

T
17
34

Proy 7.13/61

FACULTAD DE CIENCIAS

ESTUDIO DE FACTORES BIOQUIMICOS RESPONSABLES DE LA INFECCION POR
PARTE DE HONGOS FORMADORES DE MICORRIZAS VA:
ENZIMAS CELULOLITICOS

JOSE MANUEL GARCIA GARRIDO

BIBLIOTECA DOCUMENTAL
GRANADA
Nº Documento 49690861
Nº Copia 2124411x

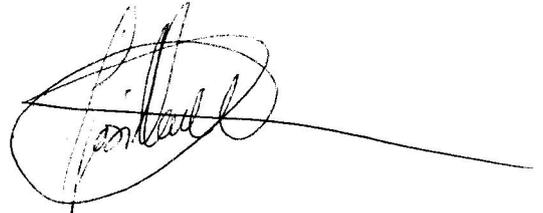
UNIVERSIDAD DE GRANADA
16 SET. 1991
CCL. 100000000

UNIVERSIDAD DE GRANADA

1 9 9 1

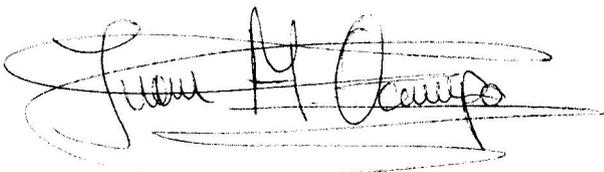
ESTUDIO DE FACTORES BIOQUIMICOS RESPONSABLES DE LA INFECCION POR
PARTE DE HONGOS FORMADORES DE MICORRIZAS VA:
ENZIMAS CELULOLITICOS

Memoria que presenta el
licenciado en Ciencias
Biológicas D. JOSE MANUEL
GARCIA GARRIDO, para aspirar
al grado de Doctor.

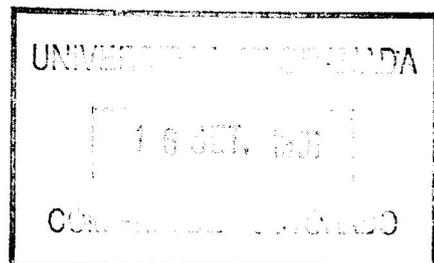


Fdo. José Manuel García Garrido

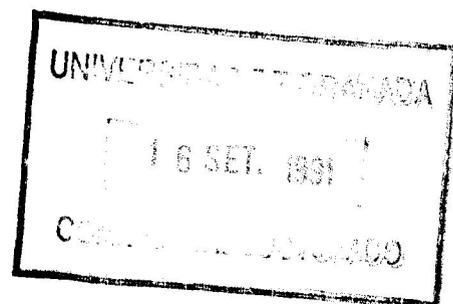
v^oB^o



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



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



INDICE

	pág.
INTRODUCCION	1
Hongos formadores de MVA	3
Dinámica de la colonización VA	6
Fase de latencia	6
Fase logarítmica de crecimiento y desarrollo	7
Fase de estabilización	9
Cuantificación de la colonización VA	9
Anatomía y morfología de las MVA	10
Morfología de estructuras fúngicas extraradicales	11
Morfología de estructuras fúngicas intraradicales	14
Hifas intracelulares en la capa externa de la corteza	14
Hifas intercelulares	15
Arbúsculos	16
Vesículas	17
Morfología y función de las interfases hongo-hospedador	18
Fisiología de la simbiosis MVA	22
Fisiología del fósforo	23
Fisiología del carbono	25
Captación de Nitrógeno y otros nutrientes	27
Alteración de las relaciones hídricas y resistencia a la salinidad	28
Efectos fisiológicos no nutricionales	29
Susceptibilidad de la plantas a la colonización VA	29
Reconocimiento y compatibilidad en el	

exterior de la raiz	31
Desarrollo del hongo en la raiz	33
Control del desarrollo de la colonización VA	36
Pared celular primaria	41
Composición de la pared celular primaria	42
Funciones biológicas de fragmentos de pared celular	50
Estructura de la pared celular primaria	52
Origen y extensión de la pared	55
Enzimas degradativos de los componentes de la pared celular vegetal	62
Degradación de celulosa	63
Enzimas celulolíticos	64
Regulación de los enzimas celulolíticos	65
Estructura de los genes implicados en la producción de enzimas celulolíticos	66
Mecanismo de degradación de celulosa por hongos	68
Sinergismo en la acción de celulasas	69
OBJETO E INTERES DEL TRABAJO	73
PLAN DE TRABAJO	76
MATERIALES Y METODOS	77
General	77
Obtención de suelos desprovistos de propágulos de micorrizas VA	77
Características de los suelos empleados	77
Tratamiento de hongos VA	78

Inoculación con hongos formadores de micorrizas VA	78
Recolección de esporas de <i>Glomus mosseae</i> en muestras de suelo rizosférico	80
Aislamiento y esterilización de esporas de <i>G. mosseae</i> .	80
Aislamiento de micelio externo de hongos VA	81
Determinaciones histoquímicas de endofitos VA	82
Tinción de raíces micorrizadas	82
Cuantificación del % de longitud de raíz colonizada	83
Cuantificación de estructuras típicas en la asociación MVA	84
Plantas y condiciones de cultivo	85
Método de obtención de extractos de raíz	87
Método de obtención de extractos de micelio externo y esporas de hongos VA	88
Determinaciones específicas	89
Determinación cuantitativa de proteínas	89
Determinación cuantitativa de actividad celulásica	91
Actividad endoglucanasa	91
Actividad exoglucanasa	92
Determinación de azúcares reductores	93
Detección de actividad celulásica en geles de poliacrilamida	96
Método de Mackenzie y Willians	98
Método de Cruickshank y Wade modificado	98
Visualización de bandas de actividad	

celulásica en geles	99
Determinación del peso molecular en geles de poliacrilamida	100
Separación cromatográfica de actividades celulásicas	102
Filtración en Sephacryl S-200	102
Cromatografía de intercambio aniónico en DEAE-sephadex A-50	103
Cromatografía de intercambio aniónico en columna Mono-Q	104
Ensayos específicos	105
Efecto del sustrato de enzimas celulolíticos en la infección VA	105
Determinación de actividad celulásica en placas de agarosa-CMC	107
Efecto de la solución extractante y el pH en la determinación de actividad celulásica	108
Estudio de actividad celulásica de microorganismos saprofitos del suelo	109
Estudio de la evolución de actividad celulásica durante el desarrollo de la colonización VA	111
RESULTADOS	113
Determinación de actividad celulásica en la asociación VA. Estudios preliminares.	113
Efecto de la celulosa en la colonización VA	113
Determinación cualitativa de actividad celulásica en placas de agarosa-CMC	114

Efecto de los distintos métodos de extracción y pH en la determinación de actividad celulásica de extractos de raíz	115
Actividad celulásica de estructuras fúngicas	117
Evolución de la actividad celulásica durante el desarrollo de la colonización VA	119
Evolución de la actividad celulásica a lo largo del proceso de colonización de lechuga por <i>G. mosseae</i>	120
Evolución de la actividad celulásica a lo largo del proceso de colonización de cebolla por <i>G. mosseae</i>	121
Evolución de la actividad celulásica a lo largo del proceso de colonización de lechuga por <i>G. fasciculatum</i>	122
Evolución de la actividad celulásica a lo largo del proceso de colonización de cebolla por <i>G. fasciculatum</i>	122
Análisis cualitativo, por técnicas electroforéticas, de actividad celulásica en la simbiosis MVA	124
Determinación de las condiciones óptimas de revelado de actividad en gel de poliacrilamida	124
Estudio de actividad celulásica de microorganismos saprofitos del suelo	125
Actividad celulásica en extractos de raíz	126
Separación cromatográfica de actividades celulásicas de extractos de raíz	128
DISCUSION	130

CONCLUSIONES

144

BIBLIOGRAFIA

145



INTRODUCCION

El estudio de las relaciones microorganismo-planta es un tema central en la investigación sobre fisiología vegetal. En el suelo habitan diversas poblaciones de microorganismos, con un papel importante sobre el crecimiento y nutrición de las plantas. Las raíces de las plantas tienen una zona de influencia en el suelo, denominada "rizosfera". Esta influencia se traduce, a nivel ecológico, en la alteración, tanto cuantitativa como cualitativa, de las poblaciones de microorganismos; cuyo metabolismo repercute directamente en la biología de la planta.

Desde el punto de vista nutricional la relación planta-microorganismo puede ser parásita, mutualista o saprofítica. Una de las simbiosis mutualistas más extendidas son las micorrizas, formadas por asociación de plantas y hongos del suelo. Alrededor del 80% de las especies vegetales conocidas forman asociación con algún tipo de hongo micorrízico. El beneficio en la asociación es mutuo y repercute en la mejor nutrición de la planta, principalmente fosforada, y del hongo, a partir de compuestos fotoasimilados de la planta hospedadora.

Las micorrizas se dividen tradicionalmente en tres grupos morfológicamente distintos en cuanto a la mayor o menor penetración de las células radicales. Las Ectomicorrizas las forman exclusivamente especies arbóreas y se caracterizan por un gran desarrollo del micelio en la superficie de la raíz hospedadora, la cual pueden llegar a estar completamente englobada en un manto fúngico. Algunas hifas del manto penetran

entre los espacios intercelulares de las células más externas de la raíz, formando una red intercelular.

El segundo tipo, y mayoritario, lo constituyen las denominadas endomicorrizas, caracterizadas por el menor desarrollo fúngico en la superficie de la raíz y una colonización importante de las células corticales. Esta colonización no causa cambios morfológicos aparentes en la raíz. Se distinguen tres tipos de endomicorrizas, diferenciados según el patrón de infección y de plantas hospedadoras. Estos tipos son: ericoides, orquidales y vesículo-arbusculares (en adelante MVA).

El último tipo, ectendomicorrizas, presenta una forma intermedia de las dos anteriores, con una cubierta superficial de hifas y una penetración intra e intercelular de las células corticales. La forman un limitado número de plantas y hongos poco conocidos.

La simbiosis MVA esta caracterizada por la colonización de hifas aseptadas y multinucleadas provenientes de otras raíces ó de grandes esporas (pueden alcanzar un tamaño de 500 μm) que se encuentran en el suelo. El desarrollo fúngico varía en detalle según el hospedador, pero en la mayoría de las asociaciones la hifa se diferencia para formar arbusculos intracelulares y vesículas tanto intra ó intercelulares. La hifa se extiende considerablemente fuera de la raíz, por lo que el hongo posee parte interna y externa.

Esta asociación tiene una larga historia evolutiva, su ubicuidad (se encuentra en mas del 80% de las especies vegetales) y la forma de explorar el suelo sugieren que ha sido

necesaria, durante el periodo Silúrico, para la colonización de la tierra por plantas acuáticas sin verdadera raíz. De hecho se conocen fósiles de micorrizas VA provenientes de los periodos Devónico y estratos subsiguientes. Desde entonces plantas y hongos VA (formadores de micorrizas VA) han evolucionados conjuntamente, lo que ha dado lugar a que se establezcan una serie de dependencias entre ambos simbioses. De este modo, muchas plantas requieren estar micorrizadas para alcanzar su crecimiento óptimo, y, por otro lado, no se ha conseguido que hongos VA completen su ciclo de vida en ausencia de la planta hospedadora, por lo que se consideran simbioses fisiológicamente obligados.

Hongos formadores de Micorrizas vesículo-arbusculares.

Los hongos VA son componentes habituales de la rizosfera, encontrándose en todos los ambientes, incluso en aquellos que han sufrido algún deterioro (Mosse, B. *et al.*, 1981). La imposibilidad actual de obtenerlos en cultivo axénico en ausencia de la planta hospedadora dificulta el estudio de su biología.

Las esporas de los hongos VA son los propágulos más característicos y los criterios taxonómicos se basan en la morfología, germinación y desarrollo de tubos germinales de estas.

Recientemente (Morton J.B. *et al* 1990) se ha propuesto una clasificación de hongos VA que incluye un solo orden dividido en dos subordenes, en función de relaciones evolutivas

existentes, originados a partir de un ancestro arbuscular común, y dos nuevas familias: Acaulosporaceae y Gigasporaceae.

División EUMYCOTA

Grupo: Zygomycotina

clase: Zygomycetes

orden: Glomales

Suborden: Glomineae

Familia: Glomaceae

Géneros: *Glomus*

Sclerocystis

Familia: Acaulosporaceae

Generos: *Acaulospora*

Entrophospora

Suborden: Gigasporineae

Familia: Gigasporaceae

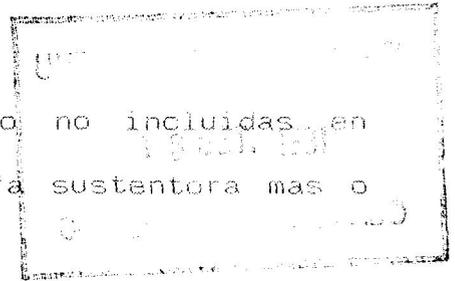
Géneros: *Gigaspora*

Scutellospora

Clasificación taxonómica de los hongos formadores de micorrizas VA. (MORTON, *et al.* 1990).

Los géneros *Glomus* y *Sclerocystis* producen esporas de resistencia (Clamidosporas) con paredes gruesas, originadas asexualmente en los extremos de hifas vegetativas (Walker, C. 1987). En *Sclerocystis* las esporas se encuentran dentro de cuerpos fructíferos, denominados esporocarpos, dispuestas de forma periférica alrededor de un eje central. En el género

Glomus las clamidosporas pueden estar o no incluidas en esporocarpos y nacen a partir de una hifa sustentora mas o menos recta (Gerdemann y Trappe, 1974).



las familias Gigasporaceae y Acaulosporaceae incluyen generos formadores de zigosporas, esporas similares a zigosporas pero en las que no se ha observado origen sexual (Morton, 1988). *Gigaspora* difiere de *Scutellospora* en que la primera no posee ninguna pared interna flexible en las zigosporas, mientras que *Scutellospora* posee al menos una. En *Acaulospora* las zigosporas se forman lateralmente a partir de la hifa que sostiene la espora madre, mientras que en *Entrophospora* las zigosporas se forman dentro del cuello de la hifa. Tanto en *Acaulospora* como en *entrophospora* las zigosporas se forman por la migración del contenido de la espora madre previamente desarrollada y de corta duración por lo que normalmente carece de hifa sustentora (Morton, 1988), no así *Gigaspora* y *Scutellospora*, que tienen un suspensor similar a un gametangio (Gerdemann y Trappe, 1974).

Las esporas de hongos VA son unidades biológicas preprogramadas, en estado de quiescencia, que precisan activarse para desencadenar los procesos normales de su biología celular y las funciones metabólicas que sustentan su germinación y crecimiento del micelio (Siqueira, 1987). No se conocen los mecanismos de activación e inicio de la germinación, aunque las esporas contienen los factores biológicos requeridos para germinar, no obstante, parece que no poseen los sistemas genéticos y metabólicos para su crecimiento continuo y esporulación, a menos que se asocien a

células de raíces vivas (Hepper, 1984; Siqueira, 1987).

Dinámica de la colonización VA.

El proceso y desarrollo de la colonización de la raíz por hongos VA sigue una curva sigmoidal típica, en la que se observa una fase de latencia, fase logarítmica de crecimiento y desarrollo, y una fase de estabilización.

Fase de latencia

Esta fase está causada por el tiempo requerido para la germinación de esporas, crecimiento del micelio y su penetración en la raíz.

Los principales propágulos de hongos VA del suelo son las esporas, fragmentos de raíz de plantas micorrizadas y masas de micelio fúngico.

Las esporas germinan en condiciones favorables de temperatura y humedad, si bien se han descrito una serie de factores que afectan este proceso. Así, se produce una estimulación de la germinación inducida por exudados radicales (Graham, J. H. 1982) o inhibición por sustancias volátiles de plantas no susceptibles de formar micorrizas (El atrach, F., *et al.*, 1989). Otros factores, como la población de microorganismos del suelo también pueden afectar el ritmo de germinación de esporas, bien por acción inductora directa (Azcón-Aguilar, C. *et al.*, 1986), o por degradación de compuestos tóxicos del suelo, que ejercen una inhibición del

proceso de germinación de esporas. (Ázcón-Aguilar, C. *et al.*, 1986).

El micelio proveniente de la germinación de esporas, de raíces colonizadas o de masa fúngica que se encuentra de forma independiente en el suelo (Warner y Mosse 1980; Ocampo y Hayman, 1981), parece tener un crecimiento errático, no dirigido, hasta alcanzar la rizosfera de la planta, donde, como se mencionará más adelante, procesos de reconocimiento y compatibilidad harán posible o no la penetración.

Fase logarítmica de crecimiento y desarrollo.

Esta fase está directamente asociada con la formación de un micelio extenso en el suelo con capacidad para penetrar la raíz. El número de propágulos del suelo es un factor determinante para la extensión y velocidad de la colonización, así como la velocidad de inicio de las primeras colonizaciones (Daft y Nicolson, 1969; Rich y Bird, 1974). Las colonizaciones iniciales tienen una gran importancia en la aceleración de la respuesta de crecimiento en plantas cultivadas. Con un incremento en el número de propágulos se consigue un mayor porcentaje de colonización. Sin embargo existe un nivel de saturación de inóculo, por encima del cual no se consigue incrementar los niveles de colonización de la raíz (Carling *et al.*, 1979; Smith y Walker, 1981). No se conoce cual es la causa de esta saturación, pues el potencial de inóculo no solo está definido por la cantidad de propagulos sino también por su competitividad en el suelo frente a otros microorganismos y por

la capacidad de extensión de la colonización el interior de la raíz, la cual puede ser diferente según el tipo de planta a colonizar. No se puede excluir que las diferentes especies de hongos VA difieran entre si en su velocidad de extensión en el interior de la raíz y puedan alcanzar una extensión de colonización similar independientemente de la dosis de inóculo (Daniels *et al.*, 1981).

La velocidad de desarrollo de la colonización, la especie de hongo y el nivel total de colonización pueden ser factores importantes en la efectividad ó en la dependencia de la planta a la micorriza.

El desarrollo de la colonización de la raíz comienza con la hifa de penetración que crece y se ramifica en los espacios intercelulares, y constituye lo que se ha denominado "unidad de infección" (Wilson, 1984).

Las hifas crecen intercelularmente en las capas más externas del parenquima cortical pudiendo formar circunvoluciones u ovillos de función no definida. En las zonas internas de la corteza el hongo se desarrolla de forma intracelular dando lugar a la estructura más característica en esta simbiosis, los arbusculos. En un estadio posterior se forman las vesículas, que se suponen que actúan como órganos de reserva, y cuya composición es, fundamentalmente, lipídica.

A medida que se generaliza la colonización se produce el desarrollo de hifas del hongo VA en el suelo, provenientes de la raíz colonizada. Esta extensa red de micelio externo es capaz de explorar un volumen de suelo adicional, al que no pueden acceder las raíces por sí solas (Abbot, y Robson, 1985).

Fase de estabilización.

Alcanzada una determinada edad de la simbiosis, que depende del tipo de planta, se estabiliza el nivel de colonización, que rara vez sobrepasa el 80% de la longitud total de la raíz. No se conocen las causas que determinan esta estabilización, pero al igual que toda la dinámica de la colonización VA depende de las condiciones intrínsecas del sistema radical y de las condiciones ambientales en que se encuentra.

Cuantificación de la colonización VA.

Prácticamente todos los estudios que se realizan con MVA requieren una observación o cuantificación de la colonización en alguna etapa de la investigación.

La mayoría de las medidas de la colonización se basan en la determinación de la proporción de tejido del hospedador susceptible de micorrizarse (corteza primaria), ocupado por el hongo. Otra forma de medición, es la determinación directa de la proporción de tejido fúngico presente en la raíz. Esta es la base de la medida de la quitina total, después de su conversión a glucosamina (Hepper, 1977) y medida colorimétricamente. Este método da una buena correlación entre el nivel de glucosamina medido y el nivel de tejido colonizado, pero para relacionar los resultados de este ensayo con la masa fúngica requiere una calibración del método para cada endofito.

y solo se utiliza en ensayos llevados a cabo en condiciones estériles y cuando se requiere una medida muy precisa. Otro método (Becker y Gerdemann, 1977) se basa en la medida del pigmento amarillo que se forma en las raíces colonizadas de algunas plantas (cebolla y maíz). Pero no todas las especies de plantas forman este pigmento y el método no es siempre satisfactorio.

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

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

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

Anatomía y morfología de las MVA.

Los cambios anatómicos y citológicos causados por hongos VA en la raíz hospedadora no son apreciables a simple vista.

Solo la presencia, en ciertas Liliáceas y en maíz, de pigmento amarillo, soluble en agua (Gerdemann, J. W. 1961) y la longitud y número de los pelos radicales, son características morfológicas macroscópicas que parecen relacionadas con la micorrización.

La colonización micorrizica solo tiene lugar en la epidermis ó exodermo y en el parénquima cortical de la raíz primaria. Nunca hay colonización en la endodermis, en el cilindro vascular central, ni en las regiones meristemáticas (Bonfante-Fasolo, 1984). Sin embargo se han descrito algunos cambios inducidos por la micorrización a nivel de organización celular del meristemo apical y cilindro vascular. La micorrización parece detener la actividad meristemática por decrecimiento del índice mitótico, formándose un tejido parenquimatoso en los ápices radicales. (Fusconi, *et al.* 1986).

En la simbiosis MVA cabe distinguir dos fases: fase de desarrollo fúngico extraradical, y fase de desarrollo intraradical.

Morfología de estructuras fúngicas extraradicales.

El desarrollo extraradical de hongos VA varía en función del tipo de suelo, planta y especie fúngica.

La fase extraradical está representada por las clamidosporas y micelio externo. Las clamidosporas de la mayoría de hongos VA poseen una pared gruesa con dos capas

distintas en arquitectura. Una observación importante es el hecho de que algunas esporas de hongos VA poseen un modelo helicoidal de estructuración de su pared. El modelo helicoidal de estructuración de la pared parece ser el resultado de un sistema oscilatorio y una actividad rítmica y puede interpretarse como un registro temporal de la actividad celular (Vian y Roland, 1987). Este tipo de organización en la pared no se ha descrito para ningún hongo, exceptuando hongos VA (Bonfante-Fasolo, y Schubert, 1987), y si se ha puesto de manifiesto en células vegetales de algas y en cubiertas celulares de crustáceos e insectos. La regularidad en deposición en capas y la organización en fibras paralelas o helicoidal de la quitina son características variables en las distintas esporas de especies fúngicas VA. El contenido citoplasmático de las esporas es denso y rico en gránulos lipídicos.

Las hifas externas poseen un tamaño variable, oscilando entre 2 y 27 μm de diámetro (Nicholson, 1959). Estas hifas pueden ser de paredes gruesas o delgadas. Las hifas de pared gruesa son de color amarillento, aseptadas y poseen proyecciones angulares unilaterales típicas (Nicholson, 1959; Mosse, B., 195). A partir de estas hifas de pared gruesa pueden desarrollarse ramificaciones laterales de pared delgada y septadas. Las paredes celulares de estas hifas se caracterizan porque poseen una textura fibrilar y están constituidas por proteínas, polisacáridos y sobre todo por quitina (Bonfante-Fasolo y Grippiolo, 1982; Bonfante-Fasolo, 1988). Poseen un citoplasma con núcleos, mitocondrias y un retículo

endoplasmático rico en ribosomas (Bonfante-Fasolo y Grippiolo, 1982). Frecuentemente poseen un sistema de vacuolas bien desarrollado y aparecen con un contenido denso a los electrones, parecido a los gránulos de polifosfato que aparecen en las hifas intraradicales. (Bonfante-Fasolo, 1984).

Cuando la hifa externa entra en contacto con la raíz puede engrosarse apicalmente, formando una estructura parecida a un apresorio, y a veces puede ramificarse en forma de abanico antes de penetrar en la raíz (Gianinazzi-Pearson *et al.*, 1980). El número de puntos de entrada que pueden formar es variable en función de las condiciones ambientales y de la edad de la raíz. La hifa no penetra los meristemas apicales y la colonización suele tener lugar entre 0.5 y 1 mm a partir del extremo de la raíz (Mosse, y Hepper, 1975).

La hifa puede penetrar la raíz por varias vías (Bonfante-Fasolo, 1984):

- Directamente a través de la pared de un pelo radical o una célula epidérmica. Se ha observado que la hifa que penetra se estrecha en el punto de penetración, recuperando posteriormente su tamaño normal (Grippiolo, 1981; Kinden y Brown, 1975).
- La hifa, originada en el apresorio, puede atravesar los espacios vacíos entre células muertas de la capa externa de la raíz y entrar en la primera capa de células intactas, formando un ovillo o circunvolución intracelular (Scannerini, y Bonfante-Fasolo, 1983).
- La hifa penetra entre las células epidérmicas y se extiende intercelularmente (Gianinazzi-Pearson, *et*

al. 1981).

En la elección de una u otra vía de penetración parece influir la anatomía de la raíz. De igual modo la extensión de la hifa en el interior de la raíz parecer depender del tipo de planta y de hongo que la coloniza (Abbot, 1982).

Morfología de estructuras fúngicas intraradicales.

Hifas intracelulares en la capa externa de la corteza.

La capa externa de la corteza de la raíz se coloniza, a menudo, por hifas intracelulares que forman circunvoluciones dentro de la célula hospedadora. Son hifas lineales sin ningún tipo de ramificación. La formación de circunvoluciones es un fenómeno común a las raíces micorrizadas de muchas plantas y producido por la mayoría de especies de hongos VA. La hifa puede formar una circunvolución intracelular en la primera célula que coloniza, pasando posteriormente a otra capa de células vecinas, y formando nuevas circunvoluciones. También puede ocurrir que la hifa penetre la primera célula sin formar circunvolución y las forme en las células vecinas. (Bonfante-Fasolo, 1984). El tamaño de la hifa intracelular depende del tipo de hongo y su comportamiento en la capa externa de células corticales posiblemente esté influenciado por el hospedador (Abbott, L. M. 1982).

Estudios realizados con microcópico de transmisión revelan que el núcleo de la célula vegetal aparece cercano a la hifa intracelular. Esta hifa contiene pequeños núcleos, vacuolas que contienen gránulos densos, gotas lipídicas, gránulos de

glucógeno y una pared con disposición fibrilar rica en polisacáridos alcalinos solubles (Bonfante-Fasolo, 1984).

La colonización de la célula por parte de la hifa se caracteriza por la invaginación del plasmalema de la célula hospedadora, de tal forma que nunca hay una invasión del citoplasma por parte del hongo. El plasmalema hospedador y la pared fungica están siempre separados por una matriz osmófila de material fibrilar que se hace continua con la pared celular de la célula vegetal y con morfología similar a esta (Grippiolo, R. 1981).

Durante el paso de célula a célula la hifa atraviesa la pared e invagina la membrana de la célula hospedadora sin afectar al citoplasma (Bonfante-Fasolo y Grippiolo, 1982).

Cuando el hongo alcanza la zona media del parénquima cortical se extiende de modo intercelular a lo largo de la raíz de forma paralela al eje principal de esta.

Hifas intercelulares.

La hifa intercelular, proveniente de una circunvolución o de una hifa de penetración, se extiende, dilatando los espacios intercelulares, a lo largo de las capas intermedias del parénquima cortical. Su diámetro es variable (2 a 6 μm) y a veces se encuentran agrupadas en paquetes de 3 o 4. La pared celular de estas hifas es delgada en la zona de crecimiento y se vuelve más gruesa y con textura fibrilar cuando la hifa envejece (Bonfante-Fasolo, 1988). Se han descrito interconexiones entre las hifas intercelulares, tanto de tipo H. cohesión perpendicular entre dos hifas que se extienden

paralelamente, como Y, división de una hifa en dos ramas que se extiende posteriormente de forma paralela (Abbot, y Robson, 1979).

Las hifas intercelulares contienen pequeños núcleos, mitocondrias, granulos densos rodeados de membrana, grandes vacuolas, granulos de α -glucógeno y granulos lipídicos.

Una característica de las hifas intercelulares y troncos arbusculares es que a veces aparecen orgánulos con aspecto de bacteria en su protoplasma. Incluso se han descrito características de estos orgánulos que hacen sospechar que sean organismos en estado citobiótico (McDonald, R. M., *et al.*, 1982). Sin embargo, no se conoce el papel y función de estas partículas, siendo necesario su aislamiento y cultivo.

Arbúsculos

En las capas interiores del parenquima cortical la hifa intercelular penetra las células corticales dando lugar a un sistema complejo de hifas ramificadas, denominado arbúsculo. El arbúsculo se origina a partir de una rama de la hifa intercelular, el tronco arbuscular, que penetra en la célula hospedadora, se ramifica sucesivamente en forma dicotómica y da lugar a ramas que proliferan en pequeñas hifas con terminales cortos bifurcados. Las ramificaciones arbusculares causan una invaginación del plasmalema hospedador y se encuentran siempre rodeadas de este. La pared de las hifas arbusculares es fina y con una estructura amorfa, donde desaparece la organización fibrilar de la quitina y solo aparecen residuos monoméricos de N-acetilglucosamina (Bonfante-Fasolo, 1982; Kinden y Brown,

1975).

Las hifas arbusculares contienen numerosos núcleos, mitocondrias, gránulos de glucógeno, gotas lipídicas, abundantes cuerpos polivesiculares y gránulos densos dentro de pequeñas vacuolas. Entre estos gránulos se han encontrado niveles altos de fósforo y calcio (Cox, G., *et al.*, 1980). Además se ha encontrado una gran actividad fosfatasa y ATPasa en estas zonas (Gianinazi, S., *et al.*, 1979; Marx, C. *et al.*, 1982).

la pared celular de los arbusculos se va haciendo más delgada conforme se aleja del tronco arbuscular. Estudios citoquímicos han puesto de manifiesto la presencia de proteínas y polisacáridos en dicha pared.

El arbusculo es la estructura más significativa en la simbiosis VA, tanto desde el punto de vista funcional, ya que es el sitio preferencial para el intercambio de metabolitos, como desde el punto de vista estructural, pues los arbusculos son elementos decisivos para la identificación de una colonización fúngica como micorriza VA.

La vida media de un arbusculo es de 4 ó 5 días, después de estos las ramas arbusculares se deterioran y colapsan (Cox y Tinker, 1976). El deterioro comienza por las ramificaciones más pequeñas y se caracteriza por la pérdida y desorganización de su contenido citoplasmático, pérdida de integridad de la membrana y colapsamiento de las paredes celulares.

Vesículas.

Las vesículas son cuerpos globosos originados por un

hinchamiento intercalar o terminal de la hifa. Las vesículas pueden ser inter ó intracelulares, variando en tamaño y en número dependiendo del hongo VA.

No se han determinado las fases de desarrollo de las vesículas, pero si se conoce que inicialmente su protoplasma contiene numerosos núcleos, glucógeno y vacuolas con gránulos densos y que en estado maduro presentan en su interior grandes gotas lipídicas. Su pared esta constituida por varias capas con diferente densidad a los electrones.

Su función es desconocida, si bien su alto contenido lipídico y su incremento en número en raíces viejas o muertas, hace suponer una función de reserva (Bonfante-Fasolo, 1984). No obstante, existen indicaciones que apoyan el papel de vesículas como propágulos de hongos VA (Bierman y Linderman, 1983).

Morfología y función de las interfases hongo-hospedador.

Un requisito imprescindible para que se lleve a cabo un intercambio de nutrientes entre simbiosis es el desarrollo de una interfase, cuyas características morfológicas y funcionales hacen posible el transporte de nutrientes. La interfase, formada entre los dos miembros de la asociación está constituida por componentes de pared, las propias paredes celulares y las membranas plasmáticas de ambos, y puede variar en estructura y organización durante las distintas fases de desarrollo de la interacción simbiótica.

En la mayoría de los casos de relación simbiótica, las interacciones entre los miembros que la forman están

localizadas a nivel del apoplasto. Cuando el microsimbionte penetra un órgano hospedador, coloniza el tejido apoplástico, si la colonización es intercelular, o bien coloniza la región apoplástica dentro de la pared celular hospedadora, pero fuera del protoplasto, si la colonización es intracelular. La formación de la interfase conlleva una serie de modificaciones que afectan a todos sus componentes. Por un lado hay una modificación del apoplasto, que afecta su permeabilidad y, consiguientemente, la transferencia de nutrientes. De este modo, en las infecciones de plantas por parásitos biotrofos, se produce una deposición de material de pared celular y cambios en los componentes de dicha pared que incrementan la resistencia de la planta a la infección y reducen la transferencia unidireccional (planta-parásito) de nutrientes. En el caso de asociaciones mutualistas hay una reducción de material de pared en la interfase intracelular, sobre todo en las zonas más directamente implicadas en el intercambio de nutrientes.

De otro lado, las membranas plasmáticas que intervienen en la interfase sufren también modificaciones, por un lado incrementan el área de contacto mediante invaginación, y por otro, se redistribuyen las enzimas que participan en el intercambio de nutrientes y mantenimiento de la interfase, tales como ATPasas y fosfatasas neutras, que se concentran en la zona de contacto.

Cuando el hongo se encuentra en la fase intercelular hay un contacto directo entre las paredes del hongo y de las células radicales. En esta fase no hay respuesta evidente a la

presencia de la hifa, si bién se han observado alteraciones de la lámina media (Gianinazzi-Pearson, V. *et al.*, 1981).

Cuando el hongo es intracelular la interfase hongo-planta esta formada por la pared fúngica, el plasmalema de la célula hospedadora y una matriz de material osmófilo rico en polisacáridos y proteínas (Scannerini, *et al.*, 1979; Gianinazzi-Pearson *et al.*, 1981). Las características de esta interfase varían según la situación del hongo. En los tejidos radicales externos, donde se desarrollan circunvoluciones intracelulares la pared de la hifa es relativamente gruesa y quitinosa, con una estructuración fibrilar, y está separada del plasmalema hospedador por una matriz interfacial parecida a la pared primaria que actúa como barrera física que separa hongo y planta. Es una interfase que se asemeja a la que se establece con la hifa intercelular. El contenido citoplasmático de las células hospedadoras cambia poco en respuesta a la colonización (Gianinazzi-Pearson y Gianinazzi, 1988). En cambio las células corticales parenquimáticas que contienen los iones arbúsculos experimentan cambios apreciables. El contenido citoplasmático se incrementa, disminuyen las vacuolas, los granos de almidón desaparecen, los orgánulos celulares son más numerosos, el sistema de membrana se incrementa y el plasmalema del hospedador prolifera rodeando las ramas de la hifa, creando así una mayor superficie de contacto celular entre ambos componentes de la simbiosis (Cox y Tinker 1976). Esta situación celular es propia de una intensa actividad metabólica, asociada a una intensa actividad transcripcional en el núcleo de la célula hospedadora (Berta, *et al.*, 1986).

A medida que la hifa fúngica se ramifica en el protoplasto del hospedador, la interfase hongo-hospedador se modifica y se hace más compleja. La pared celular fúngica se simplifica y se hace más fina a lo largo del arbusculo. El material de pared depositado por la célula hospedadora disminuye en la matriz interfacial que rodea las zonas más finas de las hifas arbusculares, por lo que el apoplasto entre hongo y plasmalema de la célula hospedadora se reduce y se establece una unión estrecha entre las superficies celulares de ambos simbiotes. A lo largo del plasmalema del hospedador que rodea las ramas arbusculares aparecen específicamente localizadas las fosfatasas neutras, cuya actividad es característica en la síntesis de polisacáridos (Jeanmaire, C. *et al.*, 1985). Además, aparecen gran cantidad de vesículas de membrana, con contenido fibrilar, cuya función parece estar relacionada con la síntesis de pared celular (Dexheimer, J. *et al.*, 1985).

Tanto la actividad de fosfatasas neutras como las vesículas de membrana permanecen en las zonas de senescencia de las hifas arbusculares, donde el material del hospedador se acumula alrededor de los restos celulares fúngicos. Por tanto, es lógico pensar que, el plasmalema del hospedador, que rodea la hifa arbuscular, tiene una actividad formadora de pared, pero los procesos de depósito y organización de pared se afectan por la hifa que está creciendo activamente (Dexheimer, *et al.*, 1985). Los precursores de la pared formados ó la hidrólisis localizada de material de pared podrían suministrar una fuente suplementaria de carbohidratos al hongo VA.

A lo largo del plasmalema de las ramas arbusculares

activas se ha detectado actividad ATPásica, lo que indica la posibilidad de un transporte activo de solutos dentro del hongo. También se han detectado actividad de fosfatasas alcalinas en las hifas arbusculares, que parece estar relacionada con el mecanismo de transporte activo de fósforo desde el hongo a la planta. en las ramas arbusculares jóvenes se ha detectado la presencia de fosfatasas ácidas cuya función parece relacionada con el proceso de elongación y crecimiento de la hifa (MacDonald y Lewis, 1978).

El plasmalema de la célula hospedadora, que se desarrolla alrededor de las ramas arbusculares, posee una intensa actividad ATPásica en comparación con el plasmalema periférico, no relacionado directamente con el arbusculo (Dexheimer, *et al.*, 1982). Este desarrollo localizado de actividad ATPásica sugiere la posibilidad de un transporte activo de solutos (Harley y Smith, 1983). La actividad ATPásica desaparece en el plasmalema hospedador que rodea las hifas arbusculares senescentes.

Tras la degeneración y senescencia de las estructuras arbusculares, la célula hospedadora recupera su aspecto normal (Harley y Smith 1983).

Fisiología de la simbiosis MVA.

La formación de la simbiosis MVA supone la alteración fisiológica de la planta cuyo efecto más apreciable es una mejor nutrición de la misma, principalmente fosforada, con la consiguiente repercusión en el crecimiento e incremento de

biomasa. Lógicamente esta asociación mutualista supone también efectos positivos sobre el hongo VA, el cual recibe los compuestos carbonados necesarios para su desarrollo a partir de la planta, los cuales provienen de la actividad fotosintética de la misma.

Aunque las principales alteraciones fisiológicas de la planta hospedadora son de tipo nutricional, existen otras modificaciones como la alteración de las relaciones hídricas y resistencia a salinidad, cambios morfológicos y resistencia a condiciones de estrés, que no parecen deberse a causas nutricionales.

A continuación se analizan las principales repercusiones fisiológicas que, sobre las plantas hospedadoras, origina el establecimiento de la asociación MVA:

Fisiología del fósforo.

El ión fosfato es muy lento en su desplazamiento en el suelo y suele encontrarse en concentración baja (Bielecki, R. L. 1973), por tanto, es muy poco el fósforo total del suelo disponible para las plantas. La captación de fósforo por la raíz origina una zona de deficiencia de este elemento alrededor de ella. Las hifas externas de la micorriza son capaces de crecer y desarrollarse más allá de esta zona de deficiencia, con lo que proporcionan a la raíz un incremento en sitios de absorción de fósforo y la capacidad de explorar un volumen mayor de suelo, superando los problemas de disponibilidad y deficiencia mencionados (Hayman, D. S. 1983)

La fisiología del P en micorrizas VA se puede dividir en tres fases: captación, transporte por las hifas y transferencia a las células hospedadoras a nivel arbuscular.

La captación de P por las hifas fúngicas se puede describir en términos de los parámetros enzimáticos de Michaelis-Menten (Beevers, y Burns, 1980). Dos son las características que definen esta captación: gran afinidad en la absorción cuando la concentración de P en el suelo es baja, y una gran capacidad de captación debido al incremento de puntos absorbentes (consecuencia de una mayor área de captación) cuando existe disponibilidad del ión.

Se supone que la entrada del ión fosfato a la hifa se realiza por un mecanismo activo acoplado a la translocación de H^+ dependiente de una ATPasa de membrana (Smith, y Smith, 1990).

El fósforo captado del suelo es transportado por las hifas fúngicas en forma de gránulos de polifosfato, osmóticamente inactivos. Estos gránulos de polifosfato, libres o incluidos en vacuolas, son formados por polifosfoquinasas específicas situadas en las hifas externas y viajan en dirección a la raíz movidos por corrientes citoplasmáticas (flujo + ciclosis) (Cappacio, y Callow, 1982). Existe un mecanismo de control según la disponibilidad de P en el suelo, mediante el cual se fija el P o se libera de los gránulos de polifosfato. En este mecanismo intervienen fosfatasas alcalinas asociadas a las vacuolas del hongo (Gianinazzi-Pearson, y Azcón-González, 1991).

Los gránulos de polifosfato no aparecen en la ramas finas

arbúsculares, lo que indica que han sido degradados previamente. El fosfato liberado y acumulado en el citoplasma fúngico, pasa de forma pasiva al apoplasto interfacial (Gianinazzi, S., *et al.*, 1979), de donde es captado por el hospedador mediante mecanismos activos dependientes de energía.

Fisiología del carbono.

Los compuestos carbonados requeridos por el hongo VA para su crecimiento y desarrollo son proporcionados por la planta hospedadora y provienen de su actividad fotosintética. Alteraciones en el proceso de fotosíntesis repercuten en el desarrollo de la colonización VA (Hayman, 1974; Ocampo y Barea, 1982).

Los compuestos carbonados transferidos son rápidamente metabolizados por el hongo y convertidos fundamentalmente en lípidos y glucógeno (Cooper, K.M. 1984).

Aunque en un principio no se encontró trealosa ni manitol, en hongos VA, recientemente (Bécard, *et al.*, 1990), se ha detectado trealosa en esporas e hifas de hongos VA asociados a raíces. La transferencia de azúcares del hospedador se manifiesta en la desaparición de almidón de las células colonizadas, y un incremento en actividad invertasa en raíces colonizadas (Dixon, *et al.*, 1988).

Todavía no está aclarado el proceso de intercambio de P y azúcares a nivel de la interfase arbuscular. Debe ser un transporte activo mediado por actividad ATPasa y extrusión de H^+ , pero no se conoce con certeza la naturaleza de los azúcares

transportados y la identidad de los transportadores, ni la estequiometría del proceso. En 1975, Woolhouse, propuso un modelo según el cual la captación por el hongo de carbohidratos, provenientes del hospedador, está acoplada a la liberación de P por la hifa; y el mecanismo de intercambio es un sistema antipor azúcar-P.

Recientemente se propone un modelo según el cual el transporte de azúcares (sacarosa u otras hexosas) de la planta a la interfase es pasivo, al igual que el de P del hongo a dicha interfase. Mientras que el transporte de P y azúcares hacia la célula hospedadora e hifa respectivamente se realizaría de forma activa y mediada por actividad ATPasa ligada a la extrusión de protones (Smith, y Smith, 1990). También se ha propuesto un modelo de intercambio basado en un translocador de P y triosas-fosfato unido a membranas, similar al existente en el cloroplasto. Según este modelo el P proveniente de la hidrólisis de gránulos de polifosfato se acumula en la interfase y es translocado por triosas-fosfato provenientes de la célula hospedadora. La hidrólisis de estas triosas-P origina triosas no cargadas que son captadas de forma activa por el hongo y P transportado activamente hacia la planta. Los niveles de P y triosas-P de la matriz interfacial controlarían el funcionamiento de todo el sistema (Schwab, *et al.*, 1991).

Es complicado verificar los modelos postulados, sin embargo si está claro que la micorrización altera la tasa fotosintética de la planta y provoca un incremento en la transferencia de fotosintato, representado por un incremento en

la superficie de membrana celular y del flujo de fotosintato del simplasto al apoplasto radical. En estos efectos podrían intervenir de manera activa las hormonas vegetales, cuyos niveles se alteran en los tejidos vegetales colonizados (Allen, *et al.*, 1982).

Captación de N y otros nutrientes.

Las plantas micorrizadas poseen una mejor nutrición nitrogenada que plantas no micorrizadas. En el caso de plantas leguminosas noduladas, el efecto de las micorrizas sobre la nutrición nitrogenada parece estar mediado por la estimulación de la fijación simbiótica, bien por una mejor nutrición fosforada (Barea, 1990), por la captación de elementos limitantes de la fijación simbiótica, tanto Fe como Mo (Rai, 1988), o por un efecto directo sobre la actividad de los nódulos (Ames, y Bethlenfalvay, 1987).

Se ha encontrado también un incremento en la captación de compuestos nitrogenados en plantas micorrizadas (Barea *et al.*, 1989a y b), posiblemente de amonio, por ser este un ión de poca movilidad en el suelo en comparación con el nitrato.

Estudios enzimológicos han puesto de manifiesto que la asimilación de amonio por micorrizas es preferencialmente vía glutamina sintetasa/glutamato sintasa, aunque también se ha encontrado actividad glutamato deshidrogenasa (Smith, y Smith, 1990).

Otros nutrientes de baja movilidad en el suelo como Zn, Cu, S, K, y Fe se han encontrado en concentraciones más altas

en plantas micorrizadas respecto a no micorrizadas, y este efecto parece independiente al producido por una mejor nutrición fosforada (Cooper, 1984).

Se ha sugerido que las micorrizas poseen la capacidad de amortiguar los efectos de alta concentración de los iones pesados en el suelo y proteger así a la planta del efecto nocivo de los mismos (Koomen, *et al.*, 1990).

La adquisición de Ca^{++} asociado a gránulos de polifosfato, posiblemente cumpla un doble papel, primero compensar la fuerte carga aniónica de los gránulos de poli-P. Segundo, participar en la transferencia de P, por un lado estimulando las fosfatasas alcalinas (Gianinazzi-Pearson, y Gianinazzi, 1978) y por otro participando en el mantenimiento de la integridad de las membranas plasmáticas asociadas a la zona de transferencia de nutrientes.

También se ha sugerido que las micorrizas poseen mayor capacidad de captar aniones, tales como Br^- y Cl^- , necesarios en el mantenimiento del pH interno de la planta, la regulación del cual se hace de forma distinta en plantas micorrizadas (Buwalda, *et al.*, 1983).

Alteración de las relaciones hídricas y resistencia a la salinidad.

Las micorrizas vesículo-arbusculares alteran las relaciones hídricas de las plantas, confiriendo a estas una mayor resistencia al estrés hídrico y a la salinidad. Esta resistencia puede deberse, bien a una captación de agua por las

nifas o a un efecto indirecto mediado por la mejor nutrición del vegetal (Cooper, 1984). También se especula con la posibilidad de una alteración fisiológica inducida en el vegetal que le confiera una resistencia a la sequia y a los efectos nocivos de la salinidad.

Efectos fisiológicos no nutricionales.

El balance hormonal en plantas micorrizadas se altera respecto a plantas no micorrizadas, tanto en cuanto a cantidad como distribución en los tejidos vegetales. La auxina posiblemente influya en la formación de arbusculos (Gunze, y Hemessy, 1980), al igual que las citoquininas, cuya actividad en hojas y raíz se incrementa en plantas micorrizadas (Allen, *et al.*, 1980).

La alteración de los niveles y distribución de fitohormonas en plantas micorrizadas puede tener una gran importancia en los procesos de compatibilidad estructural entre simbioses, así como, en el crecimiento y desarrollo de la planta como respuesta a la colonización fúngica.

Otros aspectos fisiológicos, mediados en parte por la mejor nutrición, causados por la micorrización en la planta, son la protección frente al ataque de microorganismos patógenos y un mayor beneficio en la interacción con microorganismos beneficiosos del suelo (García-Garrido, 1987).

Susceptibilidad de las plantas a la colonización VA.

La susceptibilidad de las plantas a la micorrización VA o dicho de otro modo, la capacidad de una planta para ser colonizada por un hongo VA en mayor o menor grado va a depender de los aspectos siguientes:

-Que haya un reconocimiento entre simbios. Esto implica una serie de interacciones entre planta y hongo.

- Que exista un nivel de compatibilidad de los genomas de ambos simbios.

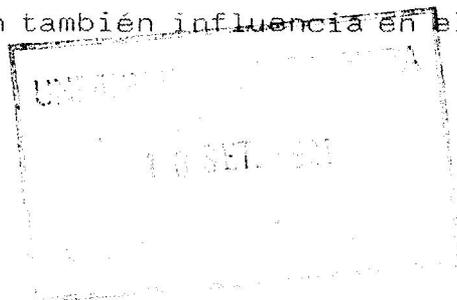
-Puede intervenir un cierto grado de especificidad.

La especificidad en sentido estricto no existe en la asociación VA, tanto desde el punto de vista del hongo como de la planta. Un mismo sistema radical puede ser colonizado simultáneamente por varias especies fúngicas y alternativamente, un mismo hongo puede colonizar simultáneamente raíces de varias especies vegetales (Harley, y Smith, 1983).

Hay especies vegetales que no son susceptibles de micorrizarse (Harley, y Harley, 1987; Newman, y Roddall, 1987) y dentro de las susceptibles, distintas especies, e incluso distintas variedades de una misma especie, pueden mostrar un grado diferente de susceptibilidad (Azcón, y Ocampo, 1981).

En un mismo sistema radical también hay variación en cuanto a susceptibilidad, pues hay raíces del sistema que se colonizan y otras no (Harley, y Smith, 1983).

Factores como el poder colonizador del hongo y la dependencia de la planta de la micorrización van a incidir en la susceptibilidad de la planta (Anderson, 1988), sin olvidar que las condiciones ambientales tienen también influencia en el



desarrollo de la simbiosis micorriza VA.

El nivel de colonización VA que puede soportar una planta hospedadora viene definido por su genotipo y por el del hongo colonizador, pues distintas especies fúngicas difieren en su grado de colonización sobre un mismo hospedador (Lackie, *et al.*, 1987). De igual modo, la compatibilidad en la asociación micorrizas VA no es resultado de un simple proceso de reconocimiento, ni va a depender de la acción de un solo gen, sino que va a depender de una serie de interrelaciones complejas entre simbiosiontes. La diversidad de tipo y efectividad de las micorrizas VA apoyan esta idea (Anderson, 1988); al igual que el hecho del dinamismo de la asociación y su complejidad.

Reconocimiento y compatibilidad en el exterior de la raíz.

A nivel de la rizosfera pueden tener lugar procesos encaminados a promover el contacto hongo-planta y facilitar así la formación de la simbiosis. En esta zona del suelo el desarrollo de microorganismos, cuya acción influye directa o indirectamente sobre la planta, está potenciado por la propia raíz. Algunos de estos microorganismos ejercen una acción activadora de la germinación de esporas de hongos VA (Azcón-Aguilar, *et al.*, 1986a), y afectan positivamente el desarrollo del micelio (Vidal Domínguez, M. R. 1991).

No existen indicaciones claras de que las raíces de la planta influyan en la germinación y desarrollo de micelio de hongos VA mediante mensajeros químicos. Estos mensajeros pueden

ser exudados solubles ó volátiles, y ejercerían una acción de proliferación y ramificación de los tubos germinales (exudados solubles) (Phillips, y Tsau, 1990) y una atracción de los mismos hacia la raíz (exudados volátiles) (Koske, 1982). A continuación de la atracción de los tubos germinales se produce un incremento rápido de la ramificación de las raíces de la planta en respuesta a un simple contacto, sugiriendo que la respuesta esta mediada por un mensajero asociado a la superficie del tubo germinal. La estimulación de la producción de raíces originaria nuevos sitios potenciales de colonización (Glenn, *et al.*, 1988; Gemma, y Koske, 1988). Queda todavía mucho por aclarar sobre la naturaleza y papel que juegan los exudados radicales en los procesos de colonización de la raíz por hongos VA. Uno de los compuestos importantes en los fenómenos de reconocimiento en plantas son los fenoles, de los cuales, sin embargo, no hay estudios de su participación en los procesos de micorrización a nivel de la rizosfera.

A nivel de rizoplana el hongo puede formar un apresorio sobre la raíz y penetrarla, o bien puede necesitar de un crecimiento en la superficie de la misma antes de penetrar. No se ha descrito adhesión o unión estrecha entre la hifa y la pared del hospedador (Gianinazzi-Pearson, 1984). Sin embargo, cuando se establece contacto entre células, la penetración de la raíz va precedida por la formación de un haustorio, más o menos definido, indicando que tiene que haber un reconocimiento celular en esta etapa inicial de formación de la micorriza (Ronfante-Fasolo, 1984). De otro lado, este contacto inicial origina un crecimiento acelerado del micelio del hongo (Glenn,

et al., 1988; Becard, y Piché, 1989). Lo que apoya la idea del intercambio de señales de reconocimiento en estas primeras etapas.

La mayor parte de las penetraciones de la raíz tienen lugar a pocos mm del extremo apical, pero una ramificación de la hifa de penetración puede colonizar una zona de la raíz lejana a la apical (Glenn, *et al.*, 1985). Esto sugiere que la penetración del extremo apical posibilita la penetración de una zona de la raíz que antes no respondió a la colonización.

Definir las zonas de iniciación de colonización es imprescindible en el estudio de la susceptibilidad, ya que factores como producción de exudados y organización de pared celular varían a lo largo de la raíz, y son factores implicados en dicha susceptibilidad.

Un componente de la superficie de la pared celular vegetal, las lectinas, participan activamente en los procesos de reconocimiento planta-microorganismos (Anderson, 1988), sin embargo no hay muchos estudios que apunten a la participación de estos compuestos en el reconocimiento de hongos VA. Tan solo se ha observado que las aglutinas (lectina específica para N-acetilglucosamina) se une a la pared celular del hongo VA *Glomus fasciculatum* (Bonfante-Fasolo, 1982).

Desarrollo del hongo en la raíz.

Tras la penetración del hongo en la raíz hospedadora, por los mecanismos ya mencionados, se desarrolla en ella de forma intercelular e intracelular, con la formación de las

estructuras e interfases también descritas anteriormente.

No está aclarado el mecanismo de penetración intracelular de las hifas fúngicas en las células hospedadoras. Se han establecido diferentes hipótesis al respecto (Harley, 1986):

- Penetración mecánica de las células hospedadoras.
- La penetración solo ocurre en células con pared celular en formación y las hifas previenen la polimerización de los precursores de pared.
- En la penetración de células hospedadoras participan enzimas líticos capaces de desorganizar y permeabilizar la pared celular hospedadora.

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

Con respecto a la segunda hipótesis, hay que considerar el hecho de que la pared del ápice de la hifa en desarrollo está en contacto con la matriz interfacial, la cual se compone de proteínas y polisacáridos provenientes del hospedador, y similares a los de la pared celular primaria, por lo que se piensa que son paredes en desarrollo (Bonfante-Fasolo, 1984), y la hifa previene que estos compuestos polimericen y lleguen a formar la pared (Harley, 1986). Sin embargo, una vez que la hifa ha penetrado la raíz, tiene un desarrollo longitudinal en dirección tanto acropétala como basipétala, independientemente del estadio en que se encuentren las paredes celulares de la raíz. Por otro lado, tanto circunvoluciones como arbusculos

tienen un periodo de vida corto y después de su desaparición la misma célula hospedadora puede ser invadida de nuevo y desarrollar otra circunvolución o arbúsculo (Bonfante-Fasolo, 1984).

La participación de enzimas hidrolíticos de pared en los procesos de penetración del hongo en las células hospedadoras es un tema difícil de resolver, debido a las características simbióticas de la asociación micorrízica. La compatibilidad de la simbiosis supone un gran control de la producción de estos enzimas, que deben ser segregados a bajo nivel y afectar de forma muy localizada la pared celular, con el fin de no dañar de forma grave dicha pared, lo que originaría una respuesta de rechazo de la planta. Se ha comprobado que estructuras fúngicas poseen actividad pectinásica (García Romera, *et al.*, 1991), y mediante pruebas indirectas se ha observado que las pectinasas pueden estar involucradas en los mecanismos de penetración de hongos VA (García Romera, *et al.*, 1990a). Existen otras evidencias indirectas de la participación de enzimas hidrolíticos en los procesos de penetración, ya que observaciones al microscopio electrónico han puesto de manifiesto que la penetración parece llevar consigo alguna degradación del material del hospedador que sugiere la existencia de una destrucción enzimática de la pared celular. La existencia de restos de lámina media en las zonas donde se desarrollan las hifas intercelulares sugieren la existencia de una acción enzimática sobre la pared celular (Kinden, y Brown, 1975; Bonfante-Fasolo, 1984).

Control del desarrollo de la colonización VA.

Durante el desarrollo del hongo en la raíz del hospedador tienen lugar una serie de modificaciones anatómico-fisiológicas que afectan a componentes celulares de ambos simbios y cuya consecuencia es la creación de una asociación compatible a nivel celular y funcional. Las paredes celulares, tanto fúngica como vegetal, participan de modo activo en el desarrollo de estructuras compatibles. La pared fúngica, relativamente gruesa y quitinosa, se va haciendo más delgada y desorganizada, llegando incluso a alcanzar un alto grado de simplificación en las ramas más finas del arbusculo, que es donde se centra fundamentalmente la fisiología de la simbiosis. De igual forma la pared vegetal se adapta a la situación simbiótica, principalmente en la zona de contacto intracelular donde desaparece como tal y aparece una matriz interfacial fibrosa cuyos componentes son sintetizados por el hospedador como respuesta a la colonización. Estos componentes varían en su disposición a lo largo de las ramas arbusculares y se sugiere que pueden servir como fuente carbonada suplementaria para el hongo VA (Schwab, *et al.*, 1991).

De otro lado se han apreciado modificaciones inducidas en el hospedador a nivel de alteraciones en el ritmo de mitosis y por tanto del ciclo celular (Fusconi, *et al.*, 1990) y de organización de orgánulos celulares: plastidios, núcleo y organización de cromatina, vacuolas y membranas (Fusconi, *et al.*, 1990; Bonfante-Fasolo, 1987). Una modificación importante es el desarrollo de membrana plasmática alrededor de las ramas

arbusculares con incremento en actividades enzimáticas, principalmente fosfatasa y ATPasa, importantes para explicar el intercambio de nutrientes a este nivel.

Todas estas modificaciones son el resultado de un permanente diálogo entre los genomas de los dos simbioses y consecuentemente origina en su integración morfológica y compatibilidad funcional, requisitos imprescindibles para el éxito de la asociación.

Trabajos recientes han puesto de manifiesto cambios en la expresión proteica durante el establecimiento de la simbiosis ectomicorrízica (Hilbert, y Martín 1988).

En la simbiosis MVA también se han puesto de manifiesto proteínas asociadas al estado simbiótico (Dumas, *et al.*, 1989). Incluso, se han encontrado polipéptidos específicos de la simbiosis MVA que tienen reacción inmunológica cruzada con nodulinas. (Wyss, *et al.*, 1990). Por otro lado, plantas mutantes de forma espontánea o química ofrecen resistencia genética a formar micorrizas VA. La expresión del carácter myc^- parece estar asociado con el carácter nod^- y al menos 3 genes intervienen en la colonización VA (Duc, *et al.*, 1989).

Todas estas investigaciones no son más que el primer paso del estudio de las interacciones moleculares de identificación de genes responsables del diálogo entre simbioses en micorrizas. Sin embargo la dificultad es grande, pues no es posible disponer del hongo en cultivo puro y menos aún de disponer de su material genético en condiciones óptimas de manipulación.

Desde el punto de vista del control de la colonización por

parte de la planta, un tema estudiado en los últimos años ha sido la posibilidad de que el hongo VA provoque en la planta una respuesta de defensa, al igual que la provovan otros microorganismos o situaciones de estrés. Los mecanismos de defensa de la planta son generalmente de tres tipos: estructurales, químicos y enzimáticos. Desde el punto de vista estructural no se han encontrado indicios de que sustancias, como callosa y suberina, importantes en el control de la infección fúngica en general, participen en el control del hongo VA. Tampoco existen evidencias de que la extensina, proteína estructural de la pared celular vegetal, participe en el control de la colonización fúngica.

Se han estudiado algunas defensas químicas de la planta, tales como la producción de fenoles y fitoalexinas. Sin embargo, no se ha encontrado diferencias en el tipo y cantidad de fenoles en plantas micorrizadas respecto a no micorrizadas, y tampoco diferencias en actividad fenil-amonio-liasa (Codignola, *et al.*, 1989. Nunca se ha encontrado fenoles en la matriz interfacial.

Por otro lado, se ha puesto de manifiesto la producción de una fitoalexina (gliceolina) en la asociación VA, aunque a niveles muy bajos y en estadíos avanzados de la colonización de la raíz (Morandi *et al.*, 1984). Sin embargo, no se ha detectado la presencia de esta fitoalexina en los estadíos iniciales y jóvenes de la colonización de la raíz por hongos VA (Wyss, *et al.*, 1991).

Respecto a los mecanismos enzimáticos de defensa de la planta, recientemente se ha encontrado que proteínas asociadas

al estado de simbiosis VA poseen reacción cruzada con proteínas relacionadas con la patogénesis (Dumas, *et al.*, 1990).

El estudio de la alteración en la actividad de peroxidasas, marcador bioquímico de interacciones planta-patógenos, ha demostrado que hay un incremento de actividad en la planta micorrizada, en los primeros estadios de colonización, cuando el hongo es principalmente intercelular. Cuando el hongo penetra las células hospedadoras y se establece totalmente la colonización, la actividad peroxidasa es similar a la de plantas no colonizadas (Spanu, y Bonfante-fasolo, 1988).

La actividad quitinasa parece tener un comportamiento similar, y se localiza en los espacios intercelulares, en las vacuolas y alrededor del hongo, pero no en la pared celular fúngica.

Otro mecanismo de control del desarrollo fúngico por parte de la planta es la regulación del flujo de carbono hacia el hongo. La formación de micorrizas requiere de un cierto nivel de nutrientes en las células corticales. La exudación de nutrientes, incrementada cuando se reduce el fosfato en la planta, favorece la micorrización (Graham, *et al.*, 1981). La micorrización, con la consecuente mejor nutrición fosforada de la planta, limitaría la permeabilidad de las membranas y disminuiría el flujo de carbono hacia el hongo. Sin embargo se supone que los hongos VA pueden favorecer de forma más directa los intercambios de nutrientes a nivel del plasmalema (Anderson, 1988). La energía necesaria para estos procesos de intercambio la puede proporcionar la ATPasa de membrana de la

planta, cuya participación en el intercambio de nutrientes esta demostrada (Marx, *et al.*, 1982). La auxinas y otras hormonas producidas por el hongo pueden afectar estos procesos de intercambio, bien de forma directa o mediada por la alteración del pH. La alteración del pH en las interfases de contacto hongo-planta podria ser un mecanismo regulador del metabolismo de la simbiosis (Anderson, 1988).

Pared Celular Primaria.

La presencia de una pared en las células vegetales es un carácter que las diferencia de las células animales. Existe una estrecha relación entre estructura de la pared y función que desarrolla la célula. Tradicionalmente se considera la existencia de dos tipos de pared celular vegetal: Pared primaria, propia de células jóvenes en crecimiento y pared celular secundaria, que se forma en la superficie interna de la pared primaria, mucho más gruesa, y con propiedades y composición distintas a la primaria.

La pared celular primaria está compuesta aproximadamente por un 90% de polisacáridos y un 10% de proteínas, sobre todo glucoproteínas; además aparecen sustancias como metil-ésteres y ésteres, acetyl y feroyl ésteres, y minerales.

La pared primaria de todas las plantas superiores contiene los mismos polisacáridos generales si bien a veces en diferentes proporciones. Los polisacáridos constituyentes de la pared vegetal son moléculas complejas, cuya estructura y composición está bien definida, sin embargo queda mucho por averiguar sobre las interconexiones e interacciones entre ellos, y es necesario conocer esto para entender como se lleva a cabo el crecimiento de la célula vegetal.

La pared celular, no solo controla el crecimiento de la célula, sino también su forma y tamaño y ha de ser lo suficientemente rígida para proporcionar la forma característica de la célula vegetal. La capacidad de extenderse de la pared celular depende mucho de las propiedades mecánicas

de las mismas y estas propiedades son consecuencia de la distribución molecular de los polímeros que la constituyen, así como, de los enlaces existentes entre ellos y el grado de enrollamiento que presentan. Sin embargo, las diferencias que existen entre la extensión celular y las propiedades mecánicas de la pared nos indican que esa extensión no es únicamente una deformación física, sino que implica una modificación bioquímica adicional. Las auxinas, en la mayoría de los tejidos, giberelinas y citoquininas en ciertos tejidos, son sustancias hormonales implicadas en la elongación celular, si bien, no se conocen de forma clara sus mecanismos de actuación. Se supone que alrededor de varios cientos de genes están implicados en los procesos de crecimiento de la pared celular primaria.

Por otro lado, la pared celular vegetal tiene funciones relacionadas con la fisiología de la célula, ya que actúa como barrera física y bioquímica frente al ataque de microorganismos patógenos. Se sabe que fragmentos polisacarídicos de la pared pueden tener acción reguladora a nivel molecular.

Composición de la de la pared celular primaria.

Celulosa.

Constituye del 20% al 30% del peso seco de la pared primaria. Químicamente, la celulosa, es una cadena lineal de moléculas de glucosa unidas por enlaces β 1-4 (β -4 D glucano). Las cadenas de β -4 D glucano se agregan formando microfibrillas, que es el estado en que se encuentran en la

pared celular. La mayor variación estructural en la celulosa de diferentes tejidos es su grado de polimerización. En la pared primaria la celulosa tiene un grado de polimerización menor que en la pared secundaria (McNeil, *et al.*, 1984). Las microfibrillas en la pared primaria son más delgadas que en la pared secundaria. Se ha observado una correlación entre la orientación de nuevas microfibrillas que se forman en la pared celular y el eje principal de crecimiento de la célula (Preston, 1974), siendo este perpendicular a la orientación de la microfibrilla. Es posible que la orientación de las nuevas microfibrillas depositadas controle la morfología de la célula en crecimiento y, por tanto la morfología de la planta.

En paredes celulares de monocotiledonas y algunas dicotiledonas (McNeil, *et al.*, 1984) se han encontrado β -glucanos, formados principalmente por agregados de residuos β -4 y β -4 D-glucopiranosil. En estas cadenas lineares suelen alternar grupos de 3 ó 4 restos de glucosa unidos por enlace β -4 separados por un enlace β -3.

Hemicelulosas.

Son compuestos mal definidos que aparecen en la paredes celulares en forma amorfa o paracristalina. Todas las hemicelulosas, aunque pueden estar formadas por azúcares distintos, poseen una columna vertebral formada por una cadena plana de azúcares, unidos casi siempre por enlaces β 1-4, de la que pueden salir ramificaciones muy cortas. Además todas poseen alguna característica estructural que no les permite formar agregados como las cadenas de celulosa. Los xilanos,

arabinoxilanos, galactomananos, glucoarabinoxilanos, glucómananos y xiloglucanos son los tipos más frecuentes de hemicelulosas.

Xiloglucanos. Están constituidos por un armazón de β -4 D-glucano al que se unen restos D-xilosa por enlace α al O_6 de las moléculas de glucosa. Algunos de estos restos de D-xilosa se extienden por la adición de D-galactosa o L-fucosa- α -2 α -D galactosa mediante enlace β .

La heterogeneidad de los xiloglucanos es resultado de diferencias en su peso molecular, distribución de los restos L-fucosil y fucosil-galactosil y los niveles de grupos xilosil añadidos.

Estos compuestos varían en cantidad y tipo entre plantas dicotiledoneas y monocotiledoneas, pero la relación xiloglucano-celulosa se mantiene constante en ambos tipos de plantas.

Su función es estructural, estando anclados a la celulosa mediante enlaces de hidrógeno. La unión de xiloglucanos a las fibras de celulosa probablemente limita la asociación de estas fibras entre sí y permite la existencia de sitios de unión covalente y entrecruzamiento de las fibras de celulosa.

Los xiloglucanos, además de su función estructural, tienen probablemente una función reguladora en el proceso de elongación de la pared celular (Labavitch, 1981).

Xilanos. Son moléculas formadas por un esqueleto de β -4 xilosil residuos altamente sustituidos en las posiciones O_2 y O_3 de la xilosa. Estas moléculas tienen la capacidad de formar asociaciones con la celulosa mediante puentes de hidrógeno.

Se conoce que los xilanos están ferulados, aparentemente en los residuos arabinosil (Smith, *et al.*, 1983) y se supone la formación de grupos diferúlicos entre moléculas de xilano, debido a la acción de la peroxidasa con lo cual se produce un entrecruzamiento lateral de estas moléculas con implicaciones físicas en las propiedades de la pared celular y en su capacidad de crecimiento y resistencia a la digestión enzimática.

Pectinas.

Son polímeros constituidos por residuos de ácido galacturónico, unidos entre sí por enlaces de tipo α 1-4. En estas cadenas de ácido poligalacturónico se intercalan diferentes restos, lo que origina la heterogeneidad dentro del grupo de la pectinas. Las principales pectinas constituyentes de la pared celular primaria son las siguientes:

Homogalacturonanos. Son polímeros constituidos prioritariamente por residuos de α -4 D ácido galacturónico. Estas moléculas forman estructuras rígidas en presencia de calcio, de ahí que se supone que juegan un papel importante en la estructura de la pared celular (McNeil, *et al.*, 1984), aunque también tienen una acción reguladora en la acumulación de fitoalexinas en plantas como respuesta a agentes inductores.

Rhamnogalacturonanos I. Son compuestos formados por largas cadenas de ácido D-galacturónico unidos por enlace α -1-4, en las que se intercalan restos de D-galactosa, L-ramnosa, L-arabionosa y L-fucosa. Son polímeros que están presentes en la mayoría de las plantas superiores, aunque, la naturaleza,

cantidad y constituyentes en la cadena es variable.

Rhamnogalacturonanos II. Están constituidos por residuos de ácido galacturónico unidos por enlaces α -1-4. En la cadena de poligalacturónico se intercalan L-ramnosa, L-arabinosa, D-galactosa y residuos laterales poco comunes, como son 2-O metil fucosa y 3-O-carboxi-5-deoxi-L-xilosa.

Arabinanos, galactanos y arabinogalactanos. Son moléculas formadas esencialmente por cadenas β -4 galactosa o 5- α -L-arabinofuranosa, sustituidas en mayor o menor grado. No se conoce muy bien como se engarzan estos polímeros en la pared celular primaria.

Residuos Feruloil Arabinosil y Galactosil. En plantas dicotiledones 1 de cada 250 residuos se encuentran formado grupos ferulólicos y además estos grupos están colocados en sitios específicos de los polisacáridos de la pared (Fry, 1983). "In vivo" se encuentran en forma oxidada formando complejos diferuloicos, lo cual contribuye a la formación de enlaces cruzados entre las moléculas polisacáridicas.(Fry, 1984).

Minerales.

Ciertas sustancias minerales, como la sílice y el carbonato cálcico, pueden formar parte de la pared celular. También, en algunas paredes, se detecta la presencia de tanino cuya función puede ser la de conferir resistencia contra ataques de virus y hongos, y como agente disuasorio de insectos comedores de hojas.

Lípidos.

Suelen estar formados por ácidos grasos de cadena larga, y su papel principal parece ser el de proteger la superficie de la planta de ataques enzimáticos.

Lignina.

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

Proteínas.

La pared celular vegetal primaria contiene proteínas, que en su mayoría están glucosiladas. La proteína mayoritaria y asociada covalentemente con la pared es la extensina. Existen otras proteínas presentes en la pared, fácilmente extraíbles, e incluso excretadas al medio en cultivos de células vegetales en suspensión (Finche, *et al.*, 1983).

La extensina es una glucoproteína rica en hidroxiprolina y constituye alrededor del 10% del peso seco de la pared primaria. Su característica principal es la insolubilidad, probablemente debido a su alto grado de entrecruzamiento. Este se realiza por unión covalente, catalizada por la peroxidasa, de dos grupos tirosil de diferentes moléculas de extensina, formando un puente isoditrosil. También puede ocurrir la formación de grupos isoditrosil entre polipéptidos de la misma molécula (Fry, 1983).

Lampert y Epstein (1983) propusieron un modelo que explica la conexión entre celulosa, hemicelulosa y extensina. Según

este modelo, las moléculas de extensina se alinean de forma anticlinal en la pared conectadas entre sí por puentes de isoditrosina, definiendo una red porosa a través de la cual se disponen periclinalmente las microfibrillas de celulosa, rodeadas por una cubierta de hemicelulosa unida por puentes de hidrógeno.

Entre las funciones biológicas de la extensina cabe destacar su papel en el control de la expansión celular y la resistencia de la célula a la invasión por patógenos. Estas funciones son consecuencia de su alto grado de entrecruzamiento en la pared celular, su resistencia a la acción de proteasas, así como, su capacidad de aglutinación de bacterias, causado por su carácter policatiónico (Leach, *et al.*, 1982).

Otro tipo de proteínas abundantes en la pared celular son las arabinogalactano-proteínas. Estas son glucoproteínas ricas en hidroxiprolina, serina, galactosa y arabinosa. Difieren de la extensina tanto en composición y estructura, y su papel biológico no se conoce.

Dentro de las proteínas de la pared merecen destacarse, por su importancia, el grupo de los enzimas. A continuación se hace referencia a las principales actividades enzimáticas que operan en la pared celular.

Malato deshidrogenasa (E.C. 1.1.1.37). El papel de este enzima en la pared celular no está claro, si bien se ha propuesto su participación en la obtención de poder reductor necesario para el proceso de lignificación. (Groos, 1977)

Peroxidasas (E.C. 1.11.1.7). Se ha demostrado la presencia de numerosos isoenzimas de peroxidasas en la pared celular. Su

papel. en la pared celular, esta relacionado con los procesos oxidativos que originan acoplamientos entre polímeros (formación de diferulato e isoditirosina). También se ha demostrado que pueden oxidar e inactivar al ácido indolacético (Cassab, y Varner, 1988). Estas acciones pueden tener importancia en el control del crecimiento y desarrollo de la pared, y más aún si tenemos en cuenta que la síntesis y secreción de peroxidasas está modulada por factores ambientales como la luz, temperatura, salinidad etc., y por reguladores metabólicos del crecimiento celular (Gaspar, *et al.*, 1981).

Fosfatasas (E.C. 3.1.3.36) La función de las fosfatasas en la pared celular no es clara ya que no se han encontrado fosfatos orgánicos extracelulares en plantas. Sin embargo, es significativo el hecho de que estados carenciales de fosfato en los tejidos produzcan un incremento de los niveles de fosfatasas en la pared celular (McNeil, *et al.*, 1984).

Glucohidrolasas y glucotransferasas. Se han encontrado tanto exoglucosidasas como endoglucosidasas en las paredes vegetales. Su función es variada y abarca tanto aspectos nutricionales (obtención de monosacáridos, captadas por la célula), como defensivos, hidrolizando moléculas inductoras de fitoalexinas de las paredes fúngicas. Por otro lado, estos enzimas también están implicados en el recambio de polímeros de la pared, hecho importante y necesario para el crecimiento celular.

Proteínas inhibidoras. Muchas especies vegetales poseen en su pared celular proteínas capaces de inhibir la acción de enzimas hidrolíticos segregadas por patógenos y enzimas que

degradan las paredes de hongos patógenos. (McNeil, *et al.*, 1984).

Funciones biológicas de fragmentos de pared celular.

En los últimos años se ha puesto de manifiesto la capacidad de regulación que poseen fragmentos aislados de la pared celular sobre los tejidos vegetales, sin embargo, no se conoce todavía como estos fragmentos pueden controlar las funciones biológicas de las plantas. Las principales actividades reguladoras de los fragmentos de pared celular vegetal son las siguientes:

Fragmentos inductores de fitoalexinas. Los fragmentos de homogalacturonano inducen en los tejidos vegetales la síntesis de fitoalexinas. Esta síntesis está considerada como un mecanismo general de defensa de las plantas. (Darwill, y Albersheim, 1984).

Las moléculas capaces de inducir la síntesis de fitoalexinas se han denominado "elicitors", (inductores). Estas moléculas inducen un cambio en el metabolismo de la planta receptora, produciendo una síntesis de mRNAs y enzimas responsables de la producción de fitoalexinas (McNeil *et al.*, 1984).

Se han encontrado fragmentos oligo- β -glucósidos de paredes de hongos que actúan como inductores. También se conocen inductores endógenos obtenidos a partir de paredes celulares vegetales. Estos inductores endógenos son fragmentos

polisacarídicos ricos en restos de ácido galacturónico, obtenidos "in vitro" tanto por hidrólisis ácida de la pared celular vegetal, como por tratamiento enzimático de la misma, utilizando enzimas, de diferentes patógenos, degradativos de oligogalacturonanos. Este hecho sugiere que existe un mecanismo de defensa general activado por inductores endógenos producidos por la acción enzimática, sobre la pared celular vegetal, de enzimas patógenos invasores.

Fragmentos inductores de inhibidor de proteasas. Daños mecánicos causados en la pared celular, inducían la producción de proteínas inhibidoras de proteasas de insectos y microbios. La señal que desencadena la síntesis de proteínas inhibidoras se ha denominado factor inductor de inhibidor de proteasas (FIIP). Se ha observado que fragmentos de polisacáridos pépticos de la pared celular poseen "in vivo" la capacidad de inducir la inhibición de proteasas. (Ryan, 1984).

Fragmentos que matan células vegetales. Se han observado respuestas de tipo hipersensitivo, que ocasionan la muerte de la célula vegetal, como mecanismos de defensa de las plantas frente al ataque de virus y microbios. Este tipo de respuesta tiene por objeto retardar el crecimiento del microorganismo invasor mientras se ponen en marcha otros mecanismos de defensa. Pequeños fragmentos, obtenidos por hidrólisis parcial de paredes celulares, parecen ser los mediadores en esta respuesta hipersensitiva, siendo los agentes tóxicos que causan la muerte celular (Yamazaki, *et al* 1983). "In vivo" estos

fragmentos son producto de la acción de enzimas pecticos sobre la pared de las células hipersensitivas.

Fragmentos inhibidores del crecimiento celular inducidos por el ácido indolacético. Un fragmento de molécula obtenido por tratamiento de xiloglucanos con β -1-4 glucanasa inhibe el crecimiento inducido por auxinas (York, *et al.*, 1984). La actividad inhibidora es debida a un nonasacárido, cuya máxima actividad corresponde con una concentración 1% de la de la concentración molar del ácido Indolacético.

Fragmentos de pared inhibidores de la floración. Un fragmento obtenido por hidrólisis ácida parcial de pared celular inhibe la floración en *Lemma gibba* y origina un crecimiento vegetativo del tejido, lo cual sugiere que su acción no es tóxica y que actúa cambiando el destino del desarrollo de las células de floración a crecimiento vegetativo. (McNeil, 1984).

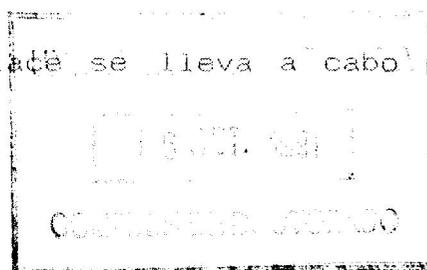
Estructura de la pared celular primaria.

Las propiedades de extensibilidad, digestibilidad y capacidad de adherencia que posee la pared primaria de células vegetales vienen determinadas por su composición molecular y por las interconexiones entre los polímeros, que en definitiva definen la estructura de la pared.

Tipos de enlaces en la pared celular.

Enlaces covalentes:

Glucosídicos. Este tipo de enlace se lleva a cabo por



glucosidasas de la pared celular o segregadas por el aparato de Golgi. Como ejemplo podemos citar la unión galactosa-Ramnosa entre Arabinogalactanos y Ramnogalacturonano I.

Ester. Están originados por transesterificación en la pared celular. Un enlace característico es la unión pectina-uronil-glucosa-celulosa, o feruloil-arabinosa-pectina.

Fenólicos. La unión entre fenoles está catalizada por peroxidasas existentes en la pared celular. Son característicos las uniones tirosina-tirosina entre moléculas y polipéptidos de la extensina y la unión diferuloil entre pectinas.

Puentes disulfuro. Se forman por oxidación de la cisteína en las moléculas proteicas de la pared celular.

Enlaces no covalentes:

Puentes de hidrógeno. Las uniones celulosa-hemicelulosa se realizan mediante este tipo de enlace.

Enlace iónicos. Son característicos los formados entre extensina y pectina.

Puentes de calcio. Los iones Ca^{++} actúan en la unión pectina-pectina

Interacciones hidrofóbicas.

Fuerzas de Van der Waals.

Uniones Lectina-polisacárido.

Modelo estructural de la pared celular vegetal.

Lampart y Epstein en 1983 proponen un modelo de estructuración de la pared celular vegetal, según el cual la extensina define una red porosa a través de la cual se disponen las microfibrillas de celulosa, rodeadas por hemicelulosa.

Albersheim, en 1976 propuso un modelo estructural, todavía válido y en concordancia con la teoría de Lamport y los tipos de enlaces interpoliméricos mencionados, en el cual las fibrillas de celulosa, formadas por agregados de cadenas de celulosa unidas entre sí por puentes de hidrógeno, están cubiertas por una capa de xiloglucano enlazada por puentes de hidrógeno. Moléculas de xilano y pectinas también se unen a la fibrilla de celulosa, mediante puentes de hidrógeno y enlaces éster respectivamente. Los xiloglucanos mediante su extremo reductor forman enlaces glucosídicos con moléculas de arabinagalactanos, los cuales presentan una disposición radial respecto al de las fibrillas de celulosa. Los Arabinogalactanos y ramnogalacturonanos, interconectados por uniones glucosídicas galactosa-ramnosa, los homogalacturonanos unidos entre sí por puentes de Ca^{2+} y las moléculas de arabinoxilano-arabinoxilano, y pectina-pectina unidas por grupos diferuloil completan las uniones interpolisacarídicas. Las interconexiones proteína-polisacárido se realizan a varios niveles y principalmente por uniones iónicas entre pectinas ácidas y extensina de carácter básico. Quizás esta unión iónica juegue un papel importante en la orientación espacial de la pectina en la pared.

En el control de la formación de enlaces interpoliméricos, tienen especial importancia dos enzimas, las peroxidases, que catalizan la formación de isoditirosina y grupos diferuloil y las pectinesterasas, las cuales producen dominios ácidos en las moléculas de pectina capaces de formar enlaces iónicos con Ca^{2+} . Es interesante señalar que ambas enzimas contienen o requieren

Ca^{2+} para su actuación y se inhiben a pHs bajos (Cooper, y Varner, 1984), lo cual puede ser un mecanismo de regulación del papel de estas enzimas en la formación de enlaces interpoliméricos y por consiguiente en la capacidad de extensión de la pared. Se sabe que un alto nivel de entrecruzamiento entre polímeros supone una disminución de la extensibilidad de la pared (Fry, 1980), mientras que bajos niveles de Ca^{2+} y la presencia de H^+ incrementan la capacidad de extensión de la misma (Baydon, y Brett 1984).

Origen y extensión de la pared.

La nueva pared celular se origina durante el proceso de citocinesis o división del citoplasma. El primer proceso de la génesis de la nueva pared es la formación del fragmoplasto en el plano ecuatorial del huso fibroso que se extiende entre los dos núcleos hijos. La primera manifestación de la pared celular es la llamada placa ecuatorial, que progresa a través del plano ecuatorial hasta alcanzar las paredes celulares laterales. Las vesículas formadas en la placa ecuatorial proceden del aparato de Golgi. Esta placa continúa creciendo por adición de estas vesículas. Esta región se caracteriza, también, por la presencia de fragmentos de retículo endoplasmático y muchos ribosomas. La fusión de membranas de las vesículas del aparato de Golgi origina el plasmalema de las células hijas. En esta fase, la placa celular consta de tres capas: la central, no celulósica y que persiste como división entre las paredes primarias de las dos células hijas y que se denomina lámina

media, y las dos capas conteniendo celulosa a cada lado de la lámina media y que son los comienzos de la pared celular primaria.

Extensión de la pared celular.

Se han propuesto varios modelos para intentar explicar la extensión de la pared. Todos consisten básicamente en dos componentes: modificación bioquímica de la pared y extensión viscoelástica de la misma, ablandada bioquímicamente y dirigida por el potencial de presión. Durante el proceso de crecimiento existe un balance entre los procesos metabólicos que producen relajación en la estructura de la pared y los procesos metabólicos y físicos que producen rigidez, es decir hay factores de aceleración y deceleración del proceso de extensión (Green, *et al.*, 1977).

Estudios sobre el control fisiológico de la pérdida de rigidez y extensión de la pared han puesto de manifiesto la existencia de una respuesta rápida de tejidos vegetales al tratamiento con fitohormonas, especialmente con auxinas. La respuesta de coleóptilos de avena al tratamiento con auxina es muy rápida, ya que después de un periodo de latencia de 10-15 minutos comienza un proceso de elongación celular acelerado, que continúa durante varias horas (Penny, y Penny, 1978). Heyn (1931) demostró que el primer efecto de las auxinas era el aflojamiento de la pared, lo cual permitía su extensión.

La observación de que se incrementa el contenido en RNA y síntesis de proteínas en los tejidos tratados con auxina, supone que se sintetizan "de novo" enzimas que relajan la pared

celular (Cleland, 1971).

Cleland y Hager (1971), propusieron de forma separada la teoría denominada del crecimiento inducido por pHs ácidos, según la cual, la acción de las auxinas estaría mediada por la estimulación de una bomba de protones de la membrana plasmática, posiblemente una H^+ -ATPasa, la cual acidifica el pH de la pared celular, por excreción de H^+ . Esta acidificación de la pared sería la causa de su aflojamiento.

Se han realizado numerosos trabajos encaminados a encontrar evidencias de la teoría propuesta, los cuales pueden resumirse en que agentes que estimulan la extrusión de protones también estimulan la elongación celular, y por otro lado, la bajada de pH, utilizando tampones ácidos, provoca la elongación celular.

El mecanismo por el cual el incremento en H^+ de la pared celular provoca su aflojamiento parece estar mediado por la activación a pHs ácidos, próximos a 5, de enzimas hidrolíticos de los polímeros que constituyen la pared, cuya acción selectiva sobre enlaces del interior de las cadenas poliméricas provoca la pérdida de rigidez de la pared y posibilita su extensión.

En definitiva, la extensibilidad de la pared celular está limitada por uniones covalentes entre polímeros y por uniones más débiles entre estos polímeros e iones, y ambos tipos de uniones deben romperse para favorecer la pérdida de rigidez de la pared.

Desde el punto de vista bioquímico, son varios los procesos necesarios y responsables de la extensión de la pared

celular. A continuación se describen estos procesos y sus implicaciones a nivel molecular en la pérdida de rigidez de la matriz polimérica de la pared celular.

Acción enzimática y recambio de polisacáridos en la pared.

Los enzimas implicados en el recambio de polisacáridos y en la extensión de la pared deben cumplir la condición de ser modulados por el pH y ser reversibles e inhibidos por Ca^{2+} (Cleland y Rayle, 1977). Una transglucosidasa, en concreto una endo-dextranasa (α -1-5 glucanasa), encontrada en coleoptilos de avena, poseía estas condiciones y su actividad se incrementaba en respuesta al tratamiento con auxina (Heyn, 1981). Las Glucosidasas, tales como β -galactosidasa y β -glucosidasa han sido identificadas en las paredes celulares de tejidos en crecimiento, sin embargo, no se conoce con certeza su función en extensión de la pared. Huber y Nevins (1982) solubilizaron una exo β -1-3 glucanasa y una endo- β -glucanasa con capacidad autolítica sobre la pared celular de coleoptilos de maíz, cuya capacidad hidrolítica se incrementaba en presencia de auxina.

El primer polímero que se solubiliza con un tratamiento ácido de la pared es el xiloglucano. Este proceso se afecta por la acción de la temperatura (Terry, *et al.*, 1981), lo que sugiere que se trata de un proceso enzimático. Enzimas capaces de degradar xiloglucanos de células vegetales en crecimiento, tales como celulasas, están presentes en paredes celulares.

Goldberg y Prot (1982) sugieren que el metabolismo de la pectina es importante en las etapas iniciales de la inducción del crecimiento con auxina y que el metabolismo de los glucanos es más importante en etapas posteriores.

Existe gran dificultad para estudiar la relación causa-efecto de los enzimas hidrolíticos de la pared respecto a la extensión de la misma, y los intentos de clarificar esta relación pasan por el uso de plantas mutantes de enzimas específicos.

Ruptura de enlaces no covalentes.

Puentes de hidrógeno. Las interacciones entre polímeros mediadas por puentes de hidrógeno son abundantes en la pared celular e importantes, especialmente, en la unión xiloglucano-celulosa. Sin embargo, la pérdida de rigidez de la pared provocada por acidificación no está mediada por la ruptura de este tipo de enlace (Valent, y Albersheim, 1974).

Interacciones iónicas. La pared celular tiene una alta capacidad para intercambiar cationes, debido, principalmente, a la presencia de ácidos urónicos, no esterificados, en las moléculas pécticas. El grado de rigidez de la pared corresponde con el efecto de los iones sobre la viscosidad y rigidez del pectato (Metraux, y Taix, 1977). El mecanismo por el cual interaccionan antagónicamente el efecto de la inducción ácida de la extensión de la pared, provocado por la auxina y rigidez de la misma causada por los iones Ca^{2+} no se conoce con exactitud, si bien parece existir un intercambio $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ inducido por la extrusión de protones (Cohen, y Nadler, 1976).

Tepfer y Taylor, (1979) basan la capacidad de cationes divalentes, como el Ca^{+2} , de antagonizar con el crecimiento y la extensión de la pared, inducido por la acidez, a la unión de estos cationes a la pectina, formando, de esta forma, geles de pectato. Para este proceso se requiere la presencia del enzima

pectin-metil-esterasa.

Lo que parece importante, en la regulación de los efectos del CA^{2+} en la rigidez de la pared, es la relación H^+/CA^{2+} que existe en el interior de la pared.

Extensina e interacciones entre fenoles.

El enzima peroxidasa cataliza la formación de isoditrosina en la molécula de extensina, y grupos diferuloil entre polímeros pécticos. Estas uniones dificultan la extensibilidad de la pared celular, por tanto, se especula con la idea de que la regulación de la actividad peroxidasa en la pared sea un mecanismo de control de la extensión de la pared. Fry (1983b) sugiere que la estimulación de la liberación de pectinas inducida por giberelinas, en un cultivo de células de espinaca, se debe a un efecto inhibitorio sobre la secreción de peroxidasa a la pared celular.

trabajos recientes apuntan la idea de que el poder reductor requerido por la peroxidasa, en la pared, proviene de la acción del enzima malato deshidrogenasa de pared, enzima que decrece en actividad cuando se somete la pared a una inducción de la extensión mediada por las giberelinas (Terry, 1983).

Posiblemente la peroxidasa esté implicada también en la rigidez de la pared inducida por CA^{2+} , ya que este ión promueve su secreción en la pared (Gaspar, *et al.*, 1983).

Síntesis de los componentes de la pared.

Las auxinas promueven la síntesis de polisacáridos de la pared, tanto en plantas monocotiledoneas (Baker, y Ray 1955), como dicotilidoneas (Abdul-Baki, 1971). La deposición del nuevo material de pared se realiza en todo el espesor de la misma,

excepto la celulosa, cuya incorporación se lleva a cabo en la superficie interna (Ray, 1967).

El proceso de síntesis de los componentes de pared puede jugar, por tanto, un papel importante en la iniciación del crecimiento. La introducción de nuevos polímeros puede incrementar el área superficial de la pared. La síntesis de nueva celulosa se realizaría intercalando nuevos segmentos de β -1-4-glucano en la cadena preexistente. Todos estos procesos confieren un incremento en la capacidad potencial de crecimiento de la pared. Por tanto, si crecimiento inducido por auxina va acompañado por la síntesis de nuevo material, el cual se deposita a lo largo de la interfase plasmalema-pared, debe entenderse que esta síntesis forma parte del metabolismo de la extensión de la pared celular.

