

**UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE CIENCIAS**



Departamento de Biología Vegetal

**Producción de Pectinasas por Hongos
Formadores de Micorrizas
Vesiculo - Arbusculares**

INMACULADA GARCÍA ROMERA

TESIS DOCTORAL

1990



Biblioteca Universitaria de Granada



01534007

Prov. T-11-2

THE UNIVERSITY OF CHICAGO
LIBRARY

FACULTAD DE CIENCIAS

T
14
23

PRODUCCION DE PECTINASAS POR HONGOS FORMADORES DE
MICORRIZAS VESICULO-ARBUSCULARES

Inmaculada García Romera

UNIVERSIDAD DE GRANADA

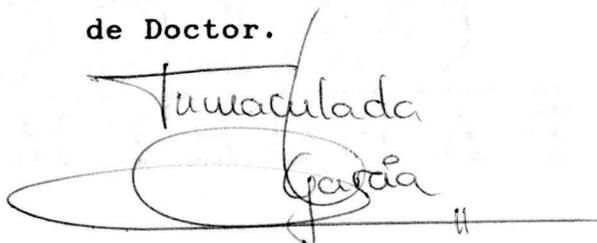
1990

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA
GRANADA
Nº Documento <u>619660339</u>
Nº Copia <u>12127410</u>

PRODUCCION DE PECTINASAS POR HONGOS FORMADORES DE
MICORRIZAS VESICULO-ARBUSCULARES

UNIVERSIDAD DE GRANADA
Facultad de Ciencias -
Fecha 12 SET 1990
ENTRADA NUM. 4246

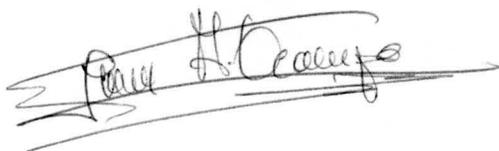
Memoria que presenta la licenciada en
Ciencias Biológicas Dña. INMACULADA
GARCIA ROMERA, para aspirar al grado
de Doctor.

A handwritten signature in cursive script, reading "Inmaculada García", written over a horizontal line. The signature is fluid and somewhat stylized.

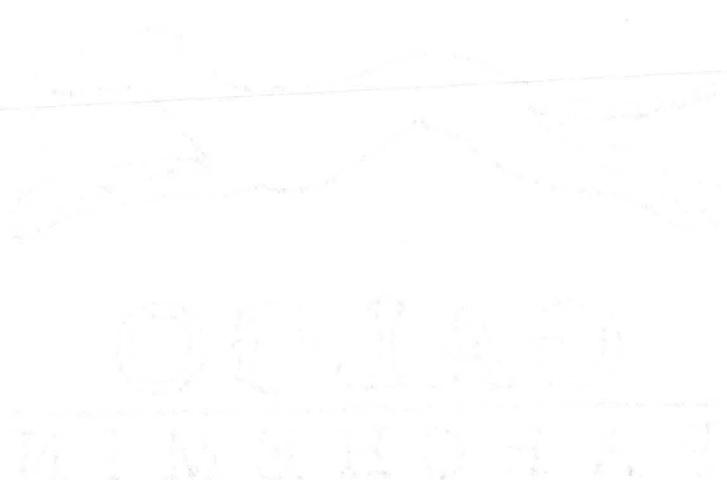
Fdo. Inmaculada García Romera

v^o B^o

El Director

A handwritten signature in cursive script, reading "Juan Antonio Ocampo", written over a horizontal line. The signature is fluid and somewhat stylized.

Fdo. Juan Antonio Ocampo
Investigador científico
del C.S.I.C.



**Esta Tesis Doctoral ha sido realizada
en la U. E. I. de Microbiología de la
Estación Experimental del Zaidín
(CSIC) de Granada.**

Al finalizar esta Tesis Doctoral, deseo expresar mi agradecimiento a aquellas personas que han contribuido a su realización.

Especialmente, quiero expresar mi agradecimiento a la persona que más importancia ha tenido en la realización de esta Tesis, Juan Antonio Ocampo, no solo por su estupenda dirección sino por su consejo y apoyo en todo momento.

Igualmente al director de la Estación Experimental del Zaidín Prof. D. José Miguel Barea, al jefe de la Sección de Microbiología Prof. D. José Olivares y a mi tutora Dña. Carmen Lluch Plá de la Universidad de Granada, les agradezco sus esfuerzos por facilitar la realización de esta Tesis Doctoral.

Mi agradecimiento a Paqui González por su ayuda en el manejo del ordenador.

Al Dr. Horst Vierheiling y a Jose Manuel García Garrido por sus consejos y amistad que me han ofrecido.

Quiero destacar mi agradecimiento a mis compañeros de laboratorio, ya que han sido muchas horas juntos, muchos malos y buenos momentos compartidos; con ellos y gracias a ellos he aprendido muchas cosas.

Finalmente a mis padres, hermano, abuela y amigos, en especial a Jesús, por su preocupación por mi trabajo, sus consejos y el apoyo en los momentos de decaimiento.

A mis padres
y a Jesús.



INDICE

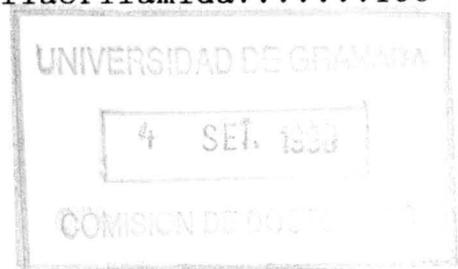
I. INTRODUCCION.....	1
1. Propágulos de los hongos formadores de micorrizas VA.....	2
2. Dinámica de la colonización VA.....	5
2.1. Fase de latencia.....	5
2.2. Fase logarítmica de crecimiento.....	5
2.3. Fase de estabilización.....	6
2.4. Velocidad y extensión de la colonización.....	6
2.5. Cuantificación de la colonización VA.....	8
3. Anatomía y morfología de las micorrizas VA.....	9
3.1. Puntos de entrada.....	10
3.2. Circunvoluciones.....	11
3.3. Hifas intercelulares.....	12
3.4. Arbúsculos.....	12
3.5. Vesículas.....	13
3.6. Relaciones celulares entre simbiotes.....	13
3.7. Interfase hongo-hospedador en los tejidos radicales externos.....	14
3.8. Interfase en las células corticales parenquimáticas.....	15
3.9. Senescencia de las estructuras intercelulares.....	16
4. Susceptibilidad de las plantas a la colonización por hongos VA.....	17
4.1. Compatibilidad de la simbiosis.....	18
4.1.1. Compatibilidad a nivel de la rizosfera.....	19
4.1.2. Compatibilidad a nivel de la rizoplana.....	20

4.1.3. Compatibilidad en el interior de la raíz.....	21
4.1.3.1. Penetración del hongo en la raíz.....	21
4.1.3.2. Mecanismos de penetra- ción del hongo en la raíz.....	23
5. Pared celular.....	25
5.1. Composición de la pared celular.....	25
5.2. Estructura de la pared celular.....	28
5.3. Enzimas degradativos de la pared celular.....	29
5.4. Enzimas pectolíticos.....	30
5.4.1. Pectín esterasa.....	31
5.4.2. Endo-poligalacturonasa.....	33
5.4.3. Poligalacturonasa.....	35
5.4.4. Endo-polimetilgalacturonasa.....	35
5.4.5. Polimetilgalacturonasa.....	36
5.4.6. Pectato liasa.....	36
5.4.7. Pectín liasa.....	38
5.5. Secuencia de actuación de los enzimas pectolíticos.....	40
5.6. Origen y extensión de la pared.....	41
5.7. Regulación de enzimas pectolíticos.....	45
II. OBJETO E INTERES DEL TRABAJO.....	50
III. MATERIALES Y METODOS.....	52
1. Parte general.....	52
1.1. Obtención de suelos desprovistos de propágulos de micorrizas VA.....	52
1.2. Tratamientos biológicos.....	52
1.2.1. Inoculación con hongos formadores de micorrizas VA.....	52

1.2.2.	Recolección de esporas de <i>G. mosseae</i> en muestras de suelo rizosférico.....	54
1.2.3.	Aislamiento y esterilización de esporas.....	54
1.2.4.	Germinación de esporas.....	55
1.2.5.	Aislamiento de micelio.....	56
1.3.	Plantas y condiciones de cultivo.....	56
1.4.	Características de los suelos empleados.....	58
1.5.	Determinaciones generales.....	59
1.5.1.	Tinción de raíces micorrizadas.....	59
1.5.2.	Cuantificación de la micorrización.....	60
1.6.	Determinaciones específicas.....	61
1.6.1.	Métodos de extracción y concentración de enzimas pectolíticos....	61
1.6.1.1.	Sulfato amónico.....	62
1.6.1.2.	Sephadex G-25.....	62
1.6.1.3.	Rotavapor.....	62
1.6.1.4.	Filtros Amicon Centr. Concentrators 10.....	63
1.6.1.5.	Liofilización.....	63
1.6.2.	Preparación de sustratos enzimáticos.....	63
1.6.3.	Detección cualitativa de enzimas pectolíticos.....	63
1.6.4.	Valoración cuantitativa enzimas pectolíticos.....	65
1.6.4.1.	Actividad pectín esterasa.....	65
1.6.4.2.	Actividad endo-poligalacturonasa....	65
1.6.4.3.	Actividad poligalacturonasa.....	67

1.6.4.4. Actividad endo-polime- tilgalacturonasa.....	68
1.6.4.5. Actividad polimetilgalacturonasa....	68
1.6.4.6. Actividad pectato y pectín liasa.....	69
1.6.5. Determinación cuantitativa de proteínas.....	70
2. Ensayos específicos.....	71
2.1. Efecto de los sustratos de enzimas pectolíticos en la infección micorriza VA.....	71
2.2. Efecto de los sustratos de enzimas pectolíticos en la germinación de esporas.....	73
2.3. Efecto de diferentes medios de extracción en la detección de enzimas pectolíticos.....	73
2.4. Estudio de la actividad pectín esterasa a distintos pHs.....	73
2.5. Estudio de la influencia de los métodos de concentración en la actividad enzimática.....	74
2.6. Estudio de las distintas actividades enzimáticas a lo largo del proceso de infección.....	74
2.6.1. Actividad pectín esterasa.....	74
2.6.2. Actividades endo-poligalacturo- nasa y endo-polimetilgalacturo- nasa.....	75
2.6.3. Actividades poligalacturonasa y polimetilgalacturonasa.....	75
2.6.4. Actividades pectato y pectín liasa.....	76

2.7. Estudio de las actividades enzimáticas en esporas y micelio.....	76
2.8. Electroforesis en gel de poliacrilamida...	77
2.8.1. Método de MacKenzie y Willians.....	77
2.8.2. Método de Cruickshank y Wade.....	79
2.8.3. Método de Cruickshank y Wade modificado.....	80
 IV. RESULTADOS.....	 81
1. Efecto de los sustratos de enzimas pectolíticos en la infección micorriza VA.....	81
2. Análisis cualitativo de enzimas pectolíticos.....	91
3. Efecto de los distintos métodos de extracción en la detección de enzimas pectolíticos.....	94
4. Efecto del pH en la actividad pectín esterasa.....	100
5. Influencia de los métodos de concentración en la actividad enzimática.....	103
6. Evolución de las distintas actividades pectolíticas a lo largo del proceso de infección VA.....	112
7. Estudio de las actividades enzimáticas en esporas y micelio.....	151
8. Electroforesis en gel de poliacrilamida.....	153



V. DISCUSION.....	155
VI. CONCLUSIONES.....	169
VII. BIBLIOGRAFIA.....	170



I. INTRODUCCION

I. INTRODUCCION.

Las micorrizas vesículo-arbusculares (VA) se encuentran entre las simbiosis mutualísticas más extendidas, englobando quizás, al 90% de todas las especies vegetales conocidas. Estas proporcionan un beneficio claro a las plantas, especialmente a través de un incremento en la captación de fósforo a partir del suelo dando lugar a un mayor crecimiento de las mismas. Lógicamente el hongo también se beneficia de la planta, principalmente, de elementos provenientes de la fotosíntesis. La simbiosis está caracterizada por la colonización de hifas aseptadas y multinucleadas que provenientes de otras raíces ó de grandes esporas (llegando a superar 500 μm), se encuentran en el suelo. El desarrollo fúngico varía en detalle según el hospedador, pero en la mayoría de las asociaciones, la hifa se diferencia para formar arbusculos intracelulares y vesículas que pueden ser intra ó intercelulares. La hifa puede extenderse a una distancia considerable (más de 8 cm), de la superficie de la raíz por lo que el hongo solo es parcialmente interno.

Esta asociación tiene posiblemente una larga historia evolutiva, su ubicuidad entre las plantas y la forma en que explora el suelo, sugiere que ha sido necesaria para la colonización de la tierra por las plantas sin verdadera raíz, durante el período silúrico. De hecho, se pueden interpretar como fósiles de micorrizas VA los observados en el Devónico y estratos subsiguientes.

La posición taxonómica de los hongos VA está siendo objeto de debate debido a la imposibilidad de reproducción de los mismos en cultivos axénicos, en

ausencia de la planta y, por lo tanto, se basa solo en criterios morfológicos de las esporas. En base a estos criterios se los ha englobado, dentro de los Zigomicetos, en la familia *Endogonaceae* en la cual se han reconocido seis géneros que forman micorrizas VA: *Glomus*, *Acaulospora*, *Gigaspora*, *Scutellospora*, *Entrophospora* y *Sclerocystis*. Actualmente se han descrito más de 126 especies de hongos formadores de micorrizas VA (Morton, 1988). Hay otras especies que todavía no están descritas y es posible que su número sea superior. Esto puede parecer excesivo si se compara con otros microorganismos simbióticos, pero hay que tener en cuenta la gran diversidad de hospedadores. Como se mencionó antes, cerca del 90% de las plantas forman micorrizas VA, por tanto, esta clase de simbiosis se forma en más de 11.000 géneros y 225.000 especies ya que, aproximadamente, hay dentro de las angiospermas 12.000 géneros y 240.000 especies y, además muchas gimnospermas, pteridofitas y briofitas forman micorrizas VA (Mosse et al., 1981).

1. Propágulos de los hongos formadores de micorrizas VA.

El hongo VA es un componente normal de la rizosfera, desarrolla la colonización a partir de esporas del suelo ó vía micelio procedente de otra raíz colonizada, ó bién a partir de masas de micelio fúngico que sobreviven en el suelo (Hayman, 1983).

Las esporas de los hongos VA son los propágulos más característicos de este tipo de simbiosis y a las que se les ha prestado mayor atención en cuanto a su morfología, germinación y desarrollo de los tubos germinales.

Sobre la morfología de las esporas descansa la mayor parte de los criterios taxonómicos empleados en la clasificación de los hongos VA. *Gigaspora* y *Scutellospora*, tienen un suspensor similar a un gametangio, pensándose por ello que sea una azigospora (Gerdemann y Trappe, 1974). *Gigaspora* difiere de *Scutellospora* en que *Gigaspora* no posee ninguna pared interna flexible, mientras que *Scutellospora* posee al menos una. Las células auxiliares formadas por *Gigaspora* son erizadas ó en forma de papila mientras que las de *Scutellospora* son grumosas ó nudosas (Walker y Sanders, 1986). En *Acaulospora* las azigosporas se forman lateralmente a partir de la hifa que sostiene la espora madre, mientras que en *Entrophospora* las azigosporas se forman dentro del cuello de la hifa. *Acaulospora* y *Entrophospora* se forman, por la emigración del contenido de una espora madre previamente desarrollada y de corta duración, por lo que normalmente, carece de hifa sustentora (Morton, 1988). *Sclerocystis* se encuentra en forma de esporocarpos en los cuales las clamidosporas se disponen de forma periférica alrededor de un eje central. El género *Glomus* contiene especies que forman esporocarpos ó nó, cuyas clamidosporas nacen a partir de una hifa sustentora más ó menos recta (Gerdemann y Trappe, 1974).

Las esporas de los hongos VA son unidades biológicas pre-programadas, en estado de quiescencia, que precisan ser activadas para desencadenar los procesos normales de su biología celular y las funciones metabólicas que sustenten su germinación y crecimiento subsecuente de fase filamentosa (Siqueira, 1987). No se conocen los mecanismos exactos por los cuales las esporas se activan e inician el proceso de germinación, aunque se sabe que contienen los factores

biológicos requeridos para germinar, no obstante, parece que no poseen los sistemas genéticos y metabólicos para su crecimiento continuo y esporulación, a menos que se asocien a células de raíces vivas (Hepper, 1984; Siqueira, 1987).

Las esporas son capaces de persistir considerables períodos de tiempo en el suelo, en donde existen condiciones adversas, germinando cuando estas les son favorables. Los procesos de formación y germinación de los diferentes tipos de esporas son bien distintos. En el caso del género *Glomus*, las clamidosporas se originan en las extremidades de las hifas, como pequeñas vesículas de paredes finas que cuando maduran se vuelven esporas multilaminadas y continuas con la pared de la hifa. Las clamidosporas germinan mediante el crecimiento de la hifa sustentora produciendo un micelio fino, generalmente hialino, bien ramificado y con numerosas esporas vegetativas pequeñas, que son semejantes a las clamidosporas que se desarrollan en los micelios asociados a raíces vivas. Estas pequeñas esporas generalmente continúan creciendo y producen un tubo germinal en posición opuesta a su base, pero no sobreviven cuando se separan de la espora principal y mueren con rapidez (Siqueira, 1987).

Otra forma de propágulo de los endofitos VA son los fragmentos de raíces colonizadas. Esta forma de propágulo es importante, en primer lugar, porque se ha descrito que la colonización VA se produce más rápidamente que a partir de esporas (Hall, 1976; Powell, 1976), lo cual puede deberse a dificultades en la germinación de esporas en el suelo ó al escaso vigor del micelio formado y en segundo lugar, porque en algunos casos, por ejemplo, en asociaciones de plantas perennes esta es su principal forma de propagación.

Aunque todavía no está claro, hay hechos experimentales que indican la existencia y permanencia de masas de hifas fúngicas en el suelo, por lo que hay que tener en cuenta su papel como propágulos de micorrizas VA. De hecho, se ha observado, por un lado, que la alteración de la red fúngica de un suelo reduce la infectividad de dicho suelo (Clark, 1964; Read et al., 1976), y por otro, hay indicaciones de la existencia de un crecimiento de las hifas fúngicas, en el suelo, no dependiente de la raíz (Warner y Mosse, 1980; Ocampo y Hayman, 1981).

2. Dinámica de la colonización VA.

El proceso y desarrollo de la colonización de los hongos formadores de micorrizas VA sigue una curva sigmoideal en la que se observa una fase de latencia, fase logarítmica de crecimiento y una fase de estabilización. Este proceso, se ha observado tanto en condiciones controladas como en el campo (Ocampo, 1980).

2.1. Fase de latencia.

Está causada, posiblemente, por el tiempo requerido para la germinación de esporas, crecimiento del micelio y penetración en la raíz.

2.2. Fase logarítmica de crecimiento.

Esta fase se puede asociar con la formación de un micelio extenso en el suelo, producido por las sucesivas germinaciones de las esporas existentes en él, desde las cuales se producen estructuras de penetración que inician la colonización; así como también se puede asociar con los puntos jóvenes de

entrada establecidos durante la fase de latencia, que se van extendiendo de célula en célula mediante el desarrollo de la hifa, formando gran número de arbusculos.

2.3. Fase de estabilización.

A partir de 30-60 días, según el tipo de planta, se produce una limitación y estabilización del porcentaje de raíces micorrizadas, las cuales rara vez sobrepasan el 80% de la longitud total de la raíz. Todavía no se conocen las causas que determinan la estabilización de la colonización.

La dinámica de la colonización VA está influenciada por los cambios estacionales, aunque también depende de las condiciones intrínsecas del sistema radical.

2.4. Velocidad y extensión de la colonización.

La velocidad y extensión de la colonización inicial en el sistema radical y la duración de la fase de latencia, va a depender, en parte, del número de propágulos del suelo. También dependerá de la velocidad a la que germinen los propágulos y se inicien las primeras colonizaciones en la raíz (Daft y Nicolson, 1969; Rich y Bird, 1974). Las colonizaciones iniciales de micorrizas tienen una gran importancia en la aceleración de los efectos sobre la respuesta de crecimiento en las plantas cultivadas. Incrementando el número de propágulos se obtiene mayor porcentaje de colonización, sin embargo, cuando se incrementa el número de propágulos por encima de un nivel, es decir cuando hay una saturación de inóculo, no se produce un mayor incremento en el porcentaje de colonización

(Carling *et al.*, 1979; Smith y Walker, 1981). La razón de esta saturación todavía no se conoce. La cantidad de propágulos de un suelo se ha venido estableciendo en base al número de esporas (Harley y Smith, 1983), e incluso en trabajos recientes se ha observado una relación entre el número de esporas inoculadas y el porcentaje de micorrización (Pugh *et al.*, 1981; Oliveira y Zambolin, 1988). Sin embargo, el número de esporas del suelo no está necesariamente relacionado con la colonización micorrízica de las plantas (Hayman y Stovold, 1979; Bolgiano *et al.*, 1983). Hay que tener en cuenta, por un lado, que las técnicas de obtención de esporas no permiten recoger el número total de las mismas, y por otro, que las esporas no son la única fuente de inóculo sino que también lo son trozos de micelio ó de raíces colonizadas (Warner y Mosse, 1980). Por ello la determinación del potencial del inóculo se hace en base al número más probable (Powell, 1976; Porter, 1979), lo que todavía no se ha determinado es el nivel de propágulos necesarios para que se produzca una saturación del inóculo, pues el potencial de inóculo no solamente está definido por la cantidad de propágulos sino también por su competitividad frente a otros organismos del suelo y por la capacidad de extensión de la colonización en el interior de la raíz, la cual puede ser, además, diferente según el tipo de planta que tiene que colonizar. No se puede excluir la posibilidad de que las especies fúngicas difieran entre sí en su velocidad de extensión en el interior de la raíz a continuación de la colonización, y puedan alcanzar una extensión de colonización similar independientemente de la dosis de inóculo (Daniels *et al.*, 1981).

La velocidad de desarrollo de la colonización, la raza ó especie del hongo y el nivel total de

colonización pueden ser factores importantes en la efectividad ó en la dependencia de la planta a la micorriza. La dependencia se ha definido como el grado al cual una planta depende de la micorrización para producir su máximo crecimiento a un nivel dado de fertilidad del suelo (Gerdemann, 1975; Menge *et al.*, 1978), y se calcula la dependencia como el peso seco de una planta micorrizada expresada como porcentaje del peso seco de una planta no micorrizada crecida en las mismas condiciones experimentales.

2.5. Cuantificación de la colonización VA.

Practicamente todos los estudios que se realizan con micorrizas VA requieren una observación ó cuantificación de la colonización en alguna etapa de la investigación.

La mayoría de las medidas de la colonización se basan en la determinación de la proporción de tejido del hospedador susceptible de micorrizarse (corteza primaria), ocupado por el hongo. Otra forma de medición, es la determinación directa de la proporción de tejido fúngico presente en la raíz. Esta es la base de la medida de la quitina total, después de su conversión a glucosamina (Hepper, 1977) y medida colorimétricamente. Este método da una buena correlación entre el nivel de glucosamina medido y el nivel de tejido colonizado, pero para relacionar los resultados de este ensayo con la masa fúngica requiere una calibración del método para cada endofito, y solo se utiliza en ensayos llevados a cabo en condiciones estériles y cuando se requiere una medida muy precisa. Otro método (Becker y Gerdemann, 1977) se basa en la medida del pigmento amarillo que se forma en las raíces colonizadas de algunas plantas (cebolla y maíz). Pero

no todas las especies de plantas forman este pigmento y el método no es siempre satisfactorio.

Cuando la colonización se mide estimando la proporción de la corteza primaria ocupada por el hongo, las mediciones se hacen en base a las observaciones del material teñido. El método de tinción más común es el descrito por Phillips y Hayman (1970).

Para la cuantificación de la colonización VA se han utilizado varios métodos, de estos los más comunes son la estimación de la colonización de raíces montadas en portaobjetos y observadas al microscopio (Nicolson, 1960), ó la estimación del porcentaje de longitud de raíz en las líneas de una placa cuadrículada (Giovannetti y Mosse, 1980).

Si bien, estos métodos de cuantificación de la colonización permiten la estimación del micelio que ocupa la raíz de la planta, no permiten determinar el nivel de funcionalidad del mismo. Por ello se ha desarrollado un método de estimación de la cantidad de micelio metabólicamente activo, en base a la determinación de la actividad succinato deshidrogenasa fúngica mediante técnicas histoquímicas (MacDonald y Lewis, 1978).

3. Anatomía y morfología de las micorrizas VA.

La colonización micorrízica tiene lugar solamente en la epidermis ó exodermo y en el parénquima cortical de la raíz que posea una estructura primaria. La colonización no penetra la endodermis y por tanto no está presente en el cilindro vascular central ni en las regiones meristemáticas (Bonfante-Fasolo, 1984).

Las hifas externas poseen un tamaño variable, oscilando entre 2-27 μm de diámetro (Nicolson, 1959). Estas hifas pueden ser de paredes estrechas ó finas, las cuales tienen un color amarillento y una proyección angular unilateral; ó bien, pueden ser de paredes gruesas que forman septos. Con estudios ultraestructurales y citoquímicos se ha observado que las paredes de las hifas externas estan formadas por proteínas, polisacáridos y quitina (Bonfante-Fasolo y Grippiolo, 1982).

3.1. Puntos de entrada.

Cuando la hifa externa entra en contacto con la superficie de la raíz puede engrosarse apicalmente formando una estructura parecida a un apresorio más ó menos pronunciado. Se ha observado que se pueden formar estructuras en forma de abanico antes de penetrar en la raíz (Gianinazzi-Pearson *et al.*, 1980).

El micelio externo puede originar un número variable de puntos de entrada en la raíz, según las condiciones ambientales en que crece la planta y la edad de la raíz. El número de puntos de entrada puede oscilar entre 2 y 21.1 por mm de raíz, sin embargo, en otros casos se han observado solo 6 puntos de entrada por cm de raíz (Harley y Smith, 1983).

Como se ha mencionado anteriormente, la hifa no penetra en los meristemos apicales, y la colonización suele tener lugar entre 0.5 y 1 mm a partir del extremo de la raíz.

La hifa de los hongos VA (Bonfante-Fasolo, 1984) puede penetrar en la raíz:

1. Directamente a través de la pared de un pelo radicular ó de una célula epidérmica. Se ha observado que la hifa se puede estrechar en el punto de penetración recuperando después el tamaño normal (Gripiolo, 1981; Kinden y Brown, 1975).

2. A partir de un apresorio, una rama de la hifa, puede pasar a través de los espacios vacíos, entre células muertas de la capa externa de la raíz y entrar en la primera capa de células intactas formando un codo ó circunvolución intracelular.

3. Entre las células epidérmicas y se extiende intercelularmente a partir del punto de entrada.

Cuando el hongo se encuentra en el interior de la raíz, el camino por el que se extiende en el interior de la misma es variable, depende de la planta y del hongo que produzca la colonización (Abbot, 1982).

3.2. Circunvoluciones.

La capa externa de la raíz se coloniza, a menudo, por una hifa intracelular que forma una circunvolución caracterizada por una disposición lineal sin ningún tipo de ramificación. La formación de circunvoluciones es un fenómeno común en las raíces micorrizadas de muchas plantas y producido por muchas especies de hongos. La hifa puede formar una circunvolución intracelular en la primera célula que coloniza, posteriormente, pasando de una capa de células a la siguiente, el hongo penetra en otras células formando nuevas circunvoluciones similares a la primera. Durante el paso de célula a célula la hifa atraviesa la pared e invagina la membrana de la célula hospedadora sin afectar al citoplasma (Bonfante-Fasolo y Gripiolo,

1982).

3.3. Hifas intercelulares.

Las hifas intercelulares que provienen de las circunvoluciones ó directamente de las ramas de las hifas que penetran, se encuentran usualmente en las capas intermedias del parénquima cortical. Su diámetro oscila de 2 a 6 μm . Esas hifas dilatan los espacios intercelulares y a menudo se encuentran en paquetes de 3 ó 4, extendiéndose a lo largo del parénquima cortical de forma paralela al eje de la raíz. Las paredes de estas hifas varían en grosor y son ricas en polisacáridos, proteínas y quitina (Bonfante-Fasolo, 1984).

3.4. Arbúsculos.

En las capas interiores del parénquima cortical, la hifa intercelular penetra las células corticales dando lugar a un sistema complejo de hifas ramificadas llamado arbúsculo (Bonfante-Fasolo, 1984). El arbúsculo se origina a partir de una rama de la hifa intercelular, el tronco arbuscular, que penetra en la célula hospedadora, se ramifica dicotómicamente y da lugar a ramas que proliferan en pequeñas hifas con terminales cortos bifurcados. Las hifas arbusculares causan una invaginación del plasmalema del hospedador y se encuentran siempre rodeadas por este. Las paredes arbusculares son muy finas (20 nm de espesor), con una estructura amorfa en la que no se encuentran fibrillas de quitina sino que poseen residuos de N-acetilglucosamina (monómeros de quitina) (Bonfante-Fasolo, 1982; Kinden y Brown, 1975).

El arbúsculo es la estructura más significativa en

la simbiosis VA, tanto desde el punto de vista funcional, ya que es el sitio preferencial para el intercambio de metabolitos entre el hongo y la planta, como desde el punto de vista estructural, ya que la presencia de arbusculos es un factor decisivo para identificar una colonización fúngica en la raíz como perteneciente a las micorrizas VA típicas (Cox *et al.*, 1975).

El ciclo de vida del arbusculo se limita a 4 ó 5 días, en que las ramas arbusculares se deterioran y colapsan (Cox y Tinker, 1976).

3.5. Vesículas.

Las vesículas son cuerpos globosos causados por un hinchamiento intercalar ó terminal de la hifa. Las vesículas encontradas en el interior de la raíz pueden ser inter ó intracelulares, difieren en tamaño (30-50 μm por 80-100 μm), y se pueden encontrar tanto en las capas internas como externas del parénquima cortical. Tanto desde el punto de vista citológico como funcional las vesículas son las estructuras fúngicas menos estudiadas. En cuanto a su papel funcional, se han establecido varias hipótesis, aunque el hecho de que su número aumente en las raíces muertas ó viejas sugieran que su función principal es la de reserva (Bonfante-Fasolo, 1984), se estan encontrando indicaciones que apoyan el papel de las vesículas como propágulos de los hongos VA (Bierman y Linderman, 1983).

3.6. Relaciones celulares entre simbiosis.

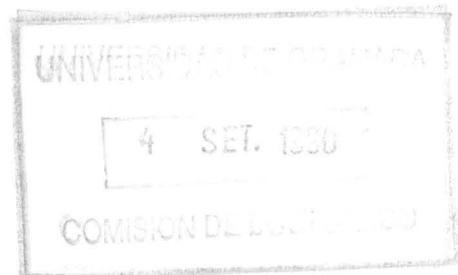
Los cambios en la morfología de los hongos VA, a medida que se desarrollan en los tejidos del

hospedador, van acompañados por modificaciones en su metabolismo de la pared. Hay un adelgazamiento de la pared de la hifa con una simplificación en su estructura y composición, la cual empieza en las circunvoluciones y se acentúa a medida que la hifa prolifera, alcanzando un máximo a nivel del arbúsculo (Bonfante-Fasolo y Gianinazzi-Pearson, 1986).

La célula hospedadora no muestra respuesta evidente a la presencia de la hifa a nivel de los espacios intercelulares pero cuando la hifa rompe la pared celular y entra en contacto con el protoplasto del hospedador, el plasmalema del hospedador se elonga y deposita, de forma activa, materiales de la pared conteniendo proteínas y polisacáridos alrededor de la hifa invasora (Gianinazzi-Pearson et al., 1981).

3.7. Interfase hongo-hospedador en los tejidos radicales externos.

En el caso de las circunvoluciones intracelulares que se desarrollan en las capas externas de la raíz, la pared celular del hongo es todavía relativamente gruesa y quitinosa y está separada del plasmalema del hospedador por un material similar al del hospedador. Este material forma una barrera física que separa el hongo del protoplasto del hospedador, en este aspecto la interfase hongo-hospedador se asemeja a la que se establece con la hifa intercelular. El contenido del protoplasma en esas células hospedadoras cambia poco en respuesta a la invasión fúngica, solo se desarrolla una capa fina de citoplasma que rodea la hifa y los granos de almidón permanecen intactos (Gianinazzi-Pearson y Gianinazzi, 1988).



3.8. Interfase en las células corticales parenquimáticas.

En esta fase el protoplasto del hospedador sufre grandes cambios, el contenido del citoplasma se incrementa varias veces, disminuyen las vacuolas, los granos de almidón desaparecen, los orgánulos celulares son más numerosos, el sistema de membrana se incrementa y el plasmalema del hospedador prolifera rodeando las ramas de la hifa, creando una mayor superficie de contacto celular entre simbioses (Cox y Tinker, 1976).

A medida que la hifa fúngica se ramifica en el protoplasto del hospedador, la interfase hospedador-hongo se modifica y se transforma en una zona compleja. Sus paredes celulares son muy finas y están simplificadas en todo el arbusculo. El material de la pared depositado por la célula hospedadora disminuye en la matriz interfacial alrededor de las ramas finas del arbusculo, por lo que el apoplasto entre el plasmalema del hongo y del hospedador se reduce y se establece una unión muy estrecha entre las superficies celulares de los simbioses. Las fosfatasa neutras, características de la síntesis de polisacáridos, se localizan específicamente a lo largo del plasmalema del hospedador en la interfase del arbusculo, y los plasmalemasomas, interpretados como que están involucrados en la síntesis de la pared, son particularmente frecuentes en la matriz interfacial alrededor de las ramas finas del arbusculo. Ambos persisten con la hifa senescente cuando el material del hospedador se acumula de nuevo alrededor de los restos celulares. Por tanto parece razonable concluir que el plasmalema del hospedador, que rodea la hifa arbuscular, tiene una actividad formadora de pared, pero los procesos de depósito y organización de pared

se afectan por la hifa que está creciendo activamente (Dexheimer *et al.*, 1985). Los precursores de la pared así formados ó la hidrólisis localizada de la pared celular podría suministrar una fuente suplementaria de carbohidratos para el hongo VA. La actividad ATPasa está localizada muy frecuentemente a lo largo del plasmalema de las hifas vivas del arbusculo, indicando la posibilidad de un transporte activo de solutos al hongo (Harley y Smith, 1983).

El plasmalema de las células no colonizadas poseen muy poca ó nula actividad ATPasa. En presencia del hongo el plasmalema periférico permanece inactivo pero en el plasmalema que se sintetiza de nuevo y que rodea las ramas arbusculares tiene lugar una actividad ATPásica intensa (Dexheimer *et al.*, 1982).

3.9. Senescencia de las estructuras intracelulares.

Las primeras etapas de deterioro del hongo, tanto en las células exteriores como en las células del parénquima cortical, se caracterizan por una deformación de la pared fúngica y una alteración en el contenido de la hifa. La degeneración de los arbusculos empieza en las ramas más pequeñas y se va extendiendo hacia el tronco arbuscular. La actividad metabólica de la célula hospedadora se incrementa durante las primeras etapas de la senescencia fúngica. A medida que la senescencia avanza en la célula, toda la hifa se vacía, las paredes se colapsan, y se unen. Estas paredes de las hifas se rodean por parte del citoplasma del hospedador. A este nivel la célula hospedadora recupera el aspecto que tenía antes de ser colonizada (Harley y Smith, 1983).

4. Susceptibilidad de las plantas a la colonización por hongos VA.

En la simbiosis micorriza VA, tanto desde el punto de vista del hongo como del de la planta, no existe especificidad como tal, en sentido estricto, en la asociación. Es más, un sistema radical dado puede ser colonizado simultáneamente por varias especies de hongos y alternativamente, un mismo hongo puede colonizar, simultáneamente, raíces de varias especies vegetales (Harley y Smith, 1983). Sin embargo, hay especies de plantas que no son susceptibles de micorrizarse (Harley y Harley, 1987; Newman y Reddell, 1987), y dentro de las susceptibles las distintas especies, e incluso variedades de una misma especie, pueden mostrar un grado diferente de susceptibilidad a la colonización por un hongo VA determinado (Azcón y Ocampo, 1981). Esta susceptibilidad a la micorrización también difiere dentro de la raíz de una misma planta, ya que hay raíces que se colonizan y otras que no (Harley y Smith, 1983).

La susceptibilidad de las plantas a la micorrización, ó lo que es lo mismo, la capacidad de una planta para ser colonizada por un hongo en mayor ó menor grado va a depender de los aspectos siguientes:

1. Que haya un reconocimiento de la planta hacia el hongo que va a colonizar, implicando una serie de interacciones entre ambos organismos.

2. Que haya un nivel de compatibilidad ó asociabilidad de los genomas de los componentes de la simbiosis.

3. Puede intervenir el que haya un cierto grado de

especificidad.

Los factores de eficiencia del hongo para producir la simbiosis (poder colonizador); así como, la dependencia ó necesidad de la planta a estar micorrizada para su supervivencia ó para mejorar su estado nutritivo, van a incidir en la capacidad de la planta a micorrizarse ó nó (Anderson, 1988; Hayman, 1983).

4.1. Compatibilidad de la simbiosis.

El genotipo del hospedador es crítico para definir el nivel de colonización VA que puede soportar, pero por otro lado distintas especies de hongos pueden exhibir un poder de colonización diferente en un mismo hospedador (Lackie *et al.*, 1987).

La micorriza VA es un tejido en el cual hay una armonía entre dos organismos, el hongo y la raíz de la planta; esta asociación armónica no es estática ya que los componentes de la planta y los del hongo están constantemente en movimiento, pues la hifa va colonizando nuevas células hospedadoras y se va extendiendo en la rizosfera. Esta asociación además de armónica es compleja. La complejidad del ciclo de vida de los hongos en el interior de la planta indica, que la compatibilidad entre ambos no puede ser el resultado de un simple proceso de reconocimiento (es decir de una interacción entre dos factores que dan como resultado la formación de la simbiosis), ó depender de un gen único (bien por parte del hongo ó por parte de la planta) que intervenga ó controle la simbiosis, sino que va a depender de un conjunto de acciones interrelacionadas entre si. La diversidad del tipo y efectividades de las micorrizas VA en el reino vegetal

apoyan esta idea (Anderson, 1988).

En los procesos de reconocimiento probablemente intervienen componentes estructurales provenientes de las células vegetales ó fúngicas. Estos productos pueden establecer comunicación entre si a nivel de la rizosfera, rizoplana y de la raíz (bien a nivel de la epidermis ó de la corteza). Como es lógico, la producción de estos componentes y/ó la comunicación entre si, estará influenciada ó condicionada por los factores ambientales donde se desarrolla la simbiosis.

4.1.1. Compatibilidad a nivel de la rizosfera.

A nivel de la rizosfera los componentes de la planta pueden influir sobre la germinación de las esporas y desarrollo del micelio. Hay indicaciones, aunque todavía escasas, de que las raíces de las plantas pueden influenciar a los hongos VA mediante mensajeros químicos, los cuales funcionan antes del establecimiento de la simbiosis. Estos mensajeros que van de la raíz al hongo, pueden ser exudados solubles ó volátiles y provocan una ramificación y proliferación de los tubos germinales (exudados solubles), así como una atracción de los mismos hacia la raíz (exudados volátiles). A continuación de la atracción de los tubos germinales se produce un incremento rápido de ramificación de las raíces de la planta en respuesta a un simple contacto (antes de la formación de las estructuras infectivas), sugiriendo que la respuesta esta mediada por un mensajero asociado a la superficie del tubo germinal. Lógicamente la estimulación de la producción de raíces originaría nuevos sitios potenciales de colonización (Glenn *et al.*, 1988; Gemma y Koske, 1988).

Todavía no se conoce la naturaleza ni el papel que juegan estos exudados en los procesos de colonización de la raíz por el hongo.

Uno de los componentes importantes en los procesos de reconocimiento son los fenoles. Los fenoles inducen la expresión de genes que regulan otros genes esenciales para la colonización (Bolton *et al.*, 1986). No hay, sin embargo, estudios sobre la participación de los fenoles en los procesos de micorrización a nivel de la rizosfera.

4.1.2. Compatibilidad a nivel de la rizoplana.

Una vez en la rizoplana el hongo puede formar un apresorio y penetrar inmediatamente la raíz, ó puede necesitar algún crecimiento en la superficie de la raíz antes de penetrar en ella. El contacto entre los simbioses parece ser fortuito y no hay nada que recuerde a una adhesión ó unión estrecha de la hifa a la pared del hospedador (Gianinazzi-Pearson, 1984). Sin embargo, cuando se establece contacto entre células, la penetración de la raíz va precedida por la formación de un haustorio más ó menos definido indicando que tiene que haber algún tipo de reconocimiento en esta etapa inicial de formación de la micorriza (Bonfante-Fasolo, 1984).

La mayor parte de las penetraciones tienen lugar a pocos mm del extremo de la raíz, pero en varias ocasiones una rama procedente de la primera penetración coloniza a una raíz más vieja en puntos distantes del extremo apical (Glenn *et al.*, 1988). Estas observaciones sugieren, que la penetración en el extremo de la raíz induce la penetración en un segmento de la raíz al que previamente la hifa no respondió a su

atracción ó que la hifa no fue capaz de penetrar. Sin embargo, todavía no hay elementos como para establecer con certeza si la iniciación de los puntos de entrada esta restringida a la región situada inmediatamente después del ápice de la raíz (meristemo apical), ó si esta restringida a células radicales jóvenes pero diferenciadas, ó si ocurre a lo largo de todo el sistema radical (Smith y Gianinazzi-Pearson, 1988). Este es uno de los puntos claves para definir los factores que pueden afectar a la susceptibilidad de las plantas a la micorrización ya que, la síntesis y organización de la pared, así como la producción de exudados radicales varía a lo largo de la raíz.

La rizoplasma debe poseer estructuras que puedan promover que la hifa tenga contacto con la raíz para que haya lugar una unión más firme. En estudios de otras asociaciones entre plantas y microorganismos se ha visto que las lectinas de la superficie de la pared son importantes para permitir el reconocimiento entre plantas y microorganismos (Anderson, 1988). Las lectinas están implicadas en la especificidad de la colonización de las plantas por hongos patógenos y bacterias. No hay apenas estudios del papel de las lectinas en procesos de colonización de los hongos VA, únicamente se ha observado (Bonfante-Fasolo, 1982) que las aglutininas de plántulas de trigo (una lectina específica para N-acetilglucosamina) se unen a la pared celular de un hongo VA (*Glomus fasciculatum*).

4.1.3. Compatibilidad en el interior de la raíz.

4.1.3.1. Penetración del hongo en la raíz.

El hongo puede penetrar en la raíz de forma intracelular ó intercelular.

1. Penetración intracelular.

En la colonización intracelular, el plasmalema y tonoplasto de la célula hospedadora se invaginan alrededor del hongo. El plasmalema del hospedador y la pared del hongo están separados por una matriz que es siempre continua y de morfología similar a la pared de la célula hospedadora (Bonfante-Fasolo y Scannerini, 1977; Grippiolo, 1981; Kinden y Brown, 1975).

La secuencia de penetración intracelular propuesta por Grippiolo (1981), es la siguiente:

a. Cuando el hongo intracelular alcanza la periferia de la célula, el plasmalema del hospedador, el cual se invagina alrededor del hongo y limita la zona interfacial, se fusiona con la que está adherida a la pared celular del hospedador.

b. La matriz se hace continua con la pared celular primaria.

c. El hongo pasa a través de esta matriz y de la lámina media penetrando en la pared de la célula siguiente causando la invaginación de su plasmalema.

La colonización recorre la raíz mediante hifas intercelulares que avanzan paralelas al eje de la raíz.

2. Penetración intercelular.

El hongo se extiende por dilatación de los espacios intercelulares de la célula hospedadora. La pared del hongo entra en contacto directo con la pared primaria del hospedador y a veces se observan restos de la lámina media que permanece (Gianinazzi-Pearson et

al., 1981; Bonfante-Fasolo y Scannerini, 1977; Bonfante-Fasolo, 1978).

4.1.3.2. Mecanismos de penetración del hongo en la raíz.

La penetración y fases subsiguientes de la colonización deben ser consideradas en su conjunto porque ellas engloban la penetración de las hifas, a lo largo ó a través, de las paredes celulares del hospedador.

Se han establecido las siguientes hipótesis (Harley, 1986):

1. El hongo puede penetrar en la raíz por un proceso mecánico.

2. La penetración solo tiene lugar en zonas de la raíz donde se está formando la pared y las hifas previenen la polimerización de los precursores de la pared producidos por las membranas de la célula hospedadora.

3. La superficie de la hifa, en su región apical, posee enzimas capaces de romper las paredes celulares.

La primera hipótesis por si sola no puede explicar el proceso de penetración de los hongos VA en la raíz, ya que es un mecanismo inespecífico no compatible con el estado evolutivo de la simbiosis. Sirva como ejemplo el hecho de que el hongo no penetra por heridas producidas en las raíces (Harley y Smith, 1983).

Con respecto a la segunda hipótesis, hay que considerar el hecho de que la pared del ápice de la

hifa en desarrollo esta en contacto con el apoplasto ó matriz interfacial, esta matriz está formada por proteínas y polisacáridos proveniente del hospedador. Los materiales que componen la matriz parecen ser similares a los de la pared celular vegetal, por lo que se piensa que son paredes en desarrollo del hospedador (Bonfante-Fasolo, 1984), y la hifa previene que estos componentes se polimerizen y lleguen a formar la pared (Harley, 1986).

Sin embargo, una vez que la hifa ha penetrado en la raíz tiene un desarrollo longitudinal en dirección tanto acropétala como basipétala, por tanto independiente del estadio en que se encuentren las paredes celulares.

Por otro lado hay que tener en cuenta que tanto las circunvoluciones como los arbusculos, que se encuentran en el interior de la célula, tienen un periodo de vida corto antes de ser asimilados por el hospedador. Pero después de su desaparición, la misma célula hospedadora puede ser invadida de nuevo por otra circunvolución ó arbusculo (Bonfante-Fasolo, 1984).

La tercera hipótesis es que los hongos VA penetran en la raíz mediante enzimas hidrolíticos (pectinasas, celulasas y hemicelulasas), capaces de hidrolizar la pared celular.

Todavía no hay evidencias directas del papel de los enzimas hidrolíticos en los procesos de penetración, sin embargo, observaciones al microscopio electrónico han puesto de manifiesto que la penetración parece llevar consigo alguna degradación del material del hospedador que sugieren la existencia de una destrucción enzimática de la pared celular (Kaspari,

1975; Kinden y Brown, 1975; Bonfante-Fasolo, 1982).

5. Pared celular.

5.1. Composición de la pared celular.

En la célula vegetal hay dos tipos de pared bien diferenciados, una pared celular primaria que se caracteriza porque las células que la poseen presentan un crecimiento activo, y una pared secundaria característica de células cuyo crecimiento se detiene.

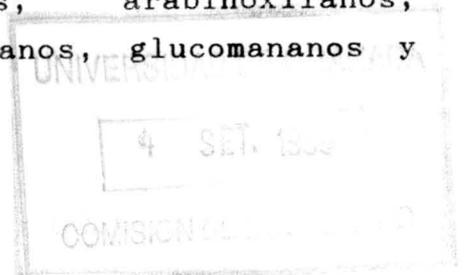
La pared celular primaria se encuentra constituida, principalmente por:

1. Polisacáridos.

Están formados por azúcares unidos mediante enlaces glucosídicos formando largas cadenas. Los tres tipos de polisacáridos que normalmente aparecen en las paredes celulares vegetales son la celulosa, hemicelulosa y sustancias pécticas.

La celulosa aparece en forma de agregados fibrilares cristalinos que le confieren a la pared la mayor parte de su enorme resistencia. Esta constituida por moléculas de glucosa unidas mediante enlaces tipo β 1-4 formando cadenas de celulosa que agrupadas dan lugar a una fibrilla elemental, y a su vez, un grupo de estas forman la microfibrilla que es el estado en el que se encuentra la celulosa en las paredes primarias.

Las hemicelulosas son compuestos más definidos que aparecen en las paredes celulares en forma amorfa ó paracristalina. Los xilanos, arabinoxilanos, galactomananos, glucuroarabinoxilanos, glucomananos y



xiloglucanos son los tipos más frecuentes de hemicelulosas. Todas las hemicelulosas, aunque pueden estar formadas por azúcares distintos, poseen una columna vertebral formada por una cadena plana de azúcares, unidos casi siempre mediante enlaces β 1-4, de la que pueden salir ramificaciones muy cortas. Además todas poseen alguna característica estructural que no les permite formar agregados como las cadenas de celulosa.

Las pectinas están formadas principalmente por ramnogalacturonanos, galacturonanos, galactanos, arabinanos y arabinogalactanos. Los ramnogalacturonanos están formados por largas cadenas de ácido galacturónico unidas mediante enlaces α 1-4, su componente principal son los ramnogalacturonanos I entre los que se encuentran intercalados algunos residuos de ramnosa unidos mediante enlaces α 1-2.

Los enlaces de las moléculas pécticas incluyen puentes de Ca y otros enlaces iónicos, puentes de hidrógeno, enlaces glucosídicos, enlaces ester y acoplamiento fenólicos. El análisis de los enlaces cruzados de la pectina es difícil de determinar debido a su gran diversidad. Dentro de esta variedad de enlaces, los más característicos son los formados por puentes de Ca, estos cationes forman complejos con los grupos carboxilo e hidroxilo de los restos de ácido galacturónico. Este tipo de enlace se da en las moléculas pécticas siempre que no posea cadenas laterales formadas por grupos metilesterificados. El grado de esterificación está controlado en la pared celular mediante la acción del enzima pectín esterasa, la cual cataliza la eliminación, al azar, de los grupos metilos facilitando, de este modo, la formación de enlaces cruzados mediante los iones Ca. Sin embargo,

hay moléculas pécticas, independientes de los iones Ca, que necesitan un pH bajo para que puedan formar agregados, condición que se puede dar en la estructura interna de la pared vegetal.

Los arabinogalactanos son polímeros de ácido galacturónico unidos a moléculas de arabinosa tanto lineal como ramificadamente.

Recientemente se han caracterizado y purificado cinco polisacáridos no celulósicos en la pared de plantas dicotiledoneas, xiloglucano, glucuroarabinoxilano, galacturonano, ramnogalacturonano I y ramnogalacturonano II. En plantas monocotiledoneas el contenido de polisacáridos pécticos es mucho menor, los componentes hemicelulósicos principales son los arabinoxilanos y los xiloglucanos y la pared celular tiene una mezcla de glucanos unidos con enlaces β 1-3 y β 1-4 (Darvill *et al.*, 1980).

2. Proteínas.

Constituyen aproximadamente un 10% de las paredes celulares primarias. La proteína más abundante de la pared se la ha denominado extensina, compuesta principalmente por hidroxiprolina que esta constituida por péptidos unidos por aminoácidos con restos fenólicos. A este tipo de péptido se le ha denominado isoditirosina.

3. Minerales.

Ciertas sustancias minerales, como la sílice y el carbonato cálcico, pueden formar parte de la pared celular. También en algunas paredes se detecta la presencia de taninos cuya función puede ser la de

conferir resistencia contra ataques de virus y hongos, y como agente disuasorio contra los insectos comedores de hojas.

4. Lípidos.

Formados por ácidos grasos de cadena larga, cuyo papel principal parece ser el de proteger la superficie de la planta de ataques enzimáticos.

5. Lignina.

Aparece en los últimos estadios de desarrollo de la pared celular, y su síntesis se debe a un mecanismo de detoxificación de sustancias fenólicas.

5.2. Estructura de la pared celular.

Albersheim (1976) propuso un modelo estructural de la pared en el cual las fibrillas de celulosa, formadas a su vez por cadenas de celulosa agregadas lateralmente mediante puentes de hidrógeno, están cubiertas completamente por una capa de xiloglucano de una molécula de espesor. Este compuesto se sitúa paralelamente al eje de la fibrilla de celulosa y está enlazado a ésta mediante puentes de hidrógeno que se establecen entre las moléculas de glucosa de ambos polisacáridos. Por el contrario, en el lado opuesto de la cadena de xiloglucano no es posible la formación de estos puentes, ya que están impedidos por las ramificaciones existentes formadas por unidades de xilosa, fucosa y galactosa. Gran parte de las moléculas de xiloglucano están enlazadas glucosídicamente en su extremo reductor a moléculas de arabinogalactano que presentan una disposición radial respecto al eje de las fibrillas de celulosa. Los extremos reductores de los

arabinogalactanos están unidos a las cadenas de ramnogalacturonano por un enlace glucosídico, que se cree que tiene lugar exclusivamente en las unidades de ramnosa. El último grupo de interconexiones implica las uniones proteína-polisacárido. Los residuos de hidroxiprolina de la proteína de la pared están glucosídicamente unidos a tetra-arabinósidos. Por último, las cadenas de arabinogalactano conectadas a los restos de serina de la proteína de la pared, parecen estar unidos a las moléculas de ramnogalacturonano mediante enlaces covalentes. La existencia de estos enlaces glucosídicos entre las proteínas y los carbohidratos de la pared confirman la hipótesis de Lamport quien en 1973 postulaba que la estructura de la pared celular primaria viene dada por una red compleja de carbohidratos y proteínas enlazadas covalentemente (Albersheim, 1976).

5.3. Enzimas degradativos de la pared celular.

Todos los estudios realizados apuntan hacia la existencia de enzimas degradativos de los polisacáridos que constituyen la pared celular de tejidos intactos (Cleland, 1971).

Se ha estudiado el papel de los enzimas hidrolíticos producidos por patógenos (celulasas, hemicelulasas y pectinasas) en la penetración activa de estos microorganismos en la pared celular de las plantas (Collmer *et al.*, 1982). Esta producción de enzimas hidrolíticos se ha observado no solo en microorganismos parásitos sino también en mutualistas (Martínez-Molina *et al.*, 1979). Estos enzimas están implicados en el proceso de infección de leguminosas por *Rhizobium* y en la infección de rye-grass por *Azospirillum* (Hubbel *et al.*, 1978; Umali-Garcia *et al.*,

1980).

5.4. Enzimas pectolíticos.

Dentro de los enzimas hidrolíticos caben destacar las pectinasas debido a la importancia que tienen en la fisiología y los cambios patológicos de plantas, así como por su producción en algunos microorganismos (Albersheim et al., 1969).

La mayoría de los hongos y bacterias fitopatógenas producen enzimas que degradan las sustancias pécticas (Albersheim y Anderson-Prouty, 1975). También se ha observado la producción de enzimas pectolíticos por microorganismos mutualistas (Martínez-Molina y Olivares, 1982).

Se han descrito, caracterizado y purificado numerosos enzimas pectolíticos.

El término pectinasa engloba a un grupo de enzimas depolimerasas que catalizan la hidrólisis de los enlaces glucosídicos α 1-4 en la molécula de ácido galacturónico de las sustancias pécticas, que según Demain y Phaff (1957) se dividen en cuatro grupos dependiendo de:

a. La preferencia del enzima por actuar sobre pectato sódico ó pectina.

b. La rotura de los enlaces glucosídicos es al azar ó en el extremo de la cadena.

A los enzimas que prefieren pectato sódico como sustrato se les denomina poligalacturonasas, y los que degradan el sustrato altamente esterificado (pectina),

polimetilgalacturonasas. El prefijo endo se le añade a los que rompen la cadena polisacarídica de forma indiscriminada.

Después de descubrir que los enzimas pectolíticos pueden romper los enlaces glucosídicos mediante β -eliminación, se amplió la clasificación llamando a estos enzimas pectato y pectín liasa. El grupo de enzimas pectolíticos incluye también la pectín esterasa que cataliza la de-esterificación de la pectina.

En síntesis los enzimas que catalizan la rotura de las moléculas de pectato sódico ó pectina son:

1. Pectín esterasa (PE; EC 3.1.1.11).
2. Endo-poligalacturonasa (endo-PG; EC 3.2.1.15).
3. Poligalacturonasa (PG; EC 3.2.1.63).
4. Endo-polimetilgalacturonasa (endo-PMG).
5. Polimetilgalacturonasa (PMG).
6. Pectato liasa (PAL; EC 4.2.2.9.).
7. Pectín liasa (PL; EC 4.2.2.10.).

5.4.1. Pectín esterasa.

Este enzima actúa sobre los grupos polimetil ester de los polímeros de ácido galacturónico, teniendo este un grado de polimerización de 10 ó más monómeros.

Este enzima no tiene una especificidad marcada respecto al alcohol mayoritario del ester, ya que también puede hidrolizar grupos etil, metil, propil ó alil ester. La de-esterificación de los grupos metil ester de la pectina produce cambios en la molécula dejando grupos carboxilos libres, esto explica la estabilidad de la pectina preparada en un medio alcalino. Este enzima cataliza la de-esterificación de

los grupos metil ester de la pectina que estan próximos a los grupos carboxilos libres.

En estudios conjuntos de pectín esterasa y liasa se comprobó que la actividad de la liasa era insignificante en comparación con la actividad de-esterificadora; además despues de adicionar la pectín esterasa, la actividad liásica se incrementa inmediatamente lo que sugiere que la mayoría de la actividad pectín esterasa tiene lugar en el extremo reductor de la molécula, la actividad remanente probablemente tendrá lugar cerca de los grupos carboxilos. La actividad inicial de la liasa esta limitada por la acción de la pectín esterasa, y el producto final de reacción de la liasa inhibe la acción de la pectín esterasa.

La acción de la pectín esterasa no produce de-esterificación completa de la pectina, sino que su acción se detiene cuando hay un cierto grado de esterificación de esta. Este grado de esterificación es dificil de precisar debido al error en los métodos analíticos utilizados y a la falta de homogeneidad de enzimas y sustratos.

Sobre la actividad pectín esterasa se produce inhibición por producto, que puede ser en algunos casos competitiva. Los cambios de pH y la presencia de sales, sobre todo ClNa, influyen notablemente sobre la actividad pectín esterasa. En efecto, los enzimas provenientes de plantas poseen el pH óptimo de actuación próximo a la región alcalina, por el contrario los provenientes de microorganismos, su pH óptimo de actuación se encuentra en la región ácida. Sin embargo, no siempre se cumple esta regla, ya que se han encontrado pectín esterassas provenientes de

microorganismos cuyo pH óptimo se encuentra próximo a 7. Del mismo modo la presencia de ClNa actúa preferentemente sobre la actividad de enzimas proveniente de plantas incrementando su actividad, mientras que no tiene una acción definida sobre la actividad de enzimas provenientes de microorganismos. Algunos agentes químicos como taninos y detergentes inhiben la actividad pectín esterasa aunque actúan de forma inespecífica, tanto sobre la actividad procedente de plantas como de microorganismos.

5.4.2. Endo-poligalacturonasa.

La endo-poligalacturonasa cataliza la hidrólisis al azar de enlaces glucosídicos α 1-4 de moléculas de ácido poligalacturónico, dando lugar a una disminución pronunciada de la viscosidad de la solución de sustrato por la rotura de la molécula, produciendo oligo-galactosiduratos como productos de reacción.

Aunque este es el esquema general de actuación de estos enzimas, su modo de acción no es idéntico en todos los casos, hay diferencias en el grado de disminución de viscosidad producido por endo-poligalacturonasas, no solo con distinto origen de procedencia, sino también en enzimas procedentes de la misma especie biológica. Un descenso pronunciado de la viscosidad indica que el enzima inicialmente actúa sobre las moléculas de sustrato al azar, después su actuación pasa a ser puntual a lo largo de la cadena de ácido poligalacturónico, actuando sobre los productos de reacción hasta que encuentra una barrera (un residuo de azúcar neutro), con lo que el enzima pasa a actuar sobre otra molécula de ácido poligalacturónico (English *et al.*, 1972).

La endo-poligalacturonasa actúa preferentemente sobre sustratos de alto peso molecular. También puede actuar sobre oligómeros de dos, tres, y cuatro monómeros provocando una disminución de la viscosidad (Rexová-Benková, 1973). Si bien, como se observó en un estudio de cinética de reacción, se producen una serie de fases en la actuación del enzima en las que la actividad descendía a medida que el grado de polimerización del sustrato disminuía. Este efecto se atribuye a la protección de los grupos terminales en el extremo reductor. En sustratos con bajo peso molecular el enzima actúa preferentemente sobre los enlaces próximos al extremo reductor.

Generalmente el pH óptimo de la mayoría de las poligalacturonasas con acción endo (poligalacturonasa y polimetilgalacturonasa) oscila entre 4 y 6.5. Además estas actividades dependen del tipo de sustrato, se ha comprobado que a pH=4.4 la endo-poligalacturonasa actúa sobre sustratos de alto peso molecular y a pH=3.5 actúa en sustratos de menor peso.

Una de las razones que explican el alto pH óptimo de actuación con sustratos de peso molecular elevado es la posible agregación de estos sustratos, a valores de pH bajos, como consecuencia de la formación de puentes de hidrógeno entre las moléculas. En todos los sustratos la adición de ClNa a la mezcla de reacción produce un incremento de la actividad enzimática y una disminución del pH óptimo de actuación (Pressey y Avants, 1971). Al añadir ClNa, el cambio de pH de actuación hacia valores más bajos se debe a la eliminación de los enlaces de hidrógeno entre moléculas.

5.4.3. Poligalacturonasa.

La poligalacturonasa cataliza la hidrólisis de enlaces terminales α 1-4 de cadenas de ácido galacturónico, dando como producto ácido galactopirranurónico. Este enzima a diferencia de la endo-poligalacturonasa está capacitado para actuar frente a sustratos con bajo peso molecular.

Se encuentra tanto en plantas como en microorganismos y cataliza la rotura de los enlaces glucosídicos empezando por el extremo no reductor, no actuando frente a sustratos que contienen un grupo 4-deoxi-L-tri-hex-4-enopiranosiluronato en el extremo no reductor formado por la β -eliminación alcalina (Hatanaka y Ozawa, 1969).

La poligalacturonasa no degrada la pectina completamente, su actividad se restringe a los enlaces α 1-4 entre residuos de galactopiranosiduronatos, sin embargo esto depende del tipo y procedencia de la pectina y de la purificación enzimática, ya que esta puede estar contaminada con polimetilgalacturonasa (Ayres *et al.*, 1952).

La degradación de pectato sódico por la poligalacturonasa se realiza mediante un mecanismo secuencial, el enzima no permanece asociado con la primera molécula de sustrato, sino que rompe diferentes moléculas.

5.4.4. Endo-polimetilgalacturonasa.

Más tarde se descubrió un enzima capaz de degradar cadenas de ácido galacturónico altamente esterificados mediante una acción tipo endo-poligalacturonasa, si

bien este enzima era inactivo frente a sustratos no esterificados. El enzima con esta especificidad de sustrato en la clasificación de Demain y Phaff (1957) se designa como endo-polimetilgalacturonasa.

Su existencia se cuestionó durante mucho tiempo, ya que cualquier enzima específicamente degradativo de sustratos esterificados, podía hacerlo mediante una β -eliminación (Albersheim *et al.*, 1960). Sin embargo en numerosos cultivos de microorganismos se encontraron enzimas que degradaban sustratos esterificados mediante un mecanismo diferente al de la β -eliminación, pues no se observó un incremento de absorbancia a 235 nm característico de los enzimas que actúan por este mecanismo.

5.4.5. Polimetilgalacturonasa.

La polimetilgalacturonasa cataliza la hidrólisis de cadenas de ácido galacturónico altamente esterificados mediante la hidrólisis de enlaces terminales α 1-4 de las cadenas, empezando por el extremo no reductor.

Su existencia, al igual que la del enzima endo-polimetilgalacturonasa se cuestionó durante mucho tiempo, debido a esto la bibliografía al respecto es escasa y contradictoria.

5.4.6. Pectato liasa.

Las liasas son enzimas que catalizan la rotura de enlaces glucosídicos α 1-4 en cadenas de ácido galacturónico, mediante el mecanismo de β -eliminación, en un medio alcalino ó neutro y temperatura elevada. En estas condiciones, en las cadenas de ácido

galacturónico después de su rotura, se produce un azúcar conjugado en el extremo no reductor del grupo 4-deoxi-L-tri-hex-4-enopiranosiluronato.

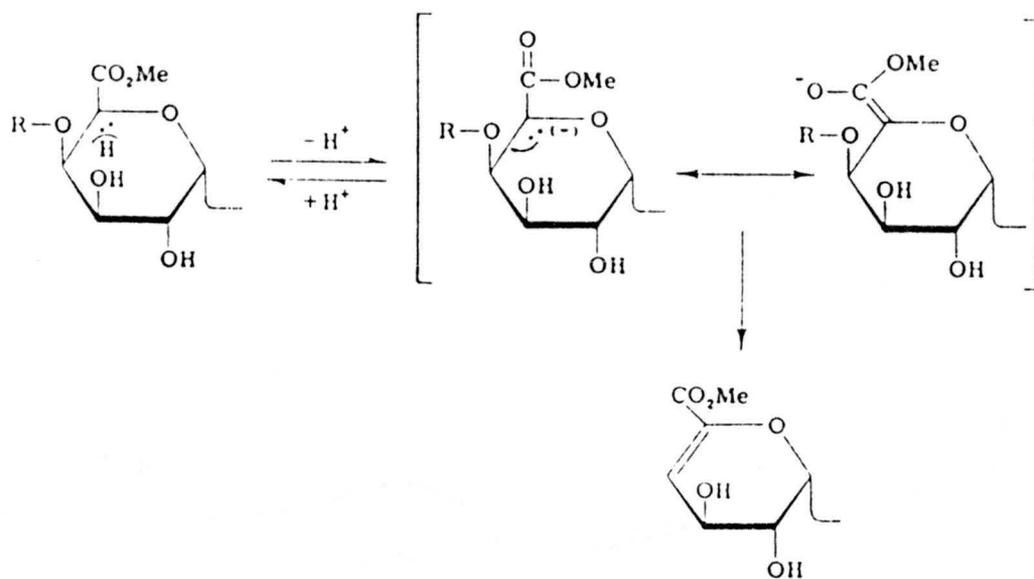


Figura 1. Mecanismo de actuación de la β -eliminación.

La β -eliminación (Figura 1) consiste en un cambio del átomo de hidrógeno del carbono 5, que está activado por un grupo donador de electrones, al carbono 6 en presencia de un aceptor de electrones como catalizador, estabilizándose el ión intermedio formado mediante la rotura del enlace C-O en posición β . La pérdida de sustituyentes en el carbono 4 y en el carbono 5 da lugar a la formación de un doble enlace. Los grupos carboxilos libres del carbono 6 no son capaces de activar suficientemente el átomo de hidrógeno del carbono 5 en un medio alcalino. La conjunción del doble enlace con el grupo carboxilo del carbono 5 en los productos de la acción del enzima son los que tienen

una gran absorción a 235 nm.

En el proceso de degradación de sustratos no esterificados ó con poco nivel de esterificación por pectato liasas, los enlaces glucosídicos pueden romperse al azar ó en un extremo, empezando por el extremo reductor de la molécula. Sin embargo, la rotura de sustratos altamente esterificados por pectín liasas solamente puede hacerse al azar, ya que la pectín liasa no puede romper los enlaces glucosídicos terminales.

El sustrato óptimo de la pectato liasa es el ácido galacturónico no esterificado, sin embargo se han descrito pectato liasas que actúan sobre sustratos esterificados aunque con una actividad menor (Bateman, 1966). Las distintas pectato liasas difieren en su acción frente a sustratos poliméricos u oligoméricos, poseen un pH óptimo alto y requerimientos de iones Ca para el mantenimiento de su actividad (Nagel y Vaughn, 1961).

5.4.7. Pectín liasa.

Las pectín liasas preferentemente actúan al azar sobre moléculas de ácido galacturónico altamente esterificado. El efecto del grado de esterificación en la afinidad del enzima por el sustrato se atribuye a una mayor presencia de puntos de actuación de este. La mayoría de las pectín liasas no actúan sobre moléculas de pectato (Albersheim *et al.*, 1960) a excepción de algunas pectín liasas de *Fusarium* (Sherwood, 1966) y *Rhizoctonia* (Bateman, 1966).

El grado de rotura de enlaces glucosídicos en sustrato altamente esterificado decrece al disminuir su grado de polimerización. Un factor importante que

afecta la actividad enzimática es la distribución de los grupos esterificados en la cadena de ácido galacturónico. En estudios de la cinética de acción de pectín liasa sobre pectina con diferentes grados de esterificación y con una distribución diferente de los residuos esterificados, se observó que la actividad pectín liasa es mayor cuando los sustratos están esterificados y con una distribución homogénea, que cuando la distribución de estas unidades es al azar.

El grado de esterificación y la distribución de los residuos esterificados de la pectina, también afectan el pH óptimo de actuación de las pectín liasas. Con sustratos altamente esterificados, el rango de pH óptimo de acción enzimática oscila entre 5.1 y 6.6 (Nagel y Vaughn, 1961). Cuando decrece el grado de esterificación el pH óptimo disminuye y esta disminución se hace más pronunciada cuando los residuos esterificados del sustrato tienen una distribución al azar.

Los iones Ca activan la mayoría de las pectín liasas, este efecto depende del pH y del grado de esterificación del sustrato (Ishii y Yokotsuka, 1972). El efecto del ión de Ca es menor cuando el sustrato está altamente esterificado. Por otra parte la acción de los iones Ca también depende del pH, ya que tiene un efecto activador a pH entre 7.5 y 8.5, mientras que a pH entre 6.5 y 5.8 posee un efecto inhibitorio y a pH entre 5.3 y 4.3 no tiene efecto sobre la actividad enzimática. Según Edstrom y Phaff (1964), este efecto se da al unirse los iones con los grupos carboxilos libres, decreciendo el posible efecto que pueda tener la carga negativa.

El nivel de producción de pectín liasa por *Erwinia*

se incrementa en presencia de aislados de pared celular de plantas, poligalacturonasas y oligogalacturonasas, y se inhibe en presencia de glucosa ó con concentraciones de ácido galacturónico no saturado en los carbonos 4-5 (Collmer y Keen, 1986).

5.5. Secuencia de actuación de los enzimas pectolíticos.

Todavía no se conoce la secuencia de actuación de los diferentes enzimas pectolíticos. Sin embargo, en base a los pocos conocimientos que existen acerca del mecanismo de acción de estos enzimas, se ha pretendido establecer el siguiente esquema teórico de actuación (Van Gijsegem, 1986).

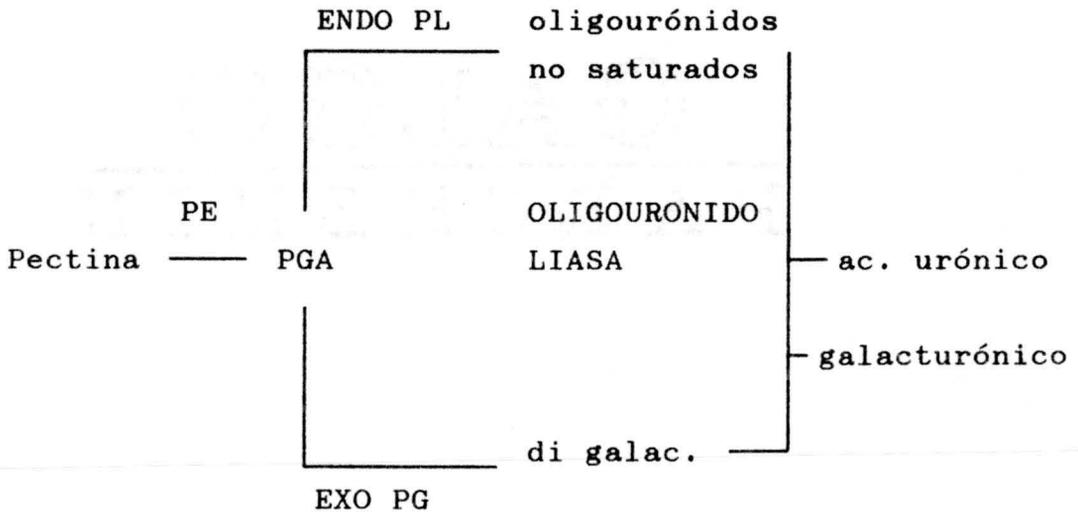


Figura 2. Secuencia de actuación de los enzimas pectolíticos.

Como se observa en la figura 2, la degradación de la pectina implica una demetilación del ácido

poligalacturónico mediante la acción de la pectín esterasa, con la consiguiente rotura de este para dar lugar a ácidos urónicos o galacturónicos. Este proceso se puede dar de dos formas:

1. Mediante una reacción transeeliminativa catalizada por la pectato liasa, produciendo oligómeros con un ácido urónico no saturado en el extremo no reductor.

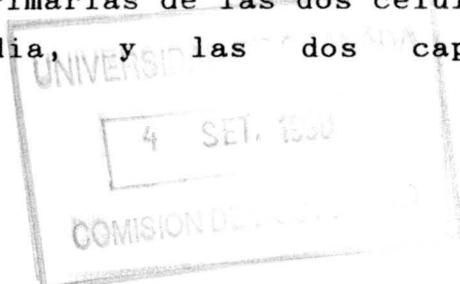
2. Mediante una reacción hidrolítica catalizada por poligalacturonasas, las cuales producen ácidos digalacturónicos.

Estos tipos de oligómeros son atacados por oligouronido liasas produciendo ácidos urónicos y galacturónicos.

5.6. Origen y extensión de la pared.

En las células vegetales la pared nueva se origina durante la citocinesis. La creación de la pared comienza generalmente por la formación de un fragmoplasto en el plano ecuatorial del huso fibroso, que se extiende entre los dos núcleos hijos. Sin embargo, la primera manifestación visible de la pared celular es la llamada placa ecuatorial que progresa a través del plano ecuatorial hasta alcanzar las paredes celulares laterales. Esta placa la forman vesículas procedentes del aparato de Golgi, fragmentos del retículo endoplasmático y muchos ribosomas.

En esta fase la placa celular consta de tres capas: la central, no celulósica y que persiste como división entre las paredes primarias de las dos células hijas llamada lámina media, y las dos capas



conteniendo celulosa a cada lado de la lámina media que son los comienzos de la pared celular primaria.

Hay dos características importantes de la estructura de la pared celular que son, los puentes de hidrógeno formados entre los principales constituyentes hemicelulósicos y las microfibrillas de celulosa, y la unión covalente de la hemicelulosa con la pectina y extensina formando un enlace cruzado. Se propuso que la extensión de la pared se produce por la rotura de los puentes de hidrógeno existentes en la interfase celulosa-xiloglucano, promovida por la acidificación de la pared causada por las auxinas (Kawase, 1979). Estudios más recientes (Darvill *et al.*, 1977) nos indican que los polisacáridos pécticos neutros o ácidos están interconectados mediante enlaces covalentes, pero de los enlaces covalentes de estos polisacáridos con la hemicelulosa se conoce poco. No parece que se establezca ningún enlace covalente entre las glucoproteínas de la pared, extensina, con ninguno de los otros polímeros de la pared celular.

Los polímeros pécticos de paredes celulares de plantas en crecimiento poseen cadenas laterales fenólicas, así como residuos de tirosina de la extensina (Fry, 1982) y de ácido ferúlico. Las cadenas laterales fenólicas son un componente minoritario de la pared, pero juegan un papel importante en la estructura de esta mediante la formación de enlaces inter-poliméricos, ya que reducen la extensibilidad de la pared en crecimiento, lo cual puede estar relacionado con el control del crecimiento celular.

Hay autores que consideran que los enlaces covalentes limitan la extensibilidad de la pared, y se requiere la rotura enzimática de estos enlaces para

relajar su estructura. Esta rotura se realiza en los enlaces glucosídicos establecidos entre residuos de pectina y de hidroxiprolina de la proteína de la pared (Lampert y Catt, 1981), en los enlaces formados por la oxidación de residuos de ácido ferúlico unidos covalentemente a puentes diferulatos y en los enlaces cruzados interpolipeptídicos formados por isoditirosinas (Fry, 1983). Otros autores Preston (1979) y Sellen (1980), defienden la idea de que en el proceso de crecimiento celular intervienen una mezcla de procesos mecánicos y enzimáticos.

La presencia de iones influye en la extensibilidad de la pared celular de plantas superiores. En tratamientos de secciones de coleoptilos con iones Ca se producía una inhibición del crecimiento inducido por las auxinas (Cleland y Rayle, 1977), mientras que si los coleoptilos eran tratados con iones K se producía una inducción de la relajación de la pared celular (Tagawa y Bonner, 1957). La rigidez producida por el calcio, se pensó inicialmente que era debida a la formación de enlaces cruzados entre este ión y los grupos carboxilos de la pectina. En investigaciones posteriores se observa que el calcio no decrece la extensibilidad de la pared celular, sino que, el principal efecto del calcio es impedir la extensión inducida por pH ácido (Tepfer y Taylor, 1981). Esta actuación puede ser debida a que el calcio bloquea específicamente la acción de los enzimas de pared activados por un bajo pH, o porque el calcio directamente forma enlaces cruzados en la pared, y los sitios de enlace son accesibles a la acción enzimática solamente a pH ácido (Bates y Ray, 1981).

La auxina en algunos tejidos es capaz de estimular el alargamiento de la célula. El mecanismo por el cual

la auxina y otras hormonas actúan como reguladores del crecimiento no se conoce. En un modelo de acción de la auxina se postulaba que esta interfiere con los enlaces cruzados de calcio en la pared celular. Este modelo se descartó cuando Cleland y Rayle (1977) observaron que los iones no se eliminan de la pared de coleótilos en tratamientos a los que se les añadió auxina. Sin embargo, las técnicas utilizadas para medir el cambio de afinidad del calcio detectan una mayor o menor presencia de este (el calcio no puede salir al estar la cutícula intacta), pero no detectan una redistribución de este. De hecho Slocum y Roux (1983) observaron una redistribución del calcio en coleótilos, situándose una mayor concentración de calcio en los lugares donde no se da crecimiento.

Otro mecanismo posible de actuación de las auxinas es mediante una activación de la bomba de protones existente entre la membrana y el plasmalema de la célula vegetal, con lo que se reduce el pH de la pared celular (Cleland, 1975) hasta unos valores cercanos a 5, el cual es el pH óptimo de actuación de los enzimas responsables del alargamiento de la pared. Este mecanismo se produce por una pérdida de cadenas laterales de arabinosa de la cadena de xilanos, en concreto del glucuronoarabinoxilano, que hace disminuir la viscosidad de la pared. A continuación se produce una rotura de las cadenas laterales de arabinogalactano conectando las moléculas de xilano con la red de extensina.

El metabolismo de la pectina puede ser importante para el estado inicial del crecimiento inducido por auxinas, ya que se ha encontrado una correlación entre la sensibilidad de la auxina y el pH ácido en diferentes zonas de la pared con el contenido en

pectina de esta.

La viscosidad de la pectina y el contenido en calcio de la pared están correlacionados inversamente con el grado de crecimiento, sin embargo con la auxina se detecta un efecto directo.

5.7. Regulación de enzimas pectolíticos.

Los microorganismos patógenos son capaces de secretar enzimas que degradan la pared celular de plantas, contribuyendo a la invasión de células de la planta. Los enzimas degradativos de los polisacáridos pécticos son los primeros enzimas degradativos secretados por patógenos de plantas (Terry *et al.*, 1981), y su acción es necesaria para la acción efectiva de los otros enzimas degradativos de pared secretados por microorganismos patógenos.

Hay bastantes estudios sobre los procesos de inducción y represión catabólica de los enzimas pécticos producidos por microorganismos patógenos. En efecto, estos enzimas se incrementan cuando se adiciona ácido galacturónico al medio, pero la producción de estos enzimas disminuye en presencia de un exceso de sustrato. Debido a la accesibilidad de los polímeros pécticos en la pared celular primaria se produce una inducción del ataque enzimático y la consecuente descomposición de la pectina. Los enzimas pécticos son los primeros enzimas hidrolíticos que se inducen.

El potencial de inducción de los enzimas pécticos por la pared celular de plantas susceptibles y no susceptibles a la infección por microorganismos patógenos es similar, lo que indica una accesibilidad parecida de los polímeros pécticos a los enzimas,

independientemente de la composición péctica de esta pared lo que parece indicar una falta de especificidad en la inducción por células vegetales (Anderson, 1978). Si hay diferencias, en cuanto a la capacidad de inducir mayor cantidad de enzimas pécticos por las paredes celulares de plantas susceptibles respecto a las no susceptibles. Sin embargo, la diferencia de producir mayor o menor cantidad de enzimas pécticos no está relacionada con la susceptibilidad y tolerancia de las plantas hospedadoras (Cooper *et al.*, 1981; Goodenough y Kempton, 1976). Sin embargo, estos hechos deben de interpretarse cuidadosamente, pues por un lado depende del tipo de enzimas pécticos que produzca el microorganismo, y por otro lado de los sistemas de defensa que posea la planta.

En efecto, la síntesis de enzimas pécticos por patógenos no es necesariamente activa en el hospedador, ya que se ha encontrado que los tejidos hospedadores tienen inhibidores de estos enzimas. Hay que destacar que varias especies de plantas poseen en sus paredes celulares, proteínas capaces de inhibir completamente los enzimas degradativos de polisacáridos producidos por microorganismos patógenos (Fisher *et al.*, 1973). La mayoría de estos inhibidores son glucoproteínas que están unidas a los polisacáridos y son efectivas frente a la producción de endo-poligalacturonasas de microorganismos patógenos, sin embargo se ha encontrado que son inefectivas frente a poligalacturonasas y otros enzimas pécticos. En algunos casos se ha comprobado, que la mayor proporción de proteínas inhibidoras de las poligalacturonasas no está directamente relacionada con la diferente resistencia de las plantas a ciertas razas de patógenos. Estos hechos indican que, posiblemente, debe haber otros tipos de mecanismos de defensa de la planta

frente al ataque de microorganismos patógenos.

Entre estos mecanismos de protección de las plantas, el calcio parece jugar un papel protector en la acción de los enzimas pectolíticos producidos por algunos microorganismos patógenos (McGuire y Kelman, 1984). En efecto, se ha observado que variedades de plantas resistentes a la infección por patógenos experimentan un incremento en su concentración de Ca. Esos resultados sugieren que uno de los mecanismos de defensa de la planta frente a la infección es la conversión de ácido péctico en pectato cálcico, el cual es resistente a la acción de los enzimas pécticos. Esta hipótesis viene corroborada por el hecho de que la infección causada por *Fusarium oxysporum* en mutantes de tomate deficientes en calcio fué muy elevada, mientras que la enfermedad desapareció cuando las plantas poseían una concentración de Ca muy elevada (Corden, 1965). Las plantas deficientes en Ca contenían más pectina soluble en agua que las plantas normales. En plantas infectadas se observa una acumulación de iones Ca cerca de las lesiones, así como un incremento en la tasa respiratoria de la planta infectada (Maher y Kelman, 1986).

En base a estos datos se ha establecido la idea de que el incremento en la tasa respiratoria en los lugares de la infección tiene como consecuencia un incremento de Ca, y posiblemente, de otros cationes los cuales activan la pectín esterasa de las paredes celulares del hospedador. La pectín esterasa elimina los grupos ester de la pectina en la zona afectada. El ácido péctico formado de esta manera da con el calcio u otros cationes, pectatos insolubles los cuales son más resistentes a la acción de la polimerasa (Collmer y Keen, 1986).

Ademas de estos mecanismos protectores existe la posibilidad del efecto de otros inhibidores, tales como compuestos fenólicos oxidados (Byrde, 1963; Deverall y Wood, 1961), ácidos clorogénico (Alberghina, 1964) y caféico y sobre todo fitoalexinas.

Las fitoalexinas son compuestos antimicrobianos de bajo peso molecular que se sintetizan y acumulan en la planta después de su exposición a un microorganismo. La acumulación de fitoalexinas en el lugar de la colonización es un mecanismo por el cual la planta resiste el ataque de un patógeno (si bién, no es el único mecanismo de defensa en las plantas). Estos compuestos no se encuentran en las plantas sanas, sino solo cuando se produce la colonización, acumulándose en gran cantidad en el lugar de la misma.

La capacidad de formar fitoalexinas se encuentra extendida tanto en plantas mono como dicotiledoneas, y constituyen un grupo heterogéneo de sustancias pertenecientes a varias clases de productos naturales. Hay más de 150 fitoalexinas conocidas distribuidas entre isoflavonoides, sesquiterpenos, diterpenos etc. (Bailey y Mansfiels, 1982; Darvill y Albersheim, 1984).

Se ha puesto de manifiesto en numerosos trabajos (Darvill y Albersheim, 1984), la inducción de la síntesis de fitoalexinas por enzimas pécticos y sus productos de degradación. Utilizando enzimas pécticos se ha observado la producción de inductores de fitoalexinas a partir de paredes celulares de plantas, encontrándose que los oligogalacturonatos con más de dos monómeros resultantes de la hidrólisis enzimática, son inductores muy potentes de fitoalexinas, sobre todo de gliceolina (isoflavonoide) (Jin y West, 1984; Nothnagel et al., 1983). La capacidad inductora de

estas moléculas desaparece mediante una metilesterificación o mediante reducción de los grupos galacturonosil carboxilos, indicando que el inductor debe de poseer una carga negativa.

La inducción de fitoalexinas durante la patogénesis puede ocurrir como respuesta a los oligogalacturonatos producidos por los enzimas pécticos del patógeno, ó por los enzimas pécticos activados en el hospedador (Darvill y Albersheim, 1984). Sin embargo, la actividad de estos inductores es difícil de conciliar con la capacidad patogénica de los microorganismos, que son sensibles a la acción de las fitoalexinas producidas por las plantas hospedadoras (Lyon, 1984). Es posible, no obstante, que la importancia de los inductores oligosacarídicos radique en su acción combinada con otros factores provocando un efecto inductor de fitoalexinas más potente (Davis *et al.*, 1986).

La producción de fitoalexinas por micorrizas VA se puso de manifiesto en 1984 (Morandi *et al.*, 1984), en concreto la gliceolina, la cual es una fitoalexina con un poder antifúngico muy elevado. Sin embargo, las cantidades de glíceolina que se detectaron en raíces micorrizadas fueron muy pequeñas si se compara con las producidas por otros inductores abióticos (SO_4Cu) ó bióticos (nematodos); sin embargo, hay que tener en cuenta, por un lado, que la extracción de gliceolina de los patógenos se hace en tejidos donde se acumula ó se centra la enfermedad y por otro el carácter simbiótico de la colonización VA.



II. OBJETO E INTERES DEL TRABAJO

II. OBJETO E INTERES DEL TRABAJO

Durante estos últimos años se ha puesto de manifiesto la importancia que juegan las micorrizas vesículo-arbusculares en el crecimiento y nutrición de las plantas, especialmente a través de un incremento en la captación de fósforo a partir del suelo dando lugar a un mayor crecimiento de las mismas. Sin embargo, los niveles de infección alcanzados por las distintas especies o variedades vegetales son diferentes, con la consiguiente repercusión en la efectividad de la simbiosis VA. Logicamente, el establecimiento de una simbiosis VA eficiente supone la expresión de una serie de propiedades propias del hongo, del hospedador o de los dos conjuntamente. Por lo que los mecanismos de penetración y desarrollo del hongo VA dentro de la planta hospedadora, van a ser factores importantes para que se de una simbiosis VA efectiva.

Se ha descrito que la penetración del hongo en la raíz hospedadora puede llevarse a cabo de forma inter o intracelular. Trás la penetración, el endofito VA se extiende de forma inter o intracelular a lo largo de la corteza radical. El desarrollo intercelular de la hifa conlleva unas modificaciones estructurales y morfológicas tales como, la dilatación de los espacios intercelulares, el estrechamiento y desaparición parcial de la lámina media y la aparición de una matriz interfacial osmófila de material fibroso rodeando la hifa. Dichas modificaciones no parecen afectar la integridad de la pared celular, sin embargo el desarrollo intracelular del hongo dentro de la raíz si provoca una desorganización en la estructura de la pared vegetal, en los puntos en los que es atravesada por la hifa en su paso de una célula a otra contigua. La hifa nunca penetra el plasmalema de la célula

hospedadora, el cual se invagina al contactar con la hifa que ha penetrado su pared celular.

Se han apuntado diversas hipótesis sobre el mecanismo de penetración y desarrollo radicular del hongo VA, intentando explicar el proceso de ruptura de la pared celular, si bien ninguna de ellas aporta suficientes pruebas a favor.

La mayor parte de bacterias y hongos fitopatógenos producen enzimas hidrolíticos (pectinasas, celulasas y hemicelulasas) que degradan los componentes estructurales de las paredes vegetales. Este tipo de actividades enzimáticas no solo se han observado en parásitos, sino también, en microorganismos mutualistas. Aunque los endofitos VA son clasificados como mutualistas tienen algunas similitudes con los parásitos obligados y algunos trabajos hacen suponer, que el mecanismo de penetración del endofito VA en la célula de la raíz hospedadora sea principalmente enzimático, pero hasta el momento no existen estudios que impliquen directamente los enzimas hidrolíticos en el proceso de penetración por parte de hongos VA.

Dentro de esta hipótesis se encuadra este trabajo, cuyo objetivo principal es determinar la posible participación de enzimas pectolíticos en los procesos de penetración y desarrollo del hongo en la planta hospedadora. Por ello, este trabajo ha estado dirigido a detectar y valorar a partir de estructuras fúngicas (esporas y micelio externo) y de raíces micorrizadas los enzimas: pectín esterasa, endo-poligalacturonasa, poligalacturonasa, endo-polimetilgalacturonasa, polimetilgalacturonasa, pectato y pectín liasa; así como la repercusión de estos en el proceso de micorrización.



III. MATERIALES Y METODOS

III. MATERIALES Y METODOS.

1. Parte general.

1.1. Obtención de suelos desprovistos de propágulos de micorrizas VA.

El suelo utilizado en cada ensayo, se empleó mezclado con arena de cuarzo, libre de nutrientes, en la proporción 1/1 o 1/9 (v/v) con objeto de mejorar su textura. Esta mezcla se tinalizó, a vapor fluente una hora, durante tres días consecutivos. Como se trataba de experimentos en los que sólo se necesitaba eliminar la población de endofitos VA, una vez esterilizado se le añadió un filtrado del suelo, utilizado como inóculo, sin esterilizar. Tal filtrado se obtiene dejando en maceración durante dos o tres horas, a temperatura ambiente, suelo y agua (en proporción 1/1, v/v). Después de una primera fase de agitación la mezcla se mantiene en reposo al objeto de que decante la fracción más gruesa y el sobrenadante se somete a una doble filtración a través de papel Whatman n^o 1. El filtrado se adiciona al suelo tinalizado con lo que se restituye nuevamente el componente biológico exento de propágulos formadores de micorrizas VA.

1.2. Tratamientos biológicos.

1.2.1. Inoculación con hongos formadores de micorrizas VA.

Los hongos VA elegidos para los ensayos realizados en este estudio, fueron las especies *Glomus mosseae* y *Glomus fasciculatum*.

La razón para seleccionar el género *Glomus radica*

en su abundancia en la mayoría de los habitats cultivables, de nuestra región.

El inóculo utilizado procedía siempre de la colección de la Estación Experimental del Zaidín. Para su obtención, se inocularon esporas a plántulas que se cultivaron, utilizando como sustrato una mezcla de suelo-arena estéril 5/2 (v/v), en condiciones controladas de invernadero. Al cabo de unos 4-6 meses, y después de haber determinado que la micorrización era adecuada, se eliminó la parte aérea, y el suelo en donde se había desarrollado la micorriza se conservó en bolsas de plástico a 5⁰C durante varios meses, antes de ser utilizado. En este suelo se habían desarrollado hifas (micelio generado a partir de la raíz colonizada), esporas y esporocarpos. Cada una de estas fracciones, ó sea el micelio (tanto dentro como fuera de la raíz) y las esporas (en forma de clamidosporas ó englobadas en esporocarpos), son generadoras potenciales de biomasa fúngica al colonizar una raíz susceptible, en presencia de la cual se repetiría nuevamente el ciclo, único capaz de la reproducción del microsimbionte.

Así pues, la mezcla suelo con raíces colonizadas con *Glomus*, obtenido como se ha descrito, fué el inóculo-suelo utilizado en los ensayos de este trabajo.

Este inóculo se aplicó tanto en semillero como en macetas de cultivo definitivo. Una alícuota del mismo (1 g/100 g de suelo) se depositó sobre una capa de suelo-arena estéril mezclándose con ella. En la superficie se depositaron las semillas esterilizadas (cubriéndose con una capa fina de arena) donde germinaron y crecieron en condiciones controladas de humedad y temperatura.

1.2.2. Recolección de esporas de G. mosseae en muestras de suelo rizosférico.

Esta operación se llevó a cabo por la técnica de decantación y tamizado húmedo descrita por Gerdemann y Nicolson (1963). Para ello, se toma una alícuota de suelo procedente del stock de inóculos de unos 50 a 100 g, se homogeniza adecuadamente en un recipiente que contiene aproximadamente 1 l de agua tibia, se deja decantar unos segundos y se pasa por un tamiz de 700 μm de luz de malla procurando mantener un ritmo uniforme de filtrado; de este modo, las partículas de suelo más pesadas quedan retenidas en el recipiente mientras que la mayor parte de las esporas se vierten sobre el tamiz. Este retiene fragmentos de raíz ó de micorrizas y partículas de materia orgánica de tamaño relativamente grande, dejando pasar las esporas sueltas. El filtrado se recoge en probeta de 1 l, se agita y, tras unos segundos de decantación, se hace pasar de nuevo por un tamiz de 250 μm de luz de malla. La operación se repite sobre un tamiz de 100 μm . En el presente trabajo siempre se resuspendió el contenido del primer recipiente en agua tibia, repitiéndose todo el proceso descrito anteriormente.

En resumen, en el primer tamiz quedan retenidas raíces, esporocarpos y micelio externo, que casi siempre lleva esporas unidas, en el segundo quedan esporocarpos y micelio con esporas y en el tercero , esporas sueltas.

1.2.3. Aislamiento y esterilización de esporas.

Para llevar a cabo el aislamiento, el contenido de cada uno de los tamices se recoge en vasos de precipitado y se vierte sobre una placa transparente

con surcos concéntricos excavados (semejante a la descrita por Doncaster en 1962). Estos surcos impiden excesivos desplazamientos de las esporas, ya que cuando se depositan no pasan de un surco a otro, lo que facilita su aislamiento. Este se realizó con microscopio binocular de disección (30 a 40 aumentos).

A partir de placas de recuento, se aislaron esporocarpos y clamidosporas de *G. mosseae*. Mediante unas pinzas de relojero, los esporocarpos se depositaron en un papel de filtro humedecido colocado en una placa Petri. Estos esporocarpos se mantenían en cámara de 4⁰C durante 4 semanas, ya que parece ser que este tratamiento mejora la germinación posterior de las esporas (Hepper y Smith, 1976). Transcurrido este tiempo se llevaba a cabo una disección del esporocarpo quedando las esporas en libertad. Una vez libres se tomaban con una pipeta capilar y se transferían a nuevos papeles de filtro humedecidos.

Para llevar a cabo la esterilización superficial de las esporas (Mosse, 1962), se sometieron durante 20 minutos a la acción de una solución esterilizante y, posteriormente, se lavaron abundantemente con agua estéril. La composición de la solución esterilizante es la siguiente:

Cloramina T.....	2 g
Estreptomina.....	20 mg
Tween 80.....	trazas
Agua.....	100 ml

1.2.4. Germinación de esporas.

Esta técnica se llevó a cabo en placas Petri que contenían 15 ml de agar-agua (Agar Difco-Bacto) al 1% a

pH=7. Sobre el agar se depositaron, aproximadamente, unas 5-10 esporas esterilizadas en superficie y se incubaron en una estufa a 23-25⁰C. Con esta técnica se consigue que las esporas germinen y se inicie el desarrollo del micelio. Ello permite estudiar la influencia de diversos metabolitos sobre la germinación.

1.2.5. Aislamiento de micelio.

Para la obtención de micelio se utilizó un método descrito por Wyss y Wiemken (1988) en el cual se ponían plantas jóvenes en estrecho contacto con raíces de plantas que poseían un buen nivel de micorrización. Para ello se diseñó unos contenedores en los que se separan las raíces inoculadas y no inoculadas mediante una tela (60 μ n de luz de malla) por la que pueden pasar las hifas del hongo pero no las raíces. Estos contenedores permiten una alta y rápida infección de las raíces de las plantas jóvenes, al igual que formación de gran cantidad de micelio externo.

Mediante unas pinzas el micelio se depositó en un papel de filtro humedecido, colocado en una placa Petri. Este micelio se colocó sobre un filtro de Millipore (0.45 μ) y se lavó abundantemente con agua estéril y se conservó en frigorífico a una temperatura de -20⁰C hasta su utilización.

1.3. Plantas y condiciones de cultivo.

En los ensayos se han utilizado las siguientes plantas: Alfalfa (*Medicago sativa*), lechuga (*Lactuca sativa*) y maíz (*Zea mays*).

Las semillas se esterilizaron con Cl₂Hg al 2.5%

durante 12 minutos, pasado este tiempo las semillas se lavaron sucesivas veces con agua estéril. Se mantenían durante 2 horas en imbibición en agua estéril y posteriormente, se colocaban en una placa Petri con un disco de papel de filtro humedecido en condiciones estériles. Las placas se mantuvieron a 28⁰C durante 48 horas, reponiendo el agua cuando era necesario. Para el resto de los ensayos en invernadero las semillas después de las dos horas de imbibición se depositaron en semillero con mezcla suelo-arena estéril. El suelo utilizado para la preparación de los semilleros, fué el seleccionado para la realización del ensayo definitivo.

Las plántulas se transplantaron a las macetas (500 ml capacidad), siendo para ello cuidadosamente seleccionadas en base a un desarrollo de parte aérea y radicular homogéneo. El número de plántulas transplantadas siempre excedió en una unidad a las que posteriormente seguirían hasta su cultivo completo. A la semana de crecimiento se extrajo cuidadosamente la planta sobrante dejándose las que mostraban un desarrollo homogéneo.

El sistema de cultivo, mantenido inalterable a lo largo de los ensayos, se realizó bajo condiciones controladas de luz, temperatura y humedad (450 μ E. m⁻² s⁻², 400-700 nm; 16/8 horas luz/oscuridad; 25/18⁰C día/noche y 60-70% H.R.). Las macetas se distribuyeron al azar, rotándolas semanalmente de forma que todas ellas ocuparan las distintas posiciones posibles dentro del invernadero, al objeto de eliminar diferencias posicionales. Las plantas se regaron por capilaridad. Para ello las macetas se colocaron en un recipiente con agua, con lo que, el suelo adquiriese una humedad adecuada. Este sistema de riego, no altera las propiedades físicas del suelo y se mantuvo a lo largo

de todos los experimentos.

Semanalmente, las plantas se fertilizaron con 10 ml/maceta de una solución nutritiva (Hewitt, 1952) diluida a la mitad y con 0.5 gr/l de $\text{PO}_4\text{H}_2\text{Na}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

Solución de Hewitt (1952).

	<u>g/100 ml</u>	<u>para 1 l</u>
NO_2K	3.03	5 ml
$(\text{NO}_2)_2\text{Ca}$	7.08	10 ml
$\text{SO}_4\text{Mg}\cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1.84	10 ml
EDTA Fe (II)	0.25	5 ml
SO_4Mn	0.22	0.5 ml
$\text{SO}_2\text{Cu}\cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.24	0.05 ml
$\text{SO}_4\text{Zn}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.29	0.05 ml
Bo_3H_3	1.86	0.05 ml
$\text{MoO}_4\text{NaNH}_4$	0.03	0.05 ml
Agua		970 ml

El pH se reguló a 7 con KOH diluido al 10%.

1.4. Características de los suelos empleados.

Como soporte para el crecimiento de las plantas se utilizó suelo procedente de la provincia de Granada (cruce de Huelago). El suelo situado a una altitud de 1020 m, forma parte de un terreno ondulado con inclinaciones suaves y se utiliza para cultivo de cereales. Es del tipo Xerochcept calcixerollico, pardo rojizo oscuro (5 y R 3/4), franco arcilloso-limoso; estructura granular fina. Posee abundantes poros intersticiales y frecuentes poros tubulares finos y muy finos, así como gravas y piedras de caliza, además hay raíces finas y muy finas.

Las características analíticas de estos suelos, proporcionadas por el Departamento de Génesis, Clasificación y Microbiología de Suelos, de la Estación Experimental del Zaidín, son las siguientes:

Características analíticas del suelo.

Arena (%)	13.2	Co ₃ Ca (%)	37.3
Limo (%)	56.9	Fe libre (%)	2.4
Arcilla (%)	29.8	pH (H ₂ O, 1:1)	8.4
Carbono orgánico (%)	1.25	Na (meq/100 gr)	0.1
N (%)	0.14	Ca (meq/100 gr)	40.4
P (ppm)	41	Mg (meq/100 gr)	1.7
K (ppm)	226		

Antes de utilizarse, el suelo se sometió a un doble tamizado, el primero se realizó con criba de 1 cm de luz de malla para eliminar partes gruesas y el segundo con 4 mm de luz de malla, con lo que se obtenía el suelo en condiciones óptimas de manipulación para los ensayos de invernadero.

1.5. Determinaciones generales.

Según la naturaleza de los ensayos los datos se analizaron estadísticamente utilizando el test de rango múltiple de Duncan (P=0.05) ó se calculó el error standard de las medias.

1.5.1. Tinción de raíces micorrizadas.

Para evaluar la extensión del sistema radical que poseía colonización vesículo-arbuscular, se tomó una alícuota del mismo constituida por la fracción central cortada en segmentos de 1 cm de longitud aproximadamente. Esta fracción fué tratada y teñida de

acuerdo con la técnica descrita por Phillips y Hayman (1970). El método consiste en sumergir las raíces en KOH al 10% y mantenerlas durante 1 hora a 100⁰C. Una vez atacadas por este procedimiento las cubiertas celulósicas de la raíz, se lavan repetidamente con agua de grifo para eliminar restos de KOH y posteriormente se tratan durante unos minutos con ClH 0.1N a temperatura ambiente, al objeto de neutralizarlas. En este estado se procede a la tinción de las raíces. El colorante utilizado para visualizar las estructuras fúngicas fué Azul-Tripan, que presenta afinidad por la quitina. El Azul-Tripan se disuelve en ácido láctico al 0.05% y se mantiene 10 minutos a ebullición en contacto con las raíces. Pasado este tiempo se elimina el colorante y se conservan las raíces en ácido láctico.

Esta tinción permite visualizar claramente las estructuras fúngicas en la raíz, ya que muestran un intenso color azul, facilmente distinguible.

1.5.2. Cuantificación de la micorrización.

Se realizó por la técnica descrita por Giovannetti y Mosse (1980) que utiliza una placa cuadrada de 10 cm de lado. Toda la superficie de la placa está distribuida en cuadrículas de 1.3 cm y sobre ella se extienden, al azar, los fragmentos de raíces teñidas. Mediante examen al microscopio binocular de disección (30 a 40 aumentos), se puede observar facilmente si las raíces son portadoras o nó del endofito formador de la micorriza por el color y morfología diferenciada de las estructuras características.

Para cuantificar el porcentaje de la longitud de raíces micorrizadas, se determina el número de intersecciones de las raíces con la cuadrícula que

presentan micorrización y de las que en el punto de cruce no la presentan. De acuerdo con las fórmulas que discuten los autores citados, el porcentaje de intersecciones que muestran infección con respecto al total de intersecciones, se considera el porcentaje de longitud de raíz que es micorriza.

1.6. Determinaciones específicas.

1.6.1. Métodos de extracción y concentración de enzimas pectolíticos.

Las raíces de plantas, inoculadas y no inoculadas con endofitos VA, después de lavadas con agua estéril y troceadas se muelen mediante mortero, con arena ó N₂ líquido, para permitir mayor maceración de tejidos y extracción de los distintos enzimas. Se utilizaron las siguientes soluciones extractantes:

- 1- Agua con ClNa (0.25M).
- 2- Tampón cítrico-fosfato (0.05M) pH=7.
- 3- Tampón cítrico-fosfato (0.05M) pH=7, polivinil-polipirrolidona (PVPP) (33%), ClNa (0.05M) y tolueno (0.5%).
- 4- Tampón cítrico-fosfato (0.05M) pH=8 con glicocola y urea (1M).
- 5- Tampón tris-ClH (0.1M) a pH=7.

La proporción peso raíz/volumen tampón extractante fué de 1:3.

La suspensión se pasó por una gasa y se centrifugó durante 30 minutos a 3.000 x g, posteriormente el sobrenadante se centrifugó durante 15 minutos a 27.000 x g. Se dializó en el tampón de extracción diluido 9 veces durante 16-18 horas a 4⁰C.

El sobrenadante se utilizó para las pruebas de detección de enzimas pectolíticos, como extracto enzimático crudo. El extracto crudo se concentró mediante las siguientes técnicas:

1.6.1.1. Sulfato amónico.

Al sobrenadante se le adicionó sulfato amónico al 80% de saturación en agitación y se mantuvo durante 18-20 horas a 4⁰C. Esta suspensión se centrifugó 15 minutos a 27.000 x g, y el precipitado resultante se resuspendió en 1 ml del tampón de extracción por cada 5 ml de extracto enzimático crudo (20 ml). Posteriormente se dializó frente a 2 litros del tampón extractante, diluido 9 veces, a 4⁰C y durante 16-18 horas.

1.6.1.2. Sephadex G-25.

Se siguió una técnica basada en la descrita por Flodin *et al.*, (1960). A cada 5 ml del extracto enzimático crudo se le añadió 1 gr de Sephadex G-25 agitando durante 1 hora. Posteriormente se centrifugó durante 10 minutos a 12.000 x g. El sobrenadante (33 ml) se utilizó como extracto enzimático concentrado, y el Sephadex G-25 del precipitado, se reutilizó despues de sucesivos lavados con disolventes orgánicos y desecación a temperatura ambiente.

1.6.1.3. Rotavapor.

Mediante rotavapor a 30⁰C durante 10 minutos se redujo el volumen de 100 ml de extracto enzimático crudo hasta un volumen de 33 ml.

1.6.1.4. Filtros Amicon Centripet Concentrators 10.

Mediante membranas Amicon Centripet Concentrators 10, se obtuvo extracto concentrado con proteínas de peso molecular superior a 10.000 dalton. El extracto enzimático crudo (100 ml) se sometió a una primera centrifugación a 3.000 x g durante 20 minutos y se obtuvo un extracto concentrado de aproximadamente 20 ml. Si era necesario mayor concentración se centrifugó a 3000 x g durante 10 minutos obteniéndose 10 ml de extracto enzimático concentrado.

1.6.1.5. Liofilización.

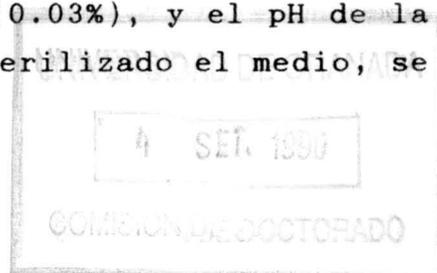
El extracto enzimático crudo (100 ml) se somete a un proceso de liofilización y el polvo resultante se almacena a -20°C . Para las determinaciones de actividad enzimática, el polvo se resuspendió en un volumen de 20 ml, cinco veces menor del que partimos inicialmente.

1.6.2. Preparación sustratos enzimáticos.

El pectato sódico y la pectina se disolvieron en agua destilada o en el correspondiente tampón en la proporción indicada para cada caso. Esta solución se mantuvo en agitación durante 3 horas, se centrifugó a 3.000 x g durante 20 minutos y se mantuvo en reposo 24 horas antes de su utilización.

1.6.3. Detección cualitativa de enzimas pectolíticos.

La detección de enzimas pectolíticos se hizo mediante un ensayo en placa de agar (Martínez-Molina et al., 1979). Al agar (1%) se le adicionó 0.1% de pectato sódico ó pectina y azida sódica (0.03%), y el pH de la mezcla se ajustó a 6. Una vez esterilizado el medio, se



repartió en placas Petri. Se esterilizaron cilindros de acero inoxidable (5 mm diametro y 10 mm altura) y se colocaron en la superficie de cada placa; a estos se adicionó 50 μ l de extracto enzimático crudo. Como controles se utilizaron extractos de enzimas autoclavados, tampones y estandar enzimáticos (obtenidos de *Aspergillus niger*) a las concentraciones de 1 y 1.5 unidades enzimáticas. Las placas se incubaron a 28⁰C durante 18 horas y después de quitar los cilindros se utilizaron varias técnicas para la detección de actividad:

1. A las placas Petri se añadió 2 ml de Bromuro de hexadecil trimetil amonio (2%) durante 30 minutos, este compuesto hace precipitar la pectina observándose la formación de un halo transparente en el lugar donde actuan las pectinasas.

2. El pectato sódico y la pectina no hidrolizados se tiñeron con 2 ml de Rojo de rutenio (0.1%) durante 30 minutos y se lavaron con agua destilada. La actividad se detectaba como halo decolorado en el sustrato coloreado de rosa.

3. Para la detección de pectín esterasa se utilizó una tinción específica descrita por Reeve (1959), en la cual se añadió 3 ml de hidroxilamina (3.75%) y 3 ml de hidróxido sódico (9.4%) en la placa agitando bien. A los 10 minutos se acidificó el medio añadiendo 3 ml de ClH (0.1N). Finalmente se tiñó con 3 ml de cloruro férrico (10%) disuelto en ClH (0.1N). Esta técnica está basada en la reacción de la hidroxilamina con los metil-ester de las pectinas para producir ácidos pectín hidroxamímicos, los cuales forman complejos de color rojo con los iones férricos. La acción del enzima pectín esterasa impide la formación de estos complejos,

formando un halo transparente.

1.6.4. Valoración cuantitativa de enzimas pectolíticos.

1.6.4.1. Actividad pectín esterasa.

La actividad pectín esterasa se determinó según el método de Hancock *et al.*, (1964), modificación de la técnica de titulación continua de Kertesz (1951). Esta técnica consiste en detectar la bajada de pH en la mezcla de reacción a distintos tiempos, por la actuación de la pectín esterasa que al eliminar los grupos metilos de la pectina acidifica el medio de reacción. La solución de 1% de pectina, ajustada aproximadamente a los pHs de 5.5 y 7 con NaOH (1N) es la que se utilizó como sustrato.

La mezcla de reacción consistió en 4.5 ml de extracto enzimático y 30 ml de sustrato, a la que se le midió el pH exactamente. Después de los tiempos de reacción de 0, 10, 20 y 40 minutos, la mezcla enzima-sustrato se tituló con NaOH (0.02N) hasta alcanzar el pH que poseía a tiempo cero. La reacción se llevó a cabo a 35⁰C.

La actividad se expresa como microequivalentes de NaOH añadidos por minuto y por miligramo de proteína.

1.6.4.2. Actividad endo-poligalacturonasa.

Para determinar actividad endo-poligalacturonasa se utilizó la técnica de viscosimetría descrita por Garibaldi y Bateman (1971). La pérdida de viscosidad del pectato sódico se determinó en viscosímetros Cannon-Fenske serie 150 (ref. 5354).

Esta técnica consiste en realizar medidas de viscosidad de la mezcla de reacción (sustrato-extracto enzimático) a distintos tiempos, obteniéndose así el porcentaje de pérdida de viscosidad de la mezcla a cada tiempo, como consecuencia de la acción hidrolítica del enzima sobre el sustrato, que disminuye su grado de polimerización y de ahí la pérdida de viscosidad.

La mezcla de reacción empleada contenía 5 ml de pectato sódico en la proporción 1% en tampón cítrico-fosfato (0.05M) pH=5 además de 1 ml de extracto enzimático. La reacción se llevó a cabo a 37⁰C. Como control se utilizaron mezclas de pectato sódico con tampón y con extracto inactivado por calor (100⁰C durante 5 minutos).

La actividad se expresó en unidades de actividad relativa (R.A.) por mg proteína y hora, calculándose la actividad relativa mediante las siguientes fórmulas:

$$\% \text{ x pérdida viscosidad} = \frac{T_o - T_x}{T_o - T_w} \times 100$$

$$T \text{ 50\%} = \frac{50 \cdot T_x}{\% \text{ x}}$$

$$R. A. = \frac{1}{T50 \%} \times 1000$$

En la que:

To= Viscosidad de la mezcla de reacción a tiempo cero.

Tx= Viscosidad de la mezcla de reacción en un tiempo determinado x.

Tw= Viscosidad del agua destilada.

1.6.4.3. Actividad poligalacturonasa.

La actividad poligalacturonasa se determinó por el método descrito por Nelson (1944) y modificado por Somogyi (1952), que consiste en la determinación espectrofotométrica de los grupos reductores que aparecen como consecuencia de la actividad hidrolítica de los enzimas.

La mezcla de reacción ensayada se componía de pectato sódico (0.25%) disuelto en 5 ml de tampón fosfato (0.1M) pH=6.5, al que se le añadía EDTA (a la concentración final de 10mM) con objeto de eliminar la posible actuación de liasas. En intervalos regulares después de la incubación a 30⁰C, a 0.1 ml de la muestra se le determinaron los grupos reductores utilizando una curva patrón con concentraciones de 40, 80, 120 y 160 γ de ácido galacturónico como estandar.

Para determinar los grupos reductores se le añade tanto a los tubos problema como a la curva patrón 1 ml de la solución tartrato alcalino de Cu, que se prepara mezclando en el momento de usar 1 vol. de solución A y 9 vol. de solución B.

La mezcla de reacción se mantiene en ebullición durante 20 minutos, transcurridos los cuales, se para la reacción enfriando durante unos minutos esta mezcla. A continuación, se añade 0.25 ml de la solución de arseno-molibdato (solución C) que da reacción colorimétrica. Cuando han transcurrido 5 minutos de la visualización de color se mide la aparición de grupos reductores espectrofotométricamente a una longitud de onda de 500 nm.

Solución A. Se prepara disolviendo en agua destilada SO_4Cu (5%).

Solución B. Se prepara disolviendo 28 gr de PO_4HNa_2 anhidro en 700 ml de H_2O destilada. Se disuelven también 40 gr de tartrato sódico-potásico en 100 ml de NaOH (1N). Ambas soluciones se mezclan y se añaden 120 gr de sulfato sódico anhidro. Cuando la disolución es completa se lleva a 900 ml de agua. Después de 2 días el reactivo se clarifica de sedimentos mediante filtración con papel Whatman n° 4.

Solución C. Se disuelven 25 gr de arsenato sódico en 25 ml de agua destilada. Esta mezcla se agrega a 21 ml de SO_4H_2 concentrado. Por otra parte se disuelven 25 gr de molibdato amónico en 450 ml de agua destilada. Ambas soluciones se mezclan bien y se incuban 48 horas a 37°C . Todas estas soluciones se mantienen en frascos de topacio para preservarlas de la luz.

La actividad específica se definió como μ moles de grupos reducidos liberados por hora y miligramo de proteína.

1.6.4.4. Actividad endo-polimetilgalacturonasa.

Se detectó por la medida de viscosimetría, método descrito en el apartado 1.6.4.2., utilizando como sustrato pectina en lugar de pectato sódico.

1.6.4.5. Actividad polimetilgalacturonasa.

Esta actividad se determinó por la medida del incremento de grupos reductores en la mezcla de reacción, en la que se utilizó pectina como sustrato enzimático, de acuerdo con el método descrito en el

apartado 1.6.4.3.

1.6.4.6. Actividad pectato y pectín liasa.

La actividad pectato y pectín liasa se determinó de igual manera variando solamente el sustrato añadido a la mezcla de reacción, utilizando pectato sódico y pectina respectivamente.

Se utilizaron dos técnicas diferentes para su valoración:

1. Esta actividad enzimática se determinó espectrofotométricamente mediante la medida del incremento en densidad óptica (Starr y Moran, 1962), a 230 y 235 nm para pectato sódico y pectina respectivamente.

La mezcla de reacción contenía 900 μ l de sustrato (0.25%) disuelto en tampón tris-ClH (0.05M) pH=8.5 suplementado con Cl_2Ca (0.001M) y 100 μ l de enzima. La reacción enzimática se llevó a cabo a una temperatura de 30⁰C. La reacción se detuvo mediante la adición de 0.2 ml de $\text{SO}_4\text{Zn}.7\text{H}_2\text{O}$ (9%) y se centrifugó a 12.000 x g durante 10 minutos.

Una unidad enzimática se definió como el incremento que se produce en absorbancia de 0.01 unidades de densidad óptica en una hora y por miligramo de proteína.

2. Otra forma de determinar esta actividad enzimática fué mediante el método de Albersheim y Killias (1962), que se basa en evaluar el incremento de unidades de absorbancia, a 230 nm para pectato sódico y 235 nm para pectina, a través del transcurso de la

reacción, mediante cinética enzimática.

La mezcla de reacción contenía 950 μ l de sustrato (0.05%) disuelto en tampón tris-ClH (0.05M) pH=8.5 con Cl_2Ca (0.001M), incubado con 50 μ l de extracto.

Una unidad enzimática se definió como la cantidad que produce un incremento en absorbancia a 230 o 235 nm igual a 0.01 unidades de densidad óptica por hora.

1.6.5. Determinación cuantitativa de proteínas.

La determinación cuantitativa de proteínas se realizó según el método de Lowry (1951).

I. Fundamento.

Es una combinación de las reacciones de Biuret y de Folin, la primera característica del enlace peptídico y la segunda del grupo fenólico de los restos de tirosina.

II. Metodica.

Se usa una curva patrón de albúmina a concentraciones entre 50 y 400 μ g/ml. Para pequeñas concentraciones proteicas la curva patrón está comprendida entre 5 y 40 μ g/ml.

El tubo blanco lleva 1 ml de agua. En tubos de ensayo se coloca 1 ml de cada una de las soluciones patrones preparadas. Igualmente se coloca 1 ml de solución problema en tantos tubos como sea necesario (si es preciso hacer diluciones).

Se agrega a tiempo cero, 5 ml de reactivo A,

agitando bien. A los 15 minutos se añaden 0.5 ml de reactivo B. Veinte minutos después de esta segunda adición se lee a 630 nm.

III. Reactivos.

1. Reactivo A. Solución alcalina de cobre que se prepara mezclando CO_3Na_2 y SO_4Cu en la proporción 50:1.

2. Reactivo B. Reactivo de fenoles que se prepara diluyendo en agua 1:1 en el momento de usarse.

2. Ensayos específicos.

2.1. Efecto de los sustratos de enzimas pectolíticas en la infección micorriza VA.

Este experimento se realizó en tubos de cristal de 20 x 200 mm con 25 gr de arena-vermiculita, mezcladas en la proporción 1/1 (v/v), y 12 ml de solución nutritiva Hewitt (1952) diluida a la mitad y con 0.5 gr/l de $\text{PO}_4\text{H}_2\text{Na} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (pH=7). Se adicionó pectato sódico y pectina al medio de cultivo a la concentración final de 0.05, 0.2, 0.6 y 1%. Los tubos cerrados con tapón de algodón se esterilizaron 3 veces con un intervalo de 24 horas, después de lo cual el pH del medio de cultivo fué 6. En cada tubo, a pocos milímetros debajo de las semillas, se colocaron 30 esporas de *G. mosseae* esterilizadas en superficie. Se utilizaron tubos con plantas no inoculadas como controles.

Se utilizaron plantas de alfalfa cuyas semillas se esterilizaron en superficie con Cl_2Hg durante 12 minutos e inmediatamente se lavaron con abundante agua estéril. Después de germinadas se seleccionaron las plántulas más uniformes. Las plantas se cultivaron en

una cámara de crecimiento bajo condiciones controladas de luz, temperatura y humedad ($400 \text{ nmol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, 400-700 nm; 16/18 horas luz/oscuridad; 25/18°C día/noche y 60-70% H.R.).

Se mantuvieron durante 12 semanas, cosechando cada 21 días. La parte aérea, constituida en todos los casos por tallos y hojas se secó a 65°C durante 16 horas y se determinó su peso. Las raíces se clarificaron y tiñeron (Phillips y Hayman, 1970) y se contabilizó el grado de colonización, según el método de Ocampo *et al.*, (1980). Según este, se colocaron 30 segmentos de raíces de 1 cm en un portaobjetos y se cuantificó la proporción de cada segmento de raíz con micelio VA, con un aumento de x 100, consiguiendo así el porcentaje de longitud de raíz colonizada. Con aumentos de x 400 se cuantificó el número de puntos de entrada por cm de raíz.

Se utilizaron 10 repeticiones por tratamiento y se determinó la presencia de microorganismos contaminantes por la técnica de MacDonald (1981), según la cual 0.1 ml de solución de cada tubo se sembró en dos medios de cultivo diferentes:

Medio 1. Pectona bacteriológica Oxoid (0.1%) y agar Difco Bacto (1.5%).

Medio 2. Extracto de levadura Difco (0.3%) con pectona micológica Oxoid (1%), glucosa (2%) y agar Difco Bacto (1.5%).

Los tubos contaminados fueron descartados.

2.2. Efecto de los sustratos de enzimas pectolíticos en la germinación de esporas.

Se cultivaron esporas de *G. mosseae*, esterilizadas en superficie, en placas con 1% de agar (Difco Bacto) y con 0, 0.05, 0.2, 0.6 y 1% de pectato sódico y pectina.

Las placas Petri se incubaron en una estufa a 25⁰C durante 2 semanas, cuantificándose el porcentaje de germinación de esporas.

2.3. Efecto de diferentes medios de extracción en la detección de enzimas pectolíticos.

Se utilizaron plantas de lechuga, las cuales se cultivaron en macetas de 500 ml de capacidad, con una mezcla de suelo:arena 1/9 (v/v), e inoculadas ó no inoculadas con *G. mosseae*. Las plantas se cosecharon despues de 8 semanas de crecimiento determinándose el nivel de colonización.

Para la cuantificación de las distintas actividades enzimáticas se realizaron las diferentes extracciones descritas en el apartado 1.6.1. Con los extractos enzimáticos obtenidos se valoraron las distintas actividades enzimáticas, como se describe en el apartado 1.6.4.

2.4. Estudio de la actividad pectín esterasa a distintos pHs.

Se utilizaron plantas de lechuga de 60 días inoculadas o nó con *G. mosseae*. Se realizó la extracción de las raíces de las mismas con agua más ClNa (0.25M) dializando posteriormente con el mismo medio de extracción diluido 9 veces, posteriormente se

utilizó este extracto enzimático para la valoración enzimática.

Se determinó la actividad enzimática mediante el método de Hancock *et al.*, (1964), descrito en el apartado 1.6.4.1, en mezclas de reacción enzima-sustrato a los pHs 3.5, 4, 4.5, 5.5, 6, 6.5 y 7.

2.5. Estudio de la influencia de los métodos de concentración en la actividad enzimática.

El ensayo se realizó con plantas de lechuga cultivadas en macetas (500 ml) con una mezcla suelo-arena 1/9 (v/v). Las plantas se cosecharon después de 8 semanas determinándose el porcentaje de micorrización, y con el resto de las raíces se hicieron extracciones y posteriores concentraciones como se describen en el apartado 1.6.1.

Se estudió comparativamente la actividad del extracto enzimático crudo y concentrado.

2.6. Estudio de las distintas actividades enzimáticas a lo largo del proceso de infección.

2.6.1. Actividad pectín esterasa.

Se utilizaron plantas de lechuga inoculadas ó no inoculadas con *G. mosseae* y *G. fasciculatum*, realizándose cosechas secuenciales a los 30, 60 y 80 días.

La extracción se realizó con 0.25M de ClNa en agua destilada. Las pruebas de valoración enzimática se realizaron en extractos concentrados mediante liofilización, utilizando el método de Hancock *et al.*,

(1964) descrito en el apartado 1.6.4.1.

Se utilizó pectina como sustrato enzimático y se se hicieron cinco repeticiones de la actividad.

2.6.2. Actividades endo-poligalacturonasa y endo-polimetilgalacturonasa.

Se utilizaron plantas de lechuga inoculadas ó no inoculadas con *G. mosseae* y *G. fasciculatum* realizándose cosechas secuenciales a los 30, 60 y 80 días.

La extracción se realizó con tampón cítrico-fosfato (0.05M) pH=7 incluyendo PVPP, obteniéndose extracto enzimático crudo. Las pruebas de actividad enzimática se realizaron a pH=5, mediante la técnica de viscosimetría descrita por Garibaldi y Bateman (1971), como se describe en el apartado 1.6.4.2.

Se utilizaron pectato sódico y pectina como sustratos enzimáticos y se hicieron cinco repeticiones de cada actividad.

2.6.3. Actividades poligalacturonasa y polimetilgalacturonasa.

Se utilizaron plantas de lechuga inoculadas ó no con *G. mosseae* y *G. fasciculatum* realizándose cosechas secuenciales a los 30, 60 y 80 días

La extracción se realizó con tampón cítrico-fosfato (0.05M) pH=7 más PVPP, determinando la actividad del extracto crudo por los métodos de Nelson (1944) y Somogyi (1952) descritos en el apartado

1.6.4.3.

Se utilizaron pectato sódico y pectina como sustratos enzimáticos y se hicieron cinco repeticiones de cada actividad.

2.6.4. Actividades pectato y pectín liasa.

Se utilizaron plantas de lechuga inoculadas ó no con *G. mosseae* y *G. fasciculatum* realizándose cosechas a los 30, 60 y 80 días. En plantas de maíz se inoculó con *G. mosseae*, cosechándose a los 30, 60 y 80 días.

La extracción se realizó con tampón cítrico-fosfato (0.05M) pH=7, al que se le incluyo PVPP. La actividad enzimática se determinó en extractos crudos por el método de Starr y Moran (1962) descrito en el apartado 1.6.4.6₁.

En las cosechas de maíz y lechuga de 30 y 60 días además se utilizó para determinar la actividad pectato y pectín liasa el método de Albersheim y Killias (1962) descrito en el apartado 1.6.4.6₂.

En todas las determinaciones enzimáticas se utilizaron pectato sódico y pectina como sustratos y se hicieron cinco repeticiones de cada actividad.

2.7. Estudio de las actividades enzimáticas en esporas y micelio.

Para la extracción de esporas y micelio externo de *G. mosseae* después de aislados y esterilizados en superficie (MacDonald, 1981), se molieron en mortero con nitrógeno líquido. Después del homogenizado con el tampón de extracción (30 mg/ml), se procedió a realizar

tres sonicaciones (5 pulsos de 1 minuto) alternando con centrifugaciones (10 minutos a 12.000 x g) y lavados del sedimento con el mismo tampón. La suspensión final se centrifugó (20 minutos a 27.000 x g) y el sobrenadante se sometió a una diálisis a 4⁰C frente al tampón de extracción diluido 9 veces.

Al realizar la extracción se utilizó agua con ClNa 0.25M para valorar actividad pectín esterasa y tampón cítrico-fosfato (0.05M) pH=7 con PVPP en el resto de las actividades.

El extracto crudo resultante se utilizó en las distintas pruebas para la valoración de las actividades pectín esterasa, endo-poligalacturonasa, poligalacturonasa, endo-polimetilgalacturonasa, polimetilgalacturonasa, pectato y pectín liasa.

Su utilizaron 5 repeticiones por cada actividad.

2.8. Electroforesis en gel de poliacrilamida.

A fin de comprobar la producción de distintos enzimas pectolíticos en extractos de plantas micorrizadas y no micorrizadas, se llevaron a cabo diferentes técnicas electroforéticas en geles de poliacrilamida.

2.8.1. Método de Mackenzie y Willians (1984).

En este método la detección de actividad pectinásica se lleva a cabo en un gel de agarosa al que se le ha incorporado pectina.

La electroforesis se realizó en geles del tipo "Cyanogum 41" (relación acrilamida:bis-acrilamida de

19:1) con un 7.5% de acrilamida y un 0.375% de bis-acrilamida, disueltos en tampón tris-glicocola (0.05M, 0.1M) pH=8.7. Una vez disueltos los componentes, la mezcla se filtró y posteriormente se desgasó al vacío durante 10 minutos. La gelificación se realizó utilizando como catalizadores N,N,N,N-Tetrametil-etilendiamina (TEMED) en la proporción del 0.15% y persulfato amónico, preparado recientemente, en la proporción del 0.07%. En estas condiciones el tiempo de gelificación fue de 30 minutos.

Para la preparación de los geles se siguió las indicaciones del manual LKB sistema 2001 de electroforesis vertical.

Se utilizaron extractos de raíces micorrizadas tanto con *G. mosseae* como con *G. fasciculatum*, y como controles se utilizaron extractos de raíces no micorrizadas. Estas muestras, con una concentración aproximada de 2 mg. ml⁻¹ de proteína, se mezclaron con Azul de bromofenol al 0.2% en glicerol al 50%. El Azul de bromofenol se utilizó como indicador del frente de la electroforesis. El volumen de muestra aplicado a cada pocillo del gel fue de 50 µl.

Los desarrollos se llevaron a cabo a 4°C en una cubeta vertical LKB 2001, en la que se aplicó una corriente constante de 180 V por cada gel durante 2-3 horas, utilizando como tampón de electrodos tris-glicocola (0.05M, 0.1M) pH=8.7, hasta que el indicador del frente alcanzó el extremo terminal del gel.

Se preparó un gel con pectina (0.1%) y agarosa (1%) disueltos en tampón cítrico-fosfato (0.05M) pH=5,

de 0.5 mm de espesor en un molde LKB para hacer geles finos.

Trás la electroforesis, el gel de agarosa con pectina se puso en contacto con el gel que contiene los enzimas objeto de nuestros estudios, durante 18-20 horas a una temperatura de 30°C. Posteriormente el gel se tiñó durante 30 minutos con una solución de Rojo rutenio (0.1%), y se decoloró mediante sucesivos lavados con agua destilada apareciendo las bandas de actividad (debidas a la hidrólisis de la pectina incluida en el gel) como bandas a lo largo del gel.

2.8.2. Método de Cruickshank y Wade (1980).

Mediante este método la detección de actividad pectinásica se lleva a cabo en un gel de poliacrilamida, con pectina incluida en la mezcla de gelificación.

La electroforesis se realizó en geles con un 10% de acrilamida y un 0.25% de bis-acrilamida disueltos en tampón tris-glicocola (0.05M, 0.1M) pH=8.7. Una vez disueltos los componentes, la mezcla se filtró y posteriormente se desgasó al vacío durante 10 minutos. A continuación se añadió 0.1 ml de TEMED y persulfato amónico, preparado recientemente, en la proporción de 0.1%. En estas condiciones el tiempo de gelificación fué de 20 minutos.

La preparación de los geles y de las muestras, así como, el desarrollo de la electroforesis se realizó como en el método descrito anteriormente. Trás la electroforesis los geles se incubaron en 200 ml de ácido málico (0.1M) durante 3-4 horas, el cual produce un descenso gradual del pH en el gel, desde pH=8.7

hasta pH=3, permitiendo actuar a cada uno de los enzimas sobre la pectina en su rango de pH óptimo. La tinción se realizó con una solución de Rojo de rutenio (0.02%) durante 1/2-2 horas, y se decoloró mediante sucesivos lavados con agua destilada.

2.8.3. Método de Cruickshank y Wade (1980) modificado.

Con objeto de lograr una máxima resolución de las distintas actividades pectolíticas, se realizaron las siguientes modificaciones al método anterior.

1. Se modificó la composición del gel, disminuyendo el porcentaje de acrilamida. Así se utilizaron geles con un 5.6% de acrilamida, 0.2% de bis-acrilamida y 0.1% de pectina disueltos en tampón cítrico-fosfato (0.05M) pH=8.5. Una vez disueltos los componentes se filtró y desgasó. La gelificación se realizó añadiendo TEMED (0.2%) y persulfato amónico (0.1%).

2. Se sometió a los geles a una pre-electroforesis durante 30 minutos aplicando una corriente constante de 10 mA por gel. Para el desarrollo de la electroforesis se aplicó una corriente constante de 20 mA por gel durante 3-5 horas, hasta que el indicador del frente alcanzó el extremo terminal del gel.

3. Tras la electroforesis cada gel se incubó en 200 ml de tampón cítrico-fosfato (0.05M) pH=5, a 37⁰C durante 18-20 horas, tras las cuales se tiñó durante 30 minutos con una solución de Rojo rutenio (0.1%). La decoloración se llevó a cabo mediante sucesivos lavados con agua destilada, y se observó la aparición de bandas de mayor nitidez que las que se encontraron con las modificaciones anteriores.



IV. RESULTADOS

IV. RESULTADOS

1. Efecto de los sustratos de enzimas pectolíticos en la infección micorriza VA.

La evolución de la micorrización de plantas de alfalfa cultivadas en arena-vermiculita e inoculadas con *Glomus mosseae* siguió una curva sigmoideal típica (Figuras 3 y 4).

Aunque la presencia de micelio externo y de puntos de entrada indicaron que el comienzo de la infección pudo detectarse a las 2 semanas, la longitud de la infección de raíz solamente se pudo apreciar después de 3 semanas (Tablas 1 y 2).

A partir de 4 semanas la infección incrementó rápidamente alcanzando el máximo a las 12 semanas (Tablas 1 y 2, Figuras 3 y 4). En tratamientos con una concentración del 0.05% de pectato sódico y pectina en el medio de cultivo, la infección se incrementó hasta las 9 semanas de crecimiento de las plantas permaneciendo casi constante en las semanas siguientes. En los tratamientos con una concentración de 0.2, 0.6 y 1% de pectato sódico y pectina, el comienzo de la infección se produjo a las 6, 9 y 12 semanas de la inoculación respectivamente. En estos tratamientos la infección incrementó levemente hasta 8 semanas de crecimiento de las plantas y después permaneció constante.

El número de puntos de entrada por cm de raíz (Tabla 3), siguió un comportamiento similar al de la longitud de la infección de raíz en todos los tratamientos.

La aplicación de pectato sódico y pectina no afectó el crecimiento de las plantas (Tabla 4). En general se puede decir que no hubo diferencias significativas en el peso seco de la parte aérea entre plantas micorrizadas y no micorrizadas, exceptuando los tratamientos controles en los que a las 6 semanas se observó un incremento del peso seco de las plantas micorrizadas sobre las no micorrizadas, pero a las 12 semanas estas diferencias desaparecieron.

El porcentaje de germinación de esporas de *G. mosseae* cultivadas en placas Petri con agar agua (1%) al que se le adicionó pectato sódico a las concentraciones de 0.05, 0.2, 0.6 y 1% , ó pectina a las concentraciones de 0.05 y 0.2%, fué similar al de los controles sin sustratos enzimáticos. Sin embargo las concentraciones de 0.6 y 1% de pectina redujeron el porcentaje de germinación de esporas a un 40±5% y 14±2% respectivamente.

Tabla 1. Porcentaje de longitud de raíces de plantas de alfalfa micorrizadas con *G. mosseae*, con diferentes concentraciones de pectato sódico en el medio de cultivo.

Concentración de pectato sódico (%)	% de longitud de raíz micorrizada despues de (semanas).			
	3	6	9	12
0	2.5 a	8.2 d	11.3 d	16.1 f
0.05	2.2 a	3.3 b	7.8 d	8.4 d
0.2	0	0.5 c	1.5 e	2.4 e
0.6	0	0	0.4 c	0.7 c
1	0	0	0	0.5 c

Cada valor es la media de 5 repeticiones. Los valores seguidos por la misma letra no son significativos de acuerdo al test de rango múltiple de Duncan (P=0.05).

Tabla 2. Porcentaje de longitud de raíces de plantas de alfalfa micorrizadas con *G. mosseae*, con diferentes concentraciones de pectina en el medio de cultivo.

Concentración de pectina (%)	% de longitud de raíz micorrizada despues de (semanas).			
	3	6	9	12
0	3.1 a	7.4 b	9.4 d	19.2 f
0.05	3.8 a	6.1 b	10.5 d	8.6 d
0.2	0	0.4 c	1.4 e	1.6 e
0.6	0	0	0.7 c	0.6 c
1	0	0	0	0.3 c

Cada valor es la media de 5 repeticiones. Los valores seguidos por la misma letra no son significativos de acuerdo al test de rango múltiple de Duncan (P=0.05).

Tabla 3. Número de puntos de entrada en plantas de alfalfa micorrizadas con diferentes concentraciones de pectina en el medio de cultivo.

Concentración de pectina (%)	Puntos de entrada por cm de raíz despues de (semanas).			
	3	6	9	12
0	0.5 a	1.1 b	1.6 d	3.1 f
0.05	0.4 a	1.3 b	1.6 d	1.7 d
0.2	0	0.03 c	0.2 e	0.2 e
0.6	0	0	0.1 c	0.07 c
1	0	0	0	0.1 c

Cada valor es la media de 5 repeticiones. Los valores seguidos por la misma letra no son significativos de acuerdo al test de rango múltiple de Duncan (P=0.05).

Tabla 4. Peso seco de parte aerea (mg/planta) de plantas de alfalfa micorrizada y no micorrizada con diferentes concentraciones de pectina en el medio de cultivo.

Concentración pectina (%)	mg de peso seco de parte aerea despues de (semanas)							
	3		6		9		12	
	-M	+M	-M	+M	-M	+M	-M	+M
0	100a	110a	191b	262c	232c	280c	400e	390e
0.05	91a	87a	181b	185b	278c	280c	382e	421e
0.2	101a	94a	170b	191b	221c	212c	370e	375e
0.6	87a	92a	184b	195b	240c	245c	372e	389e
1	87a	95a	190b	192b	248c	260c	361e	358e

Cada valor es la media de 5 repeticiones. Los valores seguidos por la misma letra no son significativos de acuerdo al test de rango múltiple de Duncan (P=0.05)

-M= plantas no micorrizadas +M= plantas micorrizadas

Figura 3. Evolución de la longitud de raíces de plantas de alfalfa micorrizadas con *G. mosseae*, con diferentes concentraciones de pectato sódico en el medio de cultivo.

Figura 3

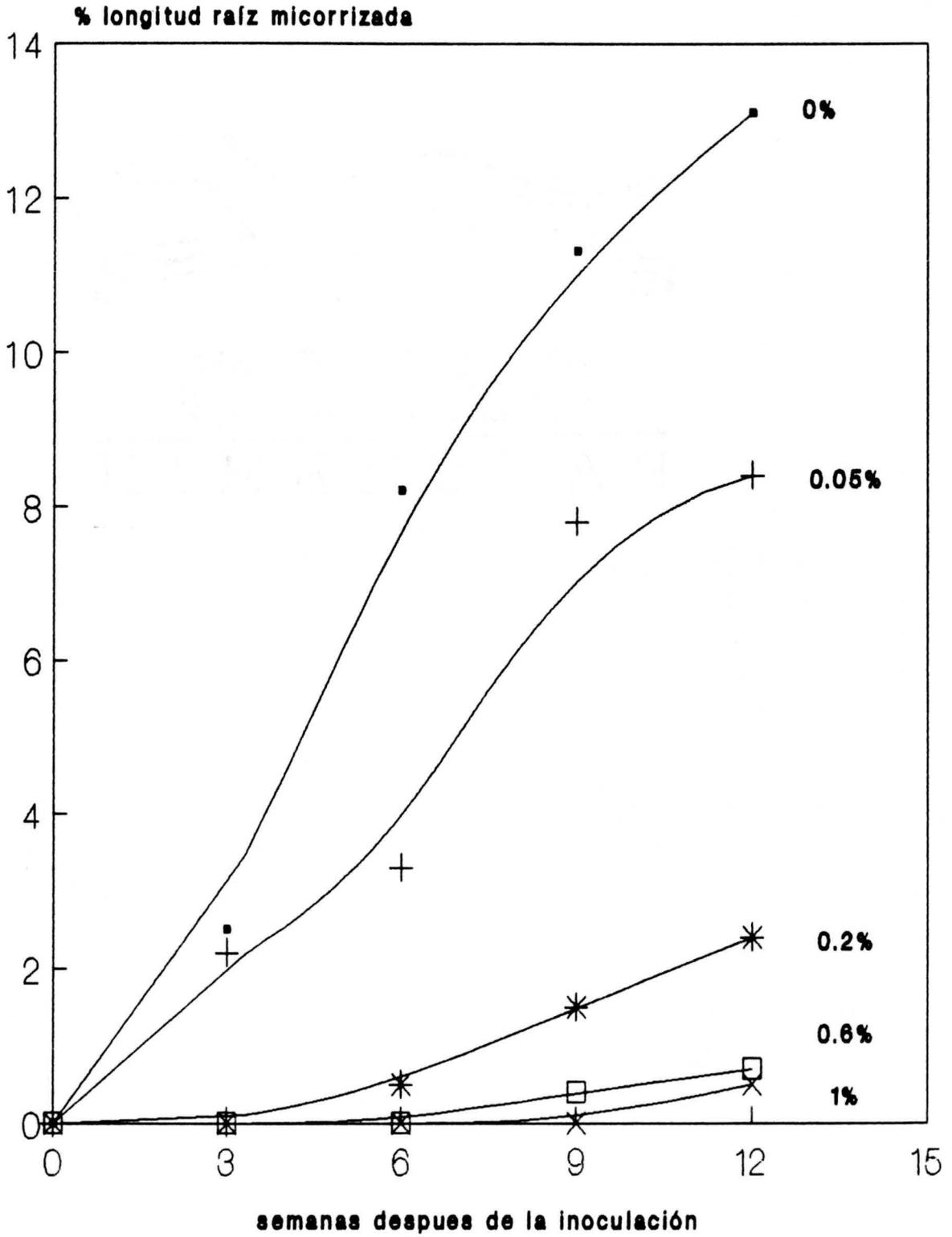
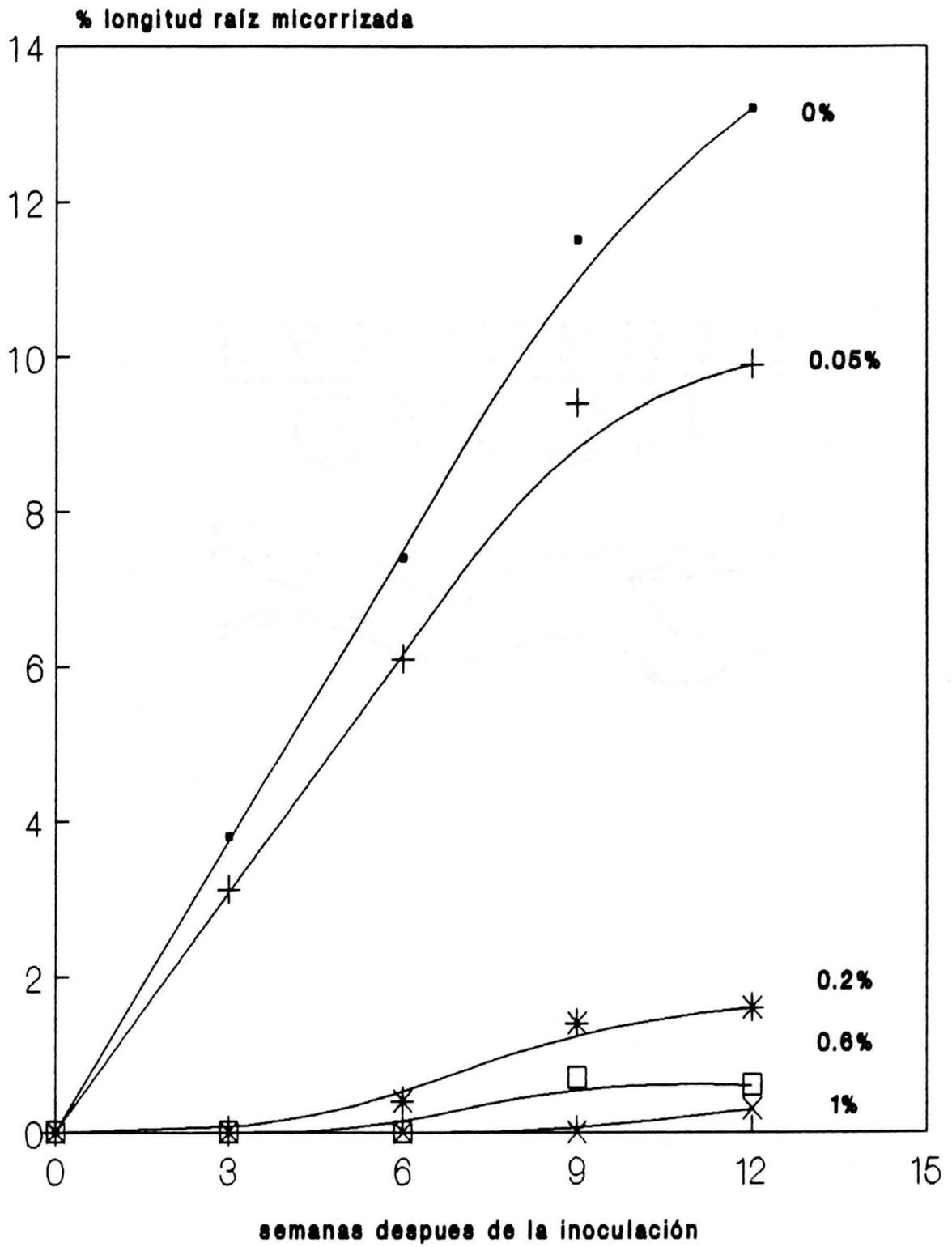


Figura 4. Evolución de la longitud de raíces de plantas de alfalfa micorrizadas con *G. mosseae*, con diferentes concentraciones de pectina en el medio de cultivo.



Figura 4



2. Análisis cualitativo de enzimas pectolíticos.

En las pruebas cualitativas de detección de actividades pectolíticas realizadas mediante la precipitación con Bromuro de hexadecil trimetil amonio de los sustratos enzimáticos mezclados con agarosa en placas Petri, se encontró que no hubo diferencias en la formación de halos de solubilización de los sustratos enzimáticos y los controles carentes de actividad. Esta similitud apareció independientemente del gradiente de pH a el que se ensayaron los distintos sustratos.

Sin embargo, cuando las pruebas cualitativas de detección de actividad enzimática se realizaron utilizando la tinción de los sustratos enzimáticos con Rojo de rutenio, no se detectó aparición de halos de solubilización de pectato sódico o pectina en los controles y sí en los extractos enzimáticos. Los extractos de raíces micorrizadas produjeron un halo de solubilización, tanto de pectato sódico como de pectina, superior al de las plantas no micorrizadas, especialmente cuando los sustratos enzimáticos poseían un pH inferior a 7 (Figura 5).

Los extractos de esporas y micelio externo de *G. mosseae* produjeron asimismo zonas de hidrólisis en placas de agarosa, tanto con pectato sódico como con pectina (Figura 6).

En la detección cualitativa de actividad pectín esterasa no se encontraron diferencias apreciables entre los halos de solubilización de plantas micorrizadas y los halos de las no micorrizadas, sin embargo en extracto de esporas y micelio de *G. mosseae* se detectó dicha actividad.

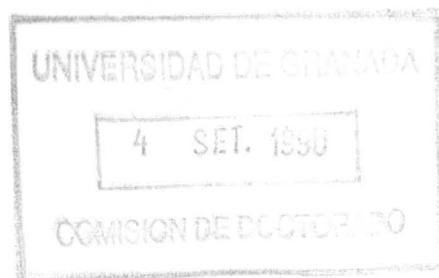


Figura 5. Halos de hidrólisis de extractos de raíces micorrizadas y no micorrizadas con *G. mosseae*.



Figura 6. Halos de hidrólisis de extractos de esporas y micelio externo de *G. mosseae*.

3. Efecto de los distintos métodos de extracción en la detección de enzimas pectolíticos.

Las raíces de plantas de lechuga utilizadas para la valoración de actividades enzimáticas obtenidas con distintos métodos de extracción, alcanzaron después de 60 días de crecimiento un $42\pm 7\%$ de porcentaje de longitud de raíz micorrizada.

Como muestra la tabla 5, con diferentes soluciones extractantes utilizadas se detectó actividad pectín esterasa tanto en las raíces micorrizadas como en las no micorrizadas, y a los dos pHs utilizados. Las raíces extraídas con ClNa (0.25M) tuvieron más actividad pectín esterasa que en los extractos de raíz preparados con tampones tris-ClH ó cítrico-fosfato, además con este extractante se observan diferencias significativas de actividad entre plantas micorrizadas y no micorrizadas. Los extractos preparados con tampón cítrico-fosfato poseían más actividad que los preparados con tris-ClH. La inclusión de polivinil-polipirrolidona (PVPP) ó glicocola y urea en el tampón cítrico-fosfato no afectó el nivel de actividad. Esta actividad enzimática se determinó en presencia de ClNa, cuando esta sal se suprimió de la mezcla de reacción solo se detectó actividad aunque muy baja en extractos de raíces micorrizadas.

Con todas las soluciones ensayadas se detectaron actividades endo-poligalacturonasa y poligalacturonasa. Si bien se obtuvo mayor actividad de ambas enzimas cuando se utilizó tampón cítrico-fosfato añadido con PVPP como medio de extracción, no se encontraron diferencias significativas entre las actividades de plantas micorrizadas y no micorrizadas (Tabla 6).

La actividad endo-polimetilgalacturonasa fué mayor cuando la extracción de raíces se realizó con tampón cítrico-fosfato, que con ClNa 0.25M ó tris-ClH (Tabla 7). La actividad endo-polimetilgalacturonasa fué superior en plantas micorrizadas que en no micorrizadas, esta diferencia se acentuó con la inclusión de PVPP en el tampón cítrico-fosfato. Con la inclusión de glicocola y urea también se detecta mayor actividad enzimática, sin embargo no se ven diferencias tan notables entre la actividad enzimática de los extractos de raíces micorrizadas y no micorrizadas.

En la tabla 7 se puede observar que los extractos preparados con tampón cítrico-fosfato contienen mayor actividad polimetilgalacturonasa comparándolos con los de extractos realizados con ClNa (0.25M) y tris-ClH. Pero no se observaron diferencias significativas en la actividad de extractos de raíces micorrizadas respecto de las no micorrizadas.

Las actividades pectato y pectín liasa (Tabla 8) al igual que las polimetilgalacturonasa (Tabla 7), endo-poligalacturonasa y poligalacturonasa (Tabla 6), se detectaron en todas las extracciones realizadas con los distintos tampones sin encontrarse diferencias apreciables entre las actividades de raíces micorrizadas y no micorrizadas. Sin embargo, los extractos preparados con tampón cítrico-fosfato con PVPP poseían valores de actividad mayores.

Tabla 5. Actividad pectín esterasa (PE) a distintos valores de pH en raíces de plantas de lechuga micorrizadas y no micorrizadas, extraídas con diferentes soluciones.

Soluciones extractantes	Actividades específicas (unidades/mg. proteína)			
	pH=5.5		pH=7	
	-M	+M	-M	+M
ClNa (0.25M)	9.3 a	18.6 b	9.3 a	19.3 b
C-P (50mM) pH=7	4.2 d	5.4 d	13.8 b	12.6 b
C-P (50mM) pH=7 con PVPP	3.0 d	4.8 d	12.6 b	14.4 b
C-P (50mM) pH=7 con 1% glicocola y 1M urea	5.4 d	6.6 d	19.2 b	18.1 b
Tris-ClH (0.1M)	1.1 e	1.3 e	14.4 b	13.8 b

Cada valor es la media de 5 repeticiones. Los valores seguidos por la misma letra no son significativos de acuerdo al test de rango múltiple de Duncan (P=0.05).

-M= Plantas no micorrizadas +M= Plantas micorrizadas

Tabla 6. Actividades endo-poligalacturonasa (endo-PG) y poligalacturonasa (PG) en raíces de plantas de lechuga micorrizadas y no micorrizadas, extraídas con diferentes soluciones.

Soluciones extractantes	Actividades específicas (unidades/mg. proteína)			
	endo-PG		PG	
	-M	+M	-M	+M
ClNa (0.25M)	2.0 a	2.8 a	0.4 b	0.5 b
C-P (50mM) pH=7	6.2 b	7.8 b	0.2 a	2.1 d
C-P (50mM) pH=7 con PVPP	10.8 c	9.6 c	3.4 e	3.9 e
C-P (50mM) pH=7 con 1% glicocola y 1M urea	6.4 b	7.3 b	1.0 c	0.9 c
Tris-ClH (0.1M)	1.7 a	2.1 a	0.1 a	0.1 a

Cada valor es la media de 5 repeticiones. Los valores seguidos por la misma letra no son significativos de acuerdo al test de rango múltiple de Duncan (P=0.05).

-M= Plantas no micorrizadas +M= Plantas micorrizadas

Tabla 7. Actividades endo-polimetilgalacturonasa (endo-PMG) y polimetilgalacturonasa (PMG) en raíces de plantas de lechuga micorrizadas y no micorrizadas, extraídas con diferentes soluciones.

Soluciones extractantes	Actividades específicas (unidades/mg. proteína)			
	endo-PMG		PMG	
	-M	+M	-M	+M
ClNa (0.25M)	13.4 c	5.3 a	1.2 a	0.6 a
C-P (50mM) pH=7	7.3 b	27.3 e	3.6 b	3.1 b
C-P (50mM) pH=7 con PVPP	30.0 e	45.6 f	2.4 b	3.2 b
C-P (50mM) pH=7 con 1% glicocola y 1M urea	15.4 c	20.2 d	6.6 c	5.4 c
Tris-ClH (0.1M)	8.5 b	18.6 d	0.6 a	0.6 a

Cada valor es la media de 5 repeticiones. Los valores seguidos por la misma letra no son significativos de acuerdo al test de rango múltiple de Duncan (P=0.05).
-M= Plantas no micorrizadas +M= Plantas micorrizadas

Tabla 8. Actividades pectato liasa (PAL) y pectín liasa (PL) en raíces de plantas de lechuga micorrizadas y no micorrizadas, extraídas con diferentes soluciones.

Soluciones extractantes	Actividades específicas (unidades/mg. proteína)			
	PAL		PL	
	-M	+M	-M	+M
ClNa (0.25M)	11.4 b	14.2 b	8.6 b	7.3 b
C-P (50mM) pH=7	59.1 e	69.3 e	19.4 c	19.2 c
C-P (50mM) pH=7 con PVPP	81.2 f	72.7 f	17.6 c	20.2 c
C-P (50mM) pH=7 con 1% glicocola y 1M urea	48.8 e	51.1 e	24.6 d	27.3 d
Tris-ClH (0.1M)	8.6 b	10.2 b	3.2 a	2.7 a

Cada valor es la media de 5 repeticiones. Los valores seguidos por la misma letra no son significativos de acuerdo al test de rango múltiple de Duncan (P=0.05).
-M= Plantas no micorrizadas +M= Plantas micorrizadas

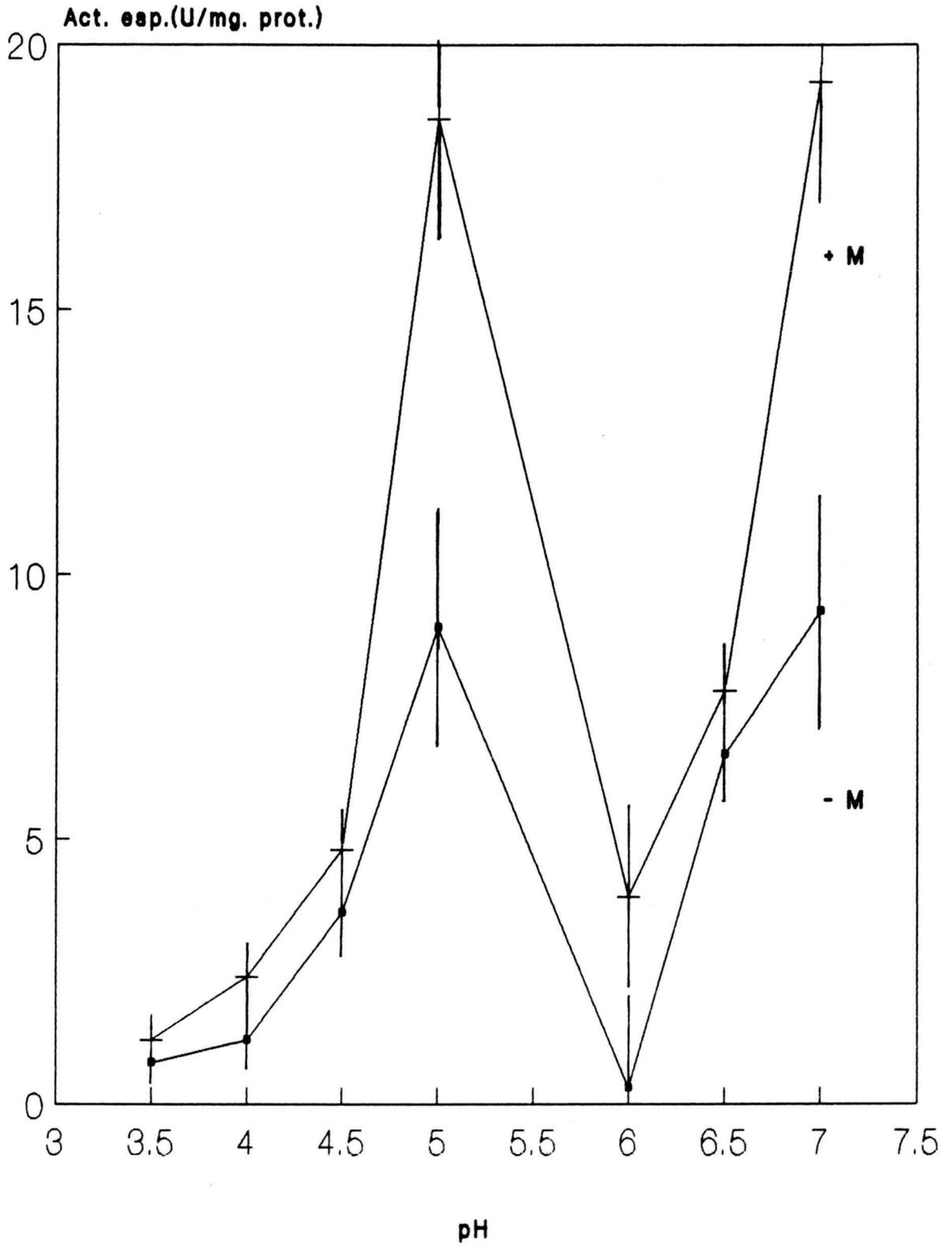
4. Efecto del pH en la actividad pectín esterasa.

La actividad pectín esterasa medida en función del pH de la mezcla de reacción posee dos máximos a pH=5 y pH=7 tanto en extractos de raíces micorrizadas como no micorrizadas (Figura 7). Si bien la actividad de los extractos de raíces micorrizadas fué superior al de las no micorrizadas a esos pHs.

Figura 7. Efecto del pH en la actividad pectín esterasa de extractos de raíces de lechuga micorrizada y no micorrizada con *G. mosseae*.

Las barras verticales representan el error estandar de las medias.

Figura 7



5. Influencia de los métodos de concentración en la actividad enzimática.

Las raíces de plantas de lechuga utilizadas para la valoración de actividades enzimáticas observadas con distintos métodos de concentración probados, alcanzaron después de 60 días de crecimiento, un $48\pm 3\%$ de porcentaje de longitud de raíz micorrizada.

De los métodos de concentración utilizados, en todos se observó una reducción del volumen de partida y un aumento de la cantidad de proteínas por ml de extracto (Tablas 9, 10, 11, 12, 13, 14 y 15).

La actividad pectín esterasa aumenta con todos los tipos de concentraciones utilizadas, respecto a la actividad del extracto enzimático crudo (Tabla 9). Mediante la precipitación con sulfato amónico, ultrafiltración con filtros Amicon y concentración con Sephadex G-50 y rotavapor se observa un aumento, aunque indiscriminado, de la actividad pectín esterasa desapareciendo la diferencia de actividad entre los extractos de raíces micorrizadas y no micorrizadas. Por el contrario en las muestras liofilizadas se mantienen las diferencias de actividad enzimática entre raíces micorrizadas y no micorrizadas existentes en el extracto crudo.

En las actividades endo-poligalacturonasa, poligalacturonasa, endo-polimetilgalacturonasa, polimetilgalacturonasa, pectato y pectín liasa (Tablas 10, 11, 12, 13, 14 y 15), ninguno de los sistemas utilizados, ya sea de concentración, ultrafiltración o precipitación de proteínas fueron eficaces ya que, si bien incrementaban la actividad específica de los

enzimas, no mantienen las diferencias de actividades entre plantas micorrizadas y no micorrizadas observadas en los extractos crudos.



Tabla 9. Concentración de la actividad pectín esterasa a pH=7 en extractos de raíces de plantas de lechuga micorrizadas y no micorrizadas con *G. mosseae*.

Material	Volumen (ml)	Proteínas (mg)	Actividad	Actividad específica (U/mg)
Extracto crudo	100	-M 79	-M 735	-M 9.3
		+M 74	+M 1427	+M 19.3
Precipitación SO ₄ (NH ₄) ₂ (80% saturación)	20	-M 9	-M 274	-M 30.4
		+M 8	+M 251	+M 31.3
Sephadex G-50	33	-M 50	-M 1000	-M 20
		+M 50	+M 1000	+M 20
Rotavapor	33	-M 81	-M 1547	-M 19.1
		+M 76	+M 1467	+M 19.3
Membrana Amicon	10	-M 21	-M 448	-M 21.3
		+M 20	+M 468	+M 23.4
Liofilización	20	-M 49	-M 853	-M 17.4
		+M 48	+M 2314	+M 48.2

-M = Plantas no micorrizadas. +M = Plantas micorrizadas.

Tabla 10. Concentración de la actividad endo-poligalacturonasa en extractos de raíces de plantas de lechuga micorrizadas y no micorrizadas con *G. mosseae*.

Material	Volumen (ml)	Proteínas (mg)	Actividad	Actividad específica (U/mg)
Extracto crudo	100	-M 80	-M 864	-M 10.8
		+M 75	+M 720	+M 9.6
Precipitación $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ (80% saturación)	20	-M 9	-M 362	-M 40.3
		+M 8	+M 307	+M 38.4
Sephadex G-50	33	-M 53	-M 704	-M 13.3
		+M 50	+M 585	+M 11.7
Rotavapor	33	-M 80	-M 960	-M 12
		+M 76	+M 760	+M 10
Membrana Amicon	10	-M 24	-M 513	-M 21.4
		+M 23	+M 476	+M 20.7
Liofilización	20	-M 50	-M 1810	-M 36.2
		+M 48	+M 1876	+M 39.1

-M = Plantas no micorrizadas. +M = Plantas micorrizadas.

Tabla 11. Concentración de la actividad poligalacturonasa en extractos de raíces de plantas de lechuga micorrizadas y no micorrizadas con G. mosseae.

Material	Volumen (ml)	Proteínas (mg)	Actividad	Actividad específica (U/mg)
Extracto crudo	100	-M 80	-M 272	-M 3.4
		+M 75	+M 292	+M 3.9
Precipitación SO ₄ (NH ₄) ₂ (80% saturación)	20	-M 9	-M 126	-M 14
		+M 8	+M 124	+M 15.6
Sephadex G-50	33	-M 53	-M 302	-M 5.7
		+M 50	+M 300	+M 6
Rotavapor	33	-M 80	-M 320	-M 4
		+M 76	+M 304	+M 4
Membrana Amicon	10	-M 24	-M 213	-M 8.9
		+M 23	+M 225	+M 9.8
Liofilización	20	-M 50	-M 600	-M 12
		+M 48	+M 480	+M 10

-M = Plantas no micorrizadas. +M = Plantas micorrizadas.

Tabla 12. Concentración de la actividad endo-polimetilgalacturonasa extractos de raíces de plantas de lechuga micorrizadas y no micorrizadas con *G. mosseae*.

Material	Volumen (ml)	Proteínas (mg)	Actividad	Actividad específica (U/mg)
Extracto crudo	100	-M 80	-M 2400	-M 30
		+M 75	+M 3420	+M 45.6
Precipitación SO ₄ (NH ₄) (80% saturación)	20	-M 9	-M 1170	-M 130
		+M 8	+M 1008	+M 126
Sephadex G-50	33	-M 53	-M 2655	-M 50.1
		+M 50	+M 2485	+M 49.7
Rotavapor	33	-M 80	-M 4824	-M 60.3
		+M 76	+M 4795	+M 63.1
Membrana Amicon	10	-M 24	-M 1896	-M 79
		+M 23	+M 1840	+M 80
Liofilización	20	-M 50	-M 5500	-M 110
		+M 48	+M 5424	+M 113

-M = Plantas no micorrizadas. +M = Plantas micorrizadas.

Tabla 13. Concentración de la actividad polimetilgalacturonasa en extractos de raíces de plantas de lechuga micorrizadas y no micorrizadas con *G. mosseae*.

Material	Volumen (ml)	Proteínas (mg)	Actividad	Actividad específica (U/mg)
Extracto crudo	100	-M 80	-M 192	-M 2.4
		+M 75	+M 240	+M 3.2
Precipitación SO ₄ (NH ₄) ₂ (80% saturación)	20	-M 9	-M 90	-M 10
		+M 8	+M 104	+M 13
Sephadex G-50	33	-M 53	-M 334	-M 6.3
		+M 50	+M 295	+M 5.9
Rotavapor	33	-M 80	-M 240	-M 3
		+M 76	+M 266	+M 3.5
Membrana Amicon	10	-M 24	-M 168	-M 7
		+M 23	+M 120	+M 5.2
Liofilización	20	-M 50	-M 350	-M 7
		+M 48	+M 432	+M 9

-M = Plantas no micorrizadas. +M = Plantas micorrizadas.

Tabla 14. Concentración de la actividad pectato liasa en extractos de raíces de plantas de lechuga micorrizadas y no micorrizadas con *G. mosseae*.

Material	Volumen (ml)	Proteínas (mg)	Actividad	Actividad específica (U/mg)
Extracto crudo	100	-M 80	-M 8	-M 0.10
		+M 75	+M 4.5	+M 0.06
Precipitación $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ (80% saturación)	20	-M 9	-M 4.1	-M 0.45
		+M 8	+M 3.6	+M 0.45
Sephadex G-50	33	-M 53	-M 10.6	-M 0.20
		+M 50	+M 9	+M 0.18
Rotavapor	33	-M 80	-M 9.6	-M 0.12
		+M 76	+M 6.8	+M 0.09
Membrana Amicon	10	-M 24	-M 3.6	-M 0.15
		+M 23	+M 3.4	+M 0.15
Liofilización	20	-M 50	-M 18.5	-M 0.37
		+M 48	+M 18.2	+M 0.38

-M = Plantas no micorrizadas. +M = Plantas micorrizadas.

Tabla 15. Concentración de la actividad pectín liasa en extractos de raíces de plantas de lechuga micorrizadas y no micorrizadas con *G. mosseae*.

Material	Volumen (ml)	Proteínas (mg)	Actividad	Actividad específica (U/mg)
Extracto crudo	100	-M 80	-M 15.2	-M 0.19
		+M 75	+M 14.2	+M 0.19
Precipitación SO ₄ (NH ₄) ₂ (80% saturación)	20	-M 9	-M 4.5	-M 0.50
		+M 8	+M 4.2	+M 0.52
Sephadex G-50	33	-M 53	-M 15.6	-M 0.30
		+M 50	+M 14	+M 0.28
Rotavapor	33	-M 80	-M 16.8	-M 0.21
		+M 76	+M 15.2	+M 0.20
Membrana Amicon	10	-M 24	-M 6	-M 0.25
		+M 23	+M 59	+M 0.26
Liofilización	20	-M 50	-M 20	-M 0.40
		+M 48	+M 18.2	+M 0.38

-M = Plantas no micorrizadas. +M = Plantas micorrizadas.

6. Evolución de las distintas actividades pectolíticas a lo largo del proceso de infección VA.

Se realizaron las valoraciones de las distintas actividades enzimáticas en plantas cultivadas durante 30, 60 y 80 días, en las que se observó un porcentaje de infección de 27 ± 3 , 39 ± 6 y $49\pm 9\%$ para el caso de las inoculadas con *G. mosseae* y de 24 ± 3 , 35 ± 5 y $70\pm 7\%$ en los casos de inoculación con *G. fasciculatum*.

La actividad pectín esterasa fué siempre significativamente superior en plantas inoculadas tanto con *G. mosseae* (Tabla 16, Figuras 8 y 9) como con *G. fasciculatum* (Tabla 17, Figuras 10 y 11) a lo largo del proceso de infección VA, independientemente del pH utilizado en la mezcla de reacción que se empleó para determinar la actividad. La actividad pectín esterasa de extractos de raíces de lechuga no inoculadas se mantuvieron en unos niveles similares a lo largo del experimento.

Las actividades endo-poligalacturonasa y poligalacturonasa evolucionaron de forma similar. Como se observa en las figuras 12, 13, 14 y 15 estas actividades fueron disminuyendo a lo largo del experimento. No se encontraron diferencias significativas en las actividades enzimáticas entre plantas micorrizadas y no micorrizadas, tanto por *G. mosseae* (Tablas 18 y 20, Figuras 12 y 14) como por *G. fasciculatum* (Tablas 19 y 21 y Figuras 13 y 15) en ningún momento del ensayo.

Las actividades endo-polimetilgalacturonasa y polimetilgalacturonasa de extractos de raíces de lechuga no inoculadas se mantuvieron en unos niveles

similares a lo largo del experimento (Figuras 16, 17, 18 y 19). A los 30 días de cultivo las plantas micorrizadas mostraron igual actividad endo-polimetilgalacturonasa que las no micorrizadas tanto con *G. mosseae* (Tabla 22, Figuras 16), como con *G. fasciculatum* (Tabla 23, Figuras 17). A los 60 días se aprecia claramente una mayor actividad en las plantas inoculadas, mientras que a los 80 días se invierte esta relación (Tablas 22 y 23). Solo se observó un incremento de actividad polimetilgalacturonasa de raíces micorrizadas respecto a las no micorrizadas cuando las plantas se cosecharon a los 30 días de crecimiento (Tablas 24 y 25), independientemente del endofito inoculado.

Por otro lado los datos de las actividades pectato liasa medidas según la técnica Starr y Moran (1962), también se mantienen con valores similares a lo largo del experimento (Figuras 20 y 21). Se observó que no hay diferencias significativas en actividad pectato liasa, entre extracto de raíces de plantas micorrizadas y no micorrizadas, en ningún momento del ensayo tanto utilizando *G. mosseae* como *G. fasciculatum* (Tablas 26 y 27).

Como se aprecia en las figuras 22 y 23, la evolución de la actividad pectín liasa medida según la técnica de Starr y Moran (1962) en plantas de lechuga no micorrizadas se mantuvo a lo largo del experimento. Sin embargo, se observó un incremento significativo en plantas micorrizadas con *G. mosseae* a los 30 días y a los 60 en plantas micorrizadas con *G. fasciculatum* (Tablas 28 y 29). En el caso de *G. mosseae* a los 80 días el incremento fue en las plantas no micorrizadas, mientras que con *G. fasciculatum* se mantiene la

igualdad de actividades.

Debido a la variabilidad de datos obtenidos en las actividades pectato y pectín liasa se utilizó otra planta hospedadora y se determinó la actividad utilizando también el método de cinética enzimática descrito por Albersheim y Killias (1962).

Las actividades pectato y pectín liasa medidas según la técnica de Starr y Moran (1962) en extracto de plantas de maíz fueron similares a las observadas en plantas de lechuga (Tablas 30 y 31). No se encontró diferencia de actividad pectato liasa mientras que se detectó mayor actividad pectín liasa de las plantas micorrizadas a los 30 días (Figuras 24 y 25).

Las actividades pectato y pectín liasa en maíz y lechuga realizadas mediante el método de cinética enzimática tuvieron una tendencia similar a las medidas mediante el método de Starr y Moran (1962) (Tablas 32 y 33).

Tabla 16. Actividad pectín esterasa (PE) a distintos valores de pH en extractos concentrados de raíces de plantas de lechuga micorrizadas y no micorrizadas con *G. mosseae*.

Tratamientos	Actividad específica (U./mg. prot.) después de (días).					
	30		60		80	
	pH=5.5	pH=7	pH=5.5	pH=7	pH=5.5	pH=7
-M	3.8a	9.0a	9.3a	17.4a	4.5a	9.6a
+M	15.6b	30.1b	18.6b	48.2b	16.2b	24.1b

Cada valor es la media de 5 repeticiones. Los valores seguidos por la misma letra no son significativos de acuerdo al test de rango múltiple de Duncan (P=0.05).

-M= Plantas no micorrizadas +M= Plantas micorrizadas

Figura 8. Evolución de la actividad pectín esterasa a pH=5.5 en extractos de raíces de plantas de lechuga micorrizadas y no micorrizadas con *G. mosseae*.

Figura 9. Evolución de la actividad pectín esterasa a pH=7 en extractos de raíces de plantas de lechuga micorrizadas y no micorrizadas con *G. mosseae*.

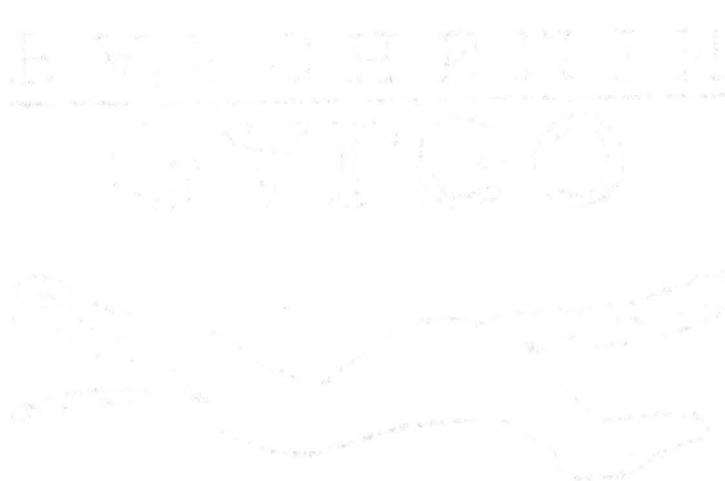


Figura 8

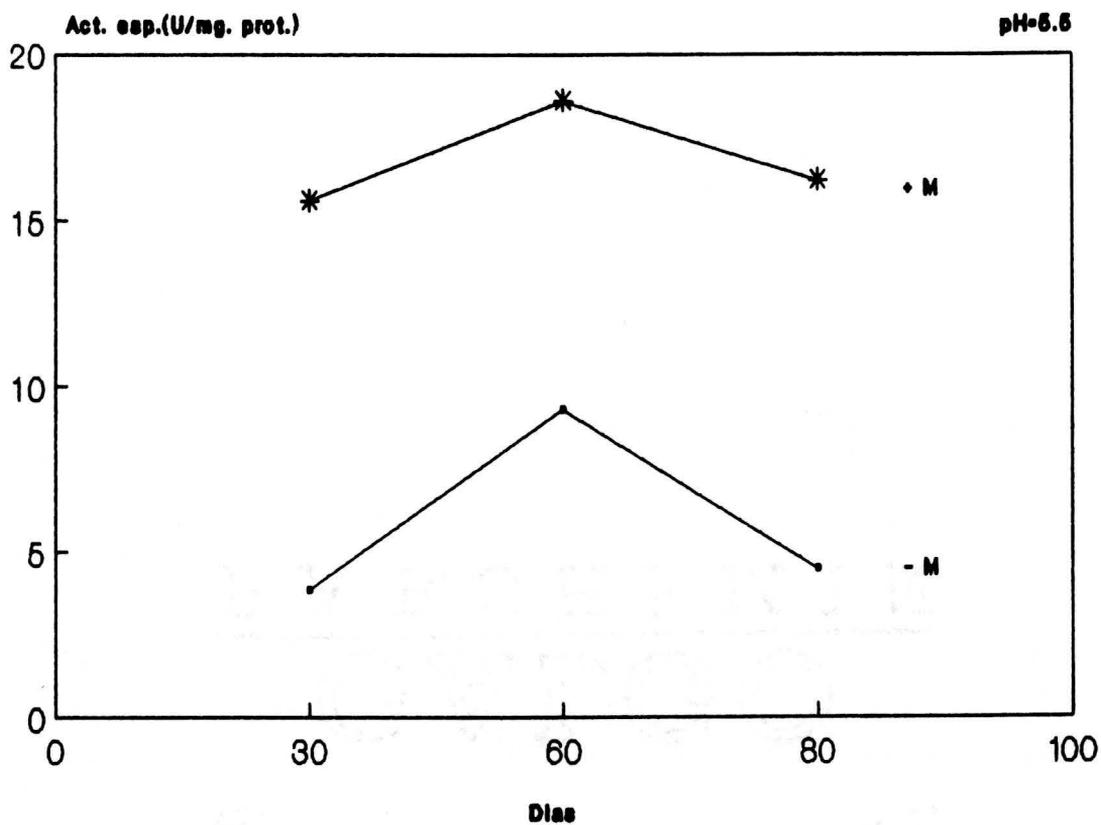


Figura 9

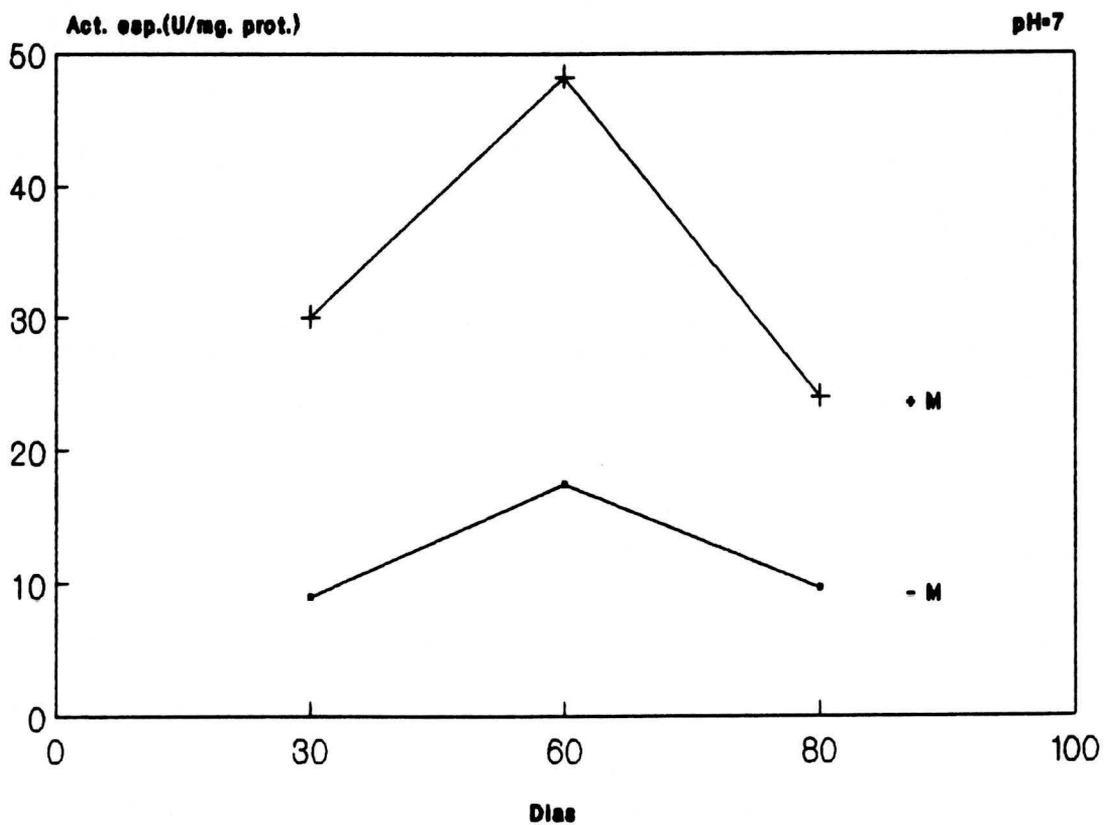


Tabla 17. Actividad pectín esterasa (PE) a distintos valores de pH en extractos concentrados de raíces de plantas de lechuga micorrizadas y no micorrizadas con *G. fasciculatum*.

Tratamientos	Actividad específica (U./mg. prot.) despues de (días).					
	30		60		80	
	pH=5.5	pH=7	pH=5.5	pH=7	pH=5.5	pH=7
-M	2.3a	6.7a	8.4a	15.0a	2.5a	7.0a
+M	12.4b	26.7b	16.2b	40.0b	15.8b	20.1b

Cada valor es la media de 5 repeticiones. Los valores seguidos por la misma letra no son significativos de acuerdo al test de rango múltiple de Duncan (P=0.05).

-M= Plantas no micorrizadas +M= Plantas micorrizadas



Figura 10. Evolución de la actividad pectín esterasa a pH=5.5 en extractos de raíces de plantas de lechuga micorrizadas y no micorrizadas con *G. fasciculatum*.

Figura 11. Evolución de la actividad pectín esterasa a pH=7 en extractos de raíces de plantas de lechuga micorrizadas y no micorrizadas con *G. fasciculatum*.

Figura 10

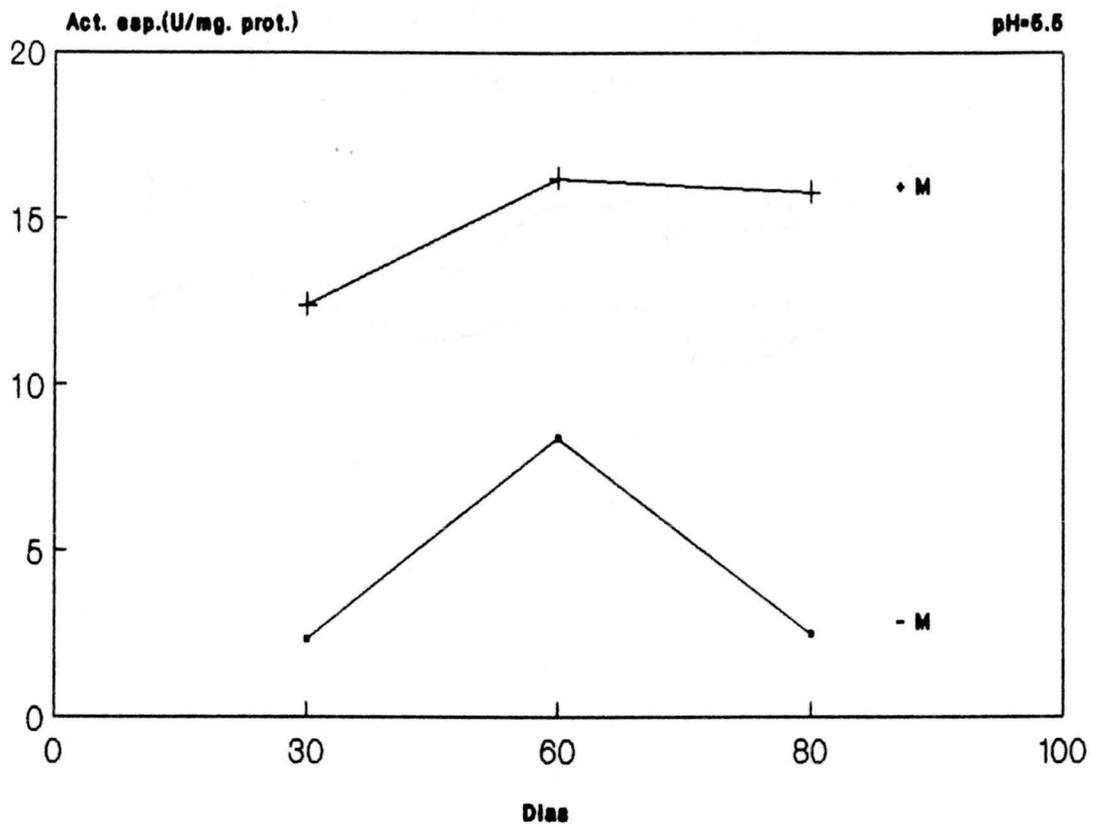


Figura 11

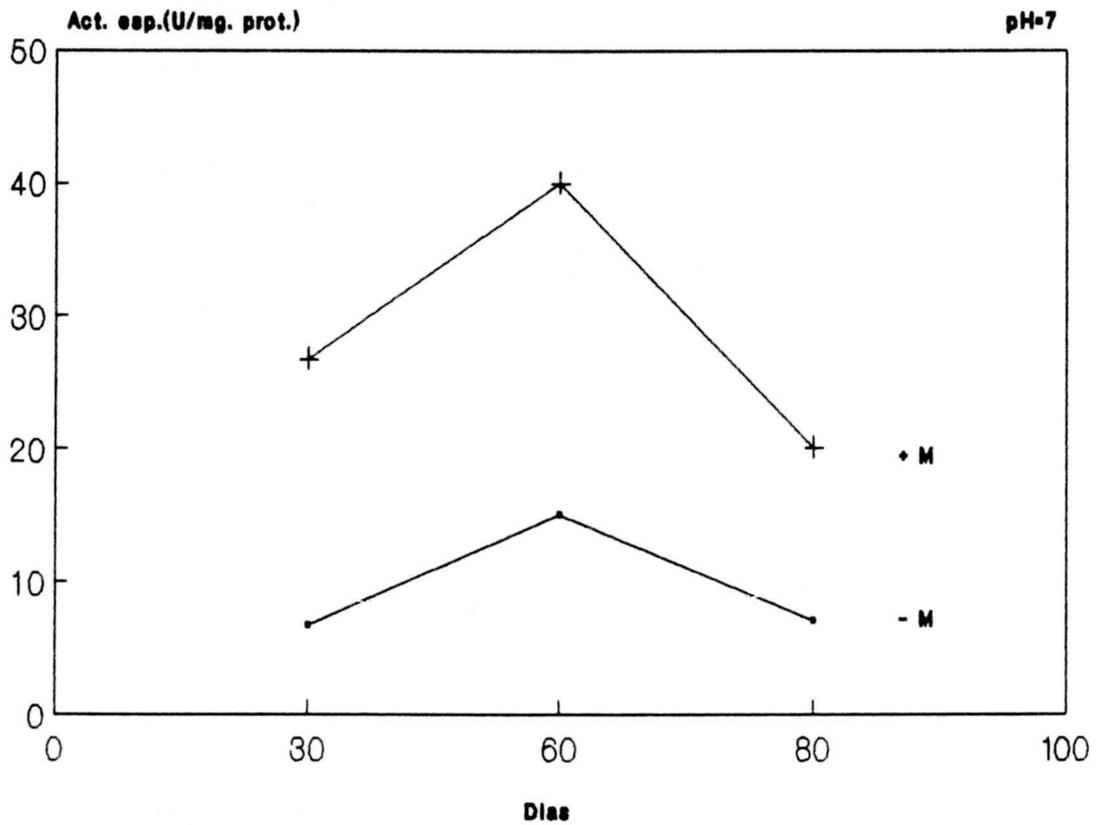


Tabla 18. Actividad endo-poligalacturonasa (endo-PG) en extractos de raíces de plantas de lechuga micorrizadas y no micorrizadas con *G. mosseae*.

Tratamientos	Actividad específica (U./mg. prot.) despues de (días).		
	30	60	80
-M	21.1 a	10.8 a	5.3 a
+M	24.2 a	9.6 a	6.1 a

Cada valor es la media de 5 repeticiones. Los valores seguidos por la misma letra no son significativos de acuerdo al test de rango múltiple de Duncan (P=0.05).
-M= Plantas no micorrizadas +M= Plantas micorrizadas

Tabla 19. Actividad endo-poligalacturonasa (endo-PG) en extractos de raíces de plantas de lechuga micorrizadas y no micorrizadas con *G. fasciculatum*.

Tratamientos	Actividad específica (U./mg. prot.) después de (días).		
	30	60	80
-M	15.1 a	11.9 a	4.2 a
+M	15.6 a	12.1 a	5.4 a

Cada valor es la media de 5 repeticiones. Los valores seguidos por la misma letra no son significativos de acuerdo al test de rango múltiple de Duncan (P=0.05).
 -M= Plantas no micorrizadas +M= Plantas micorrizadas

Figura 12. Evolución de la actividad endo-poligalacturonasa en extractos de raíces de plantas de lechuga micorrizadas y no micorrizadas con *G. mosseae*.

Figura 13. Evolución de la actividad endo-poligalacturonasa en extractos de raíces de plantas de lechuga micorrizadas y no micorrizadas con *G. fasciculatum*.

Figura 12

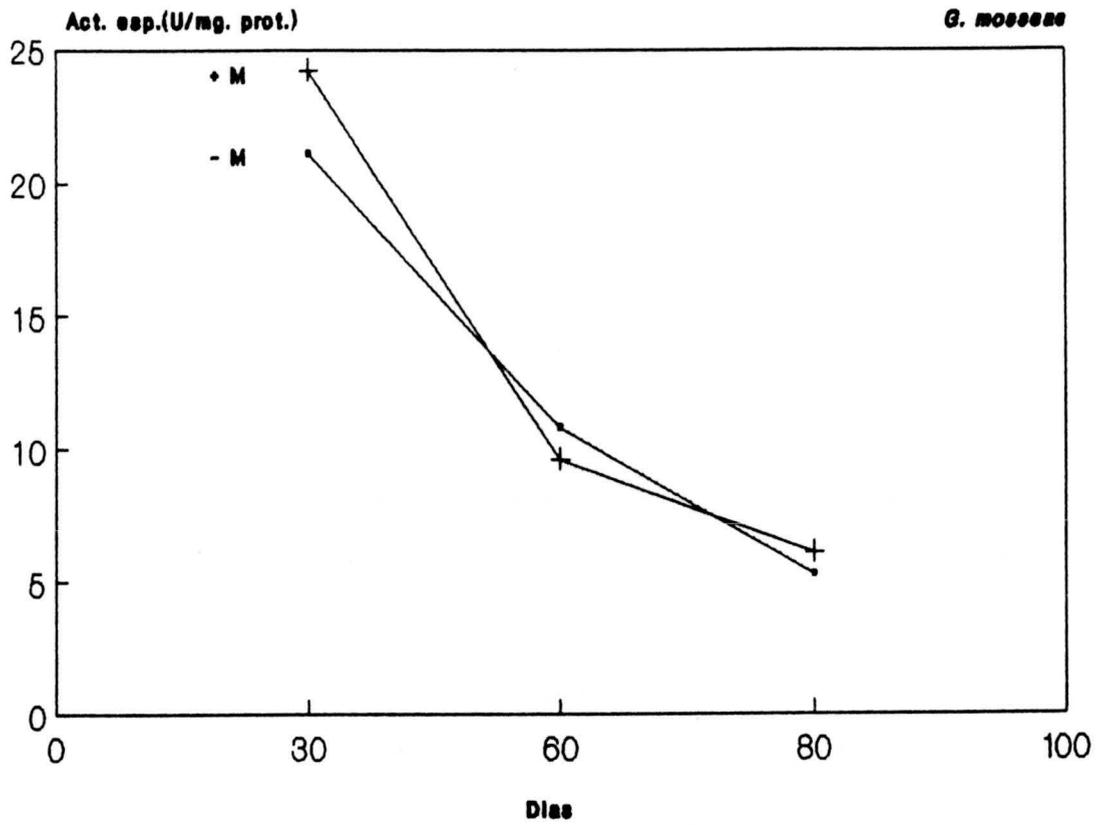


Figura 13

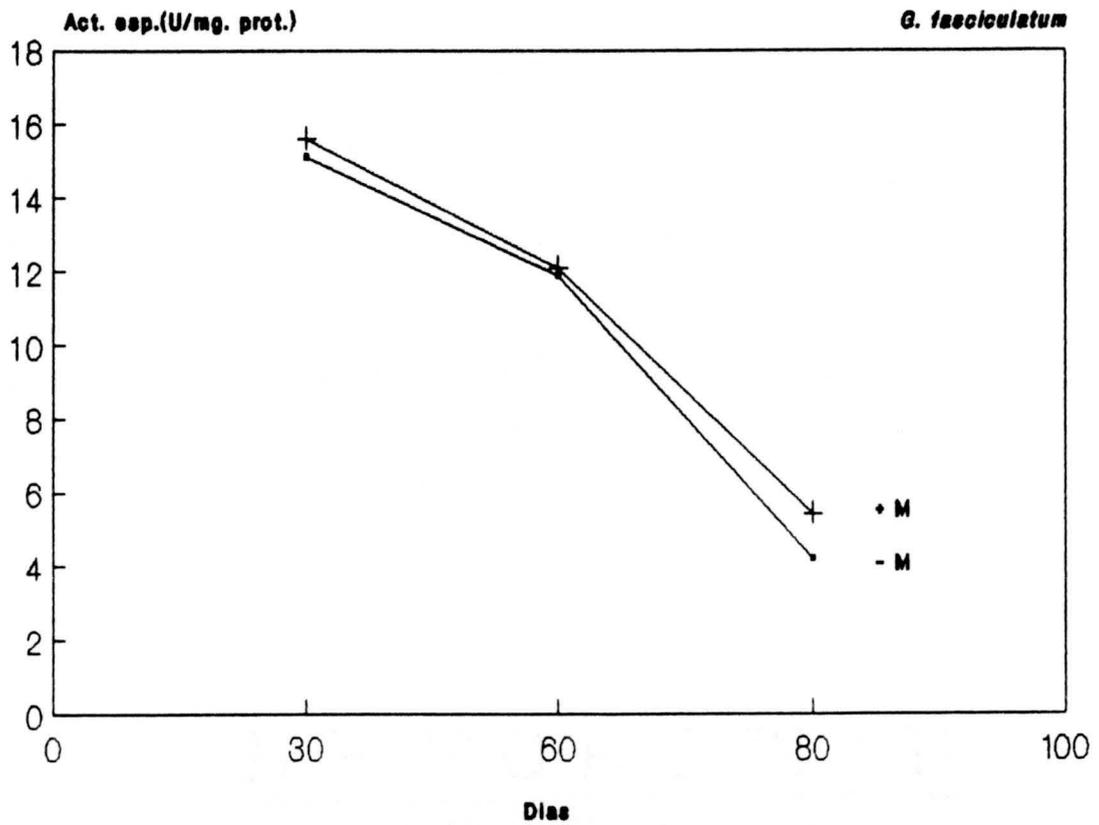


Tabla 20. Actividad poligalacturonasa (PG) en extractos de raíces de plantas de lechuga micorrizadas y no micorrizadas con *G. mosseae*.

Tratamientos	Actividad específica (U./mg. prot.) después de (días).		
	30	60	80
-M	6.7 a	3.4 a	1.3 a
+M	5.4 a	3.9 a	1.2 a

Cada valor es la media de 5 repeticiones. Los valores seguidos por la misma letra no son significativos de acuerdo al test de rango múltiple de Duncan (P=0.05).

-M= Plantas no micorrizadas +M= Plantas micorrizadas

Tabla 21. Actividad poligalacturonasa (PG) en extractos de raíces de plantas de lechuga micorrizadas y no micorrizadas con *G. fasciculatum*.

Tratamientos	Actividad específica (U./mg. prot.) despues de (días).		
	30	60	80
-M	7.4 a	6.3 a	3.1 a
+M	8.5 a	7.6 a	3.6 a

Cada valor es la media de 5 repeticiones. Los valores seguidos por la misma letra no son significativos de acuerdo al test de rango múltiple de Duncan (P=0.05).
 -M= Plantas no micorrizadas +M= Plantas micorrizadas

Figura 14. Evolución de la actividad poligalacturonasa en extractos de raíces de plantas de lechuga micorrizadas y no micorrizadas con *G. mosseae*.

Figura 15. Evolución de la actividad poligalacturonasa en extractos de raíces de plantas de lechuga micorrizadas y no micorrizadas con *G. fasciculatum*.

Figura 14

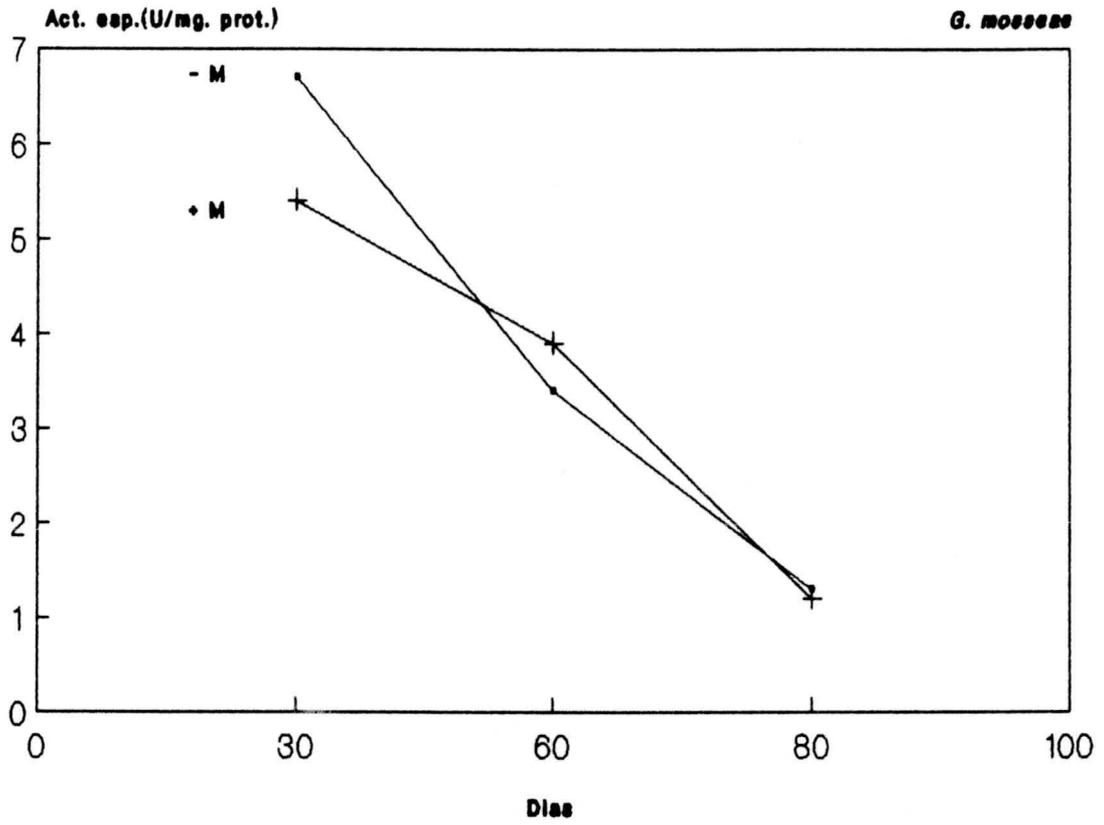


Figura 15

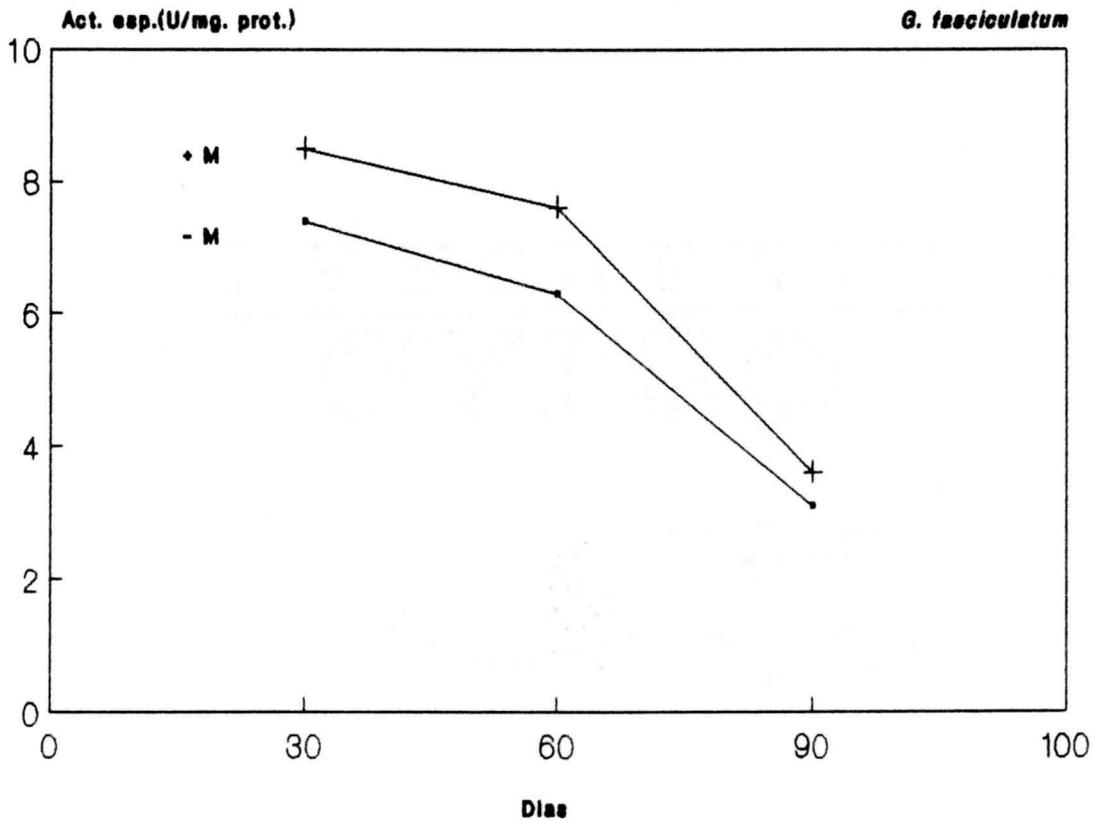


Tabla 22. Actividad endo-polimetilgalacturonasa (endo-PMG) en extractos de raíces de plantas de lechuga micorrizadas y no micorrizadas con *G. mosseae*.

Tratamientos	Actividad específica (U./mg. prot.) después de (días).		
	30	60	80
-M	35.4 a	30.0 a	35.4 a
+M	34.2 a	45.6 b	29.3 b

Cada valor es la media de 5 repeticiones. Los valores seguidos por la misma letra no son significativos de acuerdo al test de rango múltiple de Duncan (P=0.05).

-M= Plantas no micorrizadas +M= Plantas micorrizadas

Tabla 23. Actividad endo-polimetilgalacturonasa (endo-PMG) en extractos de raíces de plantas de lechuga micorrizadas y no micorrizadas con *G. fasciculatum*.

Tratamientos	Actividad específica (U./mg. prot.) después de (días).		
	30	60	80
-M	31.8 a	30.0 a	33.6 a
+M	28.8 a	43.4 b	28.3 b

Cada valor es la media de 5 repeticiones. Los valores seguidos por la misma letra no son significativos de acuerdo al test de rango múltiple de Duncan (P=0.05).
-M= Plantas no micorrizadas +M= Plantas micorrizadas

Figura 16. Evolución de la actividad endo-polimetilgalacturonasa en extractos de raíces de plantas de lechuga micorrizadas y no micorrizadas con *G. mosseae*.

Figura 17. Evolución de la actividad endo-polimetilgalacturonasa en extractos de raíces de plantas de lechuga micorrizadas y no micorrizadas con *G. fasciculatum*.

Figura 16

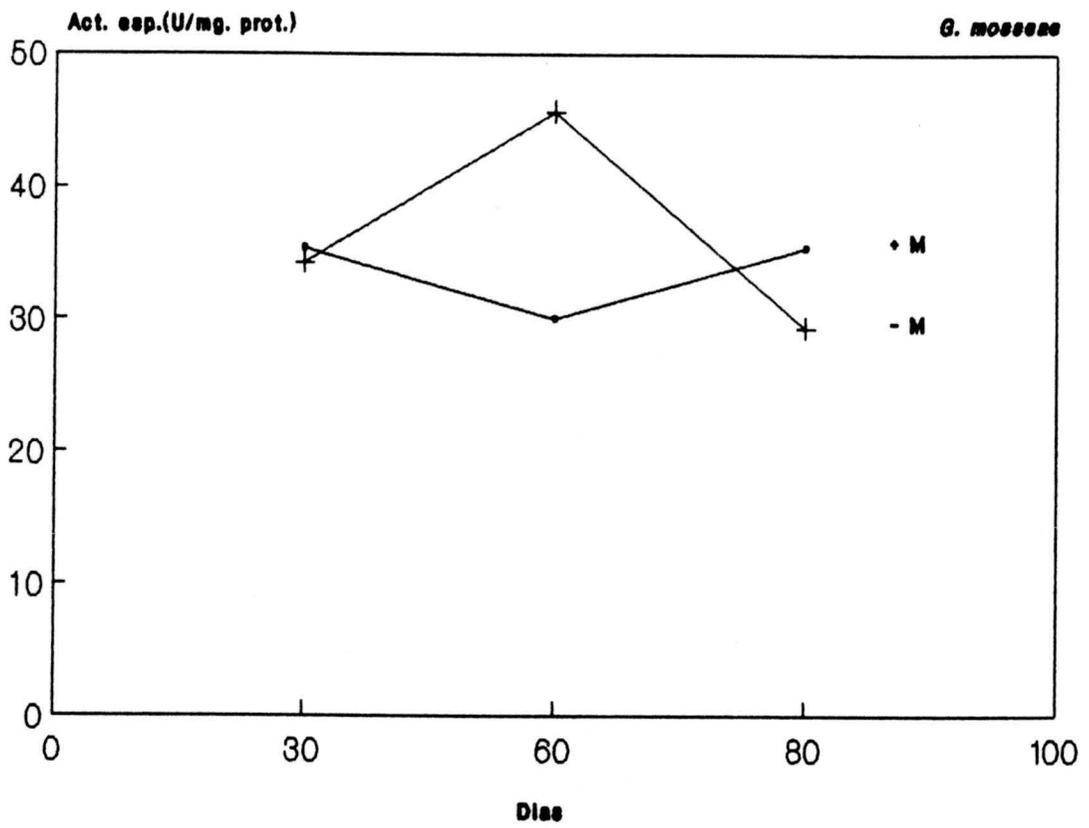


Figura 17

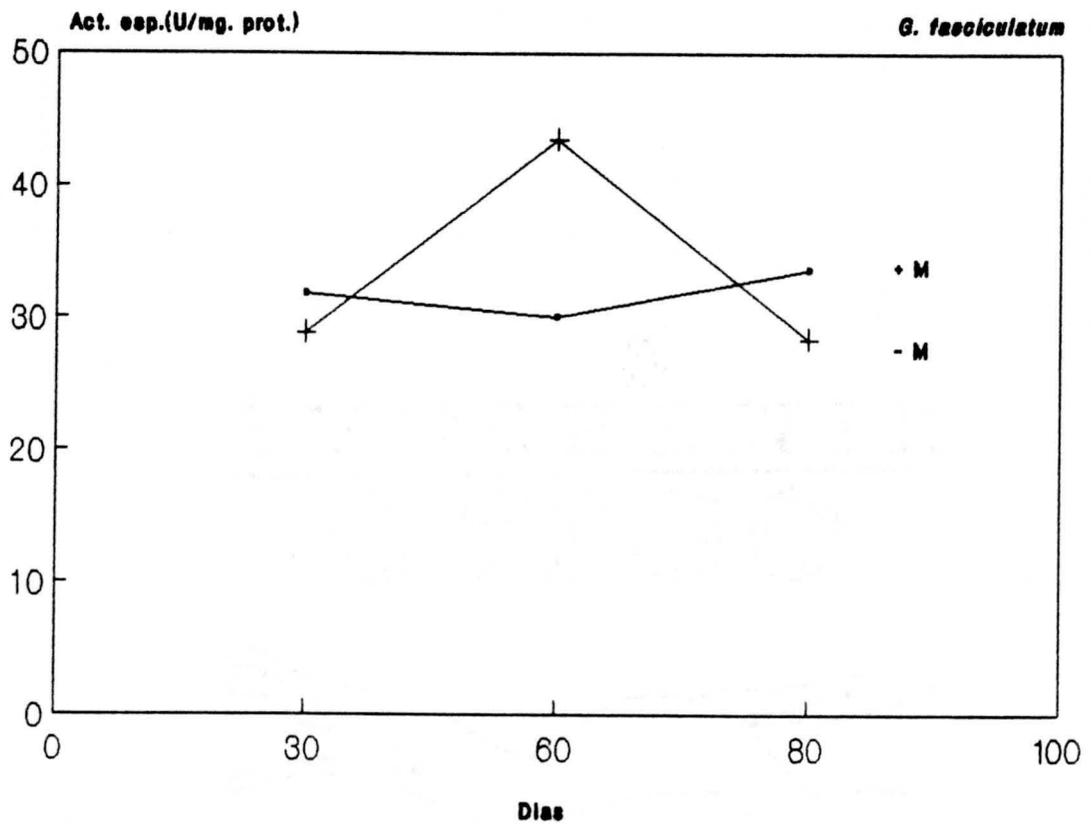


Tabla 24. Actividad polimetilgalacturonasa (PMG) en extractos de raíces de plantas de lechuga micorrizadas y no micorrizadas con *G. mosseae*.

Tratamientos	Actividad específica (U./mg. prot.) despues de (días).		
	30	60	80
-M	3.1 a	2.4 a	2.5 a
+M	7.2 b	3.2 a	2.4 a

Cada valor es la media de 5 repeticiones. Los valores seguidos por la misma letra no son significativos de acuerdo al test de rango múltiple de Duncan (P=0.05).
-M= Plantas no micorrizadas +M= Plantas micorrizadas

Tabla 25. Actividad polimetilgalacturonasa (PMG) en extractos de raíces de plantas de lechuga micorrizadas y no micorrizadas con *G. fasciculatum*.

Tratamientos	Actividad específica (U./mg. prot.) después de (días).		
	30	60	80
-M	0.8 a	1.8 a	2.2 a
+M	3.6 b	2.4 a	2.3 a

Cada valor es la media de 5 repeticiones. Los valores seguidos por la misma letra no son significativos de acuerdo al test de rango múltiple de Duncan (P=0.05).
 -M= Plantas no micorrizadas +M= Plantas micorrizadas

Figura 18. Evolución de la actividad polimetilgalacturonasa en extractos de raíces de plantas de lechuga micorrizadas y no micorrizadas con *G. mosseae*.

Figura 19. Evolución de la actividad polimetilgalacturonasa en extractos de raíces de plantas de lechuga micorrizadas y no micorrizadas con *G. fasciculatum*.

Figura 18

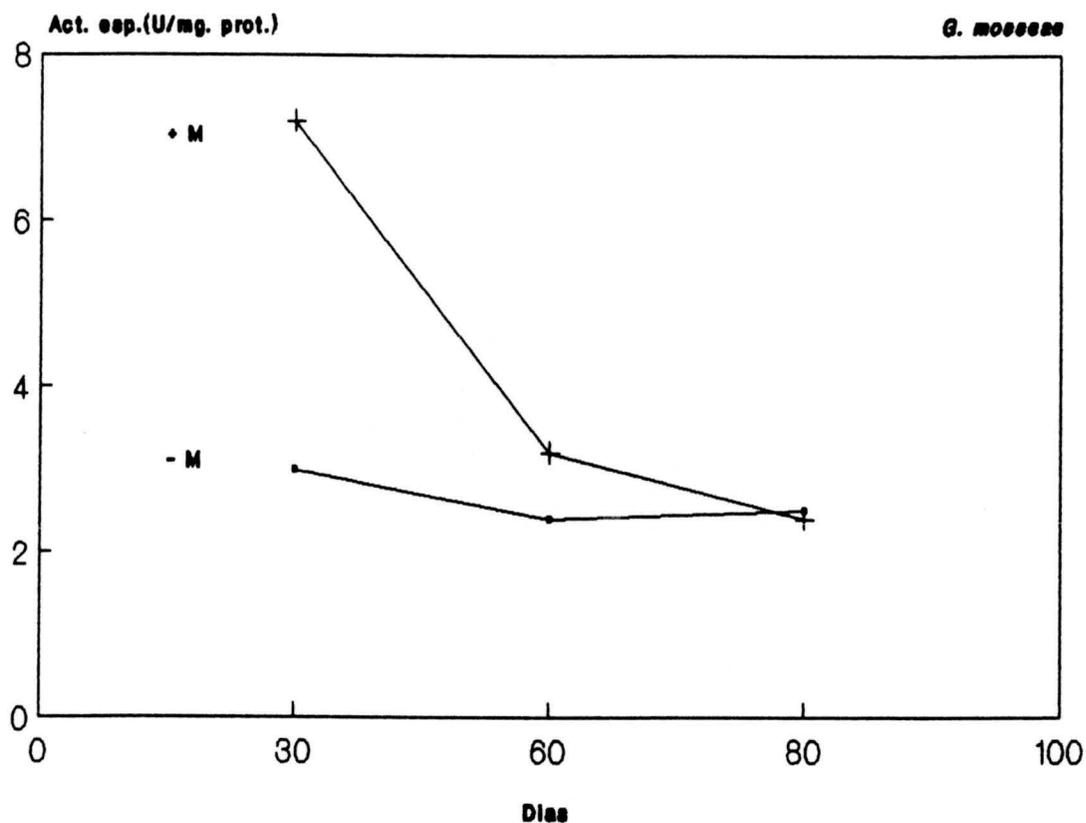
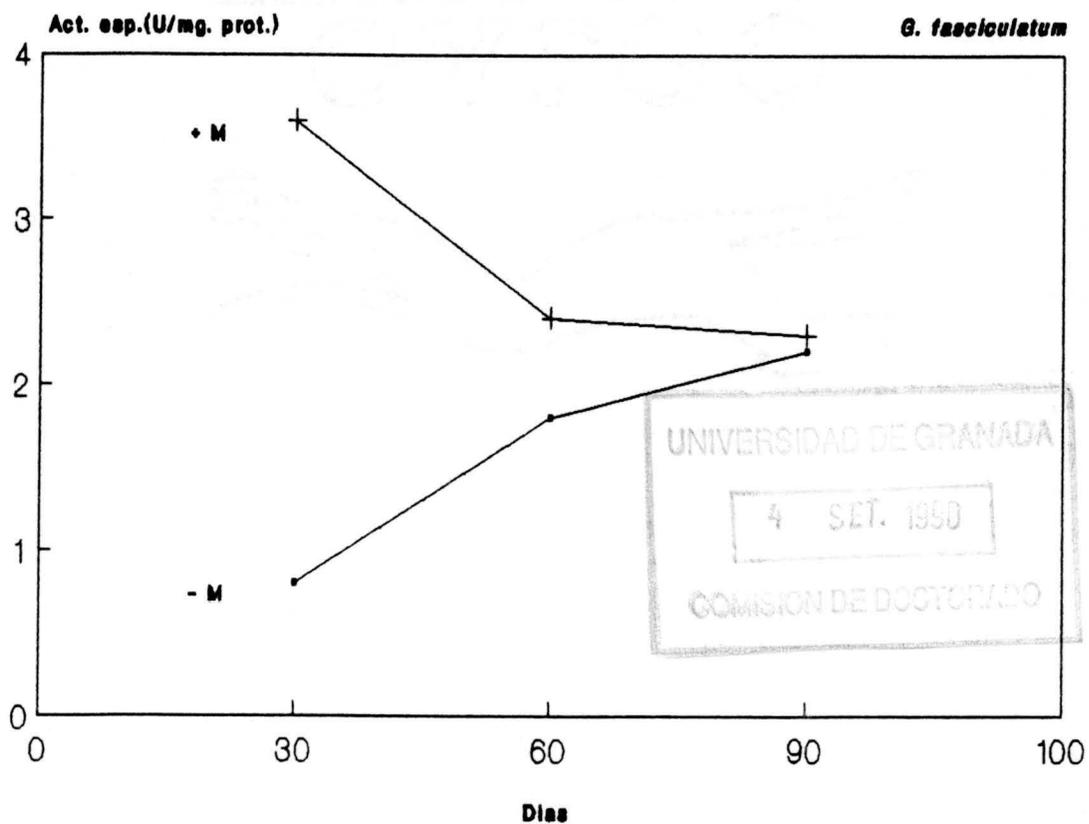


Figura 19



UNIVERSIDAD DE GRANADA
4 SET. 1950
COMISION DE DOCTORADO

Tabla 26. Actividad pectato liasa (PAL) en extractos de raíces de plantas de lechuga micorrizadas y no micorrizadas con *G. mosseae*.

Tratamientos	Actividad específica (U./mg. prot.) después de (días).		
	30	60	80
-M	0.12 a	0.10 a	0.07 a
+M	0.08 a	0.06 a	0.05 a

Cada valor es la media de 5 repeticiones. Los valores seguidos por la misma letra no son significativos de acuerdo al test de rango múltiple de Duncan (P=0.05).
-M= Plantas no micorrizadas +M= Plantas micorrizadas

Tabla 27. Actividad pectato liasa (PAL) en extractos de raíces de plantas de lechuga micorrizadas y no micorrizadas con *G. fasciculatum*.

Tratamientos	Actividad específica (U./mg. prot.) despues de (días).		
	30	60	80
-M	0.19 a	0.17 a	0.15 a
+M	0.47 a	0.15 a	0.13 a

Cada valor es la media de 5 repeticiones. Los valores seguidos por la misma letra no son significativos de acuerdo al test de rango múltiple de Duncan (P=0.05).
-M= Plantas no micorrizadas +M= Plantas micorrizadas

Figura 20. Evolución de la actividad pectato liasa en extractos de raíces de plantas de lechuga micorrizadas y no micorrizadas con *G. mosseae*.

Figura 21. Evolución de la actividad pectato liasa en extractos de raíces de plantas de lechuga micorrizadas y no micorrizadas con *G. fasciculatum*.

Figura 20

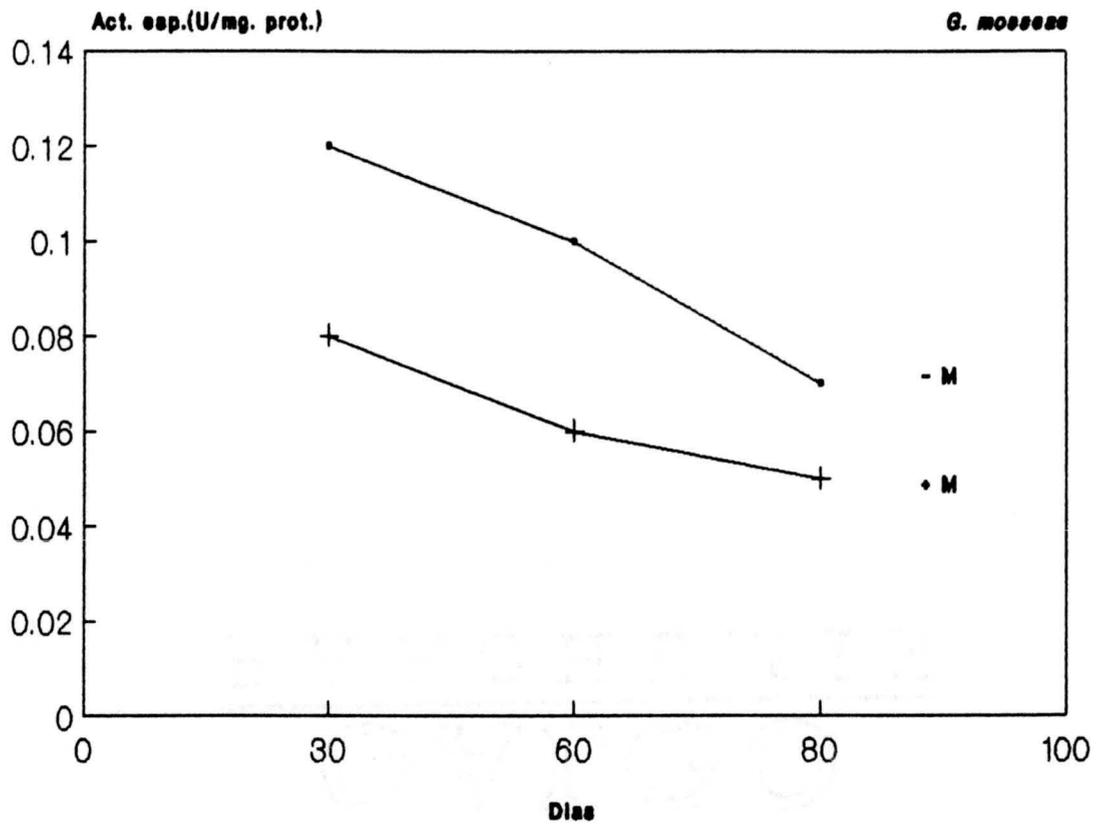


Figura 21

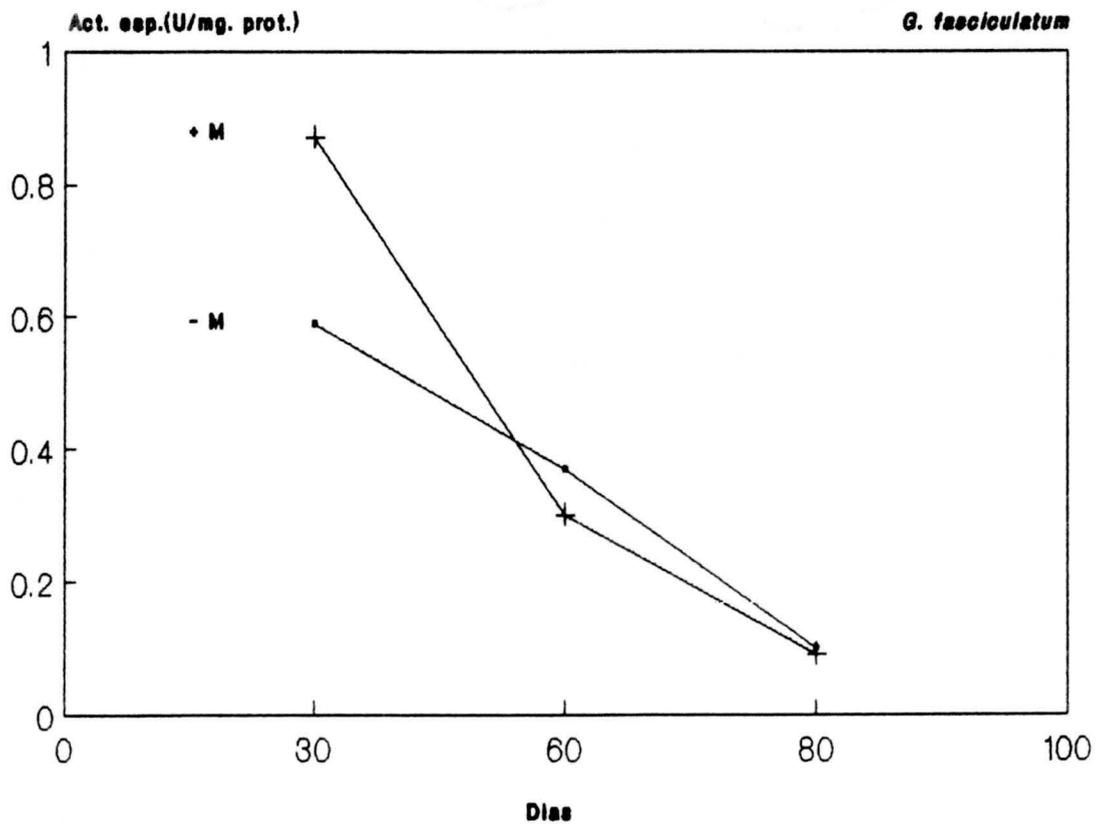


Tabla 28. Actividad pectín liasa (PL) en extractos de raíces de plantas de lechuga micorrizadas y no micorrizadas con *G. mosseae*.

Tratamientos	Actividad específica (U./mg. prot.) después de (días).		
	30	60	80
-M	0.15 a	0.19 a	0.15 a
+M	0.45 b	0.19 a	0.09 b

Cada valor es la media de 5 repeticiones. Los valores seguidos por la misma letra no son significativos de acuerdo al test de rango múltiple de Duncan (P=0.05).

-M= Plantas no micorrizadas +M= Plantas micorrizadas

Tabla 29. Actividad pectín liasa (PL) en extractos de raíces de plantas de lechuga micorrizadas y no micorrizadas con *G. fasciculatum*.

Tratamientos	Actividad específica (U./mg. prot.) después de (días).		
	30	60	80
-M	0.18 a	0.21 a	0.23 a
+M	0.18 a	0.60 b	0.24 a

Cada valor es la media de 5 repeticiones. Los valores seguidos por la misma letra no son significativos de acuerdo al test de rango múltiple de Duncan (P=0.05).

-M= Plantas no micorrizadas +M= Plantas micorrizadas

Figura 22. Evolución de la actividad pectín liasa en extractos de raíces de plantas de lechuga micorrizadas y no micorrizadas con *G. mosseae*.

Figura 23. Evolución de la actividad pectín liasa en extractos de raíces de plantas de lechuga micorrizadas y no micorrizadas con *G. fasciculatum*.

Figura 22

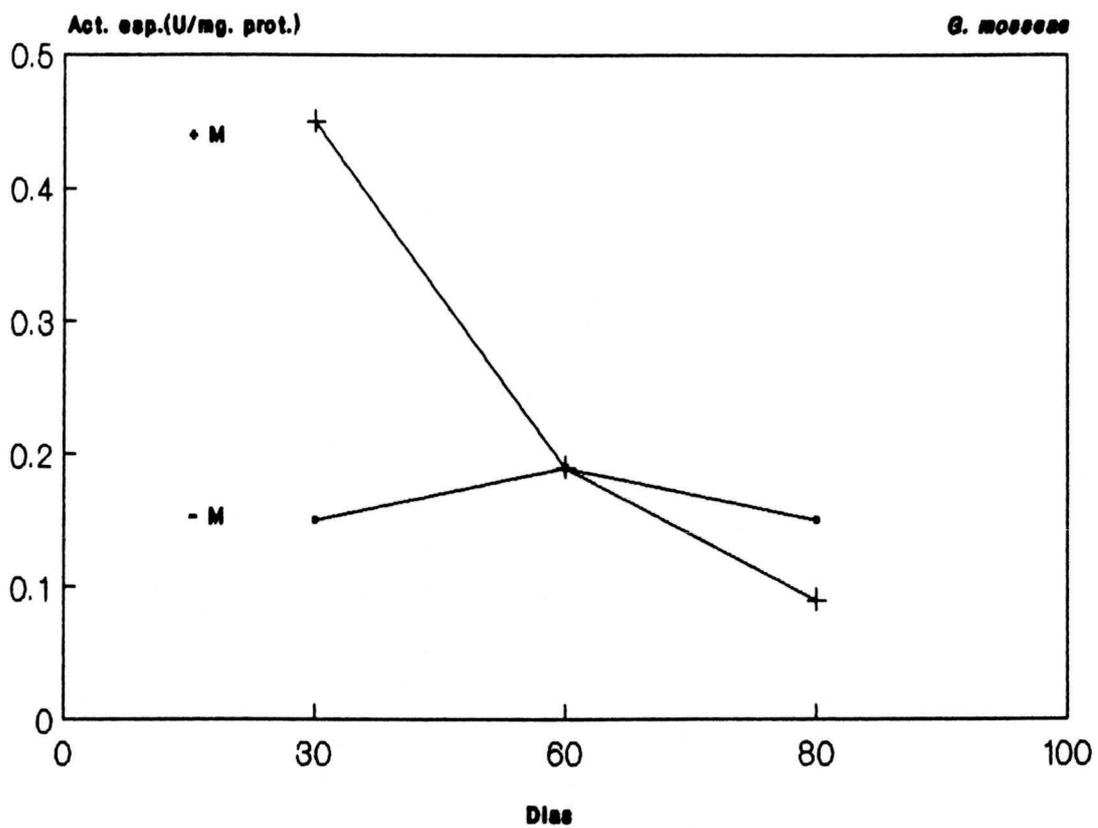


Figura 23

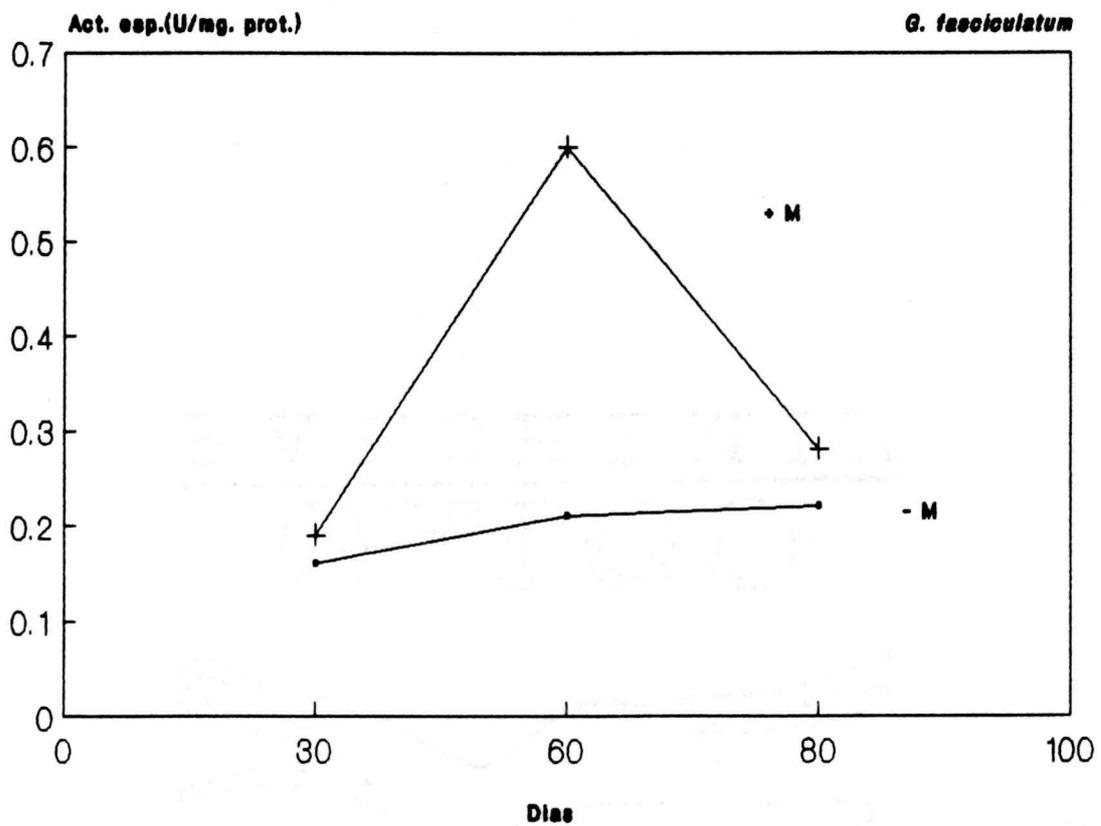


Tabla 30. Actividad pectato liasa (PAL) en extractos de raíces de plantas de maíz micorrizadas y no micorrizadas con *G. mosseae*.

Tratamientos	Actividad específica (U./mg. prot.) después de (días).		
	30	60	80
-M	0.58 a	0.47 a	0.40 a
+M	0.49 a	0.39 b	0.31 a

Cada valor es la media de 5 repeticiones. Los valores seguidos por la misma letra no son significativos de acuerdo al test de rango múltiple de Duncan (P=0.05).
-M= Plantas no micorrizadas +M= Plantas micorrizadas

Tabla 31. Actividad pectín liasa (PL) en extractos de raíces de plantas de maíz micorrizadas y no micorrizadas con *G. mosseae*.

Tratamientos	Actividad específica (U./mg. prot.) despues de (días).		
	30	60	80
-M	0.59 a	0.60 a	0.44 a
+M	1.32 b	0.57 a	0.39 b

Cada valor es la media de 5 repeticiones. Los valores seguidos por la misma letra no son significativos de acuerdo al test de rango múltiple de Duncan (P=0.05).
-M= Plantas no micorrizadas +M= Plantas micorrizadas

Figura 24. Evolución de la actividad pectato liasa en extractos de raíces de plantas de maíz micorrizadas y no micorrizadas con *G. mosseae*.

Figura 25. Evolución de la actividad pectín liasa en extractos de raíces de plantas de maíz micorrizadas y no micorrizadas con *G. mosseae*.

Figura 24

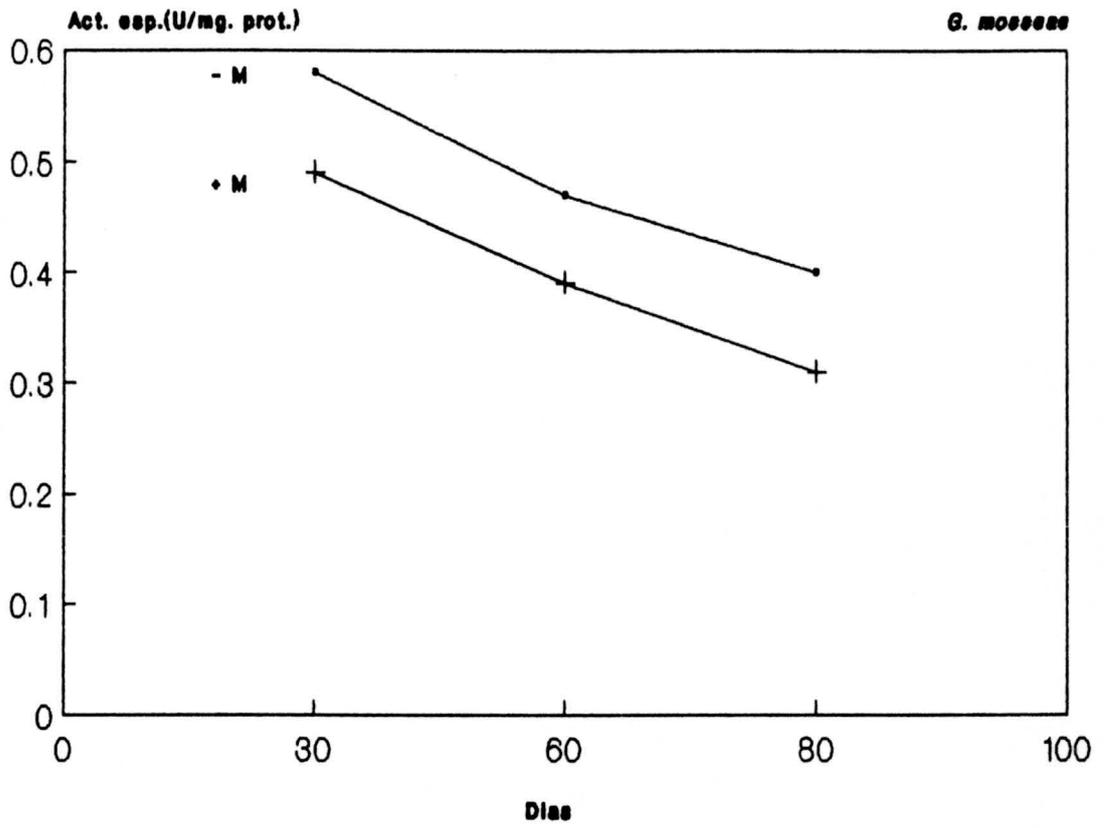


Figura 25

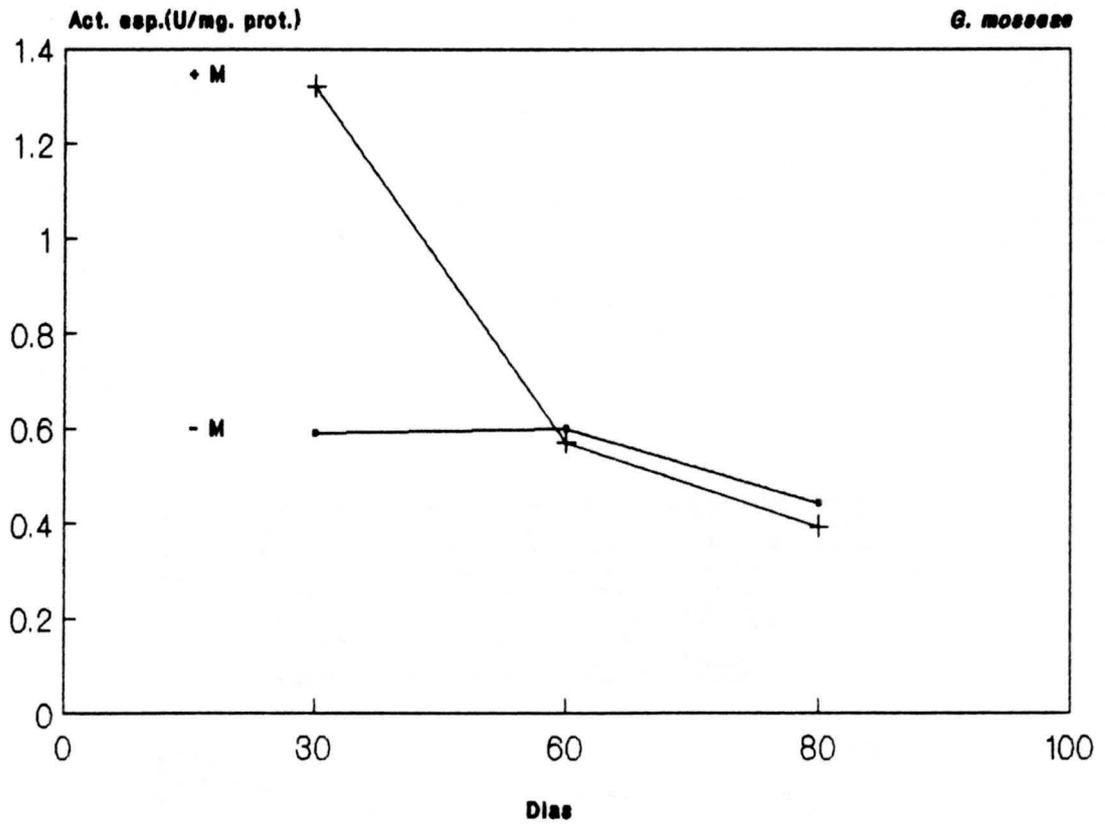


Tabla 32. Actividad pectato liasa (PAL) detectada por el método de cinética de reacción en extractos de raíces de plantas de lechuga y maíz micorrizadas y no micorrizadas con *G. mosseae*.

Plantas	Tratamientos	Act. esp.(U/mg. prot.) despues de (días).	
		30	60
Lechuga	-M	2.22 a	2.11 a
	+M	3.36 a	2.21 a
Maíz	-M	2.41 a	2.13 a
	+M	3.23 a	2.30 a

Cada valor es la media de 5 repeticiones. Los valores seguidos por la misma letra no son significativos de acuerdo al test de rango múltiple de Duncan (P=0.05).

-M= Plantas no micorrizadas +M= Plantas micorrizadas

Tabla 33. Actividad pectín liasa (PL) detectada por el método de cinética de reacción en extractos de raíces de plantas de lechuga y maíz micorrizadas y no micorrizadas con *G. mosseae*.

Plantas	Tratamientos	Act. esp.(U/mg. prot.) despues de (días).	
		30	60
Lechuga	-M	0.43 a	0.49 a
	+M	0.71 b	0.51 a
Maíz	-M	0.30 a	0.43 a
	+M	0.48 b	0.40 a

Cada valor es la media de 5 repeticiones. Los valores seguidos por la misma letra no son significativos de acuerdo al test de rango múltiple de Duncan (P=0.05).
 -M= Plantas no micorrizadas +M= Plantas micorrizadas

7. Estudio de las actividades enzimáticas en esporas y micelio.

Tanto los extractos obtenidos a partir de esporas como de micelio externo poseían todas las actividades enzimáticas ensayadas (Tabla 34).

Los niveles de actividad pectín esterasa, endo-polimetilgalacturonasa, polimetilgalacturonasa, pectato y pectín liasa son similares en esporas y micelio. Sin embargo, en los extractos de micelio se detectó mayor actividad poligalacturonasa que en los de esporas, mientras que la actividad endo-poligalacturonasa fué mayor en extractos de esporas que de micelio externo.

Tabla 34. Actividades pectolíticas en esporas y micelio externo de *G. mosseae*.

Enzimas pectolíticos	Actividades específicas (unidades/mg. proteína)	
	Esporas	Micelio
PE	29.2 a	31.8 a
Endo-PG	26.2 a	12.7 b
PG	1.9 a	18.4 b
Endo-PMG	25.4 a	28.2 a
PMG	3.8 a	3.1 a
PAL	160.2 a	27.7 a
PL	120.5 a	143.1 a

Cada valor es la media de 5 repeticiones. Para cada enzima pectolítico, los valores que muestran la misma letra no son diferentes significativamente de acuerdo al test de rango múltiple de Duncan (P=0.05).

8. Electroforesis en gel de poliacrilamida.

Las técnicas de determinación de las distintas actividades pectinásicas en geles de poliacrilamida todas no resultaron idóneas. En efecto, se presentaron dificultades derivadas principalmente de la naturaleza de las muestras a ensayar y de la poca resolución de estas técnicas. La técnica descrita por Cruickshank y Wade (1980) en la que se modificaron las condiciones de incubación y tinción, resultó ser la de más resolución para la detección de los enzimas pectolíticos.

Trás realizar numerosas electroforesis de extractos de raíces de plantas micorrizadas y no micorrizadas con *G. mosseae* y *G. fasciculatum*, hemos podido distinguir un esquema diferente de bandas de actividad pectinásica en raíces micorrizadas, respecto a los de controles no micorrizados (Figura 26). Las bandas que aparecen nos hace pensar que se deban a una actividad pectín esterasa, ya que se observan como zonas muy teñidas sobre el fondo de pectina inalterada (Cruickshank y Wade, 1980).

Figura 26. Electroforesis en gel de poliacrilamida donde las muestras utilizadas fueron extractos de raíces de plantas micorrizadas, con *G. mosseae* y *G. fasciculatum*, y extractos no micorrizados.

INSTITUTIONAL

RECORDS

1950-1951

V. DISCUSSION

V. DISCUSION.

Todavía no se conocen los mecanismos por los que los endofitos VA penetran y se desarrollan en el interior de la raíz. Una de las hipótesis que se ha establecido, en base a estudios de microscopia electrónica, es que los hongos VA producirían enzimas hidrolíticas capaces de romper o alterar la pared celular (Kinden y Brown, 1975; Bonfante-Fasolo, 1984; Jeanmougin *et al.*, 1988), facilitando así su penetración en la célula.

Los enzimas hidrolíticos del tipo de las pectinasas juegan un papel importante en la degradación de la pared celular y, por tanto, en los procesos de penetración de microorganismos fitopatógenos (Collmer y Keen, 1986) y simbióticos (Martinez-Molina *et al.*, 1979).

El hecho de que se produjera un retraso en el comienzo de la infección, así como una disminución en el plateau de las curvas de infección de plantas de alfalfa inoculadas con *Glomus mosseae*, y que ambos fueran paralelos a la concentración de pectato sódico y pectina que se añadieron al medio de cultivo, indicaba la posibilidad de que los enzimas pectolíticos podían estar implicados en los procesos de penetración de los hongos VA en el interior de la raíz. Caba la posibilidad, no obstante, de que este efecto se debiera a que las concentraciones de pectato sódico y de pectina utilizadas en nuestros ensayos produjeran una anaerobiosis o una difusión insuficiente de oxígeno que incidiera sobre el desarrollo de los hongos VA. Sin embargo, esta posibilidad puede descartarse ya que la aplicación de ambos sustratos enzimáticos no produjo efecto negativo alguno sobre el crecimiento de las

plantas. Además, en estudios llevados a cabo con otros sustratos enzimáticos de mayor viscosidad (Locus bean; García-Garrido, comunicación personal), no se observó efecto alguno sobre el desarrollo del nivel de micorrización, del mismo modo, en ensayos llevados a cabo en condiciones similares, se observó que la viscosidad producida por polisacáridos extracelulares de *Rhizobium meliloti* tampoco afectaban negativamente sobre el porcentaje de infección VA (Azcón-Aguilar y Barea, 1981).

La inhibición de la germinación de esporas en placas de agar con una concentración de 0.6 o 1% de pectina, podría explicar el retraso en el comienzo de la infección en estos tratamientos, pero no en aquellos en los que se utilizaron concentraciones menores de pectina ni en los que se utilizó pectato sódico.

Según nuestros resultados, parece necesario que haya un nivel determinado de producción de enzimas pectolíticos para que se produzca la infección inicial, así como para su desarrollo posterior. Se sabe que una vez iniciada la infección VA en la raíz es más fácil que se de una infección posterior en la misma (Mosse y Hepper, 1975), pero el nivel de enzimas pectolíticos producidos por esporas ó micelio proveniente de otra parte de la raíz infectada, parece que no fué suficiente en los tratamientos a los que se adicionó pectato sódico y pectina para alcanzar el mismo nivel de infección que en los tratamientos controles.

De acuerdo con nuestra hipótesis la adición de pectato sódico o pectina en el medio de cultivo de las plantas protegería la pared celular de la raíz de los enzimas pectolíticos producidos por los endofitos VA, retrasando la expresión de la actividad enzimática por

un período de tiempo relativo a la cantidad de sustrato que se adicionó. La presencia de sustrato en forma fácilmente accesible inhibe la actividad enzimática debido a la acumulación de productos que llevan consigo la represión catabólica de la síntesis de enzimas pectolíticos (Collmer y Keen, 1986).

Los resultados obtenidos nos dan una evidencia indirecta de la posible implicación de las pectinasas en el proceso de infección de las raíces por hongos formadores de micorrizas VA. La capacidad de producción de enzimas pectolíticos por esporas y micelio externo de *G. mosseae*, detectada mediante la formación de halos de solubilización en placas de agarosa con pectato sódico o pectina incorporados, apoyan esta idea. Utilizando las mismas técnicas se observó, que las raíces micorrizadas también producían halo de solubilización de pectina teñida con Rojo de rutenio. Las raíces no micorrizadas producen un halo mucho menor sobre todo a pHs inferiores a 7, ya que la mayoría de los enzimas pectolíticos presentan el óptimo de su actividad a pHs cercanos a 5 (Bateman, 1966).

Estas actividades no se pudieron detectar cuando la pectina se precipitó con Bromuro de hexadecil trimetil amonio, debido a la aparición de halos de hidrólisis tanto en los extractos ensayados como en los controles, causada posiblemente, por la reacción de alguna sal del tampón utilizado en la preparación de los extractos con el Bromuro de hexadecil trimetil amonio. Se sabe que los iones Na reaccionan con este compuesto produciendo la precipitación de la pectina (Martínez-Molina, comunicación personal).

Las técnicas de detección de actividad enzimática por la formación de halos de solubilización del

sustrato no permitió, sin embargo, observar diferencias en la actividad pectín esterasa ni en la actividad de los enzimas que actúan sobre pectato sódico, entre plantas micorrizadas y no micorrizadas, a pesar de que los elementos fúngicos si poseían ambas actividades. Este hecho podía explicarse, bien por una baja sensibilidad de estos métodos para una valoración cuantitativa de la actividad enzimática, o bien a que la producción de enzimas por parte del hongo en la raíz fuera demasiado pequeña como para detectarla por estos procedimientos.

Se ha demostrado que el tipo de solución extractante influye considerablemente en la cantidad de enzimas pectolíticos que se pueden extraer a partir de tejidos vegetales (Morales *et al.*, 1984). En efecto, al ensayar diversas soluciones extractantes se comprobó que se obtenía mayor actividad pectín esterasa en raíces extraídas con ClNa, mientras que utilizando tampón cítrico-fosfato (0.05M) pH=7 con un 33% de PVPP se obtuvieron mayores actividades poligalacturonasas y liasas.

Se sabe que los distintos cationes, otros que el Ca, poseen una gran influencia sobre algunos enzimas pectolíticos (Kertesz, 1951; Collmer y Keen, 1986), lo que explicaría la necesidad de ClNa en la actividad pectín esterasa. Según Hancock *et al.*, (1964), en ausencia de sales se produce una activación de la pectín esterasa de hongos mientras que la de plantas sufre una inhibición. En nuestros estudios hemos podido comprobar que en presencia de iones Ca se incrementa la actividad tanto de la pectín esterasa de hongos como la de plantas, esta actividad potencia la demetilación de la pectina y con ello se prepara el material péctico de la lámina media y la pared celular primaria para la

degradación por poligalacturonasa (Hancock *et al.*, 1964).

Por otro lado, algunos enzimas pectolíticos se pueden inactivar durante la extracción a partir de tejidos vegetales como consecuencia de la oxidación de fenoles (Dazzo y Hubbel, 1974).

Aunque se encontró que la mejor solución extractante fué el tampón cítrico-fosfato con PVPP, los niveles de actividad enzimática producidos por el hongo pueden ser demasiado bajos para su detección, al igual que ocurre en otros microorganismos mutualistas (Angle, 1986). Los métodos de concentración de proteínas pectinásicas pueden influir considerablemente en el nivel de actividad detectable a partir de los extractos. En efecto, se obtuvo mayor actividad cuando las proteínas se concentraron con los métodos utilizados, salvo en el caso de la concentración con rotavapor, sin embargo, una mayor diferencia de actividad entre extractos micorrizados y no micorrizados solo se obtuvo en el caso de la pectín esterasa cuando se concentró mediante liofilización.

Las raíces micorrizadas poseen más actividad pectín esterasa que las no micorrizadas, teniendo un pH óptimo proximo a pH=7. Se sabia que el pH óptimo de actuación de la pectín esterasa de plantas superiores era diferente del óptimo de organismos microbianos, que era cercano a la zona ácida. El pH óptimo para la actuación de la pectín esterasa de plantas superiores es 7, pero se ha encontrado algunas pectín estererasas de microorganismos con un pH óptimo en la región alcalina (Rexova-Benkova y Markovic, 1976).

La actividad pectín esterasa fué siempre superior

en plantas micorrizadas, tanto con *G. mosseae* como con *G. fasciculatum* a lo largo del proceso de infección VA, aunque la mayor diferencia se puede apreciar en la etapa logarítmica de crecimiento de los hongos VA. En la etapa logarítmica de crecimiento es cuando se produce una mayor cantidad de puntos de entrada y arbusculos (Hayman, 1983), por tanto es lógico pensar que en esta etapa es cuando el hongo produciría mayor cantidad de enzimas para poder penetrar a través y a lo largo de las paredes celulares. En esta etapa de la infección, se ha puesto de manifiesto que es además cuando el hongo produce mayor cantidad de otros enzimas tales como succinato deshidrogenasa (Kough *et al.*, 1987) y quitinasa (Wyss y Wiemken, 1988).

La actividad pectín esterasa de extractos de raíces no inoculadas se mantiene en unos niveles similares a lo largo del experimento, al igual que ocurre con el resto de actividades que utilizan la pectina como sustrato. Esto puede deberse a las continuas divisiones celulares que se dan en la raíz en todo el proceso de crecimiento (Albersheim, 1976).

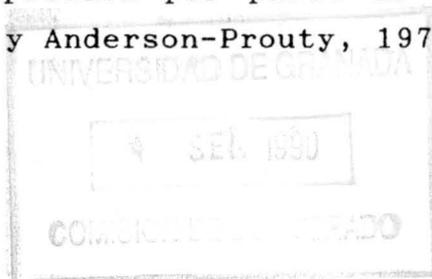
Segun los resultados obtenidos se puede afirmar que tanto *G. mosseae* como *G. fasciculatum* poseen actividad endo-polimetilgalacturonasa, polimetilgalacturonasa y pectín liasa, si bien estas actividades son detectables cuando la infección de las plantas se encuentra en la etapa de crecimiento logarítmico del hongo. Sin embargo, no se detectó incremento en las actividades endo-poligalacturonasa, poligalacturonasa y pectato liasa en ningún momento del ensayo.

Los enzimas pectolíticos intervienen en la rotura de la lámina media, lo cual está considerado como un

proceso patológico importante en muchas enfermedades de las plantas, ya que la función estructural de la lámina media es mantener las células juntas y su destrucción tiene como resultado una pérdida en la coherencia de los tejidos afectados (Basham y Bateman, 1975). Sin embargo, se conoce muy poco acerca de los mecanismos de producción y regulación de los distintos enzimas pectolíticos, y mucho menos el papel de cada uno de ellos en los procesos de infección de las plantas. Se sabe que para producir la rotura de la pared, es necesario que el fitopatógeno produzca todo el complejo de enzimas pectolíticos, incluyendo pectín esterasa, poligalacturonasa y liasa. Sin embargo, hay autores que encuentran que las poligalacturonasas y liasas (Hancock y Millar, 1965; Frieman, 1962; Basham y Bateman, 1975; Collmer y Keen, 1986) son los principales enzimas implicados en la rotura de la pared y penetración del patógeno. Las pectín esterasas y exopoligalacturonasas aparentemente contribuyen menos en este proceso (Bush y Codner, 1968).

El mecanismo de acción de los enzimas pectolíticos producidos por microorganismos mutualistas se conoce todavía menos. Solo hay indicaciones que apuntan que *Rhizobium* no posee todo el sistema de enzimas pectolíticos característico de los microorganismos patógenos (Morales et al., 1984).

G. mosseae es capaz de producir estos tres tipos de enzimas, sin embargo se observa que se da mayor producción de endo-poligalacturonasa y menor actividad poligalacturonasa en esporas que en micelio externo. Estos resultados nos indican que la producción de enzimas pectolíticos por hongos puede estar sujeta a mecanismos de activación y represión por parte de las raíces de plantas (Albersheim y Anderson-Prouty, 1975).



Sin embargo, el hecho de que los hongos VA posean la capacidad de producir pectín esterasa, poligalacturonasa y liasa no quiere decir que produzcan todos estos enzimas en la planta (Rexova-Benkova y Markovic, 1976; Albersheim, 1976), en efecto en las plantas micorrizadas hay mayor producción de pectín esterasa, endo-polimetilgalacturonasa, polimetilgalacturonasa y pectín liasa que en plantas no micorrizadas, pero las actividades endo-poligalacturonasa, poligalacturonasa y pectato liasa permanecen igual en plantas micorrizadas y no micorrizadas. No existe en la bibliografía disponible información acerca de la posible diferencia de actuación de los enzimas pectinolíticos (actúan frente a pectina) y pectolíticos (actúan frente a pectato sódico), así como del papel que juegan estos dos enzimas en los procesos de infección de las plantas (Rexova-Benkova y Markovic, 1976; Collmer y Keen, 1986); ya que se engloban dentro de la denominación poligalacturonasas y liasas tanto enzimas que actúan frente a pectato sódico como a pectina, aunque más recientemente dentro de las liasas se están estableciendo diferencias entre pectato y pectín liasa.

Es difícil establecer el modelo de actuación de los diferentes enzimas pectolíticos producidos por *G. mosseae* y *G. fasciculatum* en el proceso de infección. Pectín esterasa, endo-polimetilgalacturonasa, polimetilgalacturonasa y pectín liasa parecen los principales enzimas pectolíticos implicados en el proceso de colonización de plantas de lechuga por *G. mosseae* y *G. fasciculatum*. Parece que el grupo de enzimas determinantes en los procesos de infección VA es un sistema de enzimas degradativos de la pectina más que del pectato sódico.

La actividad pectín esterasa a pH=5 fué, al igual que a pH=7, siempre superior en plantas micorrizadas. Se considera que la pectín esterasa es fundamental para que se produzca la penetración de los microorganismos patógenos a través de las paredes celulares de las plantas, ya que, intervendría en la disminución de la esterificación de la pectina y en su conversión en pectato sobre el que podrían actuar los otros enzimas pectolíticos (Pressey y Avant, 1982), e incluso se considera que es un factor determinante de la velocidad de acción de los otros enzimas pectolíticos (Ishii, 1976).

Ya que los hongos producen pectín esterasa, endo-polimetilgalacturonasa, polimetilgalacturonasa y pectín liasa, y que su producción es mayor en plantas micorrizadas que en plantas no micorrizadas, es posible que el hospedador o el endofito, o ambos, contribuyan a la activación de estos enzimas en tejidos infectados. En efecto, el hongo podría inducir la producción de enzimas por parte de la planta mediante su capacidad para producir fitohormonas (Allen *et al.*, 1980; Harley y Smith, 1983). Las fitohormonas (auxinas, giberelinas y citoquininas) son capaces de estimular el alargamiento de las células (Wareing y Phillips, 1970; Labavich, 1981). La forma mediante la cual esos reguladores de crecimiento funcionan no se comprende bien, aunque se sabe que las auxinas activan una bomba de protones unida a membrana que reduce el pH de la pared celular desde la neutralidad hasta pH ácido (McNeil *et al.*, 1984). Una explicación posible del efecto de la activación de la bomba de protones por la auxina es que los enzimas hidrolíticos localizados en la pared celular responsables del alargamiento de la pared tienen un pH próximo a 5 (McNeil *et al.*, 1984).

Se ha observado un incremento de la ATPasa del plasmalema en la matriz entre la célula de la planta y la hifa del hongo (Marx *et al.*, 1982). La auxina y otras hormonas producidas por hongos micorrízicos (Harley y Smith, 1983) afectan la ATPasa del plasmalema y el flujo de protones. El resultado de la acción del flujo de protones a través de las membranas plasmáticas del hongo y hospedador, tiene como resultado final una acidificación de la matriz interfacial la cual puede ser importante, no solo respecto al control del transporte de nutrientes a través de la membrana, sino también en la regulación de los enzimas hidrolíticos producidos o inducidos por el hongo (Smith y Smith, 1990). La alteración del pH causada por esta interacción puede, por tanto, provocar cambios en la zona de contacto entre la hifa y las células de la planta (matriz interfacial) debido a la acción de los enzimas hidrolíticos. La composición y origen de la matriz interfacial se ha discutido ampliamente (Harley y Smith, 1983; Scannerini y Bonfante-Fasolo, 1979). Mediante pruebas citoquímicas y de microscopia electrónica se ha comprobado que uno de los componentes de la matriz interfacial es una envoltura, similar a la pared celular, que se forma alrededor del hongo en desarrollo, el cual se manifiesta claramente en el punto de penetración fúngica (Bonfante-Fasolo *et al.*, 1990). Para la formación de esta matriz se requeriría la producción por parte del hongo de enzimas hidrolíticos, que permitieran la penetración de la pared celular sin afectar la viabilidad del hospedador.

En efecto, mediante observaciones al microscopio electrónico se ha puesto de manifiesto que la penetración parece llevar consigo alguna degradación del material del hospedador. El hecho de que aparezcan zonas translúcidas a los electrones en las paredes

celulares del hospedador que están en contacto con la hifa fúngica, así como restos de lámina media en zonas donde se desarrollan las hifas intracelulares, sugieren la existencia de una destrucción enzimática de la pared celular. Se produciría una rotura mínima de la pared celular durante la penetración y colonización al igual que sucede en infecciones causadas por hongos biotrofos (Cooper, 1984), sin afectar las estructuras citoplasmáticas (Burns y Pressey, 1988; Basham y Bateman, 1975).

Según los resultados obtenidos, las plantas de lechuga reprimen la actividad pectolítica producida por *G.mosseae* y la actividad pectinolítica aunque menos drásticamente. Estos resultados indican un control por parte de la planta de estos enzimas, con lo que restaría su acción patogénica. Tal vez, mediante esta represión la planta podría regular las pectinasas producidas por el hongo de forma que no rompan la pared de un modo indiscriminado. En efecto, se sabe que las pectinasas pueden solamente producir un incremento en la porosidad de la pared, la hifa penetraría a través de estos poros sin afectar las condiciones fisiológicas de la pared. Se ha observado que la hifa de penetración se reduce considerablemente de tamaño al penetrar la pared de las células, después recupera el diámetro que tenía antes del adelgazamiento (Bonfante-Fasolo, 1984), y la pared que rodea a la hifa puede conservar sus características vitales (Harley y Smith, 1983).

Pero por otra parte hay un incremento de actividad pectín esterasa, cuyo pH óptimo de actuación es 7 (lo que indica una inducción del enzima posiblemente de origen vegetal) en plantas micorrizadas respecto a plantas no micorrizadas. Este enzima podría también

estar implicado en los mecanismos de defensa de la planta frente al ataque de los enzimas pectolíticos producidos por el hongo, ya que, la formación de pectina insoluble se debe a una de-esterificación de la pectina por la pectín esterasa de la planta a pH 7. La pectina de-esterificada puede unirse con iones Ca en la parte insoluble de la pared celular (Pressey, 1984) formando pectato cálcico, que es resistente a la acción de los enzimas pécticos (Rexova-Benkova y Markovic, 1976), cuya actividad es similar en plantas micorrizadas y no micorrizadas.

En el proceso de disminución de las actividades pectinolíticas y de la ausencia de enzimas pectolíticos también pueden intervenir, sin embargo, otros mecanismos tales como la formación de compuestos fenólicos y ácidos ferúlicos. Se ha sugerido la inactivación de pectinasas de hongos por oxidación de compuestos fenólicos formados en la infección como un mecanismo de defensa natural (Fielding, 1981; Patil y Dimond, 1967). Se sabe que los compuestos fenólicos pueden afectar negativamente el desarrollo de los hongos VA en la raíz de la planta (Allen *et al.*, 1980; Bonfante-Fasolo y Gianinazzi-Pearson, 1986). Por otro lado, los ácidos ferúlicos pueden afectar la colonización micorrízica, bien restringiendo el contacto hongo-planta, o limitando la formación de un apresorio (Wacker *et al.*, 1990). Los ácidos ferúlicos pueden restringir la acción de los enzimas pectolíticos mediante la formación de enlaces de la pectina con las proteínas de la pared (Fry, 1986).

Otro posible mecanismo de defensa frente al ataque de microorganismos es la existencia en la planta de proteínas inhibidoras de los enzimas pectolíticos producidos por los hongos (Albersheim, 1976), inducidas

solamente en la proximidad de la pared celular del pelo radical (Morales *et al.*, 1984). Estas proteínas son efectivas principalmente frente a las poligalacturonasas actuando en menor escala frente a las exopoligalacturonasas (Collmer y Keen, 1986).

La mayor actividad enzimática encontrada en plantas no micorrizadas respecto a las micorrizadas en los últimos períodos de infección se puede atribuir a los mecanismos de defensa de la planta, proteínas inhibidoras, fenoles y ácidos ferúlicos, que actúan a lo largo de la infección aunque el mayor efecto lo producen al final de esta.

Se sabe que los enzimas pectolíticos o los productos de su acción pueden inducir fitoalexinas en la planta, sobre todo gliceolina, las cuales pueden controlar el desarrollo del microorganismo patógeno (Darvill y Albersheim, 1984). Se sabe que las micorrizas VA producen este tipo de fitoalexina, si bien su producción es baja comparada con la producida por microorganismos patógenos (Morandi *et al.*, 1984). El comportamiento evolutivo de la producción de los enzimas pectinolíticos en raíces micorrizadas, tanto por *G. mosseae* como por *G. fasciculatum*, no descarta la posibilidad de una inducción tardía (después del crecimiento logarítmico del hongo) de fitoalexinas que controle el desarrollo fúngico en el interior de la raíz al igual que sucede con otros microorganismos biotróficos (Bayley y Mansfield, 1982).

Los hongos VA, tanto *G. mosseae* como *G. fasciculatum*, producen un incremento de la actividad pectinolítica en las plantas. Este incremento no solo es cuantitativo sino que, como se observa mediante técnicas electroforéticas, es cualitativo ya que

aparecen distintas bandas electroforéticas en extractos enzimáticos procedentes de raíces de plantas micorrizadas, que en los procedentes de plantas no micorrizadas. Las bandas observadas, aparentemente pueden corresponder a actividad pectín esterasa (Cruickshand y Wade, 1980), mostrando similitud las producidas por *G. mosseae* y *G. fasciculatum*. Sin embargo, el hecho de que se produzca un incremento anterior en la evolución de la infección de actividad pectín liasa en raíces colonizadas por *G. mosseae* que por *G. fasciculatum* apunta, al igual que ocurre con especies de otros microorganismos (Collmer y Keen, 1986), la posibilidad de que haya diferentes enzimas dentro del complejo enzimático de ambos hongos VA.

VI. CONCLUSIONES

VI. CONCLUSIONES.

1. El hongo formador de micorrizas vesículo-arbusculares, *Glomus mosseae*, posee la capacidad de producir pectín esterasa, endo-polimetilgalacturonasa, polimetilgalacturonasa y pectín liasa (enzimas pectinolíticos); así como, endo-poligalacturonasa, poligalacturonasa y pectato liasa (enzimas pectolíticos).

2. El incremento de la concentración de sustratos enzimáticos, pectato sódico y pectina, en el medio de cultivo de plantas de alfalfa produce de forma paralela, un retraso y disminución en la micorrización producida por *G. mosseae*.

3. Las raíces micorrizadas con *G. mosseae* y *G. fasciculatum* poseen mayores actividades pectinolíticas y similares actividades pectolíticas, que las no micorrizadas.

4. El incremento de las actividades pectinolíticas en raíces de plantas de lechuga micorrizadas con *G. mosseae* y *G. fasciculatum* coinciden con la etapa logarítmica de crecimiento de los hongos vesículo-arbusculares.

5. El incremento de las actividades enzimáticas observado en las plantas micorrizadas no es solo cuantitativo sino también cualitativo.

VII. BIBLIOGRAFIA

VI. BIBLIOGRAFIA.

- ABBOTT, L. M. 1982. Comparative anatomy of vesicular-arbuscular mycorrhizas formed on subterranean clover. *Aust. J. Bot.* 30: 485.
- ALBERGHINA, F. A. M. 1964. On enzyme inhibition by oxidized chlorogenic acid. *Life Sci.* 3: 49-54.
- ALBERSHEIM, P. 1976. The primary cell wall. En "Plant Biochemistry" (Eds. J. Bonner y J. E. Varner) pp. 225-274. Academic Press, New York.
- ALBERSHEIM, P. y ANDERSON-PROUTY, A. J. 1975. Carbohydrates proteins, cell surface, and the biochemistry of pathogenesis. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 26: 31-52.
- ALBERSHEIM, P. y KILLIAS, V. 1962. Studies relating to the purification and properties of pectin transeliminase. *Arch. Biochem. Biophys.* 97: 107-115.
- ALBERSHEIM, P., JONES, T. M. y ENGLISH, P. D. 1969. Biochemistry of the cell wall in relation to infective processes. *Ann. Rev. Phytopathol.* 7: 171-194.
- ALBERSHEIM, P., NEUKOM, H. y DEUEL, H. 1960. Uber die Bildung von ungesattigten Abbauprodukten durch ein pektinabbavendes. *Enzym. Helv. Chim. Acta* 43: 1422-1426.
- ALLEN, M. F., MOORE, T. S. y CHRISTENSEN, M. 1980. Phytohormone changes in *Boutelona gracilis* infected by vesicular-arbuscular mycorrhizae. I. Cytokinin increases in the host plant. *Can. J. Bot.* 58: 371-374.

-ANDERSON, A. J. 1978. Extracellular enzymes produced by *Colletotrichum lindemuthianum* and *Helminthosporium maydis* during growth on isolated bean and corn cell walls. *Phytopathology* 68: 1585-1589.

-ANDERSON, A. J. 1988. Mycorrhizae-host specificity and recognition. *Am. Phytopathol. Soc.* 78: 375-378.

-ANGLE, J. S. 1986. Pectin and proteolytic enzymes produced by fast- and slow-growing soybean rhizobia. *Soil Biol. Biochem.* 18: 115-116.

-AYRES, A., DINGLE, J., PHIPPS, A., REID, W. W. y SOLOMONS, G. L. 1952. Enzymic degradation of pectic acid and the complex nature of polygalacturonase. *Nature* 170: 834-836.

-AZCON-AGUILAR, C. y BAREA, J. M. 1981. Implications of some extracellular product from soil microorganisms of plant infection by VA-mycorrhizal fungi. *FAO/IAEA Consultant Meeting on the Use of Isotopes in Studies of Nutrient Availability to Food Crops by Endomycorrhizas.* pp. 109-126. Vienna, Austria.

-AZCON, R. y OCAMPO, J. A. 1981. Factors affecting the vesicular-arbuscular infection and mycorrhizal dependency of thirteen wheat cultivars. *New Phytol.* 87: 677-685.

-BAILEY, J. A. y MANSFIELD, J. W. 1982. *Phytoalexins.* Halsled, Wiley. New York.

-BASHAM, H. G. y BATEMAN, D. F. 1975. Killing of plant cells by pectin enzymes: the lack of direct injurious interaction between pectin enzymes or their soluble reaction products and plant cells. *Phytopathology* 65:

141-153.

-BATEMAN, D. F. 1966. Hidrolytic and trans-eliminative degradation of pectin substances by extracellular enzymes of *Fusarium solani* f. *phaseoli*. *Phytopathology* 56: 238-244.

-BATES, G. W. y RAY, P. M. 1981. pH dependent interactions between pea cell wall polymers possibly involved in wall deposition and growth. *Plant Physiol.* 68: 158-164.

-BECKER, W. N. y GERDEMANN, J. W. 1977. Colorimetric quantification of vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in onion. *New Phytol.* 78: 289-295.

-BIERMANN, B. y LINDERMAN, R. G. 1983. Use of vesicular-arbuscular mycorrhizal roots, intraradical vesicles and extraradical vesicles as inoculum. *New Phytol.* 95: 97-105.

-BOLGIANO, N. C., SAFIR, G. R. y WARNCKE, D. D. 1983. Mycorrhizal infection and growth of onion in the field in relation to phosphorus and water availability. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 108: 819-825.

-BOLTON, G. W., NESTER, F. W. y GORDON, M. P. 1986. Plant phenolic compounds induce expression of the *Agrobacterium tumefaciens* loci needed for virulence. *Science* 232: 983-985.

-BONFANTE-FASOLO, P. 1978. Some ultrastructural features of the vesicular-arbuscular mycorrhiza in the grapevine. *Vitis* 17: 386.

-BONFANTE-FASOLO, P. 1982. Interaction entre plante-hôte et champignon mycorrhizogène. Rôle des polysaccharides et des protéines des parois cellulaires. En "Les Mycorrhizes, partie intégrante de la plante: Biologie et perspectives d'utilisation". Colloque de l'Institut National de la Recherche Agronomique (Eds. V. Gianinazzi-Pearson y A. Trouvelot) pp. 41. Paris.

-BONFANTE-FASOLO, P. 1984. Anatomy and morphology of VA mycorrhizae. En "VA Mycorrhiza" (Eds. C. LL. Powell y D. J. Bagyaraj) pp. 5-33. CRC Press, Boca Raton, Florida.

-BONFANTE-FASOLO, P. y GIANINAZZI-PEARSON, V. 1986. Wall and plasmalemma modifications in mycorrhizal symbiosis. En "Physiological and Genetical aspects of Mycorrhizae" (Eds. V. Gianinazzi-Pearson y S. Gianinazzi) pp. 67-73. INRA Press, Paris.

-BONFANTE-FASOLO, P. y GRIPPIOLO, R. 1982. Ultrastructural and cytochemical changes in the wall of a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus during symbiosis. Can. J. Bot. 60: 2303.

-BONFANTE-FASOLO, P. y SCANNERINI, S. A. 1977. A cytological study of the vesicular-arbuscular mycorrhiza in *Ornithogalum umbellatum* L. Allionia 22: 5.

-BONFANTE-FASOLO, P., VIAN, B., PEROTTO, S., FACCIO, A. y KNOX, J. P. 1990. Cellulose and pectin localization in roots of mycorrhizal *Allium porum*: labelling continuity between host cell wall and interfacial materia. Planta 180: 537-547.

-BURNS, J. K. y PRESSEY, R. 1988. Enhancement of the release of protoplasts and pectin from tomato locular gel by pectin methylesterasa. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 113(4): 624-626.

-BUSH, D. A. y CODNER, R. C. 1968. The nature of macerating factor of *Penicillium digitatum* Saccardo. Phytochemistry 7: 863-869.

-BYRDE, R. J. W. 1963. Natural inhibitors of fungal enzymes and toxins in disease resistance. En "Perspectives of Biochemical Plant Pathology" (Ed. S. Rich) pp. 31-47. Connecticut Agr. Exp. Sta. Bull. 663.

-CARLING, D. E., BROWN, M. F. y BROWN, R. A. 1979. Colonization rates and growth responses of soybean plants infected by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. Can. J. Bot. 57: 1769-1771.

-CLARK, F. B. 1964. Microorganisms and soil structure affect yellow-poplar growth. U. S. Forest serv. Res. Paper Columbus.

-CLELAND, R. E. 1971. Cell wall extension. Ann. Rev. Plant Physiol. 22: 197-222.

-CLELAND, R. E. 1975. Auxin induced hydrogen ion excretion: Correlation with growth and control by external pH and water stress. Planta 127: 233-242.

-CLELAND, R. E. y RAYLE, D. L. 1977. Reevaluation of the effect of calcium ions on auxin induced elongation. Plant Physiol. 60: 709-712.

-COLLMER, A. y KEEN, N. T. 1986. The role of pectin enzymes in plant pathogenesis. Ann. Rev. Phytopathol.

24: 383-409.

-COLLMER, A., BERMAN, P. y MOUNT, M. S. 1982. Pectate lyase regulation and bacterial soft-rot pathogenesis. En "Phytopathogenic Prokaryotes" (Eds. M. S. Mount y G. H. Lacy) 1: 395-422. Academic Press, New York.

-COOPER, R. M. 1984. The role of cell wall-degrading enzymes in infection and damage. En "Plant diseases: Infection, Damage and Loss" (Eds. R. K. S. Wood y G. J. Jellis) pp. 13-27. Blackwell Scientific Publications. Oxford.

-COOPER, R. M., WARDMAN, P. A. y SKELTON, J. E. M. 1981. The influence of cell walls from host and non-host plants on the production and activity of polygalacturonide-degrading enzymes from fungal pathogens. *Physiol. Plant Pathol.* 18: 239-255.

-CORDEN, M. E. 1965. Influence of calcium nutrition on *fusarium wilt* of tomato and polygalacturonase activity. *Phytopathology* 55: 222-224.

-COX, G. y TINKER, P. B. 1976. Translocation and transfer of nutrients in vesicular-arbuscular mycorrhizas. I. The arbuscule and phosphorus transfer: a quantitative ultrastructural study. *New Phytol.* 77: 371-378.

-COX, G., SANDERS, F. E., TINKER, P. B. y WILD, J. A. 1975. Ultrastructural evidence relating to host-endophyte transfer in a vesicular-arbuscular mycorrhiza. En "Endomycorrhizas" (Eds. F. E. Sanders, B. Mosse y P. B. Tinker) pp. 297-312. Academic Press, London.

-CRUICKSHANK, R. H. y WADE, G. C. 1980. Detection of pectin enzymes in pectin-acrilamide gels. Anal. Biochem. 107: 177-181.

-DAFT, M. J. y NICOLSON, T. H. 1969. Effect of *Endogone* mycorrhiza on plant growth. III. Influence of inoculum concentration on growth and infection in tomato. New Phytol. 68: 953-961.

-DANIELS, B. A., MCCOOL, P. M. y MENGE J. A. 1981. Comparative inoculum potential of spores of six vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. New Phytol. 89: 385-391.

-DARVILL, A. G. y ALBERSHEIM, P. 1984. Phytoalexins and their elicitors-a defense against microbial infection in plants. Ann. Rev. Plant Physiol. 35: 243-275.

-DARVILL, A. G., MCNEIL, M., ALBERSHEIM, P. y DELMER, D.P. 1980. The primary cell walls of flowering plants. En "The Biochemistry of Plants. A Comprehensive Treatise" (Ed. N. E. Tolbert) 1: 92-162. Academic Press, New York.

-DARVILL, A. G., SMITH, C. J. y HALL, M. A. 1977. Auxin-induced proton release, cell wall structure and elongation growth: A Hypothesis. En "Regulation of Cell Membrane Activities in Plants" (Eds. E. Marre y O. Ciferri) pp. 275-282. Elsevier North/Hollans, Amsterdam.

-DAVIS, K. R., DARVILL, A. G. y ALBERSHEIM, P. 1986. Host-pathogen interactions. XXXI. Several biotic and abiotic elicitors act synergistically in the induction of phytoalexin accumulation in soybean. Plant Mol. Biol. 6: 23-32.

-DAZZO, F. y HUBBELL, D. 1974. A quantitative assay of insoluble polyvinylpyrrolidone. *Plant and Soil* 40: 435-439.

-DEMAIN, A. L. y PHAFF, H. J. 1957. Recent advances in the enzymatic hydrolysis of pectin substances. *Wallerstein Laboratories Communications*. 20: 119-139.

-DEVERALL, B. J. y WOOD, R. K. S. 1961. Chocolate spot of beans (*Vicia faba* L.) interactions between phenolase of host and pectic enzymes of pathogen. *Ann. Appl. Biol.* 49: 437-487.

-DEXHEIMER, J., GIANINAZZI-PEARSON, V. y GIANINAZZI, S. 1982. Acquisitions récentes sur la physiologie des mycorhizes VA au niveau cellulaire. *Coll. de l'INRA* 13: 61-73.

-DEXHEIMER, J., MARX, C., GIANINAZZI-PEARSON, V. y GIANINAZZI, S. 1985. Ultracytological studies on plasmalemma formations produced by host and fungus in vesicular-arbuscular mycorrhizae. *Cytologia* 50: 461-471.

-DONCASTER, C. C. 1962. A counting dish for nematodes. *Nematologia*. 7: 334-337.

-EDSTROM, R. D. y PHAFF, H. J. 1964. Elimination cleavage of pectin and of oligogalacturonide methyl esters of pectin trans-eliminase. *J. Biol. Chem.* 25: 2409-2415.

-ENGLISH, P. D., MAGLOTHIN, A., KEEGSTRA, K. y ALBERSHEIM, P. 1972. A cell wall-degrading endopolygalacturonase secreted by *Colletotrichum lindemuthianum*. *Plant Physiol.* 49: 293-297.

-FIELDING, A. M. 1981. Natural inhibitors of fungal polygalacturonases in infected fruit tissues. *J. Gen. Microbiol.* 123: 377-381.

-FISHER, M. L., ANDERSON, A. J. y ALBERSHEIM, P. 1973. Host-pathogen interactions. VI. A single plant protein efficiently inhibits endopolygalacturonases secreted by *Colletotrichum lindemuthianum* and *Aspergillus niger*. *Plant Physiol.* 51: 489-491.

-FLODIN, P., GELLOTTE, B. y PORATH, J. 1960. A method for concentrating solutes of high molecular weight. *Nature* 111: 493-494.

-FRIEDMAN, B. A. 1962. Physiological differences between a virulent and a weakly virulent radiation-induced strain of *Erwinia caratovora*. *Phytopathology* 52: 328-332.

-FRY, S. C. 1982. Isodityrosine: a new cross-linking amino acid from plant cell-wall glycoprotein. *Biochem. J.* 204: 449-455.

-FRY, S. C. 1983. Feruloylated pectins from the primary cell wall: their structure and possible functions. *Planta* 157: 111-123.

-FRY, S. C. 1986. Cross-linking of matrix polymers in the growing cell walls of angiosperms. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 37: 165-186.

-GARIBALDI, A. y BATEMAN, D. F. 1971. Pectic enzymes produced by *Erwinia chrysanthemi* and their effects on plant tissue. *Physiol. Plant Pathol.* 1: 25-40.

-GEMMA, J. N. y KOSKE, R. E. 1988. Pre-infection interactions between roots and the mycorrhizal fungus *Gigaspora gigantea*: Chemotropism of germ-tubes and root growth response. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 91: 123-132.

-GERDEMANN, J. W. 1975. Vesicular-arbuscular mycorrhizae. En "The Development and Function of roots" (Eds. J. G. Torrey y D. T. Clarkson) pp. 491-575. Academic Press, London, New York.

-GERDEMANN, J. W. y NICOLSON, T. H. 1963. Spores of mycorrhizal *Endogone* species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 46: 235-244.

-GERDEMANN, J. W. y TRAPPE, J. M. 1974. The Endogonaceae in the Pacific Northwest. *Mycologia Memoir* 5: 76.

-GIANINAZZI-PEARSON, V. 1984. Host-fungus specificity, recognition and compatibility in mycorrhizae. En "Genes Involved in Microbe-Plant Interactions" (Eds. D. P. S. Verma y Th. Hohn) pp. 225-253. Springer-Verlag, New York.

-GIANINAZZI-PEARSON, V. y GIANINAZZI, S. 1988. Morphological integration and functional compatibility between symbionts in vesicular arbuscular endomycorrhizal associations. En "Cell to Cell Signals in Plant, Animal and Microbial Symbiosis" (Eds. S. Scannerini *et al*) pp. 73-84. Springer-Verlag, Heidelberg, Berlin.

-GIANINAZZI-PEARSON, V., MORANDI, D., DEXHEIMER, J. y GIANINAZZI, S. 1981. Ultrastructural and ultracytochemical features of a *Glomus tenuis*

mycorrhiza. *New Phytol.* 88: 633-639.

-GIANINAZZI-PEARSON, V., TROUVELOT, A., MORANDI, D. y MAROCKE, R. 1980. Ecological variations in endomycorrhizas associated with wild raspberry populations in the Vosges region. *Acta Oecologia Oecol. Plant 1*: 111-119.

-GIOVANNETTI, M. y MOSSE, B. 1980. An evaluation of techniques for measuring vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytol.* 84: 489-500.

-GLENN, M. G., GLENN, F. S. y WILLIAMS, P. H. 1988. Influence of glucosinolate content of *Brassica* (Cruciferae) roots on growth of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol.* 110: 217-225.

-GOODENOUGH, P. W. y KEMPTON, R. J. 1976. The activity of cell wall-degrading enzymes in tomato roots infected with *Pyrenochaeta lycopersici* and the effect of sugar concentrations in these roots on disease development. *Physiol. Plant Pathol.* 9: 313-320.

-GRIPPIOLO, R. 1981. Il processo di un fungo vescicolo-arbuscolare. I. Osservazioni ultrastrutturali sulla penetrazione del fungo da cellula a cellula nella radice. *Allion* 24: 49.

-HALL, I. R. 1976. Vesicular mycorrhizas in the orchid *Corybas macranthus*. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 66: 160.

-HANCOCK, J. G. y MILLAR, R. L. 1965. Relative importance of polygalacturonate trans-eliminase and other pectolytic enzymes in southern anthracnose, spring black stem, and stemphylium leaf spot of

alfalfa. *Phytopathology* 55: 346-355.

-HANCOCK, J. G., MILLAR, R. L. y LORBEER, J. W. 1964. Pectolitic and cellulolytic enzymes produced by *Botrytis allii*, *B. cinerea* and *B. squamosa* in vitro and in vivo. *Phytopathology* 54: 928-931.

-HARLEY, J. L. 1986. Mycorrhizal studies: past and future. *Mycorrhizae: physiology and genetics*. Proc. 1st European Symposium on Mycorrhizae. Dijon, Paris.

-HARLEY, J. M. y HARLEY, E. L. 1987. A check-list of mycorrhiza in the British flora. *New Phytol.* 105: 1-102.

-HARLEY, J. L. y SMITH, S. E. 1983. *Mycorrhizal Symbiosis*. Academic Press, London, New York.

-HATANAKA, C. y OZAWA, J. 1969. Isolation of a new exopolygalacturonase producing digalacturonic acid from pectin acid. *Agric. Biol. Chem.* 33: 116-118.

-HAYMAN, D. S. 1983. The physiology of vesicular-arbuscular endomycorrhizal symbiosis. *Can. J. Bot.* 61: 944-963.

-HAYMAN, D. S. y STOVOLD, G. E. 1979. Spore populations and infectivity of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in New South Wales. *Aust. J. Bot.* 27: 227-233.

-HEPPER, C. M. 1977. A colorimetric method for estimating vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in roots. *Soil Biol. Bioch.* 9: 15-18.

-HEPPER, C. M. 1984. Isolation and culture of VA mycorrhizal (VAM) fungi. En "*VA Mycorrhiza*" (Eds. C.

LL. Powell y D. J. Bagyaraj) pp. 95-112. CRC Press, Boca Raton, Florida.

-HEPPER, C. M. y SMITH, G. A. 1976. Observations on the germination of *Endogone* spores. Trans. Br. Mycol. Soc. 66: 189-194.

-HEWITT, E. J. 1952. Sand and water culture methods used in the study of plant nutrition. Tech. Comm. Farham Roy. Bucks. Conn. Agric. Bur. 22.

-HUBBELL, D. H., MORALES, V. M. y UMALI-GARCIA, M. 1978. Pectolytic enzymes in *Rhizobium*. Appl. Environ. Microbiol. 35: 210-213.

-ISHII, S. 1976. Enzymatic maceration of plant tissues by endo-polygalacturonase from *Aspergillus japonicus*. Phytopathology 66: 281-289.

-ISHII, S. y YOKOTSUKA, T. 1972. Purification and properties of pectin trans-eliminase from *Aspergillus sojae*. Agric. Biol. Chem. 36: 146-153.

-JEANMOUGIN, J., GIANINAZZI-PEARSON, V. y GIANINAZZI, S. 1987. Endomycorrhizas in the *Gentianaceae*. I. Ultrastructural aspects of symbiont and relationships in *Gentiana lutea*. Symbiosis 3: 269-286.

-JIN, D. F. y WEST, C. A. 1984. Characteristics of galacturonic acid oligomers as elicitors of casbene synthetase activity in castor bean seedlings. Plant Physiol. 74: 989-992.

-KASPARI, H. 1975. Fine structure of the host-parasite interface in endotrophic mycorrhiza of tobacco. En "Endomycorrhizas" (Eds F. E. Sanders, B. Mosse y P. B.

Tinker) pp. 325-334. Academic Press, London.

-KAWASE, M. 1979. Role of cellulase in aerenchyma development in sunflower. *Am. J. Bot.* 66: 183-190.

-KERTESZ, Z. I. 1951. Pectic enzymes. En "The Enzymes" (Eds J. B. Sumner y K. Myrback) 1: 745-769. Academic Press, New York.

-KINDEN, D. A. y BROWN, M. F. 1975. Electron microscopy of vesicular-arbuscular mycorrhizae of yellow poplar. I. Characterisation of endophytic structures by scanning electron microscopy. *Can. J. Microbiol.* 21: 989-993.

-KOUGH, J. L., GIANINAZZI-PEARSON, V. y GIANINAZZI, C. 1987. Depressed metabolic activity of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi after fungicide application. *New Phytol.* 106: 708-715.

-LABAVITCH, J. M. 1981. Cell wall turn-over in plant development. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 32: 385-406.

-LACKIE, S. M., GARRIOCK, M. L., PETERSON, R. L. y BOWLEY, S. R. 1987. Influence of host plant on the morphology of the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus, *Glomus versiforme* (Daniels y Trappe) Berch. *Symbiosis* 3: 147-158.

-LAMPART, D. T. A. y CATT, J. W. 1981. Glycoproteins and enzymes of the cell wall. En "Encyclopedia of Plant Physiology (NS), Plant Carbohydrates II" (Eds. W. Tanner y F. A. Holmes) 13(B): 133-165. Springer-Verlag, New York.

-LOWRY, O. H., ROSERBROUGH, N. J., FARR, A. L. y RANDALL, R. J. 1951. Protein measurement with the Folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 267-275.

-LYON, G. D. 1984. Comparisons between phytoalexin concentrations and the extent of rotting of potato tubers inoculated with *Erwinia caratovora* subsp. *atroseptica*, *E. caratovora* subsp. *caratovora* or *E. chrysanthemi*. *Phytopathol. Z.* 111: 236-243.

-MACDONALD, R. M. 1981. Routine production of axenic vesicular-arbuscular mycorrhizas. *New Phytol.* 89: 87-93.

-MACDONALD, R. M. y LEWIS, M. 1978. The occurrence of some acid-phosphatases and dehydrogenases in the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *G. mosseae*. *New Phytol.* 80: 135-141.

-MACKENZIE, C. R. y WILLIAMS, R. E. 1984. Detection of cellulase and xylanase activity in isoelectric-focused gels using agar substrate gels supported on plastic film. *Can. J. Microbiol.* 30: 1522-1525.

-MAHER, E. A. y KELMAN, A. 1986. Changes in populations of *Erwinia caratovora* in relation to the development of soft rot in wounded potato tissue. *Proc. 6th Int. Conf. Plant Pathog. Bact.*, College Park, Maryland, 1985. Dordrecht: Nijhoff/Junk.

-MARTINEZ-MOLINA, E. y OLIVARES, J. 1982. A note on evidence for involvement of pectolytic enzymes in the infection process of *Medicago sativa* by *Rhizobium meliloti*. *J. App. Bacteriol.* 52: 453-455.

- MARTINEZ-MOLINA, E., MORALES, V. M. y HUBBELL, D. H. 1979. Hydrolytic enzymes production by *Rhizobium*. App. Environ. Microbiol. 38: 1186-1188.
- MARX, C., DEXHEIMER, J., GIANINAZZI-PEARSON, V. y GIANINAZZI, S. 1982. Enzymatic studies on the metabolism of vesicular-arbuscular mycorrhizas. IV. Ultracytoenzymological evidence (ATPase) for active transfer processes in the host-arbuscule interface. New Phytol. 90: 37-43.
- MCGUIRE, R. G. y KELMAN, A. 1984. Reduced severity of *Erwinia* soft rot in potato tubers with increased calcium content. Phytopathology 74: 1250-1256.
- MCNEIL, M., DARVILL, A. G., FRY, S. C. y ALBERSHEIM, P. 1984. Structure and function of the primary cell walls of plants. Ann. Rev. Biochem. 53: 625-663.
- MENGE, J. A., JOHNSON, E. L. V. y PLATT, R. G. 1978. Mycorrhizal dependency of several citrus cultivars under three nutrient regimes. New Phytol. 81: 553-559.
- MORALES, V. M., MARTINEZ-MOLINA, E. y HUBBELL, D. H. 1984. Cellulase production by *Rhizobium*. Plant and Soil 80: 407-415.
- MORANDI, D., BAILEY, J. A. y GIANINAZZI-PEARSON, V. 1984. Isoflavonoid accumulation in soybean roots infected with vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. Physiol. Plant Pathol. 24: 357-364.
- MORTON, J. B. 1988. Taxonomy of VA mycorrhizal fungi: Classification, nomenclature, and identification. Mycotaxon. 32: 267-324.

-MOSSE, B. 1962. The establishment of vesicular-arbuscular mycorrhiza under aseptic conditions. J. Gen. Microbiol. 27: 509-520.

-MOSSE, B. y HEPPER, C. 1975. Vesicular-arbuscular mycorrhizal infections in root organ cultures. Physiol. Plant Pathol. 5: 215-223.

-MOSSE, B., STROBLEY, D. P. y LETACON, F. 1981. The ecology of mycorrhizae and mycorrhizal fungi. En "Advances in Microbial Ecology" (ed. M. Alexander) 5: 137-210. Plenum Press, New York.

-NAGEL, C. W. y VAUGHN, R. H. 1961. The characteristics of a polygalacturonase produced by *Bacillus polymyxa*. Arch. Biochem. Biophys. 93: 344-352.

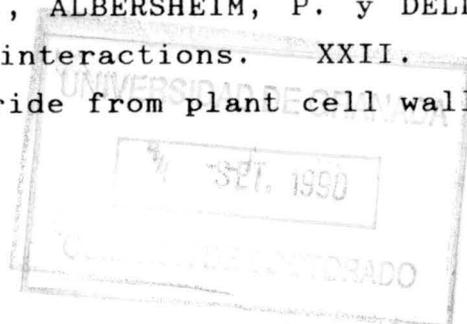
-NELSON, N. 1944. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucosa. J. Biol. Chem. 153: 375-380.

-NEWNAM, E. I. y REDDELL P. 1987. The distribution of mycorrhizas in families of vascular plants. New Phytol. 106: 745-751.

-NICOLSON, T. H. 1959. Mycorrhiza in the Graminae. I. Vesicular-arbuscular endophytes with reference to the external phase. Trans. Br. Mycol. Soc. 42: 421-438.

-NICOLSON, T. H. 1960. Mycorrhiza in the Graminae. II: Development in different habitats particularly sand dunes. Trans. Br. Mycol. Soc. 43: 132-145.

-NOTHNAGEL, E. A., MCNEIL, M., ALBERSHEIM, P. y DELL, A. 1983. Host-pathogen interactions. XXII. A galacturonic acid oligosaccharide from plant cell walls



elicits phytoalexins. *Plant Physiol.* 71: 916-926.

-OCAMPO, J. A. 1980. Micorrizas VA. I. Características generales. *Ann. Edaf. Agrobiol.* 39: 351-365.

-OCAMPO, J. A. y HAYMAN, D. S. 1981. Influence of plant interactions on vesicular-arbuscular mycorrhizal infections. II. Crops rotations and residual effects of non-host plants. *New Phytol.* 87: 333-343.

-OCAMPO, J. A., MARTIN, J. y HAYMAN, D. S. 1980. Influence of plant interactions on vesicular-arbuscular mycorrhizal infections. I. Host and non-host plants grown together. *New Phytol.* 84: 27-35.

-OLIVEIRA, A. R. y ZAMBOLIN, L. 1988. Influencia do inoculo em diferentes niveis na interacao entre *Glomus etunicatum* e *Meloidogyne javanica* em feijoeiro. *Pesq. Agropec. Bras. Brasilia.* 23: 371-378.

-PATIL, S. S. y DIMOND, A. E. 1967. Inhibition of *Verticillium* polygalacturonase by oxidation products of polyphenols. *Phytopathology* 57: 492-496.

-PHILLIPS, J. M. y HAYMAN, D. S. 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 55: 158-161.

-PORTER, W. M. 1979. The most "probable number" method for enumerating infective propagules of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in soil. *Aust. J. Soil Res.* 17: 515-519.

-POWELL, C. L. 1976. Development of mycorrhizal infections from *Endogone* spores and infected root

- segments. Trans. Br. Mycol Soc. 66: 439-445.
- PRESSEY, R. 1984. Role of pectinesterase in pH-dependent interactions between pea cell wall polymers. Plant Physiol. 76: 547-549.
- PRESSEY, R. y AVANTS, J. K. 1971. Effect of substrate size on activity of tomato polygalacturonase. J. Food Sci. 36: 486-489.
- PRESSEY, R. Y AVANTS, J. K. 1982. Solubilization of cell walls by tomato polygalacturonases: Effects of pectinesterases. J. Food Biochem. 6: 57-74.
- PRESTON, R. D. 1979. Polysaccharide conformation and cell wall function. Ann. Rev. Plant Physiol. 30: 55-78.
- PUGH, L. M., RONCADORI, R. W. y HUSSEY, R. S. 1981. Factors affecting vesicular-arbuscular mycorrhizal development and growth of cotton. Mycologia 73: 869-879.
- READ, D. J., KOUCHEKI, H. K. y HODGSON, J. 1976. Vesicular-arbuscular mycorrhiza in natural vegetation systems. I. The occurrence of infection. New Phytol. 77: 641-653.
- REEVE, R. M. 1959. A specific hydroxylamide ferric chloride reaction for histochemical localization of pectin. Stain Technology. 209-211.
- REXOVA-BENKOVA, L. 1973. The size of the substrate-binding site of an *Aspergillus niger* extracellular endopolygalacturonase. Eur. J. Biochem. 39: 109-115.

-REXOVA-BENKOVA, L. y MARKOVIC, O. 1976. Pectin enzymes. Adv. Carb. Chem. Biochem. 33: 323-385.

-RICH, J. R. y BIRD, G. W. 1974. Association of early season vesicular-arbuscular mycorrhizae with increased growth and development of cotton. Phytopathology 64: 1421-1425.

-SCANNERINI, S. y BONFANTE-FASOLO, P. 1979. Ultrastructural cytochemical demonstration of polysaccharides and proteins within host-arbuscule interfacial matrix in an endomycorrhiza. New Phytol. 83: 739-744.

-SELLEN, D. B. 1980. The mechanical properties of plant cell walls. En "The Mechanical Properties of Biological Materials" Symp. Soc. Exp. Bio. 34: 315-330. Cambridge Univ. Press, Cambridge.

-SHERWOOD, R. T. 1966. Pectin lyase and polygalacturonase production by *Rhizoctonia solani* and other fungi. Phytopathology 56: 279-286.

-SIQUEIRA, J. O. 1987. Cultura axénica e monoxénica dos fungos micorrízicos vesículo-arbusculares. En "II Reuniao Brasileira sobre Micorrizas" pp. 44-70. Sao Paulo, Brasil.

-SLOCUM, R. D. y ROUX, S. J. 1983. Cellular and subcellular localization of calcium in gravistimulated oat coleoptiles and its possible significance in the establishment of tropic curvature. Planta 157: 481-492.

-SMITH, S. E. y GIANINAZZI-PEARSON, V. 1988. Physiological interactions between symbionts in vesicular-arbuscular mycorrhizal plants. Ann. Rev.

Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 39: 221-244.

-SMITH, S. E. y SMITH, F. A. 1990. Structure and function of the interfaces in biotrophic symbioses as they relate to nutrient transport. *New Phytol.* 114: 1-38.

-SMITH, S. E. y WALKER, N. A. 1981. A quantitative study of mycorrhizal infection in *Trifolium*: separate determination of the rates of infection and of mycelial growth. *New Phytol.* 89: 225-240.

-SOMOGYI, M. 1952. Notes on sugar determination. *J. Biol. Chem.* 195: 19-23.

-STARR, M. P. y MORAN, F. 1962. Eliminative split of pectin substances by phytopathogenic soft-root bacteria. *Science* 135: 920-921.

-TAGAWA, T. y BONNER, J. 1957. Mechanical properties of the *Avena* coleoptile as related to auxin and to ionic interactions. *Plant Physiol.* 32: 207-212.

-TEPPER, M. y TAYLOR, I. E. P. 1981. The interaction of divalent cations with pectin substances and their influence on acid-induced cell wall loosening. *Can. J. Bot.* 59: 1522-1525.

-TERRY, M. E., JONES, R. L. y BONNER, B. A. 1981. Soluble cell wall polysaccharides released by pea stems by centrifugation. I. Effect of auxin. *Plant Physiol.* 68: 531.

-UMALI-GARCIA, M., HUBBELL, D. H., GASKINS, M. H. y DAZZO, F. B. 1980. Association of *Azospirillum* with grass roots. *App. Environ. Microbiol.* 39: 219-226.

- VAN GIJSEGEM, F. 1986. Analysis of the pectin-degrading enzymes secreted by three strains of *Erwinia chrysanthemi*. J. Gen. Microbiol. 132: 617-624.
- WACKER, T. L., SAFIR, G. R. y STEPHENS, C. T. 1990. Effects of ferulic acid on *Glomus fasciculatum* and associated effects on phosphorus uptake and growth of asparagus. J. Chem. Ecol. Vol. 16, No.3.
- WALKER, C. y SANDERS, F. E. 1986. Taxonomic concepts in the Endogonaceae: III. The separation of *Scutellospora* gen- nov. from *Gigaspora* Gerd. and Trappe. Micotaxon. 27: 169-182.
- WAREING, P. F. y PHILLIPS, I. D. J. 1970. The control of growth and differentiation in plants. pp. 303. Pergamon, Oxford.
- WARNER, A. y MOSSE, B. 1980. Independent spread of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in soil. Trans. Br. Mycol. Soc. 74: 407-410.
- WYSS, P. y WIEMKEN, A. 1988. Comparision of reactions in plant-roots induced by infection by pathogenic and VA mycorrhizal fungi. Proc. 2nd European Symposium on Mycorrhizae. Praga, Checoslovaquia.

