

**UNIVERSIDAD DE GRANADA**



**Inoculación de hongos micorrícicos en variedades comerciales de olivo (*Olea europaea* L.): efectos sobre el crecimiento, nutrición e inducción de enzimas hidrolíticas relacionadas con el establecimiento de la simbiosis y/o protección frente a enfermedades**

**Rut Calvente Guerrero**

**Granada, 2003**

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales

Autora: Rut Calvente Guerrero

ISBN: 978-84-9163-283-2

URI: <http://hdl.handle.net/10481/42198>

**Inoculación de hongos micorrícicos en variedades comerciales de olivo (*Olea europaea* L.): efectos sobre el crecimiento, nutrición e inducción de enzimas hidrolíticas relacionadas con el establecimiento de la simbiosis y/o protección frente a enfermedades**

Memoria que presenta la Licenciada en Farmacia  
Rut Calvente Guerrero  
para aspirar al Título de Doctor

Fdo: Rut Calvente Guerrero

Vº Bº  
Los Directores

Fdo: Dº. José Miguel Barea Navarro  
Doctor en Farmacia  
Profesor de Investigación del CSIC

Fdo: Dª Concepción Azcón González de Aguilar  
Doctora en Biología  
Profesor de Investigación del CSIC

Universidad de Granada  
2003



*No está la cosa  
en pensar mucho,  
sino en  
amar mucho, y así lo que  
más os despertare amar,  
eso haced.*

*Sta. Teresa de Jesús*



Esta Tesis Doctoral ha sido realizada en el Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos de la Estación Experimental del Zaidín (CSIC), Granada, y financiada mediante una beca predoctoral de Formación de Profesorado Universitario (F.P.U) del Ministerio de Educación, Cultura y Deporte.



El aislamiento y la caracterización morfológica de los hongos micorrícicos estudiados en la presente Memoria se realizó en el contexto del proyecto de investigación: "Control biológico de la verticilosis del olivo mediante micorrizas y microorganismos antagonistas" (CICYT, AG95-0985-C02-02). La participación de D<sup>a</sup> Custodia Cano y el Dr. John Dodd fue fundamental a tal fin.

El experimento #5 se llevó a cabo en colaboración con el departamento de Protección Vegetal del Instituto de Agricultura Sostenible (CSIC) en Córdoba en el contexto del proyecto de investigación: "Mejora de la sanidad y de la tecnología de propagación en la producción viverística de olivo" (CICYT-UE, Programa FEDER), en colaboración con el Dr. Jiménez-Díaz y la Dra. Rodríguez-Jurado.



*A mis padres,  
Antonio y Puri*



*Quisiera dar las gracias de todo corazón a muchas personas que Dios ha puesto en mi camino durante estos últimos años y que de una manera u otra han colaborado a que esta Memoria Doctoral vea la luz. Me han ayudado mucho y sobre todo me han enseñado a valorar todo lo bueno de la vida,*

*A D<sup>o</sup> José Miguel Barea Navarro, mi director de tesis y amigo. Gracias por valorar siempre mi trabajo y por tu siempre disponibilidad. Tu trayectoria profesional como investigador te hace grande pero tu humanidad y cercanía a todos te hace realmente especial.*

*A D<sup>a</sup> Concepción Azcón, mi directora de tesis y amiga. "Funcionaria incansable" y ejemplo vivo de amor al trabajo. Gracias por los buenos consejos y por esa corrección de tesis que casi acaba con nosotras.*

*A la Dra. Rosario Azcón por tener una palabra amable siempre a punto y por los buenos consejos dados..*

*A la Dra. Nuria Ferrol, por su valiosa ayuda en todos los estudios de naturaleza molecular presentados en esta Memoria.*

*Al Dr. Juan Manuel Ruiz por su disponibilidad permanente. Ánimo con estos "puñeteros" hongos.*

*Gracias a la Dra. Bonfante y Dra. Balestrini, que hicieron que mi estancia en Torino fuera muy provechosa. Me sentí como en casa.*

*No puedo olvidarme de las primeras personas que me transmitieron el amor por la microbiología y que me iniciaron en el mundo de la investigación. Son la Dra. Emilia Quesada y la Dra. Victoria Béjar. Sin duda, la universidad necesita profesores/as como vosotras, ejemplos de gran profesionalidad y cercanía al alumnado. ¡¡Emilia, de mayor quiero ser como tú!!.*

*Gracias en general a todo el departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos de la EEZ porque de un modo u otro me han ayudado a resolver numerosas dudas, en especial a D<sup>o</sup> José Olivares por sus cariñosas palabras y su incuestionable valía humana.*

*A los de arriba o de abajo (aún no lo tengo muy claro): Javi, Sonia, Adriana, Carlos, Pablo, Cecilia, Mayra, Almudena, Yolanda y Paqui, suerte con vuestros trabajos.*

*Gracias a mis compañeras del siglo pasado; M<sup>a</sup> José y Coral, que me ayudaron a desenvolverme rápidamente en el laboratorio y me enseñaron algunas de las técnicas que muestro en la presente Memoria, entre otras muchas cosas.*

*A mis compañeros de trabajo que han sido ante todo muy buenos amigos. Gracias a Manolo porque siempre has tenido un "taco" cariñoso con el que animarme y por esos masajes revitalizantes. Gracias a Sonia por aquel consejo que me diste un día y que no olvidaré jamás. Gracias a Agustín por su simpatía y por decir las cosas tan claritas y con tanta naturalidad. Una ráfaga de aire fresco siempre viene bien. Gracias a Rosa, mi chófer preferido, por ser tan buena amiga desde el principio. Gracias a Pili, por tu buen trabajo y tu siempre disponibilidad. Espero que el destino no te aleje mucho de Granada. Gracias a Silvia, porque en sólo unos meses te ganaste a todos nosotros. Nos vemos en tu boda!!! Gracias a Chon, nunca olvidaré tu "ensaladilla jienense". A Astrid, precaria, madre y esposa. Vaya torbellino de mujer!. Mucho ánimo con tu tesis que ya te queda muy poquito. Te deseo de corazón todo lo mejor. A Marisol por ese alegre canturreo de las mañanas.*

*A la abuela Custo, con la que compartí tantas cosas. No olvidaré nunca lo bien que lo pasamos en aquel puerto asturiano con Pepe y con Alberto, ni de aquella noche en la casa de la familia Monster, ni del cochinillo de Segovia, ....bueno, no acabaría nunca. Tampoco puedo olvidarme de Jose, mi castrojo preferido, qué gran semental que eres!!!!*

*Gracias a mi fiel y buen amigo Alberto por ser auténtico día a día y consecuente con los valores que rigen tu vida. Estoy segura de que la vida te dará muchas satisfacciones personales y profesionales porque como decía tu madre, la vida pone a cada a persona en su sitio y tú mereces estar muy arriba.*

*Mil gracias a la gran familia que es el COM. ¡Cuántas cosas me enseñáis cada día! Gracias por abrirme siempre las puertas de vuestro corazón. Dios seguro está muy orgulloso de cada uno de vosotros. Ánimo porque sois sensacionales.*

*Gracias Alejandro por ser un amigo incondicional. Gracias por ser como tú dices, mi fan nº 1. Te deseo todo lo mejor de este mundo porque te lo mereces.*

*Gracias Nuria por escucharme y por esos buenos consejos que me das. Espero de corazón que el futuro afiance aún más nuestra amistad y que dentro de 40 años estemos con nuestros nietos contándoles nuestro inolvidable viaje en 4 días a 3 países y que podamos seguir por mucho tiempo brindando por el sexo.*

*A mis amigas de siempre, Marián y Mar; las mejores médicas del panorama nacional. Gracias por vuestra fidelidad y por todo el cariño que me dais día a día ( ....bueno, los días que conseguimos vernos). Mucha suerte en vuestros caminos.*

*Edson, obrigado por me amar tanto e ser tão grande. O mundo necessita de pessoas tão boas e ricas de espírito como você. Es o amor mais estratégico que jamais tive. Ojalá o destino cruze nossos caminos definitivamente. Que Deus te abençõe!*

*A mi queridísima tía Carmen. Gracias por quererme tanto y ser tan buena. Llevo 27 años contigo y aún no conozco ni un mal gesto ni una mala palabra de tu boca. Sin duda, todo esto te engrandece.*

*Gracias a mi hermana Laura. Le doy gracias a Dios cada día por tenerte en mi vida. Sin duda eres el tesoro más grande que poseo. Espero poder compartir contigo tantas cosas por muchos muchos años.*

*A mis padres, Antonio y Puri, que son el pilar de mi vida. Gracias Papa por lo mucho que me quieres y por transmitirme esa paz y esa protección que tanto necesito. Te necesito y Te quiero, Papá. Gracias Mamá por lo mucho que me quieres y por ser la alegría de la casa, por tu vitalidad y por llevarme siempre por el camino recto. Te necesito y Te quiero, Mamá.*

*Muchas Gracias a todos de corazón.*

*¡Qué Dios os bendiga!*



Indice



I.	Introducción	1
A.	Interés y Objetivos Generales	3
B.	Revisión de los Antecedentes Bibliográficos	9
	AGRICULTURA SOSTENIBLE	10
	Conceptos generales	10
	Implicación de los microorganismos del suelo en Agricultura Sostenible	11
	Implicación de las micorrizas en Agricultura Sostenible	15
	MICORRIZAS ARBUSCULARES ("MICORRIZAS")	17
	Conceptos generales	17
	Taxonomía de los hongos formadores de micorrizas arbusculares	18
	Formación de las micorrizas	21
	Significado de las micorrizas en el sistema suelo- planta	25
	MICORRIZAS Y CONTROL INTEGRADO DE ENFERMEDADES	30
	Conceptos generales	30
	Mecanismos sugeridos para explicar el efecto de las micorrizas en el control de patógenos	31
	Respuesta de defensa de la planta frente al ataque de un microorganismo patógeno	33
	Respuesta de defensa de la planta a hongos micorrícicos	35
	EL OLIVO	41
	Breve introducción histórica	41
	Situación taxonómica y características generales	42
	Propagación	44
	Variedades comerciales	45
	Plagas y enfermedades	45
	Verticilosis del olivo ( <i>Verticillium dahliae</i> , K)	46

MICOTROFÍA DEL OLIVO .....	47
Micorrizas en plantas micropropagadas de olivo .....	47
Control biológico de enfermedades .....	48
<b>II. Plan de Trabajo</b> .....	<b>49</b>
<b>III. Material y Métodos</b> .....	<b>55</b>
1. Material Biológico .....	55
1.1. Material Vegetal .....	55
1.2. Hongos Micorrícicos .....	56
2. Experimentos de Invernadero .....	57
2.1. Generalidades .....	57
2.2. Experimento # 1 .....	58
2.3. Experimento # 2 .....	58
2.4. Experimento # 3 .....	59
2.5. Experimento # 4 .....	60
2.6. Experimento # 5 .....	60
3. Métodos de Laboratorio .....	62
<b>IV. Resultados</b> .....	<b>109</b>
1. Estudio de la diversidad de hongos formadores de micorrizas arbusculares en la rizosfera de olivos de la provincia de Jaén .....	111
1.1. Aislamiento y caracterización molecular de los hongos micorrícicos procedentes de la rizosfera del olivo .....	116
1.1.1. Hongos micorrícicos aislados .....	116
1.1.2. Producción de inóculo puro .....	117
1.1.3. Caracterización molecular de los hongos micorrícicos aislados .....	117
1.2. Análisis filogenético .....	122
1.3. Discusión .....	125

2.	Estudio de la formación de micorrizas y de sus efectos sobre el crecimiento y la nutrición de plantas de olivo .....	129
2.1.	Determinación de la densidad óptima de inóculo .....	132
2.2.	Efecto de diferentes hongos MA sobre el crecimiento de las plántulas (Arbequina/Leccino) .....	136
2.3.	Efecto de la micorrización sobre el crecimiento de plántulas de la variedad Picual .....	140
2.3.1	Anatomía y ultraestructura de la simbiosis .....	144
2.4.	Efecto de dosis crecientes de fertilizantes sobre el crecimiento de las plántulas de la variedad Picual. ....	148
2.5.	Discusión .....	150
3.	Actividades enzimáticas inducidas por la micorrización e implicadas en mecanismos de defensa de plantas de olivo .....	153
3.1.	Contenido proteico de la raíz .....	156
3.2.	Actividad $\beta$ -1,3-glucanasa ácida .....	157
3.3.	Actividad $\beta$ -1,3-glucanasa básica .....	159
3.4.	Actividad quitinasa ácida .....	159
3.5.	Actividad quitinasa básica .....	160
3.6.	Discusión .....	161
4.	Estudios de expresión de $\beta$ -1,3-glucanasas en raíces de olivo micorrizadas .....	165
4.1.	Búsqueda de genes que codifican $\beta$ -1,3-glucanasas en olivo. ....	170
4.2.	Obtención del gen completo <i>OleGlu1</i> .....	176
4.3.	Análisis filogenético de los genes obtenidos .....	181
4.4.	Análisis de la secuencia nucleotídica y aminoacídica de <i>OleGlu1</i> .....	185
4.5.	Estudios de expresión ( <i>Northern blot</i> ). ....	189
4.6.	Discusión .....	192

5.	Efecto protector de las micorrizas frente a la infección por <i>Verticillium dahliae</i> .....	195
5.1.	Efectos sobre el crecimiento de la planta .....	199
5.2.	Análisis del contenido en proteínas .....	204
5.3.	Análisis de la actividad $\beta$ -1,3-glucanasa ácida .....	206
5.4.	Análisis de la actividad $\beta$ -1,3-glucanasa básica .....	208
5.5.	Análisis de la actividad quitinasa ácida .....	209
5.6.	Análisis de la actividad quitinasa básica .....	211
5.7.	Estudios de expresión génica ( <i>Northern blot</i> ) .....	212
5.8.	Discusión .....	215
<u>V. Discusión General</u> .....		<u>221</u>
<u>VI. Conclusiones</u> .....		<u>231</u>
<u>VII. Anexos</u> .....		<u>235</u>
	Abreviaturas .....	237
	Índice de Figuras .....	239
	Índice de Tablas .....	241
<u>VIII. Bibliografía</u> .....		<u>243</u>

## Introducción



## **I. Introducción**

### **A. Interés y Objetivos Generales**

Las expectativas sociales en relación con la protección de la salud humana requieren, de un lado, la producción de alimentos sanos y de alta calidad, y de otro, que en los procesos productivos se provoque el mínimo deterioro ambiental. Por ello, y teniendo en cuenta los efectos colaterales de los productos químicos en Agricultura, los esfuerzos de los científicos en torno a esta temática de investigación se orientan en la actualidad hacia la búsqueda de estrategias alternativas que permitan una productividad sostenida en el tiempo con el mínimo coste ecológico y económico. Estas estrategias, que se orientan hacia unos enfoques agronómicos para los que se acuñó el término de "Agricultura Sostenible", están basadas en el aprovechamiento racional de procesos y recursos naturales. Uno de tales recursos naturales es el constituido por las diversas poblaciones de microorganismos, colonizadores habituales del suelo de las interfases suelo-planta (rizosfera), donde desarrollan acciones beneficiosas para el crecimiento, nutrición y salud de las plantas. Por ello, la manipulación de este recurso natural renovable se considera hoy día una de las estrategias mas prometedoras en Agricultura Sostenible. En particular, la atención se está centrando en investigaciones para optimizar el uso de las llamadas rizobacterias y de los hongos formadores de micorrizas. Tales grupos de microorganismos son reconocidos por sus efectos beneficiosos sobre el desarrollo y salud de las plantas, basados fundamentalmente en que : (i) promueven la germinación de las semillas y el enraizamiento de las plántulas; (ii) incrementan la disponibilidad de nutrientes en el suelo rizosférico y/o la capacidad de las plantas para adquirirlos; y (iii) ayudan a las plantas a resistir mejor estreses

bióticos (ataque de patógenos) o abióticos (sequía, salinidad, contaminación, etc). Por estas razones, la manipulación racional de microorganismos que ejercen acciones beneficiosas sobre el sistema suelo-planta puede contribuir a reducir el consumo de fertilizantes y biocidas obtenidos por síntesis química, y por tanto contribuir a la sostenibilidad de los sistemas agrícolas y a reducir el negativo impacto ambiental inherente a los sistemas intensivos de producción.

Como ya se ha mencionado anteriormente uno de los grupos de microorganismos mas destacados en el contexto de una agricultura respetuosa con el medio ambiente y sostenible en el tiempo es el constituido por los hongos formadores de micorrizas arbusculares (en adelante "micorrizas"), simbiosis mutualista hongo-planta clave en el desarrollo y salud de las plantas. La importancia ecológica y económica de este tipo de micorrizas está avalada, no solo por sus efectos beneficiosos, sino por ser las que forman más del 80% de las especies vegetales existentes. Esta simbiosis, prácticamente omnipresente en todos los suelos, climas y biomas, participa activamente en diversos procesos relacionados con el ciclado y suministro de nutrientes a la planta, y con la protección de estas frente a estreses ambientales, tanto bióticos como abióticos. Particularmente, se ha comprobado que las micorrizas pueden reducir el efecto negativo de microorganismos patógenos de las plantas, hecho de gran importancia ya que el control biológico de enfermedades es uno de los aspectos claves en Agricultura Sostenible.

Actualmente se están llevando a cabo diversos estudios con el fin de evaluar las posibilidades de aplicar eficazmente las micorrizas en el control de patógenos en cultivos de interés. Estos estudios tratan de elucidar los mecanismos de acción por los cuales las micorrizas pueden proteger a las plantas, o disminuir la susceptibilidad de estas, frente al ataque de patógenos, lo cual es vital para comprender y manipular eficazmente el sistema suelo-planta-hongo micorrícico con vistas a minimizar los daños ocasionados por un determinado patógeno. Concretamente, uno de los mecanismos que se ha sugerido que puede estar implicado en el efecto protector de las micorrizas frente a patógenos del sistema radical es la activación de los mecanismos de defensa de la planta por parte de los hongos micorrícicos. El estudio de la implicación de dicho mecanismo en el control de

enfermedades de las plantas, por parte de las micorrizas constituye uno de los objetivos fundamentales de la presente Tesis Doctoral.

Para llevar a cabo este trabajo se ha elegido el olivo (*Olea europaea*, L) como planta modelo. El olivar es uno de los principales cultivos en toda la Cuenca Mediterránea, siendo España el principal productor y exportador de aceite de oliva del mundo. Como un valor añadido a la importancia económica del olivo hay que considerar el valor cultural y social de su cultivo.

A pesar del interés del cultivo del olivo y de su carácter emblemático para la cultura y economía de los Países Mediterráneos, son escasos los estudios básicos que se han realizado sobre la biología de esta planta, quizás debido a la escasa tradición de este tipo de estudios en los países en los cuales se cultiva preferentemente. No hay que olvidar además la gran dificultad que implica el trabajar con una planta leñosa de crecimiento muy lento, lo que condiciona la larga duración de los estudios sobre ella y la demora inevitable en la consecución de resultados fiables.

No obstante, debido a la gran importancia económica del cultivo del olivo, a la conciencia sobre las cualidades nutritivas del aceite de oliva, y a la gran cantidad de aspectos desconocidos de su biología, el olivo se ha convertido en objetivo de interés prioritario en diversas investigaciones de carácter básico-orientado, como la que animó a la realización de este trabajo de Tesis Doctoral, encaminado a estudiar el impacto de la micorrización dirigida sobre diversas facetas de la "nueva olivicultura".

Se sabe que el olivo es una planta micotrófica, es decir, capaz de formar micorrizas y de beneficiarse del establecimiento de la simbiosis. Sin embargo, considerando la obtención y el uso de nuevas variedades comerciales de olivo, y teniendo en cuenta que las diferentes variedades de una planta pueden responder de manera diferente a la micorrización, es preciso contrastar previamente el nivel de micotrofia de las variedades de olivo objeto de estudio. Este hecho adquiere especial relevancia cuando las plantas son producidas en vivero, mediante técnicas de micropropagación, basadas en el cultivo de tejidos *in vitro*, ya

que los protocolos de producción de la planta son, en general, compatibles con el proceso de micorrización. Por ello es fundamental conocer el grado de micotrófia las variedades producidas por micropropagación con el fin último de promover la micorrización de las mismas, en su caso, y facilitar su aclimatación a las condiciones de crecimiento ex –vitro.

Para investigar el papel de las micorrizas en la protección frente a patógenos que afectan al olivo, se ha elegido la “verticilosis”. Esta enfermedad está causada por *Verticillium dahliae*, y se considera la enfermedad de origen fúngico más amenazadora para el olivar en diversos países de la Cuenca Mediterránea. Concretamente, su incidencia en Andalucía es alta y de considerable repercusión económica. Por ello, en los últimos años se han planteado diversas propuestas de investigación encaminadas a la determinación y explotación del potencial de distintos tipos de microorganismos en el control integrado de la misma.

La presente memoria se enmarca en el contexto de uno de tales proyectos: **Mejora de la sanidad y de la tecnología de propagación en la producción viverística de olivo** (CICYT-UE, Programa FEDER).

De acuerdo con lo que antecede se propusieron diversos estudios, con los siguientes **Objetivos Generales**:

1. Estudiar el efecto de las micorrizas sobre la nutrición y el desarrollo de tres variedades comerciales de olivo.
2. Investigar los cambios inducidos por la micorrización en las reacciones de defensa de las plantas.
3. Analizar el efecto de las micorrizas en la protección de plantas de olivo frente a la infección por *Verticillium dahliae* y la posible implicación de los cambios inducidos en las reacciones de defensa de la planta en dichos efectos.



## **B. Revisión de los Antecedentes Bibliográficos**

En los últimos años se están produciendo avances considerables en las áreas de investigación implicadas en el estudio propuesto: utilización de microorganismos en agricultura sostenible, micorrizas, control integrado de enfermedades, mecanismos de resistencia de las plantas frente a patógenos, propagación viverística de variedades de interés comercial, etc... Estos avances se reflejan en abundantes y diversas publicaciones científicas. Con objeto de analizar los aspectos fundamentales de la información recogida en dichas publicaciones, tanto en cuanto a conceptos clave bien establecidos (que se tratarán de forma muy resumida), como a los recientes avances que se están produciendo, dicha información se va sistematizar a continuación.

## **AGRICULTURA SOSTENIBLE**

### **Conceptos generales**

Según el informe confeccionado por el Fondo de Población de las Naciones Unidas (FNUAP, 2001), es un hecho constatado que la población mundial incrementa a un ritmo de 77 millones de personas al año. Si ese ritmo se mantiene, la estimación es que para el 2050 se alcancen los 9.200 millones los habitantes en el planeta. La necesidad de satisfacer la demanda de alimentos motivó el desarrollo, a mediados del siglo pasado, de nuevas prácticas de cultivo orientadas a incrementar la producción agrícola. Tales prácticas se basaron en intensificar el uso de productos agroquímicos, como fertilizantes y biocidas, lo que permitió producir más y controlar mejor plagas y enfermedades de las plantas. Sin embargo, también se ha observado que el uso creciente y excesivo de agroquímicos tiene importantes aspectos negativos, entre los que se incluyen el alto coste energético de su fabricación, pérdidas de fertilidad y problemas de erosión del suelo, contaminación de suelos y acuíferos, degradación del medio ambiente y, en último extremo, problemas sobre la salud animal y humana (López-Bellido, 1998). Debido al elevado impacto ambiental de este tipo de agricultura intensiva, se ha producido una demanda social en cuanto a propiciar el uso de técnicas agrícolas menos agresivas, compatibles con la conservación y protección del medio ambiente. Surge entonces el concepto de Agricultura Sostenible, que integra tres objetivos fundamentales (Jiménez-Díaz, 1998): (a) conservación de los recursos naturales y protección del medio ambiente; (b) viabilidad económica; y (c) equidad social.

Sostenibilidad en agricultura implica el uso racional de los recursos naturales renovables y la utilización mínima de materiales o procesos cuya producción o desarrollo conlleve el consumo de energía procedente de fuentes no renovables. Sin embargo, las prácticas agronómicas de tipo sostenible no excluyen el uso inteligente de fertilizantes y productos fitosanitarios, aunque sí que proponen reducir las dosis de aplicación. La demanda de alimentos por parte de la población ha de ser por lo tanto satisfecha de forma

compatible con la sostenibilidad de los sistemas agrícolas y con la mejora de la calidad de vida y del medio ambiente (Altieri, 1994).

La sostenibilidad de los sistemas suelo-planta se basa de forma muy especial en mantener la calidad del suelo, atributo que está definido por determinadas propiedades físicas, químicas y biológicas, que interactúan entre sí, y que constituyen los denominados macro-componentes de la fertilidad del suelo (Altieri, 1995). Mantener una calidad/fertilidad del suelo optimizada es fundamental para el establecimiento y desarrollo de las plantas. El componente biológico de la fertilidad está marcado por la actividad de los microorganismos del suelo, protagonistas de actividades fundamentales para la estabilidad y el funcionamiento de los agro-sistemas y ecosistemas naturales (Kennedy & Smith, 1995). Teniendo en cuenta que la microbiota del suelo es un recurso natural renovable, y que los microorganismos realizan actividades beneficiosas para el desarrollo, nutrición y salud de las plantas, es lógico que, ante los actuales retos de la Agricultura Sostenible, la investigación en Microbiología del Suelo está tomando un auge considerable. Actualmente se estudian los microorganismos del suelo desde diversos puntos de vista: ecológico, fisiológico, bioquímico, genético y biotecnológico (Barea, 2000). La idea es poder manipular las actividades de los microorganismos en relación con la nutrición y protección de las plantas, y de optimizar su contribución a una productividad sostenida con el mínimo deterioro del medio ambiente.

### **Implicación de los microorganismos del suelo en Agricultura Sostenible**

Es un hecho demostrado que los microorganismos del suelo (que colonizan las interfaces suelo-planta (la rizosfera)) benefician el ciclado de nutrientes y la descomposición de la materia orgánica, así como la nutrición, el desarrollo y, en algunas ocasiones la salud de la planta (Barea & Olivares, 1998).

El término rizosfera lo introdujo Hiltner (1904) para describir la zona del suelo que se encuentra influenciada por la raíz. Debido al "efecto rizosférico" (la influencia de la planta), las propiedades físicas, químicas y biológicas de la rizosfera son muy diferentes a las del suelo no rizosférico (Barea, 2000). La rizosfera es un medio dinámico de constante interacción entre los microorganismos, las raíces de las plantas y los demás componentes minerales y orgánicos del suelo; particularmente, es destacable el incremento en el número y actividad de los microorganismos, estimulados por los exudados liberados por las raíces de las plantas, y los residuos vegetales (Kennedy, 1998; Bowen & Rovira, 1999; Gryndler, 2000; Barea *et al.*, 2002 a & b). La microbiota del suelo está constituida por bacterias, hongos, algas, virus y por los componentes de la microfauna (protozoos, artrópodos, nemátodos y otros). Sin embargo, la mayoría de los estudios de Microbiología del Suelo se refieren fundamentalmente a hongos y bacterias, debido a su alto número y al amplio espectro de actividades beneficiosas que realizan (Barea *et al.*, 2002 a & b).

Las bacterias y hongos microscópicos del suelo presentan un elevado nivel de diversidad genética y funcional, y producen efectos beneficiosos, aunque también perjudiciales (patógenos), en el sistema suelo-planta. Entre las actividades positivas destacan las siguientes:

- Producción de sustancias fitoactivas (microorganismos *fitoestimuladores*), capaces de estimular la germinación de las semillas y/o el enraizamiento de las plantas. Entre ellas destacan las fitohormonas, tales como auxinas, citoquininas y giberelinas (Dobbelaere *et al.*, 2001; Barea *et al.*, 2003).
- Participación en el ciclado biogeoquímico de los nutrientes (microorganismos *biofertilizantes*), mediante la fijación del nitrógeno atmosférico, la solubilización de nutrientes o la mejora en la adquisición de nutrientes solubles por la planta (Barea, 1997).
- Mejora de la estructura del suelo, efecto ejercido mediante la formación de agregados estables que favorecen la capacidad de retención de agua y la estabilidad del suelo (Andrade *et al.*, 1998; Rillig *et al.*, 2002).

- Control biológico de patógenos mediante interacciones antagonistas con los mismos. Cabe destacar como agentes de biocontrol a bacterias pertenecientes a los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Streptomyces* y a hongos de los géneros *Trichoderma* y *Gliocladium* (Elliott & Lynch, 1995; Barea *et al.*, 2003).
- Biorremediación de suelos contaminados (Blaudez *et al.*, 2000).

La gran mayoría de los microorganismos del suelo son heterótrofos, es decir, necesitan para su crecimiento y actividad compuestos de carbono metabolizables como fuente de energía y de esqueletos carbonados. Por ello, y desde el punto de vista de su relación con la planta, los microorganismos pueden ser:

- Saprofitos: son los que utilizan para su desarrollo compuestos carbonados del suelo. Los principales fuentes de dichos compuestos son los exudados radicales y los residuos de la planta.
- Simbiontes: son microorganismos que infectan o colonizan los tejidos de la planta. Una vez establecida dicha relación simbiótica, utilizan directamente los compuestos carbonados procedentes de la fotosíntesis.

El término “simbiosis” y sus derivados procede del griego y alude a organismos que viven juntos, estrechamente asociados, en forma de:

- Simbiosis parasítica: en la que uno de los organismos resulta dañado de su asociación con el otro (patógenos).
- Simbiosis mutualistas: en la que ambos simbiontes, planta y microorganismo en este caso, se benefician del hecho de vivir juntos. A las “simbiosis mutualistas”, se las denomina genéricamente como “simbiosis”, aunque, estrictamente hablando, esta denominación no sea correcta.

Entre los microorganismos *saprófitos* que producen efectos beneficiosos sobre las plantas merecen especial atención las llamadas Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal, conocidas en la literatura científica por el acrónimo PGPR (del inglés Plant Growth Promoting Rhizobacteria). Se trata de bacterias con una elevada capacidad competitiva, que colonizan la rizosfera y la superficie de la raíz (rizoplana), en donde mantienen poblaciones relativamente elevadas. Ello les permite ejercer actividades significativas sobre el desarrollo vegetal, entre otros mecanismos, por la competencia que ejercen sobre otros microorganismos, fundamentalmente, antagonistas o patógenos de la raíz (Kloepper, 1994; Glick, 1995; Bashan & Holguin, 1998; Bashan, 1999). Los géneros con mayor número de especies con capacidad PGPR son *Pseudomonas* y *Bacillus*, y en menor medida *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Acetobacter* y *Burkholderia* (Barea, 2000). Entre las actividades beneficiosas de las PGPR se han descrito el control biológico de patógenos (Kloepper *et al.*, 1991; O'Gara *et al.*, 1994; Weller & Thomashow, 1994; Defago & Keel, 1995; Alabouvette *et al.*, 1997; Buchenauer, 1998; Ramamoorthy *et al.*, 2001), la estimulación del enraizamiento (Dobbelaere *et al.*, 1999 y 2001; Steenhoudt & Vanderleyden, 2000), fijación de nitrógeno y solubilización de fosfatos (Kim *et al.*, 1998; Toro *et al.*, 1998; Vance, 2001; Probanza *et al.*, 2002). Las bases moleculares de la actividad de las PGPR en biocontrol (van Loon *et al.*, 1998; Bloemberg & Lugtenberg, 2001; Shouan, 2002) y las posibilidades de su explotación comercial (Morrissey *et al.*, 2002), han sido ampliamente discutidas en revisiones recientes.

Más recientemente han despertado un considerable interés ciertos microorganismos rizosféricos, conocidos como "endofitos", capaces de colonizar los tejidos de la planta, aunque sin establecer simbiosis mutualistas con ellas. Estos organismos desarrollan actividades semejantes a las de las PGPR y su interés ecológico y biotecnológico se está evaluando en profundidad (Chanway, 1996; Sturz *et al.*, 2000; Sturz & Novak, 2000).

Entre los microorganismos *simbiontes mutualistas* implicados en actividades de interés en agricultura sostenible destacan las bacterias fijadoras de N<sub>2</sub> y los hongos micorrícicos.

Dentro del grupo de bacterias fijadoras de  $N_2$  merecen una mención especial las que forman nódulos en las raíces de las plantas leguminosas. Conocidas mediante la denominación genérica de "*Rhizobium*", actualmente se encuentran agrupadas en distintos géneros bacterianos: *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium* y *Azorhizobium*. Presentan el enzima nitrogenasa, responsable de la reducción (fijación) del  $N_2$  atmosférico a amonio, que una vez incorporado a compuestos carbonados específicos, es transferido a la planta, para su utilización en el metabolismo de los aminoácidos y proteínas. La fijación de  $N_2$  contribuye en gran medida a satisfacer las demandas de nitrógeno de la planta que, a cambio, suministra a las bacterias compuestos carbonados procedentes de la fotosíntesis, así como un nicho ecológico protegido. La fijación simbiótica del  $N_2$  es un proceso de suma importancia para el ciclo del nitrógeno en la biosfera estimándose que contribuye con un aporte de 140 millones de toneladas de nitrógeno por año a los distintos ecosistemas terrestres (Postgate, 1998).

### **Implicación de las micorrizas en Agricultura Sostenible**

Las micorrizas son asociaciones simbióticas mutualistas entre hongos del suelo y raíces de la mayoría de las plantas terrestres. Se estima que más del 90% de las especies vegetales existentes son susceptibles de formar micorrizas (Smith & Read, 1997). Dado que no solo las especies vegetales, sino también los hongos implicados son extraordinariamente diversos, las micorrizas se agrupan, en base a su estructura y funcionamiento, en cinco tipos fundamentales. Las características generales de los distintos tipos se recogen de forma simplificada en la Tabla 1 (Barea & Olivares, 1998).

Una información más detallada sobre el tema se puede encontrar en Smith & Read (1997).

Es evidente que las llamadas micorrizas arbusculares son las más ampliamente distribuidas en la naturaleza, y son además las que forman las plantas de interés agronómico, incluyendo hortícolas y frutales.

Los estudios que conforman esta Tesis Doctoral se refieren sólo a micorrizas arbusculares, las que forman la planta objeto de estudio de la presente memoria. Es por ello que se les dedica un apartado especial en este Capítulo de Antecedentes Bibliográficos.

**Tabla 1.** Principales tipos de micorrizas y simbiontes implicados

Denominación	Simbiontes		
	Planta	Hongo	
<b>Ectotróficas</b> (formadoras de manto)	Fagáceas, Pináceas, Betuláceas, etc... y en general plantas de interés forestal	Basidiomicetos Ascomicetos	
<b>Ectendotróficas</b>	<i>Arbutus</i> y otras Arbutoides, <i>Monotropa</i>	Basidiomicetos	
<b>Endotróficas</b>	Arbusculares	80-90% de las especies vegetales existentes (interés agronómico, forestal, ornamental, etc..)	Glomeromicetos (Schüßler <i>et al.</i> , 2001)
	Orquidoides	Orquídeas (interés ornamental)	Basidiomicetos
	Ericoides	Ericáceas	Ascomicetos Basidiomicetos

Tal como se esbozó anteriormente, las micorrizas arbusculares desempeñan actividades de considerable incidencia en el sostenimiento de los agrosistemas ya que son fundamentales para la absorción de nutrientes y agua por las plantas, a las que protegen del impacto negativo frente a estreses bióticos y abióticos (Barea & Olivares, 1998).

## **MICORRIZAS ARBUSCULARES (“MICORRIZAS”)**

### **Conceptos generales**

Como se indica en la Tabla 1, más del 80% de las familias de plantas, existentes sobre la superficie terrestre, forman las llamadas micorrizas arbusculares, en las que el hongo implicado es de tamaño microscópico (Brundrett *et al.*, 1996). Las plantas y sus micorrizas tienen una historia evolutiva común ya que los registros fósiles de plantas más antiguos que se conocen presentan en sus primitivas raíces unas estructuras similares a las de las actuales micorrizas arbusculares. De acuerdo con ello, las micorrizas arbusculares tendrían una antigüedad de unos 460 millones de años, la misma que se le adjudica a las plantas, es decir que se generan en el periodo Ordívicio (Redecker, 2000). Este hecho se ha corroborado en estudios recientes que utilizan técnicas de biología molecular, sobre datación, filogénia y evolución de los hongos formadores de micorrizas arbusculares y su asociación con las plantas (Redecker *et al.*, 2000 y 2002).

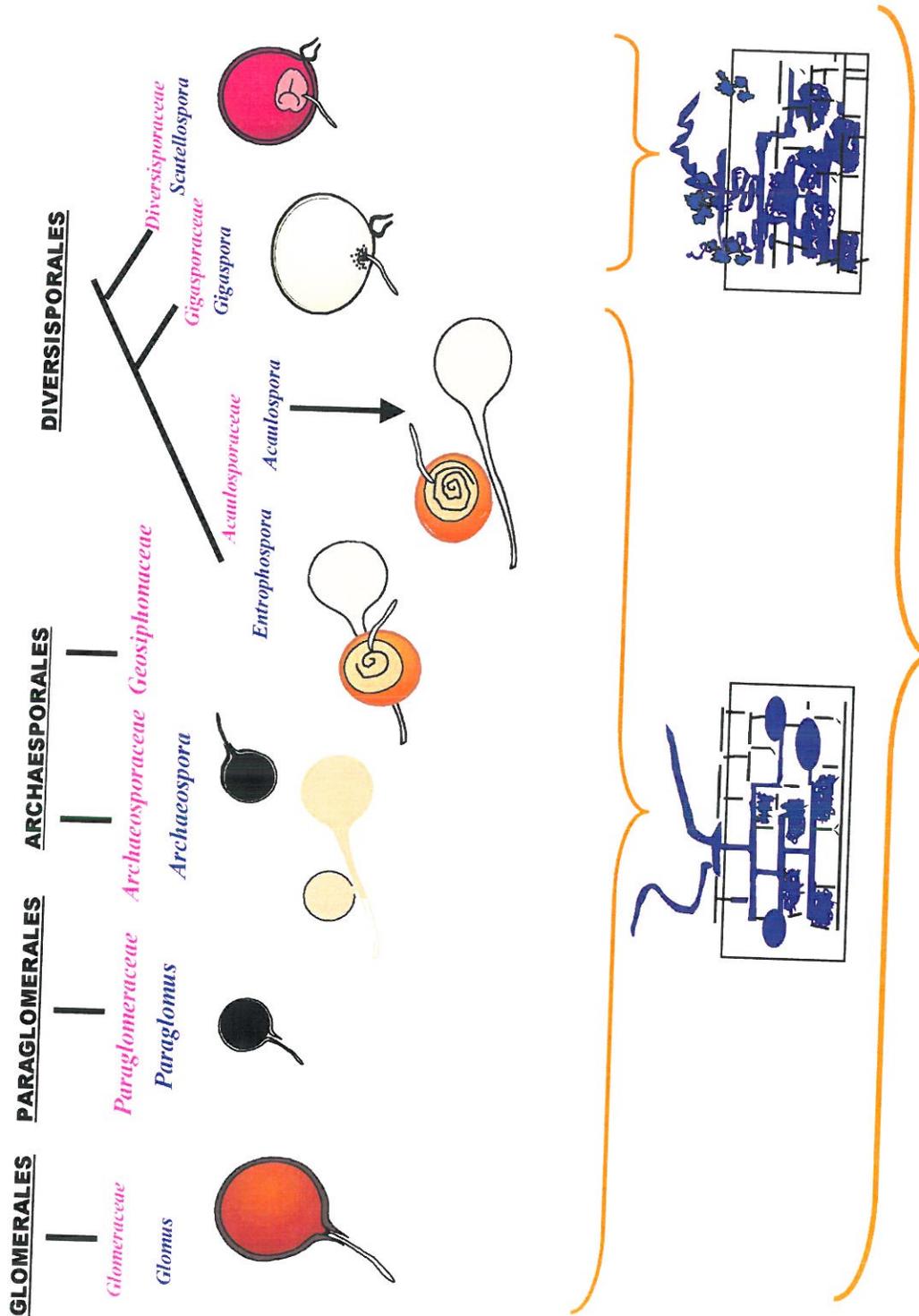
El largo periodo de vida en común de las plantas y sus hongos asociados ha condicionado una co-evolución de ambos tipos de organismos, que se manifiesta por el elevado grado de mutualismo y dependencia que los simbioses muestran entre sí. Como consecuencia de tal co-evolución, la mayoría de las plantas son “micotróficas”, ya que necesitan estar micorrizadas para lograr un desarrollo óptimo, mientras que el hongo es un simbionte obligado y que no puede completar su ciclo de vida en ausencia de una planta hospedadora (Bago & Becard, 2002).

La planta hospedadora (macrosimbionte) proporciona al hongo (microsimbionte), los componentes carbonados necesarios para su desarrollo. Por su parte, el hongo suministra a la planta nutrientes minerales y agua que extrae del suelo mediante la red de hifas externas que se desarrollan en el mismo.

Las plantas dependen en mayor o menor grado del establecimiento de la simbiosis para crecer adecuadamente. Esta dependencia, denominada *grado de micotrofia*, es especialmente relevante en la mayoría de las plantas arbóreas de interés agrícola o industrial (Declerck *et al.*, 1995; Habte, 1995; Azcón & Barea, 1997; Graham *et al.*, 1997). El grado de micotrofia puede llegar a ser extremo en especies con un sistema radical poco desarrollado, que no es capaz de aportar nutrientes al ritmo que la planta necesita para cubrir sus necesidades fisiológicas.

### **Taxonomía de los hongos formadores de micorrizas arbusculares**

Los hongos implicados en la formación de micorrizas arbusculares se consideraban hasta hace poco incluidos en el orden Glomales de los Zigomicetos, (Morton & Benny, 1990; Redecker *et al.*, 2000). Sin embargo, debido a las numerosas diferencias que presentan con otros Zigomicetos, y a las particularidades de su biología, recientemente se les ha reubicado en un nuevo phylum erigido específicamente para ellos, el de los Glomeromycota (Schüßler *et al.*, 2001a y b). El nuevo modelo taxonómico propuesto se muestra en la Figura 1.



Glomeromycota (Schüßler *et al.*, 2001)

Figura 1. Esquema de la taxonomía de hongos micorrizicos propuesta por Schüßler (2001).

Hasta la fecha y en base a la ontogenia y morfología de las esporas que producen tan solo se han descrito unas 150 especies de hongos formadores de micorrizas arbusculares (en adelante, "micorrizas"), lo que indica una diversidad muy baja. Sin embargo, ello contrasta con el hecho de que la diversidad local puede ser elevada, ya que en un sitio concreto puedan encontrarse hasta 30 tipos de hongos diferentes (Brundrett *et al.*, 1996; Fitter, 2001).

La identificación de los hongos formadores de micorrizas arbusculares se ha basado, hasta hace pocos años, en las características morfológicas y en el desarrollo ontogénico de sus esporas multinucleadas (Gerdemann & Trappe, 1970; Morton, 1988; Walker, 1992; Morton & Benny, 1990). Sin embargo, cada vez hay más evidencias de que la identificación basada en criterios morfológicos tiene un uso limitado, ya que la baja diversidad morfológica de las esporas de los hongos micorrícicos no refleja la gran plasticidad fisiológica y diversidad genética de sus poblaciones. El progreso que están experimentando en la actualidad las técnicas de biología molecular está posibilitando la utilización de criterios más constantes y fiables para caracterizar los hongos micorrícicos, facilitando así el subsiguiente análisis de la diversidad genética de las poblaciones (Helgason *et al.*, 1998; Schüßler *et al.*, 2001a, Clapp *et al.*, 2002). Debido a que el carácter de simbioses obligados de estos hongos limita la cantidad de material fúngico disponible para ser analizado, la aplicación de técnicas basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) al estudio de los hongos micorrícicos ha supuesto un avance importante en la caracterización genética de dichos microorganismos (Simon, 1996; Sanders *et al.*, 1996; Clapp *et al.*, 2002).

Concretamente, el análisis de los genes ribosómicos (ADNr) de los hongos formadores de micorrizas ha puesto de manifiesto que a pesar del polimorfismo existente en dichos genes, especialmente en las zonas ITS (del inglés Internal Transcribal Spacers) es posible establecer criterios fiables para estudios de filogenia y diversidad utilizando las subunidades ribosómicas 18S y 25S (Clapp *et al.*, 1995 y 2002; Sanders *et al.*, 1995; Redecker *et al.*, 1997; van Tuinen *et al.*, 1998; Helgason *et al.*, 1998; Redecker *et al.*, 2000; Daniell *et al.*, 2001; Schüßler *et al.*, 2001a y b).

Los avances en el conocimiento de las características moleculares de los hongos formadores de micorrizas y de su filogenia están permitiendo desarrollar estrategias basadas en el uso de metodologías innovadoras de ecología microbiana, tales como las conocidas por sus acrónimos PCR-SSCP (del inglés Polymerase Chain Reaction-Single Strand Conformational Polimorfism) y PCR-TGGE (del inglés Polymerase Chain Reaction-Temperatura Gradient Gel Electrophoresis), con el fin de identificar los diferentes ecotipos de hongos formadores de micorrizas presentes tanto en una raíz colonizada, como en el suelo asociado a la misma (Kjoller & Rosendahl, 2000; Clapp *et al.*, 2002; Kowalchuk *et al.*, 2002).

Estos estudios están poniendo de manifiesto que las comunidades de hongos micorrícicos son mucho más diversas de lo que se pensaba (Chelius, 1999; Daniell, 2001; Fitter, 2001; Clapp *et al.*, 2002; Prosser, 2002). El estudio de la diversidad de las poblaciones de hongos micorrícicos es fundamental para saber como éstos afectan a la diversidad de las plantas y a su productividad (van der Heijden & Sanders, 1998, 2002), así como su contribución a la diversidad de funciones que llevan a cabo (Clapp *et al.*, 2002). Es obvio que los nuevos avances que se están produciendo en el análisis de la diversidad genética de los hongos formadores de micorrizas arbusculares están introduciendo un elevado grado de incertidumbre sobre el concepto de especie, e incluso de individuo, en estos hongos (Clapp *et al.*, 2002).

### **Formación de las micorrizas arbusculares**

En el proceso de formación de la micorriza, durante el cual la planta acepta la colonización del hongo sin ejercer reacciones de defensa generalizadas (Dumas-Gaudot *et al.*, 2000), ocurren una serie de interacciones hongo-planta que van a dar lugar en último extremo a una integración morfológica y funcional de ambos simbioses (Gianinazzi-Pearson *et al.*, 1996). Hoy se sabe que el establecimiento de la simbiosis es el resultado de un continuo diálogo molecular entre la planta y el hongo, ejercido por el intercambio de señales de reconocimiento (Vierheilig & Piché, 2002). La identificación y clonación de los genes de

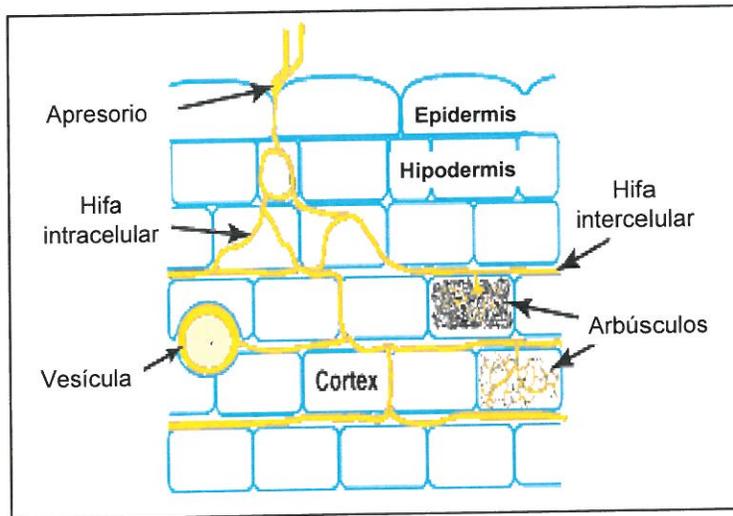
la planta implicados, así como el conocimiento de los sistemas de señales que intervienen en la formación y el funcionamiento de la simbiosis, son objeto de gran interés en la actualidad (Harrison *et al.*, 2000; Franken & Requena, 2001; Gollote *et al.*, 2002).

Los aspectos morfológicos y funcionales del proceso de formación de la simbiosis han sido objeto de numerosos estudios recientemente revisados por Giovannetti (2000), por lo que solo se van a comentar aquí los aspectos clave, fundamentalmente en lo relacionado con el contenido de esta Tesis Doctoral. Se acepta que existen en el suelo tres formas de propágulos con diferente capacidad de supervivencia y potencial infectivo para establecer la simbiosis. Estas formas son las esporas, que constituyen las formas de resistencia de estos hongos, los fragmentos de raíces micorrizadas de plantas preexistentes y finalmente, las redes de hifas que sobreviven en el suelo. Las esporas de los hongos micorrícicos contienen numerosos núcleos y una gran cantidad de lípidos de reserva (Bécard & Pfeffer, 1993). En condiciones favorables las esporas germinan y desarrollan el llamado tubo de germinación, que puede proliferar y formar un micelio que se extiende de forma radial y errática hasta alcanzar la rizosfera de una planta hospedadora susceptible de ser colonizada (Giovannetti, 2000; Giovannetti *et al.*, 2002). Las esporas de los hongos micorrícicos tienen almacenada toda la información genética y capacidad bioquímica y fisiológica para germinar, aunque determinadas condiciones físico-químicas, así como la presencia de exudados radicales y/o microorganismos del suelo pueden influenciar la germinación. El crecimiento de las hifas procedentes de las esporas ha sido intensamente estudiado con el fin de entender el por qué el hongo precisa de una colonización intrarradical obligada para completar su ciclo de vida. Si las hifas del hongo no encuentran las raíces de una planta hospedadora a las que colonizar, su citoplasma se retrae y la espora entra de nuevo en estado de quiescencia (Bago *et al.*, 1999). Una vez que una hifa "infectiva" alcanza la superficie de la raíz, se adhiere a ella y forma una estructura llamada "apresorio" a partir del cual se produce la penetración al interior de la raíz. Los mecanismos exactos por los cuáles el hongo penetra son aún desconocidos. Se ha sugerido que la producción localizada de enzimas que degradan la pared celular de la planta junto al desarrollo de una presión física, podrían ser los mecanismos responsables de la entrada de las hifas en la raíz

(García-Garrido *et al.*, 2000). El hongo micorrícico no penetra por heridas ni coloniza raíces muertas.

Una vez que la hifa colonizadora penetra en la raíz se ramifica intercelularmente, y coloniza el cortex de la raíz de forma rápida, sin invadir endodermos ni meristemos. Simultáneamente tiene lugar una colonización intracelular, formándose las estructuras más características de la simbiosis, los “arbusculos”, mediante ramificación dicotómica repetida de hifas intracelulares. En cada célula sólo puede formarse un arbusculo. Las hifas del hongo no penetran el plasmalema de la célula hospedadora sino que se produce una invaginación de éste que rodea las ramas del arbusculo. La interfase entre los dos simbiontes queda en esencia constituida por el plasmalema de la célula hospedadora o membrana peri-arbuscular, una matriz interfacial, la pared celular del hongo (muy precaria a nivel de las hifas más finas del arbusculo) y su membrana plasmática (Bonfante-Fasolo *et al.*, 1986 & 1992; Balestrini *et al.*, 1996; Gianinazzi-Pearson *et al.*, 1996; Bonfante, 2001). La barrera que suponen las paredes entre ambos simbiontes queda por lo tanto reducida a un mínimo (Gianinazzi-Pearson *et al.*, 1991). El arbusculo representa una extensa superficie de contacto entre ambos simbiontes. Se asume que el papel fundamental de esta interfase es el de facilitar el intercambio bidireccional de nutrientes entre el hongo y la planta (Smith *et al.*, 1994). En la célula vegetal colonizada tiene lugar un aumento del contenido citoplasmático, el núcleo aumenta de volumen, migra al centro de la célula y aumenta la actividad transcripcional (Smith & Gianinazzi-Pearson, 1988). La vida media del arbusculo es de 7 a 14 días y una vez que degenera, la célula vegetal recupera la situación previa a la colonización.

Algunas especies de hongos pueden también formar unas estructuras globosas llamadas vesículas con un alto contenido en lípidos y que parecen constituir un órgano de reserva de nutrientes (Barea *et al.*, 1991).



**Figura 2.** Desarrollo de la colonización radical por el hongo MA

El desarrollo del hongo en el interior de la raíz va acompañado de una proliferación de hifas en el suelo que la rodea formando lo que se denomina el micelio externo o extrarradical. Este micelio funciona como un sistema radical complementario, fundamental para la adquisición de nutrientes y agua por la planta (Barea, 2000). Se estima que por cada cm de raíz micorrizada se puede producir hasta 1 m de hifas. Dicho micelio explora microhábitats del suelo inaccesible para las raíces. Sobre las hifas extrarradicales se pueden formar esporas de resistencia, con lo que se cierra así el ciclo de vida del hongo. Las hifas extrarradicales del hongo pueden además formar nuevos puntos de entrada sobre la superficie de la raíz y contribuir así a la generalización de la colonización micorrízica.

## Significado de las micorrizas en el sistema suelo- planta

Como se indicó anteriormente, las micorrizas llevan a cabo diversas actividades relevantes desde el punto de vista de la sostenibilidad, ya que pueden representar una reducción en el aporte de fertilizantes y fitofármacos, y contribuir así a la conservación o establecimiento de sistemas sostenibles ya sean agrícolas, forestales o paisajísticos (Jeffries & Barea, 2001). En resumen, la información obtenida de diversos estudios recientes de revisión (Smith & Read, 1997; Barea *et al.*, 1997 y 2002; Kapulnik & Douds, 2000; Jeffries & Barea, 2001; Berta *et al.*, 2002), permite concluir que las micorrizas realizan las siguientes acciones en los sistemas suelo-planta:

- **Incrementan el aporte de nutrientes a las plantas.**

El efecto beneficioso más y mejor estudiado que ejercen las micorrizas sobre las plantas es, sin duda, el que conduce a una mejora del crecimiento así como de su estado nutricional.

Mediante la utilización de isótopos y sistemas compartimentados, en los que las hifas se desarrollan en compartimentos a los que las raíces no tienen acceso, se ha confirmado que el micelio externo de los hongos micorrícicos puede absorber P, Zn,  $\text{NO}_3^-$  y  $\text{NH}_4^+$  de microhabitats distantes hasta 25 cm de la superficie de la raíz (mucho más allá de la zona de agotamiento que la rodea) y transferírseles a las plantas con las que se asocian (Pearson & Jackobsen, 1993; Bürker & Robson, 1994; Tobar *et al.*, 1994; Smith *et al.*, 2000). Este efecto es mayor y más patente en suelos con una baja o desequilibrada fertilidad (Sainz *et al.*, 1999). Los efectos directos de la simbiosis sobre la nutrición mineral de las plantas se manifiestan primordialmente para aquellos nutrientes que son poco móviles y que están presentes en bajas concentraciones en la solución del suelo. El ejemplo más característico es el fósforo.

El P se encuentra predominantemente en forma no disponible, formando parte de compuestos insolubles o adsorbido a coloides o superficies del suelo. El fosfato está en la solución del suelo a concentraciones muy bajas y se desplaza muy lentamente por difusión, hacia la raíz. Una vez que alcanza la rizosfera, la velocidad de absorción es mayor que la de difusión, por lo que la rizosfera es carente en fósforo. El micelio extrarradical de los hongos micorrícicos es capaz de explotar zonas de suelo inaccesibles para las raíces de las plantas (Miyasaka *et al.*, 2001). La absorción de P por parte de las hifas ocurre en contra de un gradiente de concentración (Gianinazzi-Pearson & Gianinazzi, 1986), fundamentalmente en forma de ión fosfato. El análisis de la expresión de genes que codifican los transportadores de fosfato y la H<sup>+</sup>-ATPasa, principal directora del transporte iónico, está proporcionando evidencias experimentales sobre los mecanismos implicados en la absorción de P por el micelio externo. La observación de que en los hongos formadores de micorrizas *Glomus versiforme* y *Glomus intraradices* un gen que codifica un transportador de P de alta afinidad, el cual opera por procesos de simporte protónico, se expresa tan sólo en las estructuras extrarradicales del hongo indicando que la absorción inicial de P por la membrana plasmática del micelio externo ocurre por procesos de transporte activo (Harrison & Van Buuren, 1995; Maldonado-Mendoza *et al.*, 2001). Estos hechos están avalados por la observación de que uno de los cinco genes que codifican la H<sup>+</sup>-ATPasa de *Glomus mosseae* se expresa en las estructuras extrarradicales del hongo (Ferrol *et al.*, 2000). Esto es coherente con el hecho de que el P es absorbido en contra de un gradiente de concentración, lo que implica un consumo de energía metabólica. El fósforo se transloca predominantemente como cadenas de polifosfato a lo largo de las hifas hacia la interfase simbiótica a nivel de los arbusculos (Cox *et al.*, 1980; Dexheimer *et al.*, 1996; Saito, 2000). Mediante un sistema vacuolar móvil dirigido por el citoesqueleto fúngico, las cadenas de polifosfato circularían en dirección a la planta (Rasmussen *et al.*, 2000). No se conoce bien si la capacidad de transporte difiere de unos hongos a otros (Jakobsen, 1995).

Generalmente se ha aceptado que el P es liberado a la matriz interfacial por procesos de transporte pasivo y que posteriormente es absorbido por la planta hospedadora por procesos de transporte activo. La expresión de genes que codifican transportadores de fosfato y de ATPasas en células colonizadas por arbusculos ha permitido concluir que, en efecto, la absorción de fosfato por la planta hospedadora ocurre por un proceso de transporte activo que requiere la actividad de un transportador de fosfato de alta afinidad y de una H<sup>+</sup>-ATPasa (Gianinazzi-Pearson *et al.*, 2000; Rausch *et al.*, 2001; Ferrol *et al.*, 2002; Versaw *et al.*, 2002). La transferencia de fósforo a través de la interfase simbiótica parece seguir un modelo similar aunque directamente opuesto al de la transferencia de carbono.

Análogamente, las hifas del micelio externo son capaces de absorber y trasladar otros nutrientes como el N en forma de amonio o nitrato (Tobar *et al.*, 1994; Bago *et al.*, 1996; Bothe & Hildebrandt, 2002).

El amonio, ión de muy baja movilidad, puede dar lugar a zonas de agotamiento cuando es absorbido por la planta al igual que pasaba con el P. El micelio extrarradical puede alcanzar zonas no accesibles a las raíces de la planta y contribuir así a la nutrición nitrogenada de la misma. Con iones de mayor movilidad, como es el caso del nitrato o sulfato, es menos probable que se agoten las zonas próximas a las raíces y posiblemente estos iones no se muevan más rápidamente a través de las hifas que por la solución del suelo (Gianinazzi-Pearson *et al.*, 1991). A pesar de ello, se ha puesto de manifiesto inequívocamente la capacidad del micelio externo de absorber nitrato del medio (Bago *et al.*, 1996). Los mecanismos de cesión de elementos nitrogenados a la planta aún son hipotéticos (Bago *et al.*, 2001).

El hongo micorrícico también es capaz de absorber y transferir a la planta micronutrientes tales como el Zn y el Cu. Las plantas micorrizadas poseen una mayor eficiencia en la absorción de estos micronutrientes que las plantas no colonizadas. La absorción de estos elementos por las hifas es independiente de la

nutrición fosforada (Weissenhorn *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 2001). La absorción de otros micronutrientes por las hifas micorrícicas no está bien establecida, aunque parece generalizable que cuando un micronutriente está en concentraciones tóxicas.

Debido a la mayor absorción y al uso más eficiente de nutrientes en plantas micorrizadas, éstas presentan generalmente una mayor biomasa que sus respectivas plantas control. Además, y debido a esa mayor eficiencia en la absorción de nutrientes, la relación parte aérea/raíz es mayor en plantas micorrizadas.

- **Protegen a la planta frente a estreses abióticos.**

La simbiosis micorrícica contribuye a incrementar la resistencia/tolerancia de las plantas a salinidad, sequía, estados de deficiencia en nutrientes, exceso de metales pesados, degradación del suelo, etc. A continuación se ofrece un resumen del efecto de las micorrizas ante cada caso de situación de estrés.

*Estrés hídrico:* En diversos estudios se ha demostrado que las micorrizas ayudan a la planta a superar situaciones de estrés hídrico (Augé, 2001). Particularmente se ha demostrado que el micelio externo incrementa la capacidad de captación de absorción de agua a partir del suelo (Ruiz-Lozano & Azcón, 1995). Existen evidencias de que la micorrización puede disminuir la resistencia al transporte de agua en las raíces, alterar el potencial hídrico en hoja, aumentar la conductancia en los estomas y la transpiración. Todos estos cambios parecen ser debidos fundamentalmente a alteraciones en el balance hormonal de la planta (Augé, 1995 & 2001; Ruiz-Lozano *et al.*, 1995).

*Salinidad:* El exceso de iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  en suelos agrícolas como consecuencia de la aplicación de fertilizantes puede interferir en la absorción de nitratos, fosfatos y otros nutrientes. Las micorrizas ayudan a las plantas a superar el estrés salino (Tsang & Maun, 1999; Al-Karaki, 2000; Ruiz-Lozano & Azcón, 2000; Cantrell & Linderman, 2001).

*Presencia de metales pesados:* En general se puede generalizar que cuando se acumulan metales en el suelo, a concentraciones supraóptimas para el desarrollo de la planta, los hongos micorrícicos los absorben, disminuyendo su translocación a la parte aérea de la planta, lo que resulta de interés en la fitoestabilización de suelos contaminados con metales (Arines *et al.*, 1989; Entry *et al.*, 1999). Las distintas especies de hongos micorrícicos, y fundamentalmente, los distintos ecotipos difieren en el grado de resistencia que muestran frente a metales y en el nivel de adaptación a los mismos (del Val *et al.*, 1999). Es conveniente por lo tanto la utilización de hongos micorrízicos adaptados a la presencia de metales, con vistas a mejorar el establecimiento de la cubierta vegetal en zonas contaminadas (Díaz *et al.*, 1996; Leyval *et al.*, 2002; Turnau & Haselwandter, 2002).

- **Incrementan la actividad fotosintética de la planta.**

La colonización micorrícica estimula normalmente la actividad fotosíntesis de las plantas. Así lo avalan numerosos trabajos de investigación (Wright *et al.*, 1998; Valentine *et al.*, 2001).

- **Mejoran el enraizamiento de las plantas.**

Esta actividad está basada en la producción por los hongos de hormonas, vitaminas u otras sustancias fitoactivas.

- **Mejoran la estructura del suelo.**

Las hifas de los hongos micorrícicos están implicadas en la formación de agregados estables del suelo, un aspecto clave de la calidad del mismo. El micelio extrarradical y las propias raíces actúan como nexo de unión de las partículas orgánicas e inorgánicas del suelo, mientras que los polisacáridos, de origen

fundamentalmente bacteriano, actúan como cementantes de las estructuras formadas (Tisdall *et al.*, 1997; Miller & Jastrow, 2000).

- **Favorecen la diversidad de las comunidades de plantas y la sucesión vegetal.**

Cada planta muestra un nivel de compatibilidad mayor con determinados ecotipos de hongos micorrícicos, por lo que la conservación de la diversidad de estos hongos, beneficia la diversidad y sucesión de las plantas.

- **Control integrado de patógenos**

Dado que el estudio del efecto de las micorrizas ayudando a las plantas a superar el ataque de patógenos forma parte de los objetivos fundamentales de este estudio, a esta actividad se le va a dedicar un apartado especial.

## **MICORRIZAS Y CONTROL INTEGRADO DE ENFERMEDADES**

### **Conceptos generales**

Los microorganismos patógenos son componentes habituales de los ecosistemas naturales y agronómicos, que pueden causar importantes pérdidas en el rendimiento agrícola como consecuencia de su ataque y el consiguiente desarrollo de enfermedades. En las últimas décadas se han venido utilizando elevadas cantidades de agroquímicos para paliar estas enfermedades, pero dado que se crean resistencias a los mismos, que producen serios problemas de contaminación ambiental, y que llevan implícito un elevado

riesgo sanitario, se están estudiando nuevas estrategias alternativas a su uso. Una de tales estrategias se basa en el uso de microorganismos rizosféricos capaces de ejercer algún tipo de antagonismo sobre microorganismos patógenos para la planta y que, por tanto, beneficiarán indirectamente el desarrollo de ésta. Tal estrategia implica el manejo racional y dirigido de microorganismos antagonistas apropiados como agentes de control biológico de enfermedades (Kloepper *et al.*, 1991; O'Gara *et al.*, 1994; Weller & Thomashow, 1994; Defago & Keel, 1995; Alabouvette *et al.*, 1997; Buchenauer, 1998; van Loon *et al.*, 1998; Shoda, 2000; Bloemberg & Lugtenberg, 2001; Shouan, 2002; Landa *et al.*, 1997). Además del uso de tales microorganismos antagonistas, en los últimos tiempos despierta un elevado interés el papel que las micorrizas ejercen confiriendo una mayor resistencia/tolerancia a las plantas frente al ataque de patógenos que causan enfermedades a los cultivos. Tales efectos son difíciles de generalizar y dependen en gran medida de la especie vegetal implicada, del hongo micorrícico, el patógeno y su nivel de virulencia y de las condiciones medioambientales (Hooker *et al.*, 1994; Azcón-Aguilar & Barea, 1996). En general se ha descrito que las micorrizas reducen los síntomas cuando se trata de enfermedades que afectan al sistema radical (Cordier *et al.*, 1996; Slezack *et al.*, 2000). Una condición imprescindible para que se manifieste esta protección es que la simbiosis esté establecida antes de que se produzca el ataque del patógeno (Azcón-Aguilar & Barea, 1996).

### **Mecanismos sugeridos para explicar el efecto de las micorrizas en el control de patógenos**

De acuerdo con Azcón-Aguilar *et al.*, (2002) los mecanismos sugeridos son los siguientes:

- Mejora de la nutrición de la planta.

Numerosos estudios avalan que la mejora del estado nutricional en plantas micorrizadas les proporciona una mejor situación fisiológica, lo cual les permite a su vez combatir, de forma más efectiva al patógeno.

- Competición por fotosintetizados

Dado que es fundamental que la simbiosis esté bien establecida antes del ataque del patógeno para ser efectiva, el hongo micorrícico tiene un acceso prioritario a los productos carbonados sintetizados por la planta.

- Competición por sitios de colonización/infección

Al igual que ocurre con la competición por fotosintetizados, puede ocurrir competición por sitios de infección de forma que cuando llega el patógeno, éstos están ya ocupados por el hongo micorrícico. Existe un trabajo de investigación que muestra como las células que contienen arbusculos no son invadidas por determinados patógenos (Cordier *et al.*, 1996).

- Producción de cambios histológicos en el sistema radical

La colonización micorrícica incrementa la lignificación de las células endodérmicas de la raíz lo que dificulta la entrada de microorganismos patógenos. Este aumento en la lignificación es debido a la inducción de la ruta de biosíntesis de fenilpropanoides y la consecuente formación de precursores de la pared celular.

- Inducción de cambios en las poblaciones de microorganismos en la micorrizosfera.

Las modificaciones fisiológicas que experimentan las raíces micorrizadas provocan cambios en la cantidad y composición de los exudados radicales que liberan al suelo, y en el pH de la rizosfera (más correctamente denominada micorrizosfera cuando se trata de plantas micorrizadas), lo cual puede inducir cambios en los equilibrios microbianos de la misma. Además, el micelio extrarradical favorece la proliferación de determinadas poblaciones microbianas, dando lugar a la denominada hifosfera (Barea *et al.*, 2002a & b). Estos cambios pueden resultar en un aumento de microorganismos antagonistas frente a un determinado patógeno.

- Activación de los mecanismos de defensa.

Dado que la presente investigación tienen entre sus objetivos estudiar las implicaciones de este mecanismo en el efecto de las micorrizas sobre el control de patógenos, se propone analizar a continuación con más amplitud la información científica disponible sobre el tema,

sistematizándola como sigue: (a) respuesta de defensa de la planta frente al ataque de un microorganismo patógeno; (b) respuesta de defensa de la planta inducida por la colonización de los hongos micorrícicos; y (c) posible implicación de las respuestas inducidas por la colonización micorrícica en la protección frente al patógeno.

### **Respuesta de defensa de la planta frente al ataque de un microorganismo patógeno**

Las plantas, como todo ser vivo, activan sus sistemas naturales de defensa al reconocer un organismo patógeno o alguna parte de éste (fragmentos de sus paredes, diversos metabolitos, etc...). La defensa la ejercen mediante una combinación de barreras físicas y químicas, bien formadas con anterioridad al ataque del patógeno, o inducidas tras la infección. Las barreras físicas obstaculizan la penetración de los agentes infecciosos, ya sea por un engrosamiento de la pared celular o mediante la producción de papilas o lignificación de los tejidos. Las barreras químicas se refieren a compuestos perjudiciales para el agente infeccioso que la planta sintetiza, tales como: (a) compuestos volátiles antimicrobianos, por ejemplo el ácido hidrociánico, diferentes alquenos, polifenoles, fenoles, etc...; (b) proteínas inhibitoras del crecimiento de hongos y bacterias (quitinasas, glucanasas...); (c) fitoalexinas que son compuestos producidos por los tejidos vegetales que inhiben el desarrollo de organismos patógenos y se sintetizan cuando las células de la planta entran en contacto con el parásito o bien después de haber sufrido algún daño causado por agentes químicos o mecánicos (Darvill, 1984; Fritig *et al.*, 1998).

De una forma u otra, la planta posee o desarrolla diversos tipos de resistencia a enfermedades. La selección de cultivares resistentes es sin duda una estrategia clásica para evitar infecciones no deseadas. Conceptualmente, *resistencia* es la capacidad inherente de la planta de restringir total o parcialmente el crecimiento y/o la reproducción del patógeno en sus tejidos y, consecuentemente, el desarrollo de la enfermedad. De acuerdo con Jiménez-Díaz (1998) la resistencia puede ser completa, incompleta o inducida.

*Resistencia Completa.* Se caracteriza por que se impide el establecimiento de la relación planta-patógeno, por lo que solo se aprecia una mínima expresión de síntomas. Confiere al cultivo un gran nivel de protección y es hereditaria. Los mecanismos responsables están operativos antes de que la infección ocurra. Este tipo de resistencia involucra una interacción gen a gen entre los genotipos del hospedador y del patógeno. *Resistencia Incompleta.* Presenta una herencia poligénica. Opera después de que se ha producido la infección. Se establece la relación planta-patógeno pero en este caso el desarrollo del patógeno está limitado y el resultado es muy influenciado por el medio ambiente.

*Resistencia Inducida.* Ocurre cuando una planta que es normalmente susceptible a un patógeno concreto, ofrece resistencia a dicho patógeno conferida por un tratamiento o infección previa. Este tipo de resistencia no es hereditaria y tiene que ser conferida a cada individuo.

Aunque las defensas inducibles están a menudo localizadas en el sitio del ataque del organismo, los mecanismos de defensa de la planta pueden ser activados de manera sistémica en toda ella después de un ataque o una infección localizada (Kessman *et al.*, 1994). Así lo demostró Ross (1961) en plantas de tabaco tras sufrir infecciones localizadas con el virus del mosaico. A este tipo de resistencia se le denomina "*resistencia sistémica adquirida*" (SAR).

Al contrario que en animales, la presencia del patógeno determina en la planta una respuesta inespecífica. En ocasiones, la respuesta es tan rápida que se produce lo que se conoce como *respuesta de hipersensibilidad* (HR) (Goodman *et al.*, 1986; Dixon *et al.*, 1994). Ésta se manifiesta con necrosis de la zona adyacente a la entrada del patógeno, que de esta forma queda aislado y se evita su avance por los tejidos sanos de la planta. Entre los mecanismos que dan lugar a la reacción de hipersensibilidad está la síntesis de radicales libres de oxígeno, que provocan la muerte celular y el endurecimiento de las paredes de las células limítrofes. De esta forma el patógeno es incapaz de extenderse o multiplicarse en la planta y finalmente morirá. Esta estrategia impide que el patógeno tome los nutrientes de la planta (Hammond-Kosack & Jones, 1996).

Microorganismos no patógenos, especialmente las denominadas PGPR, son capaces igualmente de inducir en la planta procesos de sensibilización frente a patógenos que constituyen la denominada *Resistencia Sistémica Inducida* (ISR) (Van Loon *et al.*, 1998; Nandakumar *et al.*, 2001; Zehnder *et al.*, 2001). Este proceso se diferencia de la SAR en que no es dependiente de ácido salicílico ni conlleva normalmente la acumulación de proteínas relacionadas con la patogénesis (Lawton *et al.*, 1995).

### **Respuesta de defensa de la planta a hongos micorrícicos**

En general, las plantas permiten la penetración de los hongos micorrícicos en la raíz, así como su desarrollo inter e intracelular, sin oponer resistencia a su avance. Sin embargo, la planta hospedadora ejerce un control sobre el crecimiento del hongo permitiendo que solamente colonice el cortex de la raíz (Bonfante-Fasolo, 1984). Tal reconocimiento y aceptación del hongo micorrícico por parte de la planta contrasta con el hecho de que la presencia de un microorganismo invasor normalmente desencadena respuestas de defensa en la planta. Concretamente, diversos compuestos tales como glucanos de la pared celular fúngica, oligómeros de N-acetilglucosamina, péptidos de bajo peso molecular, así como elementos pectídicos, resultado de la acción de hidrolasas sobre las paredes celulares de las plantas y el hongo, constituyen elicitores comunes de las respuestas de defensa.

En realidad los hongos micorrícicos inducen inicialmente respuestas de defensa en las plantas hospedadoras que colonizan, pero éstas son localizadas, débiles y transitorias (Gianinazzi-Pearson, 1996). La colonización micorrícica produce cambios bioquímicos en los tejidos de la planta hospedadora. Éstos incluyen la estimulación de la ruta biosintética de los fenilpropanoides, cambios en los niveles de poliaminas alifáticas, síntesis de proteínas de función desconocida, activación de genes de defensa y el aumento de ciertas actividades hidrolasas (Peretto *et al.*, 1995). La colonización micorrícica incrementa, aunque débilmente y de forma transitoria, los niveles de peroxidasas, fitoalexinas, quitinasas, glucanasas, super-óxido-dismutasas, etc.... en definitiva enzimas implicadas en la defensa de la planta frente al ataque de patógenos (Azcón-Aguilar & Barea, 1996; Kapulnik *et al.*, 1996; Pozo *et al.*, 1999).

Existen evidencias claras de que algunas de las proteínas relacionadas con la defensa inducidas en la planta podrían tener un papel esencial en el control de la colonización intraradical del hongo (Lambais, 2000). Incluso se ha detectado la transcripción de genes asociados a la defensa de la planta en células que contienen arbusculos. También se inducen glicoproteínas ricas en hidroxiprolina (HRGP) (Bonfante-Fasolo *et al.*, 1991; Balestrini *et al.*, 1997), que juegan un papel estructural importante formando uniones complementarias con la red de celulosa de la pared celular reforzando por tanto su estructura y su papel como barrera defensiva.

Se ha preconizado que la inducción de tales actividades permite a la planta reaccionar mejor a un posible ataque posterior por agentes patógenos. La inducción y significado de estos mecanismos de defensa inducidos por los hongos micorrícicos se describen a continuación.

#### *Ruta fenilpropanoica:*

A partir de la fenilalanina y con el concurso de determinadas enzimas como son la fenilalanina amonio liasa (PAL), la chalcona sintasa (CHS) y la chalcona isomerasa (CHI), entre otras, se forma un numeroso grupo de compuestos como la lignina, suberina, furanocumarinas, estilbenes, fitoalexinas y otros flavonoides e isoflavonoides. La planta utiliza algunos de estos compuestos como refuerzo de paredes celulares, mientras que otros como el ácido salicílico actúan como señales que inducen otros mecanismos de defensa.

El uso de sondas específicas de algunos de estos genes (PAL y CHS) ha permitido visualizar *in situ* la acumulación de los ARNm en células que contienen arbusculos (Harrison & Dixon, 1994; Blee & Anderson, 1996; Bonanomi *et al.*, 2001). Estos mismos genes se inducen cuando existe un ataque por patógenos o cuando la planta se trata con elicitores que provocan una respuesta de hipersensibilidad.

*Fitoalexinas:* Tanto las fitoalexinas del tipo de las furanocumarinas como las de tipo isoflavonoide derivan de precursores fenilpropanoides. Son compuestos antimicrobianos de bajo peso molecular que se encuentran ausentes en plantas sanas. El contacto con microorganismos infecciosos hace que se expresen en el lugar de la infección. Se sabe que el transporte electrónico mitocondrial entre la NADH deshidrogenasa y el coenzima Q es inhibido por la acción de una fitoalexina denominada glyceolina. Asimismo se ha demostrado que el glicinol se intercala en las membranas celulares lo que induce rigidez de las mismas. Este hecho avala la hipótesis de que la acción de las fitoalexinas ocurre primordialmente a nivel de las membranas celulares (Boydston *et al.*, 1983; Weinstein *et al.*, 1983). En comparación a lo que ocurre en interacciones patogénicas, en plantas micorrizadas la acumulación de fitoalexinas es más débil y aparece en estadios más tardíos (Morandi, 1996; Harrison, 1997).

#### *Enzimas hidrolíticas*

Numerosos estudios han mostrado la inducción de isoformas específicas de quitinasas,  $\beta$ -1,3-glucanasas y quitosanasas durante la formación de las MA (Dumas-Gaudot *et al.*, 1992, 1994, 2000; Pozo *et al.*, 1996, 1998, 1999, Slezack *et al.*, 2000). El posible papel que ejercen estas enzimas durante el establecimiento y desarrollo del hongo micorrícico en el interior de las raíces ha sido discutido en diversas ocasiones (Vierheilig *et al.*, 1995; Dumas-Gaudot *et al.*, 1996; Gianinazzi-Pearson *et al.*, 1996; Lambais & Medhy, 1996). Aunque no se conoce con certeza la función de estas enzimas inducidas en plantas micorrizadas, se ha propuesto que podrían estar implicadas en el control del crecimiento fúngico en las raíces. Los genes de defensa que codifican estas enzimas hidrolíticas presentan modelos de regulación distintos y complejos (Lambais, 2000).

#### *Quitinasas*

Las quitinasas se incluyen bajo la identificación EC 3.2.1.14. La quitina, componente principal de la pared celular del hongo, es un homopolímero de residuos de N-acetil-D-glucosamina unidos por enlaces  $\beta$ -1,4, y es el sustrato sobre el que actúan las quitinasas. Las quitinasas presentan una actividad antifúngica avalada por numerosos

bioensayos en los que se han aplicado quitinasas purificadas sobre diversos hongos (Mauch *et al.*, 1988; Schlumbaum *et al.*, 1986; Arlorio *et al.*, 1992). La actividad quitinasa incrementa en plantas tras la inoculación con virus, hongos y bacterias fitopatógenas, así como tras el tratamiento con etileno y distintos elicitores (Boller *et al.*, 1993). Las quitinasas están codificadas por una familia multigénica.

Se han purificado y caracterizado un gran número de quitinasas. Suelen ser proteínas monoméricas de masa molecular entre 25 y 35 KDa. Asimismo, algunos genes de quitinasas vegetales han sido clonados y secuenciados, y en base a la secuencia deducida de aminoácidos se han podido agrupar las quitinasas en tres clases (Meins *et al.*, 1992):

- Clase I. Presentan altos puntos isoeléctricos (carácter básico) y una localización vacuolar. Cuentan con una secuencia adicional corta en el extremo C-terminal de la secuencia nucleotídica.
- Clase II. Presenta bajos puntos isoeléctricos (carácter ácido) y una localización extracelular.
- Clase III. Las secuencias nucleotídicas no presentan similitud con secuencias de quitinasas de las clases anteriores, aunque si muestran propiedades bioquímicas parecidas. Se incluyen quitinasas de carácter ácido y básico.

Algunos estudios han mostrado unos niveles de actividad total quitinasa muy superior en las raíces de plantas micorrizadas con respecto a las no colonizadas (Dumas-Gaudot *et al.*, 1992). En algunos casos se percibió un aumento en los niveles de esta enzima durante el establecimiento de la simbiosis y en estadios tempranos de la colonización, después de los cuáles decrecían hasta niveles incluso inferiores a los presentados en plantas no micorrizadas (Spanu *et al.*, 1989; Lambais & Mehdy, 1993). Se ha propuesto que las quitinasas en colaboración con las  $\beta$ -1,3-glucanasas tienen un papel regulador del desarrollo del hongo en la raíz (Lambais & Mehdy, 1995) tal como se expone a continuación.

### *$\beta$ -1,3-Glucanasas*

Las  $\beta$ -1,3-glucanasas se incluyen bajo la identificación EC 3.2.1.39. Se han encontrado en numerosos organismos como bacterias, hongos, algas, plantas superiores y algunos invertebrados. En plantas están implicadas en importantes procesos fisiológicos como la germinación de semillas, crecimiento celular, defensa frente a patógenos, floración, así como en procesos de maduración del fruto y la semilla, abscisión, senescencia y diferenciación tisular (Simmons, 1994). Se expresan en diferentes tejidos vegetales siendo regulada su expresión por hormonas (giberelinas, auxinas, etileno y ácido abscísico) (Felix & Meins, 1986), estreses bióticos (ataque de patógenos), estreses abióticos (metales pesados, ozono), etc. Esta amplia variedad de circunstancias que inducen su expresión indica la diversidad de funciones en las que están implicadas las  $\beta$ -1,3-glucanasas. Constituyen un grupo de múltiples isoformas que difieren en tamaño, punto isoeléctrico, estructura primaria, localización celular y modelo de regulación. Las  $\beta$ -1,3-glucanasas son enzimas que hidrolizan las uniones 1,3- $\beta$ -D glucosídicas de los 1,3-  $\beta$ -D glucanos, aunque a veces también son capaces de hidrolizar 1,3;1,6-  $\beta$ -glucanos. Los glucanos son polímeros de N-acetilglucosamina. Sus substratos son la laminarina y la callosa. Pueden presentar un carácter ácido o básico, secretándose al exterior celular o localizándose en la vacuola respectivamente.

Se han purificado y caracterizado  $\beta$ -1,3-glucanasas de diversos organismos (Vogelsang & Barz, 1993; Peumans *et al.*, 2000; Salazar *et al.*, 2001). Son proteínas monoméricas con una masa molecular de 25-41 kDa. La mayor información disponible la proporciona la familia multigénica de glucanasas en tabaco, ampliamente estudiadas (Linthorst *et al.*, 1990).

Las  $\beta$ -1,3-glucanasas se clasifican en tres grupos de acuerdo con su estructura primaria:

- Clase I : Isoformas vacuolares básicas que se expresan principalmente en la epidermis de las hojas más adultas y en las raíces. Cuentan con una secuencia adicional corta en el extremo C-terminal de la secuencia nucleotídica.
- Clase II: Glucanasas extracelulares ácidas (PR-2a, -2b, -2c).
- Clase III: Glucanasas inducidas por microorganismos (PR-Q) de carácter ácido o básico cuya secuencia difiere alrededor de un 43% respecto a las glucanasas básicas de la clase I y ácidas de la clase II.

*Actividad sinérgica de quitinasas y  $\beta$ -1,3-glucanasas:*

Los glucanos, junto a la quitina, son los componentes fundamentales de la paredes de la mayoría de los hongos, por lo que se ha atribuido a estas enzimas hidrolíticas un carácter antifúngico al ser capaces de degradar parcialmente las paredes celulares de ciertos hongos (Mauch *et al.*, 1988; Boller, 1993).

Quitinasas y  $\beta$ -1,3-glucanasas presentan una actividad antimicrobiana potencial. La inducción de quitinasas y glucanasas no impide la formación de micorrizas; aunque estas proteínas de defensa si pueden ejercer un efecto inhibitor sobre el crecimiento de otros tipos de hongos (Arlorio *et al.*, 1992). Su activación o acumulación es considerada un componente de la respuesta de defensa de la planta. Además las  $\beta$ -1,3-glucanasas y quitinasas pueden liberar fragmentos glicosídicos tanto del organismo patógeno como de la pared celular del hospedador, ejerciendo de esta forma una acción “señal” clave en la elicitación de otros mecanismos de defensa de la planta.

### *Quitosanases*

Las quitosanases son enzimas hidrolíticas (EC 3.2.1.99) que actúan sobre el quitosán, derivado parcial o totalmente deacetilado de la quitina (Monaghan *et al.*, 1973). Son proteínas monoméricas de carácter básico o ácido que presentan un peso molecular entre 10 y 23 KDa. Al igual que a las enzimas hidrolíticas descritas anteriormente se les ha asignado un papel en la defensa de la planta y dado que el substrato sobre el que actúan está presente en las paredes fúngicas, podrían colaborar en la degradación de la pared celular de diversos hongos (Grenier & Asselin, 1990). También son inducidas por estreses bióticos y abióticos (Sharma *et al.*, 1993). Diversos estudios, basados en la separación electroforética sobre geles de poliacrilamida, han detectado la inducción de isoformas específicas de quitosanases en extractos radicales de plantas micorrizadas con la simbiosis bien establecida (Dumas-Gaudot *et al.*, 1992; Pozo *et al.*, 1998; Dumas-Gaudot *et al.*, 2000)

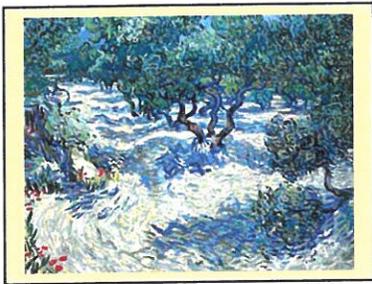
## **EL OLIVO**

### **Breve introducción histórica**

El olivo (*Olea europaea*, L.) es uno de los cultivos más importantes de toda la cuenca mediterránea. Existen dos hipótesis sobre el origen del olivo, una que postula que proviene de las costas de Siria, Líbano e Israel y otra que lo considera originario de Asia Menor. La llegada a Europa tuvo lugar probablemente de mano de los Fenicios, en tránsito por Chipre, Creta, e Islas del Mar Egeo, pasando a Grecia y más tarde a Italia. Los primeros indicios de la presencia del olivo en las costas mediterráneas españolas coinciden con el dominio romano, aunque fueron posteriormente los árabes los que impulsaron su cultivo en Andalucía, convirtiendo a España en el primer país productor de aceite de oliva a nivel mundial. En España la región olivarera por excelencia es Andalucía. El presente del olivar es excepcional debido a su gran demanda y alta rentabilidad, a lo que están contribuyendo las campañas alimentarias que resaltan las propiedades terapéuticas y nutritivas del aceite de oliva. La palabra aceite procede etimológicamente de la palabra árabe "az-zait", que quiere decir el zumo de la oliva. Efectivamente, se extrae de los frutos del olivo y ha servido

durante siglos como alimento, materia prima para alumbrado, ungüento medicinal y líquido revitalizador del organismo humano.

El olivo es un árbol que se asocia a la paz en muchas culturas. Los cristianos utilizan sus ramas, bendecidas en la festividad llamada del Domingo de Ramos (una conmemoración de cuando Jesús entró de adulto en Jerusalén), para colgarlas de sus balcones y ventanas como signos de protección. Los judíos conmemoran durante el Hannukah la multiplicación milagrosa del aceite de oliva para las lámparas del templo. Se dice que, después del diluvio, cuando Noé soltó una paloma para ver si encontraba tierra, ésta regresó al arca llevando en el pico una rama de olivo. Esa imagen es todavía signo internacional de la paz.



Olivar (V. Van Gogh)  
The Nelson-Atkins Museum of Fine Art

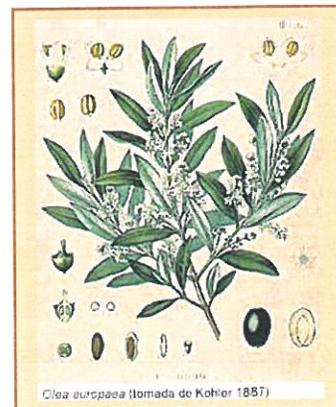
El olivo ha sido fuente de inspiración en la pintura, escultura y poesía, buena muestra de ello son algunas de las obras de el Greco, Salcillo, Goya, Van Gogh, Lope de Vega, Antonio Machado, Lope de Rueda o Miguel Hernández.

### Situación taxonómica y características generales

*Familia:* Oleaceae.

*Nombre científico:* *Olea europaea*.

*Planta:* Árbol perennifolio, de gran longevidad, que llega a vivir más de mil años. Es un árbol no muy elevado, de unos 4 a 8 metros de altura según la variedad. Puede permanecer vivo y productivo durante cientos de años. El tronco es grueso y retorcido y la corteza de color gris a verde grisáceo.



*Sistema radical:* Raíz pivotante poco ramificada.

*Hojas:* Lanceoladas y coriáceas. El limbo tiene una longitud entre 3 y 9 centímetros y una anchura entre 1-1,8 cm. El nervio central está muy marcado y los secundarios muy poco. El peciolo es muy corto, llegando apenas a medio centímetro de longitud y apareciendo dos hojas opuestas en cada nudo. Por el haz son de color verde oscuro y brillantes. Por el envés, tienen color blanco plateado.

*Flores:* Las inflorescencias se desarrollan en las axilas foliares de los nudos del crecimiento vegetativo del año previo a la floración. Cada inflorescencia puede tener entre 10 y 40 flores según la forma de cultivo, condiciones fisiológicas y ambientales. En las inflorescencias se presentan dos tipos de flores: perfectas y estamíníferas. Son pequeñas con simetría regular. El olivo florece en mayo o junio.

*Fruto:* Drupa de color oscuro al madurar y alto contenido energético. La aceituna, fruto del olivo, es de tamaño pequeño y forma elipsoidal a globosa según las variedades. Se trata de un fruto con una sola semilla, compuesto por tres tejidos principales: endocarpio, mesocarpio y exocarpio.

*Polinización:* Especie anemófila y parcialmente autocompatible. Es recomendable la polinización cruzada aunque las plantaciones monovarietales son la norma.

Vive en todo tipo de suelos tolerando muy bien el calor y siendo sensible al frío, especialmente a las heladas. No soporta temperaturas menores de  $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ . En las Sierras de Andalucía puede subir hasta los 1500 m de altitud. La madera es muy dura y compacta. Especie muy rústica, de fácil cultivo, por lo que se ha instalado en terrenos marginales. Es muy resistente a la sequía, aunque su óptimo de precipitaciones se sitúa entorno a los 650 mm<sup>3</sup> bien repartidos. En casos de extrema sequía se induce la producción de flores masculinas. Es muy tolerante a la salinidad. Se trata de una planta ávida de luz, de forma que una deficiencia de ésta reduce la formación de flores o induce que éstas no sean viables, debido a la insuficiencia de asimilados en la axila de las hojas.

## Propagación

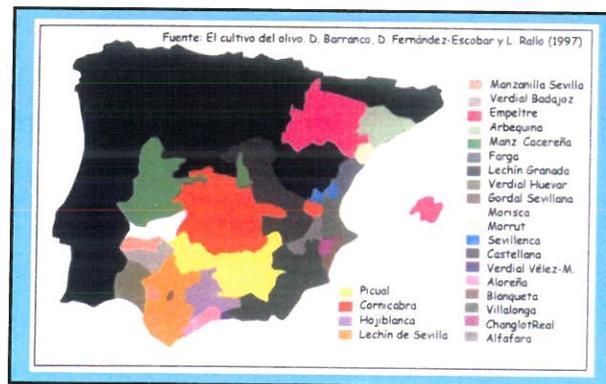
Tradicionalmente la propagación se realizaba mediante grandes estacas (0.5-1.2 m) directamente implantadas en el terreno. Este sistema presenta una serie de inconvenientes: el gran tamaño de las estacas, con la consiguiente dificultad para transportarlas y su escasez. A partir de los años 50, comienza a utilizarse el estaquillado semileñoso, que soluciona los problemas anteriores: se utilizan estaquillas de un año, fáciles de manejar, en mejor estado sanitario que las grandes y que pueden ser recolectadas a lo largo de todo el año. Las estaquillas, de 12-15 cm de longitud y con dos pares de hojas, se sumergen en una solución de ácido indolbutílico (IBA) a 3000 ppm, con objeto de favorecer el enraizamiento. Posteriormente se colocan en cámaras de nebulización sobre medio inerte (perlita) y con calor de fondo (25°C). Entorno a los 45 días (según variedad y condiciones ambientales), aparecen los primordios radicales, momento a partir del cual las estaquillas se pueden transplantar a macetas y trasladar a un umbráculo que permita la adaptación de la planta a condiciones más normales de cultivo. Este sistema permite la entrada en producción de la planta un año antes y facilita la formación del árbol (Enciclopedia del olivo, 1996).

Actualmente se están utilizando también técnicas de micropropagación que permiten la producción rápida y masiva de plántulas. Sin embargo, en determinadas especies vegetales las condiciones que exigen las técnicas de micropropagación (esterilidad, heterotrofia, etc...), dejan a la plántula muy expuesta ante cualquier tipo de estrés ambiental, dificultándose por tanto su adaptación a condiciones más normales de cultivo. La inoculación previa con hongos formadores de micorrizas se ha planteado como una posible estrategia para tratar de mejorar su supervivencia y desarrollo durante las etapas post-vitro. Se abre pues una línea de investigación muy interesante para poder dilucidar los efectos beneficiosos de la formación de micorrizas en plantas micropropagadas de olivo. La mejora de la calidad de las microplantas micorrizadas y la posible incorporación de estas tecnologías limpias a la producción viverística concuerdan con los criterios de agricultura sostenible definidos anteriormente.

## Variedades comerciales

Existen numerosas variedades locales muy antiguas. Las variedades que se cultivan en nuestro país se muestran en la Figura 3.

**Figura 3.** Variedades de olivo cultivadas en España.



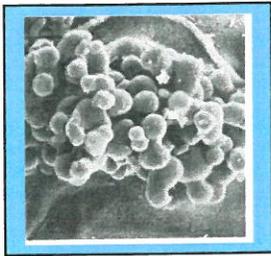
Pueden clasificarse en dos grupos fundamentales: variedades de mesa y variedades para la obtención de aceite. Entre las principales variedades de mesa destacan: Manzanilla de Sevilla y Gordal Sevillana. Las variedades de aceite más empleadas son: Picual, Arbequina, Hojiblanca, Cornicabra o cornezuelo, etc... Las distintas variedades de olivo no solo se diferencian en la calidad y características organolépticas de sus aceites, sino también en aspectos fisiológicos como el tiempo de maduración, recolección, sensibilidad-resistencia a determinados patógenos, etc... (Barranco & Rallo, 1984).

## Plagas y enfermedades

El olivo es susceptible a numerosas plagas y enfermedades. Entre las plagas que afectan al olivo las más habituales son: Arañuela del olivo (*Liothrips oleae*), Polilla del olivo (*Prays oleae*), Mosca del olivo (*Dacus oleae*), Escarabajo picudo (*Coenorhinus cribripennis*), Barrenillo del olivo (*Phloeotribus scarabaeoides*) y la Cochinilla del tizne (*Saissetia oleae*). Entre las enfermedades encontramos: Repilo (*Cycloconium oleaginum*),

Caries de la madera (*Fomes spp.*, *Polyporus spp.*, *Stereum hirsutum*), Micosis de la aceituna (*Sphaeropsis dalmatica*), Lepra de las aceitunas (*Gleosporium olivarum*), Cescorporiosis del olivo (*Cescorpora cladosporioides*), Fumagina (*Alternaria tenuis*, *Capnodium olaeophilum*, *Cladosporium herbarum*, etc.) y la Verticilosis del olivo (*Verticillium dahliae*, K).

### Verticilosis del olivo (*Verticillium dahliae*, K)



Microesclerocios de *Verticillium dahliae*

*Verticillium dahliae* sobrevive en el suelo mediante estructuras de resistencia especializadas denominadas microesclerocios, y sus poblaciones se componen tanto de patotipos muy virulentos que defolian y matan la planta, como menos virulentos que causan una marchitez progresiva, pero no letal. Está presente en suelos cultivados de todo el mundo.

Ataca a un amplio rango de especies vegetales que incluyen plantas anuales, herbáceas, arbustos y árboles. *V. dahliae* es un fitopatógeno vascular que invade en primer lugar el xilema y posteriormente se extiende desde las raíces hacia los peciolo. Ha sido el responsable directo, a lo largo de la historia, de pérdidas importantes de cosechas (Isaac, 1957). La rotación de cultivos o la plantación de variedades no susceptibles podría ayudar a reducir los niveles de inóculo. Los fungicidas no son efectivos frente a *Verticillium*.

El uso de cultivos resistentes o tolerantes es, por ahora, el camino más prometedor para poder atajar la verticilosis. Las nuevas técnicas biotecnológicas permiten aislar genes de defensa y transferirlos a las plantas de manera que se expresen constitutivamente. También cabe la posibilidad de transformar una especie vegetal con varios genes implicados en la resistencia frente a enfermedades diferentes (Dumas-Gaudot *et al.*, 1996). Estas tecnologías permiten por lo tanto abordar nuevas estrategias que faciliten el control de patógenos de acuerdo a los principios que rigen la Agricultura Sostenible.

### **Micotrofia del olivo**

Estudios previos han mostrado el carácter micotrófico de las plantas de olivo (Roldán-Fajardo & Barea, 1986). Sin embargo, esta característica no ha sido determinada en variedades de olivo con un interés comercial y agronómico y ésta puede variar substancialmente entre unas plantas y otras.

### **Micorrizas en plantas micropropagadas de olivo**

Como ya se ha indicado anteriormente, la micropropagación es una herramienta excelente para producir plantas homogéneas y de gran calidad. Esta técnica alcanza su nivel de aplicación mas alto en fruticultura, horticultura y, especialmente, en la producción de plantas ornamentales (Vestberg *et al.*, 2002). Dado que todo el proceso de multiplicación in vitro exige condiciones de esterilidad, las plantas deben inocularse con los microorganismos apropiados para proporcionarles una rizosfera optimizada, en el momento oportuno (Barea, 2000). Concretamente, se ha demostrado el elevado potencial de la micorrización dirigida durante la producción de planta micropropagada para mejorar su calidad desde todos los puntos de vista, particularmente el sanitario (Vestberg *et al.*, 2002). La micorrización de plántulas micropropagadas ofrece, además, una oportunidad para investigar los procesos fisiológicos, bioquímicos y moleculares que operan en plantas micorrizadas, en unas condiciones más controladas y reproducibles de desarrollo. Aunque la efectividad de la micorrización en la producción de plántulas micropropagadas ha sido estudiada previamente (Azcón-Aguilar *et al.*, 1994; Varma & Schuepp, 1995; Vestberg *et al.*, 2000; Declerck *et al.*, 2002; Jaizme-Vega *et al.*, 2002), no se dispone de información con respecto a plantas de olivo.

### **Control biológico de enfermedades**

Uno de los efectos beneficiosos de las micorrizas sobre la planta hospedadora descritos anteriormente es el de aumentar la tolerancia a estreses de naturaleza biótica. Sin embargo, es necesario estudiar cada caso de forma individualizada ya que como se indicó en el apartado correspondiente, factores como la planta hospedadora, el aislado micorrícico, el organismo patógeno, el sustrato de crecimiento, así como las condiciones medioambientales son cruciales para determinar el resultado de la simbiosis micorrícica en la interacción planta-patógeno (Azcón-Aguilar *et al.*, 2002).

De acuerdo con los Objetivos de la presente investigación, y con la información que antecede, se propone el siguiente Plan de Trabajo:

# Plan de Trabajo



## II. Plan de Trabajo

1. Aislar hongos micorrícicos de la rizosfera de plantas de olivo.
2. Caracterizar los hongos aislados por técnicas clásicas y de Biología Molecular.
3. Determinar el grado de micotrofia de las variedades de olivo, de interés seleccionadas.
4. Estudiar la eficacia sobre el desarrollo y la nutrición de la planta de los hongos micorrícicos aislados de la rizosfera de plantas de olivo, en comparación con hongos de colección catalogados como efectivos.
5. Estudiar la inducción de enzimas hidrolíticos implicados en defensa por parte de los hongos micorrícicos.
6. Estudiar la expresión diferencial de genes implicados en la respuesta de defensa en plantas micorrizadas.
7. Estudiar la capacidad de las micorrizas para proteger plantas de olivo frente a *Verticillium dahliae*.



## *Material y Métodos*



## 1. Material Biológico

### 1.1. Material Vegetal

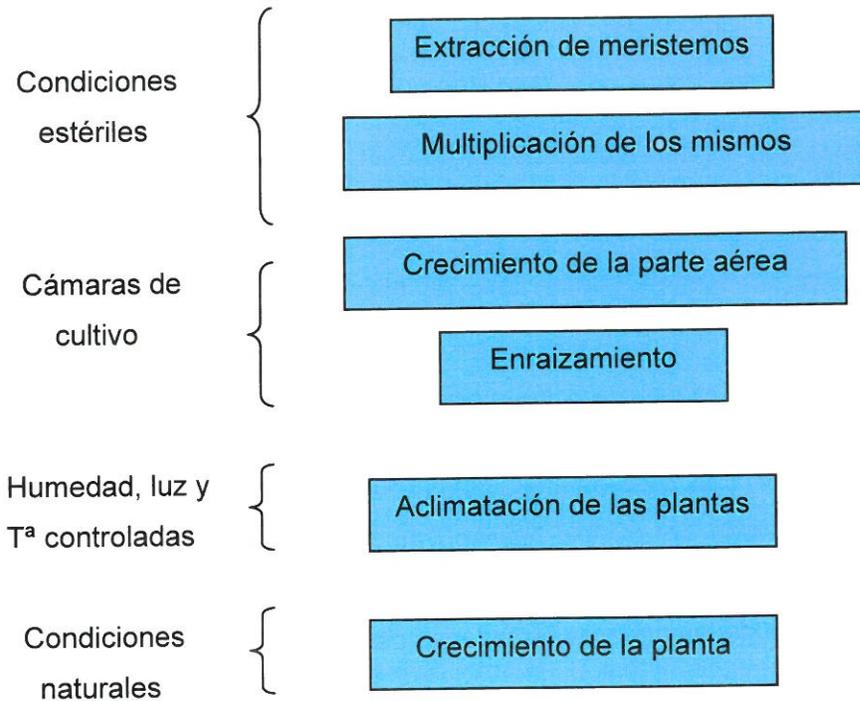
Se utilizaron tres variedades comerciales de olivo (*Olea europaea*, L.): **Arbequina**, **Leccino** y **Picual**.

*Arbequina*, es la variedad más importante de Cataluña, se cultiva en unas 55.000 ha, principalmente en las provincias de Lleida (65 %), Tarragona (32 %) y Barcelona (3 %). Se cree que su nombre proviene del pueblo leridano de Arbeca, que fue donde se inició su cultivo hacia el siglo XVI. Se la conoce también con los nombres de "Arbequí" o "Arbequín". Está reconocida como una de las mejores variedades para la obtención de aceite.

*Leccino* es una variedad de origen italiano caracterizada por ser bastante susceptible a temperaturas bajas, así como por el carácter afrutado que presenta su aceite.

*Picual* recibe esta denominación por el ápice apuntado de sus frutos, es la principal variedad en Andalucía por la importancia de la superficie plantada, estimándose que uno de cada dos olivos en esta Comunidad Autónoma es de esta variedad. Se cultiva fundamentalmente en las provincias de Jaén y Córdoba. Produce un aceite de elevada calidad.

Las plantas utilizadas se obtuvieron por micropropagación de las variedades mencionadas y fueron suministradas por COTEVISA, empresa viverística ubicada en L'Alcudia (Valencia). Los distintos experimentos se iniciaron con plantas ya enraizadas, tras superar la fase de enraizamiento en el túnel de humedad. Las distintas fases llevadas a cabo para la obtención de plantas micropropagadas se resume en la Figura 4.



**Figura 4.** Fases de obtención de plantas micropropagadas

## 1.2. Hongos Micorrícicos

Los hongos formadores de micorrizas se aislaron a partir de suelo rizosférico de olivos crecidos en condiciones naturales de la provincia de Jaén. Para aumentar la población nativa de los hongos micorrícicos, se prepararon cultivos trampa, utilizando *Sorghum bicolor* (L.) Moench y *Allium porrum* (L.) como plantas hospedadoras. Se partió de semillas de estas plantas que se esterilizaron en superficie (10 minutos en una solución comercial de hipoclorito sódico al 10% en agua (v/v), seguido de 3 lavados con agua destilada estéril), pregerminaron y transplantaron a macetas que contenían directamente el suelo rizosférico a enriquecer en propágulos micorrícicos. Las plantas crecieron en condiciones de invernadero (temperatura 19-25 °C, fotoperiodo de 16/8h luz/oscuridad y humedad relativa de 70-90%.) durante 4 meses. Para el aislamiento de los distintos hongos micorrícicos, y la producción

de inóculo puro se siguieron los protocolos 1, 2 y 3 que se detallan en el apartado de métodos de laboratorio.

## **2. Experimentos de Invernadero**

### **2.1. Generalidades**

El substrato utilizado en todos los experimentos fue una mezcla esterilizada de suelo: arena : vermiculita (1:1:1, v:v). El suelo fue tamizado (0,4 cm) y pasteurizado durante 1 hora en un autoclave a vapor fluente, durante 3 días consecutivos. De esta forma el suelo queda libre de propágulos de micorrizas. La arena y la vermiculita se esterilizaron en el autoclave a 120 °C durante 20 minutos. A este substrato se adicionó 1g/l de fertilizante de liberación lenta (osmocote ®).

El suelo utilizado procedía de la finca experimental de la Estación Experimental del Zaidín (CSIC-Granada). Se trata de un suelo que presenta las siguientes características: pH, 7,9; 2.1% de materia orgánica; 1,3g/l de N; 9mg/l de P; 82 mg/l de K; 38% de arena; 43% de limo y 19% de arcilla.

En todos los experimentos las plantas se regaron 3 veces en semana, una de ellas con solución nutritiva (protocolo 5 de los métodos de laboratorio). Las plantas crecieron en invernadero con temperaturas entre 19-25 °C, fotoperiodo de 16/8 h luz/oscuridad y humedad relativa de 70-90%.

En su caso, el hongo formador de micorrizas correspondiente, se aplicó al suelo en el momento del transplante. El número de propágulos infectivos presentes en el inóculo había sido previamente determinado mediante el método del Número Más Probable (NMP) (protocolo 4) . El inóculo de estos hongos consistía en una mezcla de sustrato que contenía propágulos del hongo (esporas y micelio externo), así como fragmentos de raíces micorrizadas.

## 2.2. Experimento # 1

---

**Objetivo:** Determinar la dosis óptima de inóculo micorrícico para mejorar el crecimiento de la planta objeto de estudio.

---

Se utilizaron plántulas micropropagadas de las variedades Arbequina y Leccino que fueron inoculadas con el hongo micorrícico *Glomus intraradices* procedente de la colección de la Estación Experimental del Zaidín (EEZ-1), mezclado con el sustrato de crecimiento en una proporción del 1, 5 y 10 % (v:v) equivalente a un aporte aproximado de 75, 375 y 750 propágulos micorrícicos. Se prepararon 14 repeticiones de cada variable experimental.

La mitad de las plantas se cosechó tras 13 semanas de crecimiento, y la otra mitad se mantuvo hasta 19 semanas. Se determinaron las siguientes variables de respuesta:

- |                                 |                               |
|---------------------------------|-------------------------------|
| * Altura de la parte aérea      | * Peso fresco de la raíz      |
| * Peso fresco de la parte aérea | * Peso seco de la parte aérea |
| * Colonización micorrícica      | * Eficiencia micorrícica      |

## 2.3 Experimento # 2

---

**Objetivos:** Determinar la efectividad de hongos micorrícicos aislados de la rizosfera de olivos adultos en cuanto a la promoción del crecimiento de las plantas.

---

Se utilizaron plántulas micropropagadas de las variedades de olivo Arbequina y Leccino. Los hongos formadores de micorrizas ensayados fueron aislados de la rizosfera de olivos de la provincia de Jaén. De acuerdo con los resultados obtenidos previamente la densidad de inóculo utilizada fue del 5% (1:1, v:v). Asimismo se probaron 2 hongos procedentes de la colección de hongos micorrícicos de la Estación Experimental del Zaidín:

*Glomus mosseae* (BEG 119) y *Glomus intraradices* (EEZ-1). Se prepararon 7 repeticiones de cada tratamiento.

Tras 19 semanas de crecimiento se sacrificaron las plantas y se determinaron las siguientes variables de respuesta:

- \* Altura de la parte aérea
- \* Peso fresco de la parte aérea
- \* Colonización micorrícica
- \* Peso fresco de la raíz
- \* Peso seco de la parte aérea
- \* Eficiencia micorrícica

## 2.4 Experimento # 3

---

**Objetivos:** Estudiar la inducción de proteínas con actividad hidrolítica por parte de los hongos formadores de micorrizas

---

Se utilizaron plántulas micropropagadas de las variedad de olivo Picual. Se utilizaron los dos hongos formadores de micorrizas que mostraron una mayor eficiencia micorrícica con respecto al crecimiento de la planta en los estudios anteriores, así como el hongo micorrícico de colección *Glomus mosseae* (BEG 119). Además del control adicionado con 1g/l de fertilizante (al igual que los tratamientos inoculados con los hongos micorrícicos), denominado Control-1, se incluyó un Control-2 adicionado de 2g/l de fertilizante, tratando de equiparar el efecto de los hongos micorrícicos.

Las plantas se cosecharon a las 11, 19 y 24 semanas de crecimiento. Se analizaron las siguientes variables de respuesta:

- \* Altura de la parte aérea
- \* Peso fresco de la parte aérea
- \* Colonización micorrícica
- \* Peso fresco de la raíz
- \* Peso seco de la parte aérea
- \* Contenido en N y P de la parte aérea

Asimismo se tomó una alícuota de la raíz a la que se extrajo el contenido total de proteínas solubles (protocolo 15) para detectar actividades enzimáticas hidrolíticas (quitinasas y glucanasas) mediante separación en geles de poliacrilamida (protocolos 18 y 19). La alícuota de raíz se congeló a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

## 2.5. Experimento # 4

---

**Objetivo:** Estudiar los posibles cambios en la expresión de genes que codifican enzimas hidrolíticas inducidos por la colonización micorrícica.

---

Se utilizaron plántulas micropropagadas de la variedad Picual. Se estudiaron los mismos hongos formadores de micorrizas que en el apartado anterior. La cosecha se realizó 19 semanas tras la inoculación. Además de las determinaciones habitualmente realizadas se tomaron alícuotas de raíces y se congelaron a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  con el fin de utilizarlas para aplicar las técnicas de biología molecular que se describen en el apartado siguiente de métodos de laboratorio. Se incluyeron tres controles distintos, C-1, C-2 y C-3, adicionados con 1, 2 y 3 g/l de fertilizante de liberación lenta. Se pretendía así abordar los estudios bioquímicos y moleculares sobre plantas control y micorrizadas lo más parecidas posible y minimizar así los efectos nutricionales de la simbiosis.

## 2.6. Experimento # 5

---

**Objetivo:** Estudiar la interacción de plantas de olivo de la variedad Picual-micorrizas arbusculares y el hongo patógeno *Verticillium dahliae*. Estudio de los cambios inducidos en el contenido de enzimas hidrolíticas y en la expresión de genes que codifican estas enzimas en raíces.

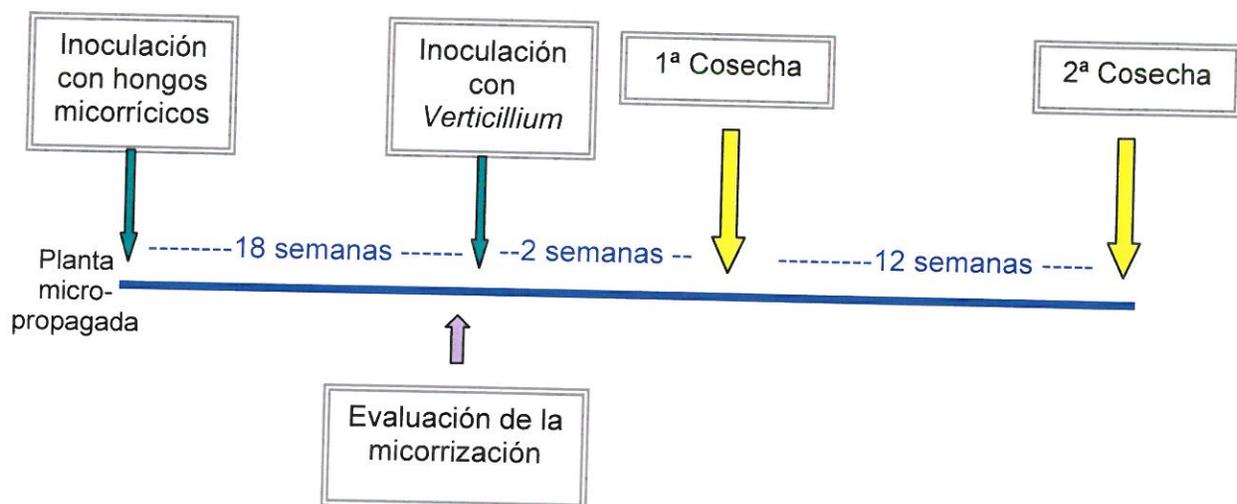
---

Este experimento se llevó a cabo en colaboración con el departamento de Protección Vegetal del Instituto de Agricultura Sostenible (CSIC) en Córdoba.

Se utilizaron plántulas micropropagadas de la variedad Picual y se estudiaron los mismos hongos formadores de micorrizas que en el experimento # 3. Tras 18 semanas de crecimiento, y una vez probado el establecimiento de la simbiosis micorrícica, las raíces de las plántulas se sumergieron en una suspensión de microesclerocios del fitopatógeno *Verticillium dahliae*. Se utilizaron un patotipo defoliante (V4) y otro no defoliante (V138).

Un lote de plántulas se cosechó a las 2 semanas después de la inoculación con el fitopatógeno. Una vez determinados los datos de crecimiento, se tomaron alícuotas de raíz para poder realizar estudios de naturaleza bioquímica y molecular. Estas muestras se almacenaron a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su uso. El resto de las plantas se cosechó a las 32 semanas de crecimiento.

El esquema seguido en este experimento se resume en el siguiente diagrama de tiempos:



### 3. Métodos de Laboratorio

---

#### Protocolo 1. Extracción de esporas de hongos micorrícicos del suelo

---

Se emplea una modificación de la técnica del tamizado húmedo y decantación (Walter *et al.*, 1982).

- **Procedimiento:**

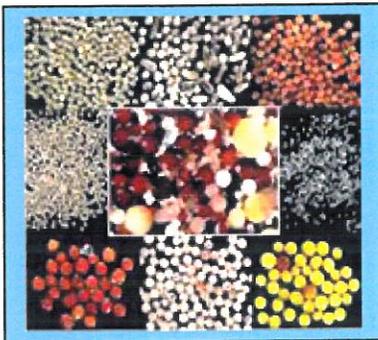
Se homogeneizaron 100 g de suelo con 100 ml de agua destilada y tras una centrifugación a 2000 rpm durante 3 minutos se eliminó el sobrenadante. De nuevo se homogeneizó con una solución de sacarosa al 50% y se centrifugó en las mismas condiciones anteriores. Esta vez el sobrenadante se filtró a través de tamices con una luz de malla de 80 y 50  $\mu\text{m}$  y el tamizado se recogió con agua. Las muestras se visualizaron con la ayuda de un estereoscopio y las esporas obtenidas se agruparon de acuerdo a características morfológicas.

---

#### Protocolo 2. Identificación morfológica de esporas de hongos MA (Koske & Tessier, 1983; Morton, 1991)

---

- **Procedimiento:**



Las esporas se separaron en función de su morfología, color, tamaño y organización subcelular. Para su observación al microscopio óptico y posterior conservación las esporas se dispusieron en portaobjetos inmersas en dos medios distintos: alcohol polivinílico-ácido láctico glicerol (PVLG) y Meltzer-PVLG en proporción 1:1 (v:v).

- **Reactivos:**

**PVLG**

Alcohol de polivinilo (APV)	1,66 g
Ácido láctico	10 ml
Glicerina	1 ml
Agua destilada	10 ml

**Reactivo de Meltzer**

Ioduro potásico	1,5 g
Yodo	0,5 g
Hidrato de Cloral	100 g
Agua destilada	22 ml

- **Notas:**

La observación al microscopio óptico permite determinar el número de capas que presentan las paredes de las esporas, las características de las mismas (color, reacción en presencia del reactivo de Meltzer, etc ...), morfología de la hifa de sustentación, presencia o ausencia de sáculo esporogénico, cicatrices, etc... características todas ellas importantes para la identificación de los hongos MA.

---

### Protocolo 3. Producción de inóculos puros de hongos micorrícicos

---

- **Procedimiento:**

Se utilizaron *Sorghum bicolor* y *Allium porrum* como plantas hospedadoras. Las semillas se esterilizaron, pregerminaron y plantaron tal y como se ha descrito en el apartado 1.2. Como sustrato de crecimiento se empleó una mezcla suelo:arena:vermiculita (1:1:1, v:v) estéril. Las plántulas se inocularon con las esporas de cada uno de los morfotipos aislados y se dejaron crecer bajo condiciones de invernadero durante 4 meses. Tras este tiempo se aislaron esporas de suelo rizosférico (protocolo 1) y en el caso de encontrar tipos diferentes

de las mismas se volvió a repetir el proceso hasta obtener un solo tipo de esporas y por tanto un inóculo puro.

---

#### Protocolo 4. Estimación del potencial micorrícico del suelo

---

Se emplea el Método del Número Más Probable (NMP) (Sieverding, 1991). El NMP es una estrategia eficiente de estimación de densidades poblacionales de microfauna, especialmente cuando una evaluación cuantitativa de células individuales no es factible. La técnica se basa en la determinación de presencia o ausencia en réplicas de diluciones consecutivas de atributos particulares de los microorganismos presentes en muestras de suelo u otros ambientes. El atributo particular a utilizar en nuestro caso, será la capacidad de los hongos micorrícicos de colonizar las raíces de las plantas. Sólo determina organismos vivos e infectivos.

- **Procedimiento:**

Se realizaron diluciones seriadas del suelo ó inóculo a estudiar. Éste se mezcló con un substrato estéril constituido por suelo: arena: vermiculita (1:1:1; v:v) y se utilizó sorgo como planta hospedadora. Al cabo de 4 semanas las raíces del sorgo se tiñeron (protocolo 6) y se determinó si estaban o no micorrizadas.

*Cálculo del Número Más Probable:*

$$\text{Log } \Omega = x \text{ Log } a - K$$

**Ω:** número de propágulos infectivos      **x:** número medio de plantas colonizadas  
**a:** factor de dilución      **y:**  $y = s - x$   
**s:** número de niveles de dilución      **K:** constante presente en la tabla VIII de Fisher & Yates (1970) a partir de los valores determinados de x o de y.

- **Notas:**

Se prepararon 5 repeticiones por cada dilución de suelo o inóculo.

---

#### Protocolo 5. **Aporte nutritivo a las plantas. Solución nutritiva**

---

En todos los experimentos realizados las plantas se fertilizaron una vez a la semana con una solución nutritiva modificada a partir de Hewitt (1966).

Compuesto	Concentración ( $\mu\text{M}$ )	Solución madre (g/l)	Para 1l (ml)
$\text{KNO}_3$	$3 \times 10^3$	30,3	10
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	$9 \times 10^3$	101,54	20
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	300	18,4	2,5
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	150	18,4	20
EDTA Fe	67	2,45	10
$\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	13	1,35	1
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1	2,4	0,1
$\text{ZnSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1	4,22	0,1
$\text{H}_3\text{BO}_3$	30	18,6	0,1
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,15	0,35	0,1

---

#### Protocolo 6. **Determinación de la micorrización**

---

Se empleó la tinción basada en el uso de azul tripán (Phillips & Hayman (1970)). El colorante azul-tripán tiñe las estructuras que contienen quitina, principal componente de las paredes celulares de algunos hongos, entre ellos los formadores de micorrizas arbusculares (Bartnicki-García, 1968). Se observan así los componentes del hongo en el interior de la raíz, sin que ésta se coloree.

• **Procedimiento:**

1. Las raíces se trocearon y se sumergieron en una solución de KOH al 10 % (p/v) y se mantuvieron durante 30 minutos al *baño maría*.
2. Posteriormente se eliminó el KOH y las raíces se lavaron con agua.
3. Las raíces se sumergieron en una solución de peróxido de hidrógeno al 10 % (v/v) hasta que las raíces estuvieron claras; aproximadamente unos 5 minutos.
4. Tras eliminar la solución anterior, se añadió una solución de HCl 0,1 N durante 5 minutos.
5. Las raíces se bañaron posteriormente en una solución de azul-tripán durante 30 minutos al *baño maría*.
6. Por último se eliminó el exceso de colorante y las raíces se conservaron en ácido láctico hasta su posterior observación al microscopio óptico.

• **Reactivos:**

**Solución de azul-tripán:** se prepara en ácido láctico al 0,05 % (p/v).

• **Notas:**

La solución de peróxido de hidrógeno se prepara justo antes de su uso.

---

Protocolo 7. **Estimación de la colonización micorrícica**

---

• **Procedimiento:**

1. Una vez teñidas (protocolo 6) las raíces se seccionaron en fragmentos de aproximadamente 1 cm. Estos fragmentos se montaron en portaobjetos, se bañaron en ácido láctico y se cubrieron con cubreobjetos.

2. La cuantificación de la colonización micorrícica, se lleva a cabo con la ayuda de un microscopio óptico. Para ello se asignaron a cada trozo de raíz dos valores. El primero de ellos corresponde a la longitud de fragmento que está colonizada, y el segundo a la intensidad de dicha colonización. Estos números toman el valor 0 cuando no hay colonización y 10 cuando ésta es máxima. La multiplicación de estos dos valores nos da el porcentaje de micorrización presente en cada fragmento de raíz, y la media de todos ellos nos da una estimación de la micorrización de la planta. De cada plántula de olivo se examinaron un mínimo de 50 fragmentos de raíz, elegidos al azar.

---

#### Protocolo 8. **Análisis de nutrición**

---

Las hojas de las plántulas se molieron hasta textura polvo y se enviaron al Servicio de Análisis en Serie de la Estación Experimental del Zaidín donde se determinó su contenido en N y P mediante el método de Nelson (Mingorance, 2002).

---

#### Protocolo 9. **Análisis estadístico**

---

Todos los datos numéricos se sometieron a un Análisis de la Varianza mediante el programa estadístico SuperAnova con un nivel de significancia de  $P < 0,05$ . Todos los datos expresados como porcentaje se transformaron en el arcoseno de su raíz cuadrada antes de someterlos al SuperAnova. En aquellos casos en los que se detectaban diferencias significativas como consecuencia de los tratamientos aplicados, se determinaron éstas entre los distintos tratamientos mediante el test de la mínima diferencia significativa de Fisher.

---

## Protocolo 10. Caracterización molecular de los hongos micorrícicos

---

Se llevó a cabo en base al análisis filogenético de la subunidad pequeña (18S) del ADN ribosómico (Schüßler *et al.*, 2001; Schwarzott *et al.*, 2001).

• **Procedimiento:**

Se utilizaron aproximadamente 100 g de inóculo de cada uno de los hongos micorrícicos aislados de la rizosfera de olivos adultos crecidos en condiciones naturales. Mediante el protocolo 1 se recogieron esporas de los distintos endofitos.

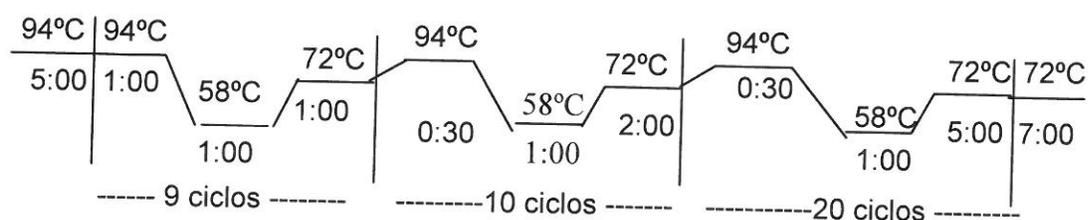
1. 100 esporas de cada hongo se suspendieron en 40  $\mu$ l de agua destilada estéril y se colocaron en un tubo de microcentrífuga,
2. Se trituraron con la ayuda de un pistilo estéril.
3. Se añadieron 10  $\mu$ l de resina Chelex (Biorad) y tras una agitación vigorosa se colocaron durante 5 minutos a 95° C seguidos de 5 minutos en hielo.
4. Se centrifugó a 12.000 rpm durante 2 minutos.
5. El sobrenadante se tomó como molde para iniciar la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) (protocolo 26). \*<sup>1</sup>

Tras haber extraído el ADN total de las esporas se utilizaron los cebadores NS31 y AM1, cebador universal y específico de los hongos micorrícicos respectivamente, para amplificar la zona 18S de ADN ribosómico. Las secuencias de los cebadores usados son las siguientes:

NS31 "TTGGAGGGCAAGTCTGGTGCC"

AM1 "GTTTCCCGTAAAGGCGCCGAA"

La mezcla de reacción contenía 23  $\mu\text{l}$  del extracto de ADN, 1  $\mu\text{l}$  de cada cebador (25  $\mu\text{M}$ ) y una bola que contenía todos los elementos necesarios para realizar la PCR en un volumen final de 25  $\mu\text{l}$  (Amersham  $\text{\textcircled{R}}$ ). El programa de PCR utilizado se detalla a continuación:



Una vez terminada la PCR se adicionó tampón de carga a la muestra (1:5, v:v) y se procedió a la separación mediante electroforesis a 100 voltios constantes en un gel de agarosa al 1,6% (p/v) en tampón TBE. El gel se tiñó en una solución de bromuro de etidio y se visualizó con luz UV. Las bandas del tamaño esperado, de unas 550 pares de bases, se cortaron con un bisturí y se eluyeron con un kit comercial (protocolo 27). Las muestras se concentraron y se secuenciaron.

- **Reactivos:**

**Resina Chelex:** Se disuelve al 20 % (p/v) en agua destilada estéril

**Tampón de carga (5x):** 0,25 % (p/v) Azul de bromofenol y 40% (p/v) sacarosa

**TBE (5x) :** 54 g Tris, 20 ml 0,5M EDTA pH= 8,0 y 27,5 g Ácido Bórico para 1 l H<sub>2</sub>O destilada.

- **Notas:**

\*<sup>1</sup> Hay que tener cuidado de no llevarse al pipetear restos de resina que podrían inhibir posteriormente la PCR

---

### Protocolo 11. **Análisis de las secuencias nucleotídicas**

---

Las secuencias de nucleótidos obtenidas se contrastaron con las presentes en la base de datos del NCBI (Centro Nacional para la Información Biotecnológica) para poder ver con la secuencia nucleotídica de que organismos presentaba mayor grado de homología y se realizó el alineamiento múltiple de las mismas. Cada una de las secuencias obtenidas se introdujo en la base de datos del EBI (Instituto Europeo de Bioinformática) proporcionándonos para cada una de las secuencias una clave de acceso.

Con el fin de poder calcular el porcentaje de similitud e identidad en cada caso se utilizó el programa *bestfit* del GCG, por ser éste mucho más preciso que el programa “blast 2 sequences” ofertado en el NCBI.

---

### Protocolo 12. **Estudio filogenético**

---

A partir de los datos obtenidos de la secuenciación de los productos de PCR, se realizaron los distintos análisis filogenéticos de las distintas especies utilizando el programa de alineamiento múltiple de secuencias CLUSTALW (version 1.5). Con la ayuda del programa PHYLIP se calculó el porcentaje de sustitución nucleotídica entre las secuencias, usando la distancia 2-parámetro de kimura (Kimura, 1980).

En el análisis filogenético de las secuencias de esta región se ha utilizado el método de distancia (Saitou & Nei, 1987), con el programa PHYLIP. Con el método de las distancias se realizó un *bootstrap* con 1000 réplicas, seguido de un análisis de *neighbor-joining* (Saitou & Nei, 1987) (opción NEIGHBOR).

El árbol filogenético obtenido mediante el método de distancias se visualizó con la ayuda del programa Tree View (Win 32 v1.50).

---

**Protocolo 13. Fijación de muestras de raíces para su observación al microscopio**

---

• **Procedimiento:**

Las raíces se cortaron en fragmentos de unos 5 mm de longitud, y se procesaron de la siguiente manera utilizando tubos Falcon.

1. Las muestras se sumergieron durante una noche a 4°C en glutaraldehído al 2,5% en tampón cacodilato 0,1 M, pH 7,2.
2. Se efectuaron dos lavados con tampón cacodilato de 10 minutos a temperatura ambiente.
3. Se efectuó otro lavado con OsO<sub>4</sub> 1% (p/v) en tampón cacodilato de 2 horas a temperatura ambiente.
4. Finalmente se realizaron dos lavados en tampón cacodilato de 10 minutos a temperatura ambiente.

• **Reactivos:**

**Tampón Cacodilato 0,2 M**

Solución A: Cacodilato sódico 4,28 % (p/v)

Solución B: HCl 0,2N

<u>Sol. A</u>	<u>Sol B.</u>	<u>pH</u>
25 ml	3,2 ml	7,0
25 ml	2,1 ml	7,2
25 ml	1,4 ml	7,4

• **Notas :**

Todas las operaciones que se describen en este protocolo se realizan en campana de extracción dada la toxicidad de los reactivos que se utilizan.

---

Protocolo 14. **Inclusión de muestras de raíces en resina**

---

• **Procedimiento:**

Los fragmentos de raíz micorrizada se deben deshidratar antes de incluirlos en resina *spurr*. A continuación se detallan los pasos que se realizaron en la deshidratación de las muestras.

*Deshidratación (Tª ambiente)*

Las muestras se deshidrataron sumergiéndolas en las siguientes soluciones durante los minutos que se detallan:

- Etanol 30% 15 minutos.
- Etanol 50% 15 minutos.
- Etanol 70% 15 minutos.
- Etanol 90% 15 minutos.
- Etanol 100% 20 minutos (2 veces).
- Óxido de propileno 30 minutos (2 veces).

Tras la deshidratación los fragmentos se incluyeron en resina *spurr* tal y como se describe a continuación:

*Inclusión en resina spurr (Tª ambiente).*

Las muestras se incluyeron en resina *spurr* sumergiéndolas en las siguientes soluciones durante el tiempo que se detalla:

- Resina : óxido de propileno 1:2 1 hora
- Resina : óxido de propileno 1:1 1 hora
- Resina : óxido de propileno 2:1 1 hora
- Resina 1 hora
- Resina Noche 4°C.

Tras este proceso las muestras se colocaron en un molde o plancha de espuma (tamaño 3, Agar Scientific G29213) y se dejaron 24 horas a 60°C.

Con la ayuda de un microtomo se realizaron algunos cortes semifinos de 1  $\mu\text{m}$ . Estos cortes se tiñeron con azul de toluidina (1%, p/v) y con la ayuda de un microscopio óptico se comprobó haber seccionado apropiadamente y tener muestras de raíces micorrizadas. Posteriormente, se realizaron cortes ultrafinos de 80 nm y se realizó una tinción de contraste con acetato de uranilo durante 20 minutos en ausencia de luz, seguido de dos lavados con agua destilada. Los cortes se dispusieron sobre una rejilla de cobre. La ultraestructura de las muestras se visualizó con la ayuda de un microscopio electrónico (Philips EM 400 electron microscope 80 Kv).

• **Reactivos:**

**Resina Spurr.** Conservación a 4°C. Muy tóxica.

ERL-4206	10 g	resina eposídica dura
D.E.R- 736	6 g	resina eposídica blanda
NBA	26 g	endurecedor
S-1	0,4 g	acelerador

**Solución de Acetato de Uranilo.**

Solución saturada en agua. Se prepara en frasco opaco dada su fotosensibilidad.

• **Notas :**

Todas las operaciones que se describen en este protocolo se realizaron en campana de extracción dada la toxicidad de los reactivos que se utilizaron.

---

## Protocolo 15. Extracción de proteínas totales solubles

---

- **Procedimiento:**

Se utilizaron muestras de raíces congeladas de plántulas micorrizadas y control. Éstas se trituraron en un mortero con ayuda de un pistilo y nitrógeno líquido hasta conseguir una textura polvo. Por cada g de muestra se adicionó 1 ml de tampón de extracción . El homogenado se centrifugó a 16.000 g durante 30 minutos a 4°C. El sobrenadante se congeló a -20°C.

- **Reactivos:**

**Tampón Mac Ilvaine:**

Solución 1: Ácido cítrico monohidrato 0,1 M

Solución 2: Fosfato disódico 0,2 M

Solución 1 + Solución 2 hasta un pH=6,8

**Tampón de extracción:**

Tampón Mac Ilvaine adicionado de:

8% (p/v) PVPP (evita daños por fenoles y quinonas)

1mM DTT (antioxidante)

1mM PMSF (inhibidor de proteasas)

0,1% Triton X-100 (detergente; secuestra compuestos fenólicos)

- **Notas:**

La solución de DTT se prepara en agua y se conserva a -20°C.

La solución de PMSF se prepara en etanol al 96% (p/v) y se conserva a +4°C.

---

Protocolo 16. **Cuantificación de proteínas totales**

---

• **Procedimiento:**

La cuantificación de proteínas totales solubles se llevó a cabo mediante el método de Bradford (1976) que utiliza albúmina bovina (BSA) como proteína de referencia. Las mediciones se realizaron en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 595 nm.

---

Protocolo 17. **Purificación de  $\beta$ -1,3-glucanos a partir de *Saccharomyces cerevisiae***

---

Se empleó el método de Cabib & Bowers (1971).

• **Procedimiento:**

1. Se tomaron 130 g de levadura seca y junto con 250 ml de NaOH al 6% (p/v) se agitó constantemente durante 1 hora a 75-80 °C.
2. Se le adicionaron 400 ml de H<sub>2</sub>O bidestilada y se centrifugó durante 40 minutos a 4.000 g.
3. El sedimento se resuspendió en 200 ml de NaOH al 3% (p/v) y se mantuvo en agitación constante durante 1 hora a 75-80°C.
4. Se centrifugó durante 15 minutos a 4.000 g.
5. Se repitieron los pasos 3 y 4 dos veces más.
6. Se mantuvo el sobrenadante a 4 °C toda la noche.
7. Se agitó durante 1 hora a 75-80°C.
8. Se centrifugó nuevamente durante 15 minutos a 4.000 g.
9. El sedimento se resuspendió en 480 ml de H<sub>2</sub>O bidestilada y se llevó a pH=5 por la adición de ácido acético glacial.
10. Se agitó durante 3 horas a 75-80°C.
11. Se centrifugó durante 15 minutos a 4.000 g.
12. El sedimento se lavó con H<sub>2</sub>O bidestilada y se repitió la centrifugación (15 minutos a 4.000 g).

13. El sedimento se resuspendió en 200 ml de NaOH al 3 % (p/v).
14. Se agitó durante 2 horas a 75-80°C.
15. Finalmente tras una centrifugación durante 15 minutos a 7.500 g se obtuvo un sobrenadante limpio que contenía los  $\beta$ -1,3-glucanos solubles.

Se pueden repetir los pasos desde el punto 9 en adelante para recuperar más cantidad de glucanos.

---

**Protocolo 18. Determinación de actividades quitinasa y  $\beta$ -1,3-glucanasa ácidas en geles de poliacrilamida en condiciones nativas (electroforesis anódica (Davis, 1964)).**

---

• **Procedimiento:**

Los extractos proteicos de raíces se separaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida usando el sistema HOEFER ("Mighty Small 250 System") para minigeles (10x8 ó 10x10 cm, 0,75 mm de espesor).

Las muestras se mezclaron con un tampón de carga (5:1, v/v). La electroforesis se realizó a corriente constante (20 mA/gel). La electroforesis se detuvo 30 minutos después de la salida del frente de migración del gel.

• **Reactivos:**

**Tampón de carga:**

Tris-ClH	0,5 M
Sacarosa	60% (p/v)
Azul de bromofenol	0,04% (p/v)
Azida sódica	0,02 % (p/v)

**Tampón de electroforesis:** Tris-Glicina pH 8,3

**Composición de los geles de poliacrilamida:**

*Para la separación de proteínas ácidas o neutras y la determinación de actividad glucanasa.*

Ingredientes	Gel concentrador (4%)	Gel separador (15%)
Acrilamida 40%	0,48 ml	3,65 ml
Bis-Acrilamida 2%	0,26 ml	2 ml
Tris-ClH 3M pH 8.8	---	1,25 ml
Tris-ClH 0.5M pH 6.8	1,26 ml	----
$\beta$ -1,3-Glucanos	---	1 ml
HCl	---	30 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O destilada	2,85 ml	2,8 ml
Persulfato de amonio 10%	50 $\mu$ l	70 $\mu$ l
TEMED	5 $\mu$ l	15 $\mu$ l

*Para la separación de proteínas ácidas o neutras y la determinación de actividad quitinasa.*

Ingredientes	Gel concentrador (4%)	Gel separador (15%)
Acrilamida 40%	0,48 ml	3,65 ml
Bis-Acrilamida 2%	0,26 ml	2 ml
Tris-ClH 3M pH 8,8	---	1,25 ml
Tris-ClH 0.5M pH 6,8	1,26 ml	----
Glicolquitina	---	100 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O destilada	2,85 ml	2,8 ml
Persulfato de amonio 10%	50 $\mu$ l	70 $\mu$ l
TEMED	5 $\mu$ l	

Los  $\beta$ -1,3-glucanos se purificaron a partir de *Saccharomices cerevisiae* (17). La solución de glicolquitina tenía una concentración final de 0,01% (p/v).

- **Notas:**

Se adicionó HCl al gel separador que contiene  $\beta$ -1,3-glucanos para poder neutralizar el pH altamente básico que presentaba.

---

Protocolo 19. **Determinación de actividades quitinasa y  $\beta$ -1,3-glucanasa básicas en geles de poliacrilamida en condiciones nativas (electroforesis catódica (Reisfeld (1962))).**

---

- **Procedimiento:**

Los extractos proteicos de raíces se separaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida usando el sistema HOEFER ("Mighty Small 250 System") para minigeles (10x8 ó 10x10 cm, 0,75 mm de espesor). En este caso el gel separador no incluye el sustrato de la reacción, por lo que para poner de manifiesto las actividades enzimáticas correspondientes es necesario realizar una transferencia de las proteínas, una vez separadas, a un gel de transferencia que incluye el sustrato de la misma.

Las muestras se mezclaron con un tampón de carga (5:1, v/v). La electroforesis se realizó a corriente constante de 35 mA durante 3 horas y con polaridad invertida.

- **Reactivos:**

**Tampón de carga:**

KOH	0,6 M
Ácido acético	3,6% (v/v)
Sacarosa	60 % (p/v)
Azul de Metileno	0,04 % (p/v)
Azida sódica	0,02 % (p/v)

**Tampón de electroforesis:**

$\beta$ -alanina	0,3 M
Ácido acético	0,8% (v/v)

**Composición de los geles de poliacrilamida:**

*Para la separación de proteínas básicas y determinación de ambas actividades (glucanasa y quitinasa).*

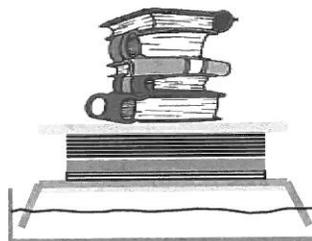
Ingredientes	Gel concentrador (7,5%)	Gel separador (12%)
Acrilamida 40%	0.73 ml	2,74 ml
Bis-Acrilamida 2%	0.4 ml	1,5 ml
Ác. Acético 22% + KOH 0,6M	---	0,75 ml
Ác. Acético 3,6% + KOH 0,6M	0,5 ml	----
H <sub>2</sub> O destilada	2.3 ml	2.75 ml
Persulfato de amonio 10%	40 µl	100 µl
TEMED	8 µl	50 µl

Tras la electroforesis el gel separador se equilibró durante 20 minutos a 37°C en tampón acetato sódico 50 mM, pH=5.

Paralelamente se incluían los sustratos de ambas reacciones en un gel adicional al 7,5 % de acrilamida (gel de transferencia) al que se transfirieron las proteínas. La composición de dicho gel es la siguiente:

Ingredientes	Gel de transferencia (7,5%)
Acrilamida 40 %	1,82 ml
Bis-acrilamida 2%	1 ml
Quitina / β-1,3-glucanos	100 µl / 1 ml
----- / HCl* <sup>1</sup> 37%	--- / 30 µl
Agua destilada	7 ml
Persulfato de amonio 10 %	100 µl
TEMED	20 µl

El gel separador se colocó sobre un cristal cubierto con papel Whatman nº 3 cuyos extremos, a modo de mecha, estaban sumergidos en un reservorio que contenía el tampón de transferencia. Sobre el gel separador se colocó el gel de transferencia, ya con el sustrato de la reacción y un tamaño similar



al gel separador. Se eliminó el exceso de tampón y las burbujas de aire entre ambos geles y sobre ellos se pusieron 2 piezas de papel Whatman nº 3 del tamaño de los geles. A continuación se colocaron piezas de papel absorbente y sobre éstas una superficie plana para soportar un peso de 1 kg. Esta transferencia se llevó a cabo durante toda la noche a 37 °C.

- **Notas:**

\*1 El HCl sólo se añade al gel que lleva los  $\beta$ -1,3-glucanos para disminuir el pH sumamente básico que presenta la solución del sustrato enzimático.

---

### Protocolo 20. **Detección y revelado de actividades enzimáticas ácidas, neutras y básicas**

---

- **Procedimiento:**

Tanto el gel separador de la electroforesis anódica como el gel de transferencia de la electroforesis catódica, se lavaron durante 20 minutos en una solución de acetato sódico 50 mM, pH 5,0. Se eliminó esta solución y los geles se incubaron en nueva solución a 37 °C durante 4 horas.

#### *Revelado de actividad quitinasa*

Durante 5 minutos se incubó el gel que contenía glicolquitina en su composición, en una solución de Calcoflúor White M2R. Se lavó con agua destilada y se visualizó el gel con luz ultravioleta a 312 nm. Se fotografió el gel a esta longitud de onda con un filtro naranja.

*Revelado de actividad  $\beta$ -1,3-glucanasa*

El gel que contenía  $\beta$ -1,3-glucanos se incubó durante 15 minutos en una solución de azul de anilina, se visualizó a 365 nm y se fotografió a esta longitud de onda con un filtro naranja.

• **Reactivos:**

**Solución de calcoflúor:** Calcoflúor White M2R (Sigma) al 0,01 % p/v en tampón Tris-HCl 0,3M, pH 8,9

**Solución de azul de anilina:** Azul de anilina al 0,025% (p/v) en  $K_2HPO_4$  150 mM a pH 8,6

• **Notas:**

Los reactivos utilizados en este protocolo se deben envasar en frascos opacos dado su fotosensibilidad. Se pueden reutilizar varias veces.

---

Protocolo 21. **Extracción de ARN total de raíces** (Félix G, 1985)

---

• **Procedimiento:**

1. Las raíces micorrizadas se trituraron vigorosamente con  $N_2$  líquido hasta conseguir textura polvo.
2. Se añadió tampón de extracción en proporción 1:3.
3. Toda la mezcla anterior se pasó a un tubo estéril de 15 ml de capacidad.
4. Los tubos se agitaron vigorosamente durante 5 minutos.
5. Se añadieron 600  $\mu$ l de una mezcla de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1, v/v) por cada 3 ml de tampón de extracción puesto inicialmente.
6. La mezcla se incubó en hielo durante 10 minutos.
7. Se centrifugó a 9.300 g durante 15 minutos.
8. Se tomó el sobrenadante y se añadió 1 volumen de isopropanol frío.

9. Se incubó durante 2 horas a  $-20^{\circ}\text{C}$ .
10. Se centrifugó a 9.300 g durante 20 minutos.
11. Se eliminó el sobrenadante y el sedimento se secó a temperatura ambiente.
12. El sedimento se resuspendió en 500  $\mu\text{l}$  de agua tratada con DEPC, calentando a 65  $^{\circ}\text{C}$  durante 5-10 minutos.
13. Se centrifugó a 9.300 g durante 5 minutos para eliminar el material insoluble.
14. Se tomó el sobrenadante y se precipitó el ARN añadiendo 0,33 volúmenes de LiCl 8M.
15. Se incubó a  $-20^{\circ}\text{C}$ , durante toda la noche.
16. Se centrifugó a 15.700 g durante 20 minutos a 4  $^{\circ}\text{C}$ .
17. El sedimento se lavó con 1 ml de etanol al 70% conservado a  $-20^{\circ}\text{C}$ .
18. Se centrifugó a 15.700 g durante 5 minutos.
19. Finalmente el sedimento se secó a vacío y se resuspendió en 50  $\mu\text{l}$  de agua tratada con DEPC.

• **Reactivos:**

**Tampón de extracción:**

Tiocianato de guanidinio	4 M
Sarcosina	1 %
Acetato sódico, pH 5,2.	0.1 M

Justo antes de su uso se le añade:

Polivinilpirrolidona	2 % (p/v)
$\beta$ -mercaptoetanol	0,7 %

Por cada 3 ml de volumen final de tampón se le añaden 2,5 ml de la mezcla fenol:cloroformo:isoamílico (25:24:1, v/v).

**Agua tratada con DEPC:**

Se añade 1 ml de dietil pirocarbonato en 1 litro de agua destilada y se mantiene en agitación durante toda una noche. Se autoclava y se agita con el tapón abierto dentro de una campana extractora para eliminar gases tóxicos.

• **Notas:**

Los morteros y pistilos utilizados para la trituración del material vegetal así como espátulas y probetas de vidrio fueron esterilizados en horno Pasteur a 140 °C durante al menos 4 horas. El fenol utilizado en el tampón de extracción debe tener un pH ácido.

---

**Protocolo 22. Tratamiento con DNAsa**

---

• **Procedimiento:**

Se incubó a 37 °C la siguiente mezcla de reacción durante 30 minutos:

50 µl del ARN obtenido en el protocolo 21.

1 µl Inhibidor de RNAsa (40 U/µl)

6 µl Tampón 6x (appligen)

2 µl DNAsa (10 U/µl)

Tras tratar con DNAsa el ARN se precipitó según el protocolo 23.

---

### Protocolo 23. **Precipitación de ARN**

---

- **Procedimiento:**

1. Se adicionó agua tratada con DEPC a la mezcla de reacción del protocolo anterior hasta alcanzar un volumen de reacción de 250  $\mu$ l.
2. Se añadió 1 volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1, v/v).
3. Se agitó y se centrifugó a 13.400 g durante 1 minuto. Nos quedamos con el sobrenadante.
4. Los pasos 1, 2 y 3 se repitieron de nuevo.
5. Se añadió 1/10 volumen de acetato sódico 3M y 2,5 volúmenes de etanol (100%).
6. Se mantuvo toda una noche a  $-20$  °C.
7. Se centrifugó a 13.400 g durante 30 minutos.
8. Se elimina el sobrenadante y se añaden 500  $\mu$ l de Etanol al 70%.
9. Se centrifugó a 13.400 g durante 10 minutos.
10. Se eliminó el etanol y el sedimento se desecó.
11. El sedimento seco se resuspendió en 50  $\mu$ l de agua DEPC.
12. Finalmente el ARN se conservó a  $-80$  °C.

- **Notas:**

El fenol utilizado presenta un pH ácido.

Es conveniente que todas las soluciones estén frías.

---

### Protocolo 24. **Cuantificación de ARN.**

---

Cada muestra fue cuantificada con la ayuda de un espectrofotómetro. Para ello se utilizaron cubetas de cuarzo. La absorbancia de una alícuota de 5  $\mu$ l de muestra diluída en 995  $\mu$ l de agua DEPC fue medida a 230, 260 y 280 nm. Cada unidad de absorbancia a 260 nm fue considerada como 40  $\mu$ g/ml de ARN. Para poder conocer una posible contaminación

por carbohidratos se calculó la relación entre las absorbancias obtenidas a 260 y 230 nm, debiendo ser ésta superior a 2. Para considerar una muestra libre de proteínas y/o fenol la relación entre las absorbancias a 260 y 280 nm debía tomar un valor intermedio entre 1,6 y 2.

---

Protocolo 25. **Retotranscripción in vitro** (Obtención de ADN complementario)

---

• **Procedimiento:**

1. Los siguientes componentes se pusieron en un tubo de microcentrífuga (1,5 ml):
  - x  $\mu$ l RNA (1 $\mu$ g)
  - 6-x  $\mu$ l agua DEPC
  - 1  $\mu$ l cebadores aleatorios (100 ng/ $\mu$ l)
2. Se mezclaron por agitación vigorosa
3. Se realizó una centrifugación rápida
  
4. La mezcla de reacción se incubó a 70 °C durante 10 minutos
5. La mezcla se enfrió en hielo 1 minuto
6. Se realizó una centrifugación rápida
7. Se añadieron:
  - 1  $\mu$ l dNTPs 10mM
  - 1  $\mu$ l Tampón de la Transcriptasa reversa
  - 0,5  $\mu$ l Inhibidor de la RNAsa (40 U/ $\mu$ l)
  - 0,5  $\mu$ l Transcriptasa reversa (20 U/ $\mu$ l)
8. Se mezclaron por agitación vigorosa
9. Se realizó una centrifugación rápida
10. La mezcla de reacción se incubó a 42 °C durante 40 minutos
11. Se inactivó la enzima transcriptasa a 94 °C durante 5 minutos
12. El tubo de microcentrífuga con el ADN complementario sintetizado se almacenó a -20 °C

---

Protocolo 26. **Reacción en Cadena de la Polimerasa**

---

• **Procedimiento:**

En un tubo de microcentrífuga de 0,2 ml de capacidad se pusieron:

x $\mu$ l	ADNc
2,5 $\mu$ l	Tampón 10x de la Taq polimerasa
0,75 $\mu$ l	Cl <sub>2</sub> Mg 50mM
5 $\mu$ l	dNTPs 1mM
0,5 $\mu$ l	Cebador F (10 $\mu$ M)
0,5 $\mu$ l	Cebador R (10 $\mu$ M)
0,5 $\mu$ l	Taq polimerasa (5 U/ $\mu$ l)
15,25-x $\mu$ l	Agua bidestilada estéril

También se preparó un tubo de microcentrífuga sin cDNA como control negativo para poder descartar posibles artefactos o contaminaciones. Tras una agitación rápida se centrifugaron y se colocaron en un termociclador (Perkin-Elmer-Modelo 2400) y se siguió un programa específico de PCR que se detallará en cada caso.

*Detección de ADN amplificado:*

Los 25  $\mu$ l de la reacción se cargaron junto con 5  $\mu$ l de tampón de carga 6x, en un gel de agarosa al 1,6% en TBE. La electroforesis se llevó a cabo a 100 V durante 1,5 horas. El gel se tiñó en una solución de bromuro de etidio y se visualizó con luz UV.

• **Reactivos:**

**TBE (5x):** 54 g Tris , 20 ml EDTA 0,5 M pH 8,0, 27,5 g Ácido bórico en 1 litro de agua destilada.

---

## Protocolo 27. Extracción de fragmentos de ADN incluidos en geles de agarosa

---

Se utilizó un kit comercial de la casa Qiagen.

• **Procedimiento:**

- 1.- Con la ayuda de un escalpelo se cortó el trozo de gel que contiene la banda de ADN y se introdujo en un tubo de microcentrífuga.
- 2.- Se pesó la cantidad de gel presente en la muestra.
- 3.- Se añadieron 3 volúmenes del tampón QX1.
- 4.- Se suspendió la resina QIAEX II mediante una agitación vigorosa durante 30 segundos.
- 5.- Se añadieron 10  $\mu$ l de esta resina a la muestra.
- 6.- Se incubó a 50 °C durante 10 minutos. Cada 2 minutos se agitaba vigorosamente.
- 7.- Se centrifugó a 13.400 g durante 30 segundos.
- 8.- El sobrenadante se eliminó.
- 9.- El sedimento se lavó con 500  $\mu$ l del tampón QX1 y se resuspendió mediante agitación vigorosa.
- 10.- Se centrifugó a 13.400 g durante 30 segundos.
- 11.- El sobrenadante se eliminó.
- 12.- El sedimento se lavó con 500  $\mu$ l del tampón PE y se resuspendió mediante agitación vigorosa.
- 13.- Se centrifugó a 13.400 g durante 30 segundos.
- 14.- El sobrenadante se eliminó.
- 15.- Los pasos 11 y 12 se repitieron.
- 16.- El sedimento se desecó durante 10-15 minutos, hasta que éste se puso de color blanco.
- 17.- El ADN se diluyó con 20  $\mu$ l de agua bidestilada estéril. Se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos.

18.- Se centrifugó a 13.000 rpm durante 30 segundos y nos quedamos con el sobrenadante.

19.- Los pasos 15, 16 y 17 se repitieron.

20.- Todo el sobrenadante se tomó y se congeló a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

---

### Protocolo 28. Preparación de células competentes

---

La preparación de células competentes de *E.coli* se realizó según la técnica descrita por Hanahan (1983).

#### • Procedimiento:

1. A partir de un cultivo madre conservado con glicerol a  $-80^{\circ}\text{C}$ , se cultivó *E.coli* el día anterior. Con un asa de siembra se puso un poco del cultivo en 5 ml de medio LB estéril. Se dejó crecer toda la noche a  $37^{\circ}\text{C}$  en un rotatubos.
2. Se vertió el preinóculo en un matraz Erlenmeyer estéril con 50 ml de LB suplementado con 10 mM de  $\text{MgSO}_4$ .
3. Se incubó a  $37^{\circ}\text{C}$  en agitación constante.
4. Cuando se alcanzó una densidad óptica 550 nm de 0,5 se vertió todo el cultivo en un tubo de centrifuga ss-34 y se dejó 15 minutos en hielo.
5. Los tubos ss-34 se centrifugaron a 800 g durante 12 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ .
6. El sobrenadante se eliminó suavemente y se dejó secar bien el sedimento.
7. El sedimento se resuspendió en 16 ml de la solución RFI y se incubó durante 15 minutos en hielo.
8. Los pasos 5 y 6 se repitieron.
9. El sedimento se resuspendió en 2 ml de la solución RFII y se incubó durante 15 minutos en hielo.
10. Se hicieron alícuotas de 100  $\mu\text{l}$  repartiéndose en tubos de microcentrifuga.
11. Estos tubos se enfriaron rápidamente en  $\text{N}_2$  líquido. Se conservaron a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

- **Reactivos:**

**Medio LB**

Triptona	10 g	} Se ajusta el pH a 7 con NaOH 5N.
Extracto de levadura	5 g	
NaCl	10g	
Agua destilada	950 ml	

Se completa con agua destilada hasta 1 litro.

Se autoclava a 120 °C durante 20 minutos.

**Solución RFI:**

RbCl	0,6 g
MnCl <sub>2</sub> -4H <sub>2</sub> O	0,495 g
Acetato potásico	0,147 g
CaCl <sub>2</sub> -2H <sub>2</sub> O	0,057 g
Glicerol	5,95 ml
H <sub>2</sub> O	50 ml

Ajustar pH 5,8 con ácido acético 0,2 M

**Solución RFII:**

MOPS 0,5 M	2ml
RbCl	0,12 g
CaCl <sub>2</sub> -2H <sub>2</sub> O	1,1 g
Glicerol	11,9 ml
H <sub>2</sub> O	100ml

Ajustar pH 6,8 con NaOH 0,5 M

- **Notas:**

Todo el material usado en esta técnica debe estar estéril y muy frío.

Las soluciones RFI y RFII se esterilizan mediante filtración.

---

Protocolo 29. **Ligación**

---

• **Procedimiento:**

En un tubo de microcentrífuga se incubó durante toda una noche a 4 °C la siguiente mezcla de reacción:

- x µl inserto
- 1 µl T<sub>4</sub> ADN ligasa
- 1 µl vector *pGEM-t-easy*
- x+2 µl tampón de ligación (2x)

• **Reactivos:**

El vector *pGEM-t-easy*, el tampón y la ligasa fueron proporcionados por Promega

• **Notas:**

Se necesitan 50 ng de vector. La proporción inserto/vector debe ser 3/1.

La cantidad de inserto necesaria depende pues, del tamaño de éste y del vector donde va a ser ligado. La siguiente fórmula nos ayuda a determinar la cantidad de inserto que necesitamos:

$$\left( \frac{50 \text{ ng vector} \times \text{Tamaño inserto}}{\text{Tamaño del vector}} \right) \times 3 = \text{cantidad de inserto (ng)}$$

---

### Protocolo 30. **Transformación de células competentes**

---

Tiene por objeto introducir plásmidos con el inserto deseado en cepas de *E. coli*.

• **Procedimiento:**

1. Se añadió a un tubo de microcentrífuga con células competentes (protocolo 28) medio volumen de la mezcla de reacción del plásmido obtenida en el protocolo anterior y se mantuvo en hielo durante 30 minutos.
2. Posteriormente se mantuvo durante 90 segundos a 42 °C.
3. Se enfrió durante 2 minutos en hielo.
4. Se añadió 1 ml de medio LB líquido estéril.
5. Se incubó a 37 °C, durante 1,5 horas en agitación constante.
6. Se prepararon placas de Petri con medio de cultivo LB sólido suplementado con ampicilina 100 µg/ml. Se extendieron en su superficie 100 µl de IPTG 100mM y 30 µl de X-Gal 50 mg/ml. Se dejaron unos 30 minutos para asegurar que se habían absorbido.
7. Se sembraron 50 µl, 100 µl y 200 µl del cultivo en dichas placas.
8. Las placas de Petri se incubaron toda la noche a 37°C.
9. Se hicieron réplicas de las colonias blancas obtenidas, supuestamente transformadas con el vector con inserto, para su posterior estudio.

• **Notas:**

Las soluciones de IPTG y X-Gal se conservan a -20°C.

El X-Gal se disuelve en dimetilformamida y dada la fotosensibilidad de la solución debe conservarse en un frasco opaco.

---

Protocolo 31. **Obtención de genes que codifican  $\beta$ -1,3-glucanasas de olivo**

---

• **Procedimiento:**

Se alinearon secuencias aminoacídicas de  $\beta$ -1,3-glucanasas de plantas superiores presentes en la base de datos del NCBI. Se estudiaron los dominios más conservados para poder diseñar cebadores lo más específicos posibles a estos genes. Los cebadores degenerados, Glu-F y Glu-R se diseñaron en base a las siguientes secuencias aminoacídicas:



Las secuencias nucleotídicas de Glu-F y Glu-R se muestran a continuación:

Nombre	Secuencia nucleotídica (5'-3')	Tm
Glu-F	AYiGGiGTiTGYTAYGG *	52 °C
Glu-R	ADiGCRTCRAAiARRTT *	45,3 °C

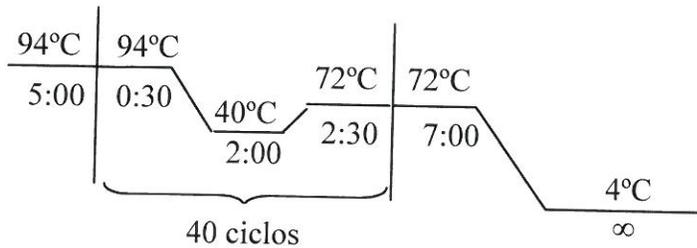
\* Código de las posiciones degeneradas:

Y = C o T      i = Inosina (A, T, C o G)    D= G o T o A      R= G o A

En tubos de microcentrífuga de 0,2 ml de capacidad se pusieron:

- 5  $\mu$ l    cDNA de raíz micorrizada
- 2,5  $\mu$ l    Tampón 10x de la Taq polimerasa
- 0,75  $\mu$ l    Cl<sub>2</sub>Mg 50mM
- 5  $\mu$ l    dNTPs 1mM
- 2,5  $\mu$ l    Glu-F (20  $\mu$ M)
- 2,5  $\mu$ l    Glu-R (20  $\mu$ M)
- 0,5  $\mu$ l    Taq polimerasa (5 U/ $\mu$ l)
- 6,25  $\mu$ l    Agua bidestilada estéril

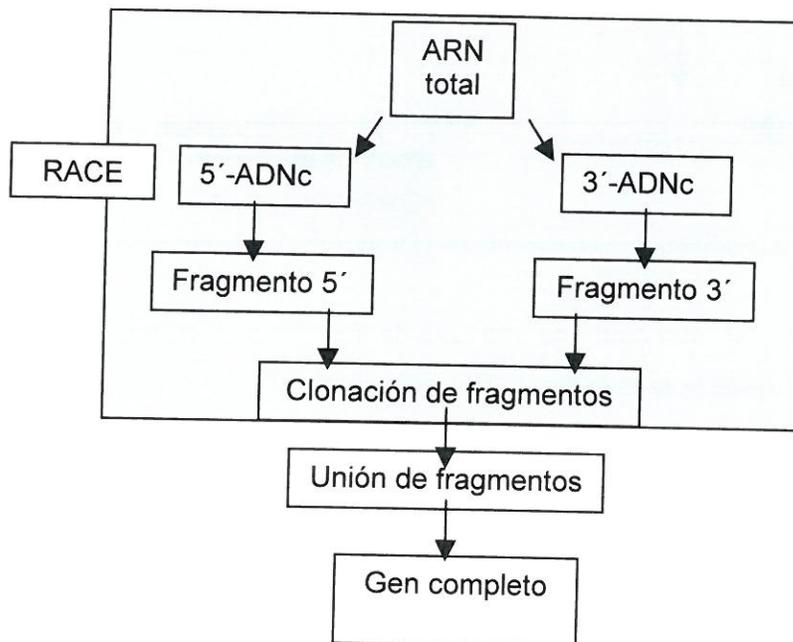
y el programa de PCR fue el siguiente:



La banda obtenida se clonó en el vector *p-GEM-t-easy* y se secuenció.

### Protocolo 32. RACE ( Rapid Amplification of cDNA Ends)

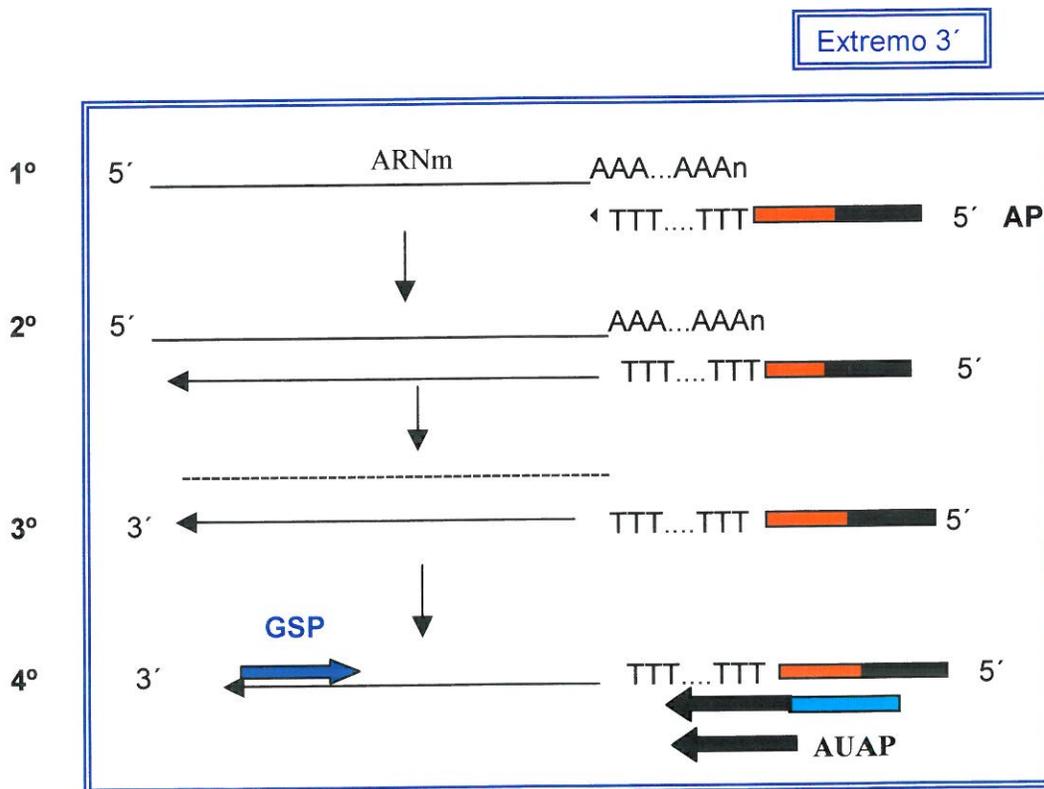
Esta técnica se ha utilizado para obtener los extremos 5' y 3' de un gen y poder construir posteriormente el gen completo. Para ello es necesario conocer una secuencia nucleotídica parcial de partida que nos permita diseñar cebadores específicos a dicho gen. Los pasos generales a seguir para obtener la secuencia completa de un gen se ilustra en el siguiente esquema:



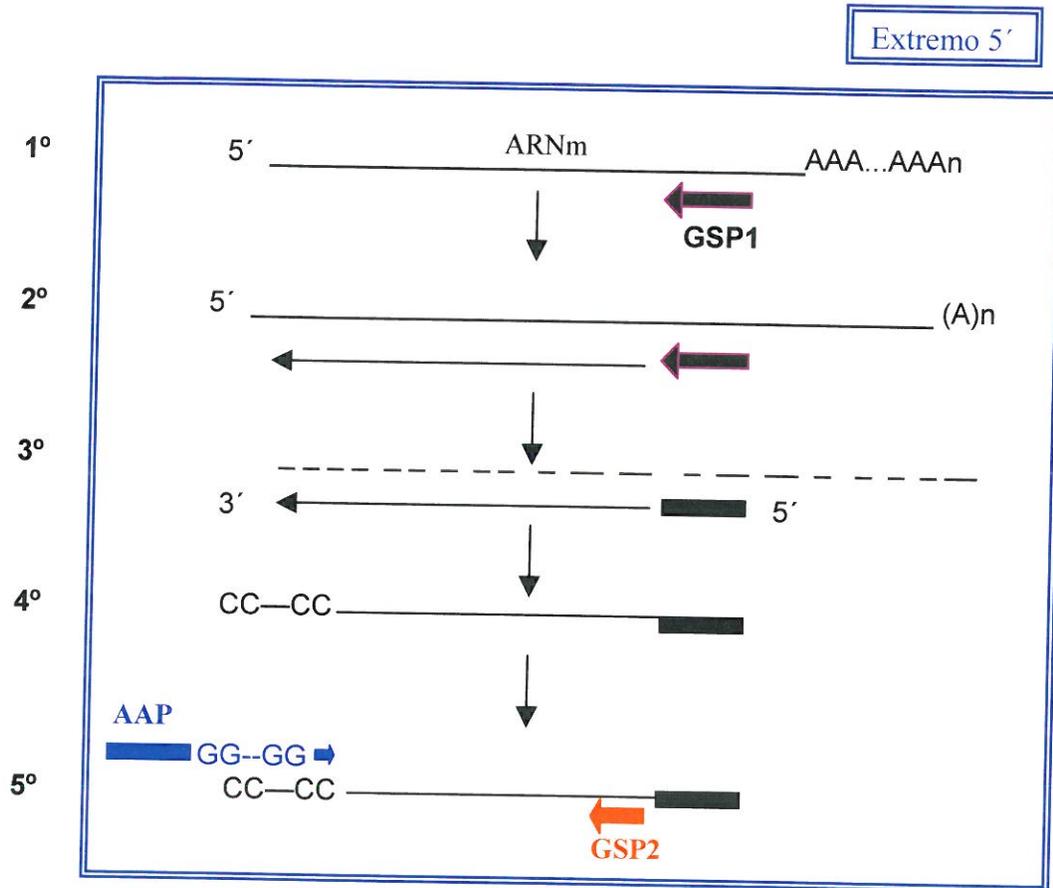
Es muy importante partir de un ARN exento de ADN y de contaminaciones de inhibidores de la enzima transcriptasa reversa como son sales de guanidinio, SDS o EDTA. Se han utilizado 2 kits diferentes, uno procedente de Gibco y otro de Clontech. A continuación se detallan ambos metodologías:

• **Procedimiento A (Gibco) :**

Antes de exponer este protocolo detalladamente se muestra un dibujo ilustrativo del plan de trabajo para obtener los extremos 3' y 5' de un gen mediante este procedimiento:



- 1° Unión del cebador AP, que contiene una cola de timinas, al ARN mensajero.
- 2° Extensión con la transcriptasa reversa "SuperScript II RT".
- 3° Degradación del ARN molde por la enzima "RNasa H".
- 4° Amplificación del ADN complementario utilizando un cebador universal, UAP o AUAP y un cebador específico GSP.



- 1° Unión del cebador específico GSP1 al ARN mensajero.
- 2° Síntesis de ADN complementario con la transcriptasa reversa "SuperScript II RT".
- 3° Degradación del ARN molde por la enzima RNasa .
- 4° Purificación del ADN complementario obtenido y adición de una cadena de citosinas en el extremo 3'.
- 5° Amplificación del ADN complementario utilizando un cebador universal, AAP y un cebador específico GSP2.

### A.- Síntesis de ADN complementario.

#### 3' ADN complementario

1 – 5 µg ARN total  
Agua DEPC hasta 11 µl  
1 µl AP (10 µM)

70 °C 10 min  
Hielo 1 min  
Centrifugación rápida

2 µl tampón PCR (10x)  
2 µl MgCl<sub>2</sub> (25 mM)  
1 µl dNTP mix (10 mM)  
2 µl DTT (0.1 M)

Mezclar y Centrifugar

Incubación 42°C 2-5 minutos  
1 µl Superscript II RT  
42 °C 50 minutos  
70 °C 15 minutos  
Hielo  
1 µl RNase H  
37 °C 20 minutos

Conservación –20 °C

#### 5' ADN complementario

1 – 5 µg ARN total  
2,5 pmoles GSP-1  
Agua DEPC hasta 15,5 µl

70 °C 10 min  
Hielo 1 min  
Centrifugación rápida

2,5 µl tampón PCR (10x)  
2,5 µl MgCl<sub>2</sub> (25 mM)  
1 µl dNTP mix (10 mM)  
2,5 µl DTT (0.1 M)

Mezclar y Centrifugar

Incubación 42 °C 2-5 minutos  
1 µl Superscript II RT  
42 °C 50 minutos  
70 °C 15 minutos  
Hielo  
1 µl RNase H  
37 °C 20 minutos

Conservación –20 °C

Los cebadores que se utilizaron en la síntesis del 3' ADN y 5' ADN complementario fueron los siguientes:

GIBCO BRL	
Cebador	Secuencia nucleotídica 5' - 3'
AP	GGCCACGCGTCGACTAGTAC(T) <sub>17</sub>
GSP-1	GTATTCGTAATTCCCATC

El ADN complementario, extremo 3', estaba listo para poder amplificarlo mediante PCR (ver apartado D). En cambio el ADN complementario, extremo 5', necesitaba ser purificado y sometido a un *TdT Tailing* como se detalla a continuación:

#### B.- Purificación del ADN complementario, extremo 5':

Al ADN complementario, extremo 5', obtenido en el apartado anterior:

1. Se añadieron 120 µl de solución de ligación (NaI 6M)
2. Todo se transfirió a una columna GlassMax
3. Se centrifugó a 13.000 g durante 20 segundos
4. Se colocó la columna sobre un tubo de microcentrifuga nuevo
5. Se añadieron 0,4 ml de tampón de lavado frío (4°C)
6. Se centrifugó a 13.000 g durante 20 segundos
7. Los apartados 4, 5 y 6 se repitieron 3 veces más
8. Se lavó 2 veces con 400 µl de etanol (70%) frío (4°C)
9. Se centrifugó a 13.000 g durante 1 minuto.
10. Se transfirió la columna a un nuevo tubo de microcentrifuga
11. Se añadieron 50 µl de agua destilada estéril, calentada previamente a 65°C.
12. Se centrifugó a 13,000 x g durante 20 segundos.

En este momento el ADN diluído podía conservarse a -20 °C o se podía continuar con el *TdT Tailing*.

**C.- TdT Tailing del ADN complementario, extremo 5´:**

1. Se añadieron a un tubo de microcentrífuga los siguientes reactivos:
  - 6,5 µl H<sub>2</sub>O DEPC
  - 5 µl Tampón Tailing (5x)
  - 2,5 µl dCTP (2mM)
  - 10 µl ADNc purificado
2. Se incubó a 94 °C durante 2 ó 3 minutos
3. Se enfrió en hielo durante 1 minuto
4. Se realizó una centrifugación rápida y se colocó de nuevo en hielo
5. Se añadió 1 µl de TdT, se mezcló bien y se incubó a 37°C durante 10 minutos
6. La reacción se inactivó a 65 °C durante 10 minutos
7. Finalmente el ADN complementario obtenido se conservó a -20 °C

**D.- Amplificación de ADN complementario (PCR).**

El contenido de cada una de las reacciones de PCR se detalla a continuación

Extremo 3´	Extremo 5´
5 µl Tampón 10x PCR	5 µl Tampón 10x PCR
3 µl MgCl <sub>2</sub> 25 mM	3 µl MgCl <sub>2</sub> 25 mM
36,5 µl H <sub>2</sub> O destilada estéril	31,5 µl H <sub>2</sub> O destilada estéril
1 µl dNTP mix (10 mM)	1 µl dNTP mix (10 mM)
1 µl GSP (10 µM)	2 µl GSP2 (10 µM)
1 µl UAP ó AUAP (10 µM)	2 µl AAP (10 µM)
0,5 µl Taq Polimerasa	0,5 µl Taq Polimerasa
2 µl ADNc	5 µl ADNc dC-tailed

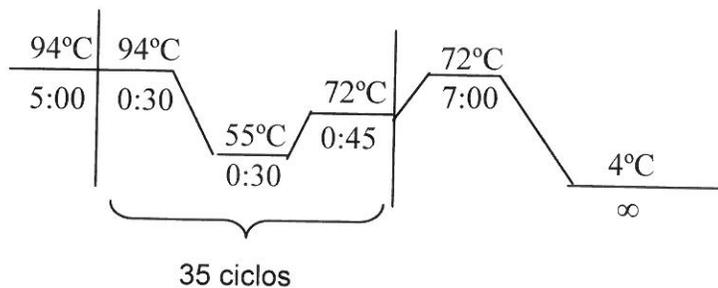
Los cebadores proporcionados por la casa comercial Gibco y utilizados en este apartado se detallan a continuación:

GIBCO BRL	
Cebador	Secuencia nucleotídica 5'-3'
UAP	(CUA) <sub>4</sub> GGCCACGCGTCGACTAGTAC
AUAP	GGCCACGCGTCGACTAGTAC
AAP	GGCCACGCGTCGACTAGTACGGGIIGGGIIGGGIIG

Los cebadores específicos diseñados y utilizados en este apartado para amplificar los extremos 3' y 5' de genes que codifican β-1,3-glucanasas, son los siguientes:

Nombre	Secuencia nucleotídica (5'-3')	Tm	A+T (%)	C+G (%)
Glu 41 (GSP)	AGAGACTTGCTGCTAACCCAAAAT	64°C	60,9 %	39,1 %
Glu 42 (GSP2)	GTACCGTGTTCCATCAGGTGTT	66°C	50 %	50 %
Glu 51 (GSP)	GGAATAGCAAGAAATACCTCG	60°C	57,1 %	42,9 %
Glu 52 (GSP2)	TCGTAATTCCCATCTTTGACC	60°C	57,1 %	42,9 %

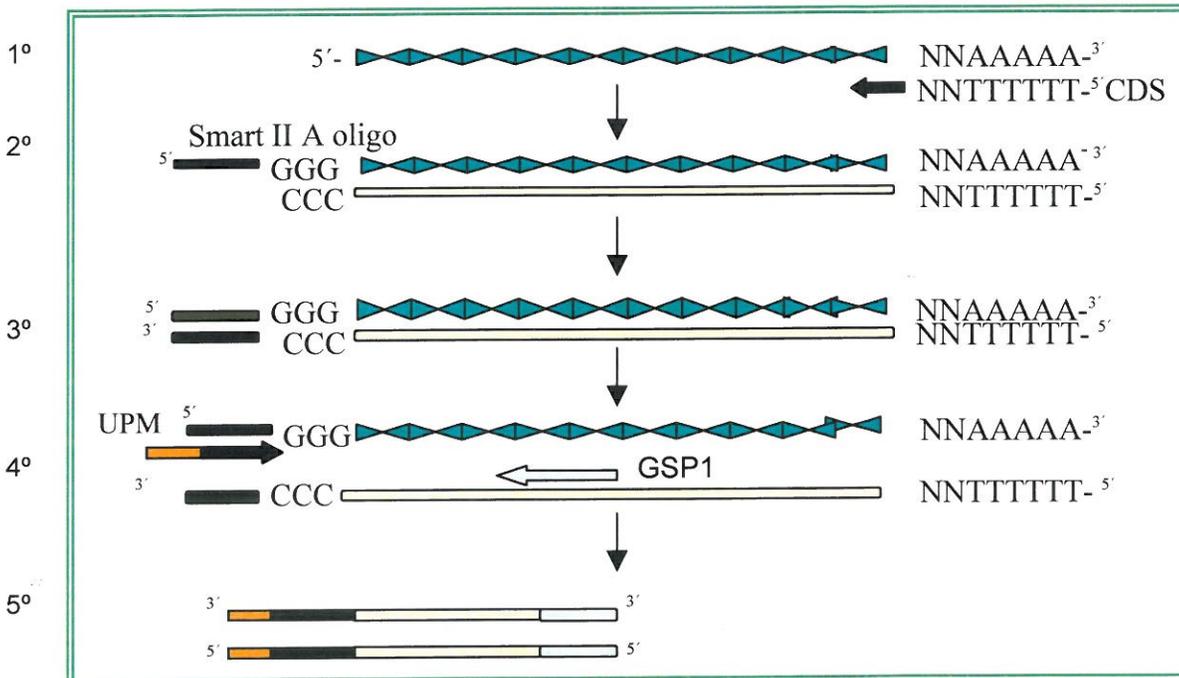
Se llevó a cabo el siguiente programa de PCR :



• **Procedimiento B (Clontech) :**

Antes de exponer este protocolo detalladamente se muestra un dibujo ilustrativo del plan de trabajo para obtener el extremo 5' de un gen mediante este procedimiento:

Extremo 5'



- 1º Unión del cebador específico 5' CDS a la cadena de ARN mensajero.
- 2º Unión del cebador Smart II A oligo al extremo 5' del gen.
- 3º Obtención del ADN complementario.
- 4º Amplificación del ADN complementario utilizando el cebador universal UPM y el específico GSP1.
- 5º Obtención del extremo 5' del gen objeto de estudio.

### A.- Síntesis de ADN complementario

Se tomaron tubos de microcentrifuga y se puso la siguiente mezcla de reacción:

ADNc (extremo 5')

1-3  $\mu$ l ARN (50 ng-1  $\mu$ g)

1  $\mu$ l Cebador 5'-CDS

1  $\mu$ l Oligo SMART II A

Se añadió H<sub>2</sub>O destilada estéril hasta completar un volumen de 5  $\mu$ l .

Se mezcló el contenido y se realizó una centrifugación rápida.

La mezcla de reacción se incubó a 70 °C durante 2 minutos.

Se enfrió en hielo durante 2 minutos.

Se realizó una centrifugación rápida.

Posteriormente se añadió a cada tubo de microcentrifuga los siguientes componentes:

2  $\mu$ l Tampón de la transcriptasa reversa 5x

1  $\mu$ l DTT (20 mM)

1  $\mu$ l dNTP (10 mM)

1  $\mu$ l transcriptasa reversa "PowerScript".

Se mezclaron todos los componentes pipeteando.

Se realizó una centrifugación rápida.

La mezcla de reacción se incubó a 42 °C durante 1,5 horas.

Se inactivó la reacción a 72 °C durante 7 minutos.

El ADN sintetizado se conservó a -20 °C, éste se conserva bien al menos durante 3 meses.

Los cebadores y oligonucleótidos provistos por la casa comercial y usados en este apartado se detallan a continuación:

<b>CLONTECH</b>	
<b>Cebador</b>	<b>Secuencia nucleotídica 5´-3´</b>
<b>Smart II A Oligonucleotido</b>	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCGGG
<b>5´-RACE CDS Cebador</b>	(T) <sub>25</sub> N <sub>-1</sub> N

\*(N= A, C, G o T , N<sub>-1</sub>= A, G o C)

### **B.- Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)**

En un tubo de microcentrífuga de 0,2 ml de capacidad se puso la siguiente mezcla de reacción:

- 34,5 µl H<sub>2</sub>O destilada estéril
- 5 µl Tampón PCR 10x
- 1 µl dNTP mix (10 mM)
- 1 µl Taq Polimerasa Mix 50x
- 5 µl cebador UPM (10x)
- 1 µl GSP1 ó GSP2 (10 µM)
- 2,5 µl ADN complementario

Los cebadores utilizados en este apartado y las secuencias nucleotídicas correspondientes se detallan a continuación:

Clontech	
UPM *	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT
	CTAATACGACTCACTATAGGGC
NUP**	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT

\* UPM es una mezcla de dos cebadores.

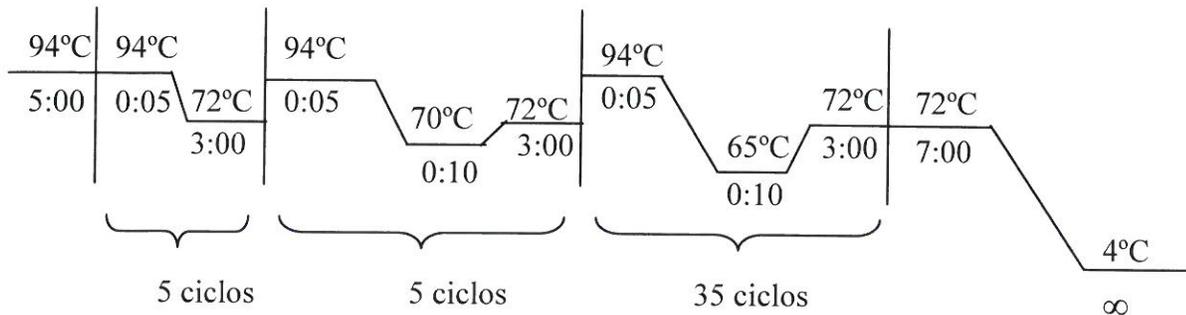
\*\* NUP se utilizará tan solo en el caso de realizar una PCR anidada.

Los cebadores específicos diseñados son los siguientes:

Clontech				
Cebador	Secuencia nucleotídica 5´-3´	Td*	A+T (%)	C+G (%)
5RACR2 (GSP1)	CGGGTATATGTTGACAAGTAGAGGGGC	74°C	48	52
5RACR4 (GSP1)	GAGCGTATTGAAGACTAATCTGTTGCGG	75,5°C	42	58

\* La temperatura de anillamiento Td se calculó mediante el método "del vecino más próximo" (*nearest neighbor*).

El programa de PCR utilizado fue el siguiente:



• **Notas:**

Los cebadores GSP1 y GSP2 han de ser específicos del gen objeto de estudio. Es conveniente que en la secuencia nucleotídica de separación entre GSP1 y GSP2 exista un único lugar de corte por una enzima de restricción para así facilitar la posterior reconstrucción del gen completo.

---

Protocolo 33. **Northern blot.**

---

Esta técnica se utilizó para estudiar la expresión de genes que codifican proteínas con actividad  $\beta$ -1,3-glucanasa en las raíces control y micorrizadas de plántulas de olivo.

• **Procedimiento:**

El protocolo seguido requiere varios pasos que se describen a continuación:

**FASE A: Electroforesis en geles de agarosa y transferencia a membrana.**

Se preparó un gel de agarosa en condiciones desnaturalizantes. Se tomó 1 volumen de cada muestra (15  $\mu$ g de ARN) y se le adicionó 1 volumen del tampón de muestra y 1/10 volumen de tampón de carga. Las muestras se incubaron a 65 °C durante 15 minutos y se introdujeron inmediatamente después en hielo, antes de cargar el gel. La electroforesis se llevó a cabo a 100 voltios constantes. Tras la electroforesis se realizó una foto al gel con luz UV. Éste se enjuagó varias veces en agua destilada para eliminar restos de formaldehído. La transferencia de los ARNs se realizó a una membrana de nitrocelulosa cargada positivamente. Dicha membrana se cortó del tamaño del gel y se lavó durante 5 minutos en agua destilada pasando posteriormente a una solución SSC 20x durante 30 minutos. La transferencia se dejó toda la noche y el tampón que se utilizó fue 20x SSC. Posteriormente se lavó la membrana durante 5 minutos en SSC 2x y se dejó secar al aire. El ARN se fijó a la membrana mediante una exposición de 3 minutos 45 segundos a la luz UV.

**FASE B: Marcaje de la sonda mediante PCR.**

La mezcla de reacción fue la siguiente:

- 5  $\mu$ l Tampón de la Taq polimerasa (10x)
- 1,5  $\mu$ l  $MgCl_2$  50 mM
- 5  $\mu$ l dATP (1 mM)
- 5  $\mu$ l dGTP (1 mM)
- 5  $\mu$ l dTTP (1 mM)
- 1,5  $\mu$ l dCTP (1mM)
- 5  $\mu$ l  $^{32}P$ -dCTP
- 5  $\mu$ l ADN (dilución 1:100 del producto de PCR)
- 1  $\mu$ l Cebador 1 (10  $\mu$ M)
- 1  $\mu$ l Cebador 2 (10  $\mu$ M)
- 0,5  $\mu$ l Taq Polimerasa
- 14,5  $\mu$ l  $H_2O$  destilada estéril

**FASE C: Purificación de las sondas marcadas:**

Para purificar las sondas marcadas se utilizó un "kit" comercial (Mini Quick Spin <sup>TM</sup> Columns, Roche).

**FASE D: Pre-hibridación e hibridación.**

1. La membrana se puso en un tubo de hibridación y prehibridó durante al menos 2 horas con la solución de hibridación a 42 °C.
2. Paralelamente la sonda se desnaturalizó calentando a 95 °C durante 10 minutos. Posteriormente se incubó en hielo durante 5 minutos.
3. La solución de hibridación se eliminó y se añadió al tubo nueva solución de hibridación. La sonda previamente había sido desnaturalizada y se adicionó a la solución de hibridación.
4. La membrana se hibridó durante toda la noche a 42 °C.
5. La solución de hibridación se eliminó y se hicieron los siguientes lavados:
  - 2 lavados con SSC 1x + SDS 0,1 % 15 minutos 42 °C

2 lavados con SSC 0,5x + SDS 0,1 % 15 minutos 42 °C

2 lavados con SSC 0,1x + SDS 0,1 % 15 minutos 42 °C

#### FASE E: **Detección y revelado**

Las membranas se expusieron a películas fotográficas KODAK a  $-80^{\circ}\text{C}$ , protegidas con cassettes especiales. El tiempo de exposición dependió del grado de marcaje que presentaban las membranas tras los lavados.

El revelado se realizó sumergiendo las películas en líquido de revelado fotográfico durante 3 ó 4 minutos, dependiendo de la señal obtenida. Tras esto, las películas se fijaron sumergiéndolas en líquido fijador fotográfico durante otros 3 ó 4 minutos. Las películas se lavaron con agua para eliminar restos de líquido fijador y se dejaron secar al aire. Las bandas obtenidas se cuantificaron utilizando el programa informático *Quantity One*.

#### • **Reactivos:**

##### **10x Tampón de electroforesis (Northern) :**

200 ml H<sub>2</sub>O- DEPC } Ajustar pH= 7,0

10,45 g MOPS }

4,15 ml Acetato sódico 3M

5 ml EDTA 0,5 M, pH=8,0

Enrasar hasta 250 ml con H<sub>2</sub>O-DEPC y autoclavar

##### **Tampón de muestra:**

100  $\mu\text{l}$  formamida desionizada

20  $\mu\text{l}$  tampón de electroforesis (Northern)

38  $\mu\text{l}$  formaldehído

42  $\mu\text{l}$  H<sub>2</sub>O-DEPC

**Tampón de carga:**

Glicerol 50 %

EDTA pH 8 1 mM

Azul de bromofenol 0,4 % (p/v)

Bromuro de etidio 0,1 mg/ml

Se completa con H<sub>2</sub>O-DEPC hasta el volumen final

**Gel de agarosa en condiciones desnaturalizantes:**

En el microondas se calientan 0,6 g de agarosa con 5 ml de tampón de electroforesis (10x) (Northern) y 42,5 ml de H<sub>2</sub>O-DEPC. Tras la fusión se controla la temperatura y cuando ésta baja a 60 °C se le adicionan 2,5 ml de formaldehído al 37%.

**SSC 20x:**

NaCl 3 M

Citrato sódico 0,3 M pH=7,0

**Solución de hibridación:**

Tampón de hibridación ultrasensible (Ambion). Debe calentarse a 60 °C unos minutos antes de su uso para eliminar grumos.

• **Notas:**

Las soluciones de acetato sódico y EDTA deben prepararse con H<sub>2</sub>O-DEPC. Se trabaja siempre en campana de extracción y las cubetas de electroforesis deben limpiarse antes de su uso con NaOH 0,1 M + EDTA 20 mM durante 15 minutos. Después se neutraliza con HCl 0,1 M durante 5 minutos y por último se lavan varias veces con agua destilada.

---

Protocolo 34. **Análisis de secuencias aminoacídicas**

---

Cuando se quiso conocer la secuencia aminoacídica correspondiente a las secuencias nucleotídicas obtenidas se consultó la página web <http://www.expasy.com/tools>. Asimismo se pudieron realizar predicciones sobre el punto isoeléctrico, masa proteica, dominios transmembrana, lugares de corte, etc... de la proteína objeto de estudio.

Los estudios sobre la estructura hipotética de la proteína se realizaron consultando la siguiente página web <http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred>. El programa Rasmol se utilizó para poder ver la estructura predicha de la proteína en dibujo tridimensional.

Resultados



- 1. Estudio de la diversidad de hongos formadores de micorrizas arbusculares en la rizosfera de olivos de la provincia de Jaén**



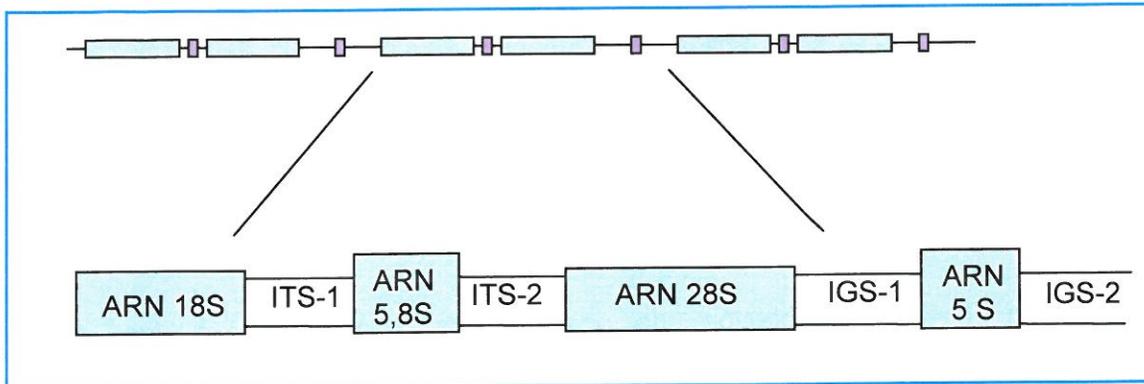
## **1. Estudio de la diversidad de hongos formadores de micorrizas arbusculares en la rizosfera de olivos de la provincia de Jaén**

Las comunidades microbianas del suelo están muy interrelacionadas y su funcionamiento depende en gran medida de la presencia de las plantas (Barea & Olivares, 1998). Concretamente, la composición de las comunidades de hongos micorrícicos está fuertemente influenciada por las especies vegetales predominantes (Burrows & Pflieger, 2002).

La posible adaptación de los hongos micorrícicos a las condiciones medioambientales específicas de cada zona geográfica hace de las poblaciones nativas objeto fundamental de las investigaciones enfocadas a la manipulación racional de los mismos en dichas zonas (Romero *et al.*, 1999; Requena *et al.*, 2001). Es por ello que en el presente estudio se prestó especial atención a los hongos micorrícicos presentes en los suelos en donde se cultiva tradicionalmente: el olivo. El primer paso fue abordar el análisis de la diversidad de los hongos micorrícicos presentes en dichos suelos, antes de investigar la importancia de su actividad biológica.

Los estudios de identificación basados en criterios morfológicos plantean dificultades que podrían eliminarse mediante el uso de técnicas moleculares, con las que sería posible desarrollar marcadores genéticos que permitieran nuevas aproximaciones en el estudio de la diversidad y estructura de las poblaciones de hongos micorrícicos en distintos ecosistemas (Barker *et al.*, 2002; Redecker *et al.*, 2002, Schüßler, 2002). Los métodos moleculares permiten la identificación de los hongos micorrícicos independientemente de criterios morfológicos. La mayoría de las técnicas moleculares se limitan a genes concretos de estos hongos y normalmente sólo se han utilizado sobre hongos de colección. Entre los genes más empleados en este tipo de estudios se encuentran los que codifican para el ARN ribosómico (ADNr), las unidades de ADNr están compuestas de varios tipos de regiones: tres regiones codificadoras muy conservadas (18s, 5,8s y 28s), regiones espaciadoras de

transcripción interna (ITS) que presentan cierto grado de variación y las regiones intergénicas (IGS), que son muy variables (Figura 5).



**Figura 5.** Unidad repetitiva de ADNr en eucariotas

El desarrollo de las técnicas moleculares supuso un paso adelante para caracterizar las poblaciones naturales de los hongos micorrícicos. Sin embargo, a pesar de las ventajas de estas técnicas en estudios de diversidad, se recomienda complementar la caracterización de los hongos aislados mediante estudios morfológicos y ontogenéticos (Prosser, 2002). Tal y como se representa en la Figura 6 (Clapp *et al.*, 2002) las diferentes técnicas de identificación deben conjugarse para obtener resultados más globales y cercanos a la realidad del suelo.

Hongos micorrícicos	Caracterización molecular	Cultivos puros	Observación de esporas
Abundantes en las raíces. Ausentes o muy bajo número de esporas en el suelo.			
Las raíces raramente están colonizadas. Aislamiento fácil de esporas del suelo. Fácilmente cultivables.			
Abundantes en raíces. Esporas presentes en el suelo y en plantas trampa. No cultivables.			
Presentes sólo en cultivos de colección. No se encuentran ni en raíces ni como esporas en el suelo.			
Esporas en el suelo. Ausentes en raíces y cultivos trampa.			

Figura 6. Metodologías para el estudio de la diversidad micorrícica en suelos.

## 1.1. Aislamiento y caracterización molecular de los hongos micorrícicos procedentes de la rizosfera del olivo

### 1.1.1. Hongos micorrícicos aislados

Se tomaron muestras de suelo rizosférico de olivo crecido en condiciones naturales en la provincia de Jaén. El pH del suelo y la localización de las muestras se recoge en la Tabla 2.

**Tabla 2.** pH de las muestras de suelo tomadas y coordenadas del lugar donde fueron tomadas.

	<b>Población</b>	<b>pH</b>	<b>Latitud</b>	<b>Longitud</b>
<b>Muestra nº 1</b>	Porcuna	7,85	37: 56: O:N	4: 14: O:W
<b>Muestra nº 2</b>	Mancha Real	7,17	37: 42: O:N	4: 11: O:W

Las muestras presentaban fragmentos aislados de raíces. Se comprobó que éstos contenían estructuras micorrícicas en su interior. Se aislaron seis hongos micorrícicos de ambas muestras de suelo rizosférico (siguiendo el Protocolo 1) que se identificaron por sus características morfológicas. D<sup>a</sup> Custodia Cano y el Dr. John Dodd (UK) realizaron dicha caracterización morfológica en los laboratorios de Microbiología de la Estación Experimental del Zaidín. Posteriormente fueron depositados en el Banco Europeo de Glomales (BEG). Todos los morfotipos pertenecían al género *Glomus*. Las especies y sus números de identificación en el BEG se muestran en la Tabla 3.

### 1.1.2. Producción de inóculo puro

De acuerdo con el Protocolo 3 se inició la producción de inóculo de cada una de las especies aisladas e identificadas. Tras 3 ó 4 meses se obtuvieron los inóculos puros correspondientes a cada especie de hongo aislado. Estos inóculos consistían en una mezcla de suelo con diversos tipos de propágulos micorrízicos, básicamente esporas, raíces micorrizadas y restos de hifas del micelio externo. A continuación se estimó el potencial infectivo de los distintos inóculos mediante el método del Número Más Probable (NMP) (Protocolo 4).

### 1.1.3. Caracterización molecular de los hongos micorrízicos aislados

Para poder verificar su identificación morfológica los hongos micorrízicos aislados se caracterizaron genéticamente utilizando técnicas basadas en la PCR. A partir de ADN genómico se amplificó parte de la subunidad ribosómica pequeña (SSU) del ARNr (Protocolo 10). Se obtuvieron bandas de aproximadamente 550 pares de bases nucleotídicas en cada caso, las cuáles fueron eluidas (protocolo 27) y secuenciadas. Las secuencias obtenidas se compararon con las de la base de datos del NCBI (National Center of Biotechnology Information), encontrándose un porcentaje de identidad superior al 89% con secuencias de la SSU ARNr de otros aislados de hongos micorrízicos (Tabla 4). Las secuencias obtenidas se incluyeron en la base de datos europea EMBL y los números de acceso asignados se muestran en la Tabla 3.

Asimismo se caracterizaron molecularmente los hongos micorrízicos *Glomus mosseae* (BEG 119) y *Glomus intraradices* (EEZ-1) de la colección de la Estación Experimental del Zaidín ya que también se utilizarían como inoculantes micorrízicos en futuros experimentos. El alineamiento de todas las secuencias obtenidas se muestra en la Figura 7.





BEG 119	ACCATAAACTATGCCGACTAGGGATCGGATGATGTTAATTTTTTAATGACTCATTCCGGCG	536
BEG 122	ACCATAAACTATGCCGACTAGGGATCGGATGATGTTAATTTTTTAATGACTCATTCCGGCG	537
BEG 124	ACCATAAACTATGCCGACTAGGGATCGGATGATGTTAATTTTTTAATGACTCATTCCGGCG	537
BEG 125	ACCATAAACTATGCCGACTAGGGATCGGATGATGTTAATTTTTTAATGACTCATTCCGGCG	536
BEG 126	ACCATAAACTATGCCGACTAGGGATCGGATGATGTTAATTTTTTAATGACTCATTCCGGCG	536
BEG 121	ACCATAAACTATGCCGACTAGGGATCGGATGATGTTAATTTTTTAATGACTCATTCCGGCG	536
BEG 123	ACCATAAACTATGCCGACTACGG-TCGGATGATGTTAATTTTTTAATGACTCATTCCGGCG	536
EEZ-1	-CCATAA-CTATGCCGACTAGGGATCGGATGATGTTAATTTTTTAATGACTCATTCCGGCG	534
	***** ***** ** *****	
BEG 119	CCTTACGGGAAACA	550
BEG 122	CCTTACGGGAAACA	551
BEG 124	CCTTACGGGAAACA	551
BEG 125	CCTTACGG-AAACA	549
BEG 126	CCTTACGGGAAACA	550
BEG 121	CCTTACGGGAAAC-	549
BEG 123	CCTTACGGGAAACA	550
EEZ-1	CCTTACGGGAAACA	548
	***** ****	

**Figura 7.** Alineamiento de las secuencias nucleotídicas obtenidas de los hongos micorrícicos aislados de la rizosfera de olivo, tras la amplificación de la pequeña subunidad del ARNr con los cebadores NS31 y AM1, descritos en el protocolo 10. En el alineamiento se han incluido también dos hongos de la colección de la EEZ (*Glomus mosseae*, BEG 119 y *Glomus intraradices*, EEZ-1) utilizados en algunos de los estudios llevados a cabo. Éstos se han caracterizado morfológicamente y molecularmente siguiendo las mismas metodologías que para los hongos aislados de la rizosfera de olivo. En color negro se muestran los sitios idénticos entre las secuencias y en color rojo las distintas.

**Tabla 4.** Grado de homología que presentan las secuencias nucleotídicas obtenidas de cada uno de los ADNr de los distintos hongos MA ensayados con secuencias ribosómicas de otros hongos micorrízicos incluídas en las bases de datos. Datos expresados en %.

	<i>G. intraradices</i> EEZ-1 (AJ505615)	<i>G. mosseae</i> BEG 119 (AJ505614)	<i>G. intraradices</i> BEG 121 (AJ536822)	<i>G. mosseae</i> BEG 122 (AJ505616)	<i>G. intraradices</i> BEG 123 (AJ505617)	<i>G. mosseae</i> BEG 124 (AJ505618)	<i>G. clarum</i> BEG 125 (AJ505619)	<i>G. viscosum</i> BEG 126 (AJ505620)
<i>G. viscosum</i> BEG27 (Y17652)	89,58	91,06	89,98	91,27	89,23	91,09	90,68	89,6
<i>G. viscosum</i> EEZ34 (AJ50812)	93,24	95,98	93,26	96,18	97,62	95,99	95,6	99,09
<i>G. viscosum</i> BEG 126 (AJ505620)	92,69	95,43	92,88	95,63	92,34	93,99	95,23	100
<i>G. viscosum</i> EEZ20 (AJ50813)	93,24	95,61	93,08	95,81	92,34	95,63	95,6	98,18
<i>G. mosseae</i> BEG 69 (U96141)	94,52	99,635	94,35	99,82	93,61	99,64	98,36	95,44
<i>G. coronatum</i> (AJ276086)	93,97	98,72	93,99	98,91	93,25	98,73	97,99	95,26
<i>G. mosseae</i> BEG 119 (AJ505614)	94,51	100	94,33	99,82	92,88	99,64	98,53	95,43
<i>G. mosseae</i> BEG 122 (AJ505616)	94,71	99,82	94,54	100	93,81	99,82	98,54	95,63
<i>G. mosseae</i> BEG 124 (AJ505618)	94,53	99,64	94,35	99,82	93,99	100	98,72	95,63
<i>G. mosseae</i> (AJ306438)	94,15	99,27	93,99	99,45	93,24	99,27	97,99	95,06
<i>G. fasciculatum</i> BEG 53 (Y17640)	99,09	94,88	98,54	95,08	97,81	94,9	94,14	93,07
<i>G. intraradices</i> (AJ301859)	99,27	94,52	98,36	94,72	97,63	94,54	93,77	92,7
<i>G. intraradices</i> BEG 123 (AJ505617)	97,62	92,88	99,27	93,81	100	93,99	93,21	92,34
<i>G. intraradices</i> EEZ-1 (AJ505615)	100	94,51	98,36	94,71	97,62	94,53	93,75	93,75
<i>G. intraradices</i> (X58725)	99,45	94,69	98,54	94,89	97,81	94,71	93,42	93,42
<i>G. clarum</i> (AJ276084.1)	96,53	93,97	96,72	94,17	95,99	93,99	93,59	91,97
<i>G. clarum</i> BEG 125 (AJ505619)	93,75	98,53	93,59	98,54	93,21	98,72	100	95,23

## 1.2. Análisis filogenético

El posterior análisis filogenético (Protocolo 12) de las secuencias obtenidas en este estudio y otras seleccionadas de la base de datos pertenecientes a hongos micorrícicos mostró que las nuevas secuencias de las distintas especies de los hongos aislados de la rizosfera de olivo se agrupan con las secuencias de las mismas especies obtenidas en otros laboratorios (Figura 8). Como grupo externo de referencia (*outgroup*) se utilizó *Geosiphon pyriforme*, el ancestro más antiguo de los Glomerales (Gehrig *et al.*, 1996).

La secuencia de *G. clarum* (BEG 125) se agrupa en una rama diferente a los otros *G. clarum* presentes en la base de datos. El número de acceso de las secuencias utilizadas se muestra en la siguiente Tabla 5.

**Tabla 5.** N° de acceso en el EMBL de las secuencias de la SSU utilizadas en el análisis filogenético

Y15905	<i>Geosiphon pyriforme</i>	AJ306438	<i>G. mosseae</i>
AJ301862	<i>G. brasilianum</i>	AJ276086	<i>G. coronatum</i>
AJ133706	<i>G. sinuosum</i>	AJ276087	<i>G. coronatum</i>
Y17648	<i>G. manihotis</i>	Y17653	<i>G. caledonium</i> – BEG 15
AF213462	<i>G. proliferum</i>	AJ505619	<i>G. clarum</i> – BEG 125
AJ276084.1	<i>G. clarum</i>	AJ276085	<i>G. fragilistratum</i>
AJ276084.2	<i>G. clarum</i>	AJ245637	<i>G. geosporum</i>
AJ505617	<i>G. intraradices</i> – BEG 123	AJ301858	<i>G. verruculosum</i>
AJ536822	<i>G. intraradices</i> – BEG 121	AJ505813	<i>G. viscosum</i> – EEZ-20
AJ505615	<i>G. intraradices</i> – EEZ 1	AJ505620	<i>G. viscosum</i> – BEG 126
X58725	<i>G. intraradices</i>	AJ505812	<i>G. viscosum</i> – EEZ 34
AJ301859	<i>G. intraradices</i>	AJ506091	<i>G. claroideum</i>
Y17640	<i>G. fasciculatum</i> – BEG 53	Y17652	<i>G. viscosum</i> – BEG 27
AF231760	<i>G. fasciculatum</i>	Y17639	<i>G. etunicatum</i>
AJ505618	<i>G. mosseae</i> – BEG 124	AJ276087	<i>G. lamellosum</i>
AJ505614	<i>G. mosseae</i> – BEG 119	AJ276079	<i>G. claroideum</i>
AJ505616	<i>G. mosseae</i> – BEG 122	AJ276075	<i>G. claroideum</i>
U96141	<i>G. mosseae</i> – BEG 69	AJ276089	<i>G. luteum</i>



- 2. Estudio de la formación de micorrizas y de sus efectos sobre el crecimiento y la nutrición de plantas de olivo**



## **2. Estudio de la formación de micorrizas y de sus efectos sobre el crecimiento y la nutrición de plantas de olivo**

En el pasado no era frecuente que los olivareros utilizaran técnicas para determinar las necesidades nutricionales, sino que de forma rutinaria solían emplear fórmulas preestablecidas, sin tener en cuenta el estado nutritivo de los árboles, ni el nivel de fertilidad del suelo (Muñoz *et al.*, 1998). En una situación de buena rentabilidad del cultivo y cuando el coste del abonado casi nunca llega a alcanzar el 5-10% del total de los costes del cultivo es normal que los olivareros abonen en exceso sus olivos (Rallo, 1998). Sin embargo, hay que considerar que un buen programa de fertilización debe minimizar el aporte de fertilizantes al olivar y corregir las deficiencias y excesos de elementos minerales, consiguiéndose así una máxima rentabilidad del gasto realizado, y una mejor conservación del medio ambiente.

Dados los reconocidos efectos de los hongos MA como biofertilizantes, se consideró que una estrategia posible para racionalizar la fertilización del olivo, siguiendo criterios de sostenibilidad, podría ser la inoculación de las plantas con hongos micorrícicos. La conveniencia de introducir hongos formadores de micorrizas en un suelo agrícola (o forestal), como biofertilizantes, debe pasar por un análisis previo del grado de micotrofia de la planta o cultivar objeto del cultivo, del sistema de cultivo y, en caso de conveniencia, de las posibilidades de manipulación racional de la simbiosis. Como se mencionó en la Introducción General de esta Memoria, tan sólo se dispone de un trabajo de investigación en el que se hayan aplicado hongos MA en plantas de olivo que se obtuvieron mediante estaquillado semileñoso. (Roldán-Fajardo & Barea, 1986).

En el presente estudio se investigó la contribución de las micorrizas a la optimización fisiológica de plantas micropropagadas de olivo. Aspectos clave del funcionamiento de las micorrizas, y en consecuencia del aporte de nutrientes a la planta son, una buena colonización intrarradical de la misma, con la formación de abundantes arbusculos, así como el desarrollo de una extensa red de micelio extrarradical que permita explorar un amplio volumen de suelo (Estaún *et al.*, 2002). Los distintos hongos micorrícicos difieren en cuánto

a sus características fisiológicas y su capacidad para estimular el desarrollo de distintas plantas (Van der Heijden & Kuyper, 2001). Por ello, es fundamental la selección de hongos micorrícicos efectivos en cuanto a la promoción del crecimiento y del estado nutritivo de la planta objeto de estudio (Feldmann & Grotkass, 2002). En los estudios que se describen a continuación se probó la eficacia en plántulas micropropagadas de olivo de los distintos hongos aislados, junto con algunos hongos pertenecientes a la colección de la EEZ, empleados como referencia.

La determinación de la colonización por los hongos micorrícicos es importante, así como la visualización y evaluación de las distintas estructuras del hongo. Por ello en los estudios que recoge este Capítulo se efectuaron observaciones tanto al microscopio óptico, como al microscopio electrónico. Se pretende mostrar una evidencia directa de la plasticidad de los hongos micorrícicos y su capacidad de adaptación a los distintos ambientes en los que se desarrollan (celulares, intercelulares o extracelulares) (Bonfante & Perotto, 2000; Bonfante, 2001).

### **2.1. Determinación de la densidad óptima de inóculo**

Este estudio se diseñó con el fin de conocer la densidad de inóculo óptima para conseguir un adecuado nivel de micorrización y una mejora en el crecimiento y estado nutricional de la planta y así evitar el consumo innecesario de inoculante. Se inoculó para ello el hongo micorrícico *Glomus intraradices* (EEZ-1) a tres concentraciones distintas (1, 5 y 10%). Los datos de crecimiento y micorrización de las plántulas tanto de la variedad Arbequina como Leccino, a las 13 y 19 semanas de crecimiento, se muestran en las Tablas 6 y 7.

Las plántulas de olivo micropropagadas de la variedad Arbequina presentaron un marcado carácter micotrófico dado que el establecimiento de la simbiosis mejoró su crecimiento significativamente. Los resultados obtenidos mostraron una misma tendencia en las dos variedades estudiadas aunque los valores de las variables de respuesta analizadas difieren notablemente en ambos tipos de plántulas. Los resultados resumidos en la Tabla 7 muestran que las plantas de la variedad Arbequina son más dependientes de la formación de la micorriza para alcanzar un desarrollo óptimo que aquellas de la variedad Leccino. En la primera cosecha de plantas de la variedad Arbequina se apreciaron diferencias significativas entre la altura de las plantas micorrizadas y las control (Tabla 6), diferencias que se fueron acentuando con el tiempo. En cambio, en las plantas de la variedad Leccino, con mayor porte que Arbequina, la micorrización ejerció efectos significativos sólo en la segunda cosecha.

**Tabla 6.** Valoración del carácter micotrófico y la concentración óptima de inóculo del hongo micorrízico *G. intraradices* para las dos variedades comerciales de olivo estudiadas, a las 13 semanas de crecimiento.

Variables experimentales		Variables de respuesta *			
Variedad de olivo	Concentración de inóculo micorrízico **	Altura (cm)	Peso húmedo de la parte aérea (g)	Peso húmedo de la raíz (g)	Colonización micorrízica (%)
<b>Arbequina</b>					
Control		6,18 a	0,68 a	0,66 a	0 a
<i>G. intraradices</i>	1%	7,47 ab	0,72 a	0,58 a	35 bc
	5%	8,47 b	0,72 a	0,59 a	25 b
	10%	7,81 b	0,73 a	0,50 a	46 c
<b>Leccino</b>					
Control		12,08 a	1,27 a	0,93 a	0 a
<i>G. intraradices</i>	1%	9,84 a	1,01 a	0,77 a	4 a
	5%	12,69 a	1,27 b	1,01 a	18 b
	10%	12,69 a	1,34 b	1,03 a	19 b

\* Para cada variedad de olivo y parámetro estudiado, los datos que no comparten una letra en común difieren significativamente ( $P < 0,05$ ) según el Test de la Mínima Diferencia Significativa de Fisher.

\*\* Número de propágulos micorrízicos aplicados: 1%= 75; 5%= 375 y 10%=750

**Tabla 7.** Valoración del carácter micotrófico y la concentración óptima de inóculo del hongo micorrízico *G. intraradices* para las dos variedades comerciales de olivo estudiadas, a las 19 semanas de crecimiento.

Variables experimentales		Variables de respuesta *				
Variedad de olivo	Concentración de inóculo micorrízico **	Altura (cm)	Peso húmedo de la parte aérea (g)	Peso húmedo de la raíz (g)	Colonización micorrízica (%)	Eficiencia del inóculo*** (%)
<b>Arbequina</b>						
Control		7,9 a	1,03 a	1,40 ab	0 a	
<i>G. intraradices</i>	1%	15,1 b	1,78 b	1,17 a	51 b	39 a
	5%	16,3 b	2,16 b	1,75 b	52 b	80 b
	10%	16,4 b	2,18 b	1,74 b	67 c	64 b
<b>Leccino</b>						
Control		22,7 a	3,08 a	2,08 ab	0 a	0 a
<i>G. intraradices</i>	1%	22,5 a	3,03 a	1,95 a	25 b	-16 a
	5%	29,3 b	3,66 b	2,36 b	41 c	5 b
	10%	29,6 b	3,85 b	2,36 b	37 c	7 b

\* Para cada variedad de olivo y parámetro estudiado, los datos que no comparten una letra en común difieren significativamente ( $P < 0,05$ ) según el Test de la Mínima Diferencia Significativa de Fisher.

\*\* Número de propágulos micorrízicos aplicados: 1% = 75; 5% = 375 y 10% = 750

\*\*\* Basado en el peso seco de la parte aérea

De los resultados obtenidos se deduce que la aplicación de una dosis intermedia de inóculo micorrícico, equivalente a 375 propágulos por planta, puede ser considerada como una dosis óptima de inóculo. El aporte de cantidades superiores de propágulos, a pesar de aumentar el nivel de colonización micorrícica, no indujo ninguna mejora significativa sobre el crecimiento en ninguna de las dos variedades de olivo objeto de estudio. Así lo confirman también los datos de eficiencia del inóculo.

## **2.2. Efecto de diferentes hongos MA sobre el crecimiento de las plántulas (Arbequina/Leccino)**

Una vez determinada la dosis óptima de inóculo a emplear, se procedió a evaluar la eficacia de los distintos hongos micorrícicos aislados de la rizosfera de olivo. Como hongos de referencia se emplearon los procedentes de la colección de la EEZ, *Glomus mosseae* (BEG 119) y *Glomus intraradices* (EEZ-1). Los datos de crecimiento y micorrización de las plantas, a las 19 semanas de crecimiento se muestran en las Tablas 8 y 9. Estos resultados corroboran que el nivel de dependencia de las micorrizas y de colonización de las raíces son superiores en la variedad Arbequina. *G. intraradices* (BEG 123) y *G. viscosum* (BEG 126), ambos endofitos aislados de la rizosfera de plantas de olivo en la provincia de Jaén, fueron los más efectivos en cuanto a mejorar el desarrollo de las plantas micropropagadas de las dos variedades de olivo. Los hongos de colección *G. mosseae* (BEG 119) y *G. intraradices* (EEZ-1) mostraron una eficacia intermedia. El hongo *G. intraradices* (BEG 123), aislado de la rizosfera de olivo fue más efectivo que su homólogo *G. intraradices* EEZ-1 procedente de cultivos de colección de la Estación Experimental del Zaidín, y que el *G. intraradices* (BEG 121) también procedente de la rizosfera de olivo. Las diferencias en cuanto a eficacia simbiótica entre los distintos *Glomus mosseae* empleados fueron menos destacadas, aunque también las había. Mientras que la variedad Arbequina respondía mejor al *G. mosseae* BEG 119, Leccino lo hizo al *G. mosseae* BEG 122 (procedente de la rizosfera del olivo).

El otro hongo utilizado *Glomus clarum* mostró una eficacia intermedia sobre las plántulas de la variedad Arbequina, y nula en Leccino, probablemente debido a su dificultad para colonizar la planta.

En general el efecto de la micorriza se manifestó fundamentalmente en el desarrollo de la parte aérea de la planta, mientras que la raíz resultaba poco o nada afectada por el establecimiento de la simbiosis.

**Tabla 8.** Efectividad de los hongos micorrizcos aislados de la rizosfera de olivo, en comparación con la de otros dos usos de referencia y procedentes de la colección de la EEZ, *Glomus mosseae* (BEG 119) y *Glomus intraradices* (EEZ-1), como inoculantes de la variedad comercial Arbequina.

Inóculo micorrizco**	Variables de respuesta*					Eficiencia del inóculo*** (%)
	Altura (cm)	Peso húmedo de la parte aérea (g)	Peso húmedo de la parte aérea (g)	Colonización micorrizca (%)		
Control	8,6 a	1,0 a	1,4 abc	0 a		
<i>G. intraradices</i> (BEG 121)	17,1 c	1,9 cd	1,4 abc	70 d		48 c
<i>G. mosseae</i> (BEG 122)	12,9 b	1,6 bc	1,1 a	45 b		18 a
<i>G. intraradices</i> (BEG 123)	21,1 d	2,5 e	2,1 de	72 d		114 e
<i>G. mosseae</i> (BEG 124)	15,2 bc	1,7 bc	1,1 a	53 bc		43 c
<i>G. clarum</i> (BEG 125)	12,4 b	1,5 b	1,5 bc	55 c		27 b
<i>G. viscosum</i> (BEG 126)	21,5 d	2,6 e	2,2 e	57 c		100 e
<i>G. mosseae</i> (BEG 119)	15,5 bc	1,9 cd	1,2 ab	77 d		36 b
<i>G. intraradices</i> (EEZ-1)	16,3 c	2,2 d	1,8 cd	52 bc		80 d

\* Para cada variedad de olivo y parámetro estudiado, los datos que no comparten una letra en común difieren significativamente ( $P < 0,05$ ) según el Test de la Mínima Diferencia Significativa de Fisher.

\*\* Número de propágulos micorrizcos aplicados: 5% = 375

\*\*\* Basado en el peso seco de la parte aérea

**Tabla 9.** Efectividad de los hongos micorrizicos aislados de la rizosfera de olivo, en comparación con dos cepas de referencia de la colección de la EEZ, *Glomus mosseae* (BEG 119) y *Glomus intraradices* (EEZ-1), como inoculantes de la variedad comercial Leccino.

Variables de respuesta*						
Inóculo micorrizico**	Altura (cm)	Peso húmedo de la parte aérea (g)	Peso húmedo de la raíz (g)	Colonización micorrizica (%)	Eficiencia del inóculo*** (%)	
Control	22,7 a	3,1 ab	2,1 ab	0		
<i>G. intraradices</i> (BEG 121)	28,9 cde	3,7 cd	2,0 ab	39 cd	9 b	
<i>G. mosseae</i> (BEG 122)	28,3 cd	3,6 c	2,2 abc	31 bc	8 b	
<i>G. intraradices</i> (BEG 123)	31,0 e	4,1 d	2,7 d	21 b	15 c	
<i>G. mosseae</i> (BEG 124)	23,7 ab	3,2 b	2,5 cd	21 b	-13 a	
<i>G. clarum</i> (BEG 125)	21,9 a	2,7 a	1,9 a	3 a	-6 a	
<i>G. viscosum</i> (BEG 126)	30,1 de	3,6 c	2,3 abcd	38 cd	6 b	
<i>G. mosseae</i> (BEG 119)	26,3 bc	3,2 b	2,1 ab	31 c	-10 a	
<i>G. intraradices</i> (EEZ-1)	29,3 de	3,7 c	2,4 bcd	41 d	5 b	

\* Para cada variedad de olivo y parámetro estudiado, los datos que no comparten una letra en común difieren significativamente ( $P < 0,05$ ) según el Test de Diferencias Significativas Fisher's Protected.

\*\* Número de propágulos micorrizicos aplicados: 5% = 375

\*\*\* Basado en el peso seco de la parte aérea

### **2.3. Efecto de la micorrización sobre el crecimiento de plántulas de la variedad Picual**

La variedad de olivo Picual es fenotípicamente muy cercana a la Leccino, y posee un gran interés agronómico, económico y cultural, fundamentalmente en Andalucía, por ser la variedad más cultivada. Esta variedad, objetivo fundamental de la investigación planteada en la presente Memoria, no se incluyó en los estudios anteriores por no disponer en su momento del material necesario. Es por ello que una vez disponible se planteó un estudio específico sobre ella, utilizando los hongos que mostraron una mayor eficacia en los estudios anteriores.

Los datos de crecimiento y micorrización a los distintos tiempos de corte se muestran en la Tabla 10.

Las plantas micorrizadas con los hongos aislados de la rizosfera de olivo crecieron mejor que las plantas control y las micorrizadas con *Glomus mosseae*. No se detectaron diferencias significativas entre los controles adicionados con ambas dosis de fertilizantes.

**Tabla 10.** Efecto de la inoculación con *G. mosseae*, *G. intraradices* y *G. viscosum* (BEG 119, 123 y 126 respectivamente) sobre el crecimiento y la micorrización de plantas de olivo de la variedad Picual.

Tratamientos *	Parámetros estudiados					
	Altura (cm)		Peso húmedo de la raíz (g)		Colonización micorrízica (%)	
	11 sem	19 sem	24 sem	11 sem	19 sem	24 sem
C-1	11,6 a	13,4 a	14,6 a	0,86 b	1,26 b	1,64 a
C-2	10,9 a	14,2 ab	14,7 a	0,57 a	1,01 ab	1,15 a
<i>G. mosseae</i> BEG 119	11,4 a	15,6 b	16,8 a	0,68 ab	0,74 a	1,50 a
<i>G. intraradices</i> BEG 123	14,3 b	20,5 c	22,9 b	0,71 ab	1,05 b	1,69 a
<i>G. viscosum</i> BEG 126	14,7 b	21,7 c	23,6 b	0,75 ab	1,07 b	1,52 a
C-1	1,30 b	1,66 a	2,05 a	0 a	0 a	0 a
C-2	1,02 a	1,75 a	2,04 a	0 a	0 a	0 a
<i>G. mosseae</i> BEG 119	1,05 a	1,67 a	1,94 a	20 b	18 b	16 b
<i>G. intraradices</i> BEG 123	1,37 b	2,32 b	3,15 b	23 b	51 d	33 c
<i>G. viscosum</i> BEG 126	1,36 b	2,50 b	2,95 b	34 c	25 c	12 b

\* C-1 y C-2 corresponden a plantas control suplementadas con 1 y 2 g/l de fertilizante de liberación lenta respectivamente. Todas las plantas inoculadas con hongos micorrízicos recibieron a su vez 1 g/l del mismo fertilizante.

La concentración de N y P en la parte aérea de las plantas se muestra en la Tabla 11 y el contenido total de N y P en las Figuras 9 y 10. Tanto la concentración como el contenido de N y P en la parte aérea de la planta son superiores en plantas micorrizadas. Las diferencias en el contenido de N y P entre los tratamientos micorrizados y los controles se hacen mucho más evidentes con el paso del tiempo. Los controles adicionados de 2g/l de fertilizante de liberación lenta (C-2), no alcanzaron en ningún momento concentraciones de N y P superiores a las presentadas por plantas micorrizadas.

A las 11 semanas de crecimiento, apenas se detectaban diferencias en el porte de las plantas sometidas a los diferentes tratamientos. A pesar de ello la concentración de N y P era bastante mayor en las plantas micorrizadas. Este incremento fue especialmente destacado en relación al P y aunque los tres hongos micorrícicos promovieron su adquisición, ésta fue notablemente incrementada por *G. intraradices* y *G. viscosum*. A las 19 semanas de crecimiento los hongos MA *Glomus intraradices* (BEG 123) y *Glomus viscosum* (BEG 126) promocionaron significativamente el crecimiento de las plantas y los efectos sobre la adquisición de N y P fueron similares a los obtenidos a las 11 semanas, pero las diferencias fueron aún más pronunciadas.

De los dos nutrientes analizados es sin duda sobre el P, sobre el que se aprecia un efecto más significativo de los hongos micorrícicos. Estos resultados confirman el conocido efecto de las micorrizas mejorando la nutrición fosforada de la planta. Este efecto es especialmente significativo en algunas situaciones, como la que se evidencia en el presente estudio, en la que el P fue el principal factor limitante del crecimiento de las plantas, como lo sugiere la elevada relación N/P en las plantas control, y su disminución en plantas micorrizadas.

	11 semanas			19 semanas		
	N (%)	P (%)	N/P	N (%)	P (%)	N/P
C-1	1,64 a	0,07 a	23,02 b	1,72 a	0,06 a	32,32 a
C-2	1,82 ab	0,09 ab	21,93 b	1,70 a	0,07 a	26,27 a
<i>G. mosseae</i>	2,07 b	0,13 abc	16,05 ab	2,07 ab	0,10 ab	21,42 a
<i>G. intraradices</i>	2,04 b	0,20 c	11,36 a	2,35 b	0,15 b	15,32 a
<i>G. viscosum</i>	1,85 ab	0,17 bc	11,28 a	2,06 ab	0,10 ab	21,08 a

Tabla 11. Porcentaje de N y P en la parte aérea de las plantas de la variedad Picual, así como la relación existente entre ambos nutrientes.

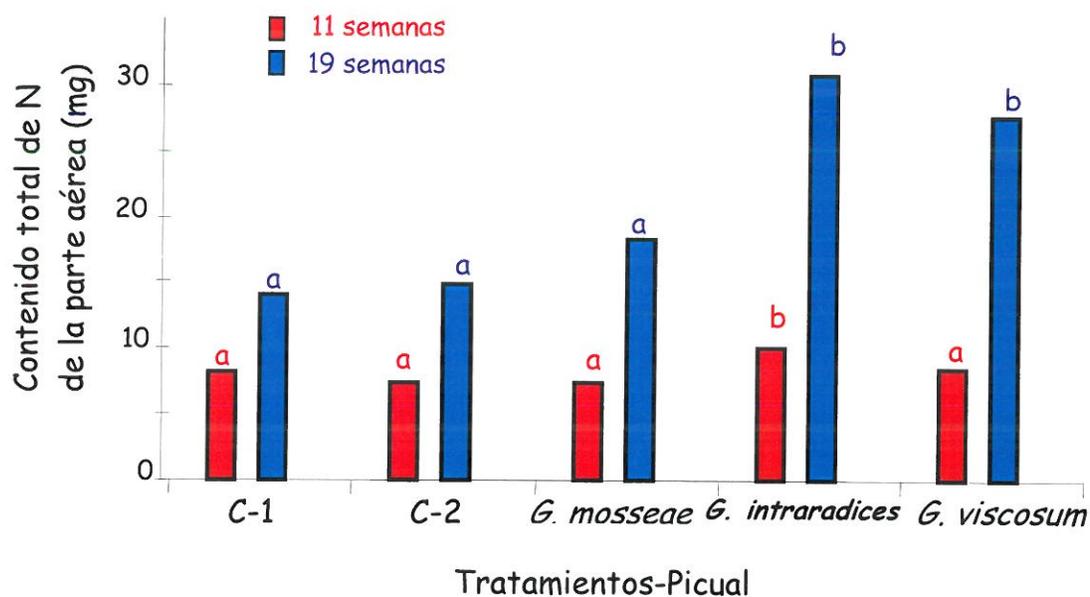
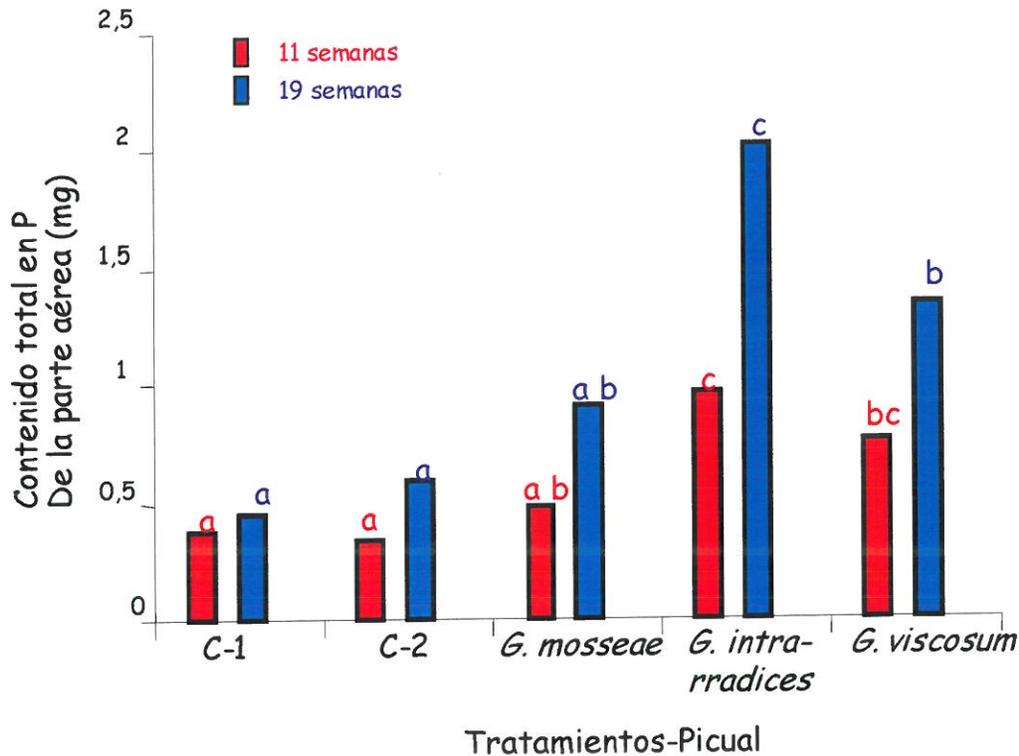


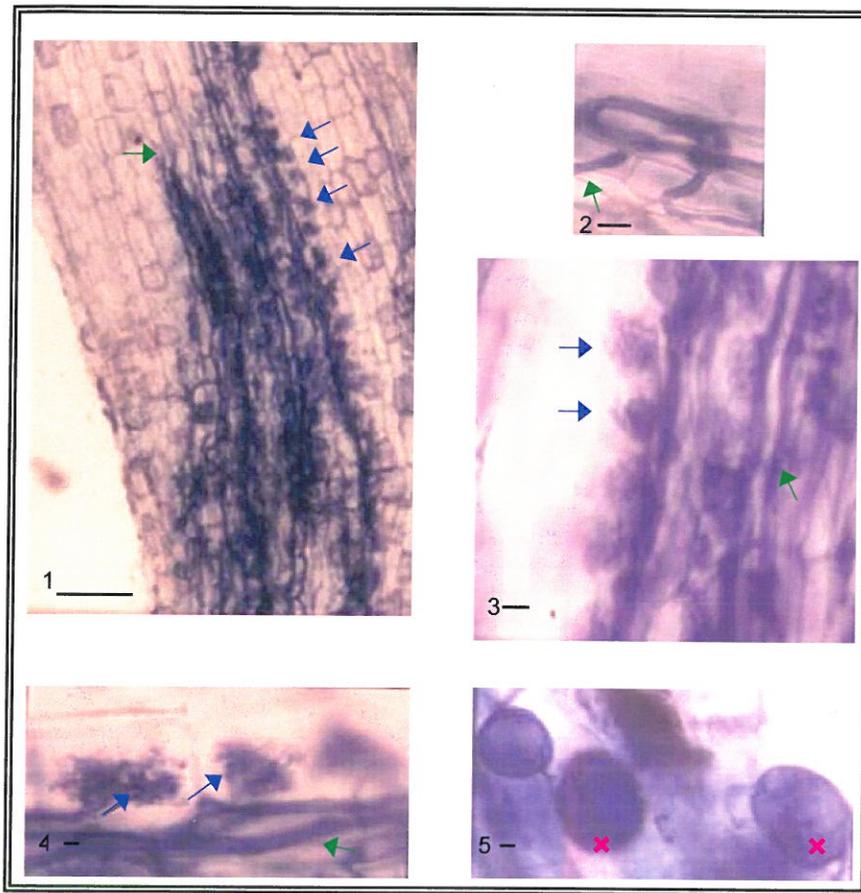
Figura 9. Contenido total de N en la parte aérea de las plantas de la variedad Picual sometidas a los distintos tratamientos tras 11 y 19 semanas de crecimiento.



**Figura 10.** Contenido total de P en la parte aérea de las plantas de la variedad Picual sometidas a los distintos tratamientos tras 11 y 19 semanas de crecimiento.

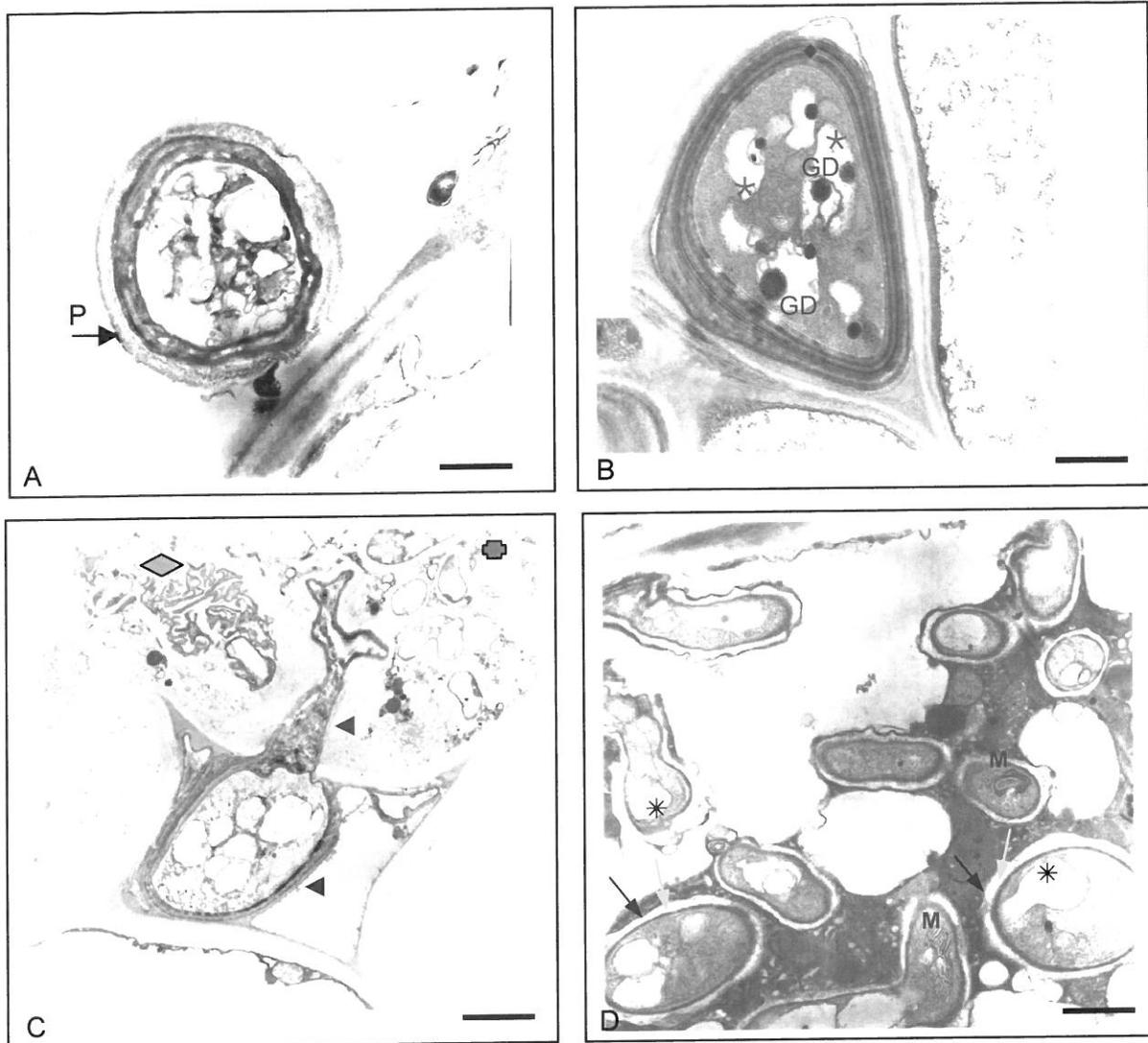
### 2.3.1. Anatomía y ultraestructura de la simbiosis.

Antes de abordar el estudio ultraestructural de la micorriza en plantas de olivo de la variedad Picual se realizaron observaciones de raíces micorrizadas al microscopio óptico, lo que permitió identificar las distintas estructuras típicas de la simbiosis. Las fotografías que se recogen en la Figura 11 ilustran las estructuras características de la micorriza producida por *Glomus intraradices* (BEG 123) en las raíces de plantas de la variedad Picual.



**Figura 11.** 1. Raíz de olivo (var. Picual) colonizada por *G. intraradices*-BEG 123 . 2. Ovillo. 3 y 4. Arbúsculos e hifas intercelulares. 5. Vesículas (X). Las flechas de color azul señalan arbúsculos y las de color verde señalan hifas intercelulares. Barra= 100 µm.

La micorriza producida es de tipo Arum, es decir con presencia de hifas intercelulares que recorren longitudinalmente la raíz (Figura 11.1). A partir de estas hifas intercelulares se producen ramificaciones laterales que colonizan la práctica totalidad de las células más internas del cortex, produciendo numerosos arbúsculos (Figura 11.1, 3 y 4). En las células subepidérmicas se observan con frecuencia circunvoluciones de hifas intracelulares, los denominados ovillos o “coils” (Figura 11.2) y a medida que la colonización envejece comienzan a formarse vesículas, que finalmente se transforman en esporas (Figura 11.5).



**Figura 12.** Micrografías que muestran la ultraestructura de las raíces de plantas de la variedad Picual (*Olea europaea*, L.) colonizadas por hongos micorrícicos. A) Hifa intercelular penetrando o emergiendo de una célula vegetal colonizada, barra=0,5  $\mu\text{m}$  B) Hifa extraradical contactando con la pared de la raíz, barra= 0,25  $\mu\text{m}$  C) Sección transversal de un arbusculo, barra= 0,75  $\mu\text{m}$  D) Hifa intercelular, barra= 0,10  $\mu\text{m}$  (ver texto para más detalles).

La Figura 12 muestra 4 micrografías de secciones transversales ultrafinas (80 nm) de raíces colonizadas y teñidas con acetato de uranilo (protocolos 13 y 14).

### Micrografía A

Sección transversal de una hifa extraradical en las proximidades de una raíz. Obsérvese la pared gruesa (P) con una capa más externa translúcida y otra más interna oscura así como grandes vacuolas y glóbulos lipídicos presentes en el citoplasma de la hifa.

### Micrografía B

Sección transversal de una hifa intercelular. Obsérvese el grosor y la complejidad de la pared celular de *G. intraradices* (BEG 123) que presenta un alto grado de estratificación (♦). El citoplasma contiene vacuolas (☆) y elementos descritos como “gránulos densos” (GD).

### Micrografía C

Sección transversal de un fragmento de raíz colonizado por *G. mosseae* (BEG 119). Se observa una hifa intercelular con glóbulos lipídicos en su interior y que ocupa parte del espacio intercelular que dejan las células corticales (◀). La pared de la hifa es más delgada y con un menor nivel de estratificación que las de *G. intraradices*. A partir de ella se produce una ramificación lateral que penetra en una célula adyacente y constituye el tronco de un arbusculo (◀). Obsérvese como el tronco del arbusculo presenta dos sucesos de división dicotómica. En la célula vegetal colonizada por el hongo, pueden observarse cortes transversales de las ramificaciones más finas del arbusculo. Obsérvese la notable reducción en el grosor de la pared celular del hongo a nivel de esas ramificaciones finas. Parte del arbusculo está colapsado (◊) mientras que en otra parte de la célula las hifas aparecen llenas de contenido y turgentes (⊕).

### Micrografía D

Sección transversal de una célula cortical que contiene un arbusculo. Esta célula también presenta una gran vacuola. Los cortes transversales de las hifas permiten ver la

matriz interfacial (→) que se establece entre la membrana periarbuscular (→) y la pared del hongo. Obsérvese como las hifas del arbusculo están permanentemente rodeadas por la membrana de la célula hospedadora. En el interior de algunas hifas pueden observarse glóbulos lipídicos (\*) y mitocondrias (M).

#### **2.4. Efecto de dosis crecientes de fertilizantes sobre el crecimiento de las plántulas de la variedad Picual.**

En un intento de disponer de plántulas no micorrizadas similares en su nivel de desarrollo al de las micorrizadas, se probó la adición de dosis crecientes del fertilizante. Se pretendía así abordar los estudios bioquímicos y moleculares que se describen en los capítulos posteriores sobre plantas control y micorrizadas lo más parecidas posible y minimizar así los efectos nutricionales de la simbiosis. Con este objetivo se incluyeron tres controles distintos, C-1, C-2 y C-3, adicionados con 1, 2 y 3 g/l de fertilizante de liberación lenta. El corte se realizó a las 19 semanas de crecimiento y los parámetros estudiados se detallan en la Tabla 12. La tendencia observada en la respuesta a la micorrización con los distintos hongos ensayados fue la misma que en el experimento anterior. Se confirmó que la micorrización mejora notablemente el crecimiento de las plántulas siendo el hongo más eficaz *G. intraradices*, seguido de *G. viscosum* y *G. mosseae*. Las plántulas respondieron también a la aplicación de dosis crecientes del fertilizante, aunque sólo la dosis superior (3g/l) produjo un efecto similar al inducido por *G. mosseae*, pero significativamente inferior al provocado por *G. intraradices* y *G. viscosum*.

**Tabla 12.** Efecto de la inoculación con *G. mosseae*, *G. intraradices* y *G. viscosum* (BEG 119, 123 y 126 respectivamente) sobre el desarrollo de plantas de olivo de la variedad Picual a las 19 semanas de crecimiento

Tratamientos*	Variables de respuesta**			
	Altura (cm)	Peso húmedo de la parte aérea (g)	Peso húmedo de la raíz (g)	Colonización micorrícica (%)
C-1	10,7 a	1,22 a	0,95 a	0 a
C-2	12,0 a	1,42 ab	1,17 a	0 a
C-3	16,7 b	1,75 bc	1,24 ab	0 a
<i>G. mosseae</i> BEG 119	16,9 b	1,88 c	1,57 b	24 b
<i>G. intraradices</i> BEG 123	24,9 d	2,90 d	2,13 c	45 c
<i>G. viscosum</i> BEG 126	20,0 c	3,24 d	2,22 c	24 b

\* C-1, C-2, C-3: Controles adicionados respectivamente con 1, 2 y 3 g/l de fertilizante. Las plántulas inoculadas con los hongos micorrícicos se adicionaron a su vez con 1g/l.

\*\* Para cada variedad de olivo y parámetro estudiado, los datos que no comparten una letra en común difieren significativamente ( $P < 0,05$ ) según el Test de la Mínima Diferencia Significativa de Fisher.

## 2.5. Discusión

Existe abundante información sobre los beneficios que reporta la micorrización de plántulas micropropagadas en la mejora de la calidad de las plantas producidas en vivero (Varma & Schuepp 1995; Lovato *et al.*, 1996; Azcón-Aguilar & Barea 1997). Los trabajos se han llevado a cabo con numerosas especies de plantas, entre las que se incluyen leñosas, muchas de ellas difíciles de enraizar. El presente trabajo es el primero que se realiza con plántulas micropropagadas de olivo (*Olea europaea*, L) y avala la potencialidad de la inoculación con hongos micorrícicos seleccionados.

La inoculación dirigida con hongos adecuados parece ser por lo tanto aconsejable para el desarrollo optimizado de las microplántulas, ya que éstas no tienen posibilidad de adquirir la simbiosis de forma natural, dada la necesidad de mantener la esterilidad inherente a las técnicas de micropropagación.

Los primeros estudios demuestran que una dosis de inóculo equivalente a 375 propágulos micorrícicos por planta puede ser considerada óptima. La inoculación con cantidades superiores de propágulos micorrícicos no incrementó el crecimiento de la plantas en otros modelos experimentales (Ortas, 1996; Al-Karaki & Clark, 1999). La producción masiva de inóculo de hongos micorrícicos está limitada por el carácter de simbiontes obligados de estos hongos. En la actualidad la producción de inóculo es un proceso largo y delicado pues implica una serie de precauciones importantes para evitar problemas de contaminación con organismos no deseados como, por ejemplo patógenos (Feldmann & Grotkass, 2002; von Alten *et al.*, 2002). Es conveniente, por lo tanto, ajustar la dosis del mismo para evitar consumos innecesarios.

Los datos de crecimiento obtenidos corroboran la dependencia micorrícica que presentan algunas variedades de plantas de olivo (Roldán-Fajardo & Barea, 1986). De las tres variedades ensayadas en los distintos experimentos, Arbequina fue la que mostró un mayor grado de micotrofia. Las diferencias en el crecimiento promovidas por la micorrización

son superiores en Arbequina que en las plántulas de Leccino y Picual. Esta respuesta diferencial entre variedades está bien documentada en otras especies vegetales (Camprubí & Calvet, 1996; Linderman & Davis, 2001) e implica la necesidad de realizar estudios individualizados de las interacciones simbióticas, a nivel hongo micorrícico y variedad de planta. De las variedades estudiadas fue la Leccino la que mostró un menor grado de micotrofia.

Los hongos micorrícicos aislados de la rizosfera de olivos crecidos en condiciones normales de cultivo en la provincia de Jaén fueron más eficaces en la promoción del crecimiento que los hongos de colección ensayados. Esto hace pensar en una adaptación de esos hongos micorrícicos para establecer una simbiosis eficaz con plántas de olivo. Estos resultados y otros similares obtenidos por otros investigadores para plantas o sistemas distintos refuerzan las estrategias que se siguen en la actualidad tanto en sistemas agrícolas, como en la recuperación de ecosistemas degradados, basados en la inoculación con hongos nativos adaptados a los suelos, plantas y condiciones ambientales predominantes en la zona (Jeffries & Barea, 2001).

Otro aspecto a reseñar es que cuando se compararon hongos micorrícicos pertenecientes a la especie *G. mosseae* (BEG 119, BEG 122 y BEG 124) con los pertenecientes a *G. intraradices* (EEZ-1, BEG 121 y BEG 123), independientemente de su origen, los aislados pertenecientes a la especie *G. intraradices* fueron, en general, más efectivos en la promoción del crecimiento que los pertenecientes a la especie *G. mosseae*. Por lo tanto, hay que considerar que, además del origen, la especie de hongo implicada puede ser también determinante de la eficacia de la simbiosis como se ha sugerido también en otros estudios (Hart & Reader, 2002).

En este sentido, no se encontró correlación entre el grado de micorrización promovida por los hongos inoculados, y la efectividad de los mismos. Esto se ha puesto de manifiesto en muchas situaciones (por ejemplo, Heijden van der *et al.*, 1998; Monzón & Azcón, 2001). En cualquier caso, hay que tener en cuenta que el porcentaje de micorrización es una medida puntual de la colonización del sistema radical por el hongo,

determinada normalmente al final de los experimentos. Posibles diferencias entre especies a nivel de (i) ritmo en la colonización de las raíces, aunque finalmente se alcancen niveles de colonización similares, (ii) desarrollo del micelio externo, aspecto éste de gran importancia en la eficacia de la simbiosis, pero de difícil evaluación debido a su extrema fragilidad, ó (iii) consumo de productos carbonados, podrían justificar diferencias en eficacia entre distintas especies.

Los hongos micorrícicos alivian y compensan las deficiencias nutricionales y juegan un papel muy importante en la adquisición de P, N en algunas ocasiones y en la producción de biomasa (Marschner *et al.*, 1998). En nuestros estudios la relación N/P de la planta decrece en plantas micorrizadas, indicándonos que los hongos micorrícicos han contribuido fundamentalmente a la absorción de P. Sin embargo, como indican los análisis minerales llevados a cabo, también han colaborado en la absorción de N. Resulta obvio de los datos obtenidos que en nuestras condiciones experimentales el factor limitante del crecimiento era el P, y que el efecto promotor de la formación de la simbiosis deriva fundamentalmente del aporte adicional de P a la planta, aunque otros factores, como la adquisición de N, hayan contribuido también, en mayor o menor grado, al efecto promotor de las micorrizas.

En condiciones naturales los olivos suelen crecer en suelos pobres, con bajo contenido en nutrientes como N y P. La mejora en el contenido total de N y, sobre todo, de P en la planta permite pensar en las micorrizas como una herramienta útil y alternativa, o al menos complementaria, a los fertilizantes químicos tradicionales. La explotación de este recurso renovable respetaría la calidad del medio ambiente de acuerdo con el concepto de sostenibilidad (Jiménez-Díaz, 1998).

Una vez determinado el grado de micotrofia de las plántulas de distintas variedades de olivo y puestos de manifiesto los efectos positivos de una adecuada micorrización sobre el crecimiento de la planta y su estado nutritivo se investigaron los cambios producidos por la formación de la simbiosis en la inducción de proteínas con actividades implicadas en la defensa de la planta. Los resultados obtenidos en esos estudios se muestran en el siguiente capítulo.

- 3. Actividades enzimáticas inducidas por la micorrización e implicadas en mecanismos de defensa de plantas de olivo**



### 3. Actividades enzimáticas inducidas por la micorrización e implicadas en mecanismos de defensa de plantas de olivo

La colonización por hongos micorrícicos produce cambios en la anatomía, fisiología y arquitectura de las raíces (Bonfante, 2001; Berta *et al.*, 2002). Algunos de dichos cambios implican la inducción o supresión de determinadas actividades enzimáticas o procesos metabólicos (Pozo *et al.*, 2002).

Concretamente, en diferentes modelos experimentales se han estudiado las actividades hidrolíticas inducidas en la planta por la colonización de los hongos micorrícicos (Pozo *et al.*, 1996, 1998, 1999; Slezack *et al.*, 2000; Dumas-Gaudot *et al.*, 2000). Entre las actividades estudiadas destacan las de  $\beta$ -1,3-glucanasas y quitinasas.

El principal sustrato de las  $\beta$ -1,3-glucanasas es el  $\beta$ -1,3-glucano; compuesto de cadenas de N-acetilglucosamina y presente en las paredes fúngicas de algunos de los hongos formadores de micorrizas pertenecientes a los órdenes Glomerales y Archaeosporales. El sustrato de las quitinasas es la quitina, homopolímero de residuos de N-acetil-D-glucosamina unidos por enlaces  $\beta$ -1,4. Es un componente mayoritario de las paredes celulares de algunos hongos (Balestrini *et al.*, 1994; Gianinazzi-Pearson *et al.*, 1994; Lemoine *et al.*, 1995). Parece lógico pensar que la presencia de hongos micorrícicos desencadenaría la inducción de dichas enzimas hidrolíticas por parte de la planta. Se ha postulado que algunas de tales enzimas estén implicadas en el proceso de colonización micorrícica y en el control sobre el crecimiento intraradical del hongo, limitando los tejidos a colonizar (Lambais, 2000; Pozo *et al.*, 2002).

Además las  $\beta$ -1,3-glucanasas y las quitinasas se regulan diferencialmente en raíces de plantas micorrizadas. Así lo muestran diversos trabajos de investigación (Dumas-Gaudot *et al.*, 1992; Volpin *et al.*, 1994; Dassi *et al.*, 1996; Lambais & Medí, 1996; 1998; Pozo *et al.*, 1999). A pesar de ser enzimas relacionadas con la respuesta de defensa de las plantas frente a patógenos, la sobreexpresión de estas proteínas hidrolíticas no impide en ningún

momento el establecimiento de la simbiosis micorrícica (Shaul *et al.*, 2000). La inducción de  $\beta$ -1,3-glucanasas y quitinasas en raíces micorrizadas podría facilitar a la planta la defensa frente a hongos patógenos en caso de un posterior ataque. Los mecanismos de inducción de estas enzimas hidrolíticas estarían preparados para actuar, con lo que se aceleraría la síntesis de las mismas y su actuación sobre las paredes celulares de los hongos fitopatógenos, con lo que se liberarían componentes de la pared que a su vez podrían funcionar como elicitores de nuevas respuestas de defensa de la planta (Salzer & Boller, 2000). Todo este planteamiento permite pensar en la posible participación de los hongos micorrícicos en el control integrado de enfermedades de las plantas producidas por el ataque de microorganismos patógenos del suelo. Sin duda esta protección se podría ejercer como resultado de un compendio de efectos beneficiosos que ejercen los hongos micorrícicos en la planta tal y como se describió en la Introducción General, entre los cuales podría incluirse la activación de los mecanismos de defensa de la planta.

En el presente Capítulo se describen los resultados obtenidos en el estudio de la inducción de actividades  $\beta$ -1,3-glucanasa y quitinasa en raíces de olivo durante la interacción mutualista con *Glomus mosseae*, *Glomus intraradices* y *Glomus viscosum*. La razón de que las investigaciones se centraran en el estudio de las actividades  $\beta$ -1,3-glucanasa y quitinasa es que estas enzimas hidrolíticas están implicadas en una primera línea de defensa frente a organismos patógenos que contienen glucanos y/o quitina en sus paredes celulares. Ni que decir tiene que este tipo de estudios no se había acometido con anterioridad en plantas de olivo. El material vegetal utilizado en estos estudios fue el procedente de los experimentos descritos en el Capítulo anterior. Concretamente, la investigación se centró en el sistema radical de las plantas por ser ahí donde se desarrolla la simbiosis, y también por ser los procesos que se desencadenan a nivel radical aún más desconocidos que los que tienen lugar a nivel de la parte aérea de la planta.

### 3.1. Contenido proteico de la raíz

En la Tabla 13 se muestran los contenidos proteicos de los extractos radicales correspondientes a los distintos tratamientos ensayados, tras 11, 19 y 24 semanas de crecimiento (Protocolo 15). La concentración en proteínas fue significativamente mayor en las plantas colonizadas por los distintos hongos micorrícicos ensayados, *G. mosseae*, *G. intraradices* y *G. viscosum* en cualquiera de los tiempos de corte practicados. Nuevamente fue *G. intraradices* el que promovió cambios más significativos.

**Tabla 13.** Concentración de proteínas ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) en los extractos crudos de raíz a lo largo del tiempo

Tratamientos*	11 semanas	19 semanas	24 semanas
C-1	0,143 a	0,450 a	0,320 a
C-2	0,148 a	0,510 a	0,315 a
<i>G. mosseae</i>	0,218 b	0,630 b	0,372 b
<i>G. intraradices</i>	0,593 c	1,915 d	1,162 d
<i>G. viscosum</i>	0,441 c	0,969 c	0,618 c

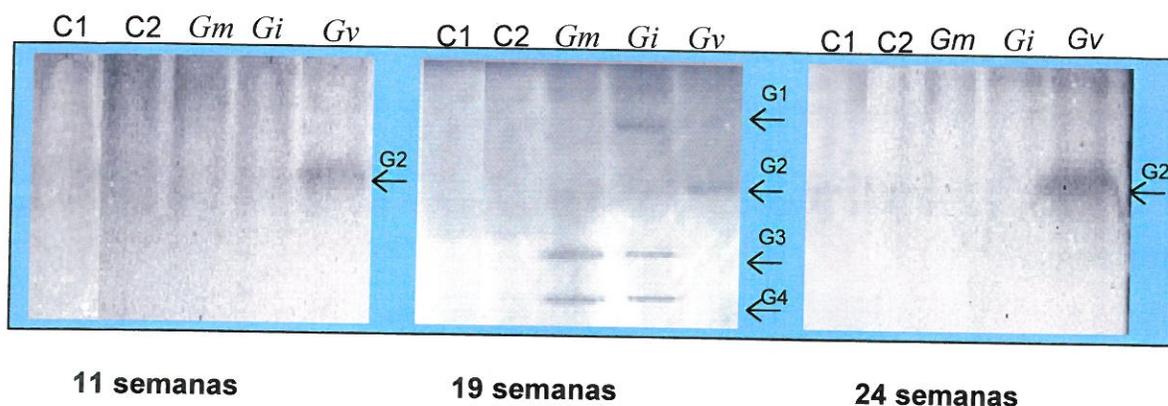
\* C-1 y C-2 corresponden a plantas control suplementadas con 1 y 2 g/l de fertilizante de liberación lenta respectivamente. Todas las plantas inoculadas con hongos micorrícicos recibieron a su vez 1 g/l del mismo fertilizante.

### 3.2. Actividad $\beta$ -1,3-glucanasa ácida

La separación de los extractos proteicos de raíz mediante el sistema Davis para proteínas ácidas y neutras permitió la detección de bandas con actividad  $\beta$ -1,3-glucanasa de carácter ácido o neutro (Protocolos 18 y 20) con distinta movilidad electroforética y a los diferentes tiempos de cosecha, tal y como se observa en la Figura 13.

En la primera cosecha, tras 11 semanas de crecimiento, los extractos proteicos procedentes de las raíces colonizadas por el hongo micorrícico *G. viscosum* mostraron una nueva isoforma con actividad  $\beta$ -1,3-glucanasa ácida. Esta banda G2 se mantendría visible en los geles realizados en los dos tiempos posteriores de cosecha. Las muestras control (C-1 y C-2) no presentaron ninguna banda clara de actividad a ninguno de los tres tiempos estudiados.

Tras 19 semanas de crecimiento, todos los extractos proteicos procedentes de raíces micorrizadas presentaron bandas de actividad  $\beta$ -1,3-glucanasa inducidas respecto a la muestra control. Las isoformas inducidas en las muestras procedentes de raíces colonizadas por los distintos hongos micorrícicos diferían en cuanto a su movilidad electroforética. Tal y como se observa en la Figura 13, a las 19 semanas de crecimiento detectamos una banda con actividad  $\beta$ -1,3-glucanasa G1, en el extracto proteico procedente de raíces micorrizadas por *Glomus intraradices* que no aparece en los demás extractos. Igualmente ocurre con el extracto procedente de raíces micorrizadas por *Glomus viscosum* donde aparece una banda de actividad G2, de mayor movilidad electroforética que G1 y que no aparece en los demás extractos. Asimismo detectamos 2 bandas de actividad G3 y G4 en los extractos proteicos de las raíces colonizadas por *Glomus mosseae* y *Glomus intraradices*. Son las bandas de actividad  $\beta$ -1,3-glucanasa con mayor movilidad electroforética detectadas. Éstas no aparecen en los extractos de raíces control y colonizadas por *Glomus viscosum* en ninguno de los tiempos estudiados. A las 24 semanas de crecimiento, tan sólo se detectó una banda con actividad  $\beta$ -1,3-glucanasa G2 en los extractos proteicos procedentes de raíces micorrizadas por *Glomus viscosum*.



**Figura 13.** Isoformas con actividad  $\beta$ -1,3-glucanasa ácida o neutra de los extractos proteicos de las raíces de olivo no micorrizadas (C1 y C2) o colonizadas con distintos hongos micorrícicos a distintos tiempos de crecimiento. *Glomus mosseae* (Gm), *Glomus intraradices* (Gi) y *Glomus viscosum* (Gv).

### 3.3. Actividad $\beta$ -1,3-glucanasa básica

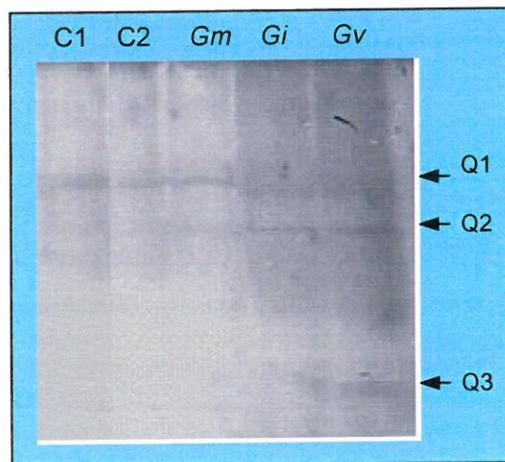
Para la detección de las posibles isoformas con actividad  $\beta$ -1,3-glucanasa básica los extractos proteicos se sometieron a electroforesis a pH ácido de acuerdo con el sistema descrito por Reisfeld *et al.* (1962) (Protocolos 19 y 20). No se detectaron bandas con actividad  $\beta$ -1,3-glucanasa básica en los geles de poliacrilamida a ninguno de ninguno de los tratamientos ensayados, a ninguno de los tres tiempos estudiados.

### 3.4. Actividad quitinasa ácida

La separación electroforética de los extractos proteicos de raíz mediante el sistema Davis para proteínas ácidas y neutras permitió la detección de bandas con actividad quitinasa (Protocolos 18 y 20). En los extractos proteicos de los tratamientos C1, C2 y G.

*mosseae* se detectaron dos bandas de actividad quitinasa de movilidad intermedia, Q1 y Q2. En los extractos proteicos de los tratamientos *G. intraradices* y *G. viscosum* se detectó, además de Q1 y Q2, una nueva banda, Q3, de mayor movilidad electroforética. Cabe destacar que los extractos proteicos de las raíces micorrizadas con *Glomus intraradices* y *Glomus viscosum*, presentaban en general mayor actividad de fondo (Figura 14).

Este patrón isoenzimático no mostró diferencias significativas en los tres cortes practicados.



**Figura 14.** Isoformas con actividad quitinasa ácida o neutra de los extractos proteicos de las raíces de olivo no micorrizadas (C1 y C2) o colonizadas con distintos hongos micorrícicos a distintos tiempos de crecimiento. *Glomus mosseae* (Gm), *Glomus intraradices* (Gi) y *Glomus viscosum* (Gv).

### 3.5. Actividad quitinasa básica

El resultado obtenido fue el mismo que para las  $\beta$ -1,3-glucanasas de carácter básico. No se pudieron visualizar bandas con esta actividad tras separar electroforéticamente los extractos radicales tal como describen los Protocolos 19 y 20.

### 3.6. Discusión

Hasta la fecha no se habían realizado estudios que abordaran la inducción de quitinasas o  $\beta$ -1,3-glucanasas en raíces de olivo en respuesta a la inoculación con hongos micorrícicos. El carácter leñoso del olivo hace difíciles los estudios de este tipo, tanto desde el punto de vista bioquímico como molecular. Sin duda el uso de plantas micropropagadas permite disponer de plántulas más apropiadas con las que investigar los mecanismos de defensa inducidos en estas plantas frente a la colonización por hongos micorrícicos.

El mayor contenido en proteínas de los extractos de raíces micorrizadas indica una actividad metabólica superior en estas raíces. Aunque la metodología de extracción de proteínas descrita en el Protocolo 15 no permite discernir entre proteínas vegetales y fúngicas, el hecho de que la biomasa del hongo asociada a la raíz represente un porcentaje relativamente bajo incluso en una micorriza bien establecida (Toth *et al.*, 1991), hace pensar que el contenido proteico es mayoritariamente de origen vegetal. Este efecto de la micorrización incrementando muy significativamente el contenido en proteínas del sistema radical ("micorriza" propiamente dicho) se ha descrito previamente en otras plantas como girasol (Bago *et al.*, 1997) y tomate (Pozo *et al.*, 2002). No parece existir una relación directa entre la magnitud de la colonización interna y el contenido proteico.

Se asume que el origen de las actividades  $\beta$ -1,3-glucanasas y quitinasas detectadas es vegetal. En el caso de las  $\beta$ -1,3-glucanasas, de las que se detectan nuevas isoformas en los extractos proteicos de raíces micorrizadas, cabría pensar que dichas actividades tuvieran un origen fúngico. Se asume, sin embargo, que son vegetales y esto no es solo por la baja proporción de proteínas del hongo micorrícico del total del contenido proteico obtenido, lo cual dificulta la detección de actividades del hongo, pero no la impide. Esta suposición se basa en estudios previos en los que no fue posible detectar ninguna de estas actividades enzimáticas en extractos de micelio y esporas de hongos micorrícicos (Slezack *et al.*, 1996; Pozo, 1999).

En el presente estudio las raíces del olivo respondieron a la colonización de los hongos micorrícicos con la inducción de nuevas isoformas con actividad  $\beta$ -1,3-glucanasa de carácter ácido. Esta inducción fue temporal en algunos casos, y específica del hongo micorrícico implicado en otros. La inducción de nuevas isoformas con actividad  $\beta$ -1,3-glucanasa por la formación de micorrizas ha sido descrita previamente por Dumas-Gaudot *et al.* (1992) y Dassi *et al.* (1996) en plantas de guisante y por Pozo *et al.* (1999) en plantas de tomate. Al igual que en el presente estudio, la inducción era específica del hongo micorrícico implicado en la simbiosis.

En las raíces colonizadas por los hongos *Glomus mosseae* (BEG 119) y *Glomus intraradices* (BEG 123) solo pudo observarse una inducción temporal de esta actividad. A las 19 semanas se observó la inducción de bandas con actividad  $\beta$ -1,3-glucanasa, pero éstas dejan de observarse en un estadio posterior de la simbiosis.

La banda con actividad  $\beta$ -1,3-glucanasa detectada en los extractos de raíces colonizadas por *Glomus viscosum* (BEG 126) es específica de este hongo, puesto que no se detectó en los extractos de las raíces micorrizadas con los otros y además se detectó en las extractos correspondientes a los tres tiempos de medidas efectuadas.

En el presente estudio se observó también la inducción de una nueva isoforma de actividad quitinasa ácida o neutra por los hongos micorrícicos *Glomus intraradices* y *Glomus viscosum*, denominada Q3. No es la primera vez que se describe la inducción de isoformas específicas de quitinasas por determinados hongos micorrícicos. Esta inducción se ha puesto de manifiesto también en tabaco (Dumas-Gaudot *et al.*, 1992), guisante (Dassi *et al.*, 1996) y tomate (Pozo *et al.*, 1996). Por ser la quitina el componente principal de las paredes de los hongos micorrícicos, el papel atribuido a estas isoformas sería la regulación por parte de la planta del desarrollo del hongo dentro de los tejidos de la raíz (Pozo *et al.*, 1998). El patrón isoenzimático en este caso fue el mismo a todos los tiempos analizados. Algunos autores utilizando metodologías distintas han encontrado un incremento transitorio y limitado de actividad en los primeros estadios de la colonización en *Allium porrum* y *Phaseolus*

*vulgaris* (Spanu *et al.*, 1989; Lambais & Medhy, 1993), mientras que otros detectan aumentos significativos de dicha actividad hidrolítica en estadios post-infección en distintas especies de *Allium*, *Pisum* y de *Nicotiana* (Dumas-Gaudot *et al.*, 1992; Vierheilig *et al.*, 1993).

Tal como describieron Lambais & Medhy (1996) las raíces micorrizadas con diferentes cepas de *Glomus intraradices* mostraban una expresión diferencial de  $\beta$ -1,3-glucanasas y quitinasas. Parece lógico pensar que si se han constatado diferencias de expresión considerando tan solo una especie fúngica, parece lógico esperar diferencias en las raíces colonizadas con hongos micorrícicos de distintas especies como es nuestro caso. Se puede por tanto deducir que la regulación de las actividades hidrolíticas  $\beta$ -1,3-glucanasa y quitinasa es muy dependiente de la combinación específica hospedador-hongo micorrícico.

Muchos de los genes expresados durante las primeras etapas de la penetración de los hongos micorrícicos y durante el establecimiento de la simbiosis también son activados por infecciones con organismos patógenos, tratamiento con elicitores o por ácido salicílico (García-Garrido & Ocampo, 2002). Tras la percepción de un elicitador se producen una serie de cambios moleculares y bioquímicos que contribuyen a una respuesta rápida por parte de las células hospedadoras. Esta respuesta implica la transducción de señales y finalmente la activación de los genes de defensa. A pesar de todo esto la planta hospedadora permite la entrada del hongo y el establecimiento de la simbiosis. En plantas micorrizadas los niveles de expresión de los genes implicados en defensa no alcanzan los niveles que en interacciones patogénicas, a pesar de que los hongos micorrícicos poseen elementos que actúan como elicitores de los mecanismos de defensa. Los niveles de expresión de dichos genes pueden volver a su nivel inicial con el tiempo (Gianinazzi-Pearson *et al.*, 1994, 1996). Se desconocen las bases moleculares que explican la supresión de los procesos de defensa generalizados en la planta y que permiten la compatibilidad planta-hongo micorrícico. Todo lo expuesto anteriormente se sustenta en ensayos como el realizado con plantas mutantes *myc-* (incapaces de establecer la simbiosis micorrícica) en donde se demostró que la

penetración de hongos micorrícicos en la raíz desencadena mecanismos de defensa propios de una infección patógena impidiendo la colonización intrarradical (Gollote *et al.*, 1993).

En cuanto al posible papel en bioprotección de las isoformas inducidas, se ha postulado que las actividades  $\beta$ -1,3-glucanasa y quitinasa podrían ayudar a la planta a afrontar la invasión de un hongo patógeno, mediante su actividad lítica, o indirectamente mediante la liberación de elicitores que desencadenen rápidamente otros mecanismos implicados en las reacciones de defensa (Pozo *et al.*, 1998). De hecho existen trabajos de investigación en los que se muestra que plantas transgénicas en los que ciertos genes de defensa, como son las  $\beta$ -1,3-glucanasas y quitinasas se expresan constitutivamente. aumentan su resistencia frente a hongos patógenos del suelo (Dumas-Gaudot *et al.*, 1996).

**4. Estudios de expresión de  $\beta$ -1,3-glucanasas en raíces de olivo micorrizadas**



#### 4. Estudios de expresión de $\beta$ -1,3-glucanasas en raíces de olivo micorrizadas

Las enzimas con actividad  $\beta$ -1,3-glucanasa están codificadas por una familia multigénica. Han sido bien caracterizadas en diferentes especies de plantas. Particularmente en tabaco y en cebada se han descrito 13 y 9 isoformas diferentes, respectivamente (Linthorst *et al.*, 1990; Hoj & Fincher, 1995). Tal y como se describió en la Introducción General son enzimas implicadas en numerosos procesos fisiológicos, así como en reacciones frente a estreses medioambientales y al ataque de patógenos. Asimismo la colonización micorrícica induce tal y como se ha descrito en el Capítulo 3 la expresión de determinadas isoformas de  $\beta$ -1,3-glucanasa. Existen pocos estudios de carácter molecular sobre la regulación de las  $\beta$ -1,3-glucanasas en raíces colonizadas por hongos micorrícicos. Los estudios al respecto se han llevado a cabo en plantas de patata y judía (Lambais & Mehdy, 1995; Gianinazzi-Pearson *et al.*, 1996; Lambais & Mehdy, 1998).

Las diferentes isoformas de  $\beta$ -1,3-glucanasas en plantas están reguladas diferencialmente en los diferentes tejidos vegetales durante los procesos de germinación y crecimiento y también ante situaciones de estrés (Simmons, 1994; Helleboid *et al.*, 1998; Tucker *et al.*, 2001). Además las distintas isoformas pueden tener localizaciones subcelulares diferentes y cumplir funciones específicas. Un aspecto poco estudiado pero que presenta un gran interés es el conocer las funciones biológicas específicas de estas  $\beta$ -1,3-glucanasas y correlacionarlas con su localización intracelular y su estructura. Las diferentes clases de  $\beta$ -1,3-glucanasas tienen diferentes funciones en las interacciones planta-microorganismo. Así, una  $\beta$ -1,3-glucanasa de la clase I, en combinación con quitinasas de la clase I, inhibe el crecimiento de determinados hongos tanto en experimentos *in vitro* como sobreexpresadas en plantas transgénicas (Leubner-Metzger & Meins, 1999). Las  $\beta$ -1,3-glucanasas extracelulares sin embargo muestran una débil actividad antifúngica pero están involucradas en la liberación de determinados elicitores activando otras reacciones de defensa de la planta.

En la Tabla 14 se recogen algunos de los experimentos que han mostrado que la sobreexpresión en plantas de genes que codifican enzimas hidrolíticas induce un aumento de la resistencia a hongos fitopatógenos.

**Tabla 14.** Estudios en los que se ha puesto de manifiesto que la sobreexpresión de enzimas hidrolíticas implica un aumento de la resistencia de la planta frente a hongos fitopatógenos.

Planta transgénica	Gen transferido	Origen del gen	Hongo fitopatógeno	Bibliografía
Tabaco	Quitinasa	<i>Judía</i>	<i>Rhizoctonia solani</i>	Broglie <i>et al.</i> , 1991
Tabaco	$\beta$ -1,3-glucanasa	<i>Soja</i>	<i>Phytophthora parasitica</i>	Yoshikawaka <i>et al.</i> , 1993
Tabaco	$\beta$ -1,3-glucanasa quitinasa	<i>cebada</i>	<i>Rhizoctonia solani</i>	Jach <i>et al.</i> , 1995
Zanahoria	Quitinasa	<i>tabaco</i>	<i>Botrytis cinerea</i> <i>R. solani</i>	Punja <i>et al.</i> , 1996
Fresa	Quitinasa	<i>Arroz</i>	<i>Sphaerotheca humuli</i>	Asao <i>et al.</i> , 1997
Crisantemo	Quitinasa	<i>Arroz</i>	<i>Botrytis cinerea</i>	Takatsu <i>et al.</i> , 1999
Arroz	Quitinasa	<i>Arroz</i>	<i>Rhizoctonia solani</i>	Datta <i>et al.</i> , 2001
Pepino	Quitinasa	<i>Arroz</i>	<i>Botrytis cinerea</i>	Kishimoto <i>et al.</i> , 2002

Dado que se había detectado inducción de actividades  $\beta$ -1,3-glucanasa en los geles de poliacrilamida tras la inoculación con hongos micorrícicos (resultados mostrados en el Capítulo 3), se abordó el estudio de dichas enzimas hidrolíticas desde un punto de vista molecular.

Hasta la fecha no se ha estudiado la expresión de dichas enzimas hidrolíticas en raíces micorrizadas de plantas de olivo. Tan solo se ha identificado el alérgeno Ole-9 que se expresa en el proceso de polinización como una  $\beta$ -1,3-glucanasa (Huecas *et al.*, 2001). Durante la formación del polen, las tetradas se rodean de una pared de callosa. Esta pared es degradada por una  $\beta$ -1,3-glucanasa específica y necesaria para la liberación del polen fértil hacia la antera.

En este Capítulo se aborda el estudio de la clonación de  $\beta$ -1,3-glucanasas de plantas de olivo, y del análisis de su expresión en raíces control y micorrizadas de plántulas micropropagadas de la variedad Picual a lo largo del tiempo. Se incluyen asimismo los estudios estructurales de la secuencia nucleotídica y aminoacídica deducida de los genes aislados mediante el uso de herramientas bioinformáticas.

### 4.1. Búsqueda de genes que codifican $\beta$ -1,3-glucanasas en olivo.

Para la clonación de genes que codifican las  $\beta$ -1,3-glucanasas en plantas de olivo y que puedan estar inducidas por la formación de la simbiosis se ha utilizado la metodología de RT-PCR usando los cebadores degenerados Glu-F y Glu-R. Estos cebadores se diseñaron en base a un alineamiento de distintas secuencias aminoacídicas de  $\beta$ -1,3-glucanasas conocidas de plantas superiores (Figura 15).

```

GGL4      -----MALCIKNGFLAAALVLVGLLMCSIQMIQAQSIGVVCYKGIANNLPSEQDVINLY 53
GGL1      -----MALCIKNGFLAAALVLVGLIMCSIQIIGAQSIGVVCYKAANNLPSDQDVINLY 53
GluA      -----MAFLSS---LLASLLLVGLL---IQITGAQPIGVVCYKGIANNLPSDQDVIKLY 47
GLUB      -----MATS-----QIAIIVLLGLLVATNIHITEAQIGVVCYMMGNNLPSHSEVIQLY 48
NpI       -----MDTSHKHIALQMAAIIILLGLLVSSTEIVGAQSTGVVCYMLGNNLPPASQVVQLY 54
VvI       -----MAAMVLLLGFLLATLQITGVKSTGVVCYMLGNNLPPASQVVVALY 44
Hb        MAISSSTSGTSSSFPSRTVMMLLFFFAASVGITDAQ-TGVVCYMQGNNLPPVSEVIALY 59
HvI       -----MARKDVASMFVAVALFIGAFAA--VPTGVQSIGVVCYGVIGNNLPSSDQVVQLY 50
HvII      -----MARKDVASMFVAVALFIGAFAA--VPTGVQSIGVVCYGVIGNNLPSSDQVVQLY 50
          :   : :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :
          :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :

GGL4      KANGIRKMRIYYPDKNIFKALKGSNIEIILDVNPQDLEALA-NSSIANGWVQDNIRSHFP 112
GGL1      NANGIRKLRIYYPDKNIFKALNGSNIEIILGVNPQDLEALA-NSSIANGWVQDNIRSHFP 112
GluA      NSNNIKMRIYFPETNVFNALKGSNIEIILDVNPQDLEALA-NPSKRQGWVQDNIRNHFP 106
GLUB      KSRNIRRLRLYDPNHGALNALRGSNIEVILGLPNVDVKHISSGMEHARWVWQKNVRDFWP 108
NpI       KSKNIRRMRLYDPNQAALQALRGSNIEVMLGVPNSDLQNIANPNSANNWVQRNVRNFWP 114
VvI       KSRNIDRMRIYDPNQAALQALRGSNIQLMLGVPNSDLQGLATNPSQAQSWVQRNVRNYWP 104
Hb        KKSNI TRMRIYDPNRAVLEALRGSNIEIILGVNPNSDLQSLT-NPSNAKSWVQKNVRGFW 118
HvI       RSKGINGMRIYFADGQALSALRNSGIGLILDIGNDQLANIAASTSNAASWVQNNVRPYYP 110
HvII      RSKGINGMRIYFADGQALSALRNSGIGLILDIGNDQLANIAASTSNAASWVQNNVRPYYP 110
          .  . *  : * : *  : :  : . * . * : * : *  : :  : . .   * * *  * : *  : .

GGL4      YVKFKYISIGNEVSP-I-NNGQYSQFLLHAMENVYNALAASGLQDKIKVTTATYSGLLAN 170
GGL1      YVKFKYISIGNKVSP-T-NNDQYSEFLLQAMKNVYNALAAAGLQDMIKVSTVTYSGLLAN 170
GluA      DVKFKYIAVGNEVDPGR-DSGKYARFVGPAMENIYNALSSAGLNQIKVSTATYLGLLTN 165
GLUB      HVKIKYIAVGNEISPVT-GTSNLAPFQVPALVNIYKAIGEAGLNDIKVSTSDVMTLIGN 167
NpI       AVKFRYIAVGNEVSPVT-GTSSLTRYLLPAMRNIRNAISSAGLQNNIKVSTSDVMTLIGN 173
VvI       GVSFRYIAVGNEVSPVNGGTSRFAQFVLPAMRNIRAALASAGLQDRVKVSTAIIDLTLGN 164
Hb        SVLFRYIAVGNEISPVNRTAWLAQFVLPAMRNIHDAIRSAGLQDQIKVSTAIIDLTLVGN 178
HvI       AVNIKYIAAGNEVQG-----GATQSILPAMRNLNAALSAAGLG-AIKVSTSI RFDEVAN 163
HvII      AVNIKYIAAGNEVQG-----GATQSILPAMRNLNAALSAAGLG-AIKVSTSI RFDEVAN 163
          *  : * * : * : : .   :   * : * : * : * * : * * : *   : *

GGL4      TYPKASIFRGEFNSFINPIIQFLAQNPLLANVYPYFVHISNTADVPLSYALFTQR-- 228
GGL1      TYPERSIFREEFKSFINPIIQFLARNPLLANVYPYFVHVSNTADVLSYALFTQQ-- 228
GluA      TYPFRDSIFRDEYKSFINPIIGFLSRHNLPLLANIYPYFGHADD--NVPLPYALFKQK-- 221
GLUB      SYPPSQGSFRNDVRWFTDPIIGFLSRHNLPLLANIYPYFGHADD--NVPLPYALFKQK-- 227
NpI       SFPPSQGSFRNDVRSFIDPIIGFVRGINSPLLVNIYPYFYSYAGNPRDISLPYALFTAPNV 233
VvI       SYPPSQGAFRGDVRGYLDPIIRFLVDNKSPLLANIYPYFYSYAGNPKDISLPYALFTANSV 224
Hb        SYPPSAGAFRDVRSYLDPIIGFLSSIRSPLLANIYPYFYSYAGNPRDISLPYALFTSPSV 238
HvI       SFPPSAGVFKN---AYMTDVARLLASTGAPLLANVYPYFAYRDNPGSISLNYATFQPGTT 220
HvII      SFPPSAGVFKN---AYMTDVARLLASTGAPLLANVYPYFAYRDNPGSISLNYATFQPGTT 220
          : : * * . * :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :

```

```

GGL4      ---GKNSAGYQNLFDALDLSMYFAVEKAGGPNVEIIVSESGWPSEGNSAATIENAQTYR 285
GGL1      ---GTNSAGYQNLFDALDLSMYFAVEKAGGPNVEIIVSESGWPSEGSSAATIENAQTYR 285
GluA      ---GLNDAGYQNLFDALVDSMYFATEKLGQNIIEIIVSESGWPSEGHPSATLENAMTYT 278
GLUB      VV-QDGSRQYRNLFDAMLDSVYAAMDRTGGGSVGIIVSESGWPSAGAFGATHENAQTYLR 286
NpI       VV-QDGSGLGYRNLFDAMLDAVYAALS RAGGSIEIIVSESGWPSAGAFGATHENAQTYLR 286
VvI       VV-WDQQRGYKNLFDAMLDALYSALERAGGASLEVVLSESGWPSAGGFETTVDNARTYNS 283
Hb        VV-WDQQRGYKNLFDALLDALYSALERASGGSLEVVLSESGWPSAGAFGATHENARTYLS 297
HvI       VRDQNNGLTYTSLFDAMVDAVYAAL EKAGAPAVKVVVSESGWPSAGGFAASAGNARTYNQ 280
HvII      VRDQNNGLTYTSLFDAMVDAVYAAL EKAGAPAVKVVVSESGWPSAGGFAASAGNARTYNQ 280
          . * .**** :*: * .: . . : :*:***** * .: : * . **

GGL4      NLIDHVKRGAGTPKKPGKSIETYLFAMFDENVKKGEITEKHFGLFSPDQRAKYQLNFNSL 345
GGL1      NLINHVKSGAGTPKKPGKTIETYLFAMFDENDKIGEITEKHFGLFSPDQRAKYQLNFN-Y 344
GluA      NLINHVKGGAGTPKKPGRTIETYLFAMFDENRKDGKPEQHFGFLFKPDQRPKYQLKFD-- 336
GLUB      NLIQHAK--GSPRKP--PIETYIFAMFDENKNKNPE-LEKHFGLFSPNKQPKYNLNFVGS 342
NpI       NLIQHVKR--GSPRRPNKVIETYLFAMFDENKNKNPE-LEKHFGLFSPNKQPKYPLSFGFS 349
VvI       NLIRHVKG--GTPKRPNRAIETYLFAMFDENKKEPQ-LEKHFGLFFPNKQPKYSINFGS- 339
Hb        NLIQHVKG--GTPKRPNRAIETYLFAMFDENKKEPQ-LEKHFGLFFPNKQPKYSINFGS- 353
HvI       GLINHVGG--GTPKKRE-ALETYIFAMFNENQKTGDATERSFGLFNPDKSPAYNIQF--- 334
HvII      GLINHVGG--GTPKKRE-ALETYIFAMFNENQKTGDATERSFGLFNPDKSPAYNIQF--- 334
          .** * . * :*: : :*:*****: ** * . * : ** : * : : . * : . *

GGL4      MPIYIDISRVI----- 356
GGL1      LPIYILR----- 351
GluA      -----
GLUB      ERVWDIT---NSTASSLTSEI 360
NpI       DRYWDISAENNATAASLISEM 370
VvI       EKPWDVSSENDTNEESLKSDI 360
Hb        EKNWDISTEHNATILFLKSDM 374
HvI       -----
HvII      -----

```

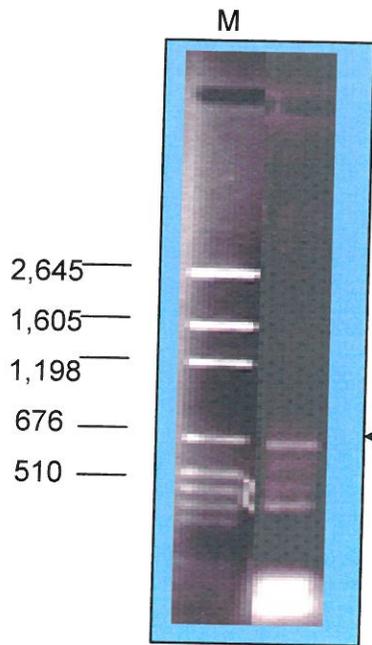
**Figura 15.** Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de  $\beta$ -1,3-glucanasas de plantas superiores. En color rojo se destacan las secuencias aminoacídicas elegidas para el diseño de los cebadores Glu-F y Glu-R.

Los nombres de los genes, planta de origen y número de acceso de las secuencias aminoacídicas utilizadas en el alineamiento anterior se muestran en la Tabla 15.

**Tabla 15.** Genes empleados para realizar el alineamiento mostrado en la Figura 15.

<b>Nombre del gen</b>	<b>Planta</b>	<b>Nº Acceso</b>
<i>GGL4</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>	AF141654
<i>GGL1</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>	AF141653
<i>GluA</i>	<i>Lycopersicon esculentum</i>	M80604
<i>Glub</i>	<i>Lycopersicon esculentum</i>	M80608
<i>Npl</i>	<i>Nicotiana plumbaginifolia</i>	M63634
<i>Vvl</i>	<i>Vitis vinifera</i>	AF239617
<i>Hb</i>	<i>Hevea brasiliensis</i>	U22147
<i>Hvl</i>	<i>Hordeum vulgare</i>	AF479647
<i>Hvll</i>	<i>Hordeum vulgare</i>	AF515785

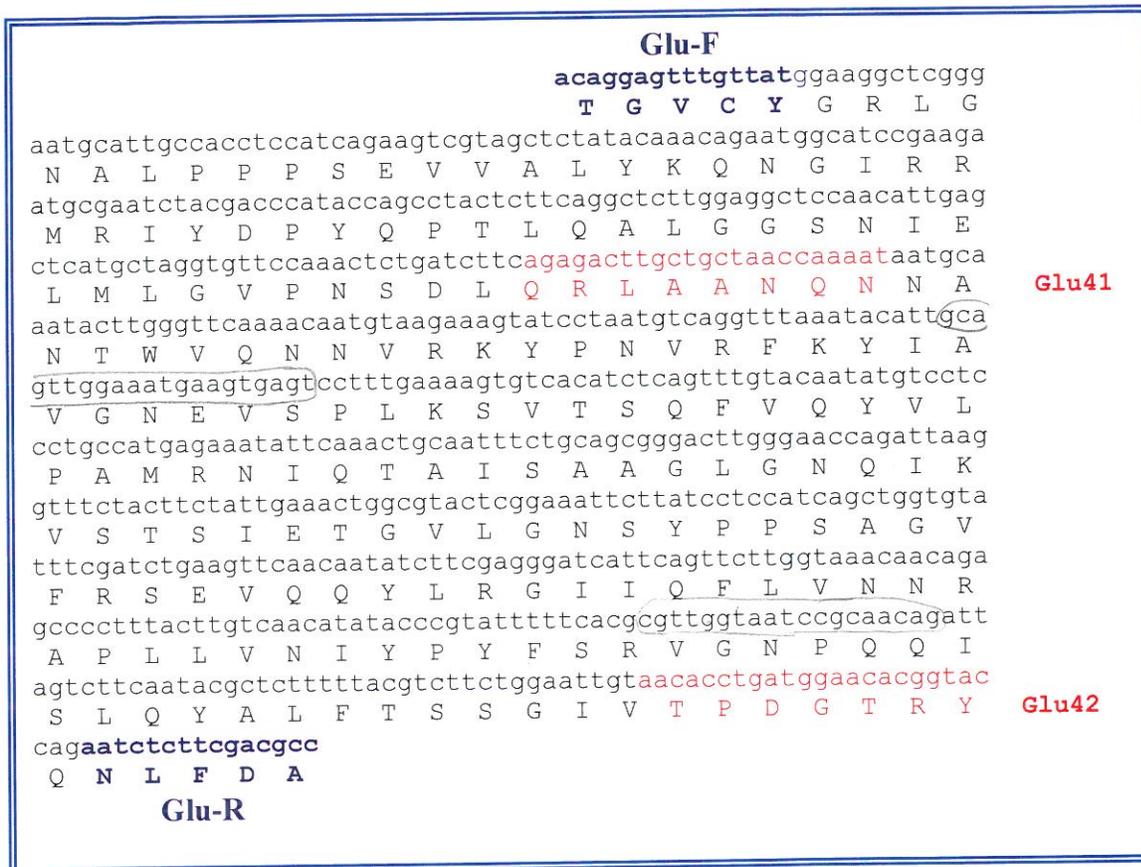
Como material de partida se usó ARN total de raíces micorrizadas por *G. intraradices* (BEG 123) cosechadas tras 19 semanas de crecimiento. Se eligió esta muestra por presentar el mayor porcentaje de colonización micorrícica (51 %) y haberse detectado isoformas inducidas de  $\beta$ -1,3-glucanasas en geles de poliacrilamida (resultados mostrados en el Capítulo 3) de sus correspondientes extractos proteicos. Se obtuvo una banda con un tamaño de aproximadamente 650 pares de bases nucleotídicas (Figura 16).



**Figura 16.** Foto del gel de agarosa con el producto de PCR obtenido tras la amplificación del ADNc con los cebadores Glu-F y Glu-R. M: Marcador de peso molecular *pGEM*.

Esta banda se clonó en el vector comercial *p-GEM-T-Easy* y posteriormente se transformaron cepas de *E.coli* XL-Blue. Se secuenciaron 10 clones diferentes y se analizaron las secuencias nucleotídicas obtenidas. Siete de los 10 clones secuenciados correspondían al mismo gen. La secuencia nucleotídica obtenida y aminoacídica se muestran en la Figura 17.

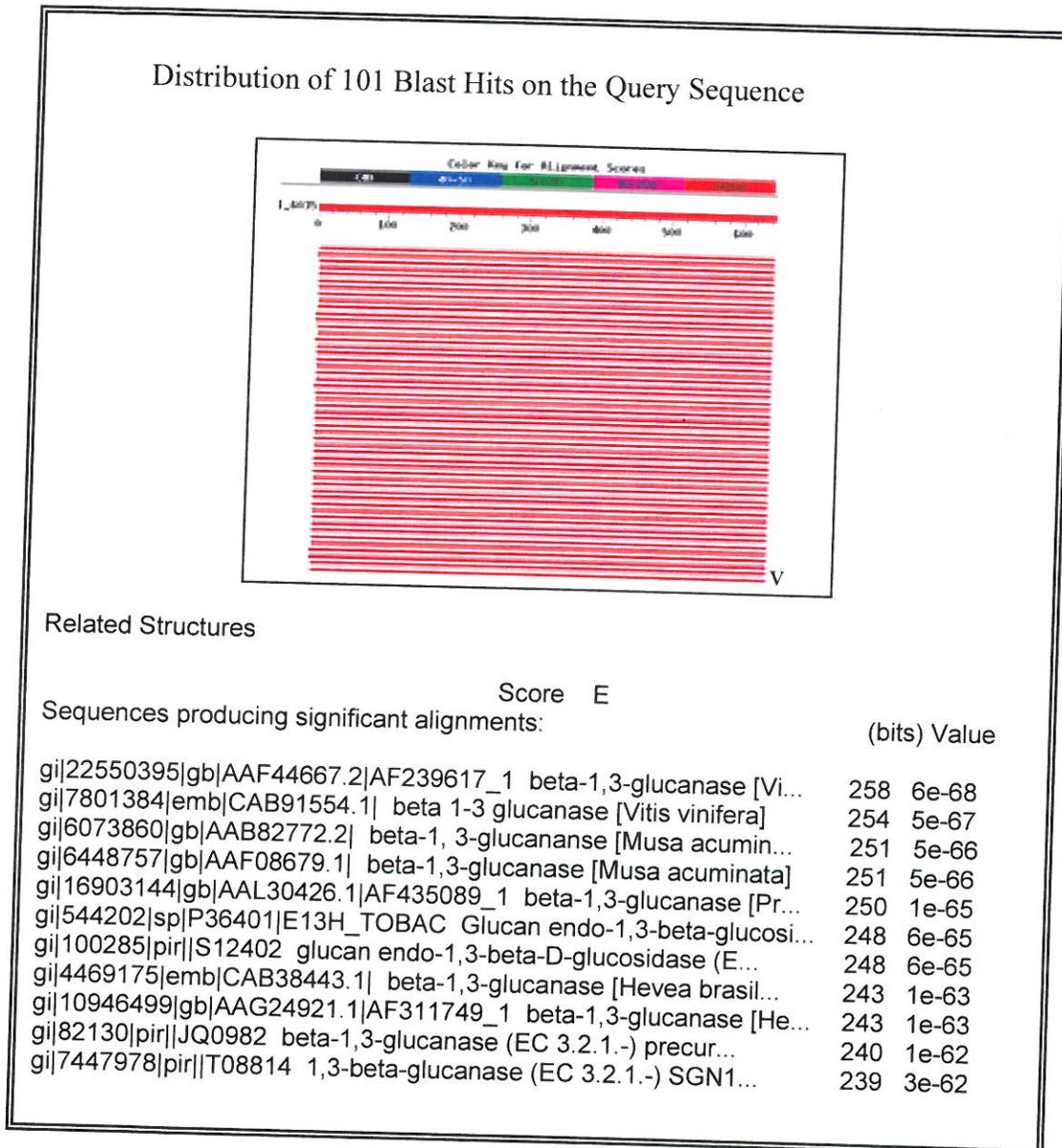
**Secuencia del gen *OleGlu1***



**Figura 17.** Secuencia nucleotídica y aminoacídica del clon parcial *OleGlu1*. En letra azul aparecen destacados los dominios de unión de los cebadores degenerados Glu-F y Glu-R se han unido.

La comparación de la secuencia obtenida con las registradas en la base de datos mostró que el gen aislado presenta una alta homología con secuencias que codifican proteínas con actividad  $\beta$ -1,3-glucanasa de plantas superiores (Figura 18).

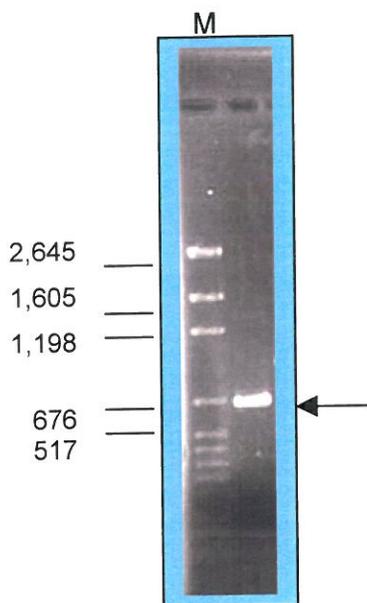
Las secuencias nucleotídicas de los 3 clones restantes analizados no mostraron homología con ninguna secuencia registrada en la base de datos (datos no mostrados).



**Figura 18.** Listado de homologías máximas obtenidas tras la comparación de la secuencia del gen *OleGlu1* y las presentes en la base de datos mediante el programa informático Blastx.

#### 4.2. Obtención del gen completo *OleGlu1*.

Con la finalidad de obtener la secuencia nucleotídica completa del gen parcial obtenido mediante 3' y 5' RACE, se diseñaron los cebadores específicos Glu 41 y Glu 42 respectivamente, resaltados en la Figura 17 en color rojo. Tras seguir los pasos del protocolo del RACE de la casa comercial Gibco para obtener el extremo 3' del gen se visualizó una banda a la luz ultravioleta de tamaño aproximado de unas 650 pares de bases (Figura 19) la cual se cortó, eluyó y clonó en el vector *p-GEM-T-easy*.



**Figura 19.** Foto del gel de agarosa con el producto de PCR obtenido tras la amplificación del ADNc con los cebadores Glu 41 y AUAP. M: Marcador de peso molecular *pGEM*.

Se secuenciaron 10 clones diferentes. De esta forma se obtuvo el extremo 3' del gen *OleGlu1*. Asimismo se encontró el extremo 3' de una nueva secuencia parcial a la que se denominó Glu-2. De los 10 clones secuenciados, 8 correspondían al extremo 3' del gen *OleGlu1* y el resto al extremo 3' del gen *OleGlu2*. El alineamiento de los extremos 3' del gen ambos genes permitió determinar las posiciones divergentes entre ambas secuencias (Figura 20).

```

OleGlu2: 1 gcagttggaatgaagtgagtcacctgaaatcggacacatctcagtatgtaccgtttgtc 60
          |||
OleGlu1: 352 gcagttggaatgaagtgagtcacctgaaatcggacacatctcagtttgtacaatatgtc 411
          |||

OleGlu2: 61 ctccctgccatgagaaatattcaaactgcaatttctgcagctggacttgggaaccagatt 120
          |||
OleGlu1: 412 ctccctgccatgagaaatattcaaactgcaatttctgcagcgggacttgggaaccagatt 471
          |||

OleGlu2: 121 aaggtttctacttccattgaaactggtatgatcgaaaattcttatccccatcaaattgt 180
          |||
OleGlu1: 472 aaggtttctacttctattgaaactggcgtactcggaaattcttatcctccatcagctgt 531
          |||

OleGlu2: 181 gtatttcaagctccagttcgagaatataattcaaggatcattgacttcttgtaaacac 240
          |||
OleGlu1: 532 gtatttccgatctgaagttcaacaatatcttcgagggatcattcagttcttgtaaacac 591
          |||

OleGlu2: 241 aaagccccctacttgtcaacatataaccgtatcttgcacgcaaagataatccacaacag 300
          |||
OleGlu1: 592 agagcccccttacttgtcaacatataaccgtatcttgcacgcttgtaaatccgcaacag 651
          |||

OleGlu2: 301 attactctcgagtatgctctttttacgtcagatggaattacagtgctgatggaacgct 360
          |||
OleGlu1: 652 attagcttcaatacgtctctttttacgtcttctggaattgtaaacacctgatggaacacgg 711
          |||

OleGlu2: 361 taccaaaatcttttctacgccttactagatgccatgtacgcagcccttgaaaagtctggt 420
          |||
OleGlu1: 712 taccagaatctcttcgacgccttattagatgccgtatatgcagcacttgaaaaggctggt 771
          |||

OleGlu2: 421 ggctcaactctggatattgttgtatccgagagtggttggccttcgatggaggaggacca 480
          |||
OleGlu1: 772 ggctcatctgtggaattgttgtgtcggagagcggttggccttcggct---ggaggacaa 828
          |||

OleGlu2: 481 gacacgtccattgataactcaaggacctataatacgaatttgggtgcaacgtgtaaagaca 540
          |||
OleGlu1: 829 gacacgtccattgataatgcaaggacctataatacgaatttgggtgaaaagtataagaca 888
          |||

OleGlu2: 541 ggaagcccaaagaggcctgaaaagcaatagaaacttacatttttgctatgtttgacgaa 600
          |||
OleGlu1: 889 ggaaccccaaaaaggcctggaagagctatagaaacttacatttttgctatgtttgacgaa 948
          |||

OleGlu2: 601 gatcagaagagccccgattatgagaaatcttgggctcttccgaccaacaac-acct 659
          |||
OleGlu1: 949 aatcagaagagccctgaatatgagaaatcttgggctcttccgaccaataaacaacct 1008
          |||

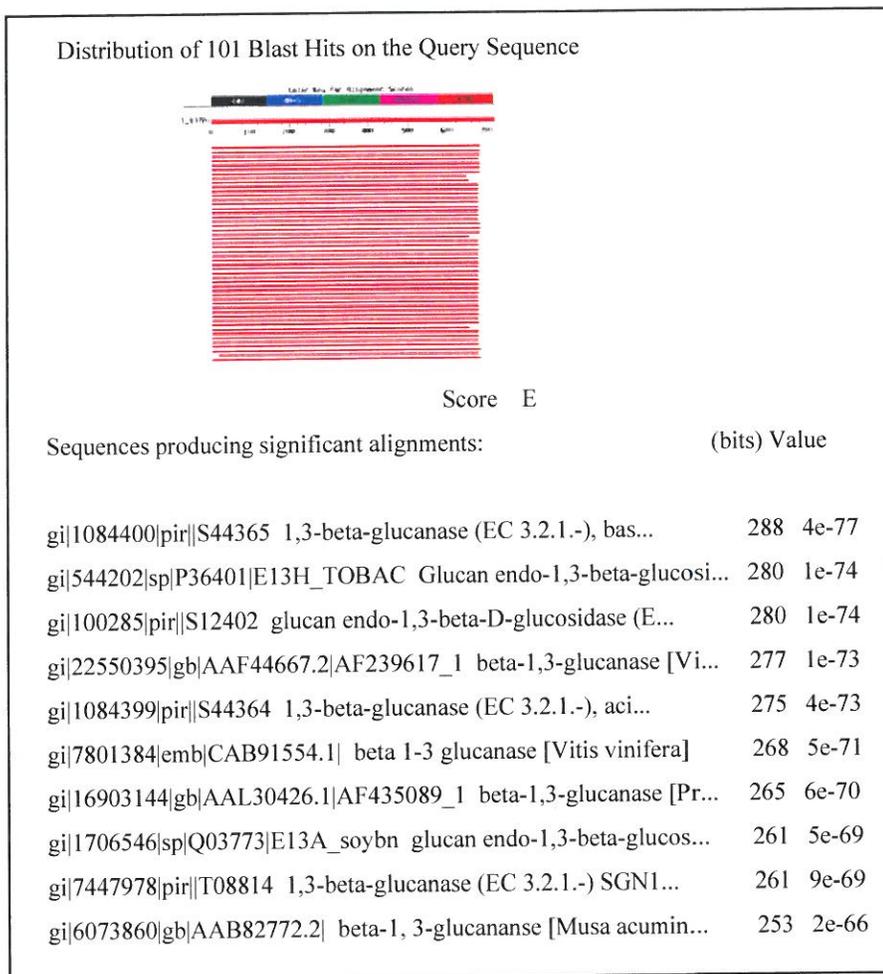
OleGlu2: 660 aagtaccccgatcagctttagctaggttagatatcaagt 699
          |||
OleGlu1: 1009 aagta-cccaatcagctttagctaggttagatatcaagt 1047
          |||

```

**Figura 20.** Alineamiento de las secuencias nucleotídicas de los genes *OleGlu1* y *OleGlu2*.

Ambos genes presentan un 79,65 % de identidad, lo que hizo considerarlos como genes diferentes.

La comparación de la secuencia nucleotídica del nuevo gen *OleGlu2* con las presentes en la base de datos del NCBI mostró igualmente un alto grado de homología con otras  $\beta$ -1,3-glucanasas de plantas superiores (Figura 21).

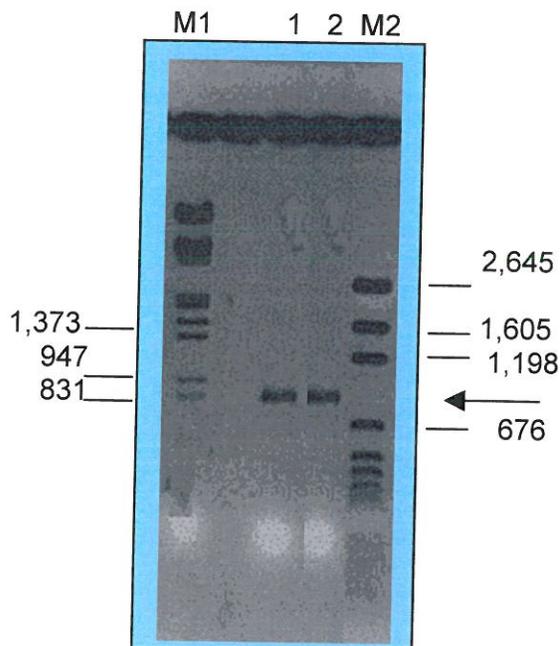


**Figura 21.** Listado de homología máxima obtenidas tras la comparación de la secuencia del extremo 3' del gen *OleGlu2* y las presentes en la base de datos mediante el programa informático Blast x. .

El grado de similitud entre las secuencias aminoacídicas de los extremos 3' de los genes *OleGlu1* y *OleGlu2* fue de un 84,51%.

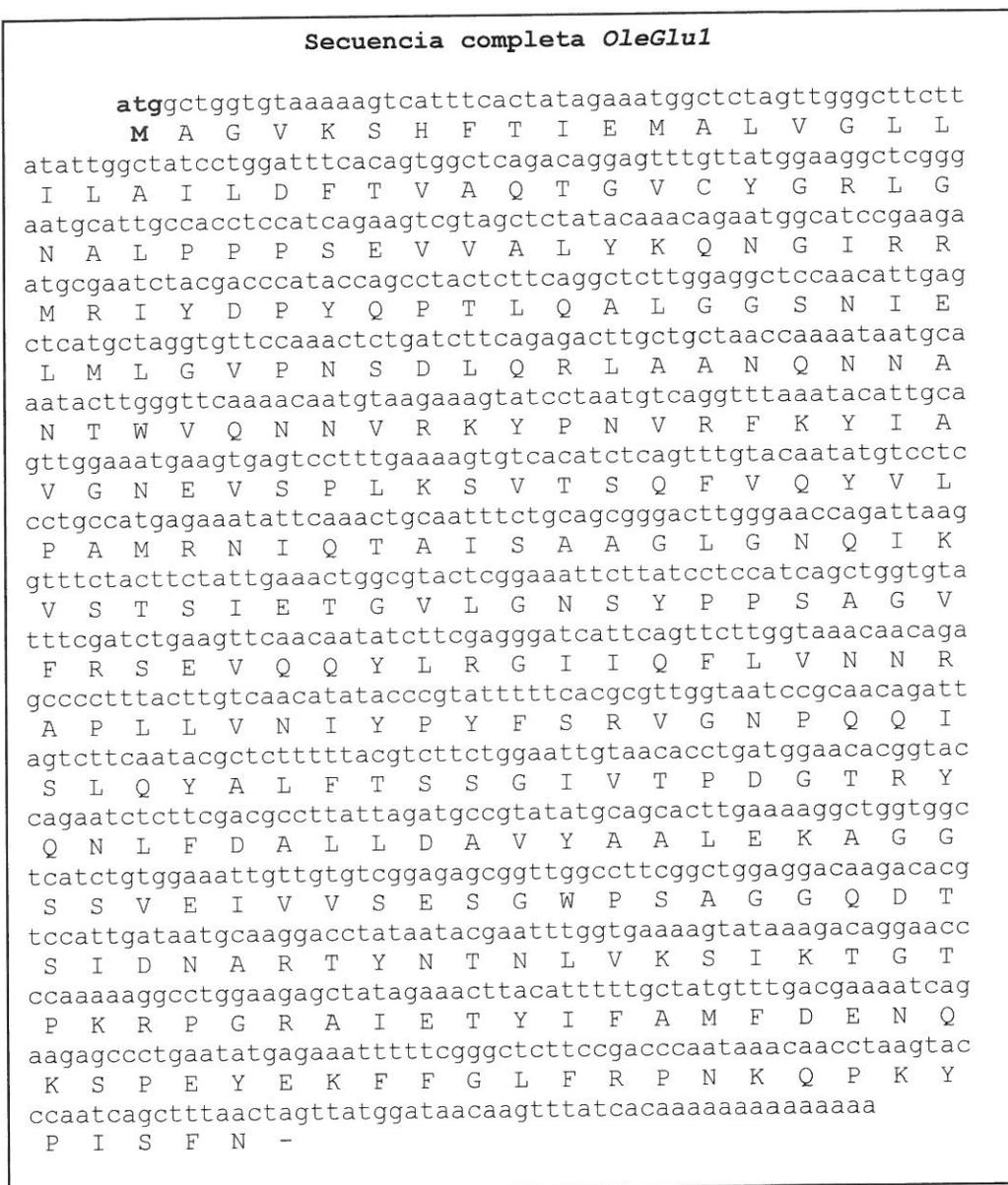
Cuando se trató de obtener el extremo 5' de los genes objeto de estudio mediante el kit de RACE de la casa comercial Gibco no se obtuvo ninguna banda.

Se decidió entonces probar con el nuevo kit comercial Clontech por ser más sensible. Para ello se diseñaron nuevos cebadores específicos en la dirección 3'- 5' con las características requeridas por este nuevo kit: 5RACR4, cebador específico para el gen *OleGlu1* y 5RACR2, cebador específico para el gen *OleGlu2*. Se obtuvieron bandas de unas 830 pares de bases (Figura 22) que coincidieron ser el extremo 5' del gen *OleGlu1* en ambos casos.



**Figura 22.** Foto del gel de agarosa con el producto de PCR obtenido tras la amplificación del ADNc. Línea 1: con los cebadores 5RACR4 y UPM. Línea 2: con los cebadores 5RACR2 y UPM. M1: Marcador de peso molecular Lambda DNA/EcoRI + Hind III, M2: Marcador de peso molecular *pGEM*.

El gen completo *OleGlu1* y la secuencia aminoacídica correspondiente se observa en la Figura 23:



**Figura 23.** Secuencia nucleotídica y aminoacídica completa del gen *OleGlu1* que codifica una  $\beta$ -1,3-glucanasa de olivo. En azul se resalta la metionina inicial de la proteína.

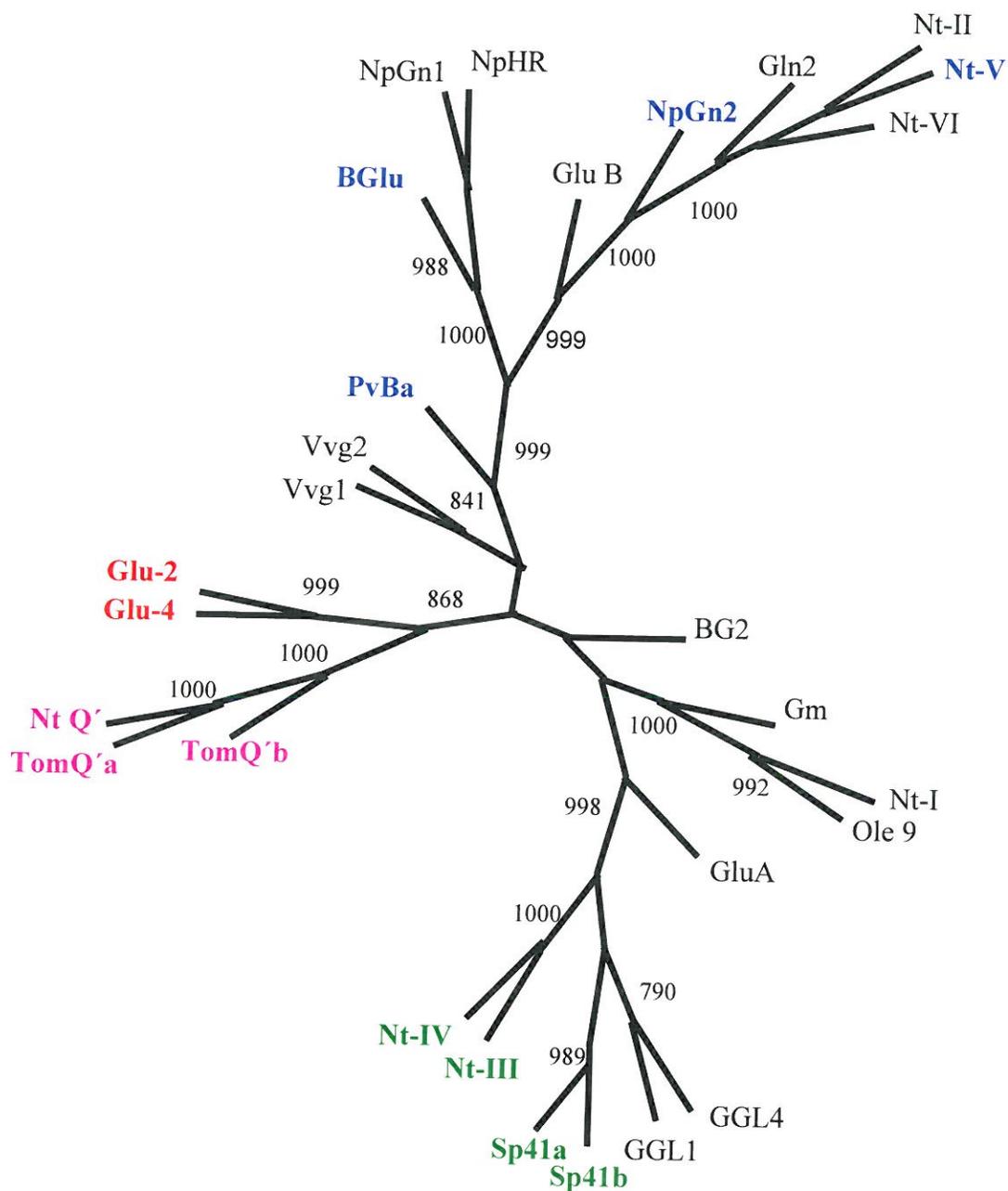
Dado el elevado grado de homología entre las secuencias nucleotídicas de los genes *OleGlu1* y *OleGlu2*, no se pudieron diseñar cebadores lo suficientemente específicos para discriminar dichos genes y que cumplieran los requisitos necesarios descritos en el manual del kit comercial Clontech. La mayor abundancia relativa de transcritos del gen *OleGlu1* impidió obtener el extremo 5' del gen *OleGlu2*. Este experimento se realizó en cuatro ocasiones y en todos los casos se obtuvieron clones con el extremo 5' del gen *OleGlu1*.

#### **4.3. Análisis filogenético de los genes obtenidos.**

Utilizando las secuencias nucleotídicas de 26  $\beta$ -1,3-glucanasas de distintas especies vegetales superiores (Tabla 16), se procedió al estudio de sus relaciones filogenéticas con las secuencias de  $\beta$ -1,3-glucanasas obtenidas del olivo: *OleGlu1* y *OleGlu2*.

**Tabla 16.** Nombres, especie vegetal de procedencia y números de acceso de los genes que codifican  $\beta$ -1,3-glucanasas utilizados en el estudio filogenético de dicha enzima.

<b>Nombre del gen</b>	<b>Especie vegetal</b>	<b>Nº acceso</b>
<i>BG2</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	M58462
<i>PvBa</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	X53129
<i>Sp41b</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>	X54431
<i>Sp41a</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>	X54430
<i>Gln2</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>	X53600
<i>GGL4</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>	AF141654
<i>GGL1</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>	AF141653
<i>NtQ'</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>	X54456
<i>Nt-I</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>	Z28697
<i>Nt-II</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>	A16121
<i>Nt-III</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>	A16120
<i>Nt-IV</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>	M59443
<i>Nt-V</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>	M59442
<i>Nt-VI</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>	M60402
<i>NpHR</i>	<i>Nicotiana plumbaginifolia</i>	M23120
<i>NpGn1</i>	<i>Nicotiana plumbaginifolia</i>	X07280
<i>NpGn2</i>	<i>Nicotiana plumbaginifolia</i>	X54742
<i>GluA</i>	<i>Lycopersicon esculentum</i>	M80604
<i>Club</i>	<i>Lycopersicon esculentum</i>	M80608
<i>TomQ'a</i>	<i>Lycopersicon esculentum</i>	X74905
<i>TomQ'b</i>	<i>Lycopersicon esculentum</i>	X74906
<i>Gm</i>	<i>Glicine max</i>	U08405
<i>Vvg2</i>	<i>Vitis vinifera</i>	AF239617
<i>Vvg1</i>	<i>Vitis vinifera</i>	AJ277900
<i>BGLU</i>	<i>Capsicum annum</i>	AF227953
<i>Ole9</i>	<i>Olea europaea</i>	AF249675
<b><i>Ole Glu1</i></b>	<b><i>Olea europaea</i></b>	---
<b><i>Ole Glu2</i></b>	<b><i>Olea europaea</i></b>	---



**Figura 24.** Árbol filogenético consenso de las secuencias parciales de  $\beta$ -1,3-glucanasas de distintas plantas. Se calculó a partir del análisis de las distancias por el 2-parámetro de Kimura (Kimura, 1980), con una relación transición/transversión de 2.0 y

analizado por el método del *neighbour-joining* (Saitou & Nei, 1987). Los valores de *bootstraps* expresados en tanto por mil y superiores a 750 se muestran en las distintas ramas. En color azul se destacan las secuencias que codifican  $\beta$ -1,3-glucanasas de carácter básico (clase I). En color verde se destacan las secuencias que codifican  $\beta$ -1,3-glucanasas de carácter ácido (clase II). En violeta se destacan las secuencias que codifican  $\beta$ -1,3-glucanasas pertenecientes a la clase III tanto ácidas como básicas. Y por último en rojo se destacan las 2  $\beta$ -1,3-glucanasas de olivo clonadas en el presente estudio.

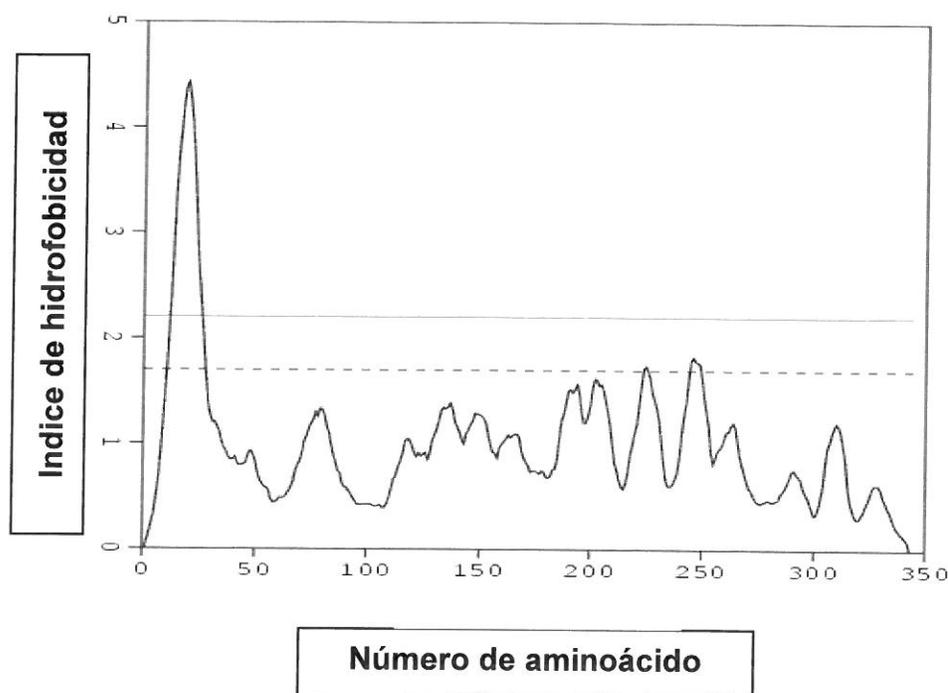
Este estudio ubica a las dos secuencias nucleotídicas obtenidas de olivo *OleGlu1* y *OleGlu2* muy cerca de las  $\beta$ -1,3-glucanasas del tipo III *NtQ'*, *TomQ'a* y *TomQ'b*. *NtQ'* está descrito en la literatura como un gen que codifica una  $\beta$ -1,3-glucanasa de tabaco de carácter ácido implicado en respuestas a estreses bióticos (Payne *et al.*, 1990). *TomQ'a* y *TomQ'b*, codifican  $\beta$ -1,3-glucanasas de tomate de carácter ácido y básico respectivamente. Ambas isoformas se expresan en las hojas como respuesta a una infección viral (Domingo *et al.*, 1994).

El gen *Ole-9* que como ya se ha indicado codifica una  $\beta$ -1,3-glucanasa de olivo se ubica en el árbol filogenético próximo a otras secuencias de  $\beta$ -1,3-glucanasas conocidas de carácter ácido.

El grupo III de  $\beta$ -1,3-glucanasas es sin duda el menos estudiado debido a que la mayoría de los genes secuenciados hasta ahora pertenecen a los otros dos grupos restantes.

#### 4.4. Análisis de la secuencia nucleotídica y aminoacídica de *OleGlu1*

La proteína codificada por *OleGlu1* tiene un tamaño molecular de 37.724 kDa, está formada por 343 aminoácidos, tiene un punto isoelectrico teórico de 9,46 y un coeficiente de extinción molar de 34.420 a 280 nm. El patrón de hidrofobicidad se representa en la Figura 25.



**Figura 25.** Patrón hidrofóbico de la proteína codificada por *OleGlu1* (OLE GLU1) calculado mediante el método DAS (*Dense Alignment Surface*). Los valores superiores a la línea continua marcan segmentos con un marcado carácter hidrofóbico. Los segmentos de la proteína que se sitúan por debajo de la línea discontinua presentan un carácter hidrofílico.

Los primeros 35-40 aminoácidos de la proteína OLEGLU1 presentan un alto grado de hidrofobicidad lo que sugiere una localización transmembrana.

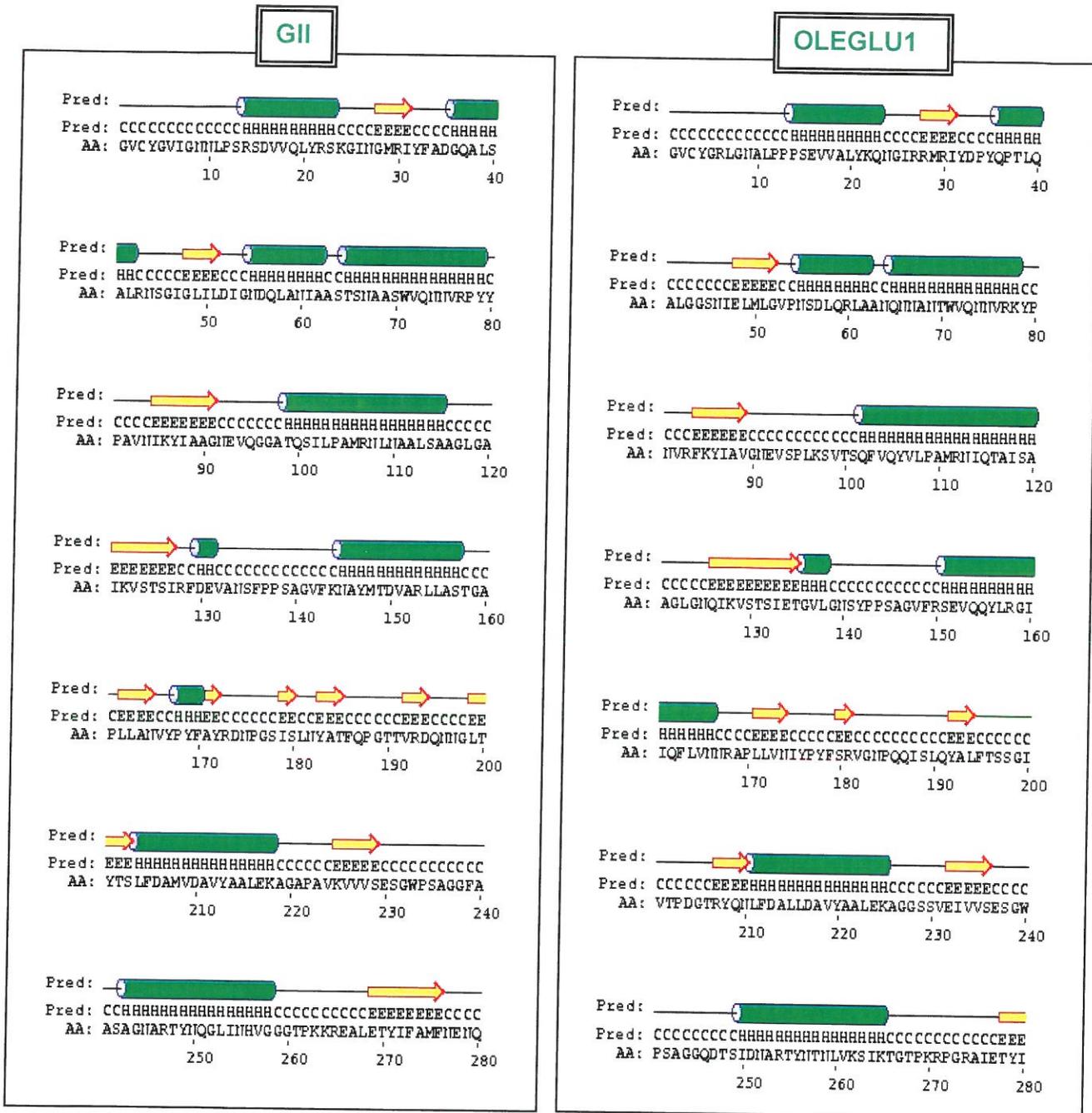
Hasta la fecha, tan solo se ha cristalizado una proteína con actividad  $\beta$ -1,3-glucanasa (Chen *et al.*, 1993). Esta enzima procede de cebada (*GII*). Y nos ha permitido comparar la estructura tridimensional hipotética de la proteína codificada por *OleGlu1* con la de la única  $\beta$ -1,3-glucanasa cristalizada y analizada hasta ahora.

El grado de similitud entre ambas proteínas es de un 62,5 % (Figura 26).

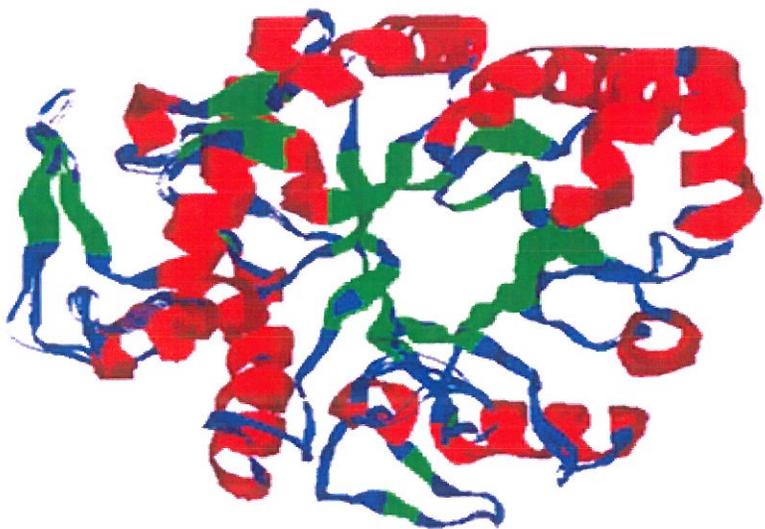
GII	1	GVCYGVIGNNLP	SRSDVVQLYRSK	INGMRIYFADGQALS	SALRNSGIGL	IILDIGNDQLANI
OLEGLU1	1	GVCYGR	LGNALPPPSE	VVALYKQNGIRRMRIYDPYQPTLQALGGSN	IELMLGVPNSDLQRL	
GII	60	AASTSNAASWVQNNV	RPYPYPAVNIKYIAAGNEVQ	-----GGATQS	SILPAMR-NLNAALS	
OLEGLU1	61	AANQNNANTWVQNNV	RK-YPNVRFKYIAVGNEVSPLKSVTSQFVQYVLPAMRNIQTAISA			
GII	113	AAGLGAIKVSTS	IRFDEVANSFPPSAGVFKN	---AYMTDVARLLASTGAPLLANVYPYFA		
OLEGLU1	120	AGLGNQIKVSTS	SIETGVLGNSYPPSAGVFRSEVQQYLRGIIQFLVNNRAPLLVNIYPYFS			
GII	170	YRDNPGSISLNYATFQPGTTVRDQNNGLTYTSLFDAMVDAVYAALEKAGAPAVKVVVSES				
OLEGLU1	180	RVGNPQQISLQYALFTSSGI	VTP--DGTRYQNLFDALLDAVYAALEKAGGSSVEIVVSES			
GII	230	GWPSAGGFAASAGNARTYNQGLINHVGGGTPKK-REALETYIFAMFNENQKTGDATERSF				
OLEGLU1	238	GWPSAGGQDTSIDNARTYNTNLVKS	IKTGTPKRPGRAIETYIFAMFDENQKSPE-YEKFF			
GII	289	GLFN	PKSPAYNIQF			
OLEGLU1	297	GLFR	PNKQPKYPISF			

**Figura 26.** Alineamiento de las secuencias aminoacídicas *GII* y *OLEGLU1*. Los aminoácidos comunes en ambas proteínas se destacan en color azul.

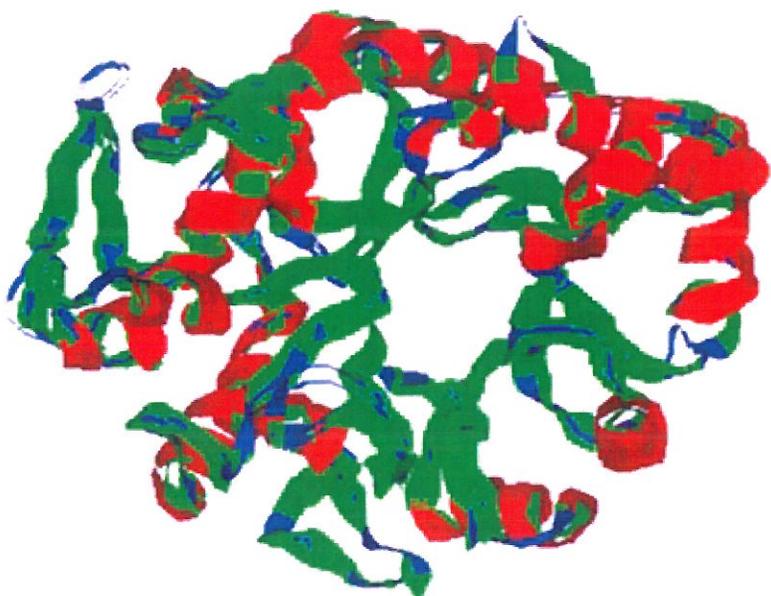
La estructura secundaria de ambas proteínas es muy semejante. Presentan numerosas hélices  $\alpha$  y láminas  $\beta$  (Figura 27).



**Figura 27.** Comparación de las secuencias de las proteínas GII y OLEGLU1 basada en las estructuras secundarias más comunes de los polipéptidos: las hélices  $\alpha$  (H y ) y las láminas  $\beta$  (E y ) .



GII



OLEGLU1

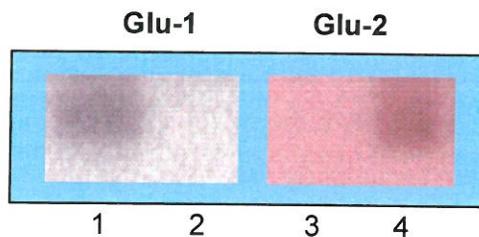
**Figura 28.** Representación esquemática del modelo 3D de las  $\beta$ -1,3-glucanases de cebada (GII) y de olivo (OLEGLU1).

La estructura secundaria de OLEGLU1 está constituida por hélices moleculares  $\alpha$ , láminas plegadas  $\beta$  y regiones de estructura irregular. Se puede afirmar pues, que OLEGLU1 presenta una estructura suprasecundaria del tipo  $\alpha$ - $\beta$ .

Los estudios de difracción de rayos X permitieron analizar la estructura proteica de la  $\beta$ -1,3-glucanasa cristalizada de cebada GII. Esta estructura tridimensional se muestra en la Figura 28. Junto a ella se ilustra la estructura tridimensional de la  $\beta$ -1,3-glucanasa OLEGLU1 de olivo deducida con diferentes programas informáticos (Protocolo 34). Se trata de una proteína globular, con una estructura del tipo barril  $\beta$ . Consiste en una estructura cilíndrica de 8 láminas  $\beta$  paralelas cuyos tramos sucesivos están unidos por hélices  $\alpha$ . El calificativo de paralela alude al patrón de establecimiento de enlaces de hidrógeno.

#### 4.5. Estudios de expresión (*Northern blot*).

Inicialmente se comprobó la especificidad de las sondas Glu-1 para el gen *OleGlu1* y Glu-2 para el gen *Oleglu2*, mediante un *southern blot* (Figura 29). No se detectó reacción cruzada entre las sondas específicas de Glu1 y Glu2 incluídas en los gels como controles positivos.



**Figura 29.** *Southern blot*. Las calles 1 y 2 se enfrentaron a la sonda Glu-1 y las calles 3 y 4 se enfrentaron a la sonda Glu-2. Las calles 1 y 3 se cargaron con 1 ng de la sonda purificada de Glu-1, mientras que las calles 2 y 4 se cargaron con 1 ng de la sonda purificada de Glu-2.

#### 4.6. Discusión

En este Capítulo se describe cómo se han clonado dos fragmentos de ADNc que codifican  $\beta$ -1,3-glucanasas de olivo aplicando la técnica de RT-PCR a un ARN aislado de raíces de olivo (variedad Picual) micorrizadas con *Glomus intraradices* (BEG 123) tras 19 semanas de crecimiento.

En 1990 se publicó el primer trabajo de investigación sobre un gen que codificaba una  $\beta$ -1,3-glucanasa de tabaco clasificada como tipo III (*Nt Q'*) (Payne *et al.*, 1990). Dicho gen es también denominado PR-35 dada su masa molecular de 35 KDa. Estructuralmente la proteína codificada es muy distinta a las  $\beta$ -1,3-glucanasas englobadas en las clases I y II. Se ha postulado que podría ser una enzima que libera oligómeros de  $\beta$ -1,3-glucanos como posibles elicitores de otros mecanismos de defensa. Más tarde, en 1994, se publicó otro estudio realizado en plantas de tomate en el que se describía la obtención de dos genes que codificaban  $\beta$ -1,3-glucanasas del tipo III (Domingo *et al.*, 1994). Esta vez las proteínas codificadas eran de carácter ácido una (*TomQ'a*) y otra de carácter básico (*TomQ'b*). A partir de entonces se admite que el grupo III de la clasificación de  $\beta$ -1,3-glucanasas agrupa proteínas ácidas y básicas. El común denominador de ambos trabajos de investigación es la implicación de estas proteínas en procesos de defensa.

Las dos secuencias obtenidas en el presente estudio *OleGlu1* y *OleGlu2* muestran una relación filogenética muy estrecha con las mencionadas *Nt Q'*, *TomQ'a* y *TomQ'b*. Esto hace pensar que *OleGlu1* y *OleGlu2*, por analogía, también estarían implicadas en procesos de defensa. En el presente estudio se ha puesto de manifiesto que los distintos hongos micorrícicos ensayados inducen la expresión de los genes *OleGlu1* y *OleGlu2*. A pesar de tratarse de microorganismos mutualistas que, en términos generales, puede decirse que no perjudican a la planta (sino más bien lo contrario), la colonización de las raíces por los hongos micorrícicos desencadena el inicio de una respuesta de defensa, tal y como se ha descrito en otras ocasiones (Blee & Anderson, 2000). El menor grado de intensidad de esta respuesta y su supresión con el tiempo son factores que la hacen diferente a una respuesta

de defensa típica frente a patógenos. En cualquier caso, parece claro que las  $\beta$ -1,3-glucanasas de tipo III se inducen en condiciones de estrés motivado por la infección o colonización por microorganismos.

El análisis de las secuencias nucleotídicas de *OleGlu1* y *OleGlu2* mostró un 84,5% de similitud entre ambos. Este resultado implica considerar a OLEGLU1 y OLEGLU2 como isoformas diferentes. Esta hipótesis se corroboró en los estudios de *Southern* al no detectar reacción cruzada entre las sondas específicas.

A pesar de ser isoformas diferentes, el alto grado de similitud entre ellas impidió diseñar cebadores suficientemente específicos de acuerdo con los requisitos del protocolo del RACE de la casa comercial Clontech para poder obtener el extremo 5' del gen *OleGlu2*. Cabría pensar que en las raíces micorrizadas de olivo empleadas para el RACE, el gen *OleGlu1* presentara un mayor número de transcritos que *OleGlu2* y por ello siempre que se ha intentado obtener el extremo 5' de este último gen se ha obtenido el extremo 5' de *OleGlu1* por una cuestión de probabilidad.

Para ambos genes los resultados de los estudios de expresión han sido similares. Se ha detectado una inducción de *OleGlu1* y *OleGlu2* en las raíces de plantas micorrizadas tanto a las 19 como a las 24 semanas de crecimiento tras la inoculación con los hongos micorrícicos correspondientes. La inducción de estas isoformas de  $\beta$ -1,3-glucanasas en olivo concuerdan con trabajos que muestran la acumulación de ARNm de  $\beta$ -1,3-glucanasas en las células que contienen arbusculos y en las adyacentes (Lambais & Mehdy, 1998). Estos resultados apuntan hacia el hecho de que estos genes pudieran estar implicados en la regulación del crecimiento del hongo micorrícico en el interior de la planta hospedadora. Sin embargo existen trabajos de investigación contradictorios respecto a la capacidad inherente de las  $\beta$ -1,3-glucanasas para influenciar el crecimiento de hongos *in vitro*. Algunos estudios muestran como las  $\beta$ -1,3-glucanasas en combinación con quitinasas inhiben el crecimiento de *Trichoderma* (Arlorio *et al.*, 1992; Ait-Lahsen *et al.*, 2001), mientras que otros autores no detectan esta actividad inhibidora sobre hongos micorrícicos (Arlorio *et al.*, 1991; Vierheilig *et al.*, 2001). Posiblemente estas diferencias funcionales sean el resultado de la utilización

de isoformas distintas. En cualquier caso, la posible actividad antifúngica de estas enzimas no afecta al establecimiento de la simbiosis micorrícica, tal y como se describió en la introducción del presente Capítulo. Deben de existir procesos, desconocidos hasta la fecha, de reconocimiento planta-hongo micorrícico que impiden la activación de mecanismos de defensa generalizados. Desde el punto de vista del conocimiento de los mecanismos por los que transcurren las interacciones planta-microorganismo, es imprescindible la comprensión del diálogo molecular que se establece entre ambos simbioses durante el proceso de micorrización y de los factores (señales) clave que diferencian esta interacción de una de carácter patogénico.

En principio no se vislumbra una relación entre el grado de colonización por el hongo micorrícico con los niveles de expresión de los genes estudiados. De hecho *Glomus mosseae* (BEG 119) no fue el hongo micorrícico que alcanzó mayor porcentaje de colonización y en las raíces colonizadas por éste se encontró un mayor nivel de expresión de *OleGlu1* que en las raíces colonizadas con los otros dos hongos ensayados.

En cuanto a la estructura tridimensional deducida de la proteína OLEGLU1 invita a postular que el centro catalítico de la misma se encuentra en el interior del barril  $\beta$ . El polímero de  $\beta$ -1,3-glucanos se hidrolizaría tras atravesar dicho barril  $\beta$ , obteniéndose monómeros de N-acetil-glucosamina.

El sistema de defensa de la planta contra microorganismos patógenos podría mejorarse si se consiguieran altos niveles constitutivos de compuestos antimicrobianos. Alternativamente, una estrategia posible que induzca de forma natural la expresión de genes que codifican enzimas hidrolíticas en procesos de defensa es sin duda, el uso de hongos micorrícicos.

Con el objetivo de estudiar el posible efecto protector de las micorrizas en plantas micropropagadas de olivo frente a estreses de tipo biótico se diseñó el experimento #5 cuyos resultados se muestran en el siguiente capítulo.

**5. Efecto protector de las micorrizas frente a la infección  
por *Verticillium dahliae***



## **5. Efecto protector de las micorrizas frente a la infección por *Verticillium dahliae***

La presencia de microorganismos patógenos en el suelo constituye una amenaza para los cultivos, ya que causan enfermedades que provocan cuantiosas pérdidas al agricultor. Existen en el mercado un gran número de productos para el control químico de las enfermedades de las plantas, no exentos de controversia. Su eficacia está cuestionada en muchos casos y la exposición a dichos productos puede dar lugar al desarrollo de fenómenos de resistencia. A ello hay que añadir las consecuencias negativas que pueden provocar sobre el equilibrio de los ecosistemas. Sin duda son necesarias alternativas para solventar este tipo de problemas sin pérdida de productividad agrícola y que sean respetuosas con el medio ambiente.

En los últimos años se están llevando a cabo numerosas investigaciones enfocadas a desarrollar acciones integradas frente al ataque de fitopatógenos. Entre dichas acciones se ha propuesto utilizar los hongos micorrícicos dadas las posibilidades que esta simbiosis ha mostrado para ayudar a muchas plantas a tolerar enfermedades provocadas por determinados patógenos del suelo (St-Arnaud *et al.*, 1995; Azcón-Aguilar & Barea, 1996; Yao *et al.*, 2002). La bioprotección ejercida por los hongos micorrícicos requiere que la simbiosis esté bien establecida antes de que la planta entre en contacto con el patógeno. Los mecanismos que podrían estar implicados en estos procesos de bioprotección se describieron en la Introducción General de la presente Memoria Doctoral.

Más de 8.000 especies de hongos del suelo, pertenecientes a diversos grupos, pueden producir enfermedades a las plantas. A su vez, todas las plantas son susceptibles de ser atacadas por algún tipo de hongo, y cada uno de los hongos patógenos puede atacar a una o más especies de vegetales.

En el presente trabajo de investigación se abordó el estudio de la posible protección de las micorrizas frente al ataque de *Verticillium dahliae* Kleb., dada la repercusión que este hongo fitopatógeno tiene sobre el cultivo del olivar (Pegg & Brady, 2002). Se trata de un hongo clasificado como Imperfecto. Es un patógeno sistémico que causa una enfermedad vascular en olivo y en otras especies de plantas como el tomate, la patata, el algodón, el girasol etc...(Pegg, 1989; Bejarano-Alcazar *et al.*, 1996). No se le conocen fases sexuales. En base a la sintomatología que produce en campo, no puede afirmarse con certeza que se trata de una infección por *Verticillium dahliae*. Es necesario el aislamiento del patógeno y su identificación para confirmarlo (Mercado-Blanco *et al.*, 2002). El ataque inicial produce los mismos síntomas que otras enfermedades vasculares producidas por hongos como *Fusarium* o bacterias como *Corynebacterium*. Los microesclerocios, sus estructuras de resistencia, están constituidos por células globosas e irregulares que contienen abundantes reservas alimenticias y funcionan como propágulos infectivos de larga vida en el suelo. Los microesclerocios pueden ser transportados a otras áreas mediante materiales de propagación, restos de plantas infectadas, aguas de riego, viento, maquinaria, etc... La severidad del ataque está relacionada directamente con la concentración de inóculo en el suelo. Se requieren varios cultivos sucesivos de plantas susceptibles para que este incremento de forma significativa. La infección se favorece por la presencia de heridas. El patógeno avanza intra e intercelularmente hasta alcanzar el xilema, donde se desarrolla y dificulta la circulación de agua y solutos (Pegg & Brady, 2002). Los primeros síntomas son la aparición de manchas amarillentas a un lado de la nervadura central de las hojas y por lo general al inicio de la floración las manchas se agrandan y se tornan de color castaño, secándose luego totalmente. Las temperaturas inferiores a 30 °C y la alta humedad favorecen la infección.

La literatura científica sobre la interacción *Verticillium*-micorrizas es escasa y los resultados contradictorios. Mientras que autores como Hwang (1992) ó Run-Jin (1995) describen una disminución en el número de propágulos infectivos de *Verticillium* en el suelo alrededor de plantas micorrizadas de alfalfa y algodón, respectivamente, otros autores, como Davis (1979) encuentran un incremento de los propágulos del fitopatógeno en los

peciolos de plantas de algodón micorrizadas. En relación al olivo, los estudios realizados por Karajeh & Al-Raddad (1999) mostraron como plantas micorrizadas con *Glomus mosseae*, que presentaban un mayor porte y ritmo de crecimiento, al ser infectadas con *Verticillium dahliae* reducían significativamente los síntomas de la enfermedad con respecto a las plántulas no micorrizadas.

En el presente Capítulo se aborda el estudio de la interacción tripartita olivo/*Verticillium*/hongo MA con el fin de evaluar el posible efecto protector de la micorriza frente a dicho hongo patógeno. Como se ha visto en Capítulos anteriores de la presente Memoria de Tesis Doctoral, la micorrización de plantas de olivo de la variedad Picual, además de mejorar el crecimiento y la nutrición de la planta, induce la producción de enzimas hidrolíticas del tipo de las  $\beta$ -1,3-glucanasas. Las  $\beta$ -1,3-glucanasas podrían actuar en la defensa de la planta frente al ataque de hongos patógenos de al menos de dos formas complementarias: (i) contribuyendo a la degradación de la pared celular del hongo fitopatógeno y (ii) liberando oligosacáridos de la pared celular del hongo, que actuarían como nuevos elicitores que amplificarían las reacciones de defensa. La actividad antifúngica de estas enzimas se ha puesto de manifiesto en numerosos estudios *in vitro* (Arlorio *et al.*, 1992; Sela-Buurlage *et al.*, 1993; Vierheilig *et al.*, 2001) e *in vivo* (Dumas-Gaudot *et al.*, 1996).

En el presente estudio se han investigado los cambios de naturaleza bioquímica, en cuánto a actividades  $\beta$ -1,3-glucanasa y quitinasa se refiere, en el modelo de estudio olivo/*Verticillium*/hongo micorrícico, así como la expresión de los genes *OleGlu1* y *OleGlu2* en distintos tratamientos para poder clarificar la función de dichas isoformas enzimáticas inducidas por los hongos micorrícicos y su posible implicación en procesos de bioprotección.

### 5.1. Efectos sobre el crecimiento de la planta

Se utilizaron plántulas de olivo de la variedad Picual, que se inocularon con los hongos micorrícicos *Glomus mosseae* BEG 119, *Glomus intraradices* BEG 123 y *Glomus viscosum* BEG 126, tal y como se describe en el apartado de Material y Métodos

(Experimento # 5). El porcentaje de colonización micorrícica obtenida tras 18 semanas de crecimiento en condiciones de invernadero se muestra en la Tabla 17.

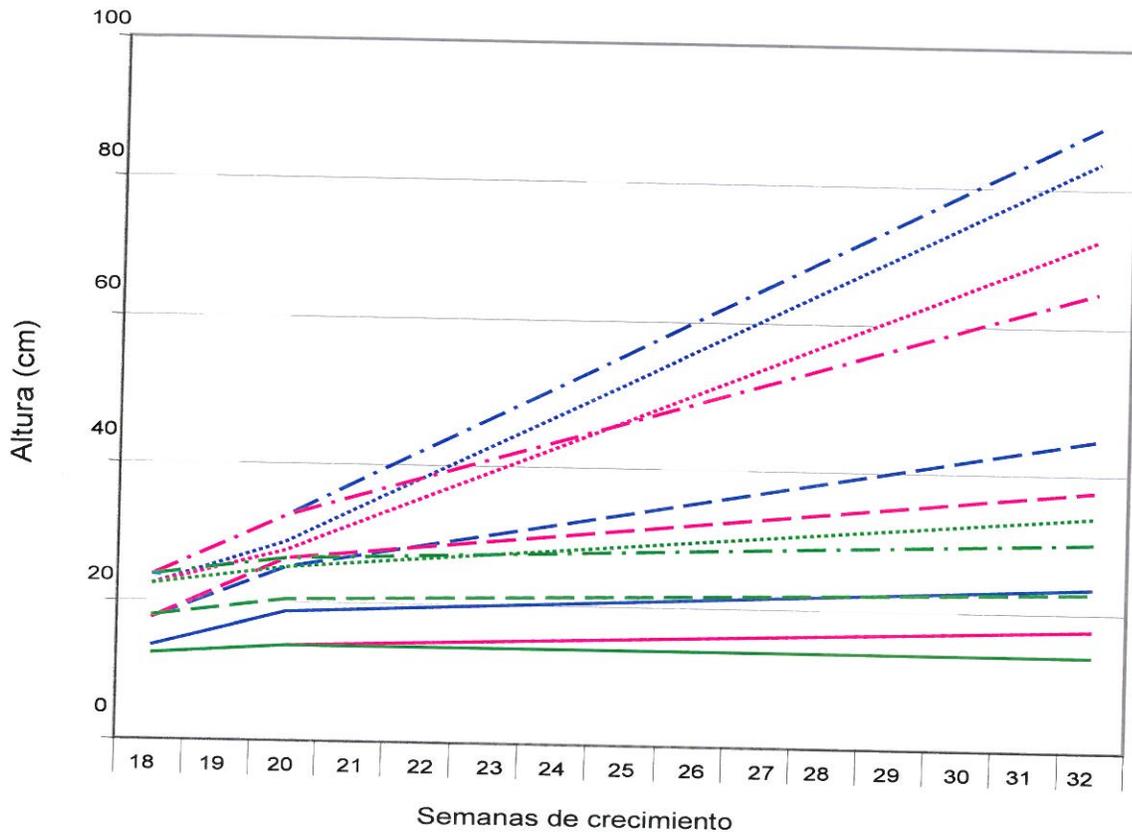
**Tabla 17.** Colonización micorrícica de las plántulas de olivo a las 18 semanas de crecimiento en condiciones de invernadero.

	Colonización micorrícica (%)
<b><i>Glomus mosseae</i> – BEG 119</b>	26.5 a
<b><i>Glomus intraradices</i> – BEG 123</b>	37.5 b
<b><i>Glomus viscosum</i> – BEG 126</b>	30.7 ab

Cabe destacar que en la colonización producida por *Glomus intraradices* –BEG 123 se apreció un número elevado de arbusculos, vesículas y esporas.

A las 18 semanas de crecimiento un lote de las plántulas se inocularon con el patotipo no defoliante (V4) de *Verticillium dahliae*, otro con el defoliante (V138) y un último lote se mantuvo como control (no inoculado) de los anteriores.

La evolución de la altura de las plántulas micorrizadas o no, infectadas o no con el fitopatógeno correspondiente se muestra en la Figura 32.



**Figura 32.** Evolución de la altura de las plántulas de olivo micorrizadas o no, e inoculadas o no a las 18 semanas de crecimiento con el patotipo no defoliante de *Verticillium dahliae* V4 y el defoliante V138.

	Control	V4	V138
<b>Control</b>	—	—	—
<b>Gm</b>	- - -	- - -	- - -
<b>Gi</b>	- . -	- . -	- . -
<b>Gv</b>	.....	.....	.....

Las alturas que mostraban las plántulas a las 32 semanas de crecimiento y último corte del experimento se muestran en la Tabla 18.

**Tabla 18.** Altura (cm) de las plántulas micorrizadas o no, e inoculadas o no con los patotipos no defoliante (V4) o defoliante (V138) de *Verticillium dahliae* a las 32 semanas de crecimiento.

	<b>Tratamiento con <i>Verticillium</i></b>		
<b>Tratamiento micorrícico</b>	<b>Control</b>	<b>V4</b>	<b>V138</b>
<b>Control</b>	22,2 a	17,7 a	14,1 a
<b><i>Glomus mosseae</i></b>	43,9 b	37,2 b	21,7 b
<b><i>Glomus intraradices</i></b>	89,1 c	65,7 c	30,0 c
<b><i>Glomus viscosum</i></b>	84,3 c	72,3 d	34,0 d

En ausencia de *Verticillium* el efecto de la micorrización sobre el crecimiento fue muy evidente. Todos los tratamientos con hongos micorrícicos produjeron un incremento significativo del crecimiento. Se volvía a confirmar el marcado carácter micotrófico de la variedad de olivo Picual. Las plantas inoculadas con el hongo micorrícico *Glomus intraradices* BEG 123 mejoraron su crecimiento hasta en un 300% con respecto a los controles sin micorrizar (Figura 32 y Tabla 19). Aunque ligeramente inferior, efectos similares provocó la inoculación con *G. viscosum*. *G. mosseae* también estimuló significativamente el crecimiento de las plantas aunque fue bastante menos eficaz que los dos anteriores.

**Tabla 19.** Estimulación del crecimiento de las plantas (estimado en base a la altura) promovida por los distintos hongos micorrícicos, en relación a su correspondientes controles sin micorrizar

	Estimulación (%)		
	Control	V4	V138
<i>Glomus mosseae</i>	98	110	54
<i>Glomus intraradices</i>	301	271	113
<i>Glomus viscosum</i>	280	308	138

La inoculación con el patotipo menos virulento de *Verticillium*, el aislado no defoliante V4, disminuyó ligeramente el desarrollo de las plantas (Figura 32 y Tabla 20). La inhibición del crecimiento fue relativamente más acusada en las plantas micorrizadas con *G. intraradices*, aunque al igual que ocurría en ausencia de *Verticillium* las plantas micorrizadas con *G. viscosum* y *G. intraradices* superaban en desarrollo a las micorrizadas con *G. mosseae* y todas ellas, superaban significativamente el crecimiento de las plantas control (Figura 32). Las plantas micorrizadas con *G. viscosum* fueron las que menos afectadas resultaron por la inoculación con el patotipo no defoliante de *Verticillium* (Tabla 20).

**Tabla 20.** Inhibición del crecimiento de las plantas (estimado en base a la altura) provocada por los distintos aislados de *Verticillium*, en relación a sus controles correspondientes sin inocular con el patógeno.

	Inhibición (%)	
	V4	V138
Control	20	37
<i>Glomus mosseae</i>	15	51
<i>Glomus intraradices</i>	26	66
<i>Glomus viscosum</i>	14	60

La inoculación con el patotipo defoliante de *Verticillium* V138 redujo drásticamente el desarrollo de las plantas, especialmente el de las plantas micorrizadas con *G. intraradices* y *G. viscosum*, que eran las que presentaban un mayor ritmo de crecimiento (Tabla 20). A pesar de ello, el crecimiento de las plantas micorrizadas fue significativamente superior al de los controles no micorrizados.

Todas las plantas inoculadas con *Verticillium* mostraron síntomas de la enfermedad. En el caso del patotipo no defoliante (V4) se observaron manchas amarillentas en las hojas. El patotipo defoliante (V138) propició la caída de las hojas. Tras un periodo de desaceleración del crecimiento importante, las plantas micorrizadas comenzaron a dar síntomas de recuperación con la aparición de hojas nuevas.

Las muestras procedentes de este experimento se sometieron a estudios bioquímicos y moleculares con la finalidad de determinar cambios en la inducción de actividades hidrolíticas en las plantas micorrizadas como consecuencia de la inoculación con los distintos tipos de patógeno.

## **5.2. Análisis del contenido en proteínas**

En la Tabla 21 se muestra el contenido proteico de los extractos de raíz correspondientes a los distintos tratamientos ensayados, después de 20 y 32 semanas de crecimiento, es decir tras 2 y 12 semanas, respectivamente, de la inoculación con *Verticillium dahliae*.

En ausencia de *Verticillium*, *Glomus intraradices* incrementó muy significativamente el contenido en proteínas del sistema radical. Al igual que se había observado previamente, *Glomus viscosum* y *Glomus mosseae* también lo incrementaron aunque en menor medida. Tendencias similares se observaron en las plantas inoculadas con V4, aunque en la lectura

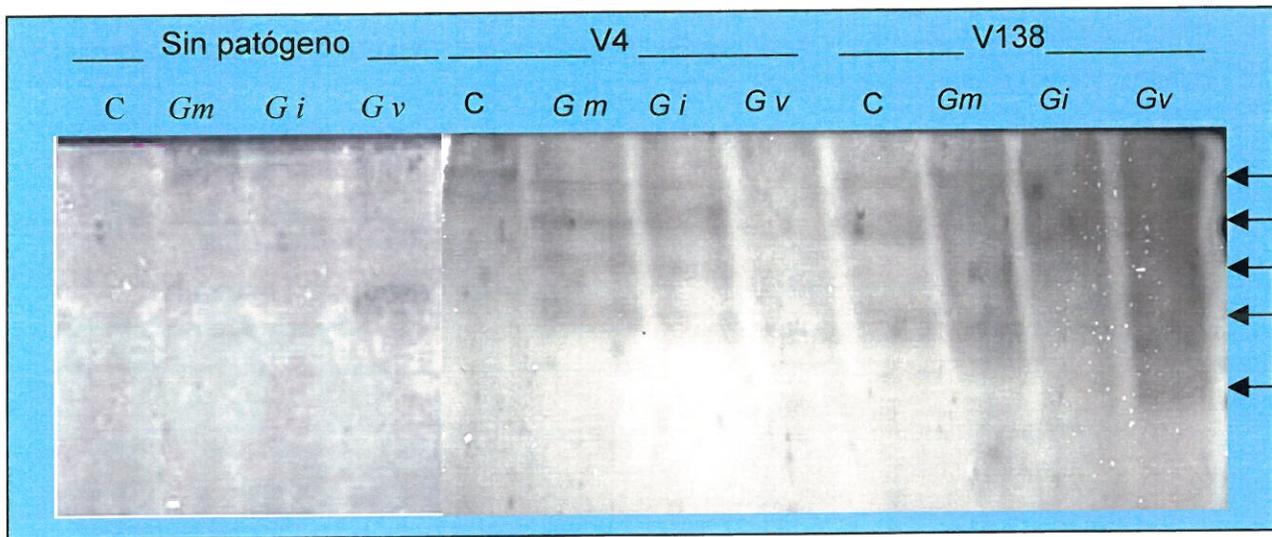
a las dos semanas de la inoculación con el patógeno las diferencias fueron mucho menores. La inoculación con el patotipo defoliante V138 indujo un cambio en la tendencia observada: mientras ésta se mantenía dos semanas después de la inoculación con V138, cambió drásticamente 12 semanas después y fueron en este caso las plantas micorrizadas con *G. viscosum* las que mostraron un mayor contenido proteico en el sistema radical.

**Tabla 21.** Concentración de proteínas en los extractos crudos de raíz de plantas de olivo sometidas a distintos tratamientos de inoculación con hongos micorrícicos y *Verticillium dahliae*. V4 = patotipo no defoliante, V138 = patotipo defoliante.

	Concentración de proteínas ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )	
	20 semanas	32 semanas
<b>Control</b>	0,336	0,550
<b><i>G. mosseae</i></b>	1,512	0,984
<b><i>G. intraradices</i></b>	1,858	3,619
<b><i>G. viscosum</i></b>	1,506	2,378
<b>Control + V4</b>	0,495	1,529
<b><i>G. mosseae</i> + V4</b>	0,675	2,359
<b><i>G. intraradices</i> + V4</b>	0,884	3,531
<b><i>G. viscosum</i> + V4</b>	0,889	2,600
<b>Control + V138</b>	0,462	0,921
<b><i>G. mosseae</i> + V138</b>	1,042	1,010
<b><i>G. intraradices</i> + V138</b>	1,668	1,353
<b><i>G. viscosum</i> + V138</b>	1,015	2,656

### 5.3. Análisis de la actividad $\beta$ -1,3-glucanasa ácida

Los resultados correspondientes a las muestras tras dos semanas de la inoculación con *Verticillium* se muestran en las Figuras 33. En ausencia del patógeno (Figura 33) tan solo se detectó una banda con actividad  $\beta$ -1,3-glucanasa en el extracto proteico de las plantas micorrizadas con *Glomus viscosum*, coincidente con la detectada en los estudios realizados anteriormente (Capítulo 3).

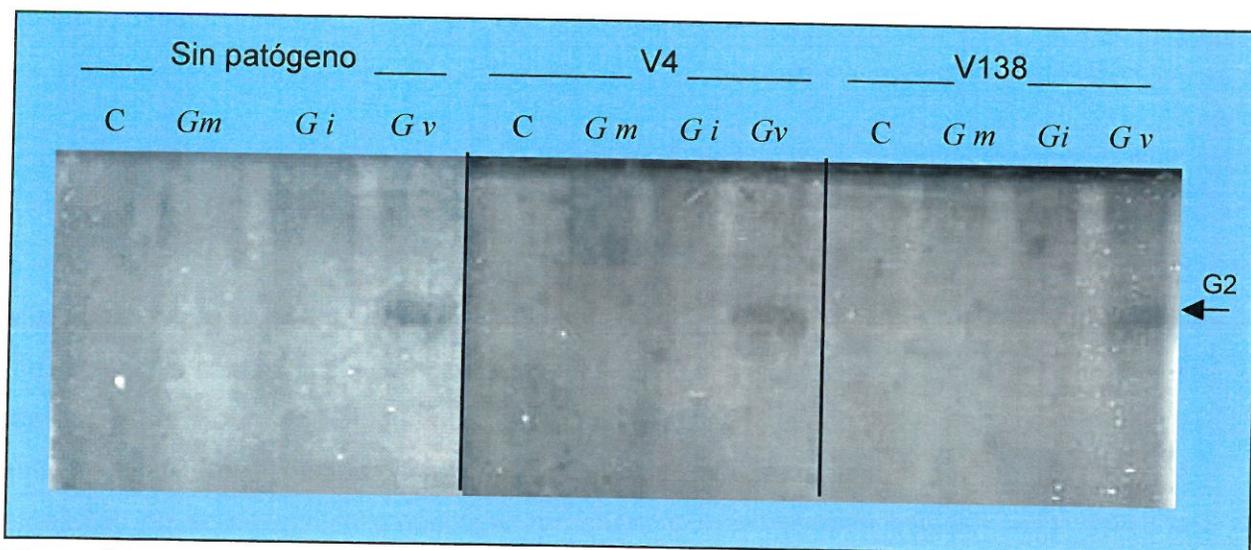


**Figura 33.** Actividad  $\beta$ -1,3-glucanasa con carácter ácido o neutro de los extractos proteicos solubles obtenidos de las raíces de olivo (var. Picual) micorrizadas o no, infectadas o no con *Verticillium dahliae* V4 ó V138, de la 1ª cosecha. C= Control no micorrizado, Gm = *Glomus mosseae*, Gi = *Glomus intraradices*, Gv = *Glomus viscosum*, V4 = patotipo no defoliante, V138 = patotipo defoliante.

En las plantas infectadas por *Verticillium dahliae* (aislado V4), se detectaron hasta cuatro isoformas nuevas en las plantas micorrizadas con *G. mosseae* Figura 33. Las plantas micorrizadas con *G. intraradices* presentaban un perfil parecido al de las micorrizadas con *G. mosseae*, aunque las bandas con mayor movilidad electroforética no se observaban tan claramente. Las plantas micorrizadas con *G. viscosum* no mostraban ninguna banda clara y en las plantas control se observó la inducción de una/dos bandas de

reducida movilidad. El patotipo defoliante V138 indujo en plantas control un mayor número de isoformas y de mayor intensidad que el patotipo no defoliante V4. Asimismo los extractos procedentes de las plantas micorrizadas mostraron un incremento generalizado de actividad, especialmente en las raíces micorrizadas con *G. viscosum*, aunque no se pudo distinguir la actividad de isoformas concretas.

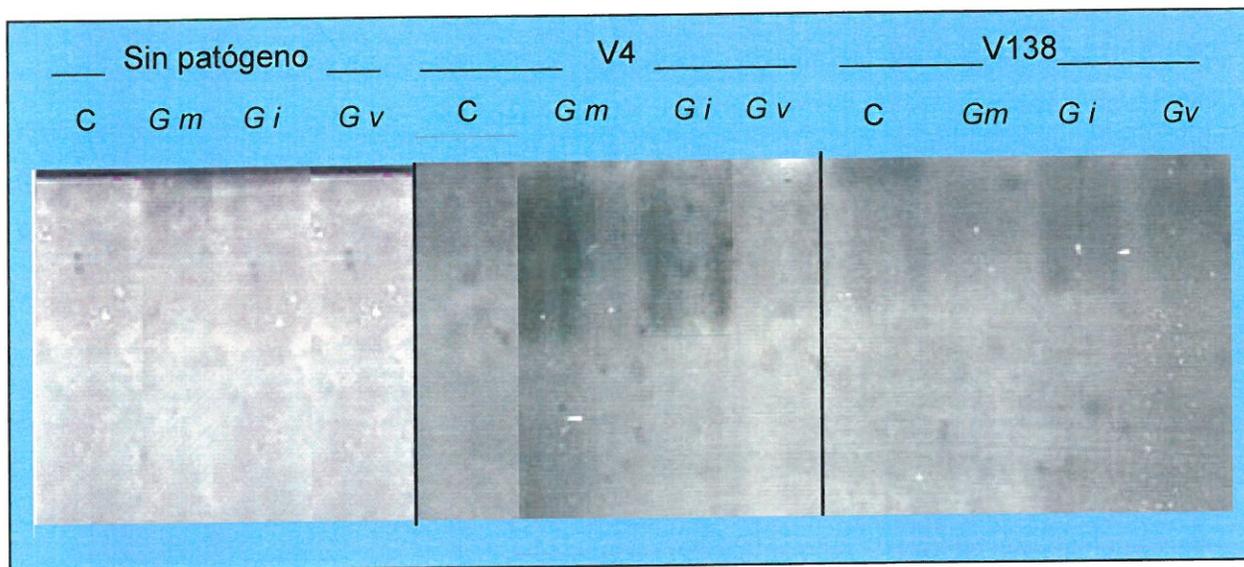
El patrón isoenzimático con actividad  $\beta$ -1,3-glucanasa de carácter ácido o neutro de los extractos proteicos procedentes de los tratamientos infectados por *Verticillium*, cambió drásticamente en el corte practicado 12 semanas más tarde (Figura 34). Tan solo se detectó claramente la inducción de una banda en las plantas micorrizadas con *Glomus viscosum*, infectadas o no por cualquiera de los patotipos estudiados. No se detectaron diferencias significativas en la intensidad de la banda observada por efecto de la inoculación con el patógeno. Este patrón de inducción coincide totalmente con el obtenido 12 semanas antes para las plantas no inoculadas con *Verticillium*.



**Figura 34.** Actividad  $\beta$ -1,3-glucanasa con carácter ácido o neutro en geles de poliacrilamida al 15%. Se cargaron los extractos proteicos solubles obtenidos de las raíces de olivo (var. Picual) de los diferentes tratamientos ensayados. C= Control no micorrizado, Gm = *Glomus mosseae*, Gi = *Glomus intraradices*, Gv = *Glomus viscosum*, V4 = patotipo no defoliante, V138 = patotipo defoliante.

#### 5.4. Análisis de la actividad $\beta$ -1,3-glucanasa básica

Las isoformas de  $\beta$ -1,3-glucanasas con carácter básico presentes en los distintos extractos radicales se analizaron mediante separación electroforética catódica. Los resultados correspondientes a las dos semanas de la inoculación con el patógeno se muestran en la Figura 35. No se detectó ninguna actividad en las plantas no inoculadas con *Verticillium*.



**Figura 35.** Actividad  $\beta$ -1,3-glucanasa de carácter básico en geles de poliacrilamida al 15%. Se cargaron los extractos proteicos solubles obtenidos de las raíces de olivo (variedad Picual) micorrizadas o no. Las plantas se habían inoculado también con *Verticillium* (aislado V4 ó V138) dos semanas antes del corte. C= Control no micorrizado, Gm = *Glomus mosseae*, Gi = *Glomus intraradices*, Gv = *Glomus viscosum*, V4 = patotipo no defoliante, V138 = patotipo defoliante.

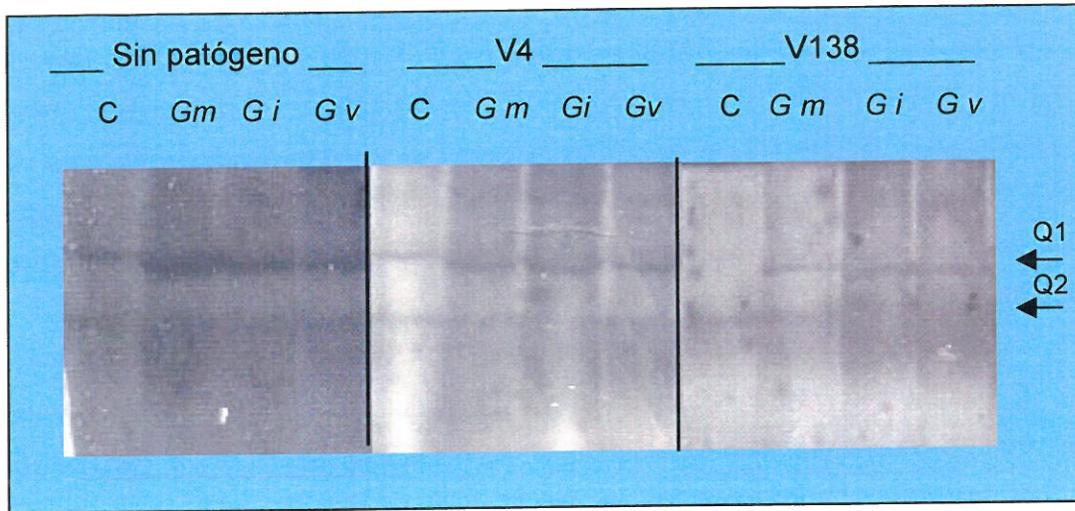
Se detectó una actividad difusa, no claramente diferenciable en bandas concretas en los extractos de las plantas micorrizadas con *Glomus mosseae* y *Glomus intraradices* e infectadas posteriormente con el aislado V4 de *Verticillium*. Sin embargo, en plantas infectadas con V138 fueron las micorrizadas con *Glomus intraradices* y *Glomus viscosum* las que presentaron mayor actividad. Curiosamente, los extractos de raíces infectadas con *Verticillium dahliae* (aislado V4) presentaban mayor actividad  $\beta$ -1,3-glucanasa de carácter básico que las infectadas con *Verticillium dahliae* (aislado V138).

En las plantas control infectadas con V138 la actividad generalizada del extracto era menor que en las plantas micorrizadas con *G. intraradices* y *G. viscosum*, pero se apreciaba la inducción de una banda concreta de actividad de baja movilidad electroforética (Figura 35).

Las muestras correspondientes al segundo corte (14 semanas tras la inoculación con *Verticillium*) no mostraron actividad  $\beta$ -1,3-glucanasa de carácter básico (resultados no mostrados).

#### **5.4. Análisis de la actividad quitinasa ácida**

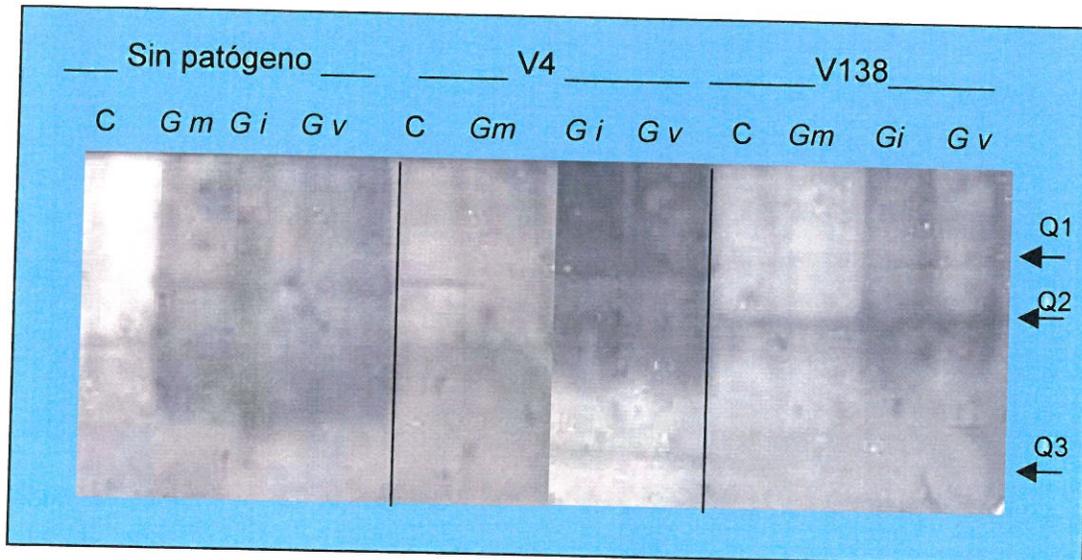
Se detectaron dos bandas con actividad quitinasa de carácter ácido o neutro en todos los casos estudiados excepto en los controles infectados por el patotipo defoliante V138 en los que tras dos semanas de inoculación con el patógeno apenas se visualizaba la banda de actividad de menor movilidad, como puede observarse en la Figura 36. La banda de menor movilidad electroforética aparecía normalmente nítida y bien definida, mientras que la otra corresponde más bien a una zona de actividad difusa.



**Figura 36.** Actividad quitinasa ácida o neutra de las muestras correspondientes a los distintos tratamientos estudiados. C= control, Gm = *Glomus mosseae*, Gi = *Glomus intraradices*, Gv = *Glomus viscosum*, V4 = patotipo no defoliante, V138 = patotipo defoliante.

Catorce semanas después de la inoculación con *Verticillium* se detectaron ciertas diferencias en cuánto a la actividad quitinasa ácida en los extractos de las raíces (Figura 37). La banda de menor movilidad electroforética, ya detectada anteriormente, se observa prácticamente en todos los tratamientos excepto en los correspondientes a C y Gm + V4. En los correspondientes a C y Gm, ambos inoculados con el patotipo defoliante de *Verticillium dahliae* V138, esta misma banda aparece especialmente tenue. La banda de mayor movilidad electroforética también detectada previamente se observa con mayor o menor intensidad en todos los tratamientos.

En general los extractos de las plantas micorrizadas muestran una mayor actividad de fondo aunque ésta no se resuelve en bandas adicionales de actividad. Esto es especialmente evidente para *G. intraradices* y *G. viscosum*.

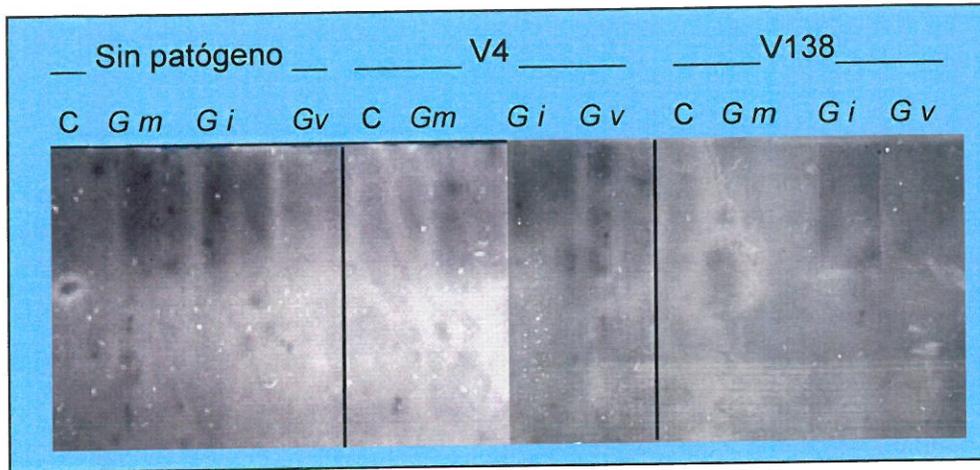


**Figura 37.** Actividad quitinasa ácida o neutra en raíces de olivo no micorrizadas (C) o colonizadas por los distintos hongos micorrícicos (*Gm* = *Glomus mosseae*, *Gi* = *Glomus intraradices*, *Gv* = *Glomus viscosum*) 14 semanas después de la inoculación con los patotipos no defoliante (V4) y defoliante (V138) de *Verticillium*.

### 5.6. Análisis de la actividad quitinasa básica

No se detectó actividad quitinasa de carácter básico en los extractos proteicos procedentes de las raíces de los distintos tratamientos estudiados dos semanas después de la inoculación con el patógeno (datos no mostrados).

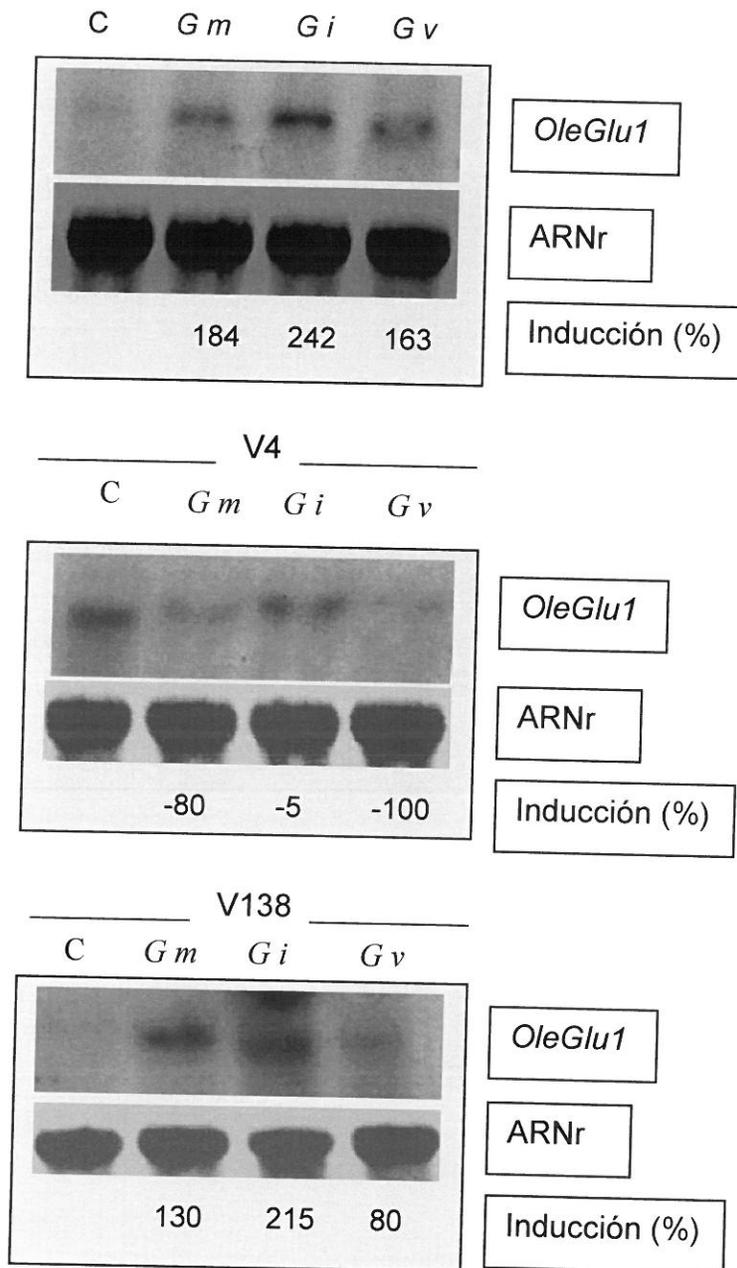
Doce semanas después se detectó actividad quitinasa básica en los extractos proteicos procedentes, fundamentalmente de los tratamientos micorrizados (Figura 38). En ausencia de patógeno la máxima actividad correspondía a los extractos de las plantas micorrizadas con *Glomus mosseae* y *Glomus intraradices*. En las plantas infectadas con V138, ni el control ni las plantas colonizadas con *G. mosseae* mostraron actividad.



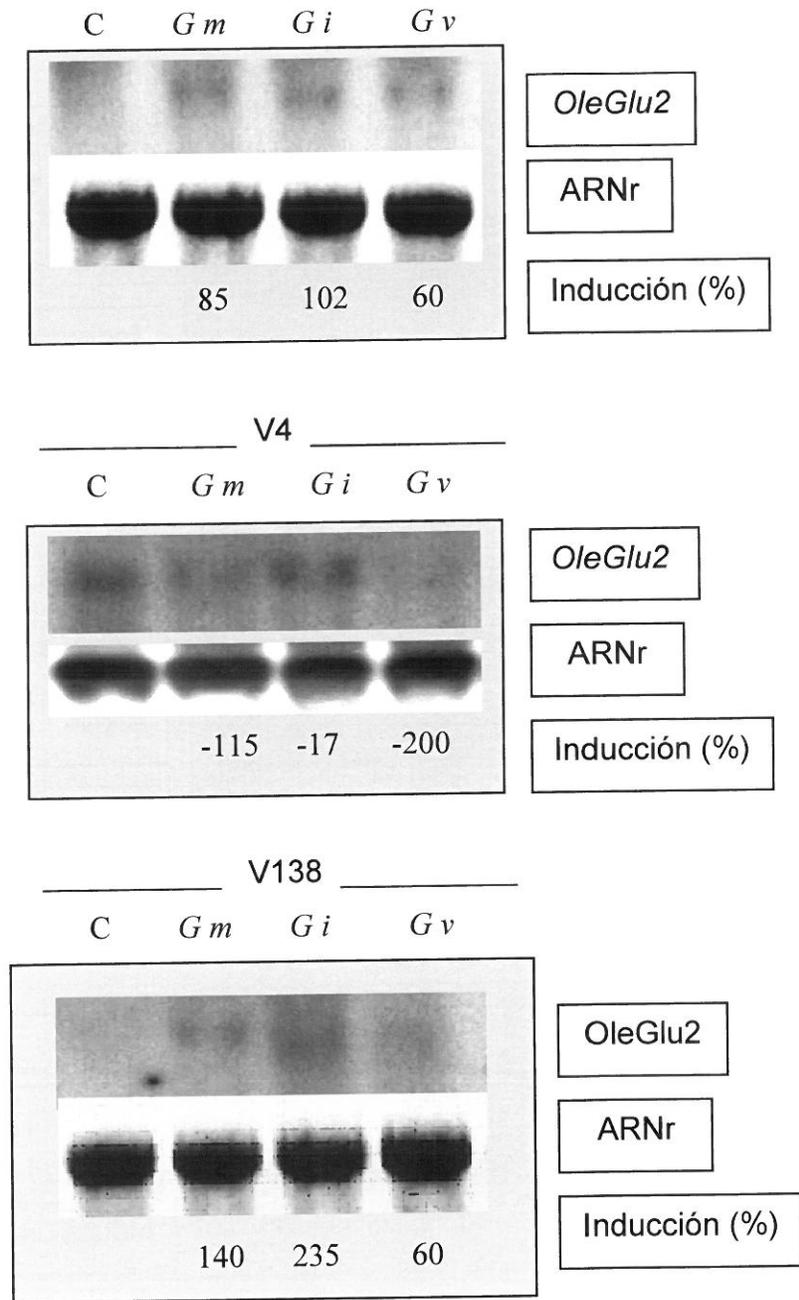
**Figura 38.** Actividad quitinasa de carácter básico de los extractos proteicos de los distintos tratamientos 14 semanas después de la inoculación con *Verticillium*. C= control no micorrizado, Gm = *Glomus mosseae*, Gi = *Glomus intraradices*, Gv = *Glomus viscosum*, V4 = patotipo no defoliante, V138 = patotipo defoliante.

### 5.7. Estudios de expresión génica (*Northern blot*)

Los estudios de expresión de los genes *OleGlu1* y *OleGlu2* se realizaron utilizando ARN total extraído de las raíces de los diferentes tratamientos ensayados, a las 20 semanas de crecimiento, es decir 2 semanas después de la inoculación con los patógenos. Los resultados de dichos estudios moleculares se muestran en las Figuras 39 y 40.



**Figura 39.** Expresión del *OleGlu1* en las raíces control (C) y micorrizadas (*Gm* = *Glomus mosseae*, *Gi* = *Glomus intraradices*, *Gv* = *Glomus viscosum*) infectadas o no por las variedades no defoliante (V4) y defoliante (V138) del hongo fitopatógeno *Verticillium dahliae* Kleb.



**Figura 40.** Expresión del gen *OleGlu2* en las raíces control (C) y micorrizadas (*Gm* = *Glomus mosseae*, *Gi* = *Glomus intraradices*, *Gv* = *Glomus viscosum*) infectadas o no por las variedades no defoliante (V4) y defoliante (V138) del hongo fitopatógeno *Verticillium dahliae* Kleb.

Los resultados obtenidos coincidieron básicamente para los dos genes estudiados *OleGlu1* y *OleGlu2*.

En ausencia de patógeno o en presencia del patotipo defoliante V138 se puso de manifiesto una inducción de ambos genes en las plantas micorrizadas, especialmente con *G. intraradices*. En las plantas control no se detectaba inducción o ésta era tan tenue que era difícil de apreciar. En cambio en los tratamientos con el patotipo no defoliante V4 la máxima inducción correspondía a las plantas control y a los tratamientos micorrizados con *Glomus intraradices*.

## 5.8. Discusión

En términos estrictos no se puede decir que la micorrización protegiera a las plantas frente a *Verticillium*. Los síntomas de la enfermedad fueron visibles con el tiempo en las plantas de todos los tratamientos. Estos síntomas fueron mucho más severos cuando se trataba del aislado 138 (patotipo defoliante) tal y como se esperaba. En este caso se produjo caída de las hojas y la defoliación se inició antes en las plantas micorrizadas. A pesar de ello, la evolución del crecimiento de las plantas sugiere que la colonización micorrícica está ayudando a la planta a tolerar mejor, probablemente mediante mecanismos compensatorios indirectos, la situación de estrés provocada por el patógeno. De ello da idea también el hecho de que, tras la defoliación, las plantas micorrizadas comenzaron a dar síntomas de recuperación con la aparición de hojas nuevas.

Las plantas micorrizadas con los distintos hongos micorrícicos estudiados no respondieron en igual medida al ataque por *Verticillium*. Las plantas que mejor respondieron al ataque por *Verticillium* fueron las micorrizadas con *Glomus viscosum*. A pesar de mostrar los síntomas característicos de la enfermedad, la inhibición del crecimiento que experimentaron estas plantas en presencia del patotipo menos agresivo (V4) fue muy baja. Cuando se trataba del patotipo defoliante V138, las plantas colonizadas por *Glomus*

*viscosum*, fueron también las que mejor toleraron la enfermedad. Este hongo micorrícico debe conferir ventajas fisiológicas a la planta respecto a los otros dos hongos ensayados, aunque hasta el momento, no se conocen los mecanismos y razones que justifican este hecho. Toda la bibliografía referente a la protección frente a patógenos por micorrizas habla de un compendio de procesos que de forma sinérgica favorece la tolerancia de la planta (Azcón-Aguilar & Barea, 1996; Dumas-Gaudot *et al.*, 2000; Lambais, 2000) Probablemente, en nuestro sistema experimental se produzca una situación parecida.

Una colonización micorrícica más extensa no supuso una mayor tolerancia de la planta frente a los patógenos, ya que las plantas micorrizadas por *Glomus viscosum* se afectaban en menor medida que el resto, mientras que las raíces colonizadas por *Glomus intraradices* eran las que presentaban un mayor intensidad de colonización. Estos resultados corroboran observaciones previas en otras plantas (Habte *et al.*, 1999).

Los resultados encontrados en nuestro estudio contrastan en general con los descritos en la bibliografía en relación a la interacción *Verticillium*-micorrizas. Hay que tener en cuenta en cualquier caso que es difícil en ocasiones comparar los resultados obtenidos en distintos laboratorios porque las condiciones experimentales, los hongos micorrícicos y los patógenos implicados son diferentes en los diversos (y escasos) estudios realizados al respecto.

El único estudio en el que se describe una interacción negativa hongo micorrícico (*Glomus fasciculatum*), *V. dahliae* (patotipo defoliante) se llevó a cabo en plantas de algodón (Davis *et al.*, 1979). En este caso la inoculación de ambos hongos se practicaba simultáneamente. En las circunstancias de este estudio los resultados son fácilmente explicables pues hoy día es ampliamente conocido que el efecto protector de los hongos micorrícicos, en caso de que se manifieste, requiere que la micorriza esté bien establecida antes del contacto de la planta con el patógeno (Azcón-Aguilar & Barea, 1996; Jaizme-Vega & Pinochet, 1997; Slezack *et al.*, 2000).

En un estudio posterior llevado a cabo en planta de alfalfa, se describe una reducción de la incidencia de la enfermedad en plantas micorrizadas producida por *Verticillium albo-agrum* (Hwang *et al.*, 1992). En este estudio la inoculación del patógeno se realizó sobre plantas ya micorrizadas adicionando al suelo una suspensión de conidios. Una situación también de protección se describió posteriormente en plantas de algodón, frente a patotipos de virulencia elevada e intermedia de *V. dahliae* (Liu, 1995).

En nuestro estudio el patógeno se adicionó a plantas ya micorrizadas. La inoculación se practicó sumergiendo la raíz (o micorriza, en su caso) a la cual se le habían producido pequeños cortes para eliminar algunos ápices, en una suspensión de microesclerocios de cada uno de los aislados de *Verticillium* estudiados. Está claro que la necesidad de dejar la planta a raíz desnuda para sumergirla en la suspensión de microesclerocios implica de un lado, romper las redes de micelio externo del hongo que se desarrollan en el suelo y también la posibilidad de producir alguna herida a la raíz. Ello junto con los cortes practicados en los ápices, sin duda (y así se pretendía) facilitó la entrada del patógeno a la planta. Estas condiciones (que en principio podríamos considerar como drásticas) se eligieron así por la necesidad de conseguir el desarrollo de la enfermedad en un tiempo prudencial de experimentación (meses y no años), de normalizar el desarrollo de la misma para poder comparar a las micorrizas con otras posibles medidas de control de la enfermedad, y finalmente, por estudiar la respuesta de las micorrizas en estas condiciones difíciles en las que al patógeno se le facilitaba la penetración al sistema radical.

Éstas, sin embargo, no son las circunstancias normales que el patógeno encuentra en condiciones naturales para infectar a la planta. En campo, el patógeno tendrá que acceder al cilindro vascular mediante heridas del sistema radical o tendrá que competir por sitios de colonización/infección y sustratos carbonados, con los hongos micorrícicos que hayan colonizado previamente la raíz. Sería por lo tanto de esperar un mayor grado de protección de las plántulas de olivo en condiciones normales de cultivo, e incluso cuando el patógeno se inocula sin producir cortes, ni disturbar el sistema radical ni el micelio externo de los hongos micorrícicos.

El único estudio encontrado hasta la fecha sobre el papel de las micorrizas en la protección frente a *Verticillium dahliae* en plantas de olivo, describe una protección de la planta mediada por la simbiosis (Karajeh & Al-Raddad, 1999). Sin embargo no nos ha sido posible conocer el protocolo experimental seguido, ni el grado de virulencia de los aislados de *Verticillium* empleados, por lo que no es posible comparar los resultados obtenidos, y, por todo lo expuesto anteriormente, tampoco podemos concluir que los resultados sean contradictorios.

En relación a mecanismos más específicos de protección, es obvio que el mejor estado nutritivo de las plantas micorrizadas es clave para la puesta en marcha de los mecanismos implicados en defensa. El estatus nutritivo de las plantas de olivo mejora significativamente por la micorrización, lo que implica un estado fisiológico más favorable, y un mayor vigor, factores que indirectamente le ayudan a enfrentarse al ataque de patógenos (Azcón-Aguilar *et al.*, 2002).

El hecho de que en las raíces micorrizadas la concentración de proteínas solubles sea superior que en los controles correspondientes es una confirmación de su mayor actividad metabólica. La presencia del patógeno causa desorganización celular y podría justificar la disminución del contenido proteico de las raíces dos semanas después de su inoculación. El incremento posterior en la concentración de proteínas en algunos de los tratamientos podría ser un reflejo de la activación de mecanismos de protección y defensa.

Los resultados del estudio de naturaleza bioquímica sobre las distintas actividades hidrolíticas analizadas nos muestran una reacción diferencial de la planta hospedadora ante los dos tipos de organismos, mutualistas y patógenos. Entre los mutualistas *Glomus viscosum* induce reiteradamente, a los distintos tiempos estudiados, la aparición de una banda con actividad  $\beta$ -1,3-glucanasa de carácter ácido o neutro en las raíces de la planta. Dado que los  $\beta$ -1,3-glucanos forman parte de las paredes celulares de algunos hongos micorrícicos, esta isoforma podría estar implicada en el control del desarrollo intracelular del hongo y en la regulación de la simbiosis. La expresión diferencial con respecto a los otros hongos micorrícicos ha sido descrita previamente en plantas de tomate (Pozo *et al.*, 1999), y

podría estar relacionada con diferencias en la estructura y/o composición de la pared celular, o en la dinámica de colonización del hongo. La inoculación con *Verticillium dahliae* resulta también en un incremento de la actividad  $\beta$ -1,3-glucanasa de la raíz tras dos semanas de inoculación. A este tiempo se aprecia la inducción de diversas isoformas de dichas enzimas o de un incremento generalizado de la actividad de fondo como respuesta a la infección por el patógeno. Las nuevas isoformas de carácter ácido o neutro que aparecen en los tratamientos con *Verticillium* podrían estar implicadas en los mecanismos iniciales de defensa ya que su inducción desaparece en estadíos posteriores.

Los estudios paralelos sobre actividad quitinasa arrojan también resultados interesantes. Las actividades hidrolíticas analizadas nos muestran una reacción de la planta hospedadora ante los distintos hongos micorrícicos. La sola presencia del patógeno no implicó la inducción de nuevas isoformas.

Diferencias en la inducción de isoformas con actividad quitinasa entre plantas colonizadas por uno u otro hongo micorrícico se han descrito previamente. De hecho Salzer *et al.* (2000) encontraron una expresión diferencial de ocho genes que codifican quitinasas en raíces de *Medicago* colonizadas o infectadas por hongos micorrícicos y fitopatógenos. Para entender la implicación de estas actividades es importante tener en cuenta que isoformas distintas pueden tener diferentes localizaciones subcelulares y estar diferencialmente reguladas, cumpliendo funciones específicas.

Los estudios de expresión de los genes *OleGlu1* y *OleGlu2* mostraron una tendencia similar en el patrón de expresión de ambos genes en los distintos tratamientos. La presencia de hongos micorrícicos y del aislado no defoliante V4 induce la expresión de dichos genes en las raíces de las plantas de olivo (variedad Picual). Estos resultados concuerdan con el análisis filogenético que se realizó con las secuencias nucleotídicas de ambos genes, el cual nos permitió clasificar a estas enzimas como glucanasas de la clase III expresadas en interacciones planta-microorganismo. La micorrización conlleva ventajas fisiológicas para la planta, pero también es cierto que implica la colonización inter e intracelular de la raíz. Aunque muy distintos en sus consecuencias, la colonización del sistema radical por los

hongos micorrícicos (la mayoría de los cuáles son poco agresivos), podría compararse a la de organismos patógenos atenuados o poco virulentos. No es de extrañar por tanto que algunos aspectos de la respuesta de la planta sean similares frente a distintos tipos de organismos (mutualistas o patógenos poco virulentos). Sin embargo, el aislado V138 (bastante más virulento que V4) no indujo la expresión de estos genes. En este sentido cabe hipotetizar que la planta posea distintos mecanismos de defensa que entran en funcionamiento en función de la agresividad del organismo invasor o colonizador (Pieterse & Van Loon, 1999; Persello-Cartieaux *et al.*, 2003). Los genes aislados en el presente estudio formarían parte de esa respuesta inicial frente a organismos que no son colonizadores agresivos, pero no estarían implicados en la respuesta drástica que requeriría un patógeno más virulento.

En resumen, y a pesar de la falta de protección en sentido estricto, los hongos micorrícicos han aliviado en cierta medida el estrés producido por los distintos patotipos de *Verticillium*. *G.viscosum* sería el hongo micorrícico de elección para profundizar en otros aspectos que permitan maximizar los efectos beneficiosos de la simbiosis en plantas de olivo y su tolerancia frente a *Verticillium*.

## *Discusión General*



## Discusión General

Los resultados obtenidos mediante las investigaciones de tipo ecológico, fisiológico, bioquímico y genético llevadas a cabo en el presente estudio ponen de manifiesto que la micorrización beneficia el crecimiento y la calidad (estado nutritivo y resistencia a estrés) de las plantas de olivo objeto de estudio. Dado que las plantas utilizadas fueron obtenidas por cultivo *in vitro*, este estudio corrobora la importancia de la micorrización como componente de los protocolos de micropropagación del material vegetal (Azcón-Aguilar & Barea, 1997; Vestberg *et al.*, 2002). Los datos fisiológicos obtenidos en el presente trabajo corroboran la gran dependencia de las micorrizas de las variedades comerciales de olivo Arbequina y Picual para alcanzar un desarrollo óptimo, al igual que se había descrito previamente para otras plantas de olivo (Roldán-Fajardo & Barea, 1986). El efecto de las micorrizas sobre la nutrición mineral de la planta se ejerce mayoritariamente mediante el incremento en la absorción de P (Pearson & Jackobsen *et al.*, 1993; Smith *et al.*, 2000) y así se puso de manifiesto igualmente en plántulas de olivo. El incremento también en el contenido de N, aunque en menor medida que de P, en la parte aérea de las plantas permite pensar en las micorrizas como “biofertilizantes”, alternativa o complemento de fertilizantes químicos tradicionales. Considerando el interés comercial de las variedades de olivo objeto de investigación y la factibilidad de hacer concurrentes los dos tipos de desarrollos biotecnológicos (micropropagación y micorrización) resulta evidente que las investigaciones presentadas en esta Memoria tienen una repercusión práctica considerable para la industria viverística. Se propone por tanto la posibilidad de incluir prácticas de inoculación con hongos micorrícicos seleccionados en los viveros productores de plántulas de olivo de dichas variedades. La inoculación pasaría a formar parte de los protocolos normalizados de producción ya que las plántulas (micropropagadas o no) mejorarían su estado nutritivo y su crecimiento. Asimismo, una adecuada micorrización podría reducir los estreses que sufren dichas plántulas en el momento de su transplante a campo.

Los hongos micorrícicos aislados de la rizosfera de olivos crecidos en condiciones naturales fueron más efectivos en la estimulación del crecimiento y la nutrición que los hongos micorrícicos de colección (EEZ). Esto indica una mejor adaptación de dichos ecotipos a la fisiología de la planta y/o arquitectura y dinámica de desarrollo del sistema radical. Esto concuerda con estudios recientes tanto en sistemas agrícolas, como en ecosistemas naturales, en donde se propone como estrategia de trabajo inocular con poblaciones nativas de hongos micorrícicos, los cuáles ya están adaptados a las condiciones prevalentes en la zona (Jeffries & Barea, 2001).

En el presente estudio la caracterización de los hongos micorrícicos aislados se realizó mediante la combinación de metodologías tradicionales, basadas en la morfología y ontogenia de las esporas de los hongos, junto a técnicas moleculares que amplifican el ADN ribosómico (Lanfranco *et al.*, 1995; Sawaki *et al.*, 1998, Redecker, 2000; Redecker, 2002). Obviamente, una correcta identificación es clave para explorar primero y explotar después, la diversidad e interacciones de los hongos micorrícicos en un agrosistema dado. La amplificación de la subunidad ribosómica pequeña (18S) ha sido una técnica utilizada en numerosos trabajos de investigación dirigidos a la caracterización molecular de distintos aislados micorrícicos (Schüßler *et al.*, 2001; Redecker, 2002). La presencia en la base de datos de muy pocas secuencias pertenecientes a algunas de las especies estudiadas, como es el caso de *G. clarum*, hace que las relaciones filogenéticas de este hongo con el resto de los hongos micorrícicos no estén claras por el momento.

Conocidos los efectos beneficiosos de la micorrización en cuánto al crecimiento y la nutrición de las plantas de olivo, se abordó el estudio de su posible papel en bioprotección frente a enfermedades. De acuerdo con los resultados obtenidos en el presente estudio en la planta micorrizada se inducen distintas isoformas con actividad  $\beta$ -1,3-glucanasa y quitinasa, de forma específica según el hongo micorrícico considerado. Esta inducción de isoformas con actividad hidrolítica por parte de los hongos micorrícicos se ha descrito previamente en otras plantas como el guisante y el tomate (Dassi *et al.*, 1996; Pozo *et al.*, 1998, 1999).

Se ha discutido mucho el posible papel de estas enzimas en la defensa de la planta, la regulación de su desarrollo, y el control del establecimiento y/o funcionamiento de las interacciones simbióticas planta-microorganismo mediante la liberación, o destrucción, de moléculas señal (formadas normalmente por residuos oligosacarídicos) implicadas en estos procesos o bien por su propia actividad inhibidora del crecimiento fúngico (Boller, 1993; Dumas-Gaudot *et al.*, 1996; Lambais, 2000; Pozo *et al.*, 2002)). La modulación de estas enzimas durante la colonización por hongos micorrícicos podría ser clave en los procesos de reconocimiento y control del desarrollo del simbionte, y, a la vez, en su efecto sobre el ataque de otros organismos.

La inducción de enzimas hidrolíticas implicadas en mecanismos de defensa por parte de los hongos micorrícicos hizo pensar que estas isoformas, ya inducidas, podrían ejercer su actividad hidrolítica sobre las paredes de hongos fitopatógenos como es el caso de *Verticillium*. De esta forma las paredes celulares fúngicas quedarían dañadas y a la vez podrían liberar componentes que actuarían como elicitores de otros mecanismos de defensa (García-Garrido & Ocampo, 2002). Según los estudios de Lambais & Medhy (1995) algunos genes que codifican proteínas con acción hidrolítica se expresaban fundamentalmente en las células que contenían arbusculos y las adyacentes con lo cual esta acción hidrolítica sobre las paredes del hongo patógeno se ejercería fundamentalmente en las zonas colonizadas por el hongo micorrícico. Esto se ha confirmado en estudios recientes en los cuales, utilizando un sistema de compartimentos para crecer la planta, se ha comprobado que la inducción de las enzimas hidrolíticas por hongos micorrícicos tiene un carácter localizado, no sistémico (Pozo *et al.*, 2002).

Los estudios de protección no indicaron que los hongos micorrícicos ejercieran una actividad antagonista frente a *Verticillium* y no se detectó protección frente al patógeno en el sentido estricto del término. Sin embargo, es evidente que aunque la verticilosis afectó a todas las plantas, las micorrizadas resistieron mejor al ataque que las plantas control. Todo ello nos sugiere que si bien los hongos micorrícicos, al menos los estudiados hasta la fecha, no se pueden considerar *per se* agentes de control biológico de las plantas de olivo frente a aislados virulentos de *V. dahliae*, si se podrían considerar como aliados importantes en el

contexto de la lucha integrada contra la enfermedad. Ello implica la necesidad de continuar la búsqueda de otros agentes (bacterias u hongos) que puedan contribuir al control de la verticilosis, estudiar su interacción con los hongos micorrícicos efectivos (*Glomus viscosum* BEG 126 hasta la fecha) y explorar las posibilidades de utilización de esos consorcios microbianos en el contexto de una lucha integrada cada vez menos dependiente de la utilización de productos fitosanitarios de elevado coste ecológico por las repercusiones negativas que su uso conlleva en el medio ambiente (Pegg & Brady, 2002). En este sentido es de destacar el hecho de que los estudios realizados hasta la fecha de interacción entre hongos micorrícicos y otros microorganismos con propiedades antifúngicas y posible uso como agentes de control biológico, han puesto de manifiesto que, en general, los hongos micorrícicos, y en consecuencia el establecimiento de la simbiosis, no se ven afectados negativamente por la acción de tales microorganismos (Nemec, 1997; Barea *et al.*, 1998; Budi *et al.*, 1999; Vázquez *et al.*, 2000). La explicación a este hecho habría que buscarla en la gran divergencia experimentada por estos hongos a lo largo de la evolución y las peculiaridades de su biología (Redecker *et al.*, 2000).

En cuanto a los genes aislados a lo largo del presente estudio, *OleGlu1* y *OleGlu2*, que codifican  $\beta$ -1,3-glucanasas, se ha comprobado que se inducen en la raíz por la presencia de cualquiera de los hongos micorrícicos estudiados y del aislado menos virulento de *Verticillium*. Como se discutió en el apartado correspondiente, la expresión de estos genes formaría parte de una respuesta inicial de defensa frente a la infección/colonización por organismos poco o nada virulentos, como indica el hecho de que se induzcan por los hongos micorrícicos y por el aislado poco virulento de *V. dahliae*, pero no por el patotipo defoliante (muy virulento) del mismo hongo. La posibilidad de que la inducción de esta débil respuesta de defensa por parte de los hongos micorrícicos predisponga a la planta para responder más rápidamente frente a patógenos poco virulentos sigue abierta y es compatible con el hecho de que las plantas micorrizadas, especialmente las asociadas con *G. viscosum*, se afecten poco por la presencia del patotipo poco virulento. Sin embargo, el hecho de que las plantas micorrizadas no mostraran un mayor grado de resistencia frente al patotipo más virulento indicaría que la respuesta de defensa, frente a este tipo de patógeno, o más bien las señales implicadas en su elicitación, son distintas a las implicadas en la

respuesta a los hongos micorrícicos. Ésta sería una situación similar a la descrita para las PGPR (rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal) con actividad en control biológico debido a su capacidad de inducir resistencia sistémica inducida. Se sabe que la vía de elicitación de esa respuesta (y en consecuencia las señales implicadas) es distinta de la que siguen los organismos patógenos, aunque las consecuencias (la inducción de fenómenos de resistencia) sean muy similares (Pieterse & van Loon, 1999). Este es un tema de gran interés, que queda abierto para investigaciones futuras. El mejor conocimiento de los mecanismos por los que se desencadena la respuesta de defensa ante distintos tipos de patógenos, así como de las moléculas señal implicadas y los genes que controlan su expresión abrirá una serie de posibilidades de estimulación de la planta para hacerla más resistente a patógenos concretos.

Las isoformas enzimáticas codificadas por *OleGlu1* y *OleGlu2*, estarían implicadas en procesos hidrolíticos favoreciendo el establecimiento y funcionamiento de la micorriza e hidrolizando, en su caso, las paredes fúngicas de *Verticillium* como mecanismo de defensa de la planta. El análisis filogenético de los genes *OleGlu1* y *OleGlu2* ha permitido su clasificación como genes que codifican  $\beta$ -1,3-glucanasas del tipo III. Tan sólo se ha descrito una isoforma con actividad  $\beta$ -1,3-glucanasa del tipo III en tabaco (Payne *et al.*, 1990) y dos más en tomate (Domingo *et al.*, 1994). Como se ha confirmado en este estudio se trata de genes que se expresan en la interacción con microorganismos. Se necesitan estudios en profundidad sobre la función y actividad de las isoformas codificadas por este tipo de genes para poder caracterizarlas bien y diferenciarlas de las clases I y II, con un mayor número de genes descritos en la literatura (Linthorst *et al.*, 1990; Leubner-Metzger & Meins, 1999).

Es difícil relacionar las  $\beta$ -1,3-glucanasas codificadas por *OleGlu1* y *OleGlu2* con algunas de las bandas de actividad mostradas en los estudios bioquímicos realizados. Mientras que ambos genes se están expresando, en mayor y menor medida, en la raíz de las plantas micorrizadas con cualquiera de los hongos micorrícicos estudiados, no hay ninguna banda de actividad glucanasa, ni ácida ni básica, que sea común a todos los extractos de raíz micorrizada. Esto era, hasta cierto punto, de esperar, pues de sobra es conocido que las técnicas moleculares son bastante más sensibles que las técnicas

bioquímicas. A pesar de las ventajas de las técnicas electroforéticas con respecto a las técnicas bioquímicas más convencionales, pues permiten distinguir entre distintas isoformas de la misma enzima, presentan ciertos inconvenientes. Fundamentalmente, los derivados de la preparación de los extractos radicales, que supone una fuerte dilución que dificulta o impide la detección de isoformas que se están expresando de forma regulada en células concretas, como puede ser el caso de muchos de los genes inducidos por los hongos micorrízicos. Una forma alternativa de conocer las características bioquímicas de la proteína codificada por *OleGlu1* implica expresar el gen heterológamente en algún organismo de fácil manejo, como por ejemplo *Escherichia coli*. Esto permitiría aislar la proteína, purificarla y determinar sus características bioquímicas.

En resumen, los resultados obtenidos apoyan que las micorrizas arbusculares deben ser consideradas como un factor esencial en la promoción del crecimiento y la salud de las plantas de olivo micropropagadas. La necesidad de reducir el uso de fertilizantes químicos y productos fitosanitarios de síntesis confiere a la posibilidad del uso de las micorrizas una capacidad alternativa en el contexto de prácticas agronómicas respetuosas con el medio ambiente.

En general la manipulación de la actividad de las comunidades microbianas del suelo en relación con el control de microorganismos fitopatógenos, es una estrategia de control de enfermedades que habrá de ser intensificada en el futuro en el contexto de una agricultura más sostenible, no sólo por su valor intrínseco, sino también por su acción complementaria de otras estrategias. Los avances en este campo en los próximos años irán dirigidos a mejorar la eficiencia de las cepas de antagonistas microbianos, en el mismo sentido que los mejoradores genéticos de plantas lo hacen con las especies vegetales. La biotecnología ya ha demostrado su utilidad en este sentido, y probablemente permitirá desarrollar microorganismos transformados genéticamente, en los que su capacidad antagonista sea mejorada y/o complementada con capacidades ecológicas como la de colonizar eficientemente la rizosfera de la planta o la propia rizoplana (Hiremath & Podila, 2000). Las estrategias que implican manipulación genética son, sin embargo, problemáticas mientras

no se realicen estudios de impacto ambiental rigurosos que avalen su uso, y mientras no cambie su nivel de aceptación social.



*Conclusiones*



1. La micorrización de plantas de olivo (*Olea europaea* L.) pertenecientes a las variedades comerciales Arbequina, Leccino y Picual, producidas por la industria viverística mediante técnicas de micropropagación, beneficia significativamente el crecimiento y la capacidad de adquisición de nutrientes de dichas plantas.
2. Los hongos micorrícicos aislados de la rizosfera de olivos crecidos en condiciones naturales fueron más efectivos que los hongos micorrícicos de colección, en cuanto a promover el crecimiento y la nutrición de las plantas micropropagadas de olivo.
3. Se confirma, mediante la utilización de técnicas moleculares, la identificación basada en criterios morfológicos de los hongos aislados de la rizosfera de olivo que se asignaron a las especies *Glomus mosseae*, *Glomus intraradices*, *Glomus viscosum* y *Glomus clarum*.
4. La micorrización con *Glomus viscosum* afectó a la actividad hidrolítica  $\beta$ -1,3-glucanasa de la planta mediante la inducción de una isoforma de carácter ácido o neutro. La inducción fue específica de este hongo y no se detectó con ninguno de los otros hongos micorrícicos estudiados.
5. La inducción de esta nueva isoforma hidrolítica no solo no impidió el establecimiento de la simbiosis micorrícica ni la formación de estructuras intrarradicales, sino que además la micorriza establecida mostró un elevado índice de eficiencia simbiótica.
6. Se han aislado y clonado un gen completo y otro parcial de plantas de olivo que codifican enzimas hidrolíticas con actividad  $\beta$ -1,3-glucanasa. El análisis filogenético de estos genes los agrupa con  $\beta$ -1,3-glucanasas de la clase III.

7. La micorrización atenuó los daños producidos en la planta por la infección con los patotipos defoliante y no defoliante de *Verticillium dahliae*, aunque en sentido estricto no hubo protección frente a los patógenos investigados.
8. El patrón de inducción de isoformas de las distintas enzimas hidrolíticas analizadas ( $\beta$ -1,3-glucanasas y quitinasas) muestra una reacción diferencial de las plantas de olivo frente a los dos tipos de microorganismos estudiados: hongos micorrícicos (mutualistas) y *Verticillium* (patógeno).
9. Los estudios de expresión de los genes *OleGlu1* y *OleGlu2* indican que éstos se inducen por la formación de micorrizas y en respuesta a la infección por el aislado no defoliante de *Verticillium dahliae* V4. Esto confirma la ubicación de estos genes en la clase III, que incluye glucanasas inducidas por microorganismos.

*Anexos*



**ABREVIATURAS**

- ADN** Ácido Desoxirribonucleico
- ADNc** ADN complementario
- ADNr** ADN ribosómico
- BEG** Banco europeo de glomales
- BSA** Albúmina bovina
- CHI** Chalcona isomerasa
- CHS** Chalcona sintasa
- DAS** Dense alignment surface
- DEPC** Dietilpirocarbonato
- EMBL** Laboratorio europeo de biología molecular
- DTT** Ditionotriol
- FNUAP** Fondo de población de las naciones unidas
- G.i** *Glomus intraradices*
- G.m** *Glomus mosseae*
- G.v** *Glomus viscosum*
- HRGP** Proteínas ricas en hidroxiprolina
- H<sub>2</sub>O-DEPC** Agua tratada con DEPC
- IPTG** Isopropil-beta-D-tiogalactopiranosido
- ITS** Regiones espaciadoras de transcripción interna

- IGS** Regiones intergénicas
- MA** Micorrízicos arbusculares
- MOPS** Ácido 3(N-Morfolino) propanosulfónico
- NCBI** Centro nacional de información biotecnológica
- NMP** Número más probable
- PAL** Fenilalanina amonio liasa
- PCR-SSCP** PCR – Polimorfismo conformacional de cadena sencilla
- PCR-TGGE** PCR – Electroforesis en gel con gradiente de temperatura
- PGPR** Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal
- PMSF** Fluoruro de fenilmetanosulfónico
- PVPP** Polivinilpolipirrolidona
- PCR** Reacción en cadena de la polimerasa
- RT** Transcriptasa reversa
- SSU** Subunidad ribosómica pequeña
- Temed** N,N,N',N' Tetrametiletilendiamina
- X-Gal** 5 Br 4Cl 3indolyl-beta-D-galactopyranosido

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Esquema de la taxonomía propuesta por Schüßler (2001).....	19
<b>Figura 2.</b> Desarrollo de la colonización micorrícica .....	24
<b>Figura 3.</b> Variedades de olivo cultivadas en España .....	45
<b>Figura 4.</b> Obtención de plantas micropropagadas .....	56
<b>Figura 5.</b> Unidad repetitiva de ADNr en eucariotas .....	114
<b>Figura 6.</b> Metodologías para el estudio de la diversidad micorrícica en suelos .....	115
<b>Figura 7.</b> Alineamiento de las secuencias nucleotídicas tras la amplificación de la SSU con los cebadores NS31 y AM1 .....	118
<b>Figura 8.</b> Análisis filogenético ADNr (18S) .....	124
<b>Figura 9.</b> Contenido total de N en la parte aérea del olivo (variedad Picual) .....	143
<b>Figura 10.</b> Contenido total de P en la parte aérea del olivo (variedad Picual) .....	144
<b>Figura 11.</b> Raíz de olivo (var. Picual) colonizada por <i>G. intraradices</i> .....	145
<b>Figura 12.</b> Micrografías que muestran la ultraestructura de las raíces micorrizadas .....	146
<b>Figura 13.</b> Isoformas con actividad $\beta$ -1,3-glucanasa ácida o neutra .....	159
<b>Figura 14.</b> Isoformas con actividad quitinasa ácida o neutra .....	160
<b>Figura 15.</b> Clustal de las secuencias aminoacídicas de $\beta$ -1,3-glucanasas de plantas superiores .....	170
<b>Figura 16.</b> Producto de PCR tras la amplificación del ADNc con Glu-F y Glu-R .....	173
<b>Figura 17.</b> Secuencia nucleotídica y aminoacídica del gen parcial <i>OleGlu1</i> .....	174
<b>Figura 18.</b> Blastx de la secuencia del gen <i>OleGlu1</i> .....	175
<b>Figura 19.</b> Producto de PCR tras amplificación con Glu 41 y AUAP .....	176
<b>Figura 20.</b> Alineamiento de los genes <i>OleGlu1</i> y <i>OleGlu2</i> .....	177
<b>Figura 21.</b> Blastx del extremo 3' del gen <i>OleGlu2</i> .....	178
<b>Figura 22.</b> Producto de PCR obtenido tras la amplificación del ADNc .....	179
<b>Figura 23.</b> Gen completo <i>OleGlu1</i> .....	180
<b>Figura 24.</b> Árbol filogenético de $\beta$ -1,3-glucanasas de distintas plantas .....	183

---

<b>Figura 25.</b> Patrón hidrofóbico de la proteína OLEGLU1 .....	185
<b>Figura 26.</b> Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de GII y OLEGLU1 .....	186
<b>Figura 27.</b> Estructuras secundaria de GII y OLEGLU1 .....	187
<b>Figura 28.</b> Representación 3D de las $\beta$ -1,3-glucanasas GII Y OLEGLU1 .....	188
<b>Figura 29.</b> Southern blot .....	189
<b>Figura 30.</b> Expresión de los genes <i>OleGlu1</i> y <i>OleGlu2</i> (19 semanas) .....	190
<b>Figura 31.</b> Expresión de los genes <i>OleGlu1</i> y <i>OleGlu2</i> (24 semanas) .....	191
<b>Figura 32.</b> Evolución de la altura de las plántulas de olivo micorrizadas o no, e inoculadas o no a las 18 semanas de crecimiento con <i>Verticillium dahliae</i> .....	201
<b>Figura 33.</b> Actividad $\beta$ -1,3-glucanasa con carácter ácido o neutro .....	206
<b>Figura 34.</b> Actividad $\beta$ -1,3-glucanasa con carácter ácido o neutro .....	207
<b>Figura 35.</b> Actividad $\beta$ -1,3-glucanasa con carácter básico .....	208
<b>Figura 36.</b> Actividad quitinasa ácida o neutra .....	210
<b>Figura 37.</b> Actividad quitinasa ácida o neutra .....	211
<b>Figura 38.</b> Actividad quitinasa de carácter básico .....	212
<b>Figura 39.</b> Expresión del gen <i>OleGlu1</i> en las raíces control (C) y micorrizadas, infectadas o no por el hongo fitopatógeno <i>Verticillium dahliae</i> Kleb .....	213
<b>Figura 40.</b> Expresión del gen <i>OleGlu2</i> en las raíces control (C) y micorrizadas, infectadas o no por el hongo fitopatógeno <i>Verticillium dahliae</i> Kleb. ....	214

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Principales tipos de micorrizas y simbiontes implicados .....	16
<b>Tabla 2.</b> pH de las muestras de suelo y coordenadas de la zona .....	116
<b>Tabla 3.</b> Clasificación de los hongos aislados de la rizosfera de olivo .....	118
<b>Tabla 4.</b> Grado de homología de los ADNr de los distintos hongos MA ensayados con secuencias de otros hongos micorrícicos.....	121
<b>Tabla 5.</b> Nº de acceso en el EMBL de las secuencias de la SSU utilizadas en el análisis filogenético .....	123
<b>Tabla 6.</b> Valoración del carácter micotrófico y la concentración óptima de inóculo del hongo micorrícico <i>G. intraradices</i> (13 semanas) .....	134
<b>Tabla 7.</b> Valoración del carácter micotrófico y la concentración óptima de inóculo del hongo micorrícico <i>G. intraradices</i> (19 semanas) .....	135
<b>Tabla 8.</b> Efectividad de los hongos micorrícicos como inoculantes de Arbequina .....	138
<b>Tabla 9.</b> Efectividad de los hongos micorrícicos como inoculantes de Leccino .....	139
<b>Tabla 10.</b> Efecto de la inoculación con hongos MA sobre plantas de Picual. ....	141
<b>Tabla 11.</b> Porcentaje de N y P en la parte aérea de olivo (var. Picual) .....	143
<b>Tabla 12.</b> Efecto de la inoculación con hongos MA sobre plantas de Picual (II) .....	149
<b>Tabla 13.</b> Concentración de proteínas en los extractos crudos radicales .....	157
<b>Tabla 14.</b> Experimentos de sobreexpresión de enzimas hidrolíticas que han aumentado la resistencia de plantas frente a hongos fitopatógenos .....	168
<b>Tabla 15.</b> Nombre del gen, planta de origen y número de acceso de las secuencias aminoacídicas utilizadas para el clustal anterior. ....	172
<b>Tabla 16.</b> Nombres y números de acceso de las $\beta$ -1,3-glucanasas utilizadas en el estudio filogenético ... ..	182
<b>Tabla 17.</b> Colonización micorrícica de las plántulas de olivo a las 18 semanas de crecimiento en condiciones de invernadero. ....	200

<b>Tabla 18.</b> Altura (cm) de las plántulas micorrizadas o no, e inoculadas o no con los patotipos no defoliante (V4) o defoliante (V138) de <i>Verticillium dahliae</i> a las 32 semanas de crecimiento .....	202
<b>Tabla 19.</b> Estimulación del crecimiento de las plantas promovida por los distintos hongos MA .....	203
<b>Tabla 20.</b> Inhibición del crecimiento de las plantas provocada por los distintos aislados de <i>Verticillium</i> , en relación a sus controles correspondientes sin patógeno .....	203
<b>Tabla 21.</b> Concentración de proteínas en los extractos crudos de raíz sometidas a distintos tratamientos .....	205

## *Bibliografia*



- Alabouvette, C., Schippers, B., Lemanceau, P., Bakker, PAHM. 1997.** Biological control of *Fusarium*-wilts: towards development of commercial product. In: Boland GJ, Kuykendall LD (eds) Plant microbe interactions and biological control. Marcel Dekker, Inc., New York, pp 15-36.
- Ait-Lahsen, H., Soler, A., Rey, M., De la Cruz, J., Monte, E., Llobell, A. 2001.** An antifungal exo- $\alpha$ -1,3-glucanase (AGN13.1) from the biocontrol fungus *Trichoderma harzianum*. Appl. Environ. Microbiol.
- Andrade, G., Linderman, R.G., Bethlenfalvay, G.J. 1998.** Bacterial associations with the mycorrhizosphere and hyphosphere of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. Plant and Soil 202: 79-87.
- Andrade, G., Mihara, KL., Linderman, RG., Bethlenfalvay, GJ. 1998.** Soil aggregation status and rhizobacteria in the mycorrhizosphere. Plant and Soil 202: 89-96.
- Al-Karaki, GN., Clark, RB. 1999.** Varied rates of mycorrhizal inoculum on growth and nutrient acquisition by barley grown with drought stress. J. Plant Nutr 22: 1775-1784.
- Al-Karaki, G.N. 2000.** Growth of mycorrhizal tomato and mineral acquisition under salt stress. Mycorrhiza 10, 51-54.
- Alten von, H., Blal, B. Dodd, J.C., Feldmann, F., Vosatka, M. 2002.** Quality control of arbuscular mycorrhizal fungi inoculum in Europe. Mycorrhizal Technology in Agriculture 281-296. Eds: S. Gianinazi. Birkhäuser-Verlag.
- Altieri, MA. 1994.** Sustainable agriculture. Encycloped. Of Agricultu. Sci. Vol 4: 239-247.
- Arines, J., Vilariño, A., Sainz, M. 1989.** Effect of different inocula of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi on manganese content and concentration in red clover (*Trifolium pratense* L.) plants. New Phytol. 112: 215-219.
- Arlorio, M., Ludwig, A., Boller, T., Bonfante, P. 1992.** Inhibition of fungal growth by plant chitinases and  $\beta$ -1,3-glucanases. Protoplasma 171: 34-43.
- Arlorio, M., Ludwig, A., Boller, T., Mishiati, P., Bonfante, P. 1991.** Effects of chitinase and  $\beta$ -1,3-glucanases from pea on the growth of saprophytic and mycorrhizal fungi. G Bot Ital 125: 956-958.
- Asao, H., Nishizawa, Y., Arai, S., Sato, T., Hirai, M., Yoshida, K., Shinmyo, A., Hibi, T. 1997.** Enhanced resistance against a fungal pathogen *Sphaerotheca humuli* in transgenic strawberry expressing a rice chitinase gene. Plant Biotechnology 14: 145-149.

- Atkinson, D., Baddeley, J.A., Goicoechea, N., Green, J., Sánchez-Díaz, M., Watson, C.A. 2002.** Arbuscular mycorrhizal fungi in low input agriculture. *Mycorrhizal Technology in Agriculture* 211-222. Eds: S. Gianinazi. Birkhäuser-Verlag.
- Augé, R.M. 2001.** Water relations, drought and vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Mycorrhiza* 11: 3-42.
- Augé, R.M., Stodola, A.J.W., Ebel, R.C., Duan, X. 1995.** Leaf elongation and water relations of mycorrhizal sorghum in response to partial soil drying: two *Glomus* species at varying phosphorus fertilization. *Journal of Experimental Botany* vol 46, 284; 297-357.
- Azcón, R., Barea, J.M. 1997.** Mycorrhizal dependency of a representative plant species in mediterranean shrublands (*Lavandula spica* L.) as a key factor to its use for revegetation strategies in desertification-threatened areas. *Applied Soil Ecology* 7, 83-92.
- Azcón-Aguilar, C., Barea, J.M. 1996.** Arbuscular mycorrhizas and biological control of soil-borne plant pathogens. An overview of the mechanisms involved. *Mycorrhiza* 6: 457-464.
- Azcón-Aguilar, C., Barea, J.M. 1997.** Applying mycorrhiza biotechnology to horticulture: significance and potentials. *Scientia Horticulturae* 68: 1-24.
- Azcón-Aguilar, C., Encina, C.L., Azcón, R., Barea, J.M. 1994.** Effect of arbuscular mycorrhiza on the growth and development of micropropagated annonacherimola plants. *Agricultural Science in Finland* 3: 281-287.
- Azcón-Aguilar, C., Jaizme-Vega, M.C., Calvet, C. 2002.** The contribution of arbuscular mycorrhizal fungi to the control of soil-borne plant pathogens. *Mycorrhizal Technology in Agriculture* 187-197. Eds: S. Gianinazi. Birkhäuser-Verlag.
- Azcón-Aguilar, C., Palenzuela, J., Barea, J.M. 2000.** Sustrato para la producción de inóculos de hongos formadores de micorrizas. Patent number 99011814, Spain.
- Bago, B., Becard, G. 2002.** Bases of the obligate biotrophy of arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycorrhizal Technology in Agriculture* 33-48. Eds. S. Gianinazi.
- Bago, B., Donaire, J.P., Azcón-Aguilar, C. 1997.** ATPase activities of root microsomes from mycorrhizal sunflower (*Helianthus annuus*) and onion (*Allium cepa*) plants. *New Phytologist* 136: 303-311.
- Bago, B., Pfeffer, P., Shachar-Hill, Y. 2001.** Could the urea cycle be translocating nitrogen in the arbuscular mycorrhizal symbiosis?. *New Phytologist* 149: 4-8.
- Bago, B., Vierheilig, H., Piché, Y., Azcón-Aguilar, C. 1996.** Nitrate depletion and pH changes induced by the extraradical mycelium of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* grown in monoxenic culture. *New phytologist* 133, 273-280.

- Bago, B., Zipfel, W., Williams, R.M., Piché, Y. 1999.** Nuclei of symbiotic arbuscular mycorrhizal fungi as revealed by in vivo two-photon microscopy. *Protoplasma* 209: 77-89.
- Balestrini, R., Hahn, MG., Faccio, A., Mendgen, K., Bonfante, P. 1996.** Differential localization of carbohydrate epitopes in plant cell walls in the presence and absence of arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Physiology* 111: 203-213.
- Balestrini, R., José-Estanyol, M., Puigdoménech, P., Bonfante, P. 1997.** Hydroxyproline-rich glycoprotein mRNA accumulation in maize root cells colonized by an arbuscular mycorrhizal fungus as revealed by in situ hybridization. *Protoplasma* 198: 36-42.
- Balestrini, R., Romera, C., Puigdomenech, P., Bonfante, P. 1994.** Location of a cell-wall hydroxyproline-rich glycoprotein, cellulose and  $\beta$ -1,3-glucans in apical and differentiated regions of maize mycorrhizal roots. *Planta* 195: 201-209.
- Barea, J.M. 1997.** Mycorrhiza/bacteria interactions on plant growth promotion. In: Ogoshi A, Kobayashi L, Homma Y, Kodama F, Kondon N, Akino S (eds). *Plant growth-promoting rhizobacteria present status and future prospects*. OCDE, Paris pp 150-158.
- Barea, J.M. 2000.** Rhizosphere and mycorrhiza of field crops. *Biological Resource Management Connecting Science and Policy (OECD)*. Eds. J.P. Toutant, E. Balazs, E. Galante, J.M. Lynch, J.S. Schepers & P.A. Werry. INRA. Editions and Springer.
- Barea, J.M., Andrade, G., Bianciotto, V., Dowling, D., Lohrke, S., Bonfante, P., O´Gara, F., Azcón-Aguilar, C. 1998.** Impact on arbuscular mycorrhiza formation of *Pseudomonas* strains used as inoculants for the biocontrol of soil-borne plant fungal pathogens. *Appl. Environ Microbiol* 64 : 2304-2307.
- Barea, J.M., Azcón, R., Azcón-Aguilar, C. 2002.** Mycorrhizosphere interactions to improve plant fitness and soil quality. *Kluwer Academic Publishers. Antoine van Leeuwenhoek* 81: 343-351.
- Barea, J.M., Azcón, R., Azcón-Aguilar, C. 2003.** Mycorrhizal fungi and PGPR. En prensa.
- Barea, J.M., Azcón-Aguilar, C., Ocampo, J.A., Azcón, R. 1991.** morfología, anatomía y citología de las micorrizas vesículo-arbusculares. En: fijación y Movilización biológica de Nutrientes. Vol. LL. Fijación de N y Micorrizas. (J. Olivares y J.M. Barea, Eds. ) CSIC, Madrid, pp.149-173.
- Barea, J.M., Gryndler, M., Lemanceau, P., Schüepp, H., Azcón, R. 2002.** The rhizosphere of mycorrhizal plants. *Mycorrhizal Technology in Agriculture*. Ed. By Gianinnazzi S, Schüepp H, Barea J.M, Haselwandter K. 1-18.
- Barea, J.M., Olivares, J. 1998.** Manejo de las propiedades biológicas del suelo. Pg. 173-193 en R. Jiménez Díaz y R. Lamo de Espinosa eds. *Agricultura Sostenible*. Editorial Mundi Prensa, Madrid.

- Barker, S.J., Duplessis, S., Tagu, D. 2002.** The application of genetic approaches for investigations of mycorrhizal symbioses. *Plant and Soil* 244: 85-95.
- Barranco, D. 1997.** Variedades y patrones. En: *El cultivo del olivo*. Barranco D, Fernández-Escobar D & Rallo L (eds). Pp. 61-79. Ediciones Mundi-Prensa, Md/ Junta de Andalucía.
- Barranco, D., Rallo, L. 1984.** Las variedades de olivo cultivadas en Andalucía. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Junta de Andalucía, Madrid 384pp.
- Bartinicki-García, A. 1968.** Cell wall chemistry, morphogenesis, and taxonomy of fungi. *Annu. Rev. Microbiol.* 22: 87-108.
- Bashan, Y. 1999.** Interactions of *Azospirillum* spp. In soils: a review. *Biol. Fertil. Soils* 29: 246:256.
- Bashan, Y., Holguin, G. 1998.** Proposal for the division of plant growth-promoting rhizobacteria into two classifications: biocontrol-PGPB (plant growth-promoting bacteria) and PGPB. *Soil Biol. Biochem* 30: 1225-1228.
- Bécard, G., Pfeffer, P.E. 1993.** Status of nuclear division in arbuscular mycorrhizal fungi during in vitro development. *Protoplasma* 174: 62-68.
- Bejarano-Alcazar, J., Blanco-López, M.A., Melero-Vara, J.M., & Jiménez-Díaz, R.M. 1996.** Etiology, importance, and distribution of *Verticillium* wilt of cotton in southern Spain. *Plant Disease* 80 (11), 1233-1238.
- Benabdellah, K., Azcón-Aguilar, C., & Ferrol, N. 1998.** Soluble and membrane symbiosis-related polypeptides associated with the development of arbuscular mycorrhizas in tomato (*Lycopersicon esculentum*). *New Phytologist*. 140: 135-143.
- Berta, G., Fusconi, A., Hooker, J.E. 2002.** Arbuscular mycorrhizal modifications to plant root systems: scale, mechanisms and consequences. S. Gianinazzi, H. Schüepp, JM Barea, K. Haselwandter (eds). *Mycorrhiza Technology in Agriculture, from genes to bioproducts* (pp. 71-85). Heidelberg, Germany: ALS Birkhäuser Verlag.
- Blaudez, D., Botton, B., Chalot, M. 2000.** Cadmium uptake and subcellular compartmentation in the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus*. 146: 1109-1117.
- Blee, K.A., Anderson, A.J. 1996.** Defense-related transcript accumulation in *Phaseolus vulgaris* L colonized by the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* Schenck and Smith. *Plant Physiol.* 110: 675-688.
- Blee, K.A., Anderson, A.J. 2000.** Defense responses in plants to arbuscular mycorrhizal fungi. In: Podila GK & Douds DD Jr. (Eds) *Current Advances in Mycorrhizae Research*. APS Press, St. Paul, Minnesota, USA pp, 27-44.

- Blilou, I., Bueno, P., Ocampo, J.A., García-Garrido, J.M. 2000.** Induction of catalase and ascorbate peroxidase activities in tobacco roots inoculated with the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *Mycological Research* 104, 722-725.
- Bloemberg, G.V., Lugtenberg, B.J.J. 2001.** Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. *Current Opinion in Plant Biology*. Vol4: 343-350.
- Boller, T. 1993.** Antimicrobial functions of the plant hydrolases, chitinase and beta-1,3-glucanase. En: *Mechanisms of Plant Defense Responses*. (B. Fritig, M. Legrand, Eds.) Kluwer Academic Publishers. Netherlands, pp. 391-400.
- Bonanomi, A. Oetiker, J.H., Guggenheim, R., Boller, T., Wiemken, A., Vögeli-Lange, R. 2001.** Arbuscular mycorrhiza in mini-mycorrhizotrons: first contact of *Medicago truncatula* roots with *Glomus intraradices* induces chalcone synthase. *New phytologist* 150: 573-582.
- Bonfante, P. 2001.** At the interface between mycorrhizal fungi and plants: the structural organization of cell wall, plasma membrane and cytoskeleton. *The mycota IX, Fungal Associations Hock* (Ed.) Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 45-61.
- Bonfante, P., Perotto, S. 2000.** Outside and inside the roots: cell-to-cell interactions among arbuscular mycorrhizal fungi, bacteria and host plants. *Current advances in mycorrhizae research*. Edited by Gopi. Podila, Symposium series.
- Bonfante-Fasolo, P. 1984.** Anatomy and morphology of VA mycorrhizae. In: Powell CL, Bagyaraj DJ (eds) *VA Mycorrhiza*. CRC Press, Boca Raton, Florida. pp35-46.
- Bonfante-Fasolo, P., Gianinazzi-Pearson, V., Scannerini, S., Gianinazzi, S. 1986.** Ultracytological analysis of cellular interactions between fungus and plant in mycorrhizae. *Physl. Veget.* 24: 245-252.
- Bonfante-Fasolo, P., Perotto, S. 1992.** Plants and endomycorrhizal fungi: the cellular and molecular basis of their interaction. In: *Molecular signals in plant-microbe communications* (eds. D.P.S. Verma, Ph, D., FRSC). Pp. 445-470.
- Bonfante-Fasolo, P., Tamagnone, L., Peretto, R., Esquerré-Tugayé, M.T., Mazau, D., Mosiniak, M., Vian, B. 1991.** Immunocytochemical location of hydroxyproline rich glycoproteins at the interface between a mycorrhizal fungus and its host plants. *Protoplasma* 165: 127-138.
- Bothe, H., Hildebrandt. 2002.** Arbuscular mycorrhizal fungi nitrate assimilation: Genes and ecophysiological aspects. *Mycorrhizal Technology in Agriculture*. 123-128. Eds: S. Gianinazi. Birkhäuser-Verlag.
- Bowen, G.D., Rovira, A.D. 1999.** The rizhosphere and its management to improve plant growth. *Adv. Agron.* 66:1-102.

- Boydston, R., Paxton, J. D., Koeppe, D, E. 1983.** Glyceollin: a site-specific inhibitor of electron transport in isolated soybean mitochondria. *Plant Physiol.* 72: 151-55.
- Bradford, M.M. 1976.** A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Brogie, K., Chet, I., Holliday, M., Cressman, R., Biddle, P., Knowlton, S., Mauvais, C.J., Brogie, R. 1991.** Transgenic plants with enhanced resistance to the fungal pathogen *Rhizoctonia solani*. *Science* 254, 1194-1197.
- Brundrett, M.C., Ashwath, N., Jasper, D.A. 1996.** Mycorrhizas in the Kakadu region of tropical Australia I & II. Propagules of mycorrhizal fungi in disturbed habitats. *Plant and Soil* 184: 173-184.
- Buchenauer, H. 1998.** Biological control of soil-borne diseases by rhizobacteria. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 105 (4), 329-348.
- Budi, S.W., Van Tuinen, D., Martinotti, G., Gianinazzi, S. 1999.** Isolation from *Sorghum* bicolor mycorrhizosphere of a bacterium compatible with arbuscular mycorrhiza development and antagonistic towards soilborne fungal pathogens. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:5148-5150.
- Burkert, B., Robson, A. 1994.** <sup>65</sup>Zn uptake in Subterranean Clover (*Trifolium subterraneum* L) by 3 vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in a root-free sandy soil. *Soil biology & Biochemistry* 26: 1117-1124.
- Burrows, R.L., Pflieger, F.L. 2002.** Arbuscular mycorrhizal fungi respond to increasing plant diversity. *Can. J. Bot* 80: 120-130.
- Cabib, E., Bowers, B. 1971.** *J. Biol. Chem.* 246: 152-159.
- Camprubi, A., Calvet, C. 1996.** Isolation and screening of mycorrhizal fungi from citrus nurseries and orchards and inoculation studies. *Hortscience* 31:366-369.
- Cantrell, I.C., Linderman, R.G. 2001.** Preinoculation of lettuce and onion with VA mycorrhizal fungi reduces deleterious effects of soil salinity *Plant and Soil* 233: 269-281.
- Chanway, C.P. 1996.** Endophytes: they're not just fungi! *Can J Bot* 74:321-322.
- Chelius, M.K., Triplett E.W. 1999.** Rapid detection of arbuscular mycorrhizae in roots and soil of an intensively managed turfgrass system by PCR amplification of small subunit rDNA. *Mycorrhiza* 9; 61-64.
- Chen, L., Garrett, T.J.P., Varghese, J.N., Fincher, G.B., Høj, P.B. 1993.** *J. Mol. Biol.* 234, 888-889.

- Chen, B., Peter, C., Xiaolin, L. 2001.** A modified glass bead compartment cultivation system for studies on nutrient and trace metal uptake by arbuscular mycorrhiza. *Chemistry of protection of the Environment*. Vol 42: 185-192.
- Clapp, J.P., Helgason, T., Daniell, T., Young, J.P.W. 2002.** Genetic studies of the structure and diversity of arbuscular mycorrhizal fungal communities. *Mycorrhizal ecology*, M.G.A. van der Heijden, I. Sanders (Eds), vol 157: 201-224.
- Clapp, J.P., Young, J.P.W., Merryweather, J.W., Fitter, A.H. 1995.** Diversity of fungal symbionts in arbuscular mycorrhiza from a natural community. *New phytologist* 130: 259-265.
- Cordier, C., Gianinazzi, S., Gianinazzi-Pearson, V. 1996.** Colonisation patterns of root tissues by *Phytophthora nicotianae* var *parasitica* related to reduced disease in mycorrhizal tomato. *Plant Soil*. 185: 223-232.
- Cox, G., Moran, K.J., Sanders, F., Nockolds, C., Tinker, P.B. 1980.** Translocation and transfer of nutrients in vesicular arbuscular mycorrhizas III. Polyphosphate granules and phosphorus translocation. *New Phytologist* 84: 649.
- Daniell, T.J., Husband, R., Fitter, A.H., Young, J.P.W. 2001.** Molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi colonising arable crops. *FEMS Microbiology Ecology* 36; 203-209.
- Darvil, A.G., Albersheim, P. 1984.** Phytoalexins and their elicitors - a defense against microbial infection in plants. *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 35: 243-275.
- Dassi, B., Dumas-Gaudot, E., Asselin, A., Richard, C., Gianinazzi-Pearson, V. 1996.** Chitinase and  $\beta$ -1,3-glucanase isoforms expressed in pea roots inoculated with arbuscular mycorrhizal or pathogenic fungi. *Eur. J Plant Pathol.* 102: 105-108.
- Datta, K., Tu, J., Oliva, N., Ona, I., Velazhahan, R., Wah Mew, T., Muthukrishnan, S., Datta, S. K. 2001.** Enhanced resistance to sheath blight by constitutive expression of infection-related rice chitinase in transgenic elite indica rice cultivars. *Plant Science* 160, 405-414.
- Davis, B.J. 1964.** Disc electrophoresis II. Method and application to human serum proteins. *Ann. New York Acad. Sci.* 121: 404-427.
- Davis, R.M., Menge, J.A., Erwin, D.C. 1979,** Influence of *Glomus fasciculatum* and soil phosphorus on *verticillium* wilt of cotton. *Phytopathology* 69: 453-456.
- Declerck, S., Plenchette, C., Strullu, D.G. 1995.** Mycorrhizal dependency of banana (*Musa acuminata*, AAA group) cultivar. *Plant and Soil* 176: 183-187.

- Declerk, S., Risede, J.M., Delvaux, B. 2002.** Greenhouse response of micropropagated bananas inoculated with in vitro monoxenically produced arbuscular mycorrhizal fungi. *Scientia Horticulturae* 301-309.
- Defago, G., Keel, C. 1995.** *Pseudomonas* as biocontrol agents of diseases caused by soilborne pathogens. Benefits and risks of introducing biocontrol agents. Hokkanen HMT, Lynch JM (eds). University Press, Cambridge.
- Dexheimer, J., Gérard, J., Ayatti, H., Ghanbaja, J. 1996.** Study of origin and repartition of vacuolar granules in the hyphae of a vesicular-arbuscular endomycorrhiza. *Acta Botanica Gallica* 143: 167-180.
- Díaz, G., Azcón-Aguilar, C., Honrubia, M. 1996.** Influence of arbuscular mycorrhizae on heavy metal (Zn and Pb) uptake and growth of *Lygeum spartum* and *Anthyllis cytisoides*. *Plant Soil*. 180: 241-249.
- Dixon, R.A., Harrison, M.J., Lamb, C. J. 1994.** Early events in the activation of plant defense responses. *Annu. Rev. Phytopathol.* 32: 479-501.
- Dobbelaere, S., Croonenborghs, A., Thys, A., Ptacek, D., Vanderleyden, J., Dutto, P., Labandera-González, C., Caballero-Mellado, J., Aguirre, JF., Kapulnik, Y., Brener, S., Burdman, S., Kadouri, D., Sarig, S., Okon, Y. 2001.** Response of agronomically important crops to inoculation with *Azospirillum*. *Aust. J. Plant Physiol* 28: 1-9.
- Dobbelaere, S., Croonenborghs, A., Thys, A., Vande Browk, A., Vanderleyden, J. 1999.** Phytostimulatory effect *Azospirillum brasilense* strains and auxins on wheat. *Plant Soil* 212: 155-164
- Domingo, C., Conejero, V., Vera, P. 1994.** Genes encoding acidic and basic class III  $\beta$ -1,3-glucanases are expressed in tomato plants upon viroid infection. *Plant Molecular Biology* 24: 725-732.
- Dumas-Gaudot, E., Asselin, A., Gianinazzi-Pearson, V., Gollotte, A., Gianinazzi, S. 1994.** Chitinase isoforms in roots of various pea genotypes infected with arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Sci.* 99: 27-37.
- Dumas-Gaudot, E., Grenier, J., Furlan, V., Asselin, A. 1992.** Chitinase, chitosanase and  $\beta$ -1,3-glucanase activities in *Allium* and *Pisum* roots colonized by *Glomus* species. *Plant Sci.* 84: 17-24.
- Dumas-Gaudot, E., Slezack, S., Dassi, B., Pozo, M.J., Gianinazzi-Pearson, V., Gianinazzi, S. 1996.** Plant hydrolytic enzymes (chitinases and  $\beta$ -1,3-glucanase) in root reactions to pathogenic and symbiotic microorganisms. *Plant and Soil* 185: 211-221.

- Dumas-Gaudot, E., Slezack, S., Negrel, J., Bestel-Corre, G., Anstett, A., van Tuinen, D., Gianinazzi-Pearson, V., Gianinazzi, S. 2000.** Chitinases and chitosanases in arbuscular and rhizobial symbioses: common or different events? In: HC Weber, S Imhof et D Zeuske (Eds). Third International Congress on Symbiosis. Vol. Philips University of Marburg, Marburg. P. 68.
- Elliott, L.F., & Lynch, J.M. 1995.** The international workshop on establishment of microbial inocula in soils: cooperative research project on biological resource management of the organization for economic cooperation and development (OECD). *Am. J. Alter. Agric.* 10: 50-73.
- Enciclopedia del olivo. 1996.** Consejo Oleicola Internacional. Plaza & Janés eds.
- Entry, J.A., Watrud, L.S., Reeves, M. 1999.** Accumulation of <sup>137</sup>Cs and <sup>90</sup>Sr from contaminated soil by three grass species inoculated with mycorrhizal fungi. *Environmental pollution* 104: 449-457.
- Eom, A., Hartnett, D.C., Wilson, G.W.T. 2000.** Host plant species effects on arbuscular fungal communities in tallgrass prairie. *Oecologia* 122: 435-444.
- Estaún, V., Camprubí, A., Joner, E.J. 2002.** Selecting arbuscular mycorrhizal fungi for field application. *Mycorrhizal Technology in Agriculture*. Eds Gianinazzi S, Schüepp H, Barea JM, Haselwandter K. Birkhauser. 249-260.
- Feldman, F., Grotkass, C. 2002.** Directed inoculum production- shall we be able to design populations of arbuscular mycorrhizal fungi to achieve predictable symbiotic effectiveness?. *Mycorrhizal Technology in Agriculture*. Gianinazzi eds. 261-279.
- Féliz, G. 1985.** *Planta* 164, 423-428.
- Félix, G., Meins, F., Jr. 1985.** Purification, immunoassay and characterization of an abundant, cytokinin-regulated polypeptide in cultured tobacco tissues. Evidence the protein is a  $\beta$ -1,3-glucanase. *Planta* 164, 423-428.
- Félix, G., Meins, F. Jr. 1986.** Developmental and hormonal regulation of  $\beta$ -1,3-glucanase in tobacco. *Planta* 167: 206-211.
- Ferrol, N., Barea, J.M., Azcón-Aguilar, C. 2000.** Molecular approaches to study plasma membrana H<sup>+</sup>-ATPases in arbuscular mycorrhizas. *Plant and Soil* 219: 225.
- Ferrol, N., Gianinazzi, S., Gianinazzi-Pearson, V. 2002.** Arbuscular mycorrhiza induced ATPases and membrane nutrient transport mechanisms. *Mycorrhizal Technology in Agriculture, from genes to bioproducts*. S. Gianinazzi, H. Schüepp, JM. Barea, K. Haselwandter (ed). 113-122.

- Ferrol, N., Calvente, R., Cano, C., Barea, J.M., Azcón-Aguilar, C. 2003.** Assessment of arbuscular mycorrhizal fungal diversity in a disturbed mediterranean ecosystem. En prensa.
- Fitter. 2001.** Specificity, links and networks in the control of diversity in plant and microbial communities. *Ecology Achievement and Challenge* 95-114.
- FNUAP. 2001.** Fondo de Población de las Naciones Unidas: [www.unfpa.org](http://www.unfpa.org)
- Franken, P., Requena, N. 2001.** Analysis of gene expresión in arbuscular mycorrhizas: new approaches and challenges. *New Phytol.* 150: 517-523.
- Fritig, B., Thierry Heitz, T., Legrand, M. 1998.** Antimicrobial proteins in induced plant defense. *Current Opinion in Immunology* 10:16-22.
- García-Garrido, J.M., Ocampo, J.A. 2002.** Regulation of the plant defence response in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Journal of Experimental Botany* 53(373): 1377-1386.
- García-Garrido, J.M., Tribak, M., Rejón-Palomares, A., Ocampo, J.A., García-Romera I. 2000.** Hydrolitic enzymes and ability of arbuscular mycorrhizal fungi to colonize roots. *Journal of Experimental Botany* 51, 1443-1448.
- Gehrig, H., Schüßler, A., Kluge, M. 1996.** *Geosyphon pyriforme*, a fungus forming endocytobiosis with *Nostoc* (Cyanobacteria) is an ancestral member of the Glomales: Evidence by SSU rRNA analysis. *J. Mol. Evol.* 43, 71-81.
- Gerdemann, J.W, Trappe, J.M. 1970.** *Endogone incrassate*: a zygosporic species with hollow sporocarps. *Mycologia* 62: 1204-1208.
- Gianinazzi, S. 1991.** Vesicular arbuscular (endo-)mycorrhiza: cellular, biochemical and genetic aspects. *Agriculture Ecosystems and Environment* 35: 105-119.
- Gianinazzi-Pearson, V. 1996.** Plant cell responses to arbuscular endomycorrhiza: Getting to roots of the symbiosis. *The Plant Cell* 8: 1871-1883.
- Gianinazzi-Pearson, V., Arnould, C., Oufattole, M., Arango, M., Gianinazzi, S. 2000.** Differential activation of H<sup>+</sup>-ATPase genes by an arbuscular mycorrhizal fungus in root cells of transgenic tobacco. *Planta* 609-613.
- Gianinazzi-Pearson, V., Dumas-Gaudot, E., Gollotte, A., Tahiri-Alaoui, A., Gianinazzi S. 1996.** Cellular and molecular defence-related root responses to invasion by arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* 133, 45-57.
- Gianinazzi-Pearson, V, Gianinazzi, S. 1986.** The physiology of improved phosphate nutrition in mycorrhizal plants. In: Gianinazzi-Pearson V, Gianinazzi S (eds) *Physiological and genetical aspects of mycorrhizae*. INRA, Paris, pp 101-109.

- Gianinazzi-Pearson, V., Lemoine, M.C., Arnould, C., Gollotte, A., Morton, J.B. 1994.** Localization of  $\beta$ -1,3-glucans in spore and hyphal walls of fungi in the Glomales. *Mycologia* 86: 478-485.
- Gianinazzi-Pearson, V, Smith, S.E, Gianinazzi, S, Smith, F.A. 1991.** Enzymatic studies on the metabolism of vesicular arbuscular mycorrhizas. V. Is H<sup>+</sup>-ATPase a component of ATP hydrolysing enzyme activities in plant fungus interfaces? *New phytol.* 117(1): 61-74.
- Gianinazzi-Pearson, V, Tahiri-Alaoui, A., Antoniw, J.F, Gianinazzi, S., Dumas, E. 1992.** Weak expression of the pathogenesis related PR-b1 gene and localization of related protein during symbiotic endomycorrhizal interactions in tobacco roots. *Endocytobiosis & Cell Res* 8: 177-185.
- Gianinazzi-Pearson, V., Van Tuinen, D., Dumas-Gaudot, E., Dulieu, H. 2001.** Exploring the Genome of glomalean fungi. *The mycota IX. Fungal associations* Hock (Ed). Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Giovannetti, M. 2000.** Spore germination and pre-symbiotic mycelial growth. In: Kapulnik Y, Douds D D (eds). *Arbuscular mycorrhizas: physiology and function.* Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 47-68.
- Giovannetti, M., Sbrana, C., Avio, L. 2002.** Arbuscular mycorrhizal fungal mycelium: from germlings to hyphal networks. *Mycorrhizal Technology in Agriculture.* Eds Gianinazzi S, Schüepp H, Barea JM, Haselwandter K. Birkhauser. 49-58.
- Glick, B.R. 1995.** The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Can. J. Microbiol.* Vol. 41, 109-117.
- Gollote, A., Gianinazzi-Pearson, V., Giovannetti, M., Sbrana, C., Avio, L., Gianinazzi, S. 1993.** Cellular localization and cytochemical probing of resistance reactions to arbuscular mycorrhizal fungi in a "locus a" myc mutant of *Pisum sativum* L. *Planta* 191: 112-122.
- Gollote, A., Brechenmacher, L., Weidmann, S., Franken, P., Gianinazzi-Pearson, V. 2002.** Plant genes involved in arbuscular mycorrhiza formation and functioning. *Mycorrhizal Technology in Agriculture.* Eds Gianinazzi S, Schüepp H, Barea JM, Haselwandter K. Birkhauser. 87-102.
- Goodman, R.N., Király, Z., Wood, K.R. 1986.** *The Biochemistry and Physiology of Plant Disease.* University of Missouri Press, Columbia, Missouri, USA.
- Graham, J. H., Duncan, L.W., Eissenstat, D. M. 1997.** Carbohydrate allocation patterns in citrus genotypes as affected by phosphorus nutrition, mycorrhizal colonization and mycorrhizal dependency. *New phytologist* 135, 335-343.
- Grenier, J., Asselin, A. 1990.** Some pathogenesis-related proteins are chitosanases with lytic activity against fungal spores. *Mol. Plant Microbe Interact* 3: 401-407.

- Gryndler, M. 2000.** Interactions of arbuscular mycorrhizal fungi with other soil organisms. Arbuscular mycorrhizas: physiology and functions. Kapulnick Y, Douds Jr. DD (eds). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp 239-262.
- Haas, D., Keel, C., Reimann, C. 2002.** Signal transduction in plant-beneficial rhizobacteria with biocontrol properties. *Antonie van Leeuwenhoek* 81: 385-395. Kluwer Academic Publishers.
- Habte, M. 1995.** Dependency of *Cassia siamea* on vesicular arbuscular mycorrhizal fungi. *Journal of plant nutrition*, 18, 2191-2198.
- Habte, M., Zhang, Y.C., Schmitt, D.P. 1999.** Effectiveness of *Glomus* species in protecting white clover against nematode damage. *Can J Botany* 77: 135-139.
- Hammond-Kosack, K.E., Jones, J.D.G. 1996.** Resistance Gene-Dependent Plant Defense Responses. *The Plant Cell* 8:1773-1791.
- Hanahan D. 1983.** Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166: 557-580.
- Harrison, M.J. 1997.** The arbuscular mycorrhizal symbiosis: An underground association. *Trends Plant Sci* 2: 54-60.
- Harrison, M.J., Dixon, R.A. 1994.** Spatial patterns of expression of flavonoid/isoflavonoid pathway genes during interactions between roots of *Medicago truncatula* and the mycorrhizal fungus *Glomus versiforme*, *Plant J.* 6: 9-20.
- Harrison, M.J., Liu, J., Dewbre, G.R., Blaylock, L.A., Zhao, L. 2000.** Toward an understanding of the development and functioning of an arbuscular mycorrhiza: molecular and genetic approaches. In: Weber, H.C., Imhof, S., Zeuske, D. (eds). *Proceedings of the Third International Congress on Symbiosis*, Marburg, Germany, August 2000, p 84.
- Harrison, M.J., Van Buuren, M.L. 1995.** A phosphate transporter from the mycorrhizal fungus *Glomus versiforme*. *Nature* 378: 626-629.
- Hart, M.M., Reader, R.J. 2002.** Taxonomic basis for variation in the colonization strategy of arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* 153: 335-344.
- Heijden van der, E., Kuyper, T.W. 2001.** Does origin of mycorrhizal fungus or mycorrhizal plant influence effectiveness of the mycorrhizal symbiosis? *Plant and Soil* 230: 161-174.
- Heijden van der, M.G.A., Klironomos, J.N., Ursic, M., Moutoglis, P., Streitwolfengel, R., Boller, T., Wiemken, A. & Sanders, I.R. 1998.** Mycorrhizal fungal diversity, ecosystem variability and productivity. *Nature* 396, 69-72.

- Heijden van der, M.G.A., Sanders, I.R. 2002.** Mycorrhizal Ecology: Synthesis and Perspectives. Mycorrhizal Ecology, van der Heijden & Sanders (eds) p, 441-456. Springer.
- Helgason, T., Daniell, T.J., Husband, R., Fitter, A., Young, P. 1998.** Ploughing up the wood-wide web? Nature 394: 431.
- Helleboid, S., Bauw, G., Belingheri, L., Vasseur, J., Hilbert, J. 1998.** Extracellular  $\beta$ -1,3-glucanases are induced during early somatic embryogenesis in *Cichorium*. Planta 205, 56-63.
- Hewitt, E.J. 1966.** Sand and water culture methods used in the studies of plant nutrition. In: Tech Comm 22. London: comm. Agri Bur pp. 430-434.
- Hijri, M., Hosny, M., van tuinen, D., Dulieu, H. 1999.** Intraspecific ITS polymorphism in *Scutellospora castanea* (Glomales, Zygomycota) is structured within multinucleate spores. Fungal Genet Biol 26: 141:151.
- Hiltner, L. 1904.** Über neuere erfahrungen und probleme auf dem gebiet der bodenbakteriologie und under besonderer berücksichtigung der gründung und brache. Arb. Dtsch. Landwirtschaft. Ges. 98: 59-78.
- Hiremath, S.T., Podila, G.K. 2000.** Development of genetically engineered mycorrhizal fungi for biological control. Current Advances in Mycorrhizae Research. Podila & Douds (edit.) 179-187.
- Hoj, P.B., Fincher, G.B. 1995.** Molecular evolution of plant  $\beta$ -glucan endohydrolases. Mini-Review. The plant journal 7(3), 367-379.
- Hooker, J.E., Jaizme-Vega, M., Atkinson, D. 1994.** Biocontrol of plant pathogens using arbuscular mycorrhizal fungi. Impact of Arbuscular Mycorrhizas on Sustainable Agriculture and Natural Ecosystems. S. Gianinazzi and H. Schüepp (eds) Switzerland.
- Huecas, S., Villalba, M., Rodríguez, R. 2001.** Ole e9, a major olive pollen allergen is a 1,3-beta-glucanase. Isolation, characterization, amino acid sequence, and tissue specificity. Journal Biol. Chem 276: 27959-27966.
- Hwang, S.F. 1992.** Effects of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi on the development of *Verticillium* and *Fusarium* Wilts of alfalfa. Plant Diseases 76: 239-243.
- Isaac, I. 1957.** Wilt of Lucerne caused by species of *Verticillium*. Ann. Appl. Biol. 45: 550-558.
- Jach, G., Gönhardt, B., Mundy, J., Logemann, J., Pinsdorf, E., Leach, R., Schell, J., Mass, C. 1995.** Enhanced quantitative resistance against fungal disease by combinatorial expression of different barley antifungal proteins in trans genica tobacco. Plant J. 8, 97-109.

- Jaizme-Vega, M.C., Esquivel Delamo, M., Tenoury Domínguez, P., Rodríguez-Romero, A.S., 2002.** Efectos de la micorrización sobre el desarrollo de dos cultivares de platanera. *INFOMUSA* 11:25-28.
- Jaizme-Vega, M.C., Pinochet, J. 1997.** Growth response of banana to three mycorrhizal fungi in *Pratylenchus goodeyi* infested soil. *Nematropica* 27: 69-76.
- Jakobsen, I. 1995.** Transport of Phosphorus and Carbon in VA Mycorrhizas. *Mycorrhiza*. A. Varma and B. Hock (eds). Springer.
- Jeffries, P., Barea, J.M. 2001.** Arbuscular Mycorrhiza – a key component of sustainable plant-soil ecosystems. *The Mycota. Vol IX . Fungal Associations* Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp 95-113.
- Jiménez-Díaz, R. M. 1998.** Concepto de Sostenibilidad en Agricultura. En: *Agricultura Sostenible* (R.M. Jiménez Díaz y J. Lamo de Espinosa, Eds.) Mundi-Prensa, Madrid, pp.3-13.
- Jiménez-Díaz, R. M. 1998.** Control de enfermedades. En: *Agricultura Sostenible* (R.M. Jiménez Díaz y J. Lamo de Espinosa, Eds.) Mundi-Prensa, Madrid, pp.345-375.
- Kapulnik, Y., Douds D. 2000.** Arbuscular mycorrhizas: physiology and function. Elsevier Science. Kluwer Academic Publishing, Dordrecht.
- Kapulnik Y, Volpin H, Itzhaki H, Ganon D, Galili s, David R, Shaul O, Elad Y, Chet I, Okon Y. 1996.** Suppression of defence responses in mycorrhizal alfalfa and tobacco roots. *New Phytologist* 133: 59-64.
- Karajeh, M., Al-Raddad, A. 1999.** Effect of VA Mycorrhizal Fungus (*G.m*) on *Verticillium dahliae* of olive. *Dirasat Agricultural Sciences* 26: 338-341.
- Kennedy, A.C. 1998.** The rhizosphere and spermosphere. Principles and applications of soil microbiology. Sylvia DM, Fuhrmann JJ, Hartel PG, Zuberer DA (eds). Prentice Hall, Upper Saddle River, New Jersey, pp 389-407.
- Kennedy AC, Smith KL. 1995.** Soil microbial diversity and the sustainability of agricultural soils. *Plant and Soil* 170: 75-86.
- Kishimoto, K., Nishizawa, Y., Tabei, Y., Hibi, T., Nakajima, M., Akutsu, K. 2002.** Detailed analysis of rice chitinase gene expression in transgenic cucumber plants showing different levels of disease resistance to gray mold (*Botrytis cinerea*). *Plant Science* 162: 655-662.
- Kjoller, R., Rosendahl, S. 2000.** Detection of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomales) in roots by nested PCR and SSCP (Single Stranded Conformation Polymorphism). *Plant and Soil* 189-196.

- Kloepper J.W. 1994.** Plant growth-promoting rhizobacteria (other systems) In: Okon Y (ed) *Azospirillum/plant associations*. CRC Press, Boca Raton, pp 111-118
- Kloepper, J.W., Zablotowicz, R.M., Tipping, E.M., Lifshitz R. 1991.** Plant growth promotion mediated by bacterial rhizosphere colonizers. Pp. 315-326. In: Keister D.L. and P.B. Cregan (eds). *The rhizosphere and plant growth*. Kluwer Academic Publishers, Netherlands.
- Kessman, H., Staub, T., Hofmann, C., Maetzke, T., Herzog, G., Ward, E., Uknes, S., Ryals, J. 1994.** Induction of systemic acquired disease resistance in plants by chemicals. *Annu. Rev. Phytopathol.* 439-460.
- Kim, K.Y., Jordan, D., Mc Donald, G.A. 1998.** Effect of phosphate-solubilizing bacteria and vesicular-arbuscular mycorrhizae on tomato growth and soil microbial activity. *Biol Fertil Soils* 26: 79-87.
- Kimura, M. 1980.** A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotides sequences. *J. mol. Evol.* 16: 111-120.
- Koske, I., Gemma, J.N. 1989.** A modified procedure for staining roots to detect VA mycorrhizas. *Mycological Research* 92: 486-505.
- Kowalchuk, G.A., De Souza, F.A., Van Veen, J.A. 2002.** Community analysis of arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Ammophila arenaria* in Dutch coastal sand dunes. *Molecular Ecology* 571: 581.
- Landa, B.B., Hervás, A., Bettiol, W., Jiménez-Díaz, R.M.. 1997.** Antagonistic activity of bacteria from the Chick-pea rhizosphere against *Fusarium oxysporum* f. sp. ciceris. *Phytoparasitica* 25: 305-318.
- Lambais, M.R. 2000.** Regulation of plant defense-related genes in arbuscular mycorrhizae. In: Podila GK, Douds DD (eds). *Current advances in mycorrhize research*. APS Press, Minnesota pp 45-59.
- Lambais, M.R., Mehdy, M.C. 1993.** Suppression of encochitinase,  $\beta$ -1,3-glucanase and chalcone isomerase expresión in bean vesicular-arbuscular mycorrhizal roots under different soil phosphate conditions. *Mol Plant-Microbe Interact* 6: 75-83.
- Lambais, M.R., Mehdy, M.C. 1995.** Differential expression of defense-related genes in arbuscular mycorrhiza. *Canad. J. of Bot* 73: 533-540
- Lambais, M.R., Mehdy, M.C. 1996.** Soybean roots infected by glomus intraradices strains differing in infectivity exhibit differential chitinase and  $\beta$ -1,3-glucanase expression. *New Phytologist* 134: 531-538.

- Lambais, M.R., Mehdy, M.C. 1998.** Spatial distribution of chitinase and  $\beta$ -1,3-glucanase transcripts in bean arbuscular mycorrhizal roots under low and high soil phosphate conditions. *New Phytologist*: 140:33-42.
- Lanfranco, L., Wyss, P., Marzachi, C., Bonfante, P. 1995.** Generation of RAPD-PCR primers for the identification of isolates of *Glomus mosseae*, an arbuscular mycorrhizal fungus. *Mol. Ecol.* 4, 61-68.
- Lawton, K., Weymann, K., Friedrich, L., Vernooij, B., Uknes, S., Ryals, J. 1995.** Systemic Acquired Resistance in Arabidopsis Requires Salicylic Acid but Not Ethylene. *MPMI*. Vol 8, n°6, 863-870.
- Lemoine, M.C., Gollote, A., Gianinazzi-Pearson, V. 1995.** Localization of  $\beta$ -1,3-glucan in walls of the endomycorrhizal fungi *Glomus mosseae* (Nicol. & Gerd.) Gerd & Trappe and *Acaulospora laevis* Gerd & Trappe during colonization of host roots. *New phytologist* 129: 97-105.
- Leubner-Metzger, G., Meins, F., Jr. 1999.** Functions and regulation of plant  $\beta$ -1,3-glucanases (PR-2). Revision en: Pathogenesis-related proteins in plants. Datta SK, Muthukrishnan S (eds), CRC Press LLC, Boca Raton, Florida, pp 49-76.
- Leyval, C., Joner, E.J., del Val, C., Haselvandter, K. 2002.** Potential of arbuscular mycorrhizal fungi for bioremediation. *Mycorrhizal Technology in Agriculture*. 175-186. Eds: S. Gianinazzi. Birkhäuser-Verlag.
- Linderman, R.G., Davis, E.A. 2001.** Comparative response of selected grapevine rootstocks and cultivars to inoculation with different mycorrhizal fungi. *Am J Enol Vitic* 52: 8-11.
- Linthorst, H.J.M., Melchers, L.S., Mayer, A., Van Roekel, J.R.C., Cornelissen, B.J.C., Bol, J.F. 1990.** Analysis of gene families encoding acidic and basic  $\beta$ -1,3-glucanases of tobacco. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 87: 8756-8760.
- Liu, R. 1995.** Effect of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi on *verticillium* wilt of cotton. *Mycorrhiza* 5: 293-297.
- Lovato, P.E., Gianinazzi-Pearson, V., Trouvelot, A., Gianinazzi, S. 1996.** The state of art of mycorrhizas and micropropagation. *Adv Hort Sci* 10:46-52.
- Maldonado-Mendoza, I.E., Dewbre, G.R., Harrison, M.J. 2001.** A phosphate transporter gene from the extra-radical mycelium of an arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* is regulated in response to phosphate in the environment. *Molecular Plant – Microbe Interactions*. 1140-1148.
- Marschner, H. 1998.** Role of root growth arbuscular mycorrhiza and root exudates for the efficiency in nutrient acquisition. *Field Crops Re.* 56: 203-207.

- Mauch, F., Mauch-Mani, B., Boller T. 1988.** Antifungal hydrolases in pea tissue. II. Inhibition of fungal growth by combinations of chitinase and  $\beta$ -1,3-glucanase. *Plant Physiol.* 88: 936-942.
- Meins, F.Jr., Neuhaus, J-M., Sperisen, C., Ryals, J. 1992.** The primary structure of plant pathogenesis-related glucanohydrolases and their genes. En: Boller, T., Meins, F.Jr., eds. *Genes involved in Plant Defense*. Vienna, New York: Springer-Verlag, pp: 245-282.
- Mercado-Blanco, J., Rodríguez-Jurado, D., Pérez-Artés, E., & Jiménez-Díaz, R.M. 2002.** Detection of the defoliating pathotype of *Verticillium dahliae* in infected olive plants by nested PCR. *European Journal of Plant Pathology* 108: 1-13.
- Miller, R.M., Jastrow, J.D. 2000.** Mycorrhizal fungi influence soil structure. *Arbuscular Mycorrhizas: Physiology and Function*, Kapulnik & Douds eds. 3-18.
- Mingorance, M.D. 2002.** Focused microwave-assisted digestion of vegetal materials for the determination of essential mineral nutrients. *Anal Bioanal Chem.*
- Miyasaka, S.C., Habte, M. 2001.** Plant mechanisms and mycorrhizal symbioses to increase phosphorus uptake efficiency. *Commun. soil. sci. Plant anal.*, 32, 1101-1147.
- Monaghan, R.L., Eveleigh, D.E., Tewari, R.P., Reese, E.T. 1973.** Chitosanase, a novel enzyme. *Nature. New Biol.* 245: 78-80.
- Monzón, A., Azcón, R. 2001.** Growth responses and N and P use efficiency of three *Alnus* species as affected by arbuscular mycorrhizal colonisation. *Plant Growth Regulation* 35: 97-104.
- Morandi, D. 1996.** Occurrence of phytoalexins and phenolic compounds in endomycorrhizal interactions, and their potential role in biological control. *Plant Soil* 185: 241-251.
- Morrissey, JP., Walsh, U.F., O'Donnell, A., Moënné-Loccoz, Y., O'Gara, F. 2002.** Exploitation of genetically modified inoculants for industrial ecology applications. *Kluwer academic Publishers* 81: 599-606.
- Morton, J.B. 1988.** Taxonomy of VA mycorrhizal fungi: classification, nomenclature and identification. *Mycotaxon* 32.
- Morton, J.B. 1991.** INVAM Newsletters. Volumes 1-5. West Virginia Universtiy, Morgantown.
- Morton, J.B., Benny, G.L. 1990.** Revised classification of arbuscular mycorrhizal fungi (Zygomycetes): a new order, Glomales, two new suborders, Glominae and Gigasporinae, and two new families, Acaulosporaceae, with an emendation of glomaceae. *Mycotaxon* 37: 471-491.

- Morton, J.B., Bentivenga, S.P., Bever, J.D. 1995.** Discovery, measurement, and interpretation of diversity in arbuscular endomycorrhizal fungi (Glomales, Zygomycetes). *Can. J. Bot.* 73:S25-S32.
- Muñoz, M.P., Humanes, J., Vega, V., Castro, J. 1998.** Diseño y manejo de plantaciones de olivar. Monografía 22/98 de la Conserjería de Agricultura y Pesca. Junta de Andalucía.
- Nandakumar, R., Babu, S., Viswnathan, R., Raguchander, T., Samiyappan, R. 2001.** Induction of systemic resistance in rice against sheath blight disease by *Pseudomonas fluorescens*. *Soil Biology & Biochemistry* 33: 603-612.
- Nemec, S. 1997.** Longevity of microbial biocontrol agents in a planning mix attended with *Glomus intraradices*. *Biocontrol Sci Technol* 7: 183-192.
- O'Gara, F., Dowling, D.N., Boesten, B. 1994.** Molecular Ecology of Rhizosphere Microorganisms. VCH, Weinheim, Germany 173p.
- Ortas, I. 1996.** The influence of use of different rates of mycorrhizal inoculum on root infection, plant growth, and phosphorus uptake. *Commun Soil Sci Plant Anal* 27: 2935-2946.
- Payne, G., Ward, E., Gaffney, T., Ahl-Goy, P., Moyer, M., Harper, A., Meins, F. Jr, Ryals, J. 1990.** Evidence for a third structural class of  $\beta$ -1,3-glucanase in tobacco. *Plant Mol Biol* 15: 797-808.
- Pearson, J.N., Jakobsen, I. 1993.** The relative contribution of hyphae and roots to phosphorus uptake by arbuscular mycorrhizal plants, measured by dual labeling with  $^{32}\text{P}$  and  $^{33}\text{P}$ . *New Phytologist* 124: 489-494.
- Pegg, G.F. 1989.** Pathogenesis in vascular diseases of plants. In: Ayres PG (ed) *Effects of Disease on the Physiology of the Growing Plant* (pp. 149-177). Cambridge University Press, Cambridge.
- Pegg, G.F., Brady, B.L. 2002.** *Verticillium Wilts*. CABI Publishing.
- Peretto, R., Bettini, V., Favaron, F., Alghisi, P., Bonfante, P. 1995.** Polygalacturonase activity and location in arbuscular mycorrhizal roots of *Allium porrum* L. *Mycorrhiza* 5: 157-163.
- Persello-Cartieaux, F., Nussaume, L., Robaglia, C. 2003.** Tales from the underground : molecular plant-rhizobacteria interactions. *Plant Cell and Environment* 26, 189-199.
- Peumans, W., Barre, A., Derycke, V., Rougé, P., Zhang, W., May, G., Delcour, J., Van Leuven, F., Van Damme, E. 2000.** Purification, characterization and structural analysis of an abundant  $\beta$ -1,3-glucanase from banana fruit. *Eur. J. Biochem.* 267, 1188-1195.

- Phyllips, J.M., Hayman, D.S. 1970.** Improved procedures for icearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection Trans Br Mycol. Soc. 55: 158-161.
- Pieterse, C.M.J., van Loon, L.C. 1999.** Salicylic acid-independent plant defence pathways. Review, Trends in plant science, 4:52-58.
- Postgate, J. 1998.** Nitrogen Fixation. Third Edition Cambridge University Press
- Pozo, M.J. 1999.** Inducción de enzimas hidrolíticos en raíces de tomate (*Lycopersicon esculentum*) como respuesta a la formación de micorrizas arbusculares y su implicación en el control biológico de *Phytophthora parasitica*. Tesis Doctoral de la Universidad de Granada.
- Pozo, M.J., Azcón-Aguilar, C., Dumas-Gaudot, E., Barea, J.M. 1999.**  $\beta$ -1,3-glucanase activities in tomato roots inoculated with arbuscular mycorrhizal fungi and/or *Phytophthora parasitica* and their possible involvement in bioprotection. Plant Sci. 141: 149-157.
- Pozo, M.J., Dumas-Gaudot, E., Azcón-Aguilar, C., Barea, J.M. 1998.** Chitosanase and chitinase activities in tomato roots during interactions with arbuscular mycorrhizal fungi or *Phytophthora parasitica*. J. Exp. Botany 49: 1729-1739.
- Pozo, M.J., Dumas-Gaudot, E., Slezack, S., Cordier, C., Asselin, A., Gianinazzi, S., Gianinazzi-Pearson, V., Azcón-Aguilar, C., Barea, J.M. 1996.** Detection of new chitinase isoforms in arbuscular mycorrhizal tomato roots: possible implications in protection against *Phytophthora nicotianae* var. *parasitica*. Agronomie 16: 689-697.
- Pozo, M.J., Slezack-Deschaumes, S., Dumas-Gaudot, E., Gianinazzi, S., Azcón-Aguilar, C. 2002.** Plant defense responses induced by arbuscular mycorrhizal fungi. Mycorrhizal Technology in Agriculture, ed. By S. Gianinazzi, H. Schüepp, JM Barea & K Haselwandter. Birkhäuser Verlag/Switzerland.
- Probanza, A., Lucas Garcia, J.A., Ruiz Palomino, M., Ramos, B., Gutiérrez Mañero, F.J. 2002.** *Pinus pinea* L. seedling growth and bacterial rhizosphere structure after inoculation with PGPR *Bacillus* (*B. licheniformis* CECT 5106 and *B. pumillus* CECT 5105). Applied Soil Ecol. 20: 75-84.
- Prosser, J.I. 2002.** Molecular and functional diversity in soil micro-organisms. Plant and Soil 244: 9-17.
- Punja, Z.K., Raharjo, S.H.T. 1996.** Response of transgenic cucumber and carrot plants expressing different chitinase enzyme to inoculation with pathogens. Plant Disease 80, 999-1005.
- Rallo, L. (1998).** Sistemas frutícolas de secano: el olivar. In Jiménez-Díaz & Lamo de Espinosa (eds). Agricultura Sostenible, pp 471-487.

- Ramamoorthy, V. 2001.** Induction of systemic resistance by PGPR in crop plants against pests and diseases. *Crop Protection* 20, 1-11.
- Rausch, C., Daram, P., Brunner, S., Jansa, J., Lalio, M., Leggewie, G., Amrhein, N., Bucher, M. 2001.** A phosphate transporter expressed in arbuscule-containing cells in potato. *Nature* 462-466.
- Rasmussen, N., Lloyd, D.C., Ratcliffe, G., Hansen, P.E., & Jackobsen, I. 2000.**  $^{31}\text{P}$  NMR for the study of P metabolism and translocation in arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Soil* 226, 245-253.
- Redecker, D. 2000.** Specific PCR primers to identify arbuscular mycorrhizal fungi within colonized roots. *Mycorrhiza* 10, 73-80.
- Redecker, D. 2002.** Molecular identification and phylogeny of arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant and Soil* 244: 67-73.
- Redecker, D., Kodner, R., Graham, L.E. 2000.** Glomalean fungi from the Ordovician. *Science* 289: 1920-1921.
- Redecker, D., Morton, J.B., Bruns, T.D. 2000.** Ancestral lineages of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomales). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. Vol 14: 276-284.
- Redecker, D., Thierfelder, H., Walker, C., Werner, D. 1997.** Restriction analysis of PCR-amplified internal transcribed spacers of ribosomal DNA as a tool for species identification in different genera of the order glomales. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 1756-1761.
- Reisfeld, R.A., Lewis, V.J., Williams, D.E. 1962.** Disk electrophoresis of basic proteins and peptides on polyacrilamide gels. *Nature*. 195: 281-283.
- Requena, N., Perez-Solis, E., Azcón-Aguilar, C., Jeffries, P., Barea, J.M. 2001.** Management of indigenous plant-microbe symbioses aids restoration of desertified ecosystems. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 495-498.
- Rillig, M.C., Wright, S.F., Eviner, V.T. 2002.** The role of arbuscular mycorrhizal fungi and glomalin in soil aggregation: comparing effects of five plants species. *Plant and Soil* 238: 325-333.
- Romero, C., Claessen, J.C., de Miranda, L.N. 1999.** Contribution of native arbuscular mycorrhizal fungi in the establishment of *Asistida setifolia kunth* in degraded areas in the cerrado. *Pesq. Agropec. Bras.*, 34: 665-674.
- Roldán-Fajardo, B.E., Barea, J.M. 1986.** Mycorrhizal dependency in the olive tree (*Olea europaea* L. ). *Mycorrhizae: physiology and genetics-1* ESM, Dijon, 1986. INRA, Paris.

- Ruiz-Lozano, J.M., Azcón, R. 1995.** Hyphal contribution to water uptake in mycorrhizal plants as affected by the fungal species and water status. *Physiol. Plantarum* 95: 472-478.
- Ruiz-Lozano, J.M., Azcón, R. 2000.** Symbiotic efficiency and infectivity of an autochthonous arbuscular mycorrhizal *Glomus* sp. From saline soils and *Glomus deserticola* under salinity. *Mycorrhiza* 10: 137-143.
- Ruiz-Lozano, J.M., Azcón, R., Gómez, M. 1995.** Effects of Arbuscular-Mycorrhizal *glomus* species on drought tolerance: physiological and nutritional plant responses. *Applied and environmental microbiology*, 61, 456-460.
- Run-Jin, L. 1995.** Effect of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi on *verticillium* wilt of cotton. *Mycorrhiza* 5: 293-297.
- Saitou, N., Nei, M. 1987.** The Neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetics trees. *Mol. Biol. Evol.* 4: 406-425.
- Saito, M. 2000.** Use of VA mycorrhizal fungi. In *Biseibutsu no Shizaika: kenkyu no saizennsen (Micro-organisms Resources: its characteristics and utilization)*. Eds. T Suzui, N Okada, H Kunimi, T Makino, M Saito and K Miyashita. Pp. 57-70. Soft Science Inc., Tokyo, Japan.
- Sáinz, M.J., Taboada-Castro, M.T., Vilariño, A. 1999.** Growth, P Nutrition and mycorrhizal colonization of red clover and cucumber plants grown in a soil amended with composted urban wastes. *Plant and Soil* 205: 85-92
- Salazar, O., Molitor, J., Lienqueo, M., Asenjo, J. 2001.** Overproduction, Purification and Characterization of  $\beta$ -1,3-Glucanase Type II in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification* 23, 219-225.
- Salzer, P., Boller, T. 2000.** Elicitor-induced reactions in mycorrhizae and their suppression. In: Podila G K, Douds D D (eds). *Current advances in mycorrhizae research*. APS Press, Minnesota pp 1-10.
- Salzer, P., Bonanomi, A., Beyer, K., Vogelilange, R., Aeschbacher, R.A., Lange, J. 2000.** Differential expression of eight chitinase genes in *Medicago truncatula* roots during mycorrhiza formation, nodulation, and pathogen infection. *Molecular Plant – Microbe Interactions* 13: 763-777.
- Sanders, I.R. 1999.** No sex please, we're fungi. *Nature* 339 24 pp. 737-738.
- Sanders, I.R., Alt, M., Groppe, K., Boller, T., Wiemken, A. 1995.** Identification of ribosomal DNA polymorphisms among and within spores of the Glomales: Application to studies on the genetic diversity of arbuscular mycorrhizal fungal communities. *New Phytologist* 130: 419-427.

- Sanders, I.R., Clapp, J.P., Wiemken, A. 1996.** The genetic diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in natural ecosystems – a key to understand the ecology and functioning of the mycorrhizal symbiosis. *New phytologist* 133: 123-134.
- Sawaki, H., Sugawara, K., Saito, M. 1998,** Phylogenetic position of an arbuscular mycorrhizal fungus, *Acaulospora gerdemannii*, and its synanamorph *Glomus leptotricchum*, based upon 18S rRNA gene sequence. *Mycoscience* 39: 477-480.
- Sharma, P., Borja, D., Sougaard, P., Lönneborg, A. 1993.** PR-proteins accumulating in spruce roots infected with a pathogenic *Pythium* sp. Isolate include chitinases, chitosanase and  $\beta$ -1,3-glucanases. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 43: 57-67.
- Schlumbaum, A., Mauch, M., Vogeli, U., Boller, T. 1986.** Plant chitinases are potent inhibitors of fungal growth. *Nature* 324: 365-367.
- Schüßler, A. 2002.** Molecular phylogeny, taxonomy, and evolution of *Geosiphon pyriformis* and arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant and Soil* 244: 75-83.
- Schüßler, A., Gehrig, H., Schwarzott, D., Walker, C. 2001.** Analysis of partial Glomerales SSU rRNA genes: implications for primer design and phylogeny. *Mycol. Res.* 105: 5-15.
- Schüßler, A., Schwarzott, D., Walker, C. 2001.** A new fungal phylum, the Glomeromycota : phylogeny and evolution. *Mycol. Res.* 105 (12) :1413-1421.
- Schwarzott, D., Schüßler, A. 2001.** A simple and reliable method for SSU rRNA gene DNA extraction, amplification and cloning from single AM fungal spores. *Mycorrhiza* 10: 203-207.
- Sela-Buurlage, M.B., Ponstein, A.S., Bres-Vloemans, S.A., Melchers, L.S., van den Elzen, P.J.M, Cornelissen, B.J.C. 1993.** Only specific tobacco (*Nicotiana tabacum*) chitinases and  $\beta$ -1,3-glucanases exhibit antifungal activity. *Plant Physiol.* 101: 857-863.
- Shaul, O., David, R., Sinvani, G., Ginzberg, I., Ganon, D., Wininger, S., Ben-Dor, B., Badani, H., Ovdad, N., Kapulnik, Y. 2000.** Plant defense responses during arbuscular mycorrhiza symbiosis. *Current advances in mycorrhizae research.* (Podila & Douds, eds) 61-68.
- Shoda, M. 2000.** Bacterial Control of Plant Diseases. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 89: 515-521.
- Shouan Zhang, M., Reddy, S., Joseph, W., Kloepper. 2002.** Development of assays for assessing induced systemic resistance by plant growth-promoting rhizobacteria against blue mold of tobacco. *Biological Control* 23, 79-86.
- Sieverding, E. 1991.** Vesicular-Arbuscular Mycorrhiza Management in Tropical Agrosystems, 306 – 310.

- Simon, L. 1996.** Phylogeny of the Glomales: Deciphering the past to understand the present. *New phytologist* 133: 95-101.
- Smith, F.A., Jackobsen, I., Smith, S.E. 2000.** Spatial differences in acquisition of soil phosphate between two arbuscular mycorrhizal fungi in symbiosis with *Medicago truncatula*. *New Phytol.* 147: 357-366.
- Smith, S.E., Gianinazzi-Pearson, V., Koide, R., Cairney, J.W.G. 1994.** Nutrient Transport in Mycorrhizas: Structure, Physiology and Consequences for Efficiency of the Symbiosis. *Plant and Soil* 159: 103-113.
- Smith, Gianinazzi-Pearson. 1988.** Physiological interactions between symbiosis in vesicular arbuscular mycorrhizal plants. *Ann. R. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 39: 221-244.
- Smith, S.E., Read, D.J. 1997.** Mycorrhizal symbiosis. Academic Press.
- Simmons, C.R. 1994.** The physiology and molecular biology of plant 1,3- $\beta$ -D-glucanases and 1,3;1,4- $\beta$ -D-glucanases. *Crit. Rev. Plant Sci.* 13: 325-387.
- Slezack, S., Dassi, B., Dumas-Gaudot, E. 1996.** Arbuscular mycorrhiza-induced chitinase isoforms. *Chitin Enzymology*, Vol 2:339-347. R.A.A. Muzzarelli, ed.
- Slezack, S., Dumas-Gaudot, E., Paynot, M., Gianinazzi, S. 2000.** Is a fully established arbuscular mycorrhizal symbiosis required for bioprotection of *Pisum sativum* roots against *Aphanomyces euteiches*? *Mol. Plant-Microbe Interact.* 238-241.
- Spanu, P., Boller, T., Ludwig, A., Wiemken, A., Faccio, A., Bonfante-Fasolo, P. 1989.** Chitinase in roots of mycorrhizal *Allium porrum*: regulation and localization. *Planta* 177: 447-455.
- St-Arnaud, M., Hamel, C., Vimard, B., Caron, M., Fortin, J.A. 1995.** Altered growth of *Fusarium oxysporum* f.sp. chrysanthemi in an in vitro dual culture system with the vesicular arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* growing on *Daucus carota* transformed roots. *Mycorrhiza* 5: 431-438.
- Steenhouudt, O., Vanderleyden, J. 2000.** *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. *Federation of European Microbiological Societies* 24: 487-506.
- Sturz, A.V., Christie, B.R., Nowak, J. 2000.** Bacterial endophytes: potential role in developing sustainable systems of crop production. *Crit. Rev. Plant Sci.* 19: 1-30.
- Sturz, A.V, Nowak, J. 2000.** Endophytic communities of rhizobacteria and the strategies required to create yield enhancing associations with crops. *Appl. Soil Ecol.* 15: 183-190.

- Tisdall, J.M., Smith, S.E., Rengasamy, R. 1997.** Aggregation of soil by fungal hyphae Australian Journal of Soil Research 35: 55-60.
- Toth, R., Miller, R.M., Jarstfer, A.G., Alexander, T. & Bennett, E.L. 1991.** The calculation of intraradical fungal biomass from percent colonization in vesicular-arbuscular mycorrhize. Mycologia 83, 553-558.
- Tsang, A., Maun, M.A. 1999.** Mycorrhizal fungi increase salt tolerance of *Strophostyles hervola* in coastal foredunes. Plant Ecology 144: 159-166.
- Tobar, R., Azcón, R., Barea, J.M. 1994.** Improved nitrogen uptake and transport from <sup>15</sup>N-labelled nitrate by external hyphae of arbuscular mycorrhiza under water-stressed conditions. New Phytologist 126: 119-122.
- Toro, M., Azcón, R., Barea, J.M. 1998.** The use of isotopic dilution techniques to evaluate the interactive effects of *Rhizobium* genotype, mycorrhizal fungi, phosphate-solubilizing rhizobacteria and rock phosphate on nitrogen and phosphorus acquisition by *Medicago sativa*. New Phytol. 138: 265-273.
- Tucker, M.R., Peach, N.A., Willemsse, M.T.M., Koltunow, A.M.G. 2001.** Dynamics of callose deposition and  $\beta$ -1,3-glucanase expression during reproductive events in sexual and apomictic *Hieracium*. Planta 212, 487-498.
- Turnau, K., Haselwandter, K. 2002.** Arbuscular mycorrhizal fungi, an essential component of soil microflora in ecosystem restoration. In S. Gianinazzi, H. Schüepp, JM Barea, Haselwandter K (eds). Mycorrhizal Technology in Agriculture, from Genes to Bioproducts (pp137-149). Basel, Switzerland: Birkhäuser Verlag.
- del Val, C., Barea, J.M., Azcón-Aguilar, C. 1999.** Assessing the tolerance to heavy metals of arbuscular mycorrhizal fungi isolated from sewage sludge-contaminated soils Appl. Soil Ecology, 11, 261-269.
- Valentine, A.J., Osborne, B.A., Mitchell, D.T. 2001.** Interactions between phosphorus supply and total nutrient availability on mycorrhizal colonization, growth and photosynthesis of cucumber. Scientia Horticulturae 88: 177-189.
- Vance, C.P. 2001.** Symbiotic nitrogen fixation and phosphorus acquisition. Plant nutrition in a world of declining renewable resources. Plant Physiology 127: 390-397.
- Van Loon, L.C., Bakker, P.A.H.M., Pieterse, C.M.J. 1998.** Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. Annu. Rev. Phytopathol. 36: 453-483.
- Van Tuinen, D., Jacquot, E., Zhao, B., Gollotte, A., Gianinazzi-Pearson, V. 1998.** Characterization of root colonization profiles by a microcosm community of arbuscular mycorrhizal fungi using 25 S rDNA-targeted nested PCR. Molecular Ecology 879-887.

- Varghese, J.N., Garrett, T.P.J., Colman, P.M., Chen, L., Hoj, P.B., Fincher, G.B. 1994.** Three-dimensional structures of two plant  $\beta$ -glucan endohydrolases with distinct substrate specificities. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. Vol 91, 2785-2789.
- Varma, A., Schuepp, H. 1995.** Mycorrhization of the commercially important micropropagated plants. *Critical Reviews in Biotechnology* 15: 313-328.
- Vázquez, M. M., Cesar, S., Azcón, R., Barea, J.M. 2000.** Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and other microbial inoculants (*Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Trichoderma*) and their effects on microbial population and enzyme activities in the rhizosphere of maize plants. *Appl. Soil Ecol* 15: 261-272.
- Versaw, W.K., Chiou, T-J., Harrison, M.J. 2002.** Phosphate transporters of *Medicago truncatula* and arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant and Soil* 244: 239-245.
- Vestberg, M., Cassells, A.C., Schubert, A., Cordier, C., Gianinazzi, S. 2002.** Arbuscular mycorrhizal fungi and micropropagation of high value crops. In S. Gianinazzi, H. Schüepp, JM Barea, Haselwandter K. (ed). *Mycorrhiza Technology in agriculture, from Genes to Bioproducts* 223-233. Basel, Switzerland: Birkhäuser Verlag.
- Vierheilig, H., Alt, M., Lange, J., Gut-Rella, M., Wiemken, A., Boller, T. 1995.** Colonization of transgenic tobacco constitutively expressing pathogenesis-related proteins by the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 3031-3034.
- Vierheilig, H., Alt, M., Neuhaus, J.M., Boller, T., Wiemken, A. 1993.** Colonization of transgenic *Nicotiana* plants, expressing different forms of *Nicotiana tabacum* chitinase, by the root pathogen *Rhizoctonia solani* and the mycorrhizal symbiont *Glomus mosseae*. *Mol. Plant Microbe Interact* 6: 261-264.
- Vierheilig, H., Alt-Hug, M., Wiemken, A., Boller, T. 2001.** Hyphal in vitro growth of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* is affected by chitinase but not by  $\beta$ -1,3-glucanase. *Mycorrhiza* 11: 279-282.
- Vierheilig, H., Piché, Y. 2002.** Signalling in arbuscular mycorrhiza: facts and hypotheses. Buslig B, Manthey J. (eds). *Flavonoids in cell functions*. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York pp 23-29.
- Vogelsang, R., Barz, W. 1993.** Purification, characterization and differential hormonal regulation of a  $\beta$ -1,3-glucanase and two chitinases from chickpea (*Cicer arietinum* L.) *Planta* 189: 60-69.

- Volpin, H., Elkind, Y., Okon, Y., Kapulnik, Y. 1994.** A vesicular arbuscular mycorrhizal fungus (*Glomus intraradix*) induces a defense response in alfalfa roots. *Plant Physiol.* 104: 683-689.
- Walker, C. 1992.** Systematics and taxonomy of the arbuscular mycorrhizal fungi. *Agronomie* 12: 887-897.
- Yakatsu, Y., Nishizawa, Y., Hibi, T., Akutsu, K. 1999.** Transgenic chrysanthemum (*Dendranthema grandiflorum* (Ramat.) Kitamura) expressing a rice chitinase gene shows enhanced resistance to gray mold (*Botrytis cinerea*). *Scientia Horticulturae* 82: 113-123.
- Yao, M.K., Tweddell, R.J., Désilets, H. 2002.** Effect of two vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi on the growth of micropropagated potato plantlets and on the extent of disease caused by *Rhizoctonia solani*. *Mycorrhiza* 12: 235-242.
- Yoshikawa, M., Tsuda, M., Takeuchi, Y. 1993.** Resistance to fungal diseases in transgenic tobacco plants expressing the phytoalexin elicitor-releasing factor,  $\beta$ -1,3-endoglucanase from soybean. *Naturwissenschaften* 80, 417-420.
- Walker, C. 1992.** Systematics and taxonomy of the arbuscular endomycorrhizal fungi (Glomales) a possible way forward. *Agronomie* 12.
- Weinstein, L. I., Albersheim, P. 1983.** Host-pathogen interactions XXIII. The mechanism of the antibacterial action of glycinol, a pterocarpan phytoalexin synthesized by soybeans. *Plant Physiol.* 72.
- Weissenhorn, I., Mench, M., Leyval, C. 1995.** Bioavailability of heavy metals and arbuscular mycorrhiza in a sewage-sludge-amended sandy soil. *Soil Biology and Biochemistry* 27, 287-296.
- Weller, D.M., Thomashow, L.S. 1994.** Current challenges in introducing beneficial microorganisms into the rhizosphere. *Molecular ecology of rhizosphere microorganisms biotechnology and the release of GMOs.* O'Gara F, Dowling DN, Boesten B, Winheim VCH (eds). Germany, pp 1-18.
- Wright, D.P., Scholes, J.D., Read, D.J. 1998.** Effects of VA mycorrhizal colonization on photosynthesis and biomass production of *Trifolium repens* L. *Plant, Cell and Environment* 21: 209-216.
- Zehnder, G.W., Murphy, J.F., Sikora, E. J., Kloepper, J.W. 2001.** Application of rhizobacteria for induced resistance. *European Journal of Plant Pathology* 107: 39-50.