^+ -ATPasa o bien a cambios inducidos en las propiedades de las vesículas de membrana, como la permeabilidad pasiva de la membrana a los H^+ . Como ya se ha indicado anteriormente las membranas microsomales están constituidas por una mezcla de membranas y aunque el estudio de las actividades ATPasa puede realizarse nivel de microsomas mediante el empleo de inhibidores específicos de la diferentes ATPasas, los estudios de las propiedades de las vesículas requieren la utilización de fracciones puras de membrana. De aquí, que para profundizar en los mecanismos por los cuales en las raíces micorrizadas se producía un incremento en la actividad bombeadora de H^+ decidimos obtener fracciones puras de membrana plasmática.

2.2. Estudios a nivel de fracciones de membrana plasmática purificadas

Puesto que en los estudios preliminares realizados a nivel de microsomas pudo observarse que los dos hongos utilizados provocaban el mismo efecto sobre la actividad ATPasa del plasmalema y debido a la gran cantidad de material biológico que se necesita para la purificación de la membrana plasmática decidimos realizar estudios a nivel de membrana plasmática en raíces micorrizadas por el hongo *G. mosseae*.

La purificación de la membrana plasmática se llevó a cabo mediante doble partición en un sistema de partición de dos fases polímero-acuosa de las fracciones microsomales.

2.2.1. Caracterización de las membranas purificadas

Las membranas obtenidas tras la partición de fases fueron caracterizadas mediante la determinación de actividades enzimáticas asociadas a las diferentes membranas subcelulares. Para ello se determinaron las actividades ATPasa sensible a vanadato (marcador de la membrana plasmática), ATPasa sensible a nitrato (marcador del tonoplasto), ATPasa sensible a azida (marcador de la mitocondria), UDPasa latente (marcador del aparato de Golgi) y NADH citocromo c reductasa insensible a antimicina A (marcador del retículo endoplasmático).

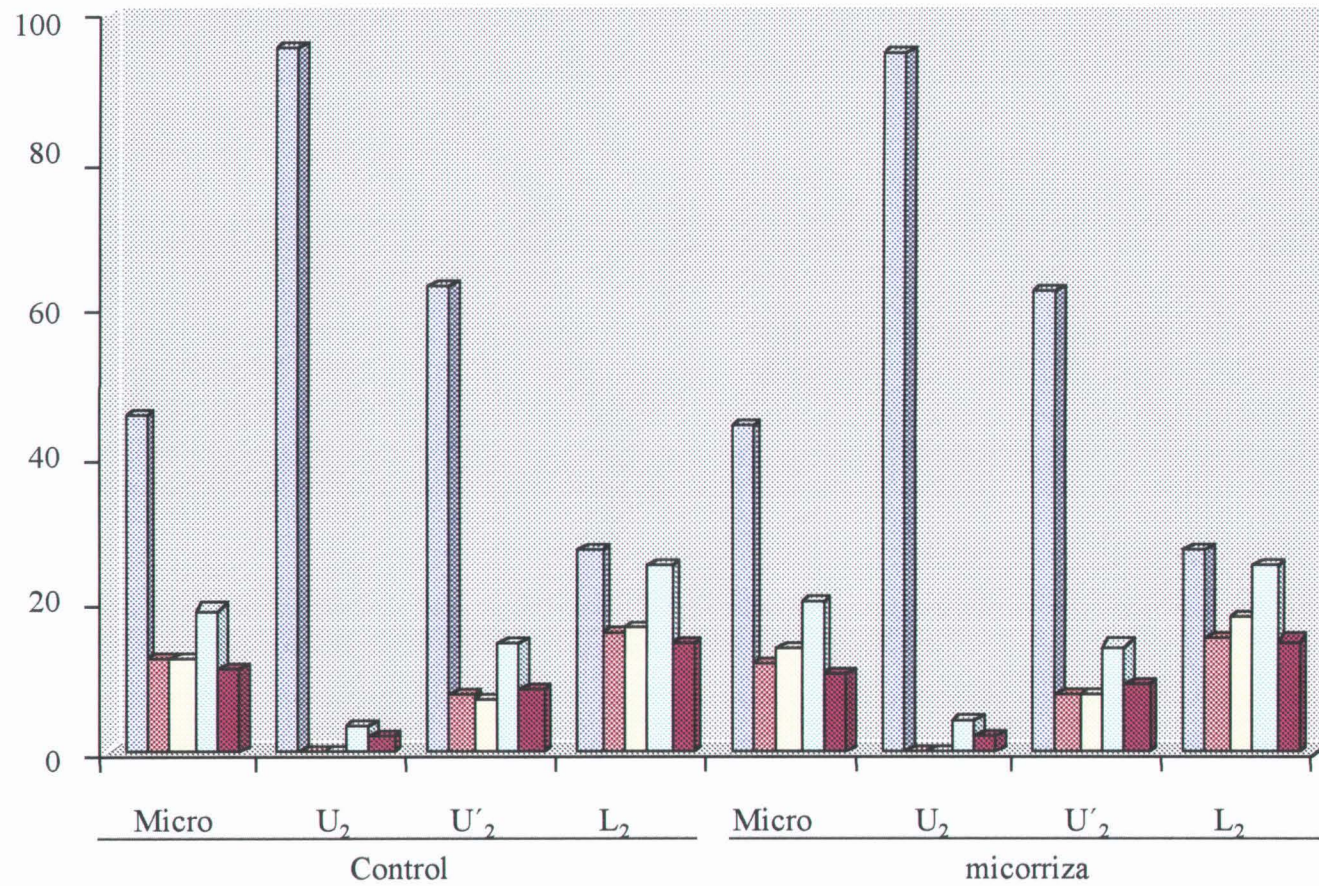
En las fases superiores U2 obtenidas tras la partición de los microsomas aislados, tanto de las raíces controles como de las micorrizadas, la actividad ATPasa de la membrana plasmática se incrementó más de un 100% con respecto a los valores observados en las fracciones microsomales. Por el contrario, en dichas fases de polietilenglicol las actividades de los marcadores enzimáticos correspondientes al aparato de Golgi y al retículo endoplasmático disminuyeron aproximadamente en un 83%, y las actividades correspondientes a los marcadores del tonoplasto y de la mitocondria no se detectaron. Mientras que en la fase U2', el porcentaje de la membrana plasmática era del 62 % en ambos tratamientos, esta fracción presentaba contaminación con el resto de las membranas. Cabe resaltar que ninguna de las fases analizadas presentó contaminación con el marcador citosólico. El análisis de las distintas fracciones ponen de manifiesto que la fracción U2 es la más adecuada para los ensayos posteriores, ya que es la fracción que menos contaminación con otras membranas, tanto en los controles como en los extractos correspondientes a las micorrizas, ya que en ambos casos la actividad del marcador de la membrana plasmática representó aproximadamente el 95 % de la actividad total de los enzimas marcadores determinados en la fase superior de polietilenglicol.

2.2.2. Contenido en proteínas de membrana plasmática

En cuanto al rendimiento en proteínas de membrana plasmática, en las raíces controles aproximadamente el 2.7 % de las proteínas microsomales aisladas de las raíces control, se recuperaron en la fracción de membrana plasmática, mientras que en las raíces micorrizadas un 3.7 % de las proteínas microsomales fueron recuperadas en la fracción de membrana plasmática (Tabla 33).

Tabla 33. Recuperación de proteínas microsomales (mg) en la fracción de membrana plasmática aislada de raíces de tomate controles e inoculadas con el hongo *G. mosseae* o *G. intraradices*

	Microsomas	U2
Control	0.26 a	7.25 10 ⁻³ c
<i>G. mosseae</i>	0.37 b	9.25 10 ⁻³ d



Porcentaje de las distintas membranas en las diferentes fases recojidas mediante partición de fases.

Membrana plasmática  Tonoplasto  Mitocondria  Aparato de Golgi  y Retículo endoplasmático 

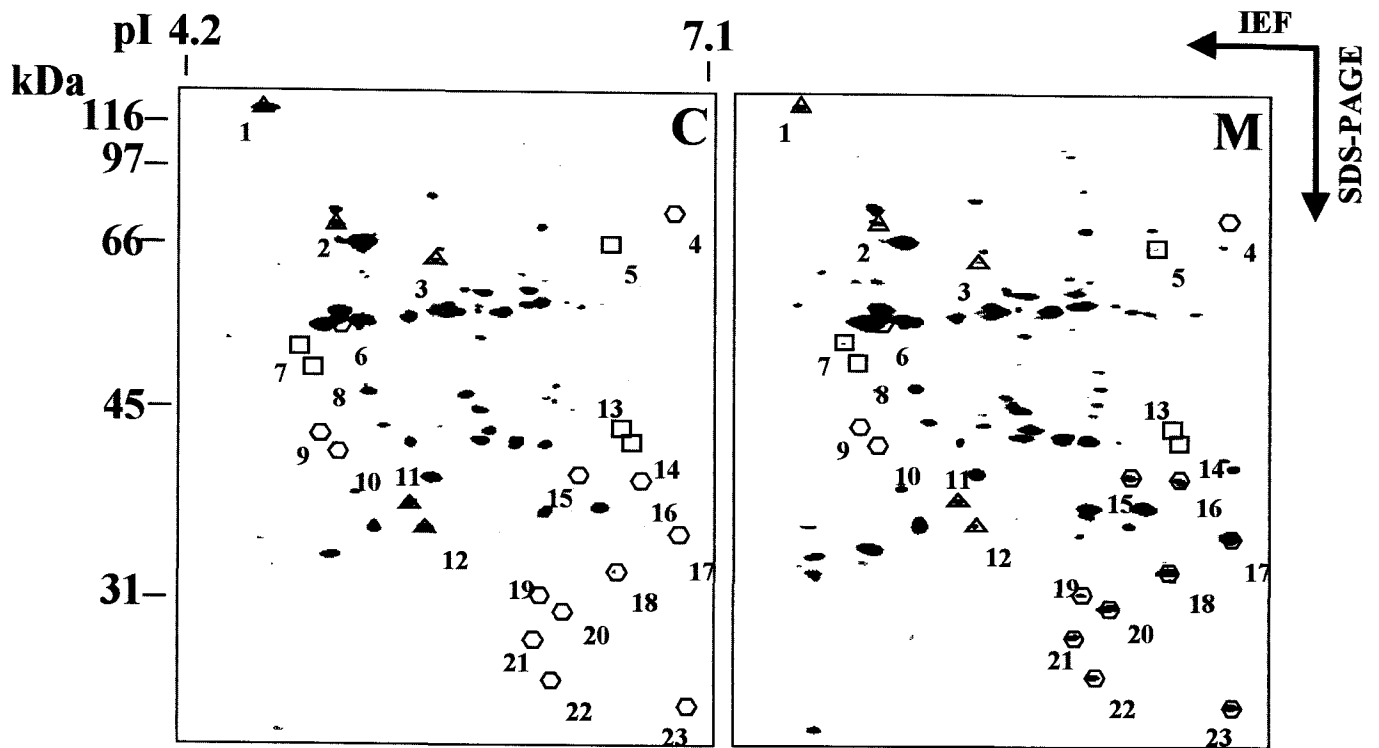


Figura 23. Perfil proteico correspondiente a microsomas de plantas control (C) y plantas micorrizadas (M)

Enzimas marcadores	Fracciones Subcelulares	Control				Micorriza			
		Micro.	U ₂	U' ₂	L ₄	Micro.	U ₂	U' ₂	L ₄
ΔV_a -ATPasa ^a	Membrana plasmática	27.11	59.28	34.37	16.18	28.22	60.63	35.77	16.85
ΔNO_3 -ATPasa ^a	Tonoplasto	7.30	<i>n.d.</i>	4.20	9.48	7.50	<i>n.d.</i>	4.31	9.66
ΔN_3 -ATPase ^a	Mitocondria	7.60	<i>n.d.</i>	3.78	9.87	8.78	<i>n.d.</i>	4.36	11.23
UDPasa latente ^a	Aparato de golgi	11.42	1.91	7.79	14.84	12.96	2.43	8.15	15.60
NADH Cyt c reductasa ^a	Reticulo endoplasmático	6.61	1.11	4.44	8.59	6.69	1.13	4.99	9.26

Tabla . Análisis de los distintos marcadores enzimáticos de las distintas fracciones obtenidas, la microsomal y fracción de membrana plasmática (U₂), fracción (U'₂) y la (L₄), extraída de raíces controles y raíces micorizadas con el hongo MA *Glomus mosseae*. Las actividades se expresaron en $\mu\text{mol Pi/mg proteína/h}$ en el caso de las ATPasas y la UDPasa y en $\mu\text{mol de Cyt C reducido/mg proteína/h}$, en el caso de la NADH cyt C reductasa. Los datos son la media de tres experimentos independientes (D.E no difiere mas del 10 %).

2.2.3. Transporte de H^+ dependiente de ATP

Teniendo en cuenta que con el método de partición de fases utilizado para la purificación las vesículas de membrana plasmática, se obtienen vesículas de membrana con una orientación invertida respecto a su disposición natural, y teniendo en cuenta la impermeabilidad de las vesículas de membrana al ATP hace la accesibilidad del ATP al centro activo de la H^+ -ATPasa, enzima dispuesto vectorialmente en la membrana, hace imprescindible el uso de detergentes para invertir la orientación de dichas vesículas. Para ello, en el presente estudio, se utilizó Brij58, determinándose en primer lugar la concentración óptima de Brij 58 para realizar las determinaciones del transporte de H^+ dependiente de ATP a nivel de las fracciones purificadas de membrana plasmática.

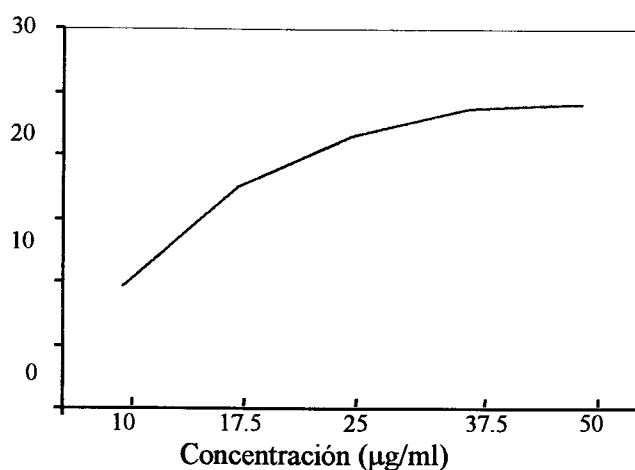


Figura 19. Efecto de la concentración de Brij 58 ($C_{16}E_{20}$) en el medio de reacción sobre la actividad bombeadora de en las fracciones de membrana purificadas mediante mediante doble partición de fases.

Los datos se expresan en ΔQ /mg Proteína/h.

Los resultados de la Figura 19 indican que la máxima actividad bombeadora de H^+ se detecta en presencia de 37.5 $\mu\text{g/ml}$ de Brij 58, por lo que se optó por esta concentración para realizar los ensayos de bombeo de protones.

2.2.4. Bombeo de protones de la membrana plasmática

En el caso de las fracciones de membrana plasmática, el transporte de H^+ dependiente de ATP, fue aproximadamente un 57 % mayor en las membranas aisladas de las raíces micorrizadas que en las aisladas de las controles incrementándose la velocidad inicial de extinción de la fluorescencia y la Q_{max} o acumulación total de protones (Tabla 34). Además pudo comprobarse que dicha actividad fue completamente inhibida por vanadato. Puesto que a nivel de las membranas purificadas, la actividad fosfohidrolítica de las H-ATPasas presento el mismo valor en las raíces controles que en las micorrizadas, al igual que se observó a nivel de las preparaciones microsomales, la relación H^+/ATP fue mayor a nivel de las membranas aisladas de las raíces micorrizadas que en aquellas aisladas de las raíces controles.

En principio, el incremento en la actividad transportadora de H en las membranas aisladas de las raíces micorrizadas podría ser consecuencia de:

1. Las actividad ATPasas latente es mayor en las raíces micorrizadas que en las controles.
2. Estimulación indirecta como consecuencia de una disminución de la permeabilidad pasiva a los protones .
3. Estimulación directa de los sistemas de transporte de H^+ .

La observación de que las membranas aisladas de las raíces controles y micorrizadas presentaban los mismos valores de latencia y que la permeabilidad pasiva de ambas membranas a los H^+ era la misma, nos permite concluir que el incremento sobre el transporte de H dependiente de ATP de debe a una estimulación directa de los sistemas de transporte de H^+ en las raíces micorrizadas.

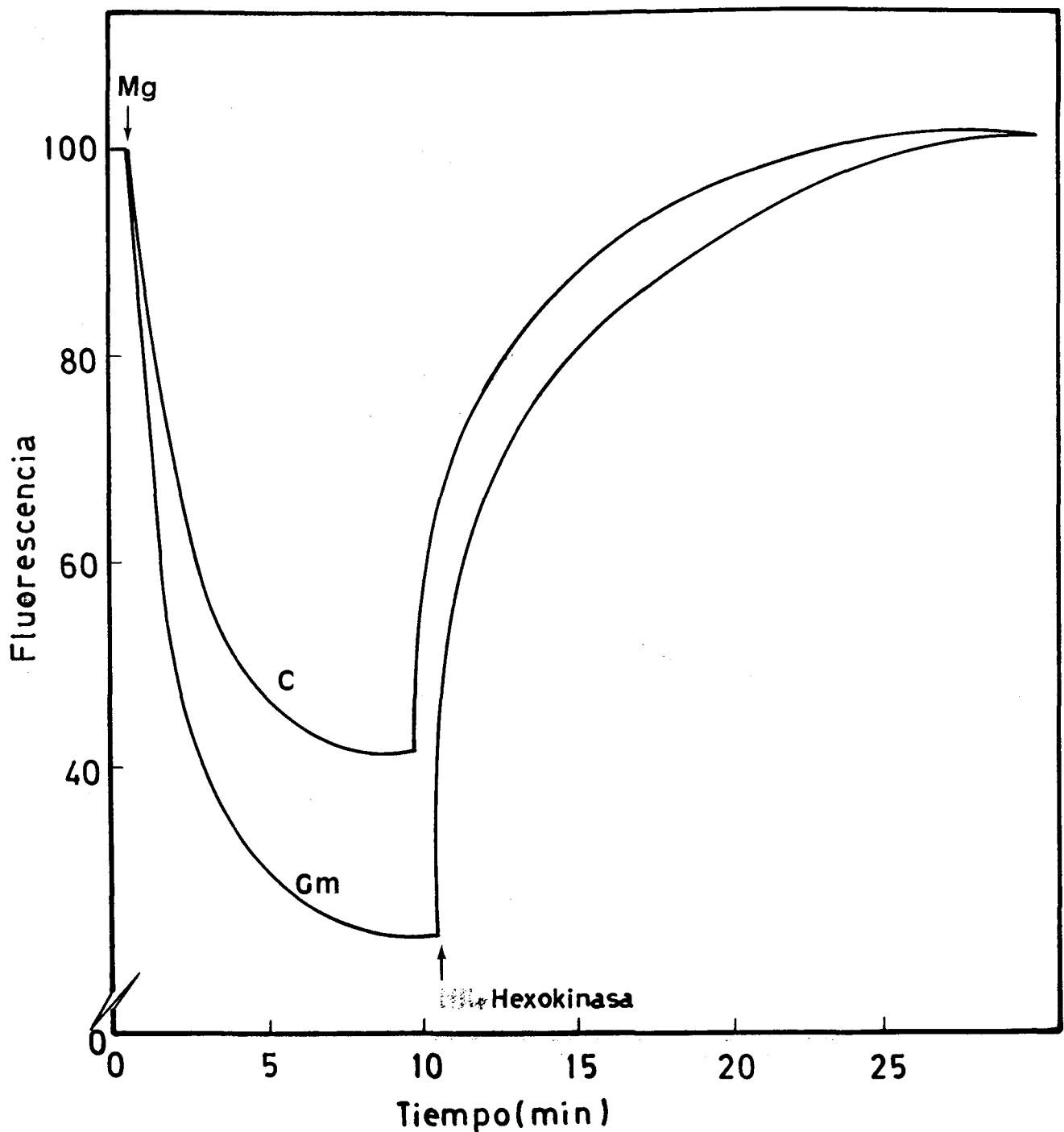


Figura 20. Actividad transportadora de H^+ dependiente de ATP, medida como extinción de la fluorescencia del ACMA, en vesículas de membrana plasmática extraídas de raíces de tomate controles e inoculadas con *G. mosseae*. Las reacciones se iniciaron mediante adición de 3 mM de $MgSO_4$ al medio normal de reacción. La fluorescencia se restauró tras la adición de D-glucosa y Hexokinasa, una vez la fluorescencia alcanzaba el estado estacionario.

Table 34. Actividad fosfohidrolítica y transportadora de H^+ dependiente de ATP, así como la razón entre la velocidad inicial de transporte de H^+ y la actividad basal fosfohidrolítica, en preparaciones de membrana plasmática, aislados de raíces de tomate controles e inoculadas con *G. mosseae*.

	Control	Micorriza
Actividad ATPasa $\mu\text{mol Pi mg}^{-1}\text{prot} \cdot \text{h}^{-1}$	59.28 a	60.63 a
VQs Transporte de H^+ % Q $\text{mg}^{-1}\text{prot} \cdot \text{min}^{-1}$	1101.50 a	1731.00 b
H^+ /ATP	18.58 a	28.55 b
Qmax	67.87 a	84.84 b

Los resultados son la media de tres experimentos independientes, Letras iguales en cada línea representan grupos homogéneos determinados según el análisis multifactorial de la varianza de Fisher ($LSD < 0.05$).

Tabla 35 refleja las propiedades de las vesículas utilizadas para el bombeo de protones

	Control	Micorriza
$t_{1/2}$ (min)	0.90 a	0.87 a
Latencia (%)	89.00 a	91.00 a

Los resultados son la media de tres experimentos independientes, letras iguales en cada línea representan grupos homogéneos determinados según el análisis multifactorial de la varianza de Fisher ($LSD < 0.05$).

2.2.4 Actividad NADH-ferricianuro óxidoreductasa:

En las vesículas de membrana plasmática aisladas de raíces controles micorrizadas con el hongo *G. mosseae*, se ha determinado también el efecto de la colonización MA sobre la actividad NADH-ferricianuro óxido reductasa, enzima del sistema redox de la membrana plasmática que junto con la actividad H^+ -ATPasa contribuye a la creación del gradiente electroquímico necesario para la absorción de solutos

La colonización MA induce una clara y significativa activación de la actividad NADH-ferricianuro óxido reductasa (tabla 36).

Tabla 36. Actividad NADH-ferricianuro óxido reductasa de la membrana plasmática aislada de raíces de tomate controles y micorrizadas.

Act. enzimática	
Control	2.53 a
Micorriza	3.69 b

Los resultados expresados en nmol de $Fe(CN)_6^{3-}$ reducidos/mg proteína/minuto son la media de tres experimentos independientes, letras iguales representan grupos homogéneos determinados según el análisis multifactorial de la varianza de Fisher (LSD < 0.05).

4. COMPOSICIÓN LIPÍDICA DE LAS RAICES Y MEMBRANAS DE TOMATE INOCULADOS CON LOS HONGOS MA.

En el apartado anterior se demostró que la actividad de enzimas claves en los procesos de energetización de membranas como las H⁺-ATPasa y sistemas redox estaba incrementada en las raíces micorrizadas. Varios autores han demostrado que la funcionalidad de las membranas biológicas viene determinada por las características de sus componentes lipídicos y proteicos concretamente se ha propuesto que la modulación de los sistemas de transporte, como las ATPasas, puede llevarse a cabo mediante cambio en la composición lipídica, a través de una interacción directa de los lípidos con las proteínas. Para profundizar en esta idea decidimos estudiar los cambios inducidos por la formación de las micorrizas en la composición lipídica de membranas aisladas de raíces de tomate. La consideración de trabajos recientes en los que se trata de correlacionar ciertos componentes lipídicos de las raíces micorrizadas, concretamente el contenido en el ácido graso 16:1, 11-cis hexadecanóico, ácido graso presente únicamente en los hongos MA, con el porcentaje de colonización fúngica nos llevo a estudiar también la composición lipídica a nivel de las raíces y de diferentes estructuras fúngicas.

4.1. Caracterización a nivel de raíz entera

4.1.1. Análisis de lípidos totales de raíces controles y micorrizadas

La Tabla 15 refleja el resultado del análisis de la composición en ácidos grasos de los lípidos totales, de raíces controles y micorrizadas, resultado obtenido mediante el análisis cromatográfico de los mismos. En dicha tabla se pone de manifiesto que la composición en ácidos grasos de lípidos totales correspondientes a las raíces micorrizadas son sustancialmente diferentes de las controles, y que estas diferencias se reflejan tanto a nivel cualitativo como cuantitativo.

Tabla 37. Análisis cualitativo y cuantitativo de los ácidos grasos de lípidos totales de raíces de tomate controles y micorrizadas

Acido graso	Control		Micorriza	
	$\mu\text{g/g.p.f}$	%T	$\mu\text{g/g.p.f}$	%T
<i>Palmítico</i>				
(16:0)	64.90 \pm 5.49	29.17	138.74 \pm 12.25	33.16
(16:1) trans	17.22 \pm 3.54	7.74	33.46 \pm 3.26	7.99
(16: 1) cis	---	---	67.74 \pm 5.49	16.15
<i>Estearico</i>				
(18:0)	18.54 \pm 1.15	8.33	12.14 \pm 3.78	2.90
<i>Oleico</i>				
(18:1)	12.82 \pm 2.46	5.76	31.28 \pm 2.52	7.40
<i>Linoléico</i>				
(18:2)	83.54 \pm 7.06	37.55	103.32 \pm 2.57	24.60
<i>Linolénico</i>				
(18:3)	25.44 \pm 0.42	11.43	31.48 \pm 0.95	4.69
Total	222.46 \pm 9.63		418.34 \pm 18.11	7.61

Las raíces micorrizadas presentaban un mayor contenido en lípidos que las controles, lo cual se debía fundamentalmente a un incremento en la cantidad de los ácidos palmítico, palmitoléico y oléico, así como a la aparición del ácido graso característico de los hongos MA, el ácido 11-cis hexadecanóico, el cual representa el 16 % del total de los ácidos grasos.

Con el fin de determinar la biomasa fúngica en las raíces micorrizadas en función de su contenido en el ácido hexadecanóico procedimos a determinar la composición en ácidos grasos de los extractos lipídicos obtenidos a partir de micelio externo y de esporas del hongo MA.

4.1.2. Análisis de los lípidos totales del hongo MA

Tabla 38. Análisis cualitativo de los ácidos grasos totales de micelio extraradical y esporas de *Glomus*.

Acido graso	micelio		esporas	
	$\mu\text{g}/\text{mg.p.f}$	%T	$\mu\text{g}/100 \text{ esp.}$	%T
<i>Palmitico</i> (16:0)	0.068 \pm 0.006	19.37	10.86 \pm 1.10	15.92
(16: 1) cis	0.134 \pm 0.012	38.17	43.83 \pm 3.43	64.31
<i>Estearico</i> (18:0)	0.058 \pm 0.006	16.52	2.93 \pm 0.18	4.29
<i>Oleico</i> (18:1)	0.032 \pm 0.002	9.11	9.52 \pm 0.85	13.96
<i>Linoléico</i> (18:2)	0.056 \pm 0.004	15.95	0.56 \pm 0.04	0.82
<i>Linolénico</i> (18:3)	0.003 \pm 0.001	0.85	0.47 \pm 0.03	0.68
Total	0.351 \pm 0.020		68.20 \pm 5.63	4.69

En la Tabla 38 muestra es el ácido graso mayoritario de los extractos lipídicos del micelio y de las esporas que el 16:1c, constitutivo el 38 y el 64 %. La consideración del contenido en el ácido 16:1c por mg de micelio y por gramo de raíz micorrizada nos permitió estimar la existencia de 0.5 mg de biomasa fúngica por gramo de raíz, lo que equivale a un 0.05 % de la biomasa de la raíz micorrizada.

4.1.3. Análisis cuantitativo de las distintas moléculas lipídicas

Para intentar clarificar el incremento en la cantidad de lípidos totales registrado en la raíces micorrizadas, se procedió a la separación y cuantificación de las diferentes moléculas lipídicas (Tabla 39).

Tabla 39. Análisis cuantitativo de las distintas moléculas lipídicas de raíces controles y raíces micorrizadas.

Acido graso	Control		Micorriza	
	$\mu\text{g}/\text{mg Prot.}$	%T	$\mu\text{g}/\text{mg Prto.}$	%T
Fosfolípidos	92.27 ± 9.14	35.70	215.19 ± 18.18	41.90
Fosfatidilcolina (FC)	40.98 ± 3.59		89.30 ± 5.28	
Fosfatidiletanolamina (FE)	24.35 ± 2.40		76.90 ± 7.69	
Otros	31.94 ± 3.15		48.99 ± 5.21	
Glucolípidos	40.26 ± 2.90	14.77	76.85 ± 5.42	14.99
Lípidos neutros	134.93 ± 10.43	49.52	210.07 ± 12.24	41.10
Total	272.46 ± 22.12		512.36 ± 48.29	

Como puede observarse en la Tabla 39 las raíces micorrizadas presentaban una mayor cantidad de fosfolípidos, glucolípidos y lípidos neutros que las controles. Sin embargo, mientras que en las raíces controles los lípidos neutros eran la molécula lipídica mayoritaria, en las raíces micorrizadas los fosfolípidos fueron el componente mayoritario. Este incremento en fosfolípidos podría deberse en principio, tanto al aporte de fosfolípidos fúngicos como a la proliferación de las membranas celulares que se produce en las células corticales conteniendo arbusculos.

4.1.4. Análisis de los ácidos grasos de la distintas moléculas lipídicas

Para clarificar si el incremento en la cantidad de fosfolípidos observado en las raíces micorrizadas se debía a un incremento en la cantidad de membranas vegetales, o bien a la contribución de las membranas del hongo, se procedió al análisis de la composición en ácidos grasos de las distintas moléculas lipídicas (Tabla 40).

Tabla 40. Análisis cualitativo de los ácidos grasos de las distintas moléculas lipídicas de raíces controles y micorrizadas.

Acido graso	FC		FE		GL		LN	
	C	M	C	M	C	M	C	M
<i>Palmitico</i> (16:0)	31.50	33.35	33.54	31.40	33.57	32.51	28.92	39.77
<i>Palmitoléico</i> (16:1) trans	8.19	7.92	8.26	8.32	9.92	9.03	16.11	15.42
<i>Hexadecanóico</i> (16: 1) cis	----	2.04	----	1.93	-----	1.24	-----	20.52
<i>Estearico</i> (18:0)	3.42	2.67	3.18	2.69	3.25	2.81	13.96	4.73
<i>Oleico</i> (18:1)	2.96	6.53	1.63	9.16	1.96	3.31	15.46	7.94
<i>Linoléico</i> (18:2)	44.63	39.47	46.69	39.91	39.11	33.85	19.02	8.91
<i>Linolénico</i> (18:3)	9.30	8.02	6.70	6.59	12.19	17.25	6.17	2.71
I.E.	128.31	119.49	123.37	119.00				

FC; fosfatidilcolina, FE; fosfatidiletanolamina, GL; glucolípidos, LN; lípidos neutros. C; control, M; micorriza.

El análisis de la composición en ácidos grasos de las distintas moléculas lipídicas de las raíces de ambos tratamientos, pone de manifiesto la presencia del ácido graso 16:1cis a nivel de todas las moléculas lipídicas analizadas. A nivel de los fosfolípidos analizados dicho ácido graso representa el 2% de los ácidos grasos totales mientras que a nivel de lípidos neutros representa el 20 %. Estos resultados indican la presencia de dicho ácido graso totales tanto en las membranas como en los órganos de reserva del hongo.

A nivel de las dos moléculas fosfolipídicas analizadas, fosfatidiletanolamina y fosfatidilcolina, se observó que los cambios fundamentales que se producían en su composición en ácidos grasos en las raíces micorrizadas eran un incremento en el contenido en ácido oléico y una disminución en linoléico, lo que se traduce en un

incremento en el nivel de saturación de dichas moléculas fosfolipídicas. En el caso de los glucolípidos, tanto el oléico como el linolénico aumentaron considerablemente en las raíces micorrizadas. En cuanto a los lípidos neutros pudo comprobarse que el porcentaje de todos los ácidos grasos detectados, con la excepción del palmítico, disminuyeron en las raíces micorrizadas, lo cual se debe al alto contenido en ácido hexadecanóico.

4.2. Caracterización a nivel de membranas

El estudio de la composición lipídica a nivel de las fracciones de membrana aisladas de las raíces controles y micorrizadas tuvo dos objetivos fundamentales. Por una parte como se indicó en el inicio de este capítulo, determinar los cambios inducidos por la formación de las micorrizas en su composición lipídica y por otra parte tratar de determinar la cantidad de membranas fúngicas recuperadas en las preparaciones aisladas de las raíces micorrizadas en base al contenido en el ácido graso 16:1 cis.

4.2.1. Análisis de los lípidos totales de membranas

Los resultados presentados en la Tabla 41 indican que a nivel de las preparaciones de membranas la cantidad de lípidos totales por mg de proteína no variaba en las raíces micorrizadas con respecto a la cantidad existente en los controles. Sin embargo, puesto que las raíces micorrizadas presentaron un mayor contenido en proteínas de membrana que las controles, estos resultados coinciden con los obtenidos a nivel de raíces si se expresan por g de peso fresco.

En lo que respecta al 16:1cis pudo comprobarse que a nivel de las membranas tan solo representaba el 12 % del contenido total en ácidos grasos.

Tabla 41. Análisis cualitativo y cuantitativo de los ácidos grasos de lípidos totales de microsomas aislados de raíces controles y micorrizadas de tomate.

Acido graso	Control		Micorriza	
	$\mu\text{g} / \text{mg proteína}$	%T	$\mu\text{g} / \text{mg proteína}$	%T
<i>Palmitico</i> (16:0)	43.15 \pm 2.09	28.52	42.15 \pm 1.89	30.89
<i>Palmitoléico</i> (16:1) trans	14.66 \pm 1.68	9.69	10.20 \pm 1.79	7.43
<i>Hexadecanóico</i> (16:1) cis	---	---	1.58 \pm 0.32	12.00
<i>Estéarico</i> (18:0)	14.58 \pm 2.48	9.66	10.65 \pm 1.86	7.80
<i>Oleico</i> (18:1)	5.00 \pm 0.24	3.30	12.03 \pm 1.03	8.81
<i>Linoléico</i> (18:2)	62.73 \pm 2.07	41.47	45.88 \pm 4.69	33.62
<i>Linolénico</i> (18:3)	11.14 \pm 0.81	7.36	13.95 \pm 1.33	10.22
Total	151.28 \pm 9.37		136.44 \pm 12.58	

4.2.2. Análisis cuantitativo de las distintas moléculas lipídicas

Tabla 41. Análisis cualitativo de las distintas moléculas lipídicas del extracto microsomal.

Acido graso	Control		Micorriza	
	$\mu\text{g}/\text{mg Prot.}$	%T	$\mu\text{g}/\text{mg Prot.}$	%T
Fosfolípidos	132.59 \pm 14.56	66.65	144.89 \pm 12.26	69.18
Fosfatidilcolina (FC)	43.55 \pm 3.36		54.86 \pm 2.68	
Fosfatidiletanolamina (FE)	27.20 \pm 2.72		38.65 \pm 2.16	
Otros	61.84 \pm 7.48		51.38 \pm 5.42	
Glucolípidos	15.35 \pm 2.53	7.71	19.48 \pm 2.00	9.30
Lípidos neutros	51.00 \pm 5.03	25.63	45.06 \pm 5.07	21.31
Total	198.94 \pm 22.12		209.43 \pm 19.33	

Como se puede apreciar en dicha tabla, la comparación de las cantidades de las distintas moléculas lipídicas de las membranas aisladas de las plantas controles y micorrizadas pone de manifiesto una mayor, aunque no significativa, cantidad de fosfolípidos y glucolípidos en las plantas micorrizadas. En cuanto a las moléculas fosfolipídicas analizadas se observa, que tanto los niveles de fosfatidilcolina como los de fosfatidiletanolamina incrementaban en las membranas aisladas de las raíces micorrizadas siendo el incremento en PE mayor que en PC de manera que la relación PC/PE disminuyó en las raíces micorrizadas.

4.2.3. Análisis de los ácidos grasos de la distintas moléculas lipídicas

El análisis de la composición en ácidos grasos de las distintas moléculas lipídicas puso de manifiesto que el ácido graso fúngico 16:1 cis tan solo se detectaba a nivel de los lípidos neutros (Tabla 43). La ausencia de dicho ácido graso a nivel de los fosfolípidos y glucolípidos en las preparaciones de membranas de las raíces micorrizadas, sugiere bien la ausencia de la membranas del hongo en tales extractos, o que, dichas membranas se recuperan en una cantidad tan baja que no pueden detectarse mediante el análisis de la composición en ácidos grasos. Por tanto, teniendo cuenta que el 16:1 cis, es el ácido graso mayoritario de los hongos MA, se puede considerar que los cambios detectados en la

composición cuantitativa y cualitativa de las moléculas fosfolípídicas en las membranas aisladas de las raíces micorrizadas, se deben a un efecto de la colonización micorrícica sobre los fosfolípídica de la planta hospedadora.

Los resultados de la Tabla 43 muestran que la composición en ácidos rasos de la PC y PC se modifica en las raíces micorrizadas. Concretamente, en ambas moléculas fosfolípídica el contenido en ácido palmítico y oléico incrementó en las raíces micorrizadas, mientras que el contenido en linoléico y linolénico disminuyó, siendo dicho cambios más importante en la fosfatidiletanolamina.

El índice de enlace de ambas moléculas fue menor en las raíces micorrizadas que en las controles, lo que indica que como consecuencia de la formación de la simbiosis micorrícica, aumenta el grado de saturación de las membranas de la planta hospedadora.

Tabla 43. Análisis cualitativo de los ácidos grasos de las distintas moléculas lipídicas de las membranas aisladas de raíces controles y micorrizadas

Acido graso	FC		FE		GL		LN	
	C	M	C	M	C	M	C	M
<i>Palmitico</i> (16:0)	42.51	46.81	39.61	49.77	39.05	50.96	48.16	57.33
<i>Palmitoléico</i> (16:1) trans	12.96	10.81	10.77	11.98	12.85	12.02	16.87	16.03
<i>Hexadecanóico</i> (16: 1) cis	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	5.97
<i>Estearico</i> (18:0)	5.46	4.58	6.54	5.99	5.71	6.25	8.76	4.71
<i>Oleico</i> (18:1)	4.58	6.41	4.61	6.91	2.85	5.30	9.11	4.91
<i>Linoléico</i> (18:2)	30.66	28.30	33.46	21.66	31.66	20.19	14.40	6.66
<i>Linolénico</i> (18:3)	3.83	3.09	5.00	3.96	7.85	5.28	2.65	5.21
I.E	90.35	83.09	97.3	73.28				

FC; fosfatidilcolina, FE; fosfatidiletanolamina, GL; glucolípidos, LN; lípidos neutros. C; control, M; micorriza.

5. EFECTO DE LA COLONIZACIÓN MA SOBRE LA SÍNTESIS DE PROTEINAS

Para analizar el efecto de la colonización MA sobre la síntesis de proteínas se procedió al estudio del patrón proteico correspondiente al extracto crudo, fracciones soluble, microsomal y de membrana plasmática aisladas a partir de raíces de tomate control y micorrizadas mediante electroforesis bidimensional 2D-PAGE.

5.1. Análisis del perfil proteico correspondiente al extracto crudo de las raíces controles e inoculadas con el hongo MA *G. mosseae*

A nivel de los extractos crudos, mas de 300 polipéptidos, los cuales presentaban pesos moleculares comprendidos entre 120 y 20 kDa y puntos isoeléctricos entre 4.2 y 7.1 (Figura 20), se separaron mediante electroforesis bidimensional.

La comparación de los perfiles proteicos obtenidos para los extractos de las raíces controles y micorrizadas puso de manifiesto que nueve polipéptidos fueron diferencialmente expresados en respuesta al establecimiento de la simbiosis (Tabla 44).

Polipéptido	peso molecular	pI	Cambios observados
1	120	4.56	Disminución
2	90	4.56	Nuevo
3	102	5.97	Incremento
4	73	5.01	Disminución
5	58	4.20	Nuevo
6	53	5.01	Incremento
7	43	5.34	Incremento
8	35	5.91	Incremento
9	28	6.21	Incremento

Tabla 44. Polipeptidos del extracto crudo diferencial expresados en plantas micorrizadas con hongo *G. mosseae*.

Concretamente, se observó que la intensidad de los polipéptidos 1 y 4 disminuyó en las raíces micorrizadas mientras que la de los polipéptidos (3, 6-9) incrementó, Además, en los extractos de las raíces micorrizadas se detectaron dos polipéptidos nuevos, polipéptidos 2 y 5, los cuales estaban ausentes en los extractos crudos de las raíces controles

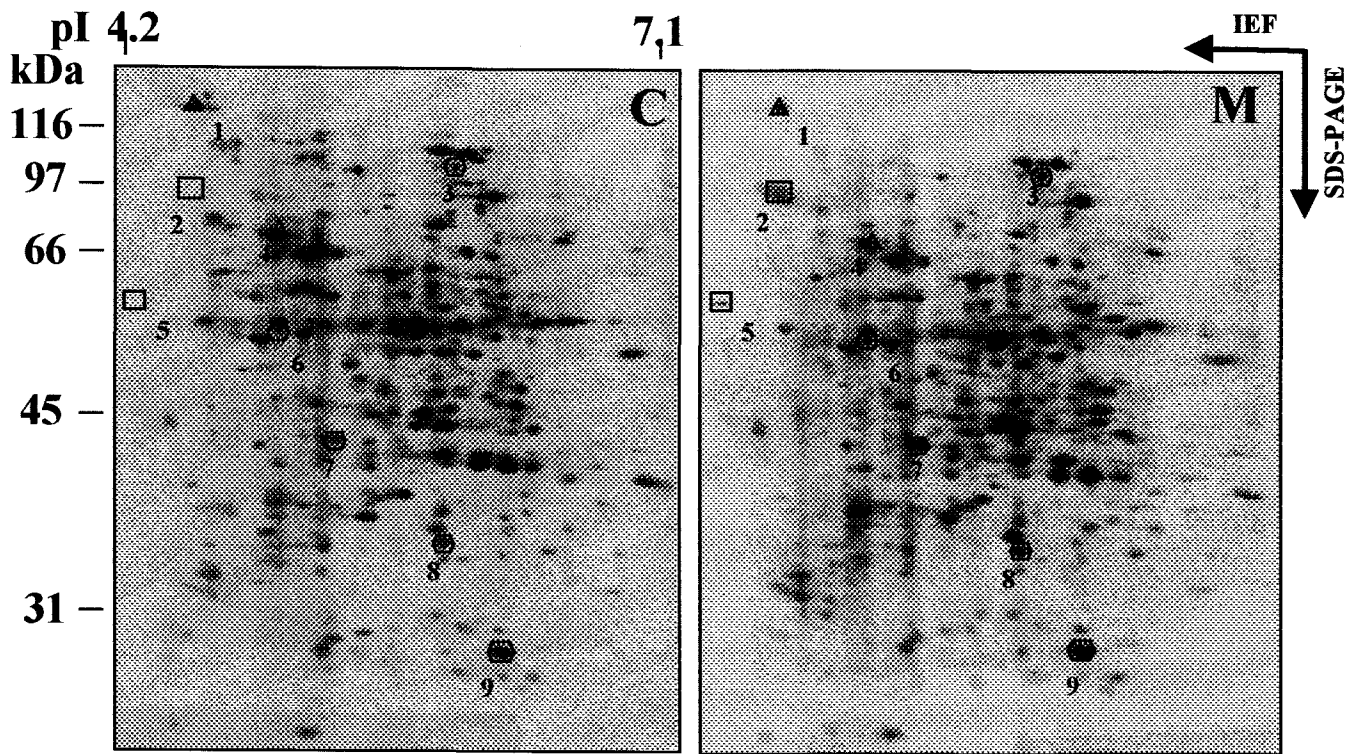


Figura 21. Perfil proteico correspondiente al extracto crudo de las plantas control (C) y plantas micorrizadas (M)

5.2. Análisis del perfil proteico correspondiente a las proteínas solubles

La fracción soluble aislada de raíces controles y micorrizadas de tomate mostró un perfil proteico comprendido por proteínas con pIs entre 4.1 y 7.1 y de pesos moleculares entre 150 y 50 KDa.

Al igual que en el extracto crudo, la formación de micorrizas provoco cambios fundamentales en la síntesis de las proteínas solubles(Fig. 22 Tabla 45): alteración de los niveles de algunas proteínas constitutivas y síntesis de proteínas nuevas, Así, pudo comprobarse que la síntesis de 12 polipéptidos incrementó en las raíces micorrizadas (marcadas 1-6, 10, 11,16, 18, 19 y 21) mientras que la síntesis de los siete polipéptidos indicados por triángulo disminuyó. Es interesante destacar que seis de los siete polipéptidos que sufren una represión tienen un peso molecular comprendido entre 27 y 37 kDa.

N° polipéptidos	PM	pI	Cambios observados
1	97	4.49	Incremento
2	90	4.51	Incremento
3	80	4.63	Incremento
4	70	4.63	Incremento
5	70	5.72	Incremento
6	102	6.06	Incremento
7	97	6.56	Disminución
8	60	4.29	Nueva
9	52	4.82	Nueva
10	50	4.82	Incremento
11	44	4.47	Incremento
12	39	4.85	Disminución
13	35	4.94	Disminución
14	28	5.13	Disminución
15	27	5.22	Disminución
16	42	6.99	Incremento
17	36	6.56	Disminución
18	37	5.81	Incremento
19	31	6.37	Incremento
20	30	6.46	Disminución
21	18	4.82	Incremento

Tabla 45. Listado de los polipéptidos solubles diferencialmente expresados en las plantas micorrizadas con el hongo *G. mosseae*.

La comparación de los cambios producidos en respuesta a la colonización MA en la fracción soluble y en el extracto crudo, ha permitido identificar algunos de los polipéptidos del extracto crudo como solubles. Así, los polipéptidos 3, 5 y 8 (Fig 21) podrían corresponderse con los polipéptidos 2, 6, 8 y 18 de la figura 22 respectivamente. La observación de que la formación de micorrizas provocara cambios en la síntesis de 21

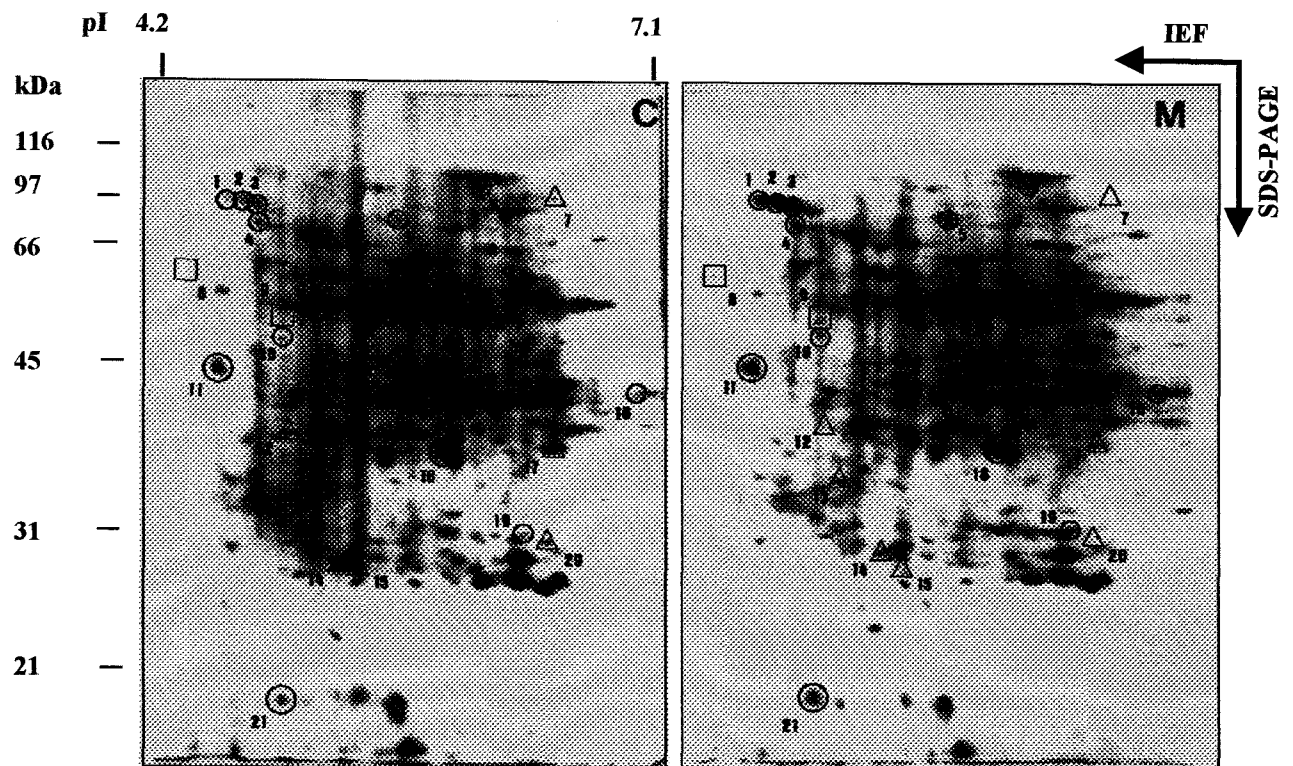


Figura 22. Perfil proteico correspondiente a las proteínas solubles de las plantas control (C) y plantas micorrizadas (M).

proteínas solubles y solo de nueve a nivel del extracto crudo indica que la expresión de algunas proteínas cambia en unos niveles tan bajos que es necesario analizar fracciones puras para poder detectarlas.

5.3. Análisis del perfil proteico de las proteínas microsomales correspondiente

Al igual que en el caso del extracto crudo y la fracción soluble, el análisis de la fracción microsomal reveló cambios importantes en la síntesis de proteínas microsomales de raíces de tomate en respuesta al establecimiento de la simbiosis. Este análisis pone de manifiesto que 23 polipéptidos fueron diferencialmente sintetizados en respuesta al establecimiento de la simbiosis, de los cuales cinco (polipéptidos 5, 7, 8, 13 y 14) correspondían a proteínas nuevas que no estaban presentes en las raíces controles y 17 a polipéptidos constitutivos cuya síntesis se ve aumentada (polipéptidos 6, 9, 10, 16-23) o disminuida (polipéptidos 1, 2, 3, 11 y 12) en las raíces micorrizadas (Figura 23). La comparación de los perfiles microsomales, con los del extracto crudo reveló que los polipéptidos 1, 4, 6 y 9 del extracto crudo (Fig 21 y la Tabla 44) podrían corresponder a los polipéptidos de membrana 1, 2, 6 y 22, respectivamente (Fig. 23, Tabla 45).

Nº polipéptidos	PM	PI	Cambio observado
1	120	4.60	Disminución
2	75	4.98	Disminución
3	64	5.51	Disminución
4	80	6.92	Incremento
5	68	6.50	Nueva
6	54	5.04	Incremento
7	52	4.83	Nueva
8	49	4.89	Nueva
9	42	4.92	Incremento
10	40	5.04	Incremento
11	37	5.41	Disminución
12	35	5.47	Disminución
13	43	6.63	Nueva
14	41	6.66	Nueva
15	39	6.34	Incremento
16	39	6.66	Incremento
17	35	6.90	Incremento
18	32	6.63	Incremento
19	31	6.08	Incremento
20	30	6.23	Incremento
21	28	6.05	Incremento
22	26	6.17	Incremento
23	25	6.92	Incremento

Tabla 46. Listado de los polipéptidos microsomales diferencialmente expresados en las plantas micorrizadas con el hongo *G. mosseae*.

5.4 Análisis electroforético de proteínas de membrana plasmática

Los resultados presentados en el apartado anterior ponen de manifiesto que la síntesis de proteínas de membrana se modifica como consecuencia del establecimiento de la simbiosis. Sin embargo, puesto que las membranas microsomales están constituidas por una mezcla de membranas, la localización de los cambios detectados a nivel de las membranas microsomales requiere realizar análisis a nivel de las fracciones purificadas de

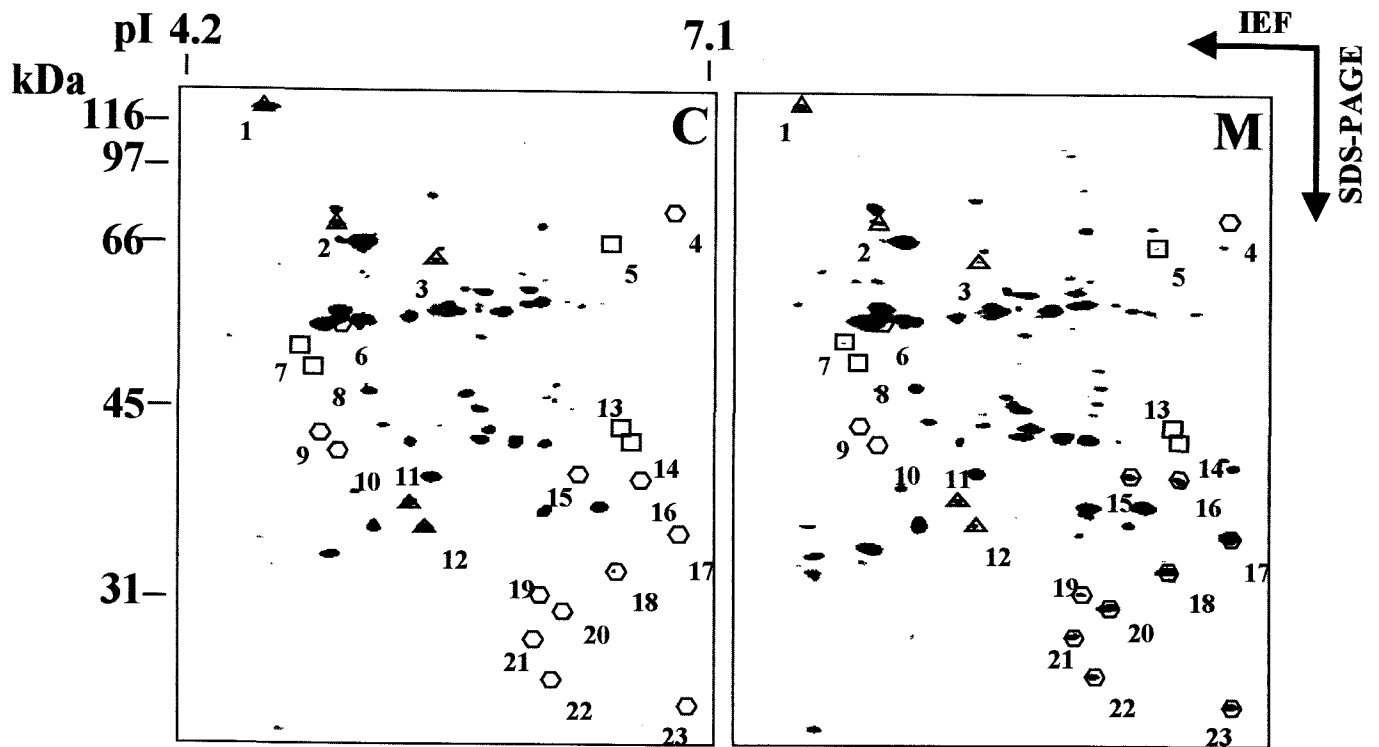


Figura 23. Perfil proteico correspondiente a microsomas de plantas control (C) y plantas micorrizadas (M)

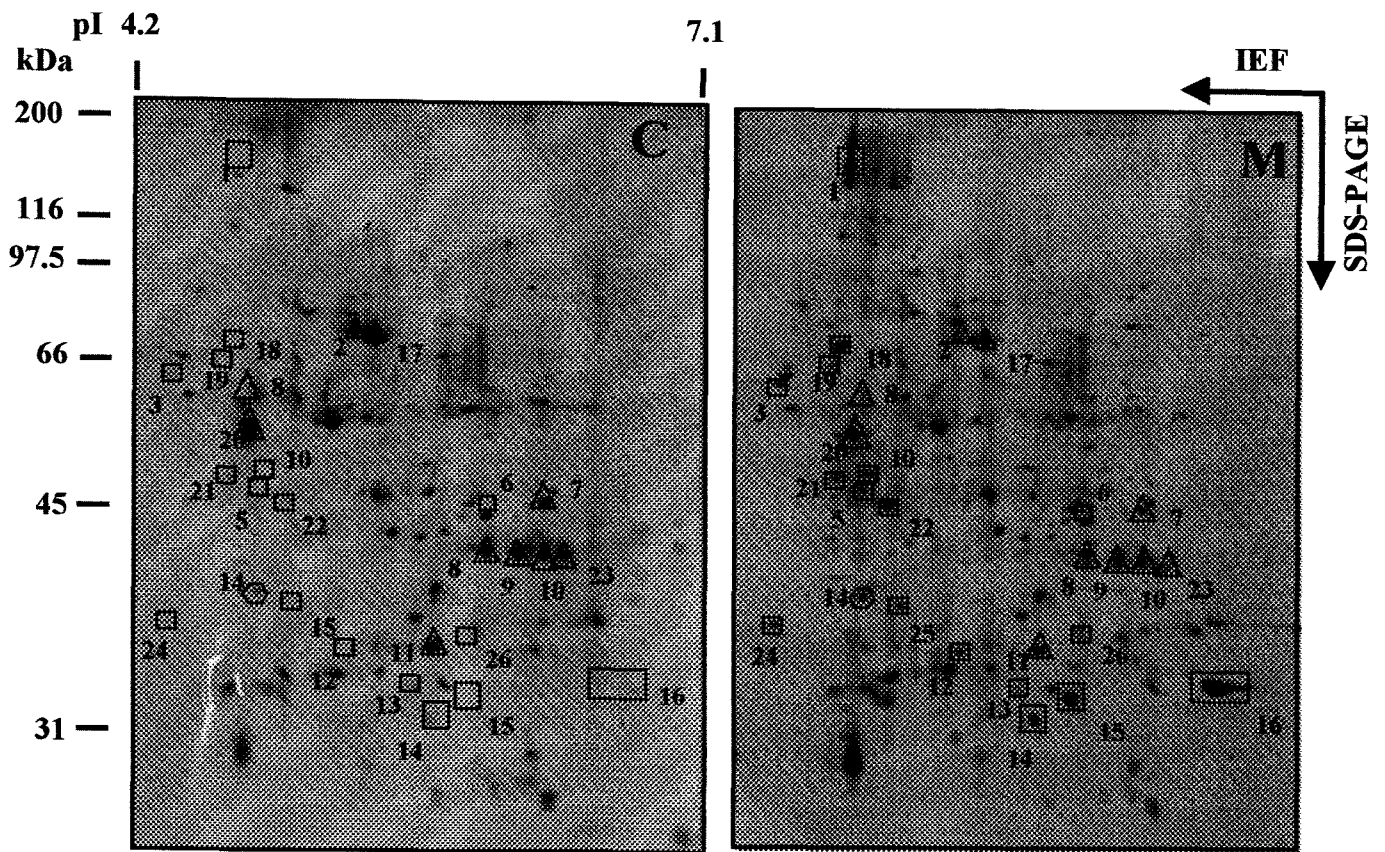


Figura 24. Perfil proteico correspondiente a la fracción de membrana plasmática de las plantas control (C) y plantas micorrizadas (M) 4 semanas después de la inoculación.

membrana. En la presente memoria decidimos analizar los cambios inducidos en la síntesis de proteínas a nivel de fracciones purificadas de membrana plasmática, debido a la gran importancia de estas membranas en el intercambio de nutrientes y señales entre ambos simbioses. En este caso se estudiaron los cambios inducidos por la formación de micorriza a las 4 y 6 semanas tras la inoculación, estadios en los que la simbiosis estaba totalmente establecida pero con diferentes niveles de colonización. En el primer tiempo las plantas presentaban un 40 % de raíz colonizada y la colonización era fundamentalmente intercelular y arbuscular. Sin embargo a las seis semanas el porcentaje de raíz colonizada era del 60 % y además de las hifas intercelulares y arbusculares existían algunas vesículas.

A nivel de fracción de membrana plasmática, se han podido separar mediante 2D-PAGE más de 200 y 150 polipeptidos a las 4 y 6 semanas después de la inoculación respectivamente, Los polipeptidos presentaban puntos isoeléctricos comprendidos entre 4.4 y 7.1 y pesos moleculares entre 29 y 150 kDa (Figs. 24 y 25).

Nº polipéptidos	PM	PI	Cambios observados
1	150	4.7	Nueva
2	71	5.3	Disminución
3	61	4.4	Nueva
4	50	4.8	Nueva
5	47	4.7	Nueva
6	45	6.0	Nueva
7	45	6.3	Disminución
8	43	6.0	Disminución
9	42	6.1	Disminución
10	42	6.3	Disminución
11	36	5.8	Disminución
12	36	5.4	Nueva
13	33	5.7	Nueva
14	32	5.8	Nueva
15	33	6.0	Nueva
16	34	6.7	Nueva

Tabla 46. Listado de los polipéptidos solubles diferencialmente expresados en las plantas micorrizadas a las 4 y 6 semanas después de la inoculación.

La comparación de los cambios inducidos por la formación de micorriza en los dos estadios analizados indicó que la expresión de algunos polipéptidos se modifica en ambos estadios (polipéptidos 1 al 16), mientras que la expresión de otros tan solo se modifica transitoriamente a las 4 semanas (polipéptidos 17 al 26) y otros a las seis semanas (polipéptidos 27 al 34). De los 16 polipéptidos cuya síntesis se modifica en ambos tiempos, 10 corresponden a polipéptidos nuevos que no están presentes en las raíces controles. De estos polipéptidos nuevos, la síntesis de los polipéptidos 4, 5, 12 y 13 aumentó al incrementar el nivel de colonización mientras que la del polipéptido 16 disminuyó.

De los 26 polipéptidos cuya síntesis se ve modificada en el primer tiempo de cosecha, 23 corresponden a polipéptidos nuevos, 9 a polipéptidos cuya síntesis disminuye en las raíces micorrizadas y tan solo la síntesis de uno incrementó en las raíces micorrizadas. En el segundo tiempo de cosecha, se observó que la síntesis de 22 polipéptidos se modificó en las raíces micorrizadas, de los cuales seis correspondían a polipéptidos nuevos no presentes en las raíces controles y el resto correspondía a polipéptidos cuya síntesis disminuía en las raíces micorrizadas (Figura 25).

Es interesante resaltar que, en este caso, los polipéptidos nuevos forman un grupo de proteínas acídicas con pesos moleculares comprendidos entre 50 y 38 kDa.

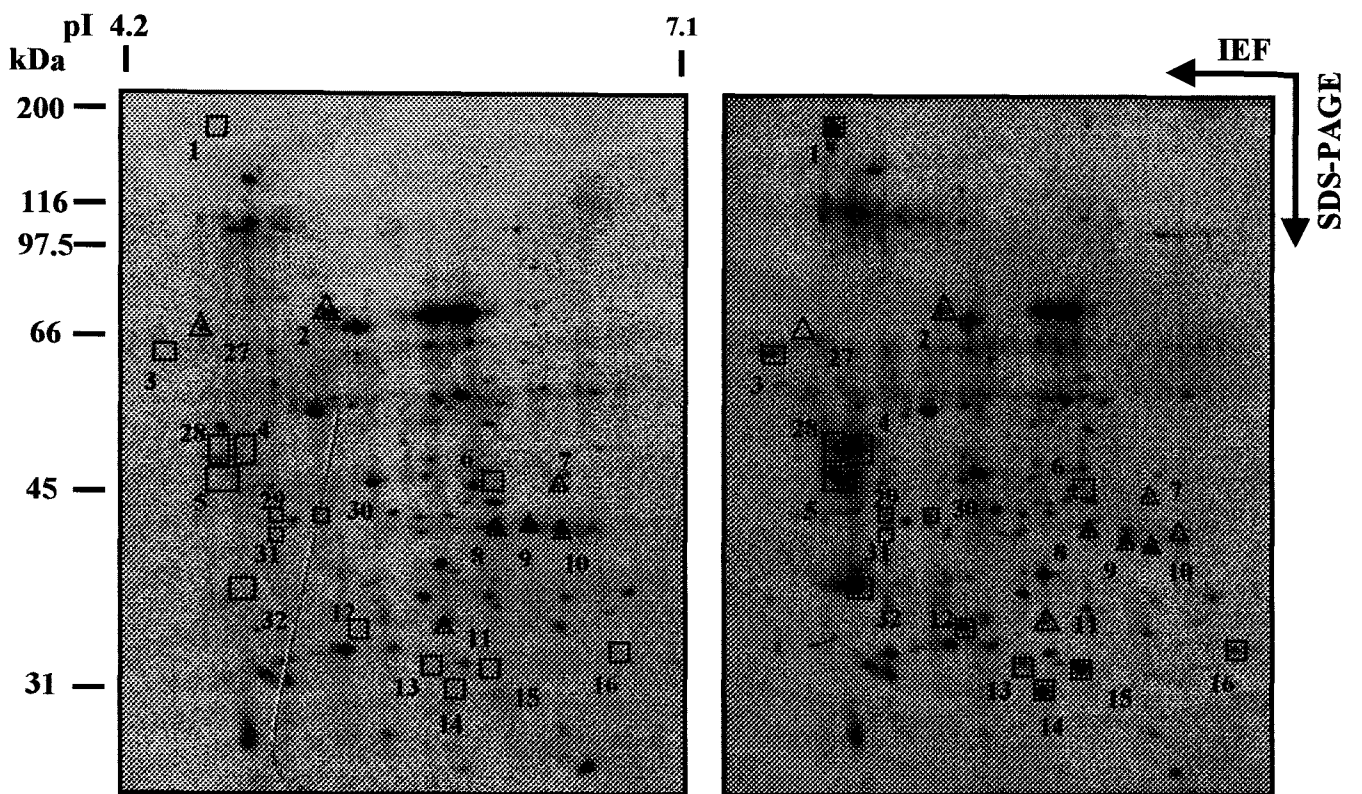


Figura 25. Perfil proteico correspondiente a la fracción de membrana plasmática de plantas control (C) y plantas micorrizadas (M) 6 semanas después de la inoculación .

Nº polipéptidos	PM	PI	Cambios observados
17	75	5.4	Disminución
18	72	4.6	Nueva
19	66	4.6	Nueva
20	54	4.7	Disminución
21	49	4.6	Incremento
22	47	4.8	Nueva
23	45	4.9	Disminución
24	41	6.4	Nueva
25	36	4.4	Nueva
26	38	4.9	Nueva
27	35	6.0	Disminución
28	67	4.5	Nueva
29	50	4.6	Nueva
30	46	4.7	Nueva
31	43	5.0	Nueva
32	43	5.2	Nueva

Tabla 46. Listado de los polipéptidos de membrana plasmática diferenciammente expresados en las planta micorrizadas 4 semanas (17-26) y seis semanas (27-32) después de la inoculación

5.5. Análisis del perfil proteico de las proteínas del extracto crudo y de membrana correspondiente al micelio externo de *Glomus mosseae*

Las proteínas nuevas detectadas en los extractos correspondientes a las raíces micorrizadas podrían ser proteínas específicas de la simbiosis (endomycorrizas), o bien proteínas fúngicas. Para tratar de discriminar entre ambas posibilidades, los patrones de proteínas obtenidos de las raíces micorrizadas se compararon con los obtenidos a partir de extractos de micelio externo del hongo MA *G. mosseae*. Sin embargo, antes de proceder a la obtención de los patrones de proteínas del micelio externo, se comprobó la viabilidad del mismo mediante tinción vital de la succinato deshidrogenas, observando que más del 80% del micelio utilizado para este estudio era metabólicamente activo.

La obtención de la fracción solubles y microsomaes del micelio se realizó siguiendo la metodología utilizada para el fraccionamiento de las proteínas de las raíces. Sin embargo, en este caso, partiendo de 1.5 gr de peso fresco de micelio se obtuvo

suficiente cantidad de proteína microsomal pero no de proteína soluble para ser analizadas por 2D-PAGE. Por tanto, a nivel de micelio tan sólo se obtuvieron los patrones de proteínas del extracto crudo y de la fracción microsomal.

A nivel del extracto crudo, se resolvieron aproximadamente 50 polipéptidos con puntos isoelectricos comprendidos entre 4.35 y 7.06 y pesos moleculares entre 31 y 200 kDa (Fig. 26a). Los polipéptidos mayoritarios están localizados en una zona del gel con pesos moleculares entre 45 y 85 kDa y puntos isoelectricos entre 4.87 y 4.63. La comparación de este gel con el correspondiente a las proteínas del extracto crudo de las raíces micorrizadas no nos permitió identificar ningún polipéptido fungico en el extracto de las raíces micorrizadas.

La figura 26b muestra el perfil proteico de la fracción microsomal aislada del micelio externo. En este caso, aproximadamente 100 polípeptidos con puntos isoelectricos comprendidos entre 4.35 y 7.06 y pesos moleculares entre 25 y 100 kDa se resolvieron mediante 2D-PAGE. En la fracción microsomal al igual que para el perfil proteico correspondiente al extracto crudo, los polipeptidos mayoritarios presenta un peso molecular entre 45 y 85 kDa y puntos isoelectricos entre 4.51 y 4.63. La gran similitud entre los patrones de proteínas obtenidos para el extracto crudo y la fracción microsomal, junto con el bajo rendimiento obtenido para las fracciones solubles, sugiere que a nivel del micelio de *G. mosseae* la mayoría de las proteínas corresponde a proteínas de membrana.

La comparación del patrón de proteínas del micelio con el de la fracción microsomal de las raíces micorrizadas mostró que el polipeptido nuevo 8 de la Figura 8 (pI 4.89, PM 49) podría ser un polipéptido fúngico (punto 1 con pI 4.72 y MW 48 kDa). Además, el polipéptido fúngico 2 con pI 4.91 y 43 kDa podría justificar el incremento en la intensidad del polipéptido 9 de la figura 8, el cual muestra un peso molecular de 42 kDa y pI de 4.92.

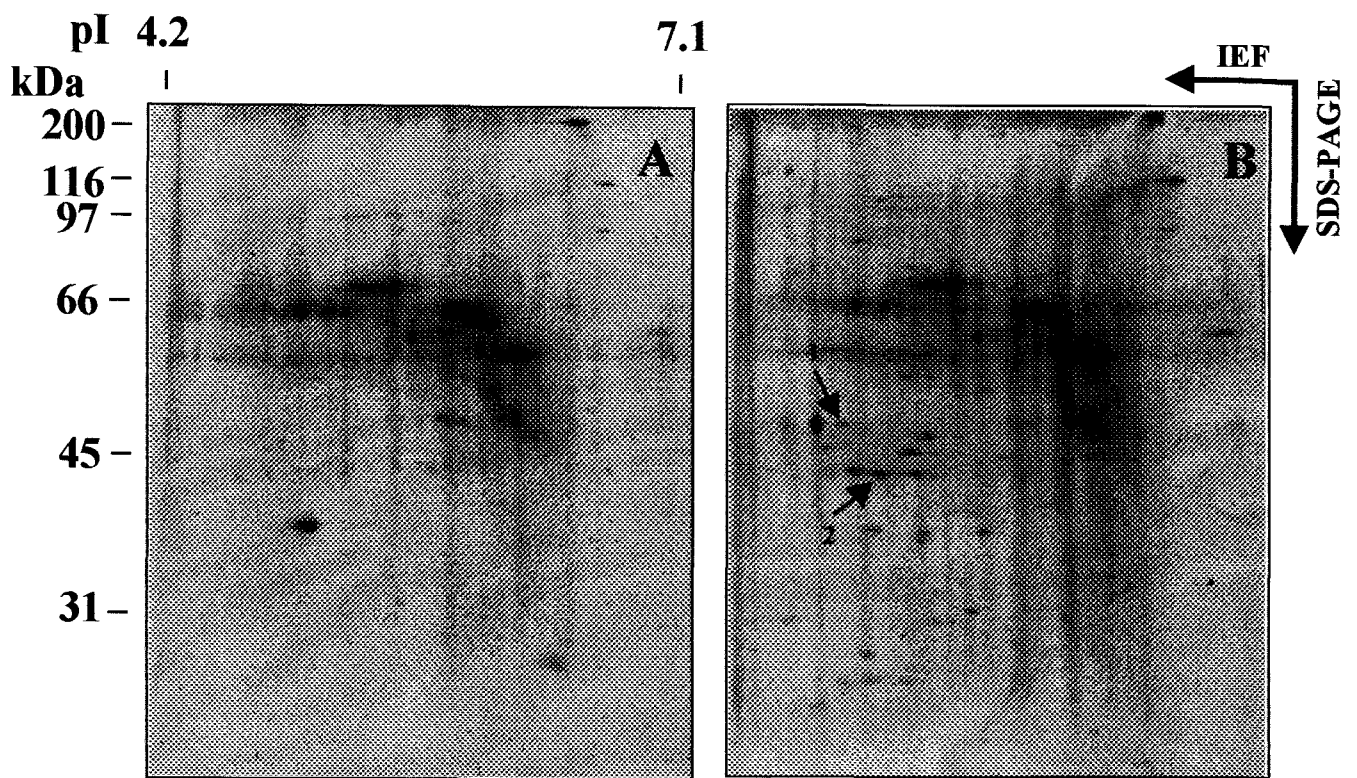


Figura 26. Perfil proteico correspondiente al extracto crudo (A) y microsomas (B) del micelio externo de *G. mosseae*.

5.6. Análisis de la secuencia N-terminal de los polipeptidos secuenciados

Con el objeto de asignar un papel biológico a alguno de los polipéptidos diferencialmente sintetizados en las raíces micorrizadas, se procedió a la obtención de la secuencia amino-terminal del polipéptido 2 de la fracción microsomal y de los polipéptidos 1, 10, 12, 13, 14 y 15 de la fracción de membrana plasmática.

Para el polipéptido microsomal se obtuvo una secuencia de 22 residuos, la cual presentó un 74 % de identidad con la secuencia amino terminal correspondiente a la subunidad catalítica de 69 kDa de la ATP sintasa vacuolar (EC 3.6.1.34) de varias plantas, Observándose la mayor homología (73.9%) con la V-ATPasa de remolacha y con la de la zanahoria (74 % identidad) (Tabla 28). Además, el peso molecular y punto isoelectrico de la proteína secuenciada condice con los de la V-ATPasa de otras plantas.

Polipéptido	PM	pI	Secuencia N-terminal
<i>membrana.plasmática</i>	150	4.74	MAEETKKQ
1	35	5.80	<i>Bloqueado</i>
6	32	5.70	<i>Bloqueado</i>
8	33	6.0	<i>Bloqueado</i>
9	33	6.7	<i>Bloqueado</i>
15			
<i>microsomas</i>	75	4.98	MPSIVGGPMTTFEDSEKSKVYGY
2			

Tabla 48 Secuencia N-terminal de los polipéptidos seleccionados.

Este resultado se confirmó mediante inmunorevelado de la proteína utilizando anticuerpos específicos a la subunidad catalítica de la V-ATPasa de remolacha (figura 13) De los polipéptidos secuenciados de membrana plasmática tan solo se obtuvo una secuencia de ocho residuos para el polipéptido 1, aunque la secuencia obtenida no presentó ninguna homología con ninguna proteína recogida en la base de datos.

5.6.1 Detección inmunológica de la V-ATPasa del plasmalema

La cuantificación de la cantidad de la V-ATPasa de la membrana plasmática de tomate en las raíces controles y micorrizadas se llevó a cabo mediante experimentos de Western blot utilizando anticuerpos desarrollados frente al dominio C-terminal de la V-ATPasa de *remolacha*. Tanto las raíces controles como de las micorrizadas reaccionaban con una proteína de 70 kDa, siendo la banda correspondiente a la membrana plasmática de las raíces micorrizadas, menor que las controles, lo que confirma el resultado del apartado anterior.

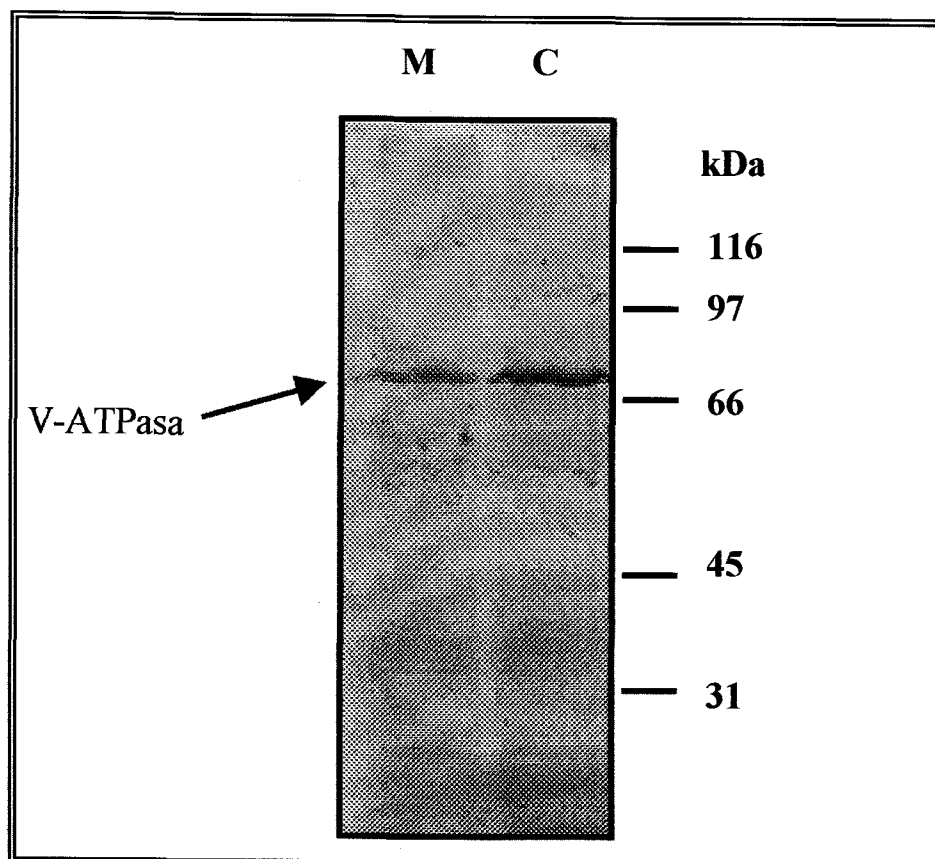


Figura 27. Análisis inmunológico de las proteínas de membrana plasmática correspondientes a las plantas control (C) e inoculadas con *G. mosseae* (G.m) frente a la V-ATPasa de la membrana plasmática de remolacha.

Discusión

volumen de algunos orgánulos como el tonoplasto, puesto que prácticamente la totalidad del volumen celular se ve invadido por las ramificaciones del arbusculo. Lo que podría justificar en cierta medida, la reducción del polipéptido 1 en el extracto microsomal, y la reducción de la banda inmunorevelada mediante anticuerpos específicos, además del polipéptido 1 reprimido en la fracción microsomal por la colonización micorrizica, hay que tener en cuenta que de los 23 polipéptidos diferencialmente expresados, 18 son nuevos o estimulados. Se conoce el papel importante que juegan las membranas en los fenómenos de transporte entre los dos simbioses (Smith y Smith, 1996), por lo que parece lógico esperar un incremento en la expresión de los genes que codifican para proteínas presentes en las membranas. Sin embargo tras la purificación de la membrana plasmática, se ha detectado mayoritariamente dos tipos de cambios, la síntesis de nuevas proteínas o la represión de proteínas constitutivas. Lo que hace pensar que la estimulación en la expresión génica observada en la fracción microsomal, correspondería a proteínas localizadas en las endomembranas, y mas concretamente en los organulos; aparato de golgi, y reticulo, puesto que hemos visto que proteínas correspondientes a la membrana vacuolar sufre una represión en su expresión. En este sentido estudios moleculares han puesto de manifiesto que genes que codifican proteínas transmembranarias como las H⁺-ATPasa, enzima mediante el cual se forma el gradiente electroquímico necesario para el transporte de nutrientes a través de la células (Murphy y Col., 1997), o genes que codifican para transportadores de azúcares (Harrison 1996) ven estimulada su expresión.

Aunque no se conoce el papel fisiológico que juegan algunos polipéptidos reprimidos por la colonización micorrizica, posiblemente serian transportadores de alta afinidad, puesto que se sabe que estos transportadores sufren una represión en

moseae. Este perfil proteico supone un resultado innovador puesto que hasta ahora no se había descrito el perfil proteico de las membranas de un hongo formador de micorriza.

La síntesis de endomicorrizas en la simbiosis MA indica la transcripción de nuevos ARNm durante la formación de las micorrizas, sugiriendo que nuevas proteínas son sintetizadas, o que aparecen fruto a modificaciones post-transduccionales. La primera posibilidad ya ha sido descrita previamente por la traducción *in vitro* de ARN total (wyss y col., 1990; Garcia-Garrido y col., 1994) o por el "diferencial display del ARN" (Martin Lauren y Col., 1996).

Todavía no se conoce el papel exacto de las proteínas constitutivas diferencialmente expresadas en las raíces micorrizadas. Se ha sugerido que los polipéptidos solubles de bajo peso molecular podrían formar parte de algún tipo de respuesta defensiva de la planta (Samra y col., 1997). Esto sería posible para las proteínas diferencialmente expresadas en la fracción soluble, puesto que la mayoría de las reacciones de defensa son citosólicas. Por lo que se refiere a las proteínas de membrana diferencialmente expresadas, para intentar asignar un papel fisiológico en la simbiosis MA, se ha procedido a la secuenciación del amino terminal de alguno de ellos, el resultado obtenido para uno de los polipéptidos, da una homología bastante significativa con la V-ATPasa de diversos organismos vegetales, por lo que el polipéptido secuenciado corresponde a la subunidad catalítica de la V-ATPasa, esto concuerda con los cambios importantes y drásticos que ocurren en una célula colonizada, se sabe que ocurren cambios espectaculares en la arquitectura de las células, invaginación de la membrana plasmática, fragmentación de la vacuola, aumento en el número de orgánulos (Bonfante-Fasolo y Perotto, 1992). Esta nueva reorganización de las células colonizadas implica una reducción drástica en el

micorrízica induce la aparición de dos polipéptidos nuevos, de un peso molecular de 24 y 39 kDa (Simoneau y col., 1994), sin embargo, en nuestro sistema, no hemos podido detectar estos dos polipéptidos, dadas las diferencias en los sistemas experimentales, puesto que el estudio realizado con las raíces transformadas correspondía a extractos crudos por lo que nos hace pensar que podría ser proteínas de pared, las cuales no fueron objeto del plan de trabajo previsto para esta memoria.

Las proteínas adicionales, que fueron detectadas en las raíces micorrizadas pueden ser endomicorrizinas (proteínas específicas de la simbiosis), o proteínas fúngicas. Hasta hoy en día, todos los trabajos, realizados con raíces micorrizadas fueron dificultados, por el hecho de que los hongos formadores de micorriza son simbioses obligados, por lo que presentan un crecimiento, en medio axénico muy limitado. A pesar de este inconveniente, se han diseñado diversas estrategias para poder identificar las proteínas relacionadas con la simbiosis, como el usado por Samra y col., (1997) quien, usando plantas de tomate transformadas (*myc*⁻) (incapaces de formar una simbiosis completa), o analizando el perfil polipeptídico de las esporas de los hongos MA. Considerando que el perfil polipeptídico extraído de esporas puede diferenciarse sustancialmente del micelio fúngico. En esta memoria, se ha intentado analizar mediante electroforesis bidimensional, el perfil proteico correspondiente a las proteínas fúngicas solubles y de membrana, y así poder compararlas con los perfiles obtenidos a partir de plantas micorrizadas, para poder identificar las endomicorrizinas. Sin embargo hay que tener en cuenta que esta aproximación no es la mas exacta puesto que las proteínas que se expresan en el micelio externo, no estarían necesariamente presentes en las estructuras internas del hongo. Fraccionando 1.5 g de micelio externo de *G. mosseae* hemos sido capaces de obtener con una alta reproducibilidad el patrón de las proteínas de membrana de *G.*

correspondiente a transcritos que son diferencialmente expresados durante la morfogénesis de las ectomicorrizas (Jage y col., 1993)

Sin embargo los estudios llevados a cabo a nivel de la expresión génica, tanto en endomicorrizas como en ectomicorrizas fueron realizados en extractos relativamente crudos lo que dificulta la localización de los cambios que se producen a nivel celular en las raíces micorrizadas, por ello, en esta memoria hemos intentado realizar la misma aproximación pero usando extractos ya purificados.

Mediante esta técnica, a nivel del extracto crudo, se ha podido identificar nueve proteínas diferencialmente expresados, sin embargo la separación de esta fracción en proteínas solubles y de membrana, nos ha permitido identificar mas de 44 polipéptidos diferencialmente expresados, entre ellos, 21 fueron soluble y el resto proteínas ligadas a algún tipo de membrana. Estos resultados indican, que durante el desarrollo de la simbiosis, se producen cambios en la expresión génica, y que estos cambios son tan pequeños, que se hace necesaria la purificación de fracción para poder apreciarlas, ya que el numero de polipéptidos en las fracción solubles y de membrana, es bastante mas importante que el obtenido en la fracción cruda. De los nueve polipéptidos diferencialmente expresados, cuatro son proteínas ligadas a membrana, y cuatro fueron citosólicas, sin embargo uno de los polieptidos presente en la fracción cruda no se ve reflejado en ninguna de las dos fracciones.

Tanto en la fracción soluble como la fracción microsomal, la simbiosis micorrízica induce tres tipos de cambios en la expresión génica del tomate, la estimulación o represión de polipéptidos constitutivos, o la aparición de proteínas nuevas. Estos datos confirman resultados ya descritos en tabaco (Dumas-Gaudot y col., 1994) o Guisante (Samra y col., 1997). Por otra parte, se ha descrito que en las raíces de tomate transformadas con el T-ADN del Plásmido Ri, la simbiosis

cuantitativos en la expresión génica. En este sentido, estudios electroforéticos de extractos crudos extraídos de raíces micorrizadas han mostrado que la plantas hospedadoras producen un gran número de proteínas nuevas, las cuales se llamaron endomicorrizas, en respuesta a la colonización por hongos simbióticos, pero su papel no ha sido determinado todavía (Dumas y col., 1990, Wyss y col., Shellunbum y col., 1992). Además, los análisis bidimensional (Tahiri-Alaoui 92) y la traducción *in vitro* del ARN total (García-Garrido y col., 1992) ha puesto de manifiesto que el establecimiento de la simbiosis no provoca solamente la aparición de proteínas nuevas, si no también esta a la base de algunos cambios cualitativos, y que la represión de la expresión de algunos genes implica la desaparición de algunas proteínas

En la presente memoria, se utilizó la técnica de electroforesis bidimensional para el estudio de la expresión génica, puesto que esta técnica ofrece una resolución y una reproducibilidad muy alta. Este análisis fue aplicado a los extractos crudos, solubles, microsomales, y de membrana plasmática, comparando los cambios obtenidos con el perfil proteico obtenido a partir de los extractos de micelio.

Los cambios en el perfil proteico en las raíces micorrizadas fueron descritos anteriormente usando la técnica 2D-PAGE. Estos estudio se realizaron en distintas especies vegetales (Dumas-Gaudot y col., 1994; Simoneau y col., 1994; Samra y col., 1997). Por otra parte, estudios similares llevados a cabo en asociaciones similares, como es el caso de la simbiosis puso de manifiesto alteraciones en la expresión génica durante la diferenciación de esta estructuras. En estas asociaciones simbióticas, Se pudieron caracterizar proteínas relacionadas con la simbiosis (SR) (Hilber y Martin, 1988; Duchesne, 1989; Hilber y col., 1991; Cutemberg y Hampp, 1992; Simoneau y col., 1993) y mas recientemente el aislamiento de ADN fúngico

Todavía no hay un consenso sobre si la transferencia de nutrientes desde el hongo a la planta y la transferencia de compuestos carbonados de la planta al hongo ocurre en el mismo sitio, o al contrario, están separados espacialmente en diferentes interfases. En este sentido, hongos del género *Glomus intraradices* crecidos en las raíces de cebolla (*Allium porrum*) Gianinazzi-Pearson y col., 1991 han usado métodos citoquímicos para poner de manifiesto actividad ATPásica, mayoritariamente atribuible a H⁺-ATPasas, en las membranas del hongo y de la planta alrededor de arbusculos jóvenes.

La formación de los nuevos compartimentos celulares, donde se produce al intenso intercambio de señales y nutrientes entre los dos simbioses, no es más que la manifestación fenotípica de los cambios que se producen en la expresión génica en las plantas micorrizadas, en respuesta a la percepción de señales por parte del hongo lo que da lugar al establecimiento de una simbiosis funcional. Todos estos procesos están regulados por procesos moleculares poco estudiados, y consecuentemente poco conocidos. Entender las bases genéticas de estos mecanismos en la simbiosis micorrízica requiere el estudio de los genes, y de sus productos, implicados en la simbiosis. Uno de los signos más evidentes de que las células colonizadas, es decir que contengan un arbusculo son metabólicamente más activas, fue aportado por Bonfante-Fasolo, 1984, quien estudiando la estructura de la cromatina nuclear mediante tinciones específicas, demostró que el núcleo aumenta de tamaño en las células que contienen arbusculos. Además Berta y col. (1994), demostraron que este incremento no era debido a cambios en la poliploididad del núcleo, si no a una decondensación de la cromatina. Esto sugiere que esta decondensación de la cromatina está en la base del incremento transcripcional que sufren las células colonizadas, y consecuentemente en la base de los cambios cualitativos y

resultado de los ensayos llevados a cabo en fracciones de membrana plasmática respecto a la actividad oxidoreductasa pone de manifiesto una mayor actividad oxido-reductasa en las membranas extraídas de raíces micorrizadas lo que podría confirmar la hipótesis de hiperpolarización que sufren las membranas correspondientes a las raíces micorrizadas.

La falta de datos experimentales demostrativos del funcionamiento de los sistemas redox a nivel de la membrana plasmática de tejidos de plantas superiores, hace difícil la discusión de los resultados obtenidos en relación al efecto de la micorriza sobre la actividad redox de la membrana plasmática. Tanto el bombeo de protones, como la actividad redox, significativamente estimuladas en las raíces micorrizadas podría estar a la base del mayor acumulo de nutrientes en las plantas micorrizadas. Este incremento en el bombeo de protones, y la consecuente mayor translocación de nutrientes, se ve reflejada en una estimulación del crecimiento, sin embargo esta estimulación no se ve reflejada en las plantas inoculadas con el hongo *G. intraradices*. Esta falta de estimulación del crecimiento ha sido ya descrita previamente por Peng, y col., 1993, quien mediante estudios llevados a cabo con plantas de limón, demostró que este hongo coloniza agresivamente las raíces de dichas plantas, produciendo un gran número de vesículas intraradicales que posteriormente son transformadas en esporas intraradicales. Esto sugiere un gran costo en lo que a compuestos carbonados se refiere, ya que se sabe que estas vesículas o esporas son órganos de reserva con un alto contenido lipídicos. Esto podría justificar el hecho de que en las plantas colonizadas con *G. mosseae* se pudo observar una estimulación del crecimiento, dado que este hongo produce un número insignificante de vesículas intraradicales en comparación con *G. intraradices*.

Dado que esta actividad bombeadora se realizó en fracciones microsomales, se hace imprescindible el uso de inhibidores de las ATPasa ligadas al tonoplasto y a la mitocondria, así en el caso de las del tonoplasto se uso el nitrato , en el caso de las mitocondriales, se uso azida, teniendo en cuenta que el nitrato, podría alterar de alguna manera el potencial de membrana, se adiciono valinomicina, ionoforo gracias al cual se iguala la concentración de aniones en ambos lados de la membrana, evitando así cualquier diferencia de potencial. En este sentido y para descartar cualquier efecto de este anion el potencial de membrana, y por consiguiente sobre la actividad bombeadora, se realizaron, los ensayos de bombeo de protones, llevados a cabo en las fracciones micrsomales, en fracciones puras de membrana plasmática. Usando estas vesículas puras de membrana plasmática, se obtuvo la misma activación del bombeo de protones que la obtenida en las vesículas microsomales, lo que confirma los resultados obtenidos en dichas fracciones de los resultados obtenidos primero en vesículas microsomales y luego en fracciones puras de membrana plasmática, se confirma así el hecho de que en las plantas micorrizadas las ATPasas de la membrana plasmática podría estar regulada por un incremento en la eficiencia de la proporción de H bombeados por ATP hidrolizado. Con esto queda establecido, que el transporte de sólutos y de iones a través de la interfase podría estar mediado por la actividad relacionada con la bomba de protones mediado a su vez por la hidrólisis de ATP. Sin embargo no hay que olvidar que hace aproximadamente dos décadas, se propuso una segunda y alternativa fuente de energía motriz, que son los sistemas redox, (Ivankina y Novak 1980), estos sistemas usando la energía libre proporcionada por la oxidación de nucleotidos de piridina reducidos, energizan la membrana proporcionando directa o indirectamente le fuerza motriz necesaria para la translocación de nutrientes. En la presente memoria, el

tamaño mucho mayor que las células controles, lo que demuestra que estas células micorrizadas son metabólicamente más activas en comparación con las células de las raíces control. (Berta y col., 1990)

En cuanto al efecto de la micorrización sobre el transporte de protones, los datos presentados en esta memoria ponen de manifiesto una significativa activación, en términos de actividad específica. Esta activación alcanza tanto en las plantas inoculadas con *G. mosseae* como con *G intraradices*, un incremento de 1.6 veces en la tasa de transporte de protones. Hay que resaltar que este incremento en el bombeo de protones no se ve acompañado por un incremento en la hidrólisis de ATP.

En este sentido, y para descartar la posibilidad de que este incremento en el transporte de H^+ se debe a cambios en las propiedades de las vesículas y no a las ATPasa en si, se ha estimado tanto la latencia de las dichas vesículas y la permeabilidad pasiva a los protones. Los resultados obtenidos al respecto no muestran ninguna diferencia de estos parámetros en las vesículas de membrana aisladas de las plantas micorrizadas en comparación con las plantas control.

No esta claro como la colonización MA estimula el bombeo de protones sin estimular la hidrólisis de ATP, ya que no hay practicamente referencias al respecto. Sin embargo, en otros organismos como las levaduras, se ha descrito recientemente, que suministrando glucosa a estas levaduras, provocaba un incremento en la proporción de protones bombeados por ATP hidrolizado (Venema y Palmgreen, 1995). Resultados similares referentes a cambios en la proporción H^+/ATP han sido descritos también en plantas mutantes de tabaco (Morsomme y col., 1996), por lo que se ha sugerido que este mecanismo seria muy importante en la regulación de la actividad bombeadora de protones.

lo que podría explicar la elevada cantidad de proteínas que se pudo observar en las raíces colonizadas tanto en las raíces colonizadas con *G. mosseae* como aquellas colonizadas con *G. intraradices*.

En lo que se refiere al efecto de la colonización MA sobre las actividades ATPásicas, se puede decir que el hecho de que no se haya podido observar ningún efecto sobre la actividad específica de las ATPasa de la membrana plasmática podría deberse al aumento de la cantidad de proteínas observado en las raíces micorrizadas, lo que implicaría una dilución a la hora de realizar los ensayos de actividad, así como los inmunológicos. De hecho esta actividad se ve estimulada cuando se expresan los datos referidos a esta actividad en base a peso fresco, estos datos concuerdan con aquellos observados por MacArthur y col., 1993; Bago y col., 1997, en plantas de patata y de cebolla respectivamente. Esto hace pensar que la colonización MA estimula la síntesis de la ATPasa mediante la síntesis *en novo* de esta enzima, la cual podría incrustarse en las membranas nuevamente sintetizadas, y no mediante la estimulación o activación de las ATPasas, ya existentes, ya que no se pudo observar ninguna diferencia en la actividad específica.

Al igual que las ATPasa ligadas a la membrana plasmática, las ATPasas mitocondriales presentaron una alta actividad en comparación con las raíces controles, cuando se expresa en base a peso fresco. Estas observaciones corroboran aquellas hechas en plantas de cebolla (Bago., y col., 1997). Esto podría justificarse por el hecho de que en las raíces micorrizadas hay un mayor número de orgánulos (Scannerini y Bonfante. 1983), así como una mayor tasa respiratoria (MacArthur y col, 1993), lo que demuestra que las raíces colonizadas son metabólicamente más activas en comparación con las controles. Además se sabe que el núcleo de las células pertenecientes a plantas colonizadas por los hongos MA, presentan un

pasivos. La transferencia o intercambio de nutrientes podría ocurrir en cualquiera de las estructuras intraradicales adoptadas por los hongos: hifas intraradical coils y arbusculo intracelulares, sin embargo se asume que el arbusculo es el principal sitio de transferencia de P (Cox y Tinker, 1976; Smith Read, 1997). Se han propuesto numerosas teorías para explicar los posibles mecanismos de transferencia de nutrientes entre las plantas y los hongos de la micorriza (Ashoford y col., 1989; Clarson, 1985; Smith y Smith 1990 y 1995). Con el propósito de estudiar los posibles mecanismos que podrían intervenir en la transferencia de nutrientes entre los dos simbioses, se planteo en esta memoria realizar estudios a nivel de microsomas extraídos de raíces de tomate micorrizadas y raíces controles. Las vesículas de membrana aisladas de raíces micorrizadas presentan un mayor contenido de proteínas en comparación con las raíces controles. Esto puede ser debido a un aumento en la proteínas de membrana de las raíces micorrizadas o a la presencia de las proteínas del microsimbionte, este incremento en el contenido de proteínas ocurre tanto en las plantas inoculadas con *G. mosseae*, como aquellas inoculadas con *G. intraradices*. Esto resultados concuerdan con las observaciones realizadas en plantas de cebolla (MaArthures, 1993; Bago y col; 1997). Muchos autores han puesto de manifiesto cambios en el perfil de proteínas como consecuencia de la colonización con hongos MA, (García Garrido y col., 1993; Dumas-Gaudot y col., 1994). Estas observaciones serán discutidas con mayor profundidad mas adelante, sin embargo poco se sabe sobre los cambios cualitativos inducidos en las proteínas de membrana como resultado de la colonización por los hongos MA. El hecho de que la membrana plasmática de la célula colonizada por los hongos MA, este englobando en todo momento la estructura fúngica aumentando su superficie varias veces (Dexheiner y col., 1970) hace pensar que este aumento en la superficie de la membrana podría provocar un aumento en la síntesis de proteínas de dichas membranas,

absorción En este sentido se han descrito dos sistemas de absorción de fósforo en las plantas y en los hongos incluidos los hongos MA, (Thomson y col., 1990). El primer sistema de alta afinidad (K_m , 100-100 μ M). y con una limitada capacidad para la absorción del fósforo, y el segundo con una alta capacidad pero de baja afinidad (K_m , 1-10 mM). El primero de ellos ha sido descrito recientemente en las hifas externas de *G. versiforme* (Harrison y VanBuuren, 1995), el cual podría estar implicado en la adquisición del P en las condiciones limitantes del mismo, como en el caso del tratamiento Po. Además del incremento en la cantidad de fósforo adquirido por las plantas micorrizadas, estas últimas hacen un mejor uso del fósforo utilizado, en este sentido Bowen (1973) sugiere que, aunque el incremento en la absorción de nutrientes podría ser la respuesta nutricional más importante en las asociaciones MA, no es la única, ya que podría ser que las plantas micorrizadas hacen un uso más eficaz, de este nutriente. La única evidencia al respecto la puso de manifiesto Lambert y col (1979), quien demostró que plantas de maíz, tienen un peso seco mayor cuando están en simbiosis con hongos MA, a cualquier concentración interna de fósforo, en comparación con plantas control.

En todo caso, tanto si es por una mejor, o una mayor absorción del fósforo por las plantas micorrizadas, la transferencia de este macronutriente hacia la planta es un factor crítico, en este sentido, Woolhouse (1975), haciendo un estudio exhaustivo de transferencia de nutrientes, concluye que la transferencia de fosfatos inorgánicos entre los hongos MA hasta la planta hospedadora se puede resumir en tres etapas esenciales; transporte activo por el hongo fuera de la raíz, un transporte pasivo a nivel de la interfase; y por último una absorción activa hacia la raíz. En este sentido Smith y Gianinazzi-Pearson (1996), proponen que el transporte de fósforo, desde la solución del suelo, hacia la interfase hongo-Planta implica fenómenos de transporte activos como

1983). El hecho de que el crecimiento de las plantas de tomate esté limitado por la deficiencia de fósforo, podría explicarse por el hecho de que este nutriente tenga una estrecha relación con fenómenos de respiración y procesos asociados con el crecimiento. En este sentido MacArthur y Knowles (1993) han demostrado que la reducción en la disponibilidad de fósforo en las plantas de patata limita la respiración de la planta, así mismo limita actividades enzimáticas como la nitrato reductasa, y el crecimiento de las mismas. Esta observación hace pensar que en el tratamiento Po, la micorriza proporciona un aporte adicional de fósforo, aporte que estimularía la respiración de la planta, lo que daría lugar a la estimulación de la producción de biomasa.

El incremento del crecimiento de las plantas por la asociación MA, es debido en gran medida a un incremento en la absorción de nutrientes desde el suelo. En este sentido se ha descrito que la absorción de nutrientes especialmente el fósforo, por las raíces micorrizadas es mucho mayor, y más rápida, que en las no micorrizadas (Sander y Tinker 1973, Son y Smith, 1988). El incremento en la absorción de este macronutriente es atribuible a muchos factores; un aumento físico del zona explorada del suelo como consecuencia de la formación del micelio externo del hongo, las hifas presentan una mayor afinidad por el fosfato, y la micorriza pueden utilizar fuentes de P que no pueden utilizar las raíces (Tinker, 1987). Sin embargo en la presente memoria, salvo el tratamiento Po, donde hay un incremento de la biomasa de la parte radical, los otros tratamientos no hay un incremento significativo de la biomasa del sistema radical, lo que sugiere que más que una mejora cuantitativa en la exploración del suelo, podría ser debido a un mejor aprovechamiento de los nutrientes del suelo. En este sentido, Cree y col. (1979), sugieren, que el aumento la capacidad de absorción de nutrientes por las raíces micorrizadas no se debe exclusivamente a un incremento en el volumen de suelo explorado por las hifas sino que también puede deberse a un aumento en la afinidad de

Las raíces de la mayoría de las plantas forman asociaciones simbióticas con hongos formadores de micorriza, aceptándose actualmente que las micorrizas son los órganos naturales de absorción de nutrientes y agua (Barea y Jeffrie, 1995). En esta asociación, el microsimbionte juega un papel importante en la captación de nutrientes minerales que presentan sobre todo, en condiciones limitantes baja movilidad en el suelo como el P, NH₄, K, Cu y Zn. (Smith y Read, 1997). La absorción de fósforo (P) por las raíces de la micorrizas ha recibido mayor atención (Cox y Tinker, 1976, Smith y col., 1994), puesto que este macronutriente presenta una clara influencia sobre el crecimiento de las plantas. Esta observación del efecto de P sobre el crecimiento se refleja claramente en nuestro caso, ya que en los ensayos de dependencia llevados a cabo, la deficiencia de fósforo en las plantas controles crecidas en condiciones limitantes en este macronutriente, provoca una reducción importante en el crecimiento y por consiguiente una reducción importante en la biomasa de las plantas. Esta reducción es fiel indicador del estere nutritional que padecen estas plantas. En estos mismos ensayos pudimos observar que a niveles bajos de fertilización de P, el tomate presentó un porcentaje de colonización muy importante, en comparación con los obtenidos a niveles más altos de fertilización, lo que hace pensar que la micorización es muy beneficiosa para la planta, ya que la alta tasa de micorrización que presentan las plantas del tratamiento Po se acompaña por una estimulación del crecimiento, y de la acumulación de biomasa, como bien reflejan los datos de peso seco. Sin embargo, A medida que se incrementa la fertilización, la micorrización se reduce, y los beneficios producidos por la asociación se hacen menos importantes. Estos resultados sugieren que el tomate es a una planta que obtiene provecho de la asociación simbiótica, aún sin depender absolutamente de ella, lo que demuestra que la variedad de tomate utilizada es una micótrofa facultativa (Hayman,

respuesta a la presencia en altas cantidades del nutriente que transportan (Clarson y Hawkesford, 1993). Puesto que los hongos micorrízicos proporcionan algunos nutrientes a la planta cabe esperar una reducción en la expresión de los genes que codifican para estas proteínas, en este sentido Liu y col., (1998) han demostrado que dos transportadores de alta afinidad ven reducida su expresión en plantas de *Medicago* micorrizadas.

Los resultados obtenidos mediante la combinación de las dos técnicas, de partición de fases y la 2D-PAGE, muestran claramente que la simbiosis micorrízica, induce cambios en la expresión génica de las proteínas en raíces micorrizadas.

Conclusiones

Conclusiones.

1- El tomate (*Lycopersicon esculentum*) es una planta micotrofa facultativa. En condiciones de baja fertilidad es muy dependiente de las micorrizas para superar las limitaciones nutritivas y alcanzar un desarrollo optimizado. En condiciones más favorables de crecimiento, la planta limita notablemente el establecimiento de la simbiosis, pero la mantiene y rentabiliza en base a los efectos secundarios que promueve.

2- Entre los mecanismos que pueden facilitar la incrementada captación de nutrientes procedentes del hongo por parte de las células de la raíz se encuentra la regulación de enzimas clave en los procesos de transporte iónico, como son las H^+ -ATPasas de la membrana plasmática. Las micorrizas inducen una mejora en la eficiencia de acoplamiento entre la hidrólisis de ATP y el transporte de H^+ .

3- Igualmente, los sistemas redox de la membrana plasmática pueden estar implicados en los procesos de energización de membrana necesarios para que se produzca el intercambio de nutrientes entre ambos simbioses. La formación de micorrizas incrementó la actividad NADH-ferricianuro óxido-reductasa, y por tanto, el transporte de electrones a nivel de la membrana plasmática.

4- El establecimiento de la simbiosis MA provoca un incremento en el contenido en lípidos de las raíces de tomate, fundamentalmente del contenido en fosfolípidos, lo que confirma un incremento en la cantidad de membranas.

5- Las membranas aisladas de las raíces micorrizadas presentaron una disminución en la relación fosfolípido/proteína, fosfatidilcolina/fosfatidiletanolamina y en el grado de insaturación de los ácidos grasos de dichas moléculas fosfolípidicas, lo que podría provocar una disminución de la fluidez de la bicapa lipídica.

7- La colonización micorrícica provoca cambios en la síntesis de proteínas solubles y de membrana en las raíces de tomate. A nivel de las proteínas solubles y de endomembranas la formación de la simbiosis indujo la síntesis de proteínas nuevas o endomicorrícicas así como cambios en los niveles de ciertas proteínas constitutivas.

7- A nivel de las proteínas de membrana plasmática la formación de micorrizas provocó fundamentalmente la síntesis de nuevas proteínas y disminución en los niveles de ciertas proteínas constitutivas. Estos cambios eran dependientes del estado fisiológico de la simbiosis.

8- La secuencia amino terminal de una proteína de membrana plasmática, cuya síntesis disminuye en las raíces micorrizadas, mostró una alta homología con la secuencia correspondiente a subunidad catalítica de 70kDa de la H^+ -ATPasa del tonoplasto de varias plantas.

Bibliografía

- Smith, S. E., Gianinazzi-Pearson, V. 1990** Phosphate uptake and arbuscular activity in mycorrhizal *Allium cepa* L. Effects of photon irradiance and phosphate nutrition *Aust. J. Plant Physiol.* 17(2): 177-188
- Smith, S. E., Smith, F. A. 1990** Structure and function of the interfaces in biotrophic symbioses as they relate to nutrient transport *New Phytol* 114: 1-38
- Spanswick RM 1981** Electrogenic ion pumps. *Annu Rev Plant Physiol* 32:267-289.
- Sussman RM 1994** Molecular analysis of proteins in the plant plasma membrane. *Annu Rev Plant Physiol. Plan. Mol. Biol* 45 : 211-234.
- Suzuki Y y Kyuwa K, 1972** Activation and inactivation of alcohol dehydrogenase in germinating pea cotyledons. *Plant Physiol.* 27:121-125.
- Sweatt, M. R., Davies, F. T. 1984** Mycorrhizae, water relations, growth, and nutrient uptake of geranium grown under moderately high phosphorus regimes. *J. Am. S. Hort.* 109(2): 210-213
- Sze H 1985** H⁺-Translocating ATPase: Advances using membranes vesicles. *Ann Rev Plant Physiol* 36: 181-187.
- Sze H, Ward JM Lai S, Perera I 1992** Vacuolar-type H⁺-translocating ATPase in plant endomembrane: Subunit organization and multigene families. *J exp. Biol.* 172:123-135.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon JC 1979** Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocelulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 76:4350-4354.
- Vorbeck ML y Martinetti GV 1965.** Separation of glycosyl diglycerides from phosphatides using silicic acid column chromatography. *J. Lipid Res.* 6:3-6
- Wang Y, Leigh RA, Kaestner KH, Sze H 1986** Electrogenic H-pumping pyrophosphate in tonoplast vesicles of oat roots. *Plant Physiol* 81:497-502.

- effects of host (myc(+)) and non-host (myc(-)) - *Pisum sativum* root exudates *Agronomie* 16: 709-719
- Sanchez-Díaz, M., Pardo, M., Antolín, M., Peña, J. y Aguirreolea, J. 1990** Effect of water stress on photosynthetic activity in the *Medicago-Rhizobium-Glomus* symbiosis. *Plant Science* 71(2): 215-221
- Sandalius AS, Barr R, Crane FL, Morre DJ. 1986** Redox reactions of plasma membranes isolated from soybean hypocotyls by phase partition *Plant Sci.*, 48:1-10.
- Serrano R 1985** plasma Membrane ATPase of Plants and Fungi. 174 pp. CRC Press Boca raton.
- Serrano R 1988** Structure and function of proton translocating ATPase in plasma membrane of plants and fungi. *Biochim. Biophys Acta* 947:1-28.
- Serrano R 1989** Structure and function of plasma membrane ATPase: *Annu Rev. Plant. Physiol. Plant Mol Biol.* 40:61-94.
- Serrano R 1990** Plasma membrane ATPase. In the Plant plasma membrane. Larsson C, Moller IM (eds). Pp. 127-153. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg.
- Singer SJ, Nicholson GL, 1972** The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 175:720-731.
- Smith, F.A.; Smith, S.E. 1997** Structural diversity in (vesicular)-arbuscular mucorhizal symbioses *New Phytol.* 137: 3
- Smith, S. E., Gianinazzi-Pearson, V. 1990** Phosphate uptake and arbuscular activity in mycorrhizal *Allium cepa* L. Effects of photon irradiance and phosphate nutrition *Aust. J. Plant Physiol.* 17(2): 177-188
- Smith, S. E., Smith, F. A. 1990** Structure and function of the interfaces in biotrophic symbioses as they relate to nutrient transport *New Phytol* 114: 1-38
- Spanswick RM 1981** Elecetrogenic ion pumps. *Annu Rev Plant Physiol* 32:267-289.

- Perez C, Michelet B, Ferrant V, Bogaerts P, Boutry M 1992** Differential expression within a three gene subfamily encoding a plasma membrane H⁺-ATPase in *Nicotiana plumbaginifolia*. J Biol Chem 267:1204-1211.
- Philips JM y Hayman DS 1970** Improved procedures for clearing root and staining parasitic and vesicular-arbuscular fungi for rapid assessment of infection. Tran.Br. Mycol. Soc. 55:158-161.
- Pool RJ, Briskin DP, Kratsky Z, Johnson RM 1984** Density gradient localisation of plasma membrane and tonoplast from storage tissue of growing and dormant red beet. Characterisation of proton transport and ATPase in tonoplast vesicles. Plant Physiol 74:549-556.
- Poole RJ. (1987)** Energy coupling for membrane transport. Annu Rev Plant Physiol 29:437-460.
- Ramagli LS y Rodríguez LV. 1985** Quantification of microgram amounts of protein in two-dimensional polyacrilamide gel electrophoresis sample buffer. Electroforesis 6:559-563
- Rea PA, Poole RJ, 1986** Chromatographic resolution of H⁺-translocating pyrophosphatase from H⁺-translocating ATPase of higher plant tonoplast. Plant Physiol. 81: 131-141
- Rea PA, Sander D 1987** Tonoplast energization: Two H⁺ pumps , one membrane Physiol Plant 71:131-141.
- Roussel, H.; Bruns, S.; Gianinazzi-Pearson, V.; Hahlbrock, K.; Franken, P. 1997** Induction of a membrane intrinsic protein-encoding mRNA in arbuscular mycorrhiza and elicitor-stimulated cell suspension cultures of parsley Plant Science 126: 203-210
- Rubinstein B, Luster DG 1993** plasma membrane redox-activity: components and role in plant processes. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 44: 131-155.

- Morton, J. B., Yarger, J. W., Wright, SF** 1990 Soil solution P concentrations necessary for nodulation and nitrogen fixation in mycorrhizal and non mycorrhizal red clover (*Trifolium pratense* L.). *Soil. Biol. B.* 22(1): 127-129
- MR Lambais, Mehdy MC.** 1995 Differential expression of defense-related genes in arbuscular mycorrhiza *Canadian Journal of Botany - Revue Canadienne de Botanique* 73: Suppl. 1 (1995)S533-S540
- Murphy, P.J.; Langridge, P.; Smith, SE.** 1997 Cloning plant genes differentially expressed during colonization of roots of *Hordeum vulgare* by the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* *New Phytol.* 135: 2 (FEB 1997)291-301
- O'Neill SD, Bennett AB, Spanswick RM.** 1983 Characterisation of Nitrate sensitive H⁺-ATPase from corn roots. *Plant Physiol.* 72:837-846.
- Pacovsky, RS.** 1989 Carbohydrate, protein and amino-acid status of *Glycine-Glomus-Bradyrhizobium* symbioses. *Physl Plant* 75(3): 346-354
- Pacovsky, RS.** 1989 Metabolic differences in *Zea-Glomus-Azospirillum* symbioses *Soil. Biol. B.* 21(7): 953-960
- Palmgren MG, christensen G.** 1993 Complementation in situ of the yeast plasma membrane H-ATPase gen pma1 by a H-ATPase gene from a heterologus species *FEBS Letters* 31, 216-222.
- Palmgren MG, Sommarin M, Serrano R, Larson C** 1991 Identification of an autoinhibitory domain in the C-terminal region of the plant plasma membrane H⁺-ATPase. *J Biol Chem* 266:20470-20475
- Perez C, Michelet B, Ferrant V, Bogaerts P, Boutry M** 1992 Differential expression within a three gene subfamily encoding a plasma membrane H⁺-ATPase in *Nicotiana plumbaginifolia*. *J Biol Chem* 267:1204-1211.

- Johansson F, Sommarin M, Larsson C. 1993** Fusicoccin activates the plasma membrane H-ATPase by a mechanism involving the C-terminal inhibitory domain. *Plant Cell* 5:321-327.
- Kuiper PJC. 1984** Functioning of plant cell membrane under saline condition: Membrane lipid composition and ATPase. In *salinity Tolerances in plants. Strategies for Crop Improvement*. Staples RC, Toennissen GH (eds). Pp 77-92. Wiley Interscience, New York.
- Laemmli UK. 1970** Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 222:680-685
- Lambais, M. R., Cardoso, BN1 990** Response of *Stylosanthes guianensis* to endomycorrhizal fungi inoculation as affected by lime and phosphorus applications .1. *Plant growth and development. Plant Soil*129(2): 283-289.
- Lin W 1982** Isolation of NADH oxidation system from plasmalemma of corn root protoplast. *Plan Physiol.*, 70:326-328.
- Lüttge U y Higinbotham N, 1979** *Transport in plants*. Springer-Verlag. Berlin.
- Lynch y Steponnkus PL. 1987.** Plasma membrane lipid alterations following cold acclimation: possible relevance to freeze tolerance. En *The Metabolism, Structure and Function of plant Lipids*. Stumpf PK, Mudd JB eds. Plenum Press, New York, 213-127
- Marre E. 1979** Integration of solute transport in cereal. En recent *Advances in the Biochemistry of cereal*. Eda Laidamn Dly Wyn Jones RG Academic Press, New York, pp 3-25.
- Marre E, Ballarin-Denti A. 1985** The proton pumps of plasmalemma and the tonoplast of higher plants. *J Bionerg Biomembr* 17: 1-21.
- Morian L, Bogaerts O, Jouniaux JL, Boutry M. 1993** Identification and characterization of a second plasma membrane H⁺-ATPase gene subfamily in *Nicotiana plumbaginifolia*. *Plant Mol Bio* 21:995-963.

- Harrison MJ, van Buuren ML. 1995** A phosphate transporter from the mycorrhizal fungus *Glomus versiforme*. *Nature* 378: 626-629
- 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*. *Molecular Plant - Microbe interactions* 6: 643-654
- Harrison, MJ.; Burleigh, SH.; Liu, H.; van Buuren, ML. 1996** Vesicular-arbuscular mycorrhizae: Molecular approaches to investigate phosphate nutrition in the symbiosis. *Biology of Plant - Microbe Interactions* 515-520
- Harrison, MJ. 1997** The arbuscular mycorrhizal symbiosis: An underground Assoc. *Trends in Plant Science* 2: 54-60
- Harrison, MJ. 1998** Development of the arbuscular mycorrhizal symbiosis *Current Opinion in Plant Biology* 1: 360-365
- Hodges TK, Leonard RT 1974** Purification of a plasma membrane adenosine phosphatase from plant roots. *Methods Enzymol* 32:392-406.
- Hodges TK., Leonard RT., Baker CE y Keenan TW. 1972** Purification of an ion-stimulated ATPase from plants roots: association with plasma membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 69:3307-3311.
- Hodges y Leonard, 1974** Purification of a plasma membrane bound ATPase from plants roots. *Meth. Enzymol.* 32:392-406.
- Hurkman WJ y Tanaka CK. 1986** Solubilization of plant membrane proteins for analysis of two-dimensional gel electrophoresis. *Plant physiol.* 81: 802-806.
- Ivankina NG Novak VA 1980.** H⁺-transport across plasmalemma. H⁺-ATPase or Redox-chain? *En :Current conceptual issues*, Eds.: Spanswick RM Lucas, WJ y Dainty J pp 503-504.
- Johansson F, Sommarin M, Larsson C. 1993** Fusicoccin activates the plasma membrane H-ATPase by a mechanism involving the C-terminal inhibitory domain. *Plant Cell* 5:321-327.

- Gildon, A. 1983** The relationship of vesicular arbuscular mycorrhizal infection and copper nutrition. *J. Sci. Food* 34(1): 56-57
- Giovannetti M., Mosse B. 1980** An evaluation of techniques for measuring vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytol.*, 84: 489-500
- Giovannetti, L. Tosi, L., Della Torre, G., Zizzerini, A. 1991** Histological, physiological and biochemical interactions between vesicular arbuscular mycorrhizae and *Thielaviopsis basicola* in tobacco plants. *J. Phytopathology* 131(4): 265-274
- Giovannetti, M., Avio, L., Salutini, L. 1991** Morphological, cytochemical, and ontogenetic characteristics of a new species of vesicular arbuscular mycorrhizal fungus *Can. J. Bot.* 69(1): 161-167.
- Gogstad GO y Krutnes MG. 1982** Measurement of protein in cell suspension using the comassie brilliant blue dye binding assay. *Anal. Biochem.* 126: 355-359.
- Hager A, Debus G, Edel HG, Stransky H, Serrano R. 1991** Auxin-induced exocytosis and the rapid synthesis of high-turnover pool of plasma-membrane H-ATPase. *Planta* 185: 527-537.
- Harper JF, Manney L, Dewitt ND, Joo MH, Sussman MR. 1990** The *Arabidopsis thaliana* plasma membrane H-ATPase multigen family. Genomic sequence and expression of a third isoform. *J Biol. Chem* 265: 13601-13608.
- Harper JF., Surowy TK., Sussman MR. 1989** Molecular cloning and sequence of cDNA encoding the plasma membrane proton pump (H-ATPase) of *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86:1234-1238
- Harrison MJ. 1996** A sugar transporter from *Medicago truncatula*: Altered expression pattern in roots during vesicular-arbuscular (VA) mycorrhizal associations *Plant Journal* 9: 4 (APR 1996)491-503

- Fries LLM, Pacovsky RS., Safir GR. 1996** Expression of isoenzymes altered by both *Glomus* intraradices colonization and formononetin application in corn (*Zea mays* L) roots *Soil Biol. & Bioch.* 28: 981-988
- Galtier N, Belver A, Gibrat R Grouzizis JP, Rigaud J y Grigon C. 1988.** Preparation of corn root plasmalemma with low Mg-ATPase latency and high electrogenic H-pumping activity after partitioning. *Plant Physiol.* 87: 491-497.
- Garcia-Garrido, J. M.,Toro, N., Ocampo, J. A. 1993** Presence of specific polypeptides in onion roots colonized by *Glomus mosseae*.*Mycorrhiza* 2: 175-177
- Gerdman JW y Nicolson JH. 1963** Spore of mycorrhizal *Endogone* species extracted from soil by wet-seiving and decanting. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 46:235-244.
- Gianinazzi-Pearson V. 1996** Plant cell responses to arbuscular mycorrhizal fungi: Getting to the roots of the symbiosis *Plant Cell* 8: 1871-1883
- Gianinazzi-Pearson V, Dumas-Gaudot E, Gollotte A, Tahiri-Alaoui A, Gianinazzi S. 1996** Cellular and molecular defence-related root responses to invasion by arbuscular mycorrhizal fungi *New Phytol.* 133: 45-57
- Gianinazzi-Pearson, V.Smith, S. E., Gianinazzi, S., Smith, F. A.1991** Enzymatic studies on the metabolism of vesicular arbuscular mycorrhizas . V. Is H⁺- ATPase a component of ATP hydrolysing enzyme activities in plant fungus interfaces? *New Phytol.*117(1): 61-74
- Gildon, A.,Tinker, P. B.,1983** Interactions of vesicular arbuscular mycorrhizal infection and heavy metals in plants. I. the effects of heavy-metals on the development of vesicular arbuscular mycorrhizas *New Phytol.* 95(2): 247-261
- Gildon, A.,Tinker, P. B. 1983** Interactions of vesicular arbuscular mycorrhizal infection and heavy metals in plants. II. The effects of infection on uptake of copper *New Phytol.*95(2): 263-268

- Dassi B, E Dumas-Gaudot, A Asselin, C Richard, Gianinazzi S. 1996. Chitinase and beta-1,3-glucanase isoforms expressed in pea roots inoculated with arbuscular mycorrhizal or pathogenic fungi. *European Journal of Plant Pathology* 102: 105-108
- Dassi, B.; Dumas-Gaudot, E.; Gianinazzi, S. 1998. Do pathogenesis-related (PR) proteins play a role in bioprotection of mycorrhizal tomato roots towards *Phytophthora parasitica*? *Physiol. and Mol. Plant Path.* 52: 3 167-183
- Dassi, B.; Samra, A.; Dumas-Gaudot, E.; Gianinazzi, S. 1999. Different polypeptide profiles from tomato roots following interactions with arbuscular mycorrhizal (*Glomus mosseae*) or pathogenic (*Phytophthora parasitica*) fungi symbiosis 26: 1 65-77
- Dassi, B. Martin-Laurent, F.A., Gollotte, A., Dumas-Gaudot, E., Gianinazzi-Pearson, V. Gianinazzi, S. 1997. Expression of a PR-1a protein-related gene in pea roots (*Pisum sativum*) after pathogenic (*Chalara elegans*) or symbiotic (*Glomus mosseae*) infection and chemical induction 222-225
- Douce R. 1964. Identification et dosage de quelque glicerolipides dans des suches normales et tumoral de scorsonère cultivé in vitro. *CR Acad. Sci. Paris*, 259: 3066-3068.
- Dumas-Gaudot, E., Furlan, V., Grenier, J., Asselin, A. 1992. New acidic chitinase isoforms induced in tobacco roots by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycorrhizal*: 133-136
- Dumas-Gaudot, E., Grenier, J., Furlan, V., Asselin, A. 1992. Chitinase chitosanase and beta 1,3 glucanase activities in *Allium* and *Pisum* roots colonized by *Glomus* species. *Plant Science* 84(1): 17-24
- Federico R, Giartoso CE, 1983 A transmembrane electron transport system in maize roots. *Plant Physiol.*, 73:182-184.
- Franken P, Gradinger F. 1994 Analysis of parsley arbuscular endomycorrhiza: Infection development and mRNA levels of defense-related genes *Mol. Plant - Micro. Inter.* 7: 5 612-620

- Bonfante-Fasolo, P Scannerini, S 1992.** The cellular basis of plant-fungus interchanges in mycorrhizal associations. *Mycorrhizal Functioning An Integrative Plant-Fungal Process.* (Ed. M. J. Allen) Chapman & Hall, New York 65-101
- Böttger M, y Hilgendorf F 1988.** Hormone action on transmembrane electron and H⁺ transport. *Plant Physiol.* 86: 1038-1043.
- Böttger M., 1989.** Transmembrane electron transfer of NADH loads right side out vesicles. *EN : Plant membrane transport,* (Ed. Dainty, J) Elsevier Science Publishers BV (Biomedical Division), pp 55-60.
- Bradford MM 1976.** A rapid and sensitive method for the quantification of micrograms of protein, utilising the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.,* 72: 248-254.
- Burgos PA 1993.** Estudio comparativo del enzima H-ATPasa composición lipídica y fluidez en plasmalema y tonoplasto de raíces de girasol y jojoba: efecto de NaCl. Tesis Doctoral. Universidad de Granada.
- Cocucci C, y Maree E., 1984.** Lysophosphatidilcholine-activated, vanadate inhibited , Mg-ATPase from radich microsome *BIOCH. Biophy. Acta,* 771:42-52.
- Cooper, K. M. Losel, D. M. 1978.** Lipid physiology of vesicular-arbuscular mycorrhiza *New Phytol* 80: 143-151
- Cordier, C.; Gianinazzi, S.; Gianinazzi-Pearson, V. 1996.** Colonisation patterns of root tissues by *Phytophthora nicotianae* var *parasitica* related to reduced disease in mycorrhizal tomato *Plant and Soil* 185: 2 (1996)223-232
- 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: 10 (1996)679-688

- Bienfait , HF, y Lüttge U. 1988.** On the purification of two systems that can transfer electrons across the plasma membrane. *Plant Physiol. Biochem.* 26:1-7.
- Blum H Beier H, Gross HJ. 1987.** Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrilamide gels, *Electroph.* 8:93-99.
- Bonfante-fasolo, P., Gianinazzi-Pearson, V., Scannerini, S., Gianinazzi, S. 1986.** Ultracytological analysis of cellular interactions between fungus and plant in mycorrhizae. *Physl. Veget.* 24(2): 245-252
- Bonfante-Fasolo, P., Perotto, S. 1992.** Plants and endomycorrhizal fungi: the cellular and molecular basis of their interaction. In: *Molecular signals in plant-microbe communications* (eds. D. P. S. Verma, Ph. D., FRSC) pp.445-470. RCR Press, boca Raton, Ann Arbor, London
- Bonfante-fasolo, P., Scannerini, S. 1986.** Cytological observations on the mycorrhiza endogone *Flammicorona*, *Pinus strobus*. *Physl. Veget.* 24(2): 245-252
- Bonfante-Fasolo, P., Faccio, A., Perotto, S., Schubert, A. 1990.** Correlation between chitin distribution and cell wall morphology in the mycorrhizal fungus *Glomus versiforme*. *Mycol. Res.* 94: 157-165
- Bonfante-Fasolo, P., Fontana, A. 1985.** VAM fungi in *Ginkgo biloba* roots; their interactions at cellular level *Symbiosis* 53-67
- Bonfante-Fasolo, P., Tamagnone, L., Peretto, R., Esquerr, -Tugay,, M. T., Mazau, D., Mosiniak, M., Vian, B. 1991** Immunocytochemical location of hydroxyproline rich glycoproteins at the interface between a mycorrhizal fungus and its host plants. *Protoplasma* 165(1-3): 127-138
- Bonfante-Fasolo, P., Vian, B. 1989.** Cell-wall architecture in mycorrhizal roots of *Allium porrum* L. *Annales des Sciences Naturelles Botanique* 10(3): 97-109

- Azcón-Aguilar, C.; Barea, J.M. 1996** Arbuscular mycorrhizas and biological control of soil-borne plant pathogens - An overview of the mechanisms involved *Mycorrhiza* 6: 6 (1996)457-464
- Azcón Aguilar , C. Alba, C., Montilla, M. Y Barea JM 1993.** Isotopic (^{15}N) evidence of the use of less available N forms by VA mycorrhizas. *Symbiosis*, 15: 39-48.
- Balestrini, R.,Berta, G., Bonfante, P. 1992** The plant nucleus in mycorrhizal roots positional and structural modifications. *Biol Cell* 75(3): 235-243
- Balestrini, R.,Bianciotto, V., Bonfante-Fasolo, P.1992** Nuclear architecture and DNA location in two VAM fungi *Mycorrhiza*1: 105-112
- Barea , JM; Azcón-Aguilar , C. Azcón R 1983** Efecto de la interacción de fertilizantes solubles de P y micorriza sobre la nodulación, micorrización, crecimiento y nutrición de alfalfa (*Medicago sativa*, L.). *Ciencia del suelo*, 1:39-43.
- Barea, J.M.; Azcon-Aguilar, C.; Azcon, R. 1997** Interactions between mycorrhizal fungi and rhizosphere microorganisms within the context of sustainable soil-plant systems *Multitrophic Interactions in Terrestrial Systems* Article
- Barre, R. 1988.** The effect of inhibitors of plasma membrane redox reactions on proton secretion by plant cells. *Physiol. Plant.*, 73:194-199
- Bennett AB, Spanswick RM 1983** Optical measurements of ΔpH and $\Delta\psi$ in corn roots membrane vesicle. Kinetic analysis of Cl^- affects on a protons translocating ATPase. *J. Membr Biol* 71: 95-107.
- Bennett, AB, Spanswick RM. 1984.** H^+ -ATPase activity from storage tissue of *Beta vulgaris*. *Plant Physiol.* 74: 545-548.