

T 11-49

Facultad de Ciencias
UNIVERSIDAD DE GRANADA

UNIVERSIDAD DE GRANADA
Facultad de Ciencias
Fecha <u>7/6/99</u>
ENTRADA NUM. <u>1805</u>

**Inducción de enzimas hidrolíticos en raíces de tomate
(*Lycopersicum esculentum*) como respuesta a la formación de
micorrizas arbusculares y su implicación en el control biológico
de *Phytophthora parasitica***

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA GRANADA
N.º Documento <u>b13383723</u>
N.º Copia <u>i17869006</u>

María José Pozo Jiménez
1999

UNIVERSIDAD DE GRANADA
21 MAYO 1999
COMISION DE DOCTORADO



Biblioteca Universitaria de Granada



01295932

**Inducción de enzimas hidrolíticas en raíces de tomate
(*Lycopersicum esculentum*) como respuesta a la formación de
micorrizas arbusculares y su implicación en el control biológico
de *Phytophthora parasitica***

Memoria que presenta la Licenciada en
Biología María José Pozo Jiménez
para aspirar al Título de Doctor



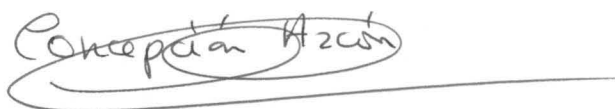
Fdo: María José Pozo Jiménez

Vº Bº

Los Directores



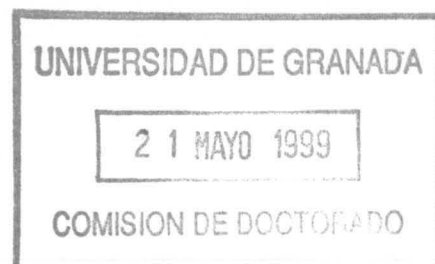
Fdo: D. Jose Miguel Barea Navarro
Doctor en Farmacia
Profesor de Investigación del C.S.I.C.



Fdo: Dª Concepción Azcón Gonzalez de Aguilar
Doctora en Biología
Investigador Científico del C.S.I.C.

UNIVERSIDAD DE GRANADA

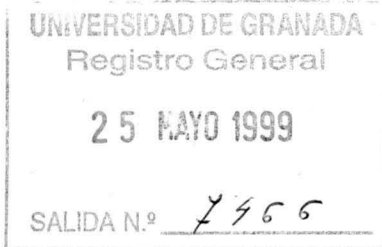
1999





UNIVERSIDAD DE GRANADA

COMISION DE DOCTORADO



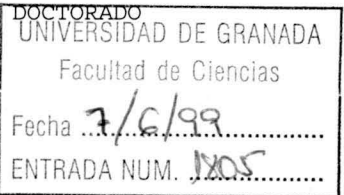
Fecha: 21 de Mayo de 1999

Su Ref^a.

Nuestra Ref^a.

Fecha de Salida:

Unidad de Origen: COMISIÓN DE



Destinatario:

Ilmo. Sr. DECANO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS


En cumplimiento del artículo 36 de las Normas Regulatoras de los estudios de Tercer Ciclo de esta Universidad, adjunto se remite un ejemplar de la Tesis Doctoral presentada por el Doctorando D^a. MARIA JOSE POZO JIMENEZ titulada INDUCCION DE ENZIMAS HIDROLITICOS EN RAICES DE TOMATE (LYCOPERSICON ESCULENTUM L.) COMO RESPUESTA A LA FORMACION DE MICORRIZAS ARBUSCULARES Y SU IMPLICACION EN EL CONTROL BIOLÓGICO DE PHYTOPHTHORA PAR y dirigida por el Profesor/es Dr/es JOSE MIGUEL BAREA NAVARRO, CONCEPCION AZCON GONZALEZ DE AGUILAR con objeto de mantenerla depositada desde el día 21 de Mayo de 1999 hasta el día 26 de Junio de 1999 para que pueda ser examinada por cualquier Doctor que así lo desee.

Granada, a 21 de Mayo de 1999.

EL SECRETARIO DE LA COMISIÓN

DE DOCTORADO




DIEGO SEVILLA MERINO
Secretario de la Comisión

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada en el
Departamento de Microbiología del Suelo y
Sistemas Simbióticos de la Estación
Experimental del Zaidín (C.S.I.C.), Granada.

Introducción

1. Nuevas tendencias en agronomía: desarrollo sostenido de los agrosistemas	7
1. 1. Microorganismos y sostenibilidad	10
1. 2. Control biológico	13
2. Interacciones planta-patógeno	23
2.1. Tipos de interacciones	23
2.2. Reacciones de defensa	24
3. Micorrizas	32
3.1. Concepto general y tipos de micorrizas	32
3.2. Micorrizas arbusculares	34
4. Micorrizas arbusculares y protección frente a patógenos	54
4.1. Mecanismos implicados en el efecto protector	57
4.2. Micorrizas frente a <i>Phytophthora sp</i>	60

Materiales y Métodos	69
-----------------------------	----

Resultados	97
-------------------	----

Efecto protector de la micorrización frente a la infección por <i>Phytophthora parasitica</i> en plantas de tomate	97
Quitinasas	107
Quitosanasas	123
Quitinasas/Quitosanasas	133
β -1,3-glucanasas	141
Superoxido dismutasas y peroxidasas	153
Modelo Compartimentado	161

Discusión General	183
--------------------------	-----

Conclusiones	193
---------------------	-----

Bibliografía	195
---------------------	-----

Interés y Objetivos

1. INTERES DEL ESTUDIO

Las prácticas más comunes en agricultura intensiva se basan fundamentalmente en aportes elevados de fertilizantes minerales para maximizar la producción e implican repetidas aplicaciones de otros agroquímicos, como son los productos fitosanitarios para la protección de los cultivos frente a microorganismos patógenos y plagas. Sin embargo, el control eficaz de patógenos sigue siendo un gran reto, puesto que, aún cuando se encuentran en el mercado diversos compuestos químicos para este fin, su aplicación en campo conlleva costes económicos y ecológicos muy altos, con frecuencia sin que se consigan los resultados esperados. Consideraciones de este tipo llevan a un replanteamiento de tales estrategias tan extendidas y altamente agresivas con el medio ambiente, surgiendo la necesidad de compatibilizar el respeto al medio natural con las exigencias de un mercado internacional cada vez más competitivo.

En este contexto crece el interés por la llamada Agricultura Sostenible, que implica un uso mínimo de productos obtenidos mediante procesos que conllevan gasto de energías no renovables, o que resulten contaminantes de los agroecosistemas. Se fomenta por tanto la utilización y optimización de los recursos naturales, entre los cuales destacan los microorganismos del suelo por el amplio espectro de actividades que desarrollan y que repercuten en la mayoría de los casos en los restantes organismos de su hábitat. Es particularmente importante su influencia sobre el establecimiento, desarrollo, nutrición y salud de las plantas. Entre las actividades ejercidas por los microorganismos cabe destacar su participación en los ciclos biogeoquímicos de los nutrientes y en el control biológico de patógenos de plantas. Sin embargo las técnicas habituales de cultivo, y fundamentalmente el abuso de fertilizantes y fitofármacos, han contribuido a la degradación y erosión de los sistemas suelo-planta y, por consiguiente, a la ruptura del equilibrio microbiano de los ecosistemas. Es, por tanto, crucial un uso controlado de tales tratamientos, así como la optimización de las actividades microbianas para mantener niveles de productividad

sostenidos mediante prácticas respetuosas con el medio ambiente. Para ello es necesario el desarrollo de estrategias que favorezcan o dirijan la intervención de los microorganismos beneficiosos en estos procesos con el fin de lograr su máximo aprovechamiento.

En este sentido el control biológico de patógenos aparece como una de las claves en agricultura sostenible. De hecho, en los últimos años, tanto el Plan Nacional de Investigación Científico Técnica (CICYT), como el Plan de Actuación del Consejo Superior de Investigaciones Científicas destacan prioritariamente este área de investigación dentro del ámbito de las Ciencias Agrarias. De igual modo los Programas Marco de la Unión Europea destacan dicho tema de investigación.

A este respecto, las micorrizas arbusculares, asociaciones simbióticas mutualistas entre hongos del suelo y la mayoría de las plantas, entre ellas las que presentan interés agrícola, constituyen una opción muy prometedora. Aunque el papel más conocido y ampliamente estudiado de la simbiosis micorrícica es la mejora de la nutrición mineral de la planta hospedadora, actualmente crece el interés sobre su efecto sobre el incremento de la resistencia/tolerancia de la planta frente al ataque de patógenos del suelo. Mientras que el uso de hongos como *Trichoderma* y de bacterias (*Pseudomonas*, *Bacillus*, etc...) como agentes de control biológico está alcanzando niveles de aplicación práctica en formulaciones comerciales adecuadas, la utilización de micorrizas con este fin comienza a ser una posibilidad cada vez más realista. Sin embargo, el desarrollo de una biotecnología que permita aplicar de forma racional las micorrizas como agentes de control biológico de patógenos en viveros o cultivos de interés requiere de una investigación básica apropiada, ya que se ignoran muchos de los mecanismos implicados en tal control, su regulación y las condiciones en que se expresan. Conocerlos es vital para comprender y manipular el sistema, y por consiguiente, optimizar su funcionamiento.

De acuerdo con lo que antecede varias instituciones en diversos países europeos propusieron al programa AIR (en el que se integraban los estudios sobre Ciencias Agrarias),

dentro del IV Programa Marco de la U.E., un proyecto titulado “Biological control of root pathogens by VA mycorrhizas: research into the mechanisms involved”, en el que se enmarcaba el presente trabajo de investigación y que fue subvencionado por la U.E. Por lo tanto, este estudio pretende contribuir al conocimiento de los mecanismos de acción desarrollados por las micorrizas arbusculares para proteger a las plantas, o disminuir su susceptibilidad, frente al ataque de patógenos, utilizando como modelo experimental el sistema tomate-*Phytophthora parasitica*.

La importancia económica del tomate, que es en la actualidad, tras la patata, la hortaliza más cultivada en el mundo, y el hecho de que *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* sea el causante más común de la podredumbre del pie de las tomateras dentro del género *Phytophthora*, y que sea un organismo ampliamente estudiado en relación a las interacciones planta-patógeno, justifica que éste sistema biológico sea un modelo idóneo para el estudio propuesto.

2. HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS

Este trabajo de investigación pretende abordar el estudio de algunos de los mecanismos de acción por los cuales la simbiosis micorrizica ejerce y regula sus funciones como agente de control biológico. Entre los mecanismos propuestos para explicar los fenómenos de protección biológica por micorrizas (mejora del estatus nutritivo de la planta, alteraciones en las poblaciones microbianas de la rizosfera, cambios en la arquitectura radical, producción de compuestos antimicrobianos, competencia por nutrientes y nicho ecológico, etc...) se encuentra la posibilidad de que el hongo formador de la micorriza active, aunque levemente, los mecanismos de defensa de la planta hospedadora, por lo que ésta estaría más preparada para responder posteriormente a un eventual ataque por patógenos. El OBJETIVO GENERAL del presente trabajo era determinar el grado de protección que confiere la micorrización a plantas de tomate frente al ataque por *Phytophthora parasitica*, así como el estudio de la posible inducción por parte del hongo micorrízico (hongo MA) de enzimas de defensa de la planta y su posible implicación en bioprotección. El proyecto de investigación constó de varias etapas, que se corresponden con los OBJETIVOS ESPECIFICOS:

1. Estimar el grado de protección del tomate frente a *Phytophthora parasitica* conferido por dos hongos MA, *Glomus mosseae* y *Glomus intraradices*.
2. Investigar la inducción en la planta hospedadora de enzimas implicados en los mecanismos de defensa por los hongos MA y/o el hongo patógeno.
3. Estudiar la implicación de éstas en el control y desarrollo de la simbiosis y/o la enfermedad.



Introducción

1. NUEVAS TENDENCIAS EN AGRONOMÍA: DESARROLLO SOSTENIDO DE LOS AGROSISTEMAS

Las plantas necesitan para su establecimiento y desarrollo un medio físico que les proporcione el ambiente adecuado y les suministre los nutrientes que requieren a lo largo de su ciclo de vida, es decir, un nivel de fertilidad en su sustrato de crecimiento, normalmente el suelo. La fertilidad depende de la conjunción de una serie de factores físicos, químicos, biológicos y climáticos, y por consiguiente de un complejo sistema de interacciones (Pauli, 1967). Hay tres aspectos fundamentales a considerar en relación con la calidad de los suelos: su estructura física, la cantidad y dinámica de los nutrientes que contiene y la biota que alberga. Los tres aspectos están estrechamente interrelacionados puesto que la estructura del suelo condiciona la naturaleza de la microbiota, que determina la dinámica del ciclado de nutrientes, que a su vez repercute en la microbiota, y que en conjunto influyen en la macrobiota, que finalmente tiene un efecto importante en la estructura física del suelo. Las prácticas de la llamada “agricultura moderna”, intensiva, han provocado cambios significativos en los tres aspectos, sacrificando generalmente el mantenimiento de la calidad del suelo a largo plazo en favor de una mejora del estatus nutritivo a corto plazo (Vandermeer, 1995). Uno de los aspectos más característicos de este tipo de agricultura ha sido el uso masivo y recurrente de agroquímicos, tanto fertilizantes minerales para aumentar la producción como repetidas aplicaciones de productos fitosanitarios para la protección de los cultivos frente a patógenos y plagas. En concreto el uso de plaguicidas a nivel mundial se ha incrementado en más de 12 veces desde principios de los años 50 (Van Driesche y Bellows, 1996). En la actualidad son múltiples las consideraciones de tipo económico y ecológico que llevan a un replanteamiento de este tipo de prácticas, cada vez más en “tela de juicio” conforme aumentan los conocimientos sobre las posibles consecuencias ambientales y en la salud del uso excesivo de agroquímicos. Por ejemplo, es de sobra conocido en la actualidad que la aplicación de fertilizantes nitrogenados puede tener como consecuencia la contaminación de las aguas subterráneas por la filtración de nitratos a través del suelo. Bajo determinadas condiciones, la desnitrificación del fertilizante nitrogenado

aplicado puede dar lugar a compuestos nitrogenados que se volatilizan a la atmósfera, algunos de los cuales contribuyen a incrementar el denominado “efecto invernadero” y/o causan alteraciones en la capa de ozono. De igual modo, aumenta la preocupación sobre el riesgo del uso de fitofármacos en relación a la posible presencia de residuos de éstos en la cadena alimenticia y en el medio ambiente (Coscollá, 1998), la génesis de líneas de patógenos resistentes y la aparición de nuevas plagas por la destrucción de enemigos naturales. La concienciación en torno a todas estas posibles consecuencias sobre la salud y el medio ambiente han impulsado el creciente interés por alternativas viables que aseguren la protección de los cultivos y producciones competitivas, pero que, al mismo tiempo, ayuden a mantener, incluso a largo plazo, el equilibrio ecológico del sistema mediante prácticas agrícolas más respetuosas con el medio, dentro de lo que se ha venido a llamar **Agricultura Sostenible**.

Por agricultura sostenible se entiende la forma de cultivar que permite conservar la fertilidad del suelo a largo plazo, con un gasto mínimo de energía y de recursos no renovables. Entre las prácticas que propugna este tipo de agricultura como alternativa a las estrategias de cultivo intensivo están la rotación de cultivos o cultivos mixtos, el reciclado de residuos, el uso de abonos orgánicos, la conservación del agua, la reducción al mínimo de la aplicación de agroquímicos, el laboreo de conservación, el uso de fosfatos de roca, uso de nuevas especies o variedades adaptadas a situaciones concretas, el control biológico de patógenos y el aprovechamiento de las propiedades beneficiosas de los microorganismos del suelo (Jiménez-Díaz y Lamo de Espinosa, 1998).

Este nuevo concepto de agricultura ha promovido la búsqueda de soluciones prácticas en los procesos de producción con métodos que tiendan a maximizar los rendimientos mediante un uso racional de los recursos naturales renovables y la utilización mínima de materiales y procesos cuya producción o desarrollo conlleve consumo de energía procedente de fuentes no renovables. El reto fundamental es, en estos momentos, el uso racional de la tecnología y la compatibilización del respeto al medio ambiente con las exigencias de un mercado internacional cada vez más competitivo. Por lo tanto, el objetivo

perseguido para los sistemas naturales es triple: rentabilidad, productividad continuada y seguridad ambiental (López-Bellido, 1998).

Agricultura sostenible

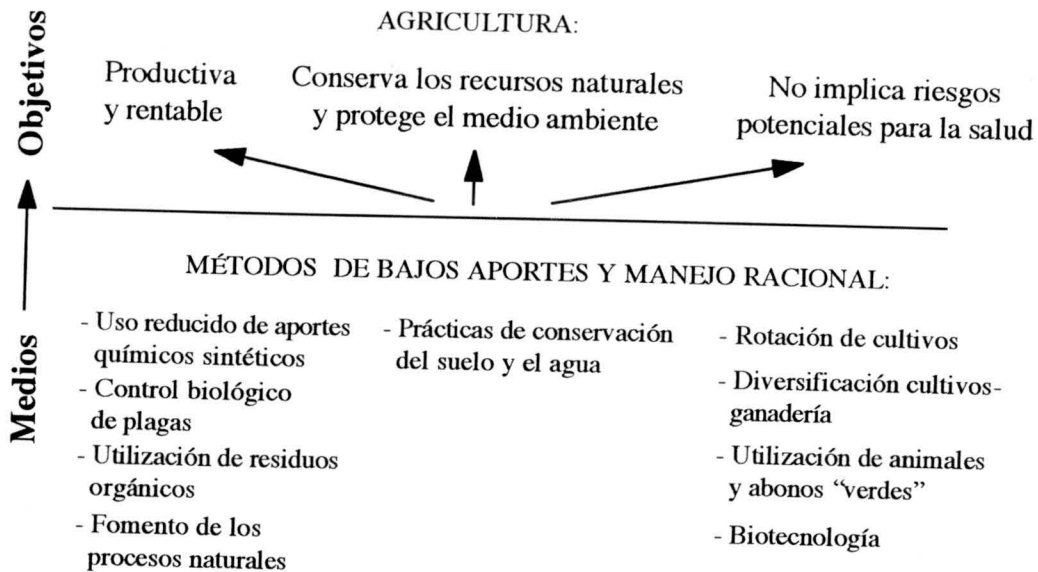


Figura 1. Concepto de agricultura sostenible (modificado de Lopez-Bellido, 1998)

La biotecnología ofrece una amplia gama de aplicaciones en este terreno. La adopción de técnicas de este tipo para ser aplicadas en agricultura sostenible depende en gran medida de que se intensifiquen los esfuerzos de investigación en agrobiología, centrados fundamentalmente en la mejora de la gestión de los sistemas biológicos a través de un mejor conocimiento de sus procesos de retroalimentación y de equilibrio y de un manejo más adecuado del suelo, para con ello mejorar la cantidad y calidad de la producción sin perjudicar el medio.

Desde este punto de vista, y considerando que la microbiota del suelo es un recurso natural renovable y que los microorganismos son capaces de desarrollar importantes funciones en los sistemas suelo-planta, el manejo adecuado de los distintos organismos del suelo es clave en el desarrollo sostenido de los sistemas agrícolas o forestales. Así, la

sostenibilidad de los agroecosistemas depende en último extremo del equilibrio entre los componentes biológicos del suelo. Por ello, la tendencia actual de la investigación en Microbiología (Biotecnología) del Suelo se orienta hacia el estudio de los microorganismos que se desarrollan y actúan en la zona de influencia de la raíz (la "rizosfera") desde múltiples puntos de vista (ecológico, genético, bioquímico, fisiológico, etc...) y sus repercusiones en la nutrición y protección de las plantas, así como su contribución a una productividad sostenida con el mínimo deterioro del medio ambiente (Barea y Olivares, 1998).

1.1 Microorganismos y sostenibilidad

En el suelo habitan microorganismos de muy variados grupos taxonómicos: algas, hongos, protozoos, bacterias, nemátodos, etc. Así, la llamada microbiota del suelo es un conjunto heterogéneo que alberga una extraordinaria diversidad. A modo de ejemplo, indicar que se ha estimado que alrededor de 1.500.000 especies de hongos pueden habitar en el suelo, de las cuales sólo un 1% habrían sido identificadas. Evidentemente, debido al amplio espectro de actividades que pueden desarrollar los microorganismos, esta diversidad biológica se ve reflejada en una compleja diversidad funcional. En la mayoría de los casos estas actividades repercuten en otros organismos de su hábitat, incluidas las plantas, desempeñando a veces un papel fundamental en su establecimiento, nutrición, desarrollo y salud.

Las interacciones que ocurren en la rizosfera son complejas y resultan afectadas por numerosos factores, tales como humedad, condiciones físicas del suelo, intensidad lumínica, aporte nutritivo, microorganismos asociados, exudados radicales, etc. El hecho de que muchos microorganismos precisen vivir asociados a la raíz de la planta, y que su alimentación, en cuanto a compuestos carbonados se refiere, dependa en mayor o menor medida de ella o de sus exudados radicales, lisados o restos celulares, determina de antemano la existencia de posibles procesos de competencia (antagonismo) entre los distintos grupos microbianos. Pero, además de competir, los organismos también pueden

cooperar a distintos niveles, con vistas a mejorar la utilización de los limitados recursos del suelo. El resultado de tales interacciones, tanto antagónicas como sinérgicas, puede ser de gran importancia para el desarrollo de la planta (Bethlenfalvay y Schüepp, 1994). Debido a la gran complejidad de las interacciones que se desarrollan en el sistema suelo-planta el estudio de las interacciones microbio-microbio y planta-microbio es crucial para entender los procesos dinámicos que caracterizan la formación y mantenimiento de la rizosfera, así como sus repercusiones sobre el crecimiento y la salud de la planta (Stotzky, 1972).

En líneas generales los microorganismos del suelo se dividen en tres grandes grupos desde el punto de vista de sus relaciones con la planta (Barea y Azcón-Aguilar, 1982):

a) Saprofitos, que utilizan compuestos orgánicos procedentes de residuos animales, vegetales o microbianos.

b) Simbiontes mutualistas, referidos comunmente como simbiontes, que benefician el desarrollo y la nutrición vegetal.

c) Simbiontes parasíticos y patógenos en general, causantes de enfermedades a las plantas

Los dos primeros grupos comprenden microorganismos beneficiosos para los sistemas suelo-planta. Sus efectos se pueden englobar en cuatro tipos de acciones fundamentales (Barea y Olivares, 1998):

- *Estimulación de la germinación de las semillas y el enraizamiento*, mediante producción de hormonas, vitaminas y otros compuestos, mejorando así la salud de la planta y por tanto la producción de la cosecha. Los organismos que presentan estas propiedades son conocidos como fitoestimuladores.

- *Incremento en el suministro y/o disponibilidad de nutrientes* necesarios para la planta, al estar implicados en los ciclos de estos nutrientes y en su recircularización, ya que también son responsables de la descomposición de la materia orgánica. Debido a esta

capacidad para mejorar la fertilidad del suelo, los organismos que la presentan son denominados en términos globales como biofertilizantes.

- *Mejora de la estructura del suelo* mediante su contribución a la formación de agregados estables, siendo por tanto denominados mejoradores de suelo.

- *Protección de la planta frente a estreses bióticos y abióticos*. Los biorremediadores intervienen en la eliminación de productos xenobióticos. Los mejoradores ecofisiológicos son responsables de un incremento de la resistencia/tolerancia a salinidad, sequía, degradación de sistemas, etc. Por último, los organismos denominados biopesticidas o agentes de control biológico intervienen frente a estreses bióticos provocados por patógenos a través de fenómenos de antagonismo microbio-microbio o por fenómenos de inducción de resistencia en la planta.

Entre los saprófitos destacan las bacterias promotoras del crecimiento vegetal, conocidas en la literatura con el acrónimo PGPR (del inglés "plant growth promoting rhizobacteria"), se hallan implicadas en procesos de control biológico, movilización de nutrientes y fitoestimulación al facilitar el establecimiento o la emergencia de plántulas (Kloepper, 1992). Adicionalmente pueden ejercer acciones de biorremediación o participar en la formación de agregados en el suelo.

En cuanto a los simbioses mutualistas cabe destacar bacterias fijadoras de nitrógeno (*Rhizobium*, *Frankia*, etc...), que pueden transformar el nitrógeno atmosférico en compuestos nitrogenados utilizables por las plantas (Martinez Molina y Velázquez, 1992) y los hongos formadores de micorrizas, que desarrollan un papel esencial al constituir el nexo de unión fundamental entre la planta y el suelo (Bethlenfalvay y Linderman, 1992), facilitando la captación de nutrientes y ayudando a la planta a superar estreses tanto de tipo medioambiental como cultural. En términos generales podríamos considerar a los hongos formadores de micorrizas como biofertilizantes, fitoestimuladores, protectores de la planta frente a patógenos y biorremediadores. Ejercen además un efecto positivo sobre la

conservación del suelo y facilitan la sucesión vegetal, por lo que son piezas clave en procesos de revegetación.

En base a todas estas propiedades beneficiosas el uso de inoculantes microbianos en la práctica agrícola representa una alternativa muy atractiva al uso de compuestos químicos. El desarrollo de inoculantes microbianos efectivos es, por tanto, fundamental para un aumento de la producción con costes económicos y ambientales mínimos, y que además preserve la estructura y diversidad de las comunidades naturales del suelo. Este no es un reto fácil, ya que requiere del conocimiento en profundidad de la estructura de las poblaciones microbianas del suelo y de su diversidad natural, así como de los mecanismos que rigen los equilibrios e interacciones que tienen lugar entre ellos para poder lograr una optimización de los efectos beneficiosos a través de la manipulación racional de las mismas.

1.2 Control biológico

Como se ha mencionado en el apartado anterior, además de los microorganismos beneficiosos existen organismos de carácter patógeno capaces de producir enfermedades en las plantas y que originan grandes pérdidas en el rendimiento de las cosechas. Aparte de este daño directo sobre la producción, las enfermedades reducen la absorción de fertilizantes por la planta, cuyos remanentes no utilizados permanecen en el suelo y favorecen el desarrollo de malas hierbas. Por ello, el desarrollo de cultivos sanos además de optimizar la producción facilita el uso más eficiente de los fertilizantes, la competencia con las malas hierbas y la incorporación de una mayor cantidad de materia orgánica al suelo. Esto supondría una menor acumulación de residuos de fertilizantes (especialmente NO_3) en el suelo tras la cosecha, menos dependencia de los herbicidas, disminución del uso de fungicidas y desinfectantes volátiles del suelo, una mejor estructura del suelo y una reactivación del ciclo de nutrientes (Jiménez-Díaz, 1998). Todo esto explica que el control de los agentes fitopatógenos constituya uno de los mayores problemas de la agricultura actual. Aunque existen en el mercado gran número de productos para el control químico de enfermedades, su eficacia cuando éstos se aplican en campo abierto y amplias

extensiones de terreno está cuestionada. Además, a través de generaciones sucesivas la supervivencia de algunos miembros de la población causante de la plaga o enfermedad capaces de detoxificar o evitar la exposición al plaguicida puede dar lugar al desarrollo de fenómenos de resistencia, que pueden conducir a que las nuevas poblaciones de la plaga no sean destruidas por dicho producto. Desde finales de la década de los 40 el número de insectos, malas hierbas y, más recientemente, bacterias y hongos patógenos de plantas que desarrollan resistencia a plaguicidas ha incrementado dramáticamente (Brent, 1987). A esto se suma la información derivada de los estudios acerca de la repercusión de los productos fitosanitarios sobre la cadena alimenticia, que indican la gravedad de las posibles consecuencias que su aplicación puede provocar sobre el equilibrio de los ecosistemas.

Diversas consideraciones sobre el origen de las plagas y enfermedades sugieren que la solución para estos problemas reside en la modificación de los sistemas agrícolas, a ser posible sin pérdida de productividad. En el contexto de una agricultura sostenible, el control eficiente de las enfermedades requiere combinar todas las estrategias de lucha disponibles, para alcanzar niveles de resistencia mantenidos en el tiempo sin alterar la estabilidad de los agroecosistemas. Se entiende por **lucha integrada o manejo integrado de plagas y enfermedades** la estrategia global para el desarrollo de sistemas de control contra el conjunto de plagas, enfermedades y malas hierbas asociadas a un cultivo, para mantener la densidad de sus poblaciones por debajo del umbral de tolerancia o nivel que causaría daños económicos al cultivo. Incluye la utilización de suelos libres o con el menor contenido posible de patógenos, cultivares resistentes, semillas libres de propágulos del patógeno, prácticas culturales adecuadas, microorganismos antagonistas y compuestos químicos sólo como complemento para las insuficiencias del control alcanzado con las medidas anteriores. El aprovechamiento de las propiedades biopesticidas de ciertos microorganismos es, a este respecto, un campo muy prometedor, que empieza a explotarse incluso a nivel comercial. Sirva como ejemplo el hecho de que el El Vademecum de productos fitosanitarios y nutricionales de 1999 propugna la lucha integrada y presenta productos biológicos inductores de resistencia (Liñan, 1999).

Sin embargo, la idea de usar microorganismos para el control de organismos perjudiciales no es reciente. Ya en 1834, Agostino Bassi mostró experimentalmente que el hongo *Beauveria bassiana* causa una infección en el gusano de la seda y sugirió la posibilidad de usar ciertos microorganismos con propósitos de control. En las primeras décadas de este siglo, algunos investigadores pusieron de manifiesto que la infección de las plantas por patógenos del suelo ocurrían con mayor facilidad en suelos estériles que en los no esterilizados (Henry, 1931). Sanford (1926) fue de los primeros en establecer la competencia entre organismos saprófitos y patógenos por nutrientes o sitios de infección como una forma de control de las enfermedades. El conocimiento en mayor profundidad de los fenómenos de antagonismo biológico, y posteriormente de la existencia de sustancias antibióticas, enfatizó el hecho de que los patógenos tienen unos nichos específicos limitados en los ecosistemas naturales y sugirió que la rizosfera, y más concretamente las poblaciones microbianas que en ella residen, pueden constituir una barrera a la infección por patógenos mediante fenómenos de competencia por sustratos de crecimiento y posiblemente por la producción de sustancias antibióticas (Harley, 1971).

Aunque en un principio el control biológico se refería fundamentalmente al control de plagas de insectos, ácaros y malas hierbas, y se desarrollaba principalmente en el campo de la entomología, el concepto se ha ampliado en las últimas décadas. Esta ampliación afecta tanto a los organismos a combatir o “diana”, que en la actualidad incluye a otros invertebrados, bacterias y hongos patógenos de plantas e incluso algunos vertebrados, como a los agentes de control biológico, entre los que se consideran organismos de los más variados grupos taxonómicos y de propiedades biológicas y poblacionales muy diversas como por ejemplo microorganismos (bacterias, hongos, protozoos, virus...), invertebrados (nematodos, ácaros, insectos) e incluso vertebrados (sapos, pájaros insectívoros) (Van Driesche y Bellows, 1996). Los agentes de control biológico pueden actuar como parasitoides, predadores o causantes de enfermedades en los distintos organismos diana.

Teniendo en cuenta este amplio sentido del concepto de control biológico, probablemente la definición más sencilla de él sea “el uso de biota para controlar biota” o

“el uso de organismos vivos para disminuir la población de plagas” (Samways, 1981), aunque se han propuesto otras muchas definiciones para describir un concepto simple en principio pero que implica procesos muy complejos. Van Driesche y Bellows (1996) lo definen como el uso de poblaciones de parasitoides, predadores, patógenos, antagonistas o competidores para suprimir una plaga haciendola menos abundante y por tanto menos dañina de lo que es. El control biológico, a menudo abreviado como biocontrol, es en consecuencia una forma de manejo de poblaciones: implica el uso finalista de uno o varios organismos para reducir una población que es perjudicial para el hombre bien porque consume o dañe plantas de interés o sus productos, bien porque ataque al ganado o afecte a la salud humana. Aunque el organismo no deseado puede ser eliminado localmente en algunas ocasiones mediante este control, en general se pretende disminuir el número de individuos a un nivel que no sea perjudicial ni cause daños económicos. La erradicación completa es ambiciosa y rara vez se consigue. Además, en el caso de interacciones tipo predador-presa, un enemigo natural que elimine totalmente a su presa queda sin comida u hospedador y por tanto, perece. La opción más aconsejable en estos casos es la reducción de la población de la plaga a un nivel que no sea perjudicial (Samways, 1981), manteniendose las dos poblaciones en equilibrio pero a bajos niveles. En resumen, el control biológico consiste en el uso dirigido del enfrentamiento de los organismos beneficiosos, o agentes de biocontrol, frente a los perjudiciales o diana, de lo que se deduce la importancia de conocer los mecanismos de interacción entre ellos.

Existen tres líneas generales de actuación para el uso de estos enemigos naturales (Van Driesche y Bellows, 1996):

La **conservación**, cuando ya existen en la zona especies de enemigos naturales que potencialmente pueden suprimir la plaga. Esta estrategia implica la identificación y rectificación de las influencias negativas que suprimen a estos agentes y la mejora de sus hábitats. El principal efecto negativo sobre estas poblaciones son los productos fitosanitarios, especialmente aquellos de amplio espectro y de actividad residual larga.

Introducción de nuevas especies de agentes de biocontrol. Este método ha mostrado su eficacia en numerosas ocasiones, especialmente en los casos en que la plaga no sea propia de la zona donde ataca, por lo que no se encuentran enemigos naturales eficaces. Se recurre entonces a un estudio de las poblaciones de la plaga en sus hábitats originales y de las especies que pueden atacarle allí. Se recolectan estas últimas, se estudian sus posibles efectos y si cumple con las garantías adecuadas, lo que implica un profundo estudio científico (Cook *et al.*, 1996), se liberan en la zona afectada, siendo necesarias a veces medidas de conservación para que la población se establezca de forma permanente. Este método ha conseguido el control total o parcial de más de 200 especies de plagas (Julien, 1992; Greathead y Greathead, 1992).

Por último se recurre al **aumento** de la población de enemigos naturales mediante liberaciones controladas cuando éstos no están presentes (invernaderos, viveros), aparecen tarde en las nuevas plantaciones (en rotación de cultivos) o simplemente son demasiado escasos para conseguir el control necesario. La liberación puede ser a modo de inóculo, realizándola en los primeros estadios del cultivo para que el agente se reproduzca y desarrolle su control a lo largo de todo el periodo de crecimiento y cosecha, o masiva, cuando la reproducción de éstos es insuficiente y es necesario liberar todos los individuos requeridos para un control efectivo.

Los posibles efectos negativos del uso de microorganismos con fines de control biológico, especialmente cuando no son nativos de la zona a tratar (posible desplazamiento de microorganismos beneficiosos, alergenidad, toxicidad o patogenicidad frente a organismos no perjudiciales) han sido discutidos por Cook y colaboradores (1996), llegando a la conclusión de que los efectos no deseados, en el caso de producirse, parecen ser transitorios y en todo caso, el efecto no deseado se elimina en gran medida al interrumpir el uso del agente de biocontrol, al contrario de los efectos que tienen las prácticas convencionales, cuyos efectos sobre organismos no diana son significativos y a largo plazo.

1.2.1 Control biológico de patógenos del suelo

Una de las diferencias fundamentales entre el control biológico de microorganismos patógenos de plantas y el de otros organismos como insectos o malas hierbas es que el control se ejerce en zonas definidas y restringidas del ecosistema, como serían las hojas o la rizosfera. Normalmente existe un conjunto de microorganismos asociados a las plantas, que pueden actuar como competidores o antagonistas de posibles patógenos. Por este motivo el control de enfermedades de plantas se centra principalmente en la conservación y aumento de estos microorganismos beneficiosos existentes en cada ambiente particular, mientras que para el control de insectos o malas hierbas se recurre con frecuencia a la importación y liberación de nuevas especies de enemigos naturales (Van Driesche y Bellows, 1996).

La conservación implica evitar las prácticas que afecten a las poblaciones nativas, especialmente la esterilización de los suelos y los tratamientos con fungicidas, y favorecer aquellas prácticas que benefician a estas poblaciones, como por ejemplo la adición de materia orgánica al suelo. La otra estrategia de actuación, el aumento de la población del organismo beneficioso supone el cultivo masivo de especies antagonistas y su adición al agrosistema, con el fin de incrementar la población existente o de modificar su distribución espacial. Dentro de este apartado que implica la inoculación como forma de introducción de una población de los microbios beneficiosos, se consideran dos posibilidades: la inoculación de poblaciones de antagonistas o parasitos del patógeno por sí mismas, lo que se enmarca en la idea más clásica de control biológico, o la inoculación con organismos que no van a actuar directamente sobre el patógeno, pero que sin ser patógenos o presentando una patogenicidad atenuada, son capaces de desencadenar las defensas de la planta frente a la invasión de patógenos (resistencia inducida), con lo que el control de la enfermedad se consigue gracias a la mayor resistencia que opone la planta (Van Driesche y Bellows, 1996). Esto podría considerarse como un estadio más avanzado en la aplicación de las técnicas de biocontrol, en el que la propia planta, con un mayor nivel de resistencia inducida gracias al tratamiento previo con el organismo desencadenante de la misma, es capaz de controlar el desarrollo del patógeno.

En numerosos trabajos se ha demostrado que el control biológico de patógenos de plantas a través del uso de hongos o bacterias beneficiosos es una alternativa posible al uso de fungicidas o productos fitosanitarios en general. Bacterias como *Pseudomonas sp.* o *Bacillus sp.* y hongos como *Trichoderma sp.* o *Gliocladium sp.* han sido ensayados con éxito como agentes de control biológico de hongos patógenos del suelo (Kim *et al.*, 1994; Elliot y Lynch, 1995; O'Gara *et al.*, 1994).

Whipps (1997) recoge en una extensa revisión los resultados de multitud de trabajos llevados a cabo en las últimas décadas sobre gran cantidad de patosistemas. Se describen distintas prácticas que llevan a una situación de biocontrol, tanto en el sentido de conservación como de aumento. Entre estas prácticas cita el uso de suelos supresivos de determinadas enfermedades. La supresividad está vinculada a características bióticas y abióticas del suelo, que pueden tener un efecto directo sobre el patógeno o indirecto mediado por la planta. La adición de residuos orgánicos y "compost", además de mejorar la estructura del suelo y la nutrición de la planta resulta a veces en el control de gran variedad de agentes patógenos. Esto es debido a que propicia una microbiota metabólicamente muy activa que puede ejercer antagonismo frente a patógenos mediante distintos mecanismos: (i) evitando la germinación de los propágulos al consumir nutrientes necesarios para ello; (ii) por la acción inhibidora de compuestos volátiles de amonio o azufre liberados durante la descomposición de la materia orgánica o (iii) mediante la liberación de metabolitos antifúngicos que, además de inhibir la germinación, pueden causar la lisis de las hifas o esporas del patógeno. Por otro lado la adición de compuestos de quitina produce incrementos en los organismos quitinolíticos que parecen ejercer un efecto negativo sobre hongos como *Fusarium* o *Rhizoctonia*. Sin embargo, en algunos casos se ha descrito que la adición de compost no tiene efecto alguno, o incluso que puede acentuar los efectos de algunos patógenos. Es, por lo tanto, necesario el análisis pormenorizado de los distintos patosistemas y de las medidas para su control.

La fauna también puede desempeñar un papel importante en biocontrol, aunque se sabe poco al respecto. Su acción puede ser directa, al atacar o consumir hifas o propágulos,

o indirecta, dispersando propágulos de los agentes de control biológico. De hecho se ha demostrado que amebas, nemátodos, ácaros, algunas larvas y lombrices atacan o consumen una gran variedad de patógenos.

La inoculación con organismos capaces de ejercer como agentes de control biológico ha de tener en cuenta los mecanismos por los que va a ejercer su acción para facilitarla en la medida de lo posible. Los mecanismos de acción, aunque variados, no son excluyentes ni exclusivos. Pueden implicar la interacción directa del antagonista y el patógeno, o indirecta, al provocar en la planta la activación de sus mecanismos de resistencia, como se mencionó anteriormente, o al incrementar su crecimiento, compensando en parte los efectos deletereos del patógeno (Figura 2). Con frecuencia un antagonista puede desarrollar varios de estos mecanismos simultáneamente o de forma secuencial. También es posible que varios antagonistas actúen conjuntamente mediante un amplio rango de actividades, como se ha visto en algunos suelos supresores.

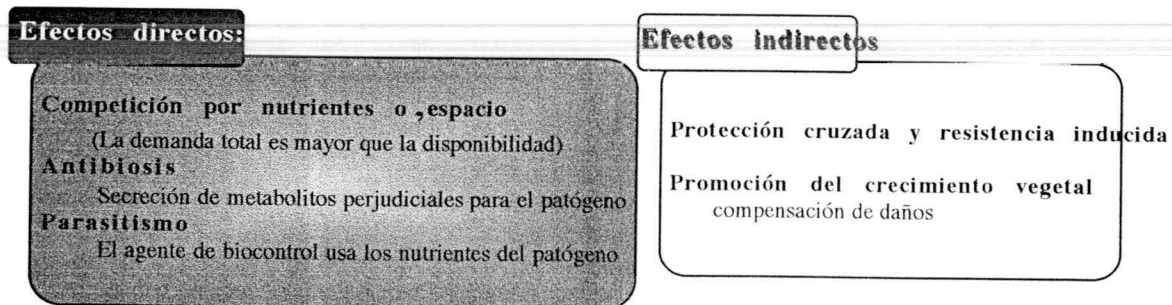


Figura 2. Esquema de los principales efectos que pueden llevar a una situación de control biológico, derivados de la presencia del agente de control y que de forma directa o indirecta pueden llevar a la disminución de la población del organismo perjudicial.

Algunas bacterias de los géneros *Bacillus* y *Pseudomonas* y hongos como *Trichoderma* spp. son los organismos más estudiados en relación a los fenómenos de antagonismo, competición y producción de antibióticos. Las especies de *Pseudomonas* son un grupo muy prometedor puesto que además de sus propiedades antagonistas son fáciles

de cultivar en laboratorio, se encuentran de forma natural en los suelos y colonizan y se establecen bien cuando se inoculan artificialmente.

En cuanto al parasitismo de patógenos y nemátodos, varias especies de *Trichoderma* se han usado con éxito frente a enfermedades causadas por *Rhizoctonia* y *Sclerotium*. Por ejemplo, algunas cepas de *T. harzanium* que producen quitinasas, β -1,3-glucanasas y proteasas pueden parasitar, gracias a estas enzimas, las hifas y esclerotia del patógeno *Sclerotium rolfsii*, invadiéndolas y causando la lisis de sus células.

El control biológico mediante la inducción de resistencia en la planta se basa en la estimulación de la capacidad defensiva de la planta. No implica la aparición de resistencia donde no la hay, sino la activación de mecanismos de resistencia latentes lo que facilitará posteriormente la reacción de la planta frente al patógeno, y limitará más eficazmente la invasión de los tejidos. Este fenómeno ocurre de forma natural como resultado de una invasión limitada por un patógeno, particularmente cuando la planta desarrolla la reacción hipersensible, pero además puede desencadenarse por ciertos químicos, agentes no patogénicos, formas avirulentas de patógenos, razas incompatibles de patógenos o por patógenos virulentos bajo circunstancias en las que la infección está desfavorecida por condiciones ambientales. La inmersión, por ejemplo, de raíces de tomate en una suspensión de *Fusarium oxysporum f.sp. dianthi* unos días antes de la exposición de la planta al patógeno *F. oxysporum f. sp. lycopersici* confiere a la planta protección durante algunas semanas. Las plantas de algodón puede protegerse durante más de tres meses pulverizando sus raíces durante el transplante con una cepa poco virulenta de *Verticillium albo-atrum* (Van Driesche y Bellows, 1996). Adicionalmente algunas cepas no patógenas de bacterias colonizadoras de raíces también pueden inducir resistencia sistémica (Kloepper *et al.*, 1993; Hoffland *et al.*, 1996; Pieterse *et al.*, 1996). De hecho el tratamiento de semillas de rábano con la cepa WCS374 de *P. fluorescens* redujo en más de un 50% la enfermedad causada por *Fusarium* durante 4 años consecutivos en invernaderos infectados de forma natural (Leeman *et al.*, 1995). También la colonización de la rizosfera de *Arabidopsis thaliana* por ciertas cepas de *Pseudomonas fluorescens* indujo resistencia sistémica en la planta frente a

los patógenos *Pseudomonas syringae* y *Fusarium oxysporum* (Van Wees *et al.*, 1997). Se ha descrito incluso la inducción por PGPRs de resistencia frente a coleópteros, mostrándose en experimentos de campo este tratamiento más efectivo que los insecticidas (Zehnder *et al.*, 1997).

Las PGPRs son un claro ejemplo de que un mismo agente puede ejercer el control biológico a través de la combinación de distintos mecanismos. Concretamente puede actuar mediante competición por espacio y nutrientes, competición por hierro mediada por sideróforos, antibiosis (Thomashaw y Weller, 1995), excreción de enzimas líticas, e inducción de resistencia sistémica en la planta (Buchenauer, 1998). Los resultados obtenidos con estas bacterias son muy prometedores y empiezan a comercializarse en formulaciones para el tratamiento de semillas (Buchenauer, 1998).

Las últimas revisiones sobre el tema de control biológico (Van Driesche y Bellows, 1996; Whipps, 1997) contemplan el potencial del uso de la simbiosis micorrícica con este fin, aspecto que se ampliará en el apartado 4 de esta Introducción.

Para que las preparaciones microbianas puedan ser consideradas efectivas como agentes de biocontrol, deben cumplir varios requisitos básicos: ser efectivos en campo, competitivos económicamente con los fitofármacos existentes, y no ocasionar ningún problema de contaminación ambiental.

La limitación principal de la aplicación de estos agentes es su introducción en el agroecosistema y el control de los factores que regulan su competitividad en la rizosfera para mejorar su establecimiento. El problema es que puesto que la actividad por la que el microorganismo beneficioso ejerce el efecto antagónico frente a patógenos opera de forma natural, no controlada específicamente, los resultados son, en muchos casos, impredecibles. De hecho, la variabilidad de resultados en experimentos de campo ha sido uno de los principales inconvenientes del desarrollo y uso de inoculantes microbianos con ese fin. En este sentido es necesario profundizar en el conocimiento de los procesos biológicos

(interacciones planta- patógeno-agente de biocontrol) implicados en el control biológico y de las condiciones ecológicas que puedan potenciar esta acción.

2. INTERACCIONES PLANTA-PATÓGENO

2.1 Tipos de interacciones

Las plantas se enfrentan cotidianamente a organismos tales como hongos, bacterias, micoplasmas, virus, nemátodos, etc..., con frecuencia de carácter potencialmente patógeno. Sin embargo, aún cuando las plantas pueden sufrir daños considerables, muchas de ellas sobreviven por sí mismas a los ataques y pueden continuar su desarrollo e incluso producir buenos rendimientos. Para conseguirlo, las plantas han desarrollado distintos mecanismos que minimicen el ataque del patógeno, bien mediante barreras físicas o defensas estructurales que dificultan su entrada, bien por medio de reacciones bioquímicas que dan lugar a sustancias tóxicas o que inhiben de algún modo el desarrollo del patógeno.

En líneas generales hay tres razones que pueden llevar al fracaso del patógeno (Hammond-Kosack y Jones, 1996):

1) La planta no cumple los requerimientos del patógeno, por lo que no es hospedadora para el mismo.

2) La planta presenta barreras estructurales preexistentes o compuestos tóxicos que impiden la penetración de gran número patógenos, por lo que sólo algunas especies patógenas especializadas podrán llevar a cabo con éxito la infección.

3) Tras el reconocimiento del patógeno, la planta responde activando sus mecanismos de defensa, con lo que consigue mantener la invasión localizada.

Los tres tipos de interacciones descritos se consideran **incompatibles**, pero sólo el último caso de resistencia depende de respuestas inducidas.

Sin embargo, el patógeno a veces consigue invadir la planta y causar la enfermedad, en cuyo caso se habla de interacción **compatible**. Esto puede suceder porque las defensas preformadas de la planta fueran inapropiadas, que la planta no detectara al patógeno o que las respuestas de defensa activadas fueran insuficientes.

Dentro del tercer tipo que implica reacciones de defensa inducidas en respuesta al ataque del patógeno, se pueden diferenciar dos tipos de resistencia, en cuanto a los mecanismos por los que se desencadenan dichas reacciones. El más generalizado, pero menos estudiado, es por el que las plantas responden a los agentes potencialmente patógenos sin que exista, al menos aparentemente, una relación directa gen a gen, conocida como **respuesta de resistencia inespecífica, o incompatibilidad básica**. En este caso diversas proteínas, glicoproteínas y oligosacáridos de origen bacteriano o fúngico pueden desencadenar las reacciones de defensa en la planta. El otro tipo de interacción es menos frecuente e implica la resistencia específica de una raza o cultivar mediante el llamado modelo **gen a gen**. Este mecanismo está genéticamente definido por las interacción directa o indirecta entre el producto de un gen de avirulencia del patógeno (*avr*), de carácter dominante, y el producto complementario correspondiente al gen de resistencia (*R*), también dominante o semidominante, de la planta, con lo que la presencia o ausencia de la resistencia específica de una raza o cultivar a un patógeno depende de los genotipos de ambos organismos. Parece que los productos de los genes *avr* tienen funciones estratégicas en la patogenicidad o metabolismo del patógeno, que son reconocidos por los productos de los genes *R*, que han surgido durante la coevolución del patógeno y la planta hospedadora, haciéndola resistente. A pesar de estas diferencias en el inicio de la respuesta (inespecífica o específica), los procesos bioquímicos que se desencadenan en la planta en ambos casos son muy similares (Somssich y Hahlbrock, 1998).

2.2 Reacciones de defensa

La primera línea de defensa es la superficie de la planta, puesto que el patógeno ha de penetrar a través de ella para causar la infección. Algunas de las barreras estructurales son

constitutivas de la planta, independientes de cualquier contacto previo con patógenos. Esas estructuras incluyen la cera y la cutícula que cubren las células epidérmicas, que pueden variar en cantidad y calidad, las paredes celulares de dichas células, y, por último, la presencia en la planta de tejidos protegidos por paredes celulares gruesas que obstaculicen el avance del patógeno.

Análogamente a lo descrito para las defensas estructurales, la planta puede presentar ciertos mecanismos de defensa bioquímica de carácter constitutivo, como sería por ejemplo la exudación de compuestos fungitóxicos, capaces de inhibir el desarrollo de ciertos hongos patógenos, o la presencia en su interior de otras sustancias inhibidoras

Sin embargo, esas medidas preexistentes no son suficientes para una gran mayoría de agentes patógenos, que logran penetrar en el hospedador y producir diversos grados de infección. La planta responde entonces a la presencia del patógeno con otros recursos. A nivel estructural y desde el punto de vista macroscópico se producen modificaciones histológicas que pueden impedir el avance del patógeno e incluso la difusión de posibles sustancias tóxicas secretadas por este, mediante la formación de estructuras aislantes como serían las capas de corcho, capas de abscisión en el caso de lesiones foliares, tilosis en los vasos xilémicos, depósitos de sustancias gomosas alrededor de las lesiones, etc. A nivel celular se pueden producir cambios morfológicos en la pared celular de las células afectadas. Así, por ejemplo, la pared celular de células epidérmicas o subepidérmicas puede experimentar engrosamientos durante la penetración de un patógeno. Igualmente, la pared celular puede invaginarse y recubrir las hifas que la penetran con una especie de vaina que las rodea e impide su progresión. A estos cambios estructurales se suman los complejos mecanismos bioquímicos que conducen a la producción de compuestos antimicrobianos de diversa naturaleza. Estos se inducen como resultado de un complicado sistema de señales y procesos de transducción y resultan en la puesta en marcha de un completo arsenal de defensa.

Uno de los mecanismos más eficaces de resistencia inducida es la llamada **respuesta necrótica o de hipersensibilidad (HR)**, que puede proteger a la planta frente a hongos,

bacterias y virus. Es un mecanismo de efecto múltiple puesto que además de activar los distintos mecanismos de defensa de la planta, conduce a la muerte rápida de unas pocas células en el lugar de la infección, lo que tiene por objetivo aislar al patógeno y provocar su muerte. Esta activación puede incluso resultar en la inducción de una resistencia sistémica de amplio espectro contra patógenos virulentos, llamada **resistencia sistémica adquirida (SAR)**, que puede durar desde semanas hasta meses después de la infección (Ryals *et al.*, 1996).

En los procesos de respuesta de la planta frente al posible agente patógeno cabe distinguir tres fases principales que implican una gran complejidad a nivel funcional, espacial y temporal (Somssich y Hahlbrock, 1998):

2.2.1 Reconocimiento del patógeno

Un prerequisite fundamental para una respuesta de defensa eficaz es el rápido reconocimiento del agente potencialmente invasor. Este se puede llevar a cabo a través de moléculas señal específicas, denominadas de modo general “**elicitores**” por su capacidad para inducir la respuesta de defensa en la planta. Estos elicitores pueden proceder del patógeno (elicitores exógenos) o de la propia pared celular de la planta (endógenos). Normalmente son moléculas de bajo peso molecular, de estructura química muy variada - principalmente oligosacáridos, (glico)proteínas o ácidos grasos-, que se sintetizan como tales o que pueden ser desprendidos de precursores poliméricos durante la infección. La gran variedad de moléculas que pueden actuar como elicitores constituye el primer nivel de la gran complejidad de este proceso. Como ejemplo cabe citar que se han detectado dos tipos distintos de elicitores de *Phytophthora sojae*, un heptaglucano y un oligopéptido que pueden desencadenar la respuesta de defensa en soja y perejil, respectivamente, mediante su unión específica con distintos receptores de membrana (Somssich y Hahlbrock, 1998).

Dentro de los elicitores oligosacáridicos se han identificado cuatro clases principales: oligoglucanos, oligoquitina y oligoquitosán de origen fúngico, y oligogalacturónidos de origen vegetal (Ebel y Mithöfer, 1998)

2.2.2 Transducción de la señal

Las primeras reacciones detectadas en respuesta a los elicitores son la apertura de canales iónicos específicos y la formación de especies de oxígeno activo como O_2^- , H_2O_2 y OH^\cdot , probablemente mediante la actividad de NAD(P)H oxidasas asociadas a membrana y/o peroxidasas apoplásticas (Wojtaszek, 1997). Estas reacciones iniciales parecen disparar una compleja cascada de señales, que incluyen cambios en la polaridad de la membrana, cambios en las concentraciones citosólicas de Ca^{2+} y H^+ , y la regulación alostérica de enzimas como fosfolipasas, NAD(P)H oxidasas, fosfatasas, y quinasas, que finalmente desencadenan la respuesta de defensa en su conjunto (Yang *et al.*, 1997).

Es posible que alguno de estos mecanismos actúe como señal y como arma defensiva simultáneamente. Así, por ejemplo, concentraciones altas y localizadas de especies reactivas de oxígeno pueden participar directamente en la muerte del patógeno y de la célula vegetal afectada -respuesta hipersensible- (Lamb y Dixon, 1997), mientras que dosis bajas pueden actuar como señales para la inducción de mecanismos detoxificantes que implican a superóxido dismutasas -SOD- y glutatión-S-transferasas, y la activación de otras reacciones de defensa en las células vecinas. Además, la producción masiva de H_2O_2 en la superficie celular conduce, mediante la acción de la peroxidasa, a un entrecruzamiento de las proteínas estructurales de la pared celular, reforzando así la barrera física frente a la entrada del patógeno. De otro lado, el componente O_2^- de los intermediarios de oxígeno reactivo actúa en los procesos de transducción de señales en paralelo a la activación de las cascadas de quinasas y fosfatasas (Ligterink *et al.*, 1997) (Ver Figura 3).

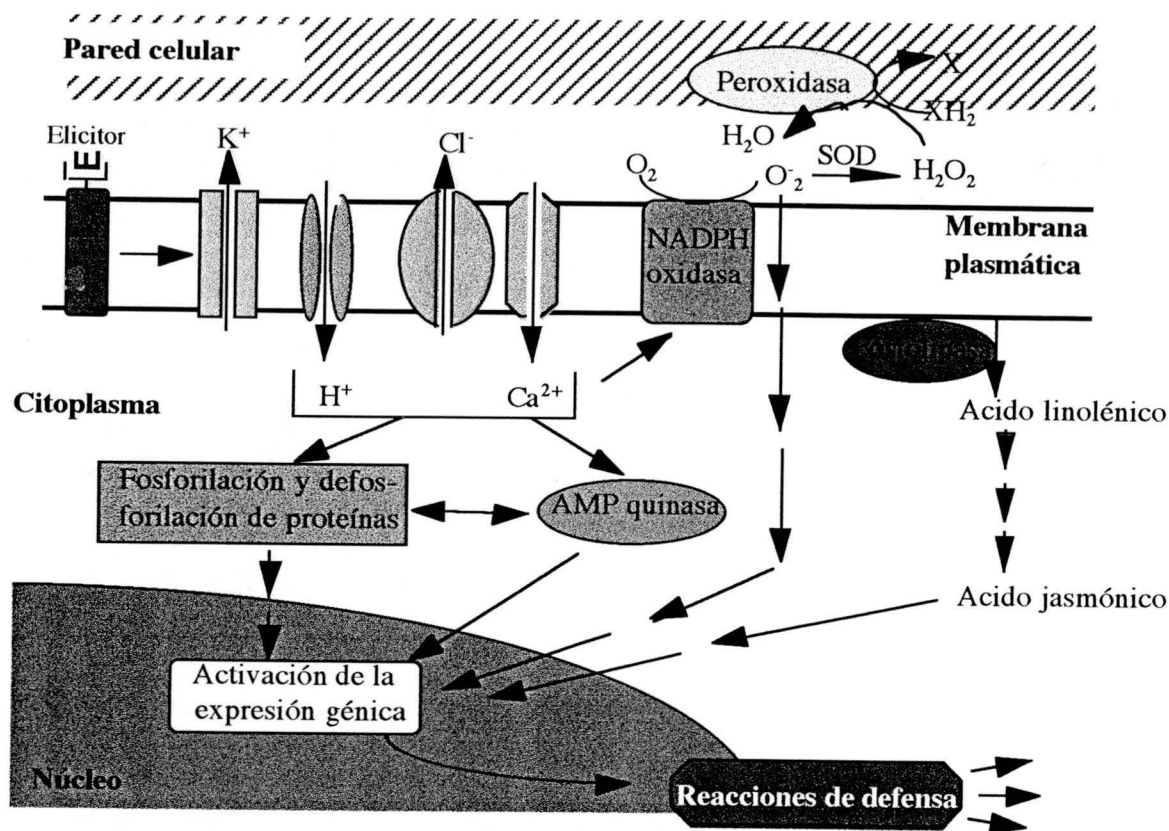


Figura 3. Principales componentes de la cadena de transducción de señales desde la percepción del elicitor hasta la activación génica en células de cultivo de perejil (Somssich y Hahlbrock, 1998).

2.2.3 Cambios en la actividad génica

Uno de los principales objetivos de todos estos procesos de transducción de señales es el núcleo, donde pueden provocar grandes cambios en los patrones de expresión génica. La acumulación de ARN mensajeros de los genes activados localmente alrededor de los sitios de infección se detecta después de varios minutos o pocas horas de ésta, y para los genes de respuesta sistémica varias horas después. La identificación funcional de muchos de los genes inducibles en respuesta a los elicitores ha demostrado su implicación en varios procesos bioquímicos del metabolismo primario y secundario, por lo que es difícil discernir el papel que desempeñan los distintos productos a nivel individual.

Como consecuencia de la inducción de las reacciones de defensa se produce una fuerte estimulación del metabolismo secundario, como, por ejemplo, de la vía de los

sesquiterpenoides y, especialmente, la de los fenilpropanoides (fenil-alanina-amonio liasa o PAL). Esta estimulación conduce a la formación de compuestos fenólicos de bajo peso molecular con actividad antimicrobiana conocidos como **fitoalexinas**, o a compuestos como lignina, suberina, callosa, fenoles, silicona y glicoproteínas ricas en hidroxiprolina (HPRG) que refuerzan la pared celular dificultando la entrada de los microorganismos (Hammond-Kosack y Jones, 1996). En muchas plantas se induce localmente en el sitio de infección, o de forma sistémica, la síntesis masiva y rápida de un amplio conjunto de **proteínas de defensa** conocidas como **PRs** ("pathogenesis related"). Este grupo engloba distintas clases de proteínas no relacionadas estructural ni funcionalmente, cuya actividad, en muchos casos desconocida, y en otros de carácter hidrolítico (quitinasas, glucanasas, lisozimas, etc...) parece contribuir a la resistencia de la planta contra bacterias, hongos, nemátodos y virus (Van Loon, 1997).

Aparte de los metabolitos que presentan propiedades antifúngicas, otros pueden actuar como moléculas señal, como es el caso del **ácido salicílico**, que parece ser una molécula clave en los procesos de comunicación intercelular de larga distancia. Estos procesos pueden resultar en cierta inmunidad frente a infecciones posteriores por un amplia gama de patógenos, incluso en tejidos no infectados, lo que se denomina resistencia sistémica adquirida (SAR).

Como se deduce de lo anterior, los componentes de la respuesta de defensa inducida a veces están confinados al área infectada, y en otras ocasiones se extienden a zonas adyacentes e incluso alejadas, lo que demuestra la compleja organización espacial de la respuesta (Somssich y Hahlbrock, 1998). Esta complejidad espacial se observa también a nivel intracelular. Las moléculas señal implicadas en la reacción de defensa, como el salicilato y el etileno, inducen diferencialmente distintas isoformas de las proteínas PR, que pueden presentar localizaciones subcelulares distintas, frecuentemente la vacuola o el espacio apoplástico, y que pueden desempeñar funciones muy variadas. Además se producen reorganizaciones internas en las células infectadas que implican una rápida depolimerización de la red microtubular alrededor de los sitios de penetración del hongo y la

traslocación del núcleo y el citoplasma de la célula mediante los filamentos de actina, observándose un influjo de Ca^{2+} , con todas sus consecuencias, entre las primeras reacciones detectadas en células tratadas con elicitores.

Todos los cambios descritos ocasionan, indirectamente, la inducción y represión de distintas actividades básicas a fin de mantener equilibrado el metabolismo general, mediante el reajuste de numerosos parámetros del metabolismo primario y secundario. La reacción de defensa supone, por tanto, un cambio general en el metabolismo de la planta más que la alteración de la expresión de unos pocos genes implicados en defensa. Parece que el éxito de la respuesta de defensa depende en mayor medida de la velocidad y la extensión de la respuesta en su conjunto, incluyendo la muerte celular por la respuesta hipersensible, que de la presencia o ausencia de cualquier metabolito específico. La información existente sugiere que estas respuestas pretenden englobar todos los mecanismos disponibles para formar el mayor arsenal de defensa frente al mayor número de patógenos posible.

Para hacer frente a la reacción de defensa, el patógeno debe desarrollar mecanismos para evitar el reconocimiento por el hospedador o interferir con los mecanismos de defensa de la planta. Una de sus estrategias es la producción de supresores de las respuestas de defensa, que pueden interferir cualquiera de las etapas de estas reacciones: el reconocimiento del elicitador, la transducción de la señal, la activación génica o la actividad de los factores de defensa.

2.2.4 Aplicaciones prácticas de la inducción de respuestas de defensa

La capacidad para desencadenar total o parcialmente el proceso de defensa no es exclusivo de las moléculas mencionadas en el apartado 2.2.1. (las producidas por el patógeno -elicitores exógenos- o liberadas en la planta - elicitores endógenos-). Aparte de éstas, se ha visto que algunos de los compuestos implicados en la SAR son inducidos por diversos compuestos químicos de síntesis, y también, de manera no específica, por

distintos agentes bióticos y abióticos, situaciones de estrés ambiental, mutaciones genéticas o sinergismos entre varios agentes.

Este aspecto despierta un gran interés en cuanto que la expresión constitutiva de determinados mecanismos de defensa, o bien su inducción por compuestos químicos o microorganismos no patógenos, podría ser aplicada para la protección de los cultivos. De hecho esta vertiente aplicada ha sido un estímulo para el intenso desarrollo que esta línea de investigación ha experimentado en los últimos años (Olivares y Sanjuan, 1997).

Las rizobacterias no patogénicas, especialmente las promotoras del crecimiento, son capaces de provocar en la planta una resistencia sistémica similar fenotípicamente a la SAR inducida por patógenos, efectiva frente a hongos, virus y bacterias, y que se ha llamado Resistencia Sistémica Inducida (ISR). Una vez activada, se mantiene por periodos prolongados de tiempo. Aunque a veces el uso de los términos ISR y SAR ha llevado a confusión en la literatura científica, existen ciertas diferencias. Mientras que la SAR es dependiente de ácido salicílico como molécula señal y aparece asociada a la acumulación de PRs, la ISR no es dependiente de salicílico y normalmente no conlleva acumulación de PRs (Van Loon *et al.*, 1998).

Tras conocerse la capacidad de microorganismos no patogénicos y beneficiosos para desencadenar SAR o ISR en distintos sistemas vegetales, la posibilidad del uso de este tipo de microorganismos, especialmente de las rizobacterias promotoras del crecimiento, como agentes de control biológico de enfermedades en plantas es una atractiva línea de investigación (Kloepper *et al.*, 1992, 1993). Evidentemente el manejo de los microorganismos con estos fines no es fácil, puesto que implica la superación de múltiples dificultades relacionadas tanto con la caracterización del microorganismo y su aislamiento, como con su posterior incorporación al complejo sistema suelo-planta, ya que en el medio edáfico, como se describe en el apartado 1.1., los delicados equilibrios existentes entre las distintas comunidades microbianas pueden dificultar el establecimiento del microorganismo que se desea introducir.

Hay otro aspecto fundamental a considerar respecto a la aplicación de la inducción de resistencia sistémica para la protección de los cultivos, y es su repercusión en la interacción de la planta con microorganismos beneficiosos capaces de establecer simbiosis mutualísticas con la misma. Tal es el caso, fundamentalmente, de las micorrizas o de la asociación *Rhizobium*-leguminosa, ya que ambas simbiosis implican la colonización de los tejidos de la raíz por el microsimbionte (Olivares y Sanjuan, 1997).

3. MICORRIZAS

3.1 Concepto general y tipos de micorrizas

Las micorrizas son asociaciones mutualistas que se establecen entre plantas terrestres y determinados hongos del suelo. Se estima que aproximadamente el 90% de las especies vegetales existentes pueden formar micorrizas, y que unas 6000 especies de hongos son capaces de colonizar la raíz de la planta para establecer la simbiosis. Esta gran biodiversidad de los organismos implicados da lugar a numerosos tipos de micorrizas, que son normalmente clasificadas en base a criterios morfológicos, fisiológicos y taxonómicos. Se pueden distinguir así seis tipos definidos que se engloban en tres grupos fundamentales según la estructura de la micorriza formada: Ectomicorrizas o formadoras de manto; ectendomicorrizas, que incluye arbutoides y monotropoides y endomicorrizas, caracterizadas por la colonización intracelular del hongo, y que incluye ericoides, orquidoides y arbusculares (Read, 1999). A pesar de esta diversidad, todas ellas presentan características comunes, como es la limitación de la zona de colonización por el hongo al cortex de la raíz, no penetrando nunca la endodermis y por tanto, el cilindro vascular. No inducen además reacciones típicas de defensa en la planta, característica que las diferencia de las infecciones producidas por hongos patógenos (Azcón-Aguilar y Barea, 1996).

Las ectomicorrizas se caracterizan por un gran desarrollo del micelio del hongo en la superficie de la raíz hospedadora, la cual puede llegar a estar completamente englobada por ese "manto" fúngico. Esta capa gruesa de hifas proporciona un nicho ecológico favorable

para el desarrollo de ciertos microorganismos y parece proteger a la raíz del ataque de patógenos radicales (Read, 1999). Algunas hifas del manto penetran en los espacios intercelulares de los tejidos más externos de la raíz formando una red de hifas entre las células corticales llamada red de Hartig. No se produce, sin embargo, colonización intracelular por parte del hongo. Este morfotipo de micorriza es exclusivo de especies arbóreas, tanto Gimnospermas como Angiospermas, la mayoría de ellas de gran interés forestal. Los hongos que las forman son mayoritariamente Ascomicetos y Basidiomicetos, y más raramente Zigomicetos (Barea, 1990).

Las ectendomicorrizas parecen constituir un tipo intermedio entre ecto- y endomicorriza, ya que comparten características de ambas. Presentan hifas inter e intracelulares, y en algunas ocasiones, también manto, aunque poco desarrollado. Los hongos implicados parecen pertenecer a los Discomicetos, y las plantas pueden ser Angiospermas o Gimnospermas, normalmente en sus estadios juveniles. Dentro de este grupo se incluyen las micorrizas arbutoides y monotropoides, formadas entre ciertos Basidiomicetos y plantas pertenecientes al género *Arbutus* o a la familia Monotropaceae, respectivamente.

Las micorrizas ericoides y orquidoides se consideran dentro de las llamadas endomicorrizas de acuerdo a su estructura, puesto que colonizan intracelularmente las células de la epidermis y del córtex de la raíz. Las plantas que las forman pertenecen a las familias Ericaceae y Orchidaceae, respectivamente, siendo los hongos formadores Ascomicetos y Basidiomicetos.

Por último, tenemos las micorrizas arbusculares, las más ampliamente distribuidas en la naturaleza, que se describen a continuación con mayor detalle por constituir el pilar fundamental de este trabajo de investigación.

3.2 Micorrizas arbusculares

Las micorrizas arbusculares son el tipo de micorriza de más amplia distribución geográfica y las más abundantes en la naturaleza, ya que lo establecen entre el 80 y el 90% de las especies vegetales estudiadas hasta la fecha, entre ellas, la mayoría de las que presentan interés agronómico. Se encuentran por tanto en agrosistemas, ecosistemas modificados y ecosistemas naturales. En contraste con el alto número de especies botánicas que forman este tipo de simbiosis, se estima que la pueden originar solamente unas 150 especies de hongos, encuadrados generalmente en cinco géneros (*Acaulospora*, *Entrophospora*, *Gigaspora*, *Scutelospora* y *Glomus*), todos de la familia Endogonaceae, dentro del orden Glomales, perteneciente a la clase Zigomicetos.

Las micorrizas arbusculares (MA) constituyen la simbiosis microbio-planta más antigua que se conoce, prevaleciendo desde el principio de la evolución de las plantas terrestres. Una vez que se ha establecido la asociación, puede perdurar durante toda la vida de la planta hospedadora. Los hongos formadores de MA (hongos MA) son biotrofos obligados puesto que sólo completan su ciclo de vida en presencia de la planta hospedadora. Esta asociación no es, en principio, específica, puesto que cualquiera de los hongos MA puede colonizar cualquiera de las plantas susceptibles de formar la simbiosis. Sin embargo, a pesar de esta no especificidad en sentido estricto, algunos hongos MA benefician en mayor grado a un determinado hospedador que otros, y fundamentalmente, muestran un cierto grado de adaptación para establecer la micorriza y funcionar bajo determinadas condiciones edafo-climáticas.

3.2.1 Formación

En ausencia de planta hospedadora, el hongo se mantiene en el suelo en forma de esporas de resistencia o hifas conectadas a raíces micorrizadas (micorrizas en sentido estricto) preexistentes. Su ciclo de vida empieza con la germinación de las esporas de resistencia cuando las condiciones ambientales son favorables. La germinación de las

esporas no requiere la presencia de la planta hospedadora, aunque puede verse estimulada por la presencia de sus exudados radicales. También está influida por determinados microorganismos del suelo y, fundamentalmente, por las condiciones físico-químicas del mismo. A partir del tubo de germinación el hongo desarrolla un micelio que se extiende por el suelo de forma radial y errática hasta alcanzar la rizosfera de una planta hospedadora. Si no encuentra una raíz susceptible de ser colonizada para poder continuar su ciclo vital, la espora retrae el citoplasma de las hifas producidas y entra de nuevo en estado de quiescencia. Una vez que las hifas alcanzan la rizosfera de una raíz susceptible su crecimiento se ve notablemente estimulado por los exudados radicales existentes en la zona (Azcón-Aguilar *et al.*, 1999). Se induce una ramificación profusa del micelio y a partir de ahí el crecimiento de las hifas ya no es errático, sino que son atraídas hacia la rizoplana. Al entrar en contacto con la superficie de la raíz, la hifa infectiva aumenta de tamaño en su parte apical y forma un apresorio sobre las células epidérmicas. A partir de éste se produce la hifa de penetración que marca el inicio de la colonización de la raíz. La penetración puede ocurrir a través de los pelos radicales o bien entre o a través de las células epidérmicas, pero nunca por zonas dañadas o a través de heridas (Barea *et al.*, 1991) a diferencia de lo descrito para gran cantidad de patógenos. Los mecanismos de entrada del hongo en la raíz parecen ser una suma de procesos mecánicos, por la presión ejercida por la hifa de penetración (Smith y Read, 1997), y enzimáticos, mediante la producción de enzimas pectinolíticos y celulolíticos por parte del hongo. Estos enzimas se producen en pequeñas cantidades, por lo que no llegan a producir la degradación total de las paredes celulares de la raíz, sino tan solo la desorganización de sus componentes (García Romera *et al.*, 1996). Por otro lado recientemente se ha descrito un aumento en la expresión de un gen que parece codificar una xiloglucan endotransglicosilasa que podría estar implicado en la relajación de la pared celular del hospedador durante la colonización (van Buuren *et al.*, 1999)

Aunque los modelos de colonización varían algo dependiendo de las especies de hongo y planta implicados, la colonización de la corteza radical por un hongo mA transcurre, generalmente, según el siguiente modelo: La hifa de penetración se extiende, avanza por entre las células de la epidermis, o a través de ellas, hacia la corteza de la raíz, y

con frecuencia forma en el interior de las células más externas de ésta unas circunvoluciones no ramificadas llamadas ovillos (Barea *et al.*, 1991). Para ello, una vez superada la pared celular, la hifa produce la invaginación de la membrana plasmática de la célula hospedadora, quedando completamente envuelta por ella sin llegar nunca a penetrarla. Posteriormente, la hifa alcanza la corteza media a través de los espacios intercelulares, o bien por paso célula a célula. Una vez allí, el hongo se desarrolla intercelularmente, actuando la hifa sobre la lámina media, abriéndose paso entre ella, ramificándose y recorriendo longitudinalmente la raíz, por lo que la colonización se extiende rápidamente. Este modelo de colonización descrito corresponde al que se denomina micorriza tipo *Arum*, el formado por la mayoría de las plantas de climas templados. Existe otro modelo de colonización, denominado *Paris*, que lo presentan las plantas, tropicales en su mayoría, que no dejan canales intercelulares, en los que la extensión del hongo dentro de la raíz se produce, mucho más lentamente, mediante el paso célula a célula.

En las capas más internas del parénquima cortical las hifas intercelulares se ramifican lateralmente, penetran en las células y se dividen de forma dicotómica repetida, formando unas estructuras con forma de árbol características de este tipo de simbiosis, llamadas arbusculos. En las micorrizas tipo *Paris* los arbusculos se originan de forma similar, pero a partir de las propias hifas intracelulares. En cada célula se forma un sólo arbusculo, que se encuentra rodeado totalmente por la membrana plasmática de la célula hospedadora, con lo que se consigue un gran aumento en la superficie de contacto entre el hongo y la planta. A este nivel la pared celular del hongo queda reducida a un mínimo, y experimenta un cambio en su estructura, que pasa a ser amorfa por la desaparición de la estructura fibrilar de la quitina. La interfase que se forma a nivel del arbusculo es la más especializada de la simbiosis y es aquí en donde se asume que tiene lugar preferentemente el intercambio de nutrientes entre la planta y el hongo (Blee y Anderson, 1998). La vida media de los arbusculos es muy corta, entre 4 y 10 días (Alexander *et al.*, 1988) y pasado este tiempo, los arbusculos degeneran, se retrae el citoplasma de las hifas más finas, se produce el colapso de las mismas y queda en la célula una masa de material fúngico desorganizado que más tarde es reabsorbida y finalmente acaba por desaparecer (Barea *et al.*, 1991).

Las hifas pueden formar además unas estructuras globosas, de alto contenido lipídico, conocidas como vesículas, que parecen funcionar como órganos de reserva (Barea *et al.*, 1991). La existencia y el número de vesículas depende de la especie fúngica, y de forma característica, algunos hongos MA son incapaces de formarlas.

Tras el establecimiento de los primeros arbuscúlos, las hifas externas del hongo se fortalecen y ramifican intensamente, constituyendo el micelio externo que se extiende en el suelo y es capaz de explorar un volumen del mismo inaccesible a las raíces. De esta forma aumenta considerablemente la superficie de absorción de la planta y su capacidad para captar nutrientes y agua más allá de la zona de agotamiento que se crea alrededor de las raíces. Algunas de las hifas extraradicales darán lugar a nuevas esporas de resistencia, cerrándose así el ciclo de vida del hongo.

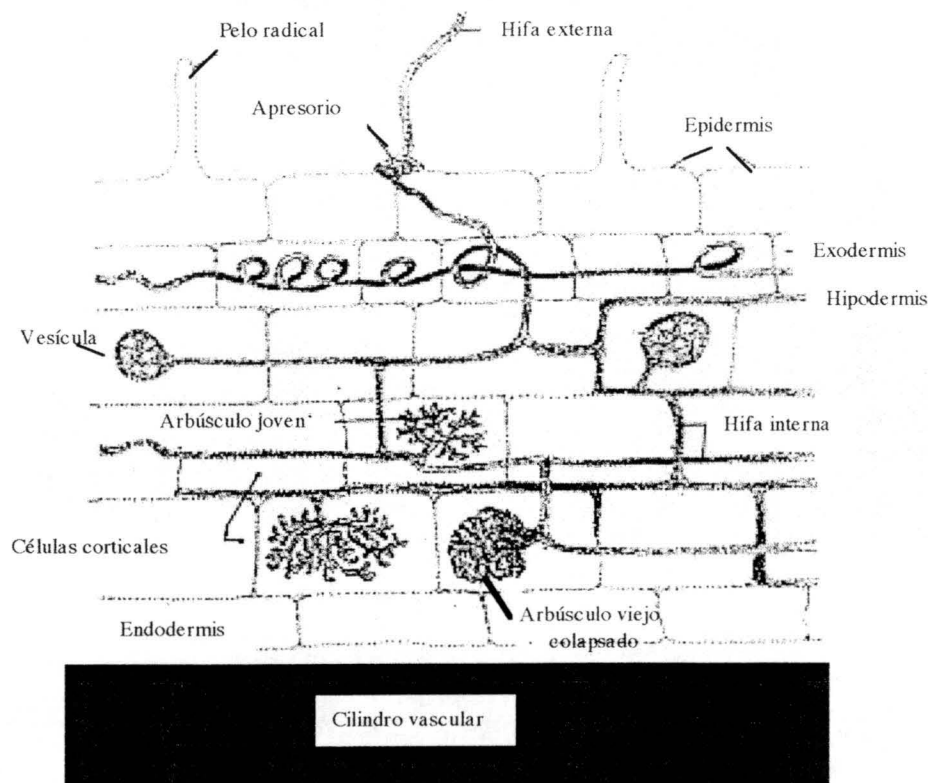


Figura 4. Desarrollo de la colonización radical por el hongo MA.

3.2.2 Regulación

3.2.2.1 Factores que afectan a su formación

La formación de las MA comporta un sistema complejo de interacciones entre suelo, planta y hongo. El hongo le confiere agregación al suelo o sustrato en el que se encuentra, de él capta el P y otros nutrientes que transloca hacia la planta hospedadora. La planta libera exudados radicales y restos orgánicos al suelo, del cual absorbe agua y nutrientes minerales, ya sea directamente o a través del hongo que forma la micorriza, al que aporta hidratos de carbono para su desarrollo. Toda esta complejidad explica que sean muchos los factores que afecten al establecimiento y la funcionalidad de la simbiosis. Cualquier alteración en el ecosistema puede provocar cambios en el potencial infectivo de MA en el suelo, lo que a su vez, y debido al papel que juegan las micorrizas en el mantenimiento de la estructura y diversidad de las comunidades vegetales (Sanders et al., 1998-nature) puede contribuir a disminuir la estabilidad del ecosistema. Los factores que pueden influir en la formación de las micorrizas y su funcionamiento se engloban, de modo general, en cinco grupos:

1) **Factores edáficos y físicos.** Estos factores pueden afectar a la simbiosis actuando en todas las fases del proceso de colonización, desde la germinación de las esporas, y el crecimiento de las hifas en el suelo, hasta el desarrollo de la colonización de la raíz y la eficacia de la simbiosis. Los factores de este tipo más importantes son el pH del suelo, la humedad, la temperatura y la intensidad de la luz.

El **pH** es determinante para la presencia de los hongos MA y para la efectividad de la simbiosis, condicionando la germinación de las esporas y la capacidad de colonizar las raíces. Por otro lado, el pH puede tener un efecto indirecto afectando a la absorción de P o influyendo en el vigor y estado nutritivo de la planta. La mayoría de las especies de hongos MA son capaces de germinar en un rango de pH favorable para el crecimiento de la mayoría de las plantas, aunque algunas están especialmente adaptadas a pHs ácidos, mientras que otras sólo son capaces de desarrollarse en suelos neutros o alcalinos.

El *potencial hídrico* del suelo también influye porque aunque las esporas pueden germinar en condiciones de humedad elevada, la colonización de las raíces se reduce considerablemente. En el otro extremo, es necesario un mínimo de humedad en el suelo para que se produzca la germinación de las esporas.

Aunque la *temperatura* también afecta a la germinación de las esporas y el crecimiento de las hifas, los hongos MA parecen adaptarse a este factor, puesto que se ha descrito una estrecha relación entre la T^a óptima de germinación de las esporas y la T^a media del suelo del que se aíslan. En general se ha observado que las T^a altas suelen promover el desarrollo de los hongos en las raíces de las plantas (Nemec, 1987).

La *intensidad de luz* y la duración del fotoperiodo influye en la esporulación del hongo y en la colonización de la planta. Mientras que fotoperiodos cortos e intensidades de luz bajas favorecen la germinación de las esporas, los fotoperiodos largos y luminosidad elevada favorecen la colonización de las raíces y la efectividad de la simbiosis (Nemec, 1987), probablemente a través de un aumento de la tasa fotosintética de la planta.

Puesto que el suelo es el nicho natural de los hongos MA, y de la propia micorriza, la pérdida de suelo inherente a los procesos de *erosión*, o cualquier proceso que conduzca a la pérdida de calidad de los mismos afecta negativamente al desarrollo normal de las MA.

2) **Microorganismos del suelo.** Las poblaciones de hongos MA se ven afectados por otros microorganismos de la rizosfera. Esta influencia puede ser negativa, como es la ejercida por organismos que se alimentan de hifas o esporas de los hongos MA, reduciendo por lo tanto el potencial infectivo y consecuentemente la colonización de la raíz y la efectividad de la simbiosis. Dentro de las interacciones negativa hay que incluir también los casos descritos de fungistasis hacia los hongos MA que inhiben la germinación de las esporas en el suelo. De otro lado se han descrito interacciones sinérgicas con otros microorganismos del suelo, y se ha puesto de manifiesto el efecto positivo de éstos sobre la germinación, el crecimiento de las hifas (Azcón-Aguilar *et al.*, 1986a, Mayo *et al.*, 1986), y la colonización de la raíz (Azcón-Aguilar *et al.*, 1986b). Por su parte, los hongos MA

alteran cuantitativa y cualitativamente las poblaciones microbianas de la rizosfera, bien directamente por la presencia de sus hifas en el entorno, que pueden servir de nicho ecológico para otros microorganismos, o bien por los cambios fisiológicos que inducen en las plantas micorrizadas que se reflejan en alteraciones en la exudación radical, lo que implica, en último extremo, cambios en los equilibrios microbianos. Ese nuevo ambiente alrededor de la raíz micorrizada se conoce como micorrizosfera.

Las interacciones sinérgicas entre hongos MA y otros microorganismos rizosféricos revisten un especial interés. En numerosos trabajos de investigación se ha puesto de manifiesto que bacterias beneficiosas, como fijadoras de N₂ libres o simbióticas (Barea *et al.*, 1983), solubilizadoras de fosfatos (Toro *et al.*, 1998) o promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) (Meyer y Linderman, 1986), y en algunas ocasiones hongos saprofiticos como los del género *Trichoderma* (Calvet *et al.*, 1992, 1993) muestran un efecto sinérgico con los hongos MA favoreciendo el desarrollo de la planta. No se ha determinado si ambos tipos de organismos interaccionan directamente en la rizosfera o si lo hacen indirectamente a través de cambios fisiológicos en la planta hospedadora. Las evidencias sugieren que puede producirse cooperación a ambos niveles, tanto en la fase de vida libre en la rizosfera en la que uno de los microorganismos puede favorecer el establecimiento o la capacidad de colonización del otro, como a nivel de su interacción con la planta hospedadora, actuando por mecanismos de diversa índole, como puede ser la mejora nutritiva, producción de hormonas, etc... (Azcón-Aguilar y Barea, 1992). La capacidad de algunos microorganismos del suelo de facilitar la formación de la micorriza esta siendo explotada desde el punto de vista práctico. A dichos microorganismos se les considera genericamente "microorganismos auxiliares de la micorrización" (De Oliveira y Garbaye, 1989).

Como se ha indicado anteriormente algunos microorganismos pueden sin embargo tener un efecto supresivo sobre la formación de micorrizas y sobre la respuesta del hospedador. Es posible que fallos en el establecimiento de los hongos MA en determinados ecosistemas sean debidos a competencia microbiana y a supresión de la colonización micorrícica.

3) **Planta hospedadora.** El grado de dependencia de las micorrizas que presenta una planta para alcanzar un crecimiento óptimo, llamado grado de micotrofia, está condicionado fundamentalmente por su genotipo aunque existen diversos factores externos (medioambientales) que pueden modular la respuesta de la planta a la micorrización (Figura 5). Hay familias enteras de plantas que no son hospedadoras de los hongos MA, ni forman ningún otro tipo de simbiosis micorrícica, denominadas autotróficas. Este carácter puede asociarse con propiedades antifúngicas intrínsecas de la planta, como la vía metabólica glucosinolato-mirosinasa (Capparales) o la producción de betalainas en lugar de antocianinas (Caryophyllales). En estos casos la aparición de la "autotrofia" habría sido una necesidad derivada de la evolución de estos sistemas metabólicos antifúngicos que, además de afectar a hongos patógenos, afectan a los hongos simbioses, aunque aún no se ha concluido sobre la existencia de un mecanismo general que sea responsable de la falta de susceptibilidad de las plantas no hospedadoras.

Otros grupos de plantas aparecen como micotrofas obligadas puesto que no pueden crecer adecuadamente sin formar la simbiosis, cualquiera que sea el nivel de fertilidad del suelo o el sustrato de crecimiento. En este grupo se encuentran, por ejemplo, los cítricos y una gran mayoría de árboles frutales. Sin embargo, la gran mayoría de las plantas son micotrofas facultativas, puesto que normalmente forman la simbiosis pero según las condiciones, pueden crecer sin ella. Son plantas que se encuentran en una situación intermedia entre las dos extremas anteriormente citadas. Dentro de este grupo podemos definir grados de dependencia de cada una de las especies, e incluso cultivares o ecotipos, respecto a la micorrización, apareciendo ciertas tendencias hacia una mayor o menor micorrización según el hábitat de la planta y el nivel de fertilidad del suelo.

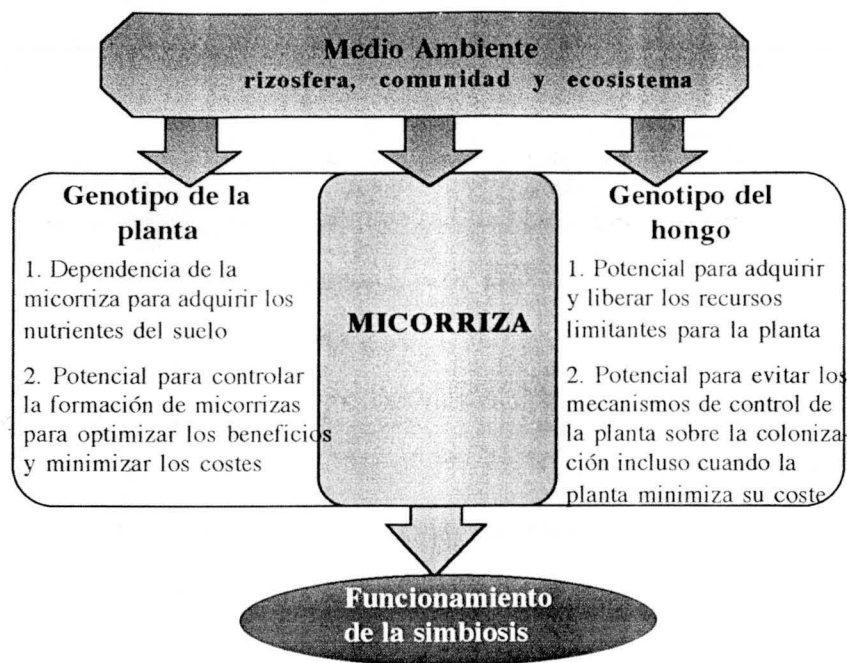


Figura 5. El fenotipo final de la micorriza es la manifestación de la interacción entre los genotipos de la planta y del hongo y las condiciones ambientales que determinan el funcionamiento de la simbiosis y su ubicación en el continuo delimitado por el mutualismo y el parasitismo (modificado de Johnson *et al.*, 1997).

4) **Factores nutricionales.** Los hongos formadores de micorrizas necesitan carbono y energía para el mantenimiento de su biomasa y de sus actividades metabólicas, por lo que cuanto más activo es el hongo transfiriendo nutrientes a la planta, mayor demanda de carbohidratos requiere de la misma. Así, en algunos casos, la planta limita la colonización por el hongo y su funcionamiento cuando el coste de la simbiosis es mayor que el beneficio que la planta obtiene de ella (Azcón-Aguilar y Bago, 1994), o cuando la planta no necesita al hongo por ser las condiciones nutricionales óptimas. La efectividad de la simbiosis es máxima cuando el suelo es muy deficiente en P, y se hace menos evidente a medida que incrementa la fertilidad, produciéndose una disminución de la colonización de las raíces en suelos con niveles altos de P (Plenchette *et al.*, 1983).

5) **Prácticas culturales.** Otro factor condicionante de la formación de micorrizas son las prácticas de cultivo. Son muchos los aspectos a considerar a este respecto, entre ellas

los tipos de sustrato empleados, las prácticas de irrigación, la presencia de metales pesados, la rotación de cultivos, la labranza del suelo y los trasplantes.

Cualquier práctica que conlleve alteraciones del perfil edáfico y que facilite la erosión, como ya se ha indicado, afecta negativamente la formación de micorrizas.

En cualquier caso, las prácticas con una mayor repercusión directa sobre el establecimiento de la simbiosis es la aplicación de fertilizantes y plaguicidas, por lo que sus efectos más destacados se resumen a continuación.

Fertilizantes: La adición de materia orgánica compostada parece favorecer el desarrollo de la colonización MA en algunas plantas. La adición de fertilizantes inorgánicos, que favorecen el crecimiento de las plantas, puede tener un efecto positivo sobre las MA cuando el nivel de fertilidad de partida en el suelo sea muy bajo, o cuando la aplicación del fertilizante sea reducida, o la liberación de nutrientes gradual. Sin embargo los fertilizantes inorgánicos pueden influir negativamente en la producción de esporas y en el desarrollo de la micorriza cuando se utilizan en exceso. Un incremento en los niveles de P asimilable por encima de los requeridos por las plantas puede deprimir la producción de esporas y la colonización de las raíces (Plenchette *et al.*, 1983). Las plantas pueden dejar de micorrizarse cuando su contenido en P sea elevado (Smith y Read, 1996). Algunos trabajos (Cuenca y Azcón, 1994) muestran un efecto negativo de la fertilización nitrogenada sobre la micorrización, pero este efecto parece depender de la forma de N aplicada, las condiciones del suelo y la disponibilidad de P. Otro efecto indirecto de la adición de fertilizantes es que éstos pueden producir alteraciones cualitativas y cuantitativas en las poblaciones microbianas de la rizosfera, y éstas, como ya se ha indicado, desempeñan un papel fundamental en la formación y funcionamiento de las micorrizas.

Productos fitosanitarios: Los tratamientos de desinfección del suelo afectan a los hongos formadores de MA. La aplicación de productos fitosanitarios, tan extendida por otra parte, puede tener un efecto muy negativo sobre las poblaciones de hongos MA y sobre la formación y funcionamiento de la simbiosis. Muchos de los fungicidas más

utilizados afectan negativamente a la simbiosis MA, mientras que otros parecen no afectarla, e incluso, bajo condiciones determinadas, pueden incrementar la colonización y el desarrollo de las MA. La fumigación del suelo con biocidas como bromuro de metilo, cloropicrina, formaldehído, Metam-Na (Vapam) y vorlex eliminan los endofitos de la zona tratada (Ocampo, 1994), aunque transcurrido algún tiempo los hongos son capaces de reintroducirse y colonizar los suelos de nuevo. Dentro de los distintos tipos de fungicidas, los sistémicos, como grupo, son los más tóxicos hacia los hongos MA (Nemec 1980; Menge, 1982), puesto que bien en el suelo, bien al traslocarse dentro del hospedador, pueden actuar directamente sobre los hongos MA, o afectarlos indirectamente alterando la fisiología de la raíz. Parece determinante en su efecto la forma de aplicación, ya que los fungicidas aplicados foliarmente tienden a no afectar tanto la formación de micorrizas como los que se aplican directamente al suelo (Trappe *et al.*, 1984). Sin embargo, en ocasiones se ha descrito que fungicidas sistémicos antioomicetes, como el Metalaxil y el Fosetil-Al, pueden estimular la formación de MA (Jabaji-Hare y Kendrick, 1987). Además se cree que algunos fungicidas no sistémicos que no actúan directamente sobre los hongos MA podrían en algunos casos estimularlos indirectamente al reducir la competencia en la rizosfera y creando un medio favorable para la colonización del hospedador. En resumen, es difícil sacar conclusiones sobre las repercusiones de la aplicación de fungicidas en los cultivos puesto que los resultados pueden variar según el fungicida de que se trate, la planta hospedadora sobre la que se aplique, la dosis de éste y el tiempo de exposición de los hongos al mismo, además de la falta de un método estandarizado para la evaluación de su efecto (Kling y Jacobsen, 1998).

Aún menos conocido es el efecto de otros productos fitosanitarios como herbicidas, insecticidas, nematicidas, etc. Algunos herbicidas muestran un fuerte efecto inhibitor sobre la formación de MA. Insecticidas y nematicidas tienen también efectos variables. Mientras que algunos nematicidas parecen estimular la formación de micorrizas, probablemente por la reducción de las poblaciones de nemátodos y otros depredadores de hifas y esporas de los hongos MA, otros muestran un efecto depresor.

3.2.2.2 Mecanismos de regulación

El funcionamiento de la simbiosis MA implica un alto grado de coordinación y de integración morfo-fisiológica entre los dos simbiontes. Esta compleja interacción ha de estar basada en un diálogo celular y molecular continuo que permita el reconocimiento mutuo y la regulación de la colonización de la raíz por el hongo (Gianinazzi, 1991), aunque la naturaleza de las señales implicadas y su modo de actuación apenas empiezan a descifrarse. Puesto que la simbiosis micorrízica no es específica, ya que una misma especie fúngica puede colonizar numerosas especies vegetales, se ha sugerido que las moléculas señal estén muy conservadas en plantas, o que se reconozcan un gran número de compuestos (Koide y Schreiner, 1992).

Parece aceptado que el reconocimiento entre ambos simbiontes, y por tanto el intercambio efectivo de señales, ha de realizarse durante las distintas etapas de la interacción: 1) A nivel rizosférico, que se manifiesta mediante la estimulación del desarrollo del hongo por los exudados radicales de plantas micotróficas; 2) Cuando se producen los primeros contactos célula-célula, que conducen a la formación de apresorios sobre la epidermis radical de plantas hospedadoras; 3) A nivel de la zona colonizada, puesto que el hongo experimenta una morfogénesis diferencial según la zona de la corteza colonizada, y por último 4) en estadios más avanzados para alcanzar la integración de la fisiología de ambos simbiontes y la redistribución de actividades enzimáticas implicadas en la transferencia de nutrientes (Barea *et al.*, 1991).

El intercambio de señales y el reconocimiento entre ambos simbiontes empiezan antes de que tenga lugar el contacto físico, durante la fase extraradical de desarrollo del hongo. Entre los compuestos propuestos como moléculas señal en estas primeras etapas de la simbiosis están los flavonoides, los isoflavonoides y los compuestos fenólicos, que parecen promover el crecimiento independiente del micelio, pero su función como verdaderos inductores del establecimiento de la simbiosis está en entredicho, puesto que su ausencia no previene la formación de la micorriza (Becard *et al.*, 1995). Antes de entrar en contacto con la raíz, las hifas del micelio se ramifican profusamente. Esta ramificación, sin embargo, sólo

es inducida por plantas hospedadoras. Giovannetti y colaboradores (1996) han descrito la existencia de moléculas de origen vegetal y naturaleza desconocida, con un peso molecular menor de 500 Da, capaces de inducir esta respuesta de reconocimiento.

Cuando el hongo establece contacto con la raíz se forma el apresorio, a partir del cual se origina la hifa de penetración. El uso de fragmentos purificados de la pared celular de plantas hospedadoras y no hospedadoras, en ausencia de células intactas, ha permitido concluir que para la formación del apresorio no es necesaria una señal citoplasmática. Tan solo se requiere un sitio adecuado para la adhesión de la hifa a la pared, y éste vendría determinado por caracteres químicos y/o topológicos de ésta, puesto que se desarrollaron apresorios sobre las paredes de células epidérmicas de plantas hospedadoras y no en las de células del cilindro vascular de estas plantas ni en la pared de distintos tipos celulares de plantas no hospedadoras (Nagasahi y Douds, 1997). En el caso de plantas micotróficas esta fase de contacto no produce ninguna respuesta incompatible, mientras que en plantas mutantes resistentes a la micorrización (myc^-) el hongo forma el apresorio pero su penetración se bloquea por componentes fenólicos depositados en las paredes de las células expuestas a la colonización (Gollote *et al.*, 1993).

Los primeros estudios sobre los mecanismos básicos de la respuesta de las plantas a la colonización por hongos MA se han basado en el análisis diferencial de polipéptidos solubles de raíces micorrizadas o no. Estos han mostrado la existencia de numerosas modificaciones cualitativas y cuantitativas en distintos estadios de la interacción planta-hongo (Dumas *et al.*, 1990; Arines *et al.*, 1993; Benabdellah *et al.*, 1998). Los polipéptidos inducidos por la simbiosis MA se han llamado "micorrícinas" en referencia a las nodulinas, actinorrícinas, haustorinas y ectomicorrícinas de otras interacciones (Verma *et al.*, 1992; Roberts *et al.*, 1993; Seguin y Lalonde, 1993). El análisis electroforético mono (Schellenbaum *et al.*, 1992) y bidimensional (Samra *et al.*, 1997) de extractos proteicos de plantas de guisante sensibles (myc^+) y resistentes (myc^-) a la micorrización ha permitido la detección de proteínas inducibles en el genotipo sensible (myc^+) en respuesta a la colonización con hongos MA, que no aparecen en el mutante. Estos datos parecen

confirmar la existencia de genes de la simbiosis en la planta, puesto que cuando éstos están mutados se observa la resistencia de las raíces al hongo MA, caracterizada por una fuerte expresión de los sistemas de defensa de la planta. La expresión de estos genes simbióticos sería constitutiva en las plantas susceptibles, y podría ejercer el control de la expresión de los genes de defensa en las interacciones simbióticas (Gollote *et al.*, 1993). Su represión en mutantes myc^- estaría asociada a la incompatibilidad de la interacción por la resistencia de la planta (Gianinazzi *et al.*, 1995). Se ha especulado con la posibilidad de que estos genes simbióticos sean comunes a otros tipos de simbiosis, en concreto a la establecida entre leguminosas y bacterias del género *Rhizobium*. Puesto que ambas simbiosis presentan similitudes a distintos niveles, se ha postulado la existencia de mecanismos conservados entre ambas. Se ha descrito la reacción cruzada de anticuerpos frente a nodulinas con polipéptidos de plantas micorrizadas (Wyss *et al.*, 1990), y la presencia de ciertas nodulinas se ha confirmado en raíces micorrizadas (Van Rhjin *et al.*, 1997; Frühling *et al.*, 1997). Además de estos indicios, la conservación de ciertas señales y respuestas en los dos tipos de simbiosis se ha visto apoyada a nivel genético por la existencia de mutantes de guisante y haba con incapacidad para formar nodulos ($nod^- fix^-$) o formadoras de nódulos inefectivos ($nod^+ fix^-$), que son incapaces de formar micorrizas arbusculares (myc^-) (Duc *et al.*, 1989). Posteriormente se han identificado otros mutantes en diferentes especies de leguminosas con nodulación ineficiente o defectiva que presentan carácter myc^- caracterizado por un bloqueo de la formación de la micorriza a distintos niveles (Bradbury *et al.*, 1991; Sagan *et al.*, 1995; Shirtliffe y Vessey 1996, Wegel *et al.*, 1998). Entre los mutantes myc^- se distinguen fundamentalmente los myc^{-1} , cuando la planta reacciona al hongo MA como lo haría frente a un patógeno, es decir, inhibiendo la colonización en la etapa inicial, tras la formación del apresorio (Gollote *et al.*, 1995, 1996) y los myc^{-2} , cuando son capaces de desarrollar la colonización del parénquima cortical con hifas intercelulares pero son defectivos en la formación de arbusculos (Gollote, 1994). Ninguno de los mutantes myc^- presentan mayor resistencia a patógenos, lo que sugiere que la mutación afecta a un gen simbiótico y no a un regulador positivo de los mecanismos de defensa.

Reacciones de defensa frente a hongos MA

En términos generales puede decirse que la planta hospedadora controla el desarrollo de la colonización de las raíces por el hongo MA. El desarrollo de las hifas y de los arbusculos está restringido a las células del parénquima cortical, y el hongo nunca coloniza el cilindro central ni los meristemas. En los últimos años se han llevado a cabo numerosos trabajos en relación a la inducción de mecanismos de defensa típicos durante la simbiosis MA, para lo que han resultado de gran utilidad los mutantes resistentes a la formación de la micorriza (myc^{-1}) puesto que en ellos se activa la respuesta defensiva de la planta tras las etapas iniciales de reconocimiento y formación del apresorio.

Es obvio que los hongos MA no pueden inactivar la reacción de defensa de la planta de modo general, porque en ese caso la planta micorrizada sería más vulnerable al ataque de cualquier patógeno. Por el contrario el proceso de reconocimiento como simbionte (o el bloqueo de la defensa) deberá empezar a cada nuevo contacto celular, resultando en la represión puntual de los mecanismos de defensa o en su modulación (Barker *et al.*, 1998).

En general, la colonización de una planta hospedadora por hongos micorrícicos induce una cierta activación de los mecanismos relacionados con procesos de defensa, aunque dicha activación es localizada y temporal, desapareciendo en estadios tardíos de la colonización.

A continuación se pasa a pormenorizar algunos de los mecanismos implicados en defensa que han sido estudiados en relación a la formación de micorrizas:

Modificaciones de la pared celular: De modo general no se detecta respuesta del hospedador a nivel celular en los primeros estadios de formación del apresorio y colonización de los tejidos externos de la raíz. Ocasionalmente se han observado engrosamientos de la pared celular en el punto de contacto con el apresorio en algunas plantas como el tomate, pero su textura es normal, sin indicios de acumulación de callosa ni fenoles como ocurre en respuesta a patógenos (Gianinazzi-Pearson *et al.*, 1996). Sólo se detectan alteraciones acompañando el desarrollo del arbusculo en la deposición de material

que forma la matriz interfacial entre los dos simbioses, aunque esos cambios no corresponden a una reacción de defensa típica. Sí se ha descrito un aumento de la expresión de genes que codifican para glicoproteínas ricas en hidroxiprolina (HPRG) (Franken y Gnädinger, 1994), que han sido detectadas alrededor de las hifas arbusculares (Bonfante-Fasolo *et al.*, 1991; Balestrini *et al.*, 1997). También se han descrito incrementos transitorios de actividad peroxidasa -enzima implicada en el reforzamiento de la pared celular en las reacciones de defensa- sobre todo en estadios iniciales de la simbiosis, decreciendo posteriormente hasta niveles basales, e incluso inferiores a los de plantas no micorrizadas (Spanu y Bonfante-Fasolo, 1988; Spanu *et al.*, 1989b). Se han localizado también algunas cadenas dispersas de β -1,3-glucanos, componentes de la callosa, en el material parietal depositado por la planta alrededor del sitio de penetración de las hifas en las células del parenquima cortical (Gianinazzi-Pearson *et al.*, 1996). Por el contrario, también se ha detectado la inhibición de la expresión de un gen que codifica para proteínas ricas en prolina, implicadas en conferir rigidez a la pared celular, en plantas micorrizadas (Lapopin, 1999)

Ruta del fenilpropanoico.- Esta ruta es activada comúnmente en las reacciones frente a patógenos. Implica a enzimas como la fenilalanina amonio liasa -PAL-, chalcona sintasa-CHS-, isoflavona reductasa -IFR- y chalcona isomerasa -CHI-, dando lugar a un amplio abanico de compuestos como fitoalexinas (antimicrobianos), flavonoides e isoflavonoides (moléculas señal), precursores de lignina, suberina y ácidos fenólicos (refuerzos de la pared) y ácido salicílico (señal). En las interacciones micorrícicas se han encontrado incrementos transitorios de PAL y CHS durante los primeros estadios de la simbiosis (Lambais y Mehdy, 1993, Volpin *et al.*, 1994, 1995, Harrison y Dixon 1993) aunque su expresión parece restringida a las células que contienen arbusculos (Harrison y Dixon, 1994, Blee y Anderson 1996). Sin embargo las enzimas IFR y CHI no parecen afectarse durante la micorrización (Bell *et al.*, 1986). Sí se ha observado un cierto aumento de compuestos fenólicos como las fitoalexinas, los flavonoides y los ácidos fenólicos solubles totales (Morandi, 1996), aunque su elicitación parece muy débil y ocurre más tarde que en las reacciones frente a patógenos (Morandi *et al.*, 1984; Harrison, 1997).

Maier y colaboradores (1995) describieron la acumulación continuada de terpenoides glucosidos durante la colonización de cebada por *G. intraradices*, y la acumulación transitoria de amidas en los primeros estadios de la micorrización. Más tarde Peipp *et al.* (1997) sugirieron que la acumulación de amidas refleja la iniciación de la respuesta de defensa ante la penetración del hongo, que es subsecuentemente reprimida.

Proteínas PR: Las primeras investigaciones sobre proteínas PR en la simbiosis MA mostraron la acumulación local alrededor de los arbusculos de una proteína relacionada con el grupo PR1a en las raíces de tomate colonizadas por *G. mosseae* (Gianinazzi-Pearson *et al.*, 1988, 1992), y más tarde se confirmó la acumulación de transcritos de PR1a en raíces micorrizadas de perejil (Franken y Gnädinger, 1994) y guisante (Dassi *et al.*, 1996). Varios autores han descrito una inducción transitoria de actividades quitinasa y β -1,3-glucanasa en las raíces de diferentes especies vegetales (Spanu *et al.*, 1989; Lambais y Mehdy, 1993; Volpin *et al.*, 1994, Kapulnik *et al.*, 1996). La inducción de quitinasas parece ocurrir durante las primeras etapas de la simbiosis (Spanu *et al.*, 1989; Lambais y Mehdy, 1993), para caer en estadios posteriores a niveles más bajos que los de las raíces no micorrizadas (Spanu *et al.*, 1989; Lambais y Mehdy 1993). También se ha descrito la reducción de la expresión en raíz de una quitinasa básica durante la simbiosis con *G. intraradices* en judía (Lambais y Mehdy, 1993) y tabaco (David *et al.*, 1998). Mediante técnicas de hibridación *in situ* se ha detectado la acumulación de transcritos de quitinasa y β -1,3-glucanasa en células que contienen arbusculos (Blee y Anderson, 1996; Lambais y Mehdy, 1995, 1998). También se ha descrito un incremento de la transcripción de los genes de estas enzimas en el inicio de la interacción planta-hongo MA, seguido por una fuerte represión de los mismos, corroborando la inhibición de la síntesis de las enzimas citadas en estadios tardíos de la colonización (Lambais y Mehdy, 1993). Las paredes celulares de los hongos MA contienen quitina (Bonfante-Fasolo *et al.*, 1990) y β -1,3-glucanos (Lemoine *et al.*, 1995), por lo que se ha propuesto que las quitinasas y β -1,3-glucanasas inducidas durante la simbiosis tengan un papel regulador del desarrollo fúngico en la raíz (Lambais y Mehdy, 1995). Otros autores, sin embargo, consideran la activación de estas enzimas como una respuesta inespecífica de la raíz ante la invasión (Gianinazzi-Pearson *et al.*, 1996), ya que

se cuestiona la accesibilidad de las enzimas al micelio fúngico debido a diferencias en la compartimentación celular (normalmente localización extracelular para las isoformas ácidas y vacuolar para las básicas). Además se ha comprobado que la sobreexpresión de algunas proteínas PR (de las familias PR1, PR2, PR3 y PR4) en plantas transgénicas aunque confiere resistencia frente a patógenos no previene ni altera los niveles de colonización de dichas plantas por hongos arbúsculares (Vierheilig *et al.*, 1994; 1995; Tahiri-Aloui *et al.*, 1994). Este hecho parece indicar la capacidad de los hongos MA de evitar determinados mecanismos de defensa.

La conclusión general de estos trabajos es que la colonización de la raíz por el hongo MA inicia la respuesta de defensa de la planta, pero de forma débil, transitoria y localizada, quedando rápidamente bloqueada, por lo que los mecanismos de control de la planta sobre el desarrollo del hongo siguen sin conocerse. Puesto que la capacidad del hongo para inducir estas respuestas de defensa se ha confirmado en las planta mutantes incapaces de establecer la simbiosis (*myc⁻*), parece necesaria la existencia de un mecanismo de represión de dicha respuesta para permitir la colonización en las plantas susceptibles. Esta represión estaría relacionada con la inducción de genes simbióticos, que podrían prevenir la elicitación de la respuesta defensiva, o bien podrían bloquearla una vez producida. Se especula con distintas posibilidades (Gianinazzi-Pearson *et al.*, 1996):

- Que los productos de los genes simbióticos, mediante la activación por algún compuesto del hongo, limiten directamente la expresión de los genes de defensa.
- Que los productos de los genes simbióticos induzcan en el hongo la síntesis de un compuesto supresor que bloquee la respuesta de defensa en la planta.
- Que distintas fitohormonas, cuyas concentraciones pueden verse alteradas en las raíces micorrizadas, sean las que actúen como señal en la supresión de la respuesta de defensa.

Puesto que los datos indican una inducción transitoria de los mecanismos de defensa en los primeros estadios de la simbiosis, que disminuye o desaparece en las etapas tardías de la formación de los arbusculos, cabe la posibilidad de que este fenomeno este relacionado con la carencia de elicitores activos en dichos estadios, ya que la morfología y la composición química de la pared fúngica a nivel del arbusculo es extremadamente simple (Gianinazzi-Pearson *et al.*, 1996).

El equilibrio entre los mecanismos de represión o inhibición de la respuesta defensiva y el control del desarrollo del microorganismo simbiote en la planta son la clave de la compatibilidad y funcionalidad de la asociación (Blilou, 1998).

3.2.3 Fisiología de la simbiosis

La mayoría de los cambios estructurales y morfológicos producidos en la planta por el establecimiento de la simbiosis están esencialmente ligados a aspectos nutricionales, puesto que la base fundamental de esta simbiosis es un intercambio bidireccional de nutrientes, sobre todo a nivel del arbusculo. El hongo se provee de compuestos carbonados procedentes de la fotosíntesis, y compensa a la planta mediante la captación de nutrientes del suelo, fundamentalmente fósforo, pero también nitrógeno y otros nutrientes poco móviles como K, Cu y Zn. El micelio fúngico actúa por tanto como una superficie adicional de captación de nutrientes, que facilita en gran medida su absorción en situaciones de baja o moderada fertilidad. La planta micorrizada explora mayores volúmenes de suelo ya que las hifas del hongo son capaces de superar la zona de agotamiento en nutrientes que rodea la raíz y explorar microhabitats que son inaccesibles a la raíz propiamente dicha (Smith y Read, 1997).

Aparte de las acciones debidas al aporte de nutrientes, las micorrizas arbusculares afectan al desarrollo de las plantas actuando mediante mecanismos de diversa indole. Aunque en algunos casos los cambios provocados en la fisiología de la planta hospedadora no tienen realmente una base nutricional directa, en muchas ocasiones es difícil descartar un

efecto indirecto de la mejora nutritiva. Entre los efectos “colaterales” o “no-nutritivos” de los MA cabe destacar por su importancia para la salud y el desarrollo de la planta los siguientes:

a) Alteraciones en las relaciones hídricas de la planta, incrementando su resistencia a la sequía. Estos efectos pueden ejercerse a través de la influencia de las MA alternando el potencial hídrico de las hojas, disminuyendo la resistencia al transporte del agua, aumentando la transpiración, etc... (Barea, 1991; Sanchez-Díaz y Honrubia, 1994).

b) Cambios en las relaciones hormonales, que pueden resultar, por ejemplo, en modificaciones de la arquitectura radical (Berta *et al.*, 1995; Hooker *et al.*, 1994).

c) Aumento de la tasa fotosintética, que podría estar parcialmente justificada por los cambios hormonales inducidos (Wright *et al.*, 1998), aunque también es bien conocido que el P es un factor regulador de la fotosíntesis. Este incremento podría compensar el “coste” de la simbiosis, que supone de un 5 a un 10% del carbono total asimilado por la planta.

d) Alteraciones en la distribución de fitomasa, incrementando la relación parte aérea / raíz. Como se ha indicado anteriormente, el sistema radical experimenta igualmente cambios en su arquitectura.

e) Mayor resistencia de las plantas a la salinidad. Se han propuesto distintos mecanismos que pueden justificar este efecto, entre ellos un incremento en la proporción K^+/Na^+ en plantas micorrizadas (Allen, 1983). Este incremento en la cantidad de K^+ en relación al Na^+ produce una disminución del efecto negativo del Na^+ en los tejidos de la planta.

f) Incremento de la tolerancia de la planta a patógenos que afectan al sistema radical. Debido a la importancia de este efecto en el contexto del presente trabajo de investigación, este aspecto se considera con mayor detalle en el apartado 4 de esta Introducción.

g) Incremento de la tolerancia de la planta a la presencia de metales pesados. En general la micorriza actúa como factor amortiguador de las variaciones de metales pesados en el suelo, favoreciendo su absorción cuando se encuentra a niveles subóptimos, como se ha descrito para el Cu y el Zn, o fijándolos, reduciendo la concentración de los mismos disponibles a la planta cuando se encuentran a niveles supraóptimos (Díaz *et al.*, 1996).

En general se considera a las micorrizas arbusculares como agentes antiestrés, que ayudan a la planta a superar situaciones desfavorables, mientras que su papel en situaciones óptimas de crecimiento deja de ser relevante. En este sentido se han descrito incrementos en la supervivencia a trasplantes de plantas micorrizadas (Azcón-Aguilar y Barea, 1997) y mejoras en el establecimiento y supervivencia de las plantas en ecosistemas degradados (Jeffries y Barea, 1994).

En resumen se acepta en la actualidad que la simbiosis micorrícica juega un papel importante en la sostenibilidad de los ecosistemas facilitando no solo la supervivencia de la planta en situaciones de estrés, sino incluso aumentando su productividad en condiciones adversas (Mosse, 1986).

4. MICORRIZAS ARBUSCULARES Y PROTECCIÓN FRENTE A PATÓGENOS

En el contexto del desarrollo de métodos de control biológico son muchos los trabajos realizados en relación a la capacidad de las micorrizas para reducir los síntomas de enfermedades causadas por diversos patógenos.

A lo largo de la investigación sobre micorrizas arbusculares han aparecido numerosas revisiones que recopilan la información disponible sobre micorrizas arbusculares y control biológico (Schönbeck, 1979; Dehne, 1982; Bagyaraj, 1984; Schenck, 1987; Smith, 1987; Zambolin, 1987; Caron, 1989; Jalali y Jalali, 1991; Sharma *et al.*, 1992; Hooker *et al.*, 1994; Linderman, 1994; St Arnaud *et al.*, 1995 y Azcón-Aguilar y Barea, 1996, entre otras). A pesar de la heterogeneidad de los sistemas experimentales usados, en líneas generales los trabajos muestran el efecto protector de las micorrizas frente a enfermedades de la raíz

causadas por hongos, bacterias y nemátodos, y, por el contrario, parecen favorecer las enfermedades virales y fúngicas en las hojas (St Arnaud *et al.*, 1995).

En relación a enfermedades que afectan a la **parte aérea**, no son muchos los estudios al respecto. Los resultados son muy variables, desde la ausencia de efecto de la simbiosis MA hasta un aumento de la cantidad de patógeno o de los síntomas de la enfermedad provocada por hongos o virus (Perrin, 1991; Linderman, 1994; St-Arnaud *et al.*, 1995). Este aumento de la sensibilidad de la planta a parásitos foliares o del tallo podría ser consecuencia del mejor estado nutritivo de la misma, que permitiría un desarrollo mayor del parásito en los tejidos, además de un aumento en la frecuencia de la infección (Dehne, 1982). La mejora en la nutrición de la planta puede estimular las actividades celulares, entre ellas la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos, lo que podría estimular la multiplicación de las partículas virales y favorecer la extensión de la infección en la planta hospedadora (Perrin, 1991, St-Arnaud *et al.*, 1995). De hecho, en algunos casos se ha demostrado un mayor número de partículas víricas en planta (Linderman *et al.*, 1994; St Arnaud *et al.*, 1995). Sin embargo, trabajos recientes realizados sobre lino y el patógeno aéreo *Oidium lini* muestran que las plantas micorrizadas, a pesar de presentar una mayor tasa de esporulación del hongo y una mayor incidencia de la enfermedad, se mostraron más tolerantes en términos de peso, asimilación de carbono y contenido en azúcares (Dugassa *et al.*, 1996).

Con respecto al efecto de la simbiosis MA frente a **bacterias** patógenas se han realizado pocos trabajos. García-Garrido y Ocampo (1988, 1989) mostraron que los daños causados por *Pseudomonas syringae* y *Erwinia carotovora* en tomate son significativamente reducidos cuando la planta está micorrizada, produciéndose una disminución en la población de los patógenos en la micorrizosfera.

La literatura describe resultados contradictorios sobre interacciones entre micorrizas y **nemátodos** fitoparásitos. La mayoría de los trabajos se centran en los nemátodos agalladores, principalmente del género *Meloidogyne*, mientras que hay pocas referencias sobre los efectos de la micorrización frente a nemátodos endoparásitos migratorios (lesionadores - *Pratylenchus spp.*) (Pinochet *et al.*, 1996). Se ha descrito un efecto inhibitor

o supresivo de la micorriza sobre nemátodos agalladores (*Meloidogyne spp.*), y en algunos casos sobre nemátodos migratorios, como por ejemplo en frutales atacados por *Pratylenchus* (Pinochet *et al.*, 1993b, 1995). Este efecto podría estar mediado por alteraciones bioquímicas que afecten a la penetración, desarrollo y reproducción del nemátodo. Sin embargo en otras situaciones no se ha observado ningún efecto directo de la micorrización sobre el nemátodo, en cuyo caso los efectos beneficiosos serían indirectos, posiblemente relacionados con la mejora del estado nutricional de la planta hospedadora. El incremento en tolerancia que puede conferir la micorriza frente a nemátodos fitoparásitos parece depender del grado de dependencia a la micorrización de la planta en cuestión (Pinochet *et al.*, 1995 y 1996). En determinados estudios, como el realizado por Vaast *et al.* (1998) en plantas de café, se ha descrito incluso una mayor densidad de nemátodos lesionadores en las raíces de plantas micorrizadas, aunque las lesiones en la raíz eran menos numerosas y más localizadas, por lo que la tolerancia al patógeno parece incrementada.

La mayoría de los trabajos en relación a micorrizas arbusculares y fitoprotección se han realizado frente al ataque de hongos patógenos de la raíz. En aproximadamente un 70% de los casos se ha puesto de manifiesto una disminución de los síntomas de la enfermedad causada por hongos como *Phytophthora*, *Gaeumannomyces*, *Fusarium*, *Thielaviopsis*, *Pythium*, *Rhizoctonia*, *Sclerotium*, *Verticillium*, *Aphanomyces*..., mientras que en un 10% de los estudios se ha encontrado un mayor desarrollo de la enfermedad. En casi todos los casos, sin embargo, el número de propagulos del patógeno en el suelo se mantenía o disminuía (St Arnaud *et al.*, 1995). El efecto bioprotector frente a hongos patógenos se ha confirmado en experimentos de campo (Datnoff *et al.*, 1995, Torres-Barragán *et al.*, 1996). Debido al interés que resenta en el planteamiento de la presente investigación, los trabajos en relación a la protección ejercida por las MA frente a patógenos del género *Phytophthora* se discuten en el apartado 4.2.2.

En resumen, los trabajos realizados indican que la simbiosis puede reducir el efecto perjudicial de numerosos patógenos de la raíz, aunque el incremento en la resistencia/tolerancia no es generalizable ya que la efectividad varía con el hongo micorrícico

implicado, el patógeno, el sustrato de crecimiento y las condiciones ambientales. Sí parece generalizable que la simbiosis debe de estar establecida y ser funcional antes de la invasión por el patógeno para que se manifieste el efecto protector. Parece recomendable además utilizar conjuntamente micorrizas y otros agentes de control biológico (Paulitz y Linderman, 1991, Datnoff *et al.*, 1995, Nemeček *et al.*, 1996), desarrollando así sistemas micorrizosféricos apropiados en desarrollar una acción integrada (ciclado de nutrientes y protección para la planta). En este sentido hay un razonable interés en bacterias implicadas en control biológico, particularmente PGPR (*Pseudomonas*, *Bacillus*, *Agrobacterium*, etc...) y en hongos con actividad antifúngica frente a otros hongos (*Trichoderma*, *Gliocladium*, etc...) ya que se ha evidenciado que estos agentes de control biológico que antagonizan hongos patógenos, no suelen hacerlo, e incluso pueden beneficiar a los hongos de la micorriza (Azcón-Aguilar y Barea, 1996; Barea *et al.*, 1998).

4.1 Mecanismos implicados en el efecto protector

A pesar de que como se acaba de indicar son numerosos los estudios sobre el efecto profiláctico de las micorrizas frente a patógenos del suelo, los mecanismos implicados en estos procesos aún no se conocen con exactitud, aunque su estudio constituyen una línea de investigación de gran actualidad.

Aunque en un principio se explicó este efecto sólo en base a la mejora inducida en la nutrición de la planta, en la actualidad se conoce que algunos de los cambios bioquímicos, fisiológicos y estructurales de la raíz asociados a la formación de la micorriza podrían justificar, en cierta medida, el efecto protector frente a patógenos. Igualmente, los cambios inducidos en la rizosfera de la planta tras el establecimiento de la simbiosis pueden explicar la reducción del potencial infectivo en el suelo encontrado para algunos patógenos. La intervención real de los posibles mecanismos no se conoce (Azcón-Aguilar y Barea, 1996). Probablemente la bioprotección resulte de la conjunción de varios mecanismos diferentes que pueden operar en mayor o menor grado según el sistema planta-patógeno de que se

trate y las condiciones en que se desarrolle, lo que explicaría la diversidad de resultados descritos en la literatura. Los mecanismos propuestos son básicamente los siguientes:

a) Mejora del estado nutritivo de la planta hospedadora. Aunque cabría pensar que la mejora podría producir un aumento de la infección al brindar la planta al patógeno mayor cantidad de nutrientes, también es previsible que un mejor estado nutritivo promueva plantas más vigorosas, lo que se vería reflejado en una mayor resistencia o tolerancia a patógenos. Puesto que el principal efecto de las micorrizas es a nivel de la nutrición fosforada, muchos trabajos han explicado la mayor resistencia a enfermedades en base a unos niveles más altos de fósforo en la planta, siendo esta la hipótesis más manejada en un principio (Davis *et al.*, 1978; Davis y Menge, 1980). Trabajos posteriores, sin embargo, han demostrado que este no es el único mecanismo implicado, al demostrar que plantas no micorrizadas suplementadas con fósforo hasta niveles equivalentes a los encontrados en las plantas micorrizadas no mostraban el mismo nivel de tolerancia/resistencia ante los patógenos que las micorrizadas (Caron *et al.*, 1986; Trotta *et al.*, 1996). De otro lado, la superficie adicional de absorción de nutrientes que representa la micorriza puede compensar, al menos parcialmente, la reducción del sistema radical provocada por el patógeno (St. Arnaud *et al.*, 1995; Azcón-Aguilar y Barea, 1996).

b) Competencia por fotosintatos: Ambos hongos han de competir por los fotosintetizados de la planta. Si la micorriza se establece antes de que tenga lugar la infección por el patógeno el hongo MA tendrá un acceso prioritario a los compuestos carbonados y el crecimiento del patógeno podrá verse inhibido (Linderman, 1994; Azcón-Aguilar y Barea, 1996).

c) Competición por sitios de infección y/o colonización. Los hongos MA y el patógeno pueden colonizar los mismos tejidos de la planta hospedadora, aunque normalmente no las mismas células (Dehne, 1982, Cordier *et al.*, 1996). Esto implicará una competición por sitios de infección y colonización. Los trabajos más recientes de Cordier y colaboradores (1996) muestran una exclusión del hongo patógeno de las células ocupadas por el hongo MA e incluso de las adyacentes.

d) Modificaciones anatómicas y en la arquitectura radical: la presencia del hongo MA induce modificaciones anatómicas, como un aumento de la lignificación de las células endodérmicas, que podrían dificultar la penetración del patógeno (Dehne y Schönbeck, 1979). Hooker y colaboradores (1994) sugieren que los cambios intensos en la arquitectura del sistema radical promovidos por la colonización por los hongos MA y que se manifiestan por un aumento importante de raíces de un orden elevado (mayor ramificación), y por una reducción de la longevidad del sistema radical, podría tener cierta influencia en la infección por el patógeno y el desarrollo de la enfermedad al desacoplar el ciclo vital de los mismos con la dinámica de producción de raíces.

e) Modificaciones de la rizosfera: Como ya se ha indicado anteriormente la colonización de las raíces de la planta hospedadora por los hongos MA provoca modificaciones en la fisiología de la misma que pueden repercutir en la composición de los exudados radicales (Bansal y Mukerji, 1994; Azcón-Aguilar y Barea, 1996). Por consiguiente, los equilibrios microbianos en la rizosfera pueden verse alterados mediante cambios en grupos funcionales y taxonómicos de microorganismos, formándose la llamada micorrizosfera. Esta podría verse enriquecida en microorganismos antagonistas de patógenos (Lindermann, 1994, Citeresi *et al.*, 1996; Azcón-Aguilar y Barea, 1996). Además, St-Arnaud *et al.* (1995) mediante ensayos *in vitro* con raíces transformadas de zanahoria propusieron la hipótesis de que el hongo MA podría estimular la germinación de los propágulos del patógeno en la proximidad de sus hifas. Puesto que la fase extraradical de los hongos MA está más extendida que el sistema radical, los propágulos del patógeno podrían germinar demasiado lejos de las raíces, lo que puede facilitar que acaben sus reservas o sufran el ataque de otros microorganismos del suelo antes de alcanzar la raíz. Esta hipótesis tendría que verificarse en condiciones naturales.

f) Activación de los mecanismos de defensa de la planta hospedadora. Aunque la inducción de moléculas o enzimas de defensa por los hongos MA es en general débil y transitoria, como se ha descrito en el apartado 3.2.2.2, una hipótesis a tener en cuenta es que las plantas estarían “sensibilizadas” por la presencia del hongo simbiote, y la previa

activación de sus mecanismos de defensa, aunque de manera débil, podría hacer más rápida una posible respuesta de defensa al posterior ataque de algún patógeno (Gianinazzi, 1991, St-Arnaud *et al.*, 1995, Azcón- Aguilar y Barea, 1996). Entre las defensas desencadenadas por la planta estaría la producción de compuestos antimicrobianos, como compuestos fenólicos e isoflavonoides antibacterianos (Dehne y Schönbeck, 1978; Morandi *et al.*, 1984; Benhamou *et al.*, 1994, Morandi y Paynot, 1996).

4.2 Micorrizas frente a *Phytophthora* sp.

4.2.1 Impacto de *Phytophthora* sobre los sistemas de producción vegetal

Phytophthora es un género perteneciente al orden Peronosporales de los Oomicetos que agrupa a hongos fitopatógenos del suelo (Ingold y Hudson, 1993). En este orden están incluidos algunos de los hongos más dañinos que se conocen: *Pythium*, que causa podredumbres y estrangulamientos en las plantas, varios géneros que comprenden al grupo de hongos que ocasionan enfermedades muy destructivas conocidas como mildiús, y *Phytophthora*, la causa de los tizones y podredumbres en la raíz de muchas plantas.

En la actualidad se reconocen más de 40 especies en el género *Phytophthora*. La mayoría de ellas son patógenas y responsables de daños de gran importancia agroeconómica. Aunque algunas especies son saprofitas, otras son parásitos altamente especializados de plantas superiores. Estos hongos presentan un amplio espectro de plantas hospedadoras, desde plántulas de hortalizas anuales u hornamentales, hasta árboles de interés forestal y frutales completamente desarrollados, y en el caso de *Phytophthora cinnamomi* se han descrito hasta 1000 especies vegetales como posibles hospedadoras.

Las especies de *Phytophthora* se pueden encuadrar en tres categorías según los daños que causan (Schwinn, 1983): las que producen daños en la parte aérea de la planta, a nivel de las hojas y los frutos, como es el caso de *P. infestans* de Bary, que es responsable del tizón tardío en la patata; las que infectan las raíces y/o el cuello de las Solanáceas,

desarrollándose en los tejidos no vasculares preferentemente, aunque dañan más tarde el tallo y las hojas, entre las que se encuentran *P. nicotianae* van Breda de Haan; y por último las que originan síntomas importantes en las raíces, además de daños a nivel del cuello y del hipocotilo, causados por la infección local en estas regiones, como *P. cinnamomi* que ataca principalmente a plantas leñosas (Smith *et al.* 1986).

Las enfermedades producidas por miembros de este género han aumentado en los últimos años y causan importantes pérdidas en viveros. La podredumbre de las raíces es una de las enfermedades más conocidas causadas por *Phytophthora* y se manifiesta por la muerte de las raíces jóvenes y la necrosis de las más desarrolladas, lo que puede llevar a la muerte de la planta en mayor o menor espacio de tiempo según la cantidad de hongo presente en el suelo y las condiciones ambientales. Una de las plantas afectadas por esta enfermedad es el tomate (Satour y Butler, 1967; Neher y Duniway, 1991) siendo *Phytophthora parasitica* (o *P. nicotianae* var. *parasitica*) la causa más común de la podredumbre del pie de las tomateras. Generalmente actúa sobre plantas recién transplantadas, aunque también cuando están en plena producción. Sus síntomas pueden asemejarse a los producidos por la correspondiente especialización de *F. oxysporum* (*Fusarium oxysporum* fsp. *radicis-lycopersici*, que provoca la podredumbre de la raíz y el cuello de las plantas hasta ocasionar su muerte). Sus ataques están asociados con condiciones defectuosas de cultivo y sobre todo de encharcamientos más o menos transitorios. Unas temperaturas no muy elevadas -unos 25°C de Tª máxima- unidas a riegos a manta o por surco y restos de cosecha infectados constituyen las condiciones adecuadas para que se produzca la micosis. Cuando ésta se produce, puede alcanzar los frutos directamente si éstos están en contacto con el suelo o mediante salpicaduras por lluvia (Nuez, 1997).

4.2.1.1 Ciclo biológico y modo de infección

Las especies de *Phytophthora* sobreviven en el suelo en forma de clamidosporas, de oosporas o de micelio en los restos de raíces infectadas. Cuando las condiciones climáticas son favorables (humedad alta y temperatura templada), a partir de las oosporas y las

clamidosporas se desarrolla un tubo de germinación que dará lugar a un nuevo micelio que inicia su crecimiento. En él aparecen unos esporangios de forma ovoide que contienen las zoosporas biflageladas que son las formas infectivas de *Phytophthora*. Puede formar también nuevas clamidosporas por reproducción asexual u oosporas mediante reproducción sexual. Cuando las zoosporas están maduras se rompe el esporangio y quedan libres, moviéndose en el agua contenida en el suelo hasta encontrar una planta hospedadora. (Agrios, 1988). Aunque las interacciones celulares entre ciertas especies de *Phytophthora* y la planta hospedadora a nivel de la parte aérea han sido objeto de numerosos estudios, las interacciones que tienen lugar durante la infección de las raíces están poco descritas en la literatura (Miller y Maxwell, 1984; Hinch *et al.*, 1985; Benhamou 1992; Benhamou y Coté, 1992). En general, las zoosporas de *Phytophthora* sp. se enquistan espontáneamente en la superficie de la célula hospedadora y pierden los flagelos para formar un punto de anclaje llamado apresorio, a partir del cual se desarrolla una hifa de infección que penetra el tejido vegetal. Las complejas interacciones celulares y moleculares que se establecen entre el patógeno y el hospedador dan lugar a una interacción de tipo compatible cuando el hongo coloniza eficazmente los tejidos y causa la enfermedad, o de tipo incompatible cuando induce la activación de los sistemas de defensa de la planta dando lugar a fenómenos de resistencia.

Las paredes celulares de las hifas de los Oomicetes están compuestas principalmente por glucanos unidos por enlaces β -1,3 y β -1,6, que forman el esqueleto de la pared, estando parte de la celulosa presente en forma de cristal imperfecto (Bartnicki-García, 1968). El monómero más abundante en las paredes de estos hongos es la glucosa, aunque se detectan también ciertas cantidades de manosa. Otra característica distintiva es la presencia de hidroxiprolinas en las proteínas de la pared. Generalmente se asume que no presentan quitina, pero se han encontrado trazas de quitina en algunos oomicetos como *Pythium* (Asiegbu *et al.*, 1996), y se ha detectado actividad quitin-sintasa en algunas especies de *Pythium* y *Phytophthora* (Bruyere *et al.*, 1996).

4.2.1.2 Medidas de control

Los métodos de lucha actuales contra *Phytophthora* son fundamentalmente la utilización de sustratos libres de propágulos del hongo, la limitación del exceso de agua y de nitrógeno, la eliminación de las plantas atacadas, y, sobre todo, la lucha química que incluye la desinfección de los sustratos de crecimiento utilizando por ejemplo Bromuro de metilo + Cloropicrina, o Enzone y de las plantas antes del transplante o el tratamiento químico durante el cultivo (Etridiazol, Metalaxil, Nabam, Promocarb, Quinosol y Quintoceno). La mayoría de estos productos presenta toxicidad elevada para el hombre y el medio ambiente (Liñan, 1999), agravada por la necesidad en muchos casos de repetidas aplicaciones y en grandes extensiones de terreno. El coste económico, los riesgos para la salud y el entorno y a veces la protección tan sólo a corto plazo que confieren estas técnicas no permiten su utilización sistemática. Otro problema añadido a la utilización de los métodos químicos de control es que pueden ser contrarrestados por la variabilidad genética de las poblaciones fúngicas. A modo de ejemplo, en 1980, tras el tratamiento de un suelo con metalaxil, que destruyó las variedades de *Phytophthora megasperma* autóctonas, se aislaron numerosas variedades resistentes a este fungicida (Davidse *et al.*, 1981).

También se ha recurrido a su control mediante la aplicación de ciertas técnicas de cultivo como la rotación. Estas técnicas pueden ejercer un control sobre *Phytophthora* de modo directo, haciendo el medio menos propicio para su desarrollo (Broadbent y Baker, 1975), o de modo indirecto haciendo a la planta menos sensible al patógeno (Shea y Broadbent, 1983). Sin embargo, la eficacia de estas técnicas de control es aleatoria y los resultados son en muchos casos contradictorios, dependiendo del sitio tratado y sus condiciones ambientales, de la planta hospedadora y de la especie de *Phytophthora* implicada.

Recientemente se ha estudiado la eficacia de la adición de distintos tipos de compost en el control de los daños causados por *Phytophthora* (Kim *et al.*, 1997; Widmer *et al.*, 1998), y entre las vías alternativas que más se están desarrollando actualmente destaca la selección de variedades vegetales resistentes a éstos organismos. Por último, el control

biológico parece muy prometedor en la lucha contra *Phytophthora*. Desde hace años se conoce la existencia de microorganismos antagonistas de *Phytophthora*, entre los que se encuentran los microorganismos endosimbiontes como hongos formadores de ecto y endomicorrizas (Malajczuk, 1983). En la última década han aparecido numerosos trabajos mostrando resultados positivos en cuanto al control biológico de los daños causados por diversas especies de *Phytophthora* en distintas plantas mediante la aplicación de varias especies de bacterias u hongos. Los resultados obtenidos en dichos estudios se resumen en la tabla 1. Entre los organismos con potencialidad para controlar *Phytophthora* aparecen distintas especies de hongos MA.

Tabla 1. Ejemplos recientes de control biológico frente a distintas especies de *Phytophthora* por antagonistas microbianos (actualizada de Whipps, 1997).

Antagonista	Patógeno	Hospedador	Condiciones	Referencia
<i>Bacillus cereus</i> UW85	<i>P. megasperma</i>	Alfalfa	Campo	Handelsman <i>et al.</i> , 1990
<i>B. cereus</i> UW85	<i>P. medicaginis</i>	Alfalfa	Controladas	Silo-Suh <i>et al.</i> , 1994
<i>B. cereus</i> UW85	<i>P. sojae</i>	Soja	Campo	Osburn <i>et al.</i> , 1995
<i>B. subtilis</i> spp	<i>P. cactorum</i>	Manzano	Campo	Utkhede y Smith, 1991
<i>Enterobacter aerogenes</i> B8	<i>P. cactorum</i>	Manzano	Campo	Chernin <i>et al.</i> , 1995
<i>Pseudomonas cepacia</i>	<i>P. cinnamomi</i>	Protea	Invernadero	Turnbull <i>et al.</i> , 1992
<i>P. fluorescens</i> M24	<i>P. cinnamomi</i>	Jacaranda	Invernadero	Stirling <i>et al.</i> , 1992
<i>P. aureofaciens</i> PA147-2	<i>P. megasperma</i>	Esparrago	Invernadero	Carruthers <i>et al.</i> , 1995
<i>Gliocladium virens</i>	<i>P. cactorum</i>	Manzano	Invernadero	Smith <i>et al.</i> , 1990
<i>Glomus</i> sp.	<i>P. cinnamomi</i>	Piña	Controladas	Guillemin <i>et al.</i> , 1994
<i>Glomus fistulosum</i>	<i>P. fragariae</i>	Fresa	Invernadero	Mark y Cassells, 1996
<i>G. fasciculatum</i> / <i>G. etunicatum</i>	<i>P. fragariae</i>	Fresa	Invernadero	Norman <i>et al.</i> , 1996
<i>Penicillium funiculosum</i>	<i>Phytophthora</i> spp.	Azalea naranja dulce	Invernadero	Fang y Tsao, 1995b
<i>Phytophthora parasitica</i> var. <i>nicotianae</i>	<i>P. parasitica</i>	<i>Catharanthus</i> <i>roseus</i>	Invernadero	Holmes y Benson, 1994
<i>Pythium nunn</i>	<i>P. spp.</i>	Azalea naranja dulce	Invernadero	Fang y Tsao, 1995a
<i>Trichoderma</i> spp.	<i>P. cactorum</i>	Manzano	Invernadero	Smith <i>et al.</i> , 1990
<i>Verticillium chlamydosporium</i>	<i>P. capsici</i>	Pimienta	Invernadero	Sutherland y Pap., 1991
Virus de la necrosis del tabaco	<i>P. infestans</i>	Tomate		Anfoka y Buchen., 1997

4.2.2 Efecto de las micorrizas sobre *Phytophthora*

En los años 70 comenzaron los primeros estudios sobre el papel de las ectomicorrizas en la reducción de la infección por *Phytophthora* (principalmente *P. cinnamomi*) en un amplio rango de hospedadores (Malajczuk, 1983). Los mecanismos que se propusieron para explicar este fenómeno fueron la alteración de los exudados radicales, que podrían alterar la respuesta quimiostática de las zoosporas o reducir los estímulos para la germinación de sus propágulos en el suelo (Marx y Davey, 1969); la producción de antibióticos (Marx 1969) y la formación de una barrera mecánica frente al patógeno constituida por el manto fúngico (Marx y Dabey, 1969).


Los primeros trabajos sobre el efecto de las micorrizas arbusculares en la resistencia de la planta frente a *Phytophthora* fueron contradictorios, y variaban según la planta y especie de *Phytophthora* estudiadas. Ross y colaboradores (1972) encontraron que las plantas de soja micorrizadas estaban afectadas por la podredumbre de la raíz producida por *Phytophthora* mientras que esto no ocurría en las no micorrizadas. Hall y Finch (1974) llegaron a la conclusión de que la micorrización no ejercía efecto alguno sobre la podredumbre de la raíz causada por *Phytophthora cinnamomi* en el aguacate (*Persea americana*). Davis y colaboradores (1978) también encontraron menor resistencia a la enfermedad causada por *P. cinnamomi* en plantas micorrizadas de aguacate, o ausencia de efecto en alfalfa frente a *P. megasperma*, pero más tarde describieron el incremento de la resistencia frente a *P. parasitica* en *Citrus*, en base a un mayor porcentaje de raíces sanas tras la infección en las plantas premicorrizadas que en las no micorrizadas (Davis y Menge, 1980). Los autores explicaron esta aparente mayor tolerancia por la capacidad de compensar la pérdida de nutrientes (principalmente fósforo) en las raíces afectadas con la absorción de nutrientes debida a la micorriza en las raíces sanas. La micorrización ha mostrado también efectos protectores^o frente a *P. cinnamomi* en *Chamaecyparis lawsoniana* (Bäertschi *et al.*, 1981) y en plantas de piña (Guillemin *et al.*, 1994).

La disparidad en los resultados obtenidos se produce incluso dentro del mismo sistema hospedador- patógeno. En fresa, aunque algunos autores no encontraron ningún efecto protector de la inoculación con *Glomus* spp. frente a *P. fragariae* (Bäath y Hayman, 1984), trabajos más recientes han mostrado en distintas variedades de fresa una menor susceptibilidad frente a este patógeno tras su inoculación con *Glomus fistulosum* (Mark y Cassells, 1996), *G. fasciculatum* o *G. etunicatum* (Norman *et al.*, 1996). Esta disparidad de resultados podría explicarse por la gran variedad de sustratos de crecimiento, hongos MA y condiciones de cultivo empleadas. Todos estos factores pueden influir en el resultado final de la interacción hospedador-simbionte-patógeno. Adicionalmente, los diferentes criterios seguidos para la estimación de los daños producidos por la enfermedad complican aún más la posibilidad de obtener conclusiones definitivas dentro de este panorama complejo de interacciones múltiples entre organismos distintos, y de todos ellos con su medio ambiente.

PLAN DE TRABAJO

Una vez analizados los antecedentes científicos sobre el tema, y de acuerdo con los OBJETIVOS establecidos, se propone el siguiente Plan de Trabajo:

1. Evaluación del grado de protección frente a *Phytophthora parasitica* derivado de la formación de micorrizas arbusculares en plantas de tomate.
2. Análisis isoenzimático de las actividades hidrolíticas quitinasa, quitosanasas y β -1,3-glucanasa inducidas durante las interacciones simbiótica, patógena y en la doble interacción.
3. Análisis de isoenzimas relacionados con el estrés oxidativo, peroxidasa y superóxido dismutasa, durante los distintos tipos de interacción.
4. Ensayos para determinar las propiedades antifúngicas de extractos proteicos radicales procedentes de plantas micorrizadas o no, frente a *Phytophthora parasitica*.
5. Determinación del carácter localizado o sistémico del efecto protector de la micorriza, así como de los cambios enzimáticos observados.



Materiales y Métodos

1. MATERIAL BIOLÓGICO

El tomate ha sido la planta elegida como modelo para este trabajo experimental. La importancia social de este cultivo por su relevancia en la producción agrícola y en las relaciones comerciales, así como su interés desde el punto de vista científico por la amplia información disponible sobre distintos aspectos bioquímicos y genéticos, hacen de esta planta un modelo de gran interés.

En cuanto a los hongos formadores de micorrizas arbusculares (MA), se eligieron *Glomus mosseae* Nicol y Gerd (BEG 12) y *Glomus intraradices* Smith y Schenck (BEG 72) por su infectividad y eficacia en la simbiosis, así como por estar entre los hongos MA más estudiados en trabajos de fitoprotección. Para la experiencia de establecimiento de la simbiosis en condiciones monoxénicas se utilizó *Gigaspora rosea*.

Por otro lado, uno de los sistemas planta-hongo patógeno mejor estudiados desde hace años en relación a la capacidad de elicitación de respuestas de defensa y de diálogo molecular entre ambos organismos son los que implican distintas especies de *Phytophthora* (Keen y Yoshikawa, 1983; Darvill y Albersheim, 1984; Séjalon-Delmas *et al.*, 1997; Yu, 1995). Además los daños causados por patógenos de este género sobre cultivos de solanáceas son muy elevados y han dado lugar a grandes pérdidas económicas. Por todo esto se tomó como agente patógeno para nuestro modelo experimental una especie de este género, *Phytophthora parasitica*, causante de podredumbre en la raíz y lesiones en el cuello del tomate.

1.1 Tomate

La variedad de tomate (*Lycopersicon esculentum* L.) usada en este trabajo ha sido Earlymech, donada por el centro de INRA de Dijon (Francia). Esta variedad presenta

resistencia a Fusariosis, Verticilosis y Estamfiliosis, pero es sensible a hongos patógenos del suelo como *Phytophthora* sp.

1.1.1 Esterilización, germinación y cultivo

Las semillas de tomate se esterilizaron en superficie por inmersión durante 10 minutos en una solución de lejía comercial al 50% en agua destilada en continua agitación, lavandolas seguidamente con agua destilada estéril tres veces durante 5, 10 y 15 minutos respectivamente.

La germinación de las semillas se llevó a cabo bajo distintas condiciones dependiendo del sistema experimental a usar. En el caso del sistema simple, que se detallará en el apartado 2.1., las semillas estériles en superficie se depositaron sobre papel de filtro empapado en agua en una placa Petri de cristal estéril, y se colocaron a 28° en oscuridad para su germinación. Una vez aparecida la radícula se sembraron en las macetas con el sustrato correspondiente. Para el modelo compartimentado (apartado 2.2) las semillas se colocaron en un recipiente con vermiculita autoclavada (115°, 20 minutos) húmeda para su germinación y se transplantaron tras la aparición de la primera hoja verdadera en la plántula.

En ambos casos las plantas crecieron en una cámara de cultivo bajo condiciones ambientales controladas, a una temperatura de 25° C durante el día y 18°C durante la noche, con un fotoperiodo de 16 horas y un flujo de fotones de 400 mmol m⁻² s⁻¹, con una humedad relativa del 60%. Todas las plantas se regaron tres veces por semana con solución nutritiva Long Ashton (Hewitt, 1966) modificada en relación a la concentración de fósforo que se redujo a un 25%, como se indica en la tabla 2.

Las condiciones de esterilización, germinación y cultivo del tomate para el modelo *in vitro* se detallan en el apartado 2.3.

Tabla 2. Solución nutritiva Long Ashton (Hewitt, 1966) modificada.

Compuesto	Concentración (M)	Sol. madre (g/l)	Para 1l (ml)
SO ₄ Mg.7H ₂ O		18.4	20
EDTA Fe		2.45	10
SO ₄ Mn.7H ₂ O		2.23	1
SO ₄ Cu.5H ₂ O		2.4	0.1
SO ₄ Zn.2H ₂ O		2.9	0.1
BO ₃ H ₃		18.6	0.1
MoO ₄ Na.2H ₂ O		0.35	0.1
PO ₄ H ₂ Na.2H ₂ O		20.8	2.5
NO ₃ K		30.3	10
(NO ₃) ₂ Ca		70.8	20

1.2 Hongos formadores de micorriza arbuscular

1.2.1 Cultivo e inoculación

Los hongos formadores de micorriza arbuscular, *G. mosseae* Nicol y Gerd (BEG 12) y *G. intraradices* Smith y Schenck (BEG 72) se cultivaron y multiplicaron bajo régimen de invernadero en macetas de 500g conteniendo arena de cuarzo con "suelo Zaidín" en proporción 9:1 (v/v) en las que se sembró puerro (*Allium porrum* L.). A partir de estos cultivos se obtuvo el inóculo bruto troceando las raíces micorrizadas del puerro y mezclándolas con el sustrato. El inóculo consistió finalmente en una mezcla del sustrato conteniendo propágulos del hongo (esporas y micelio externo) y fragmentos de las raíces micorrizadas. La inoculación con hongos de la micorriza en los distintos experimentos se llevó a cabo mediante la adición de un 10% (p/p) de éste inóculo a las macetas correspondientes, mezclándolo con el sustrato estéril.

1.3 *Phytophthora parasitica*

El hongo patógeno utilizado fue *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* [sinónimo de *Phytophthora nicotianae* van Breda de Haan var. *parasitica* (Dastur) Waterhouse], aislado 201, reaislado de raíces de tomate y cedido por P. Bonnet, INRA. Antibes, Francia.

1.3.1 Cultivo e inoculación

El cultivo rutinario de *P. parasitica* se realizó en un medio de extracto de malta / Bacto Agar (2%:1% p/v), sobre el que el hongo creció en oscuridad a 24°C, replicando el cultivo a medio nuevo cada tres semanas. Para la obtención de inóculo, tras dos semanas de cultivo se lavó la superficie del medio con 16 ml de agua estéril por placa, frotando suavemente para desprender el micelio. La suspensión resultante se usó como inóculo bruto del patógeno para los distintos ensayos, aplicándola en el sistema radical mediante la inyección de 8 ml por planta de esta suspensión de micelio.

En algunos ensayos las plantas fueron inoculadas con zoosporas. Para su obtención el hongo se cultivó en un medio compuesto por 2g/l de CaCO₃, 200ml/l de zumo de 8 vegetales (Vida) y 16g/l de Bacto Agar. Tras 7 días en oscuridad a 24°C se cortó el medio con el micelio en trozos de aproximadamente 1 cm y se colocaron en placas Petri con 10 ml de agua destilada estéril, que se incubaron de nuevo en oscuridad a 24°C. Las placas se observaron periódicamente al microscópio, hasta la visualización de zoosporas en movimiento en el interior de los esporangios, aparecidos entre el 5º y 8º día. En ese estadio de madurez de los esporangios se procedió a un choque térmico durante 1 hora a 4°C seguido de una incubación de 30 minutos a temperatura ambiente para provocar la ruptura del esporangio y la consiguiente liberación de las zoosporas de su interior. Se recogió el agua conteniendo las zoosporas liberadas y se cuantificó la concentración de esta suspensión en una cámara de Neubauer.

2. DISEÑO EXPERIMENTAL

El sustrato utilizado, excepto en el caso del cultivo *in vitro* que se describe en detalle en el apartado 2.3, ha sido una mezcla de arena de cuarzo con “suelo Zaidín” en proporción 9:1 (v/v). La arena había sido previamente lavada, dejada secar y autoclavada a 120° durante 15 minutos, y el suelo se esterilizó mediante un proceso de tindalización, que consiste en someterlo una hora, durante tres días consecutivos, a 100°C en un autoclave a vapor fluente, quedando así estéril y libre de propágulos de micorrizas pero sin que se vean alteradas sus cualidades físico-químicas.

Este sustrato, basado en arena, es fundamentalmente inerte, lo que permite buenos niveles de micorrización y no presenta limitaciones importantes a la difusión de nutrientes hacia la raíz, facilitando la reproducibilidad de las condiciones experimentales.

2.1 Modelo simple

Las plantas se cultivaron en recipientes de plástico de 750 ml (14 cm de altura) conteniendo la mezcla estéril de suelo y arena. En el momento de la siembra se consideraban 3 tratamientos:

- Plantas no micorrizadas o controles (C)
- Plantas inoculadas con el hongo MA *G. mosseae* (Gm)
- Plantas inoculadas con el hongo MA *G. intraradices* (Gi)

La inoculación de los hongos MA se realizó mediante la adición de un 10% (p/p) del inóculo bruto de micorriza (apartado 1.2) a cada maceta, mezclándolo con el sustrato estéril.

Tras la siembra se añadieron a cada planta 5 ml de un filtrado (<20mm) de ambos inóculos (10g inóculo de *G. mosseae* + 10g de inóculo de *G. intraradices* / 100ml agua estéril), en un intento de equiparar en todos los tratamientos las poblaciones microbianas, excluyendo los propágulos de hongos AM procedentes de dichos inóculos.

Puesto que numerosos trabajos previos han descrito que, en general, el efecto protector de la micorriza sólo se manifiesta si la simbiosis está previamente establecida, se realizó un seguimiento de la cinética de colonización de la raíz por el hongo MA mediante cortes secuenciales de plantas y tinción de su sistema radical, procediendo a la inoculación del patógeno cuando más del 40% de la raíz estaba micorrizada. Estos niveles de colonización se alcanzaron 4 semanas después de la siembra, momento en el que la mitad de las plantas de cada tratamiento fueron inoculadas con el patógeno *Phytophthora parasitica* como se indica en el apartado 1.3.

Por consiguiente, estos experimentos constaron finalmente de 6 tratamientos:

- Plantas no micorrizadas o controles (C)
- Plantas inoculadas con *G. mosseae* (Gm)
- Plantas inoculadas con *G. intraradices* (Gi)
- Plantas no micorrizadas postinfectadas con *P. parasitica* (C+P)
- Plantas inoculadas con *G. mosseae* y postinfectadas con *P. parasitica* (Gm+P)
- Plantas inoculadas con *G. intraradices* y postinfectadas con *P. parasitica* (Gi+P)

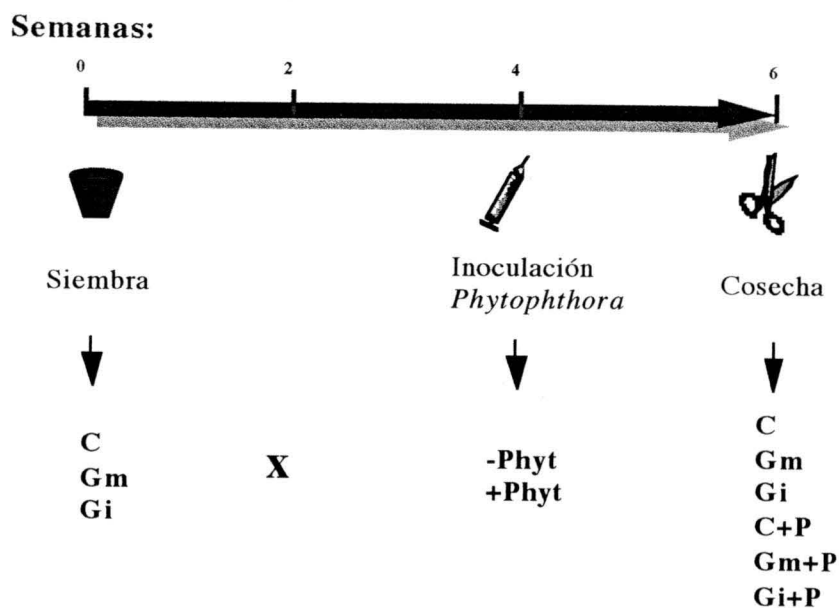


Figura 6. Esquema del modelo experimental simple y sus tratamientos

2.2 Modelo compartimentado

Con el fin de evaluar si la protección así como los cambios bioquímicos inducidos en la raíz en respuesta a la micorrización tienen un carácter localizado o sistémico, se desarrolló un sistema compartimentado que permitiera la separación del sistema radical en dos partes y que en la medida de lo posible no afectara el desarrollo normal de la planta.

Para ello se usaron recipientes de plástico de 250 ml, unidos de dos en dos por una cinta adhesiva y comunicados por una muesca en la parte superior que permitió colocar parte del sistema radical en uno y otro compartimento. En todos los casos ambos compartimentos contenían el sustrato estéril (arena/ suelo Zaidín 9:1), pero en el caso de los tratamientos micorrizados se añadió inóculo bruto de micorriza (apartado 1.2) a uno de los compartimentos. La zona de unión entre los dos compartimentos se cubrió con una capa de arena estéril. Notaremos **Nm** (no micorrizada) a cada una de las partes del sistema radical de las plantas control, que crecen en dos compartimentos sin inóculo de micorriza. Se notará **Gm** a la parte no micorrizada (crecida en el compartimento sin inóculo) del sistema radical de una planta micorrizada con *G. mosseae*, ya que la otra parte de su sistema radical creció en un compartimento conteniendo el inóculo de ese hongo, a la que llamaremos **+Gm**, e igualmente llamaremos respectivamente **-Gi** y **+Gi** a las partes no micorrizadas y micorrizadas de una planta inoculada con *G. intraradices* (Figura 7).

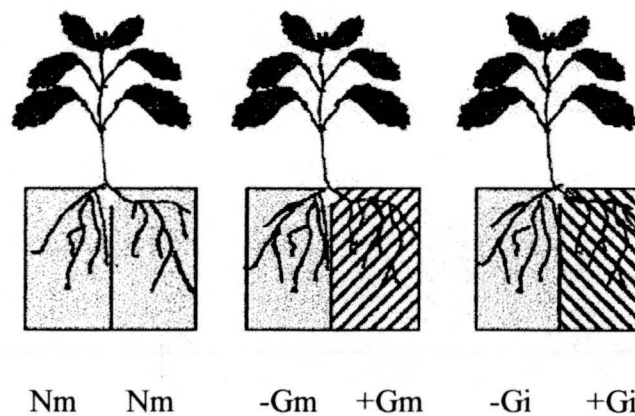


Figura 7. Esquema del modelo experimental compartimentado

Debido a la arquitectura radical del tomate, de tipo pivotante, el reparto del sistema radical entre los dos compartimentos no puede ser totalmente equitativo, por ello, en un primer ensayo se consideraron por separado las repeticiones en que la raíz principal se llevó al compartimento que contenía el hongo MA y las repeticiones en que ésta se había guiado al compartimento sin inóculo. Puesto³ que no se detectaron diferencias en los resultados, se usaron indistintamente ambas disposiciones (normalmente mitad de las plantas de cada tratamiento con la raíz principal en uno u otro compartimento).

Al igual que en el caso del modelo simple, se hizo un seguimiento del grado de micorrización de las plantas, confirmando a su vez la ausencia de micorrización en los compartimento -Gm o -Gi. Una vez bien establecida la simbiosis (nivel de colonización $\geq 40\%$ en la parte del sistema radical con inóculo de micorriza) se procedió a la inoculación con el patógeno en uno de los compartimentos de cada planta, como se describe en el apartado 1.3. Los tratamientos fueron Nm, -Gm, +Gm, -Gi, +Gi, como anteriormente, para las plantas no inoculadas con *P. parasitica*, y en el caso de plantas infectadas con el patógeno, se notará "+P" a la parte de la raíz crecida en el compartimento en que se realizó la inoculación con *Phytophthora*, y "-P" a la otra parte del sistema radical de esa misma planta (parte no inoculada de una planta que sí ha sido infectada con *Phytophthora*). Los tratamientos finales son los que aparecen en la Figura 8.

2.3 Modelo *in vitro*

En colaboración con el grupo de la Dra. Eliane Dumas-Gaudot, del laboratorio de Fitopatología, INRA, Dijón (Francia) en virtud del proyecto europeo en que se encuadra este trabajo, se realizó una experiencia *in vitro* de micorrización, usando un sistema de cultivo monoxénico. En este caso, las semillas de tomate fueron esterilizadas en superficie durante 5 minutos con una solución de hipoclorito calcico al 3.5%, enjuagadas y dejadas secar sobre un papel estéril durante 18 h, tras las cuales se repitió la esterilización durante otros 5 minutos, y se colocaron en placas Petri para su germinación. Una semana después

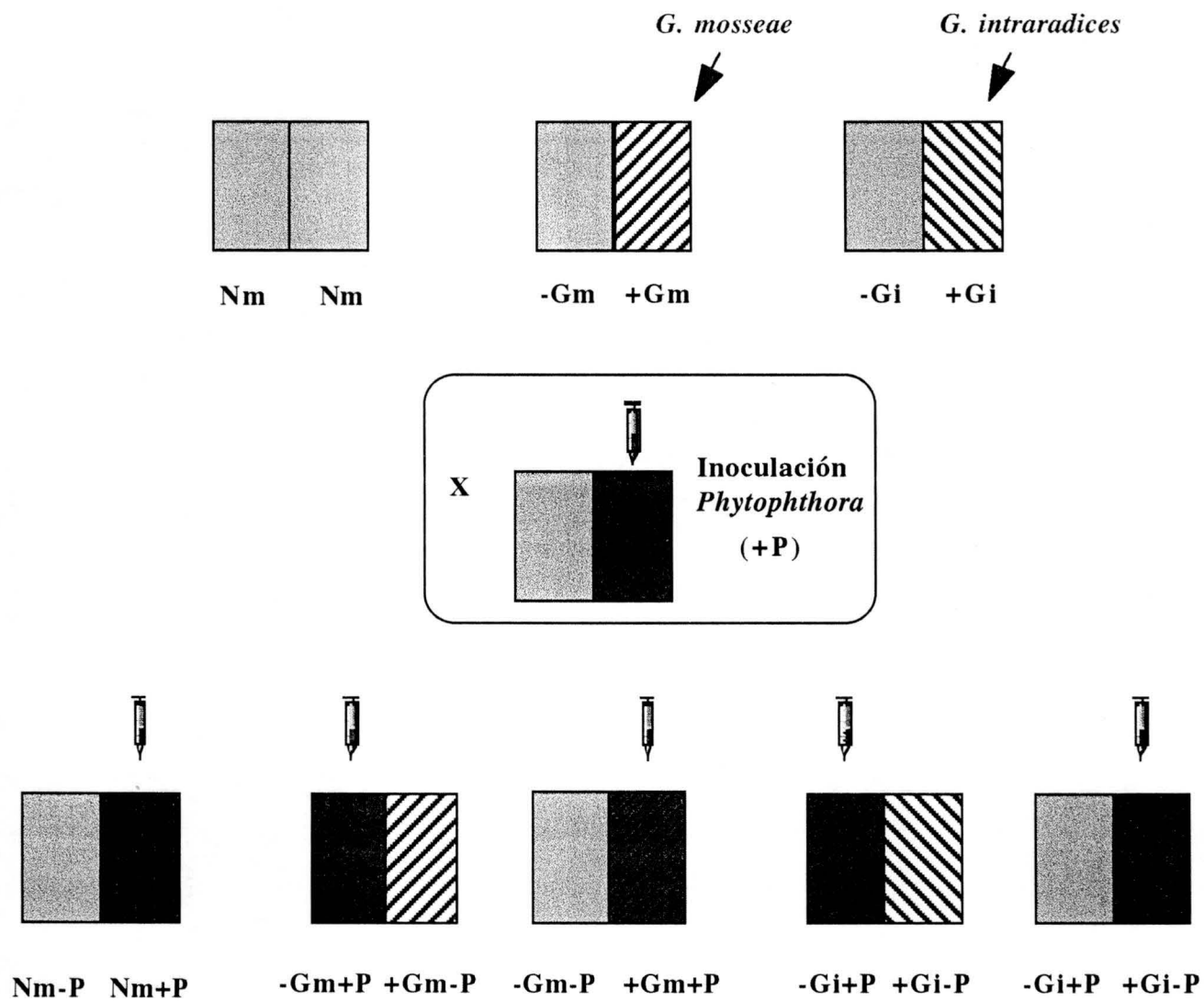


Figura 8. Esquema de los tratamientos completos del modelo experimental compartimentado

las semillas germinadas se pasaron a placas Petri de 14 cm de diámetro, a razón de 4 semillas por placa (Figura 9) en 50 ml del medio de cultivo descrito por Crush y Hay (1981), con un pH 6.8, añadiendo 0.5% (p/v) de carbón activo. Junto a la raíz de cada plántula se colocaron bajo condiciones estériles 25 esporas del hongo MA *Gigaspora rosea* Nicolson y Schenk (BEG 9) previamente esterilizadas en superficie durante 10 minutos con una solución de estreptomicina (0.2 mg/ml), gentamicina (0.1 mg/ml), cloramina T 5% y dos gotas de Tween 20.

Los placas con los cultivos se colocaron en posición vertical en una cámara de crecimiento (fotoperiodo de 16 horas, temperatura 17-23°C) con la parte inferior envuelta en papel aluminio para preservar los sistemas radicales de la luz. Tras ocho semanas de crecimiento se procedió a la extracción, escogiendo bajo el binocular los fragmentos de raíz sobre los que se observaba un buen desarrollo de las hifas del hongo. Estos fragmentos se congelaron en nitrógeno líquido y se conservaron a -80°C hasta su uso.

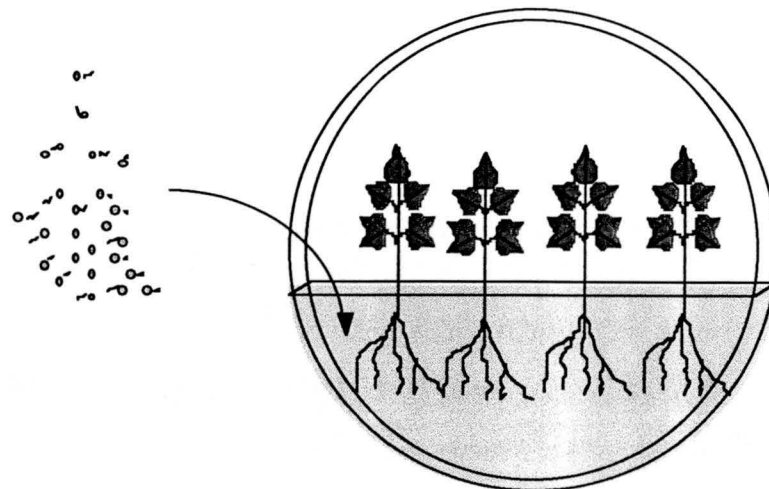


Figura 9. Esquema del cultivo monoxénico del modelo experimental *in vitro*.

3. EVALUACIÓN DE DATOS FISIOLÓGICOS

3.1 Parámetros de crecimiento de la planta

Tras la cosecha, las plantas se lavaron cuidadosamente con agua, se secó el exceso de agua y se pesaron por separado partes aéreas y raíces. Los parámetros de crecimiento se expresan en gramos de peso fresco. Los datos se sometieron a análisis de varianza (ANOVA) aplicandoles a continuación el test de Fisher a un nivel de significación del 5%.

3.2 Tasa de micorrización

La colonización micorrícica se determinó en muestras representativas de cada uno de los sistemas radicales, mediante el proceso de tinción descrito por Philips y Hayman (1970). Las muestras son tratadas con una solución de KOH al 10% (20 min., 100°C) para la digestión parcial de las paredes y cubiertas celulares de la raíz. A continuación una solución 0.1N de HCl (5 minutos a T^a ambiente) actúa como neutralizadora y mordiente para el siguiente paso, la tinción, que se lleva a cabo con azul tripán al 0.05% en ácido láctico, durante 15-20 minutos en caliente. El colorante se une a la quitina de la pared fúngica, tiñéndose las estructuras del hongo de color azul.

Tras la tinción, se colocaron fragmentos de raíz de aproximadamente 1cm de longitud en portaobjetos (15 fragmentos en cada portaobjetos y 3 portaobjetos por cada muestra) fijandolas con ácido láctico. La frecuencia del hongo en la raíz se cuantificó observando estas preparaciones al microscopio, expresandose los resultados como porcentaje de corteza radical colonizada por el hongo.

3.3 Tasa infección por *Phytophthora parasitica*

La presencia del patógeno *Phytophthora parasitica* en los sistemas radicales se estimó por dos vías:

- Estimación visual de los daños ocasionados por el patógeno en el sistema radical mediante una escala arbitraria del 0 al 5, correspondiendo el 0 a una raíz sana, sin indicios de lesiones necróticas, y el 5 a una raíz totalmente necrosada.

- Cuantificación de la cantidad de patógeno dentro de la raíz usando un kit comercial (Agriscreen, Adgen Diagnostic Systems, Auchincruive, Ayr, Reino Unido) basado en el método de ELISA (“Enzyme-Linked Immunosorbent Assay”). En cada pocillo de la placa se añadieron 100 µl de una dilución 1/100 del extracto de proteínas radicales obtenido para los análisis bioquímicos. Se incubó la placa a T^a ambiente durante 2 horas para permitir la unión de los antígenos de *P. parasitica* contenidos en los extractos radicales con los anticuerpos específicos prefijados en los pocillos. Transcurrido ese tiempo se procedió a una serie de 5 lavados con tampón y a una segunda fase de incubación (2 horas) con otros 100 µl de anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa. Tras otra serie de lavados para eliminar los anticuerpos no unidos se llevó a cabo el revelado mediante la adición de un sustrato para la peroxidasa. La reacción da lugar a una coloración verde cuantificable en un lector de placas ELISA a una longitud de onda de 405 nm. Los resultados se expresen como unidades de absorbancia.

4. ESTUDIOS BIOQUÍMICOS

4.1 Extracción de proteínas

4.1.1 Proteínas de la raíz

Las raíces lavadas y pesadas tras la cosecha se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se conservaron a -80°C . Para la extracción de proteínas las raíces congeladas se molieron en un mortero con nitrógeno líquido, y el polvo resultante se homogeneizó con tampón de extracción de proteínas (1ml/g de materia fresca). Se probaron distintos tampones de extracción:

a) Tampón McIlvaine pH 6.8 (22.75 ml ácido cítrico 0.1 M + 77.25 ml Na_2HPO_4)

b) Tampón McIlvaine pH 6.8 adicionado con:

PVPP	8%	(Evita daños por fenoles y quinonas)
Tritón X-100	0.1%	(Detergente, secuestra compuestos fenólicos)
PMSF	1mM	(Inhibidor de proteasas)
DTT	1mM	(Antioxidante)

b) PK 50mM pH 7 adicionando los compuestos indicados en el apartado b).

c) Tris-CIH 100 mM pH 7.5 adicionando los compuestos indicados en el apartado b).

Pese a que en el patrón de proteínas totales se observaron algunas variaciones entre los extractos obtenidos con los distintos tampones, no se observaron diferencias entre los patrones isoenzimáticos de los enzimas objeto de este estudio. Por ello, para los posteriores análisis se usó MacIlvaine pH 6.8 (a), por sugerencia de los autores que desarrollaron la técnica de detección de éstos enzimas (Grenier y Asselin, comunicación personal).

Los homogeneizados obtenidos se centrifugaron a 15000g durante 30 minutos a 4°C, conservándose las fracciones sobrenadantes a -80° hasta su utilización como extracto bruto de proteínas.

4.1.2 Proteínas fúngicas

Para la extracción de proteínas de hongos MA se recolectó el micelio externo del hongo de macetas con plantas de tomate colonizadas por *G. mosseae* o *G. intraradices*. Para ello las raíces se lavaron suavemente con agua estéril, se colocaron sobre hielo y se observaron a la lupa, recogiendo el micelio externo adherido a ellas con unas pinzas. El micelio externo de *P. parasitica* se obtuvo a partir de las colonias del hongo en cultivo rutinario (apartado 1.3.1).

El micelio se congeló y homogeneizó en un mortero con nitrógeno líquido. Tras suspender el polvo resultante en tampón McIlvaine la muestra fue sonicada durante 5 minutos y centrifugada a 15000g durante 30 minutos. Los sobrenadantes se liofilizaron y seguidamente se resuspendieron en una mínima cantidad del mismo tampón para concentrar la muestra obtenida. La solución resultante fue usada como extracto crudo para los análisis posteriores.

4.2 Cuantificación de proteínas

El contenido en proteínas solubles de los distintos extractos se determinó por el método de Bradford (1976) usando el reactivo comercializado por Bio-Rad. La técnica se basa en la propiedad del azul de Coomassie G-250 para formar complejos con las proteínas de la solución originando un cambio de color que es cuantificable con un espectrofotómetro. La cantidad de proteínas se calculó tomando como referencia albumina bovina (SIGMA).

4.3 Separación electroforética de proteínas

Los extractos proteicos de raíces y/o micelio se separaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con el sistema HOEFER (“Mighty Small 250 System”) para minigeles (10x8 ó 10x10, 0.75 mm de espesor) siguiendo distintos métodos, dependiendo de si la separación se llevaba a cabo bajo condiciones desnaturalizantes o nativas (no desnaturalizantes):

a) condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE), según el método descrito por Laemmli (1970) -Apartado 4.3.1-.

b) condiciones nativas, siguiendo el sistema descrito por Davis (1964) para la separación de proteínas ácidas o neutras -apartado 4.3.2-, o el propuesto por Reisfeld *et al.* (1962) para proteínas básicas -apartado 4.3.3-.

Los extractos también fueron analizados mediante isoelectroenfoque usando el sistema Multiphor II de LKB.

4.3.1 SDS-PAGE

La separación en condiciones desnaturalizantes se llevó a cabo en presencia de sodio-dodecil-sulfato (SDS), un detergente iónico que actúa como agente desnaturalizante. La desnaturalización de las mezclas proteicas en presencia de exceso de SDS permite que el detergente se una a la mayoría de los polipeptidos en una proporción constante, confiriéndoles una carga negativa general respecto a la cual las cargas intrínsecas de los polipéptidos son insignificantes. Así, los complejos polipeptido-SDS tienen en esencia densidades de carga idénticas y migran a través de los poros del gel de poliacrilamida estrictamente en función del tamaño del polipéptido. Por tanto el SDS elimina las diferencias conformacionales y de densidad de carga entre las proteínas, y reduce el efecto de la variabilidad en hidratación y volumen parcial específico. Esto permite la determinación del

peso molecular de las distintas isoformas por comparación con un grupo de polipéptidos de peso molecular conocido sometidos a electroforesis en el mismo gel.

Los extractos proteicos a analizar se desnaturalizaron mezclandolos (3 : 1 v/v) con el tampón de desnaturalización (tabla 3) y manteniendo la mezcla a 100°C durante 5 minutos (Trudel y Asselin, 1989).

Tabla 3. Tampón de desnaturalización para SDS-PAGE

Composición	Concentración
Tampón Tris-ClH pH 6.7	0.5 M
Sacarosa	40 % (p/v)
SDS	8 % (p/v)

Este tampón permite la desnaturalización en **condiciones no reductoras**. Para una desnaturalización en **condiciones reductoras** se añade al tampón 5% (v/v) de 2-mercaptoetanol (MCE), responsable de la reducción de los puentes disulfuro, permitiendo un desplegamiento completo, y por tanto, una determinación más exacta del peso molecular de proteínas. Algunas proteínas son muy sensibles a la desnaturalización en presencia de este agente, no siendo posible renaturalizarlas y recuperar su actividad después, por lo que no siempre es factible este método.

Para la separación de las proteínas se usó el sistema discontinuo de electroforesis descrito por Laemli (1970), consistiendo éste en un gel separador al 15% de poliacrilamida, y uno concentrador al 4%, con la composición indicada en la tabla 4:

Tabla 4. Composición de los geles separador y concentrador para electroforesis en condiciones desnaturalizantes.

Composición	Gel separador (15%)	Gel concentrador (4%)
Acrilamida 40%	3.65 ml	0.48 ml
Bis-acrilamida 2%	2 ml	0.26 ml
Tris-ClH 3M, pH 8.8	1.25 ml	-
Tris-ClH 0.5M, pH 6.8	-	1.26 ml
Sustrato enzimático	100 µl	-
H ₂ O destilada	2.8 ml	2.85 ml
SDS 10%	100 µl	50 µl
Persulfato de amonio 10%	70 µl	50 µl
Temed	15 µl	5 µl

El **tampón de electroforesis** es Tris-Glicina pH 8.3, al que se añade 0.1% (p/v) de SDS.

Las muestras se cargaron en el gel a razón de 10 µg de proteínas por pocillo, salvo en los casos en que se especifique otra cantidad. Las separaciones electroforéticas se realizaron a corriente constante (20 mA/gel).

Para la determinación del peso molecular aparente (PM) se usó como patrón una mezcla (7µl / gel) de proteínas preteñidas con PM en el rango 21-112 kDa (Biorad prestained SDS-standard).

4.3.2 Sistema Davis o electroforesis anódica

La separación de proteínas se lleva a cabo en condiciones no desnaturalizantes (en ausencia de SDS). Este sistema se usa para la resolución de proteínas ácidas y neutras porque debido al pH básico del gel de separación (pH 8.8), sólo éstas pueden entrar en el gel. Se usa el sistema discontinuo (Laemli 1970), siendo la composición de los geles la

indicada para condiciones desnaturalizantes (apartado IV.3.1) pero omitiendo el SDS. Antes de ser cargadas en el gel las muestras se mezclan con una solución de azul bromofenol (5:1 v/v) como tampón de carga (Tabla 5)

Tabla 5. Tampón de carga para electroforesis anódica (Davis)

Composición	Concentración
Tris-ClH	0.5 M
Sacarosa	60% (p/v)
Azul de bromofenol	0.04% (p/v)
Acida de sodio	0.02%

El tampón de electroforesis es Tris-Glicina 8.3, y la electroforesis se realiza a corriente constante (20 mA/gel). La electroforesis se detiene 30 minutos después de la salida del frente de migración del gel, para conseguir una mejor separación de las bandas correspondientes a éstas actividades enzimáticas.

4.3.3 Sistema Reisfeld o electroforesis catódica

Este sistema permite la resolución de proteínas de carácter básico usando geles de separación de pH ácido (pH 4.3). La composición del gel, con una concentración final de acrilamida del 12% se muestra en la tabla 6.

Tabla 6. Composición de los geles separador y concentrador del sistema Reisfeld para separación de proteínas de carácter básico

Composición	Gel separador (12%)	Gel concentrador (7.5%)
Acrilamida 40%	2.74 ml	0.73 ml
Bis-acrilamida 2%	1.5 ml	0.4 ml
Ácido acético 22%-KOH 0.6M	0.75 ml	-
Ácido acético 3.6%-KOH 0.6M	-	0.5 ml
H2O destilada	2.75 ml	2.3 ml
Persulfato de amonio 10%	100 µl	40 µl
Temed	50 µl	8 µl

El **tampón de electroforesis** está compuesto por β -alanina 0.3M y 0.8% (v/v) ácido acético. El tampón de carga que se adiciona a la muestra (1:5 v/v) consiste en una solución de azul de metileno (tabla 7).

Tabla 7. Tampón de carga para el sistema Reisfeld (Reisfeld *et al.*, 1962).

Composición	Concentración
KOH	0.6M
Acido acético	3.6% (v/v)
Sacarosa	60% (p/v)
Azul de metileno	0.04% (p/v)
Acida de sodio	0.02% (p/v)

La electroforesis se llevó a cabo con la polaridad invertida a una corriente constante de 35 mA durante 3 horas.

4.3.4 Isoelectroenfoque

El análisis de las muestras mediante isoelectroenfoque (IEF) se realizó con el sistema Multiphor II (LKB) sobre geles de poliacrilamida de amplio rango de pH (3.5-9.5) comercializados por Pharmacia (Ampholine PAGplate). Se aplicaron 10 μ g de proteína de cada muestra, siendo las condiciones de electroforesis las indicadas por el fabricante en las instrucciones del producto (1500 V, 50mA, 30W, duración 90 minutos). El punto isoeléctrico aparente se calculó a partir de la determinación del pH de cada intervalo de 0.5 cm del gel.

4.4 Detección de actividades enzimáticas

4.4.1 Quitinasa

Para la detección en gel de actividades quitinasa se usó glicolquitina como sustrato (Molano *et al.*, 1979), ya que su carácter soluble asegura el reparto homogéneo del sustrato en el gel. Cuando la electroforesis se realizó en condiciones desnaturalizantes (4.3.1) o nativas siguiendo el sistema Davis (4.3.2), el sustrato se incluyó directamente en el gel separador a una concentración final de 0.01% (p/v). En el caso de la electroforesis catódica siguiendo el sistema descrito por Reisfeld (4.3.3) y del isoelectroenfoque (4.3.4.), el sustrato no se incluyó directamente en el gel separador sino en un gel adicional al 7.5% de acrilamida (tabla 8) al que se transfirieron las proteínas tras la electroforesis.

Tabla 8. Composición del gel con sustrato (7.5% acrilamida) para detección de actividades enzimáticas tras electroforesis catódica o isoelectroenfoque.

Composición	Concentración
Acrilamida 40%	1.82 ml
Bis-acrilamida 2%	1 ml
Sustrato enzimático	100 μ l
H ₂ O destilada	7 ml
Persulfato de amonio 10%	100 μ l
Temed	20 μ l

En todos los casos tras la electroforesis el gel separador se equilibra mediante un lavado de 20 minutos en el tampón de incubación de la actividad, acetato de sodio 50 mM pH 5.0.

Cuando la electroforesis se realizó en condiciones desnaturalizantes, las actividades quitinasa se renaturalizaron siguiendo distintos protocolos y distintos tiempos de incubación.

Para el caso de desnaturalización de las muestras proteicas en condiciones no reductoras, en ausencia de MCE, tras el lavado previo la renaturalización se realizó mediante una incubación a 37°C en 200 ml del tampón acetato de sodio pH 5.0, 50 mM, durante tiempos entre 1 y 18 horas.

Cuando la desnaturalización se desarrolló en condiciones reductoras mediante la adición del 5% (v/v) de 2-mercaptoetanol (MCE) al tampón de desnaturalización (apartado IV.3.1.), la renaturalización se llevó a cabo tras el lavado mediante una incubación de 45 minutos a 37°C en 200 ml de tampón Tris-HCl pH 8.0 100mM conteniendo 1% (v/v) de Tritón X-100 y 1 mM de tioglicolato o 1 mM de L-cisteina.

En relación a las separaciones en condiciones nativas, se procedió según el sistema empleado. Para la electroforesis anódica (sistema Davis, apartado 4.3.2) tras el lavado la incubación del gel separador, que lleva incluido el sustrato, se realiza en tampón acetato de sodio pH 5.0 50 mM durante 4 horas a 37°C.

En el caso de la electroforesis catódica (sistema Reisfeld, apartado 4.3.3), el gel separador se equilibró 20 minutos a 37°C en tampón acetato de sodio 50 mM pH 5.0, y se colocó sobre un cristal cubierto con papel Whatman 3MM cuyos extremos, a modo de mecha, estaban sumergidos en un reservorio conteniendo el tampón de transferencia, igual al tampón de incubación de la actividad (acetato de sodio 50 mM pH 5.0). Sobre el gel separador se colocó un gel de tamaño similar conteniendo el sustrato (tabla 8). Se eliminó el exceso de tampón y las burbujas de aire entre ambos geles y sobre ellos se situaron dos piezas de papel Whatman 3MM de tamaño similar al de los geles. A continuación se colocaron varias piezas de papel de celulosa y sobre éstas otra superficie plana y un peso de 1 kg. El proceso de transferencia de proteínas del gel separador al gel con el sustrato se llevó a cabo, normalmente, durante toda la noche. Una vez completado ese tiempo se separaron los geles y con el fin de comprobar el desarrollo correcto de la transferencia se realiza una tinción de proteínas con azul Coomassie del gel separador.

Para el análisis de actividades quitinasa tras isoelectroenfoque, el gel de separación se equilibró como se cita anteriormente, y se superpuso a un gel conteniendo el sustrato (Tabla 8) situado sobre un cristal. Después de eliminar las burbujas y el exceso de tampón entre ambos el cristal con los geles se coloca sobre varias capas de papel empapadas en el tampón de incubación (acetato de sodio 50 mM a pH 5.0) en una caja hermética de plástico para mantener un alto grado de humedad. La transferencia se llevó a cabo durante 3 horas y se comprobó que ésta había sido completa mediante tinción del gel de isoelectroenfoque con azul de Coomasie.

En todos los casos la actividad quitinasa se reveló mediante tinción de los geles con el sustrato con el fluorocromo Calcofluor White M2R (Sigma) (0.01% p/v en tampón Tris-HCl 0.3 M pH 8.9) durante 5 minutos, seguido de un lavado con agua destilada a temperatura ambiente para aumentar el contraste. El Calcofluor, fluorescente bajo luz UV, se une a la quitina. Cuando el gel se visualiza en el transiluminador de luz UV a 312 nm, las zonas donde ha habido actividad quitinasa aparecen como zonas oscuras frente al fondo fluorescente del gel con quitina intacta. Los geles se fotografiaron (Polaroid film nº 665) bajo esa luz con un filtro naranja.

4.4.2 Quitosanasa

La detección de actividades quitosanasa se llevó a cabo con métodos equivalentes a los indicados en el apartado anterior para la detección de quitinasas, usando como sustrato glicolquitosán (Sigma) incluido en los geles a la concentración final de 0.01%. Los lavados e incubaciones en los distintos procesos se realizaron como en el apartado anterior exceptuando la concentración del tampón de incubación, que en este caso es acetato de sodio 10 mM, pH 5.0. El revelado de la actividad quitosanasa consiste, al igual que para la actividad quitinasa en tinción del gel que contiene el sustrato con Calcofluor en un transiluminador con longitud de onda de 312 nm. Para confirmar las actividades quitosanasa verdaderas y descartar falsos positivos se realizó una segunda tinción de 45 minutos con

azul Coomasie (0.25% Coomasie Brilliant Blue R-250 en solución con 50% metanol y 10% ácido acético) seguido de un lavado de 30 minutos en la solución de desteñido de agua destilada con metanol 5% y ácido acético al 7%. El azul Coomasie tiene una gran afinidad por el quitosán, por tanto las zonas donde ha habido actividad quitosanasa aparecen como bandas blancas sobre el fondo azul del quitosán intacto.

4.4.3 Quitinasa/quitosanasa

La detección de actividades quitinasa/quitosanasa en el mismo gel se realizó siguiendo los métodos anteriores, añadiendo simultáneamente ambos sustratos (glicolquitina y glicolquitosán) al gel. Las incubaciones se llevaron a cabo en acetato de sodio pH 5.0 tanto 50mM como 10mM. Tras la tinción de los geles con Calcofluor y su observación con luz ultravioleta se hizo una muesca en el gel junto a las bandas detectadas con una pipeta pasteur. Seguidamente los geles se tiñeron con azul Coomasie durante 45 minutos como se describe en el apartado anterior (4.3.2).

4.4.4 β -1,3-glucanasa

Para la detección de actividad β -1,3-glucanasa se incluyó directamente en la matriz del gel una solución de β -1,3-glucanos (0.6% en NaOH 0.5%) purificados a partir de *Saccharomices cerevisiae* (Cabib y Bowers, 1971). El gel separador es esencialmente el descrito en el apartado IV.3.2, con ligeras modificaciones ya que el volumen del sustrato es mayor, y es necesario neutralizar el pH altamente básico de la solución de glucanos. La composición final se indica en la tabla 9.

Tabla 9. Composición de los geles separador y concentrador del sistema Reisfeld para detección de actividades β -1,3-glucanasas de carácter ácido o neutro.

Composición	Gel separador (15%)	Gel concentrador (4%)
Acrilamida 40%	3.65 ml	0.48 ml
Bis-acrilamida 2%	2 ml	0.26 ml
Tris-ClH 3M, pH 8.8	1.25 ml	-
Tris-ClH 0.5M, pH 6.8	-	1.26 ml
β -1,3-glucanos	1 ml	-
HCl	30 μ l	-
H ₂ O destilada	2.8 ml	2.85 ml
Persulfato de amonio 10%	70 μ l	50 μ l
Temed	15 μ l	5 μ l

Para los métodos en que el sustrato no estaba incluido en el gel de separación (sistema Reisfeld o IEF) se prepararon geles de acrilamida al 7.5% portadores del sustrato sustrato (tabla 10).

Tabla 10. Composición del gel con sustrato al 7.5% de poliacrilamida

Composición	Concentración
Acrilamida 40%	1.82 ml
Bis-acrilamida 2%	1 ml
β -1,3-glucanos	1 ml
HCl	30 μ l
H ₂ O destilada	6 ml
Persulfato de amonio 10%	100 μ l
Temed	20 μ l

Para electroforesis en condiciones desnaturizantes se siguió el mismo proceso descrito para quitinasas (apartado IV.4.1.) tanto en la desnaturización como en las incubaciones para la renaturalización de la actividad.

Cuando la separación se realizó en condiciones nativas, el gel separador se equilibró en tampón acetato de sodio 50mM, pH 5.0. En el caso del sistema Davis, el gel separador se incubó en el mismo tampón durante 3 horas a 37°C. Para el sistema Reisfeld y el IEF tras el equilibrado se llevó a cabo la transferencia al gel portador del sustrato como se describe en el apartado 4.4.1. En todos los casos los geles con el sustrato se tiñeron a temperatura ambiente con el fluorocromo azul Anilina al 0.025% (p/v) en K₂HPO₄ 150 mM, pH 8.6, durante 15 minutos. Los geles se observaron y fotografiaron bajo luz UV de longitud de onda larga (365 nm), siguiendo el método descrito por Grenier y Asselin (1993), apareciendo las zonas correspondientes a actividad β-1,3-glucanasa como bandas oscuras sobre el fondo fluorescente de los glucanos intactos.

4.4.5 Superoxido dismutasa

La separación de distintas isoformas de superóxido dismutasa (SOD) se realizó en geles de poliacrilamida al 15% bajo condiciones nativas siguiendo el sistema Davis o mediante isoelectroenfoque. En el primer caso la composición del gel es la indicada en la tabla 4 omitiendo el sustrato. El tampón de carga usado corresponde a la solución de azul bromofenol descrita en la tabla 5. La separación se llevó a cabo a una intensidad de corriente de 20mA, deteniendo la electroforesis cuando el frente del azul bromofenol alcanzó 0.5 cm por encima del borde del gel.

Las isoformas de SOD se detectaron directamente en el gel separador (Davis o IEF) con el método descrito por Beauchamp y Fridovich (1971), basado en la inhibición de la reducción del azul de tetrazolio (NBT-nitro blue tetrazolium-) por radicales superóxido (O₂⁻) generados fotoquímicamente. Las bandas resultado de la actividad aparecen sin color sobre el fondo azul correspondiente al NBT reducido por los radicales superóxido.

Para ello el gel separador se incubó en oscuridad durante 20 minutos a 25°C en 100 ml de solución de NBT 2.45 mM en tampón fosfato potásico 50mM, pH 7.8. Se retiró el

NBT y se incubó durante 15 minutos en 100 ml de solución 28mM de riboflavina en tampón fosfato potásico 50mM, pH 7.8 con 4.17 ml de TEMED. Seguidamente los geles se lavaron dos veces con el tampón (PK 50mM, pH 7.8). El recipiente con el gel se colocó bajo una fuente de iluminación fuerte, comenzando así la reacción fotoquímica, que se detuvo una vez conseguido un buen contraste entre las bandas acromáticas de la actividad SOD y el fondo azul correspondiente al NBT reducido por los radicales superóxido. El gel se guardó en el frigorífico y se fotografió al día siguiente para un mayor contraste.

La diferenciación de las distintos tipos de isoformas se realizó mediante la misma tinción de actividad, tras previa incubación de los geles durante 30 minutos a 25°C en tampón fosfato potásico 50 mM, pH 7.8, conteniendo 2mM de KCN o 5mM de H₂O₂ como inhibidores (Palma *et al.*, 1993). Las Cu-Zn-SODs son inactivadas por ambos inhibidores, KCN y H₂O₂, las Fe-SODs son resistentes al CN⁻, pero inhibidas por H₂O₂, y las Mn-SODs son resistentes a ambos inhibidores.

4.4.6 Peroxidasa

El estudio del patrón isoenzimático correspondiente a peroxidasa de los distintos extractos se realizó mediante electroforesis vertical en condiciones nativas como se describe para la SOD en el apartado IV.4 .5 e isoelectroenfoque. Las actividades se detectaron directamente en el gel separador mediante incubación en 200 ml de tampón Tris-ClH pH 7.6, 0.1 M añadiendo justo antes de su uso 20 mg de 4-cloro-1-naftol disueltos en 2 ml de metanol y 0.32 ml de peróxido de hidrógeno (0.16%). Se agitó suavemente el gel en la solución hasta la aparición de bandas color azul oscuro sobre el fondo transparente, y se detuvo la reacción sustituyendo el tampón por agua destilada.

4.5 Ensayos antifúngicos

4.5.1 En placa Petri

Se realizaron distintas experiencias con el ánimo de vislumbrar el efecto *in vivo* sobre *Phytophthora parasitica* de los enzimas hidrolíticos estudiados en este trabajo. Los ensayos de inhibición del crecimiento del hongo se realizaron en placas Petri, colocando 6 círculos de papel de filtro estéril de 5 mm de diámetro en cada placa sobre la superficie del medio de cultivo (extracto de malta 2% / agar 1%) donde crecía *Phytophthora* (apartado 1.3.1). Sobre estos círculos se aplicaron diversas concentraciones de enzimas comerciales purificadas: quitinasa de *Streptococcus griseus* (0, 1.25, 2.5, 5, 10, 20 μg de proteína (0.84 U/mg) y β -1,3-glucanasa de *Helix pomatia* (0, 2.5, 5, 10, 20 y 40 μg (0.3 U/mg), tanto conjuntamente como por separado. En todos los casos se añadieron 20 μl de la dilución correspondiente de enzima a cada papel. En otras experiencias se aplicaron 20 μl de diferentes diluciones de los extractos crudos de proteínas correspondientes a los distintos tratamientos (5, 10, 15, 20 y 30 μg proteína/ muestra). Todas las soluciones fueron filtradas antes de su aplicación a través de filtros de membranas de 0.22 μm . Las placas se devolvieron a la estufa de 24°C y se observaron a las 24, 36 y 48 horas para el seguimiento del crecimiento del hongo, en busca de posibles halos de inhibición.

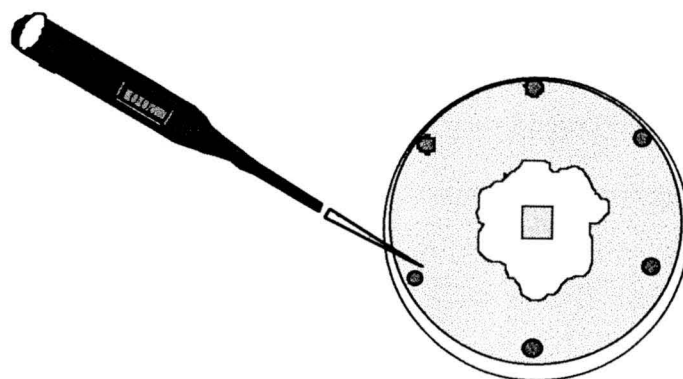


Figura 10. Esquema del ensayo del efecto antifúngico en placa de enzimas hidrolíticos comerciales y extracto bruto de proteínas de raíz.

4.5.2 En gel de poliacrilamida

Se obtuvo micelio de *P. parasitica* a partir de hongo en cultivo rutinario (apartado 1.3.1). Tras varios lavados para eliminar los restos de medio se realizó un extracto bruto de paredes mediante homogeneización del micelio con nitrógeno líquido en un mortero de porcelana. El polvo resultante se resuspendió en tampón de extracción de proteínas (MacIlvaine) centrifugando seguidamente a 15000g durante 30 minutos. El sobrenadante se guardó como extracto bruto de proteínas, el sedimento fue resuspendido de nuevo en tampón. La mezcla se sonicó durante 5 minutos para romper los restos de hifas y paredes, y tras una nueva centrifugación se repitió la operación anterior. La pasta resultante una vez eliminado el sobrenadante se usó como sustrato. Para la inclusión en el gel del homogeneizado de pared fúngica obtenida se añadió esta pasta al volumen correspondiente de tampón Tris-ClH pH 8.8, homogeneizándolos por fricción en un homogeneizador potter hasta conseguir una solución homogénea blanquecina, a la que se añadieron el resto de componentes del gel como se indicó para detección de glucanasas mediante el sistema Davis (apartado 4.4.4, tabla 8), ajustando la cantidad de agua para mantener el volumen y concentraciones finales. Se cargaron 10 µg de proteína por pocillo y la electroforesis se desarrolló como se describe en ese mismo apartado.

Tras la electroforesis el gel se equilibró mediante un lavado con tampón acetato de sodio 50 mM pH 5.0 durante 20 minutos a 37°C y se incubó toda la noche con el mismo tampón.

Debido al color blanco del extracto de pared fúngica y su alta concentración en el gel, éste resultaba translúcido, pero no transparente como en los casos anteriores (sin sustrato o con cualquiera de los sustratos anteriormente citados). Por tanto una actividad lítica sobre componentes de la pared aparecería como un halo de lisis, apreciable a contraluz sobre fondo oscuro como zonas más transparentes destacando en el resto del gel blanquecino y translúcido. Seguidamente el gel se tiñó con azul de anilina y se visualizó bajo luz UV (365) como se describe en el apartado 4.4.4.

Resultados

Efecto protector de la micorrización frente a la infección por *Phytophthora parasitica* en plantas de tomate

El tomate es un fruto de importancia mundial del que se producen anualmente 60 millones de toneladas, de las cuales alrededor de un tercio es producida en la región mediterránea. La variedad Earlymech está muy extendida en Florida, y es muy cultivada en la región mediterránea para la producción de jugo de tomate concentrado, ya que presenta ventajas como el tamaño reducido de la planta y la maduración sincrónica de los frutos. Se suele cultivar de manera intensiva en el campo sobre suelo previamente desinfectado. Aunque presenta resistencia a las enfermedades causadas por *Fusarium* y *Verticillium* esta variedad sí es sensible al ataque de hongos del género *Phytophthora*, que puede provocar daños dramáticos en los cultivos.

En relación al control biológico de patógenos en el tomate por hongos MA las investigaciones realizadas muestran en general un efecto bioprotector de la simbiosis frente a hongos, bacterias y nemátodos patógenos del suelo. Por ejemplo, García-Garrido y Ocampo (1988, 1989) encontraron que la presencia del hongo MA *Glomus mosseae* disminuía la cantidad de las bacterias patógenas *Pseudomonas syringae* y *Erwinia carotovora* pv. *carotovora* en la rizosfera del tomate independientemente del contenido de fósforo de las raíces o del momento de inoculación de los dos organismos aunque la premicorrización del sistema radical aumentaba el nivel de protección obtenido. Caron y colaboradores obtuvieron resultados similares mostrando una disminución de la necrosis provocada por el patógeno *F. oсыporum* f.sp. *radicis-lycopersici* en raíces de tomate inoculadas con el hongo MA *G. intraradices* demostrando que este efecto era independiente del nivel de fósforo disponible (Caron *et al.*, 1986a; Caron *et al.*, 1986b).

En este capítulo se describen los resultados obtenidos en cuanto a la colonización de las plantas de tomate por los hongos de la micorriza *Glomus mosseae* y *Glomus intraradices*, a la capacidad del patógeno *P. parasitica* para infectar sus raíces y desarrollar

la enfermedad y la estimación del efecto protector de la simbiosis sobre la resistencia/tolerancia de la planta frente al ataque del patógeno.

1. EFECTOS SOBRE EL CRECIMIENTO DE LA PLANTA

Se estimó el efecto de las distintas interacciones simbiótica (con *G. mosseae* o *G. intraradices*) o patógena (*P. parasitica*) sobre el crecimiento de las plantas de tomate en términos de peso fresco de parte aérea y raíz. En la figura 11 aparecen los pesos de las plantas en el momento de la inoculación con *Phytophthora* (4 semanas, -Phyt) y dos semanas después de la inoculación (6 semanas +Phyt) y sus correspondientes controles sin patógeno (6 semanas -Phyt). En relación a la simbiosis micorrícica, sólo *G. mosseae* (Gm) indujo un ligero incremento en la producción de biomasa en los dos tiempos de cosecha, aunque este no fue estadísticamente significativo, por lo que en nuestro sistema experimental no se considera que la simbiosis con ninguno de los hongos MA usados promueva el crecimiento de la planta.

Sin embargo la inoculación con el hongo patógeno *P. parasitica* sí tuvo un efecto significativo sobre la biomasa de la planta. Dos semanas después de su inoculación (6 semanas +Phyt) se observó una reducción significativa del peso de la parte aérea, entre un 30-40% y la raíz, alrededor del 50%, en las plantas no micorrizadas (Nm) o micorrizadas con *G. intraradices* (Gi) infectadas por el patógeno. Sin embargo la infección con el patógeno no causó inhibición del crecimiento en las plantas previamente colonizadas por *G. mosseae* (Gm) en parte aérea ni raíz.

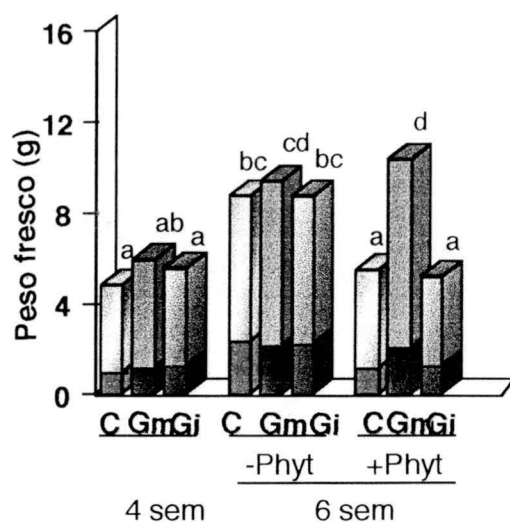


Figura 11. Efecto de las interacciones con los hongos formadores de micorriza *G. mosseae* (Gm) o *G. intraradices* (Gi) sobre el crecimiento de las plantas de tomate inoculadas (+Phyt) o no (-Phyt) con el hongo patógeno *P. parasitica*, tras 4 o 6 semanas de crecimiento. La altura de la barra corresponde al peso total de la planta, correspondiendo a la suma del peso del sistema radical (oscuro) y la parte aérea (claro).

Tabla 11. Peso fresco total, de raíz y parte aérea de las plantas de 6 semanas según los distintos tratamientos y porcentaje de reducción del peso tras la infección con el patógeno.

		-Phyt	+Phyt	Reducción
Total	Nm	8.8	5.5	37.5 %
	Gm	9.4	10.3	-9.6 %
	Gi	8.7	5.2	40.2 %
Raíz	Nm	2.4	1.1	54 %
	Gm	2.1	2	4 %
	Gi	2.2	1.2	45%
P. aérea	Nm	6.4	4.3	33 %
	Gm	7.3	8.3	-13 %
	Gi	6.5	3.9	40 %

2. ESTABLECIMIENTO Y DESARROLLO DE LA SIMBIOSIS

Antes de realizar los ensayos de inoculación con el patógeno se hizo un seguimiento de la colonización de la raíz por los hongos MA.

2.1 Colonización por *Glomus mosseae*

Tras cuatro semanas de crecimiento más del 40% de la longitud total de la raíz estaba colonizada por *G. mosseae*. A las seis semanas la colonización alcanzaba entre un 55% y un 60% de la raíz según los experimentos, y seguía incrementando hasta alcanzar un 65% a las 8 semanas. La morfología de la simbiosis, mostrada en la figura 12, es representativa de una simbiosis MA típica (introducción, apartado 3.2.1.), con desarrollo del micelio externo alrededor de la raíz, apresorios y colonización interna en la que predominan los arbuscúlos (arb), que representan entre un 60-65% del total del parenquima cortical colonizado, y aparecen esporádicamente algunas vesículas (ves).

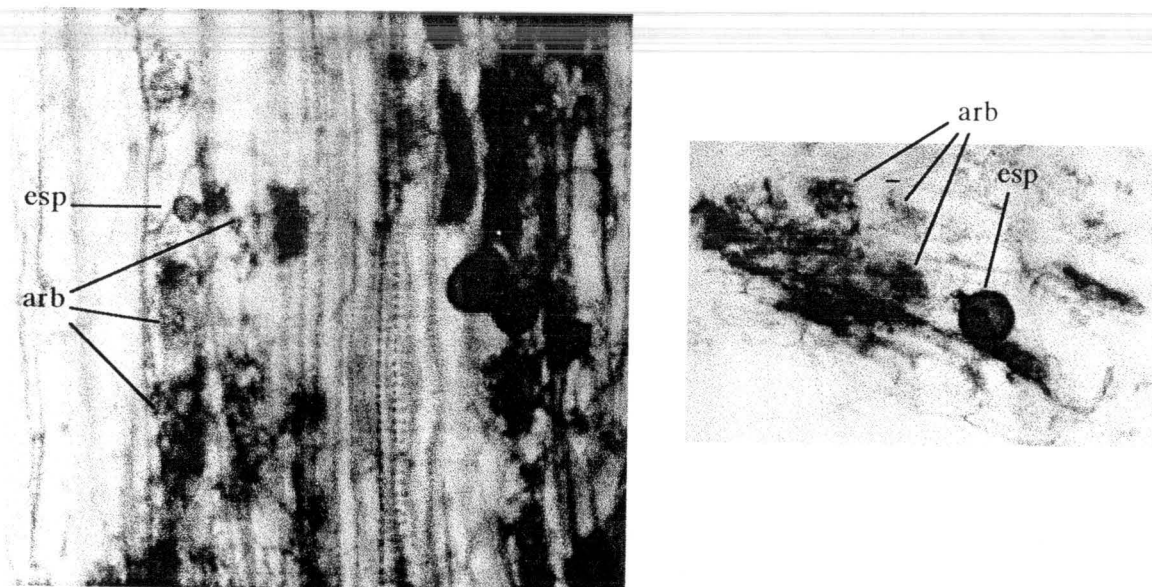


Figura 12. Raíces de tomate colonizadas por *G. mosseae*. Se observan esporas externas (esp), arbuscúlos (arb) y algunas vesículas. A la derecha detalle de espóra de *G. mosseae* y de los arbuscúlos.

2.2 Colonización por *Glomus intraradices*

La simbiosis estaba bien establecida tras cuatro semanas, con un porcentaje de colonización de la raíz superior al de *G. mosseae*. A las cuatro semanas superaba el 50%, para llegar a las 6 semanas a un 65% de colonización, y más de un 80% a las 8 semanas. En este caso la colonización interna (Figura 13) se caracteriza por una presencia masiva de vesículas (ves) muchas de las cuales en etapas más tardías dan lugar a esporas intraradicales.

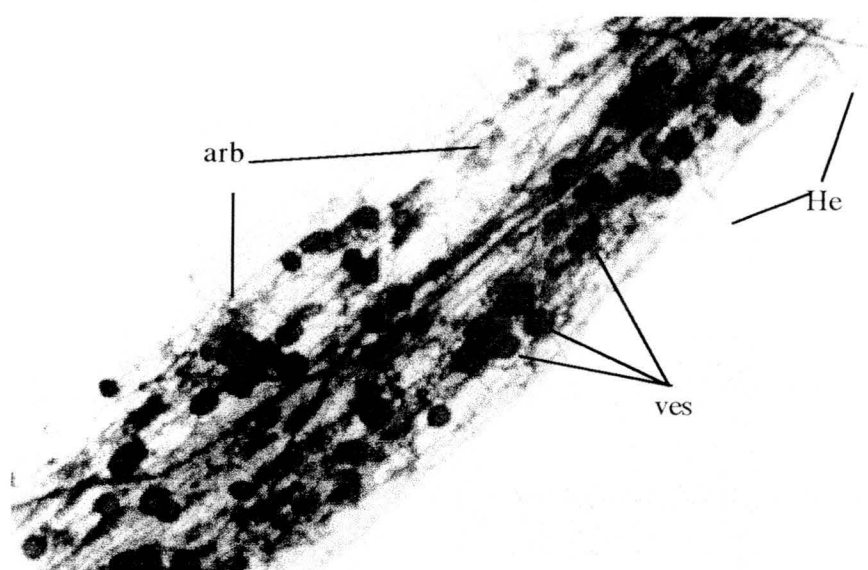


Figura 13. Raíz colonizada por *G. intraradices*. Se observan hifas externas (He), la alta proporción de vesículas (ves) y los arbuscúlos (arb).

3. INFECCIÓN DEL SISTEMA RADICAL POR *PHYTOPHTHORA PARASITICA* Y DESARROLLO DE LA ENFERMEDAD

Dos semanas después de la inoculación con el hongo patógeno *P. parasitica* ya se aprecian los síntomas de la enfermedad en las plantas que se manifiesta en primer lugar en el sistema radical, donde aparecen lesiones necróticas más o menos extendidas, que pueden impedir el desarrollo de esa raíz. Una estimación visual de los daños en el sistema radical indicó que las plantas no micorrizadas (Nm) o las previamente colonizadas con *G. intraradices* (Gi) presentaban numerosas áreas necróticas repartidas por todo el sistema

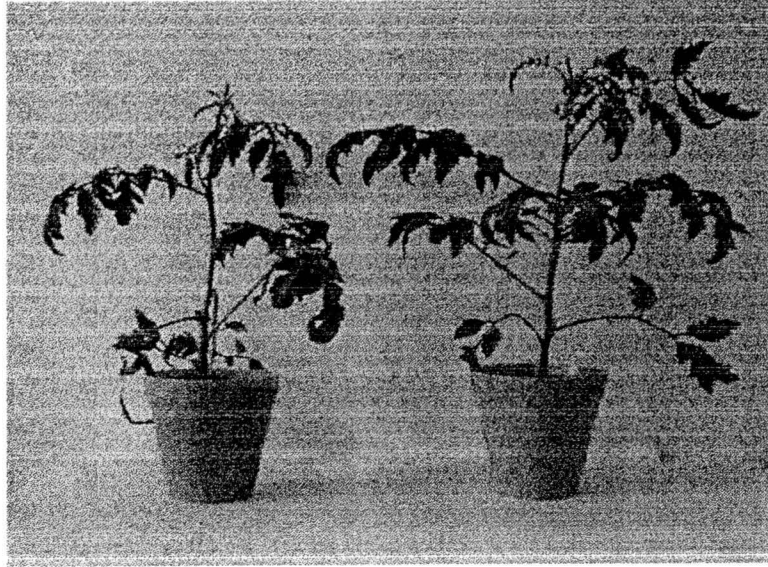
radical, junto con una reducción del desarrollo de la masa radical. Las plantas más afectadas mostraron síntomas en la parte aérea como marchitez y clorosis en las hojas más viejas. En ocasiones se observó un estrangulamiento del cuello del tallo en plantas muy afectadas. La infección por *P. parasitica* ocasionó en algunas ocasiones la muerte de la planta.

Sin embargo cuando las plantas estaban previamente colonizadas por el hongo *G. mosseae* la inoculación con *P. parasitica* no tuvo tanto impacto en el desarrollo y salud de la planta. El sistema radical presentaba menor número de lesiones necróticas y más localizadas, no se apreciaba una pérdida de la masa radical en comparación con sus correspondientes controles sin patógeno, y rara vez se encontraron síntomas en la parte aérea (Figuras 14 y 15).

Utilizando una escala arbitraria para evaluar visualmente los síntomas (0 para la ausencia de síntomas, 5 para raíces totalmente necrosadas), la media de los síntomas de las plantas no micorrizadas (Nm) o micorrizadas con *G. intraradices* (Gi) infectadas por el patógeno fue 3 (nivel medio de síntomas), mientras que para las plantas previamente colonizadas por *G. mosseae* (Gm) el índice medio de enfermedad fue 1 (muy pocos síntomas).

Se observa, en relación a los pesos frescos obtenidos para los distintos tratamientos, que el nivel de síntomas se correlaciona con la pérdida de peso por el ataque del patógeno (tabla y Figura 11, tabla 12). Se cuantificó la cantidad de *Phytophthora* en la raíz mediante la técnica de ELISA. Los resultados se expresan en unidades de absorbancia ante la imposibilidad de realizar una curva de referencia adecuada, ya que los anticuerpos del kit parecen reconocer antígenos que el patógeno expresa en planta durante la colonización de la raíz y no los del hongo en cultivo puro (Dassi *et al.*, 1997). A pesar de esto el kit ha mostrado su eficacia y reproducibilidad para la comparación de niveles de infección en raíz. Los valores medios para los distintos tratamientos dos semanas después de la inoculación con el patógeno fueron: 1.94 para plantas no micorrizadas, 0.98 para las micorrizadas con *G. intraradices*, y 0.5 para las colonizadas por *G. mosseae* (tabla 12). Las plantas no

A



B

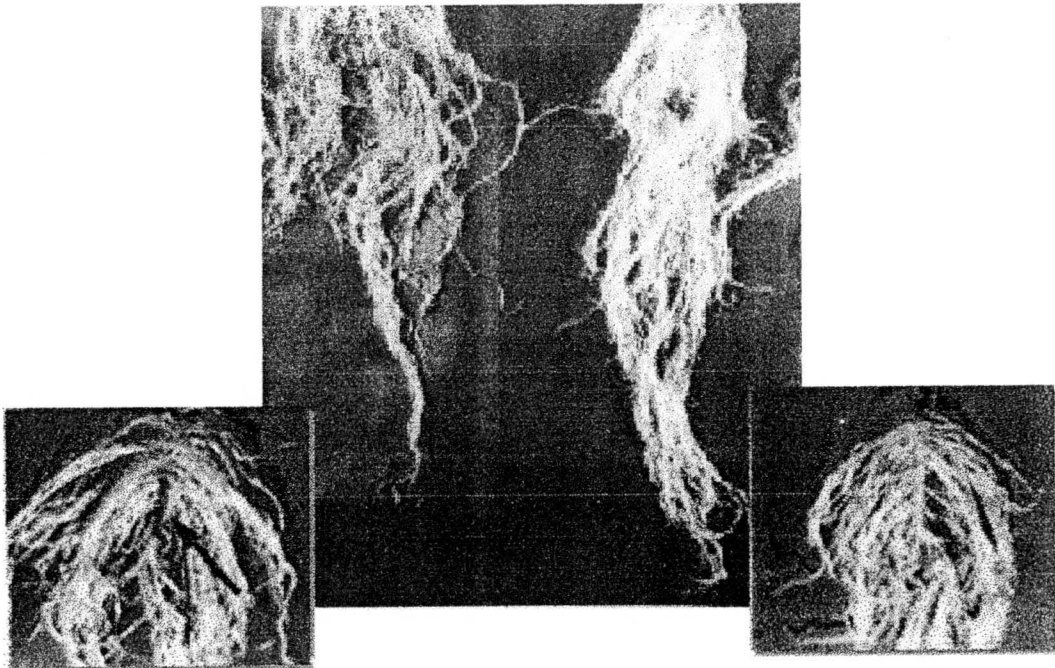


Figura 14. Desarrollo de los síntomas de la enfermedad causada por *Phytophthora parasitica* en parte aérea (A) y raíz (B) en plantas no micorrizadas (izquierda) o colonizadas por *Glomus mosseae* (derecha). En la figura B se muestran detalles del sistema radical en los recuadros laterales, observándose en la planta no micorrizada la raíz principal necrosada (izqda, flecha) y ausencia de necrosis en la raíz principal en la planta micorrizada (dcha).

inoculadas con el patógeno, micorrizadas o no, dieron valores de absorbancia de 0.1, valor de fondo del ensayo.

Tabla 12. Parámetros de micorrización, nivel de síntomas y cantidad de *Phytophthora* dentro de la raíz dos semanas después de la inoculación de las plantas.

	Micorrización (%)		Indice enfermedad*	<i>Phytophthora</i> en raíz **
	- Phyt	+ Phyt	+ Phyt	+ Phyt
Nm	-	-	3	1.94a
Gm	56	58	1	0,50b
Gi	64	63	3	0,98ab

* Estimación visual de los síntomas de 0 (ausencia de síntomas) a 5 (raíz completamente necrosada)

** Expresado como unidades de absorbancia obtenidos mediante la técnica de ELISA.

Los datos seguidos de una misma letra no difieren significativamente ($P \leq 0.05$).

La inoculación con el patógeno no tuvo efectos significativos sobre el proceso de colonización de los hongos de la micorriza.

En algunas experiencias la colonización por *G. mosseae* no alcanzó el nivel indicado (sobre un 15%), y en estos caso no se observaron diferencias respecto a las no micorrizadas en la respuesta al ataque del patógeno.

4. CONTENIDO PROTEICO

En la tabla 13 se muestran los contenidos proteicos de los extractos radicales correspondientes a los distintos tratamientos, después de 4 y 6 semanas de crecimiento. La concentración en proteínas fue mayor en las plantas colonizadas tanto por *G. mosseae* como por *G. intraradices* a ambos tiempos de cosecha. La inoculación con el patógeno no alteró de forma estadísticamente significativa estos valores.

Tabla 13. Concentración de proteínas en los extractos crudos radicales, expresados en gramos de proteína por gramos de peso fresco.

Tratamiento <i>Phytophthora</i>	Tratamiento micorriza	Edad (semanas)	
		4	6
- Phyt	Nm	0.45a	0.53a
	Gm	0.78b	0.95b
	Gi	0.85b	1.09b
+ Phyt	Nm	-	0.43a
	Gm	-	0.82b
	Gi	-	0.59ab

5. DISCUSIÓN

El crecimiento del tomate no se incrementó de forma significativa por ninguno de los dos hongos MA usados en este estudio, probablemente debido a que el sustrato, basado principalmente en arena, no impone limitaciones importantes a la difusión de los nutrientes hasta la raíz. Este aspecto es muy importante cuando se trata de evitar el efecto indirecto de un mejor estado nutricional de las plantas micorrizadas sobre la susceptibilidad frente al patógeno.

La inoculación con el patógeno *P. parasitica* sí tuvo consecuencias importantes en el desarrollo y salud de la planta, causando numerosas lesiones necróticas en el sistema radical y una notable reducción de la biomasa radical y aérea. Sin embargo, la colonización previa de la raíz con el hongo MA *G. mosseae* redujo considerablemente los daños causados por el patógeno, tanto a nivel de pérdida de peso como de necrosis en el sistema radical. Estos resultados concuerdan con los obtenidos durante experiencias paralelas llevadas a cabo en distintos sustratos por otros grupos en el contexto del mismo proyecto de investigación al que pertenece este trabajo (Cordier *et al.*, 1996; Trotta *et al.*, 1996), lo que confirma *G. mosseae* como protector del tomate frente a *P. parasitica* en distintas condiciones experimentales. Los datos de Cordier y colaboradores demuestran que la expresión de la bioprotección requiere que la colonización por el hongo MA sea anterior a la infección por

el patógeno, como ya se había descrito para interacciones entre otras especies de *Phytophthora* y distintas plantas (Bartschi *et al.*, 1981; Guillemín *et al.* 1994). Además la protección requiere un umbral mínimo de colonización, como apunta el hecho de que en nuestro sistema un 15% de colonización radical por *G. mosseae* no fue suficiente para conferir protección a la planta, fenómeno corroborado por otros grupos participantes en el proyecto (Fortuna *et al.*, 1998; Cordier *et al.*, 1998 -AIR-), estipulándose el umbral en al menos un 30%.

Se sabe que una mejora en la nutrición de fósforo de la planta puede aumentar la tolerancia de ciertas plantas frente al ataque de hongos patógenos, y puesto que esa es la función más reconocida de las micorrizas, es uno de los mecanismos más descritos en cuanto al efecto de esta simbiosis frente a patógenos (Hooker *et al.* 1994). Sin embargo en nuestro modelo (tomate/ *P. parasitica*) este mecanismo no parece estar implicado en la protección de la planta frente a *Phytophthora*. Un indicio sería que en nuestro sistema no hay estimulación significativa del crecimiento por este hongo, que sería el reflejo de esta mejora en el estado nutricional. Trotta y colaboradores (1996) confirman estos indicios al demostrar que la fertilización de las plantas no micorrizadas con niveles altos de fósforo no disminuyó de manera apreciable el desarrollo de la enfermedad, por lo que, aún sin descartar cierta contribución del aspecto nutricional, apuntan a otros mecanismos como clave para el efecto protector.

Además de la reducción de la necrosis y la pérdida de peso, la proliferación del patógeno en la raíz es menor en plantas colonizadas por *G. mosseae* según se deduce de la detección de proteínas de *P. parasitica* en los extractos radicales mediante la técnica de ELISA. Estudios citológicos llevados a cabo por Cordier y colaboradores (1996) demuestran que el patógeno prolifera rápidamente en la zona cortical, sobre todo intercelularmente, en las plantas no micorrizadas, y que penetra las células corticales por digestión parcial de la pared sin provocar una reacción evidente de la célula hospedadora. La presencia del patógeno en la célula causa desorganización citoplasmática, dando lugar a necrosis de las células infectadas e incluso de las células no infectadas adyacentes a la

lesión, aunque esta reacción no parece prevenir la difusión del patógeno hacia el cilindro central que penetra el xilema. En plantas previamente colonizadas por *G. mosseae*, las hifas de ambos hongos no se hallan normalmente en las mismas partes del sistema radical, y aunque ocasionalmente pueden desarrollarse en los mismos tejidos, *P. parasitica* nunca invade las células con arbusculos, que nunca se necrotizan aunque haya alrededor hifas intercelulares del patógeno. Por tanto el desarrollo de las hifas del patógeno en el interior de la raíz se reduce considerablemente sobre todo en el cortex, tejido en el que se desarrolla preferencialmente el hongo MA. Además frecuentemente en las plantas micorrizadas el hongo MA se distribuye por la zona diferenciada cerca del ápice, y puesto que el hongo patógeno es capaz de penetrar todas las zonas del ápice el resultado es una reducción del porcentaje de ápices necróticos. Todos estos datos parecen apuntar a que la protección del tomate frente a *P. parasitica* se deba a una mayor resistencia frente al patógeno, más que de un incremento en la tolerancia.

Sin embargo, aunque *G. intraradices* alcanzó niveles mayores de colonización, no se observó reducción de los daños causados por el patógeno en las plantas micorrizadas con este hongo. Ya en 1981 Clarke y Mosse concluyeron que no existe una relación directa entre la magnitud de la infección interna y su eficiencia en la promoción del crecimiento de la planta, y esta afirmación se ha podido extrapolar a la eficiencia en otros aspectos (ref), como se observa en el presente trabajo. Nuestros resultados contrastan con los de trabajos previos que han demostrado la capacidad de *G. intraradices* para proteger plantas de tomate frente a patógenos como *Fusarium* (Caron *et al.*, 1986 a y b; Datnoff *et al.*, 1995). en que el efecto protector se evidencia incluso con la inoculación de *G. intraradices* simultánea o posterior a la del patógeno. De estos datos y otros trabajos se deduce que la habilidad de los hongos MA para potenciar la resistencia o tolerancia de la planta frente a patógenos no es igual para los distintos hongos, y necesita ser determinada para cada combinación particular de hongo MA, genotipo de la planta hospedadora, patógeno y condiciones ambientales (Azcón-Aguilar y Barea, 1996)

Quitinasas

Las quitinasas (EC 3.2.1.14) hidrolizan la quitina, un homopolímero de residuos de N-acetil-D-glucosamina unidos por enlaces β -1,4, componente mayoritario de las paredes celulares fúngicas. Constituyen una familia de proteínas que pueden diferir en sus características bioquímicas, estructura primaria y localización subcelular, además de poder ser diferencialmente reguladas, probablemente por desempeñar funciones distintas, y han sido clasificadas en seis clases en función de sus secuencias aminoacídicas (Collinge *et al.*, 1993). La actividad quitinasa parece inducirse en plantas superiores en respuesta a estreses de tipo fisiológico o ambiental (Collinge *et al.*, 1993; Graham y Sticklen, 1994). Aunque no se ha descrito aún ningún sustrato para esta enzima en plantas. Se ha descrito su regulación a lo largo del desarrollo de la planta, lo que apunta a una función morfogénica, especialmente durante los procesos que implican desorganizaciones de la pared celular como la floración o la reproducción (Sahai y Manocha, 1993) o en el intercambio de señales, como por ejemplo en zanahoria donde parece intervenir en la generación de señales endógenas que controlan el desarrollo del embrión en estadios tempranos (Kragh *et al.*, 1996). También se ha sugerido su intervención en el crecimiento de la planta (Patil y Widholm, 1997). Sin embargo, el interés sobre la inducción de quitinasas y otros enzimas hidrolíticos se ha centrado, sobre todo, en su implicación en la defensa de la planta frente al ataque de patógenos, ya que se ha demostrado la actividad antifúngica de algunas quitinasas en ensayos *in vitro* (Schlumbaum *et al.*, 1986; Sela Buurlage *et al.*, 1993) o *in vivo* en plantas transgénicas (Broglie *et al.*, 1991; Grison *et al.*, 1996). Por tanto las quitinasas parecen ser parte de los mecanismos que de manera coordinada constituyen el complejo proceso de las respuestas de defensa, ejerciendo su papel en la resistencia de modo directo mediante la lisis de la pared celular del hongo patógeno, o indirecto mediante la liberación de compuestos capaces de elicitar los distintos mecanismos de defensa (Sahai y Manocha, 1993).

También se ha descrito la estimulación de quitinasas de la planta en distintas interacciones simbióticas con la raíz, como nódulos (Stahelin *et al.*, 1992), ectomicorrizas (Albretch *et al.*, 1993) y micorrizas arbusculares (Spanu *et al.*, 1989, Dumas-Gaudot *et al.*, 1992a,b, 1994, Volpin *et al.*, 1994).

En este capítulo se describen los resultados sobre actividades quitinasa en raíces de tomate durante la interacción simbiótica con *Glomus mosseae*, *Glomus intraradices* y *Gigaspora rosea* o patogénica con *Phytophthora parasitica*.

1. ISOFORMAS ÁCIDAS

Los extractos crudos de proteínas de las raíces de los distintos tratamientos se analizaron mediante electroforesis bajo distintas condiciones como se describe en Material y Métodos. El sistema Davis para la separación de proteínas ácidas o neutras (Figura 14), permitió la detección de cuatro isoformas principales (barra, quit1, quit2 y quit3) en los extractos de raíz no micorrizada o control (Figura 14, calle Nm) y algunas de señal más débil cuya intensidad varió en los distintos ensayos (punteado). Además de estas isoformas, presentes en las raíces de todos los tratamientos, en los extractos de raíz colonizada por *G. mosseae* aparece una amplia señal correspondiendo a una actividad quitinasa adicional (Figura 14, calle Gm, quitM) que se confirmó en raíces colonizadas por *G. intraradices* (no mostrados). En raíces infectadas por *Phytophthora* (Figura 14, bloque +Phyt) la actividad de las isoformas más débiles (punteado) y de la constitutiva quit1 se ve incrementada, y además aparece una nueva isoforma de mayor MR (flecha), que no se detecta en raíces control. En los extractos de plantas colonizadas por *G. mosseae* y posteriormente infectadas por *P. parasitica* (Figura 14, calles Gm+Phyt) se detectaron las bandas inducidas por ambos hongos (quitM y flecha) aunque la actividad de la isoforma inducida por la micorrización parece tener menor actividad. En los extractos proteicos del micelio de los distintos hongos no se detectaron bandas de movilidad similar (Figura 14, bloque micelio), *Phytophthora* no presentó ninguna actividad clara (Figura 14, micelio Pp), y en el micelio extraradical de *G. mosseae* y *G. intraradices* se detectó una quitinasa (Figura 14, bloque

micelio, calles Gm y Gi, flecha izqda) pero que no corresponde con la detectada en los extractos de las plantas micorrizadas.

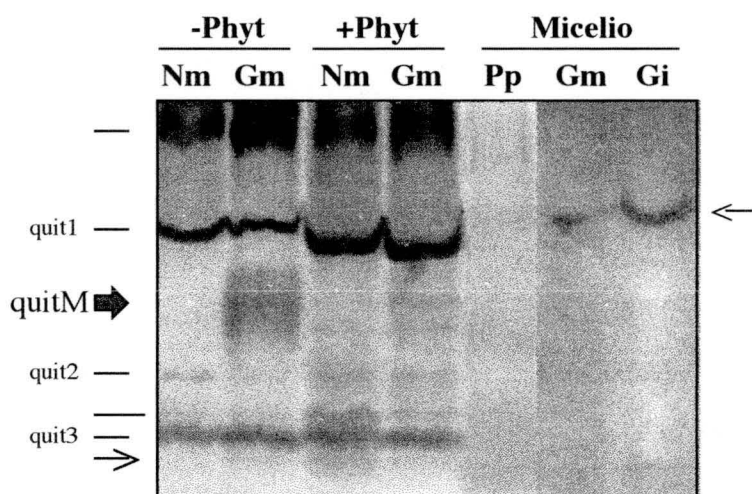


Figura 14. Isoformas de quitinasa de carácter ácido o neutro en raíces de plantas de 6 semanas no micorrizadas (Nm) o en simbiosis con *G. mosseae* (Gm), infectadas (-Phyt) o no (+Phyt) por el patógeno *P. parasitica*, y en los extractos proteicos de micelio de los hongos *P. parasitica* (Pp), *G. mosseae* (Gm) o *G. intraradices* (Gi).

Este patrón isoenzimático no mostró diferencias significativas a través del tiempo según se deduce del seguimiento de las actividades quitinasas en raíz mediante cortes secuenciales a las 4, 6, 8, 10 y 12 semanas de crecimiento (datos no mostrados).

Cabe resaltar que en plantas que mostraron menor grado de colonización radical por los hongos MA la isoforma inducida por la micorrización (quitM) se detecta con menor intensidad, incluso no se detecta si la colonización se limita a puntos aislados. En las muestras correspondientes al ensayo preliminar en que se aplicaban distintos niveles de fósforo en la solución nutritiva (Material y Métodos, 1.1.1) la isoforma aparecía en las plantas inoculadas y fertilizadas con solución Long Ashton al 25% de fósforo, que mostraban un buen porcentaje de colonización, y se detectaba debilmente en las inoculadas y fertilizadas con la solución al 50% de fósforo, que mostraban unos niveles de micorrización de alrededor del 10%, mientras que en las plantas fertilizadas con 100% de fósforo, en las que la colonización radical fue sobre un 2% no aparecieron. En las plantas no

inoculadas con el hongo MA no se detectó ninguna actividad similar a ninguno de los niveles de fósforo aplicados.

El ensayo llevado a cabo en colaboración con el equipo de la Dra. Dumas-Gaudot de Dijon (Francia) permitió confirmar estos resultados en las plantas crecidas en condiciones monoxénicas, encontrando un patrón isoenzimático similar (Figura 15, bloque *in vitro*). Las plantas colonizadas por *Gigaspora rosea* (Figura 15, calle Gir, *in vitro*) presentan la isoforma adicional descrita en las plantas micorrizadas en condiciones abiertas (quitM, Figura 14 y Figura 15-*in vivo*), y en las plantas control no micorrizadas (Figura 15, calle Nm, *in vitro*) aparecen las isoformas constitutivas aunque la isoforma de mayor RM (quit 3) aparece con menor intensidad.

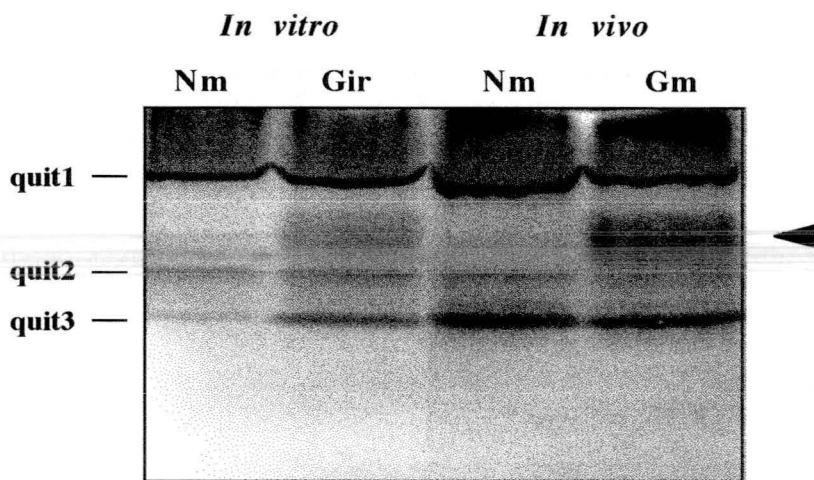


Figura 15. Actividades quitinasa con caracter ácido o neutro, procedentes de raíces no micorrizadas o micorrizadas del sistema experimental en condiciones abiertas -modelo simple- (*In vivo*), o del sistema de cultivo monoxénico (*In vitro*).

2. ISOFORMAS BÁSICAS

Las isoformas de quitinasa con caracter básico presentes en los distintos extractos se analizaron mediante separación electroforética catódica (Figura 16). Se detectaron cuatro isoformas básicas constitutivas en todos los extractos y aunque no se observaron diferencias cualitativas entre los distintos tratamientos (no micorrizadas, micorrizadas con

G. mosseae o *G. intraradices*), las actividades detectadas en los extractos de plantas infectadas por el patógeno (Figura 16, calle Phyt) eran considerablemente mayores. Sin embargo este incremento en la actividad quitinasa básica no es detectable en las raíces micorrizadas y posteriormente infectadas por el patógeno (Figura 16, calle Gm+Phyt). En un extracto crudo de proteínas del hongo *P. parasitica* no se detectó ninguna señal de quitinasa básica que pueda corresponder a ninguna de las isoformas presentes en cualquiera de los extractos proteicos de raíz.

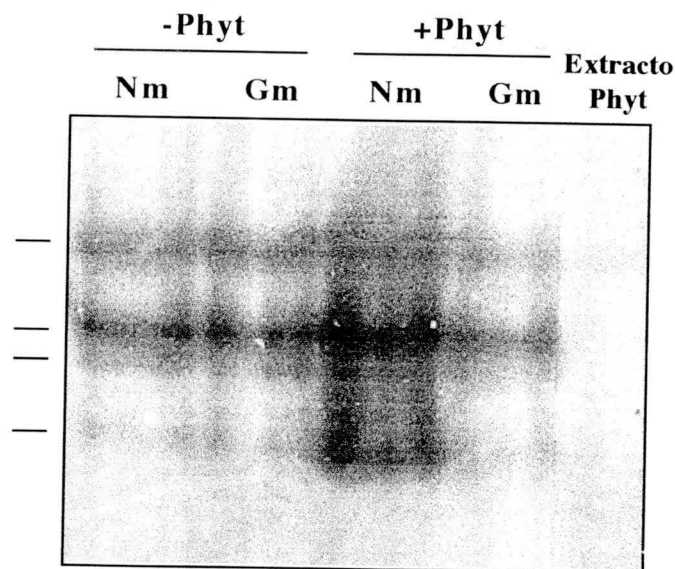


Figura 16. Quitinasas con carácter básico. Leyendas como en figura 14.

3. DETERMINACION DEL PUNTO ISOELECTRICO

Para una mayor caracterización de la isoforma inducida por la micorrización, los extractos de los distintos tratamientos se analizaron mediante isoelectroenfoque (Figura 17). En los extractos de plantas micorrizadas (Figura 17, calle Gm) aparecían dos bandas adicionales muy próximas, con puntos isoelectricos estimados de 4.5 y 4.7, que no aparecían en las raíces de plantas control no micorrizadas infectadas o no por *Phytophthora* (Figura 17, calles Nm y Phyt). En relación a las isoformas básicas no se observaron diferencias cualitativas entre los tratamientos aunque normalmente las actividades en los

extractos correspondientes a plantas infectadas con el patógeno presentaban mayor actividad (Figura 17, calle Phyt).

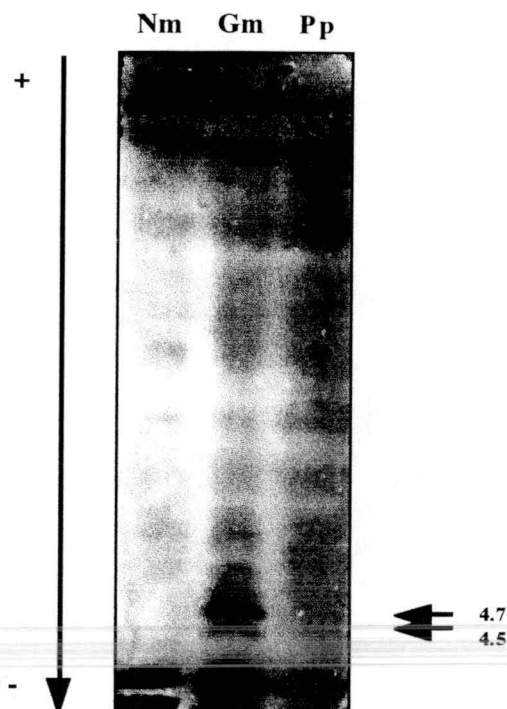


Figura 17. Patrón isoenzimático de quitinasas separado mediante isoelectroenfoque, de raíces no micorrizadas (Nm), colonizadas por *G. mosseae* (Gm) o no micorrizadas e infectadas por *P. parasitica* (+Phyt).

4. DETERMINACION DEL PESO MOLECULAR Y CAPACIDAD DE RENATURALIZACIÓN

Los extractos proteicos se sometieron posteriormente a electroforesis en condiciones desnaturizantes. Cuando la desnaturalización de las proteínas se llevó a cabo en condiciones no reductoras, sólo las isoformas de quitinasa presentes en las raíces micorrizadas recuperaron su actividad dentro de periodos de incubación cortos (Figura 18, panel A). En los extractos de raíces micorrizadas (con *G. mosseae* o *G. intraradices*) con

sólo una hora de incubación aparecen tres bandas líticas bien definidas con pesos moleculares comprendidos entre 28 y 35 kDa, independientemente de que la planta haya sido posteriormente infectada por el patógeno o no (Figura 18, panel A, calle Gm, bloques -Phyt y +Phyt). Después de periodos de incubación bastante mayores (8 horas) fue posible detectar alguna de estas actividades en los extractos de plantas no micorrizadas colonizadas por el patógeno (Figura 18, panel B, calle Nm +Phyt) junto con señales de actividad de menor PM en todos los extractos, aunque la señal es considerablemente mayor en los extractos de plantas no micorrizadas infectadas con el patógeno. No se detectó actividad quitinasa en los extractos proteicos de *Phytophthora* a ninguno de los tiempos de incubación ensayados (Figura 18, paneles A y B, calles extr. Phyt). La intensidad de la señal de las actividades correspondientes a los extractos de raíces micorrizadas es ligeramente menor en las plantas micorrizadas que han sido postinfectadas por el patógeno (Figura 18, paneles A y B, calles Gm +Phyt).

Cuando la desnaturalización se llevó a cabo en condiciones reductoras en presencia del agente 2-mercaptoetanol, los resultados fueron notablemente distintos (Figura 18, paneles C y D), al detectarse la señal de actividad de tres isoformas en los extractos correspondientes a todos los tratamientos. No se aprecian diferencias entre el patrón de bandas de los distintos tratamientos con ninguno de los dos protocolos de renaturalización empleados, usando tioglicolato (panel C) o cisteína (panel D), aunque en ambos casos los extractos de raíces infectadas por *P. parasitica* muestran mayor actividad quitinasa que el resto de tratamientos (Figura 18, paneles C y D, calles Nm +Phyt).

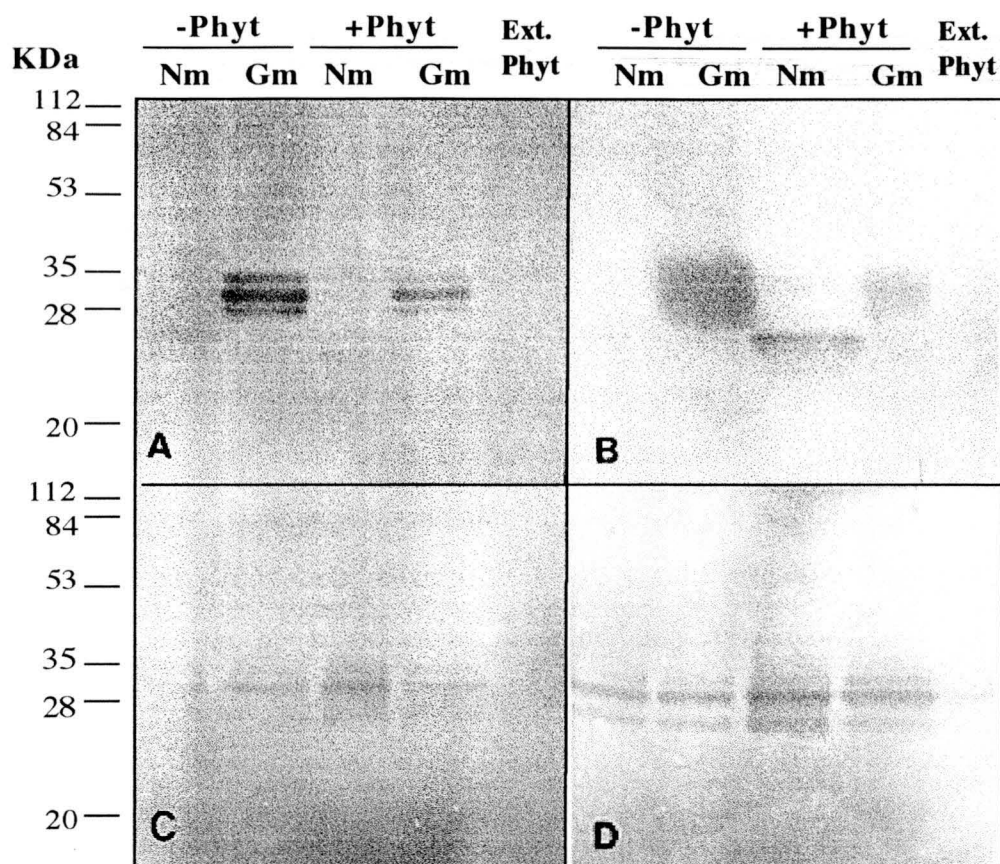


Figura 18. Actividades quitinasa tras electroforesis en condiciones desnaturizantes. Los gels A y B corresponden a muestras desnaturizadas en condiciones no reductoras, y la renaturalización se realizó con tritón X-100 durante 1 (A) u 8 horas (B). Para los gels C y D las muestras se desnaturizaron en presencia del agente reductor 2-mercaptoetanol, y la renaturalización se llevó a cabo en tampón adicionado de tioglicolato (C) o cisteína (D) durante 45 minutos.

5. DISCUSIÓN

Son numerosos los trabajos que han abordado la inducción de quitinasas y β -1,3-glucanasas en hojas de tomate en respuesta a la inoculación con hongos patógenos o virus, o a tratamientos con inductores químicos (Pegg y Young 1982; Granell *et al.*, 1987; Joosten y de Witt, 1989; García-Breijó *et al.*, 1990; van Kan *et al.*, 1992; Wubben *et al.*, 1992; Danhash *et al.*, 1993; Joosten *et al.*, 1995; Lawrence *et al.*, 1996; Wubben *et al.*, 1996). En estos trabajos se identifican cuatro quitinasas en hojas de tomate tratadas químicamente o infectadas por patógenos, dos de ellas son ácidas, extracelulares, con pesos moleculares de

26 y 27 kDa, y las otras dos básicas, intracelulares, de 30 y 32 kDa. Joosten y colaboradores (1995) describieron otra proteína de 20 kDa con actividad quitinasa. Sin embargo, se conocen pocos trabajos sobre quitinasas en interacciones entre hongos y raíces de tomate, fundamentalmente los de Benhamou y colaboradores (1989, 1990) que abordaron la localización ultraestructural de la enzima durante las interacciones de la raíz con *Fusarium oxysporum*.

La técnicas electroforéticas asociadas a un test específico descrito para la detección de actividad quitinasa (Trudel *et al.*, 1989; Pan *et al.*, 1991) han permitido el seguimiento de las distintas formas moleculares de quitinasa presentes en la raíz de plantas de tomate durante la interacción simbiótica con hongos de la micorriza arbuscular o patógena con *P. parasitica*. Se han identificado 3 isoformas ácidas principales además de otras 3 con menor intensidad y cuatro isoformas básicas en las raíces de plantas control no micorrizadas. El número total de isoformas obtenido en raíz es mayor que el descrito para hojas (Joosten *et al.*, 1995). Esto puede deberse a una expresión diferencial de los genes codificantes para quitinasas en los distintos órganos de la planta (raíces/hojas/partes florales) como ya se ha descrito en tabaco (Trudel *et al.*, 1989) y para otras enzimas hidrolíticas (Coté *et al.*, 1991; El Ouakfaoui y Asselin, 1992). Por otro lado, puesto que las proteínas con pI próximo a la neutralidad pueden ser separadas en los sistemas electroforéticos anódico y catódico, alguna de éstas isoformas podría ser detectada en ambos sistemas. Este podría ser el caso de la isoforma de menor movilidad electroforética detectada con el sistema Davis (barra) y considerada como ácida, puesto que la señal se detecta con resolución baja, podría tratarse de una isoforma básica. Para resolver totalmente este problema habría que recurrir a técnicas de electroforésis bidimensional.

En distintos sistemas biológicos se ha comprobado que la expresión de las quitinasas es regulada durante el desarrollo de la planta y como consecuencia de la infección por patógenos (Collinge *et al.*, 1993). En nuestro sistema, el patrón isoenzimático de las quitinasas en las raíces de tomate se ve afectado por la interacción de la planta con los hongos patógeno y simbióticos. La inoculación con *P. parasitica* ha resultado en un

incremento de la actividad de la actividad quitinasa de la raíz. Las isoformas ácidas que aparecían con una señal muy débil en raíces control, muestran una actividad mayor en los extractos correspondientes a las plantas infectadas por *Phytophthora*, además de la aparición de una nueva isoforma en estos extractos. De igual modo, aunque no se han detectado nuevas isoformas de carácter básico, la infección por el patógeno ha inducido las actividades básicas constitutivas. Puesto que se considera que este hongo carece de quitina en su pared, el fenómeno podría deberse a una inducción inespecífica de los mecanismos de defensa. El incremento de actividad quitinasa tras la inoculación con *P. parasitica* ha sido descrito previamente en plantas de tabaco, donde la infección causó una importante inducción de quitinasa y β -1,3-glucanasas, con un incremento de las concentraciones relativas de los ARNm de ambas enzimas (Meins y Ahl, 1989). En tomate Enkerli y colaboradores (1993) demostraron que la inoculación de las hojas con *P. infestans* induce la actividad quitinasa sistémicamente, en paralelo a la resistencia sistémica adquirida.

En el caso de la simbiosis MA se ha descrito una activación transitoria de la actividad quitinasa en distintos sistemas planta-hongo durante la simbiosis (Spanu *et al.*, 1989; Lambais y Mehdy, 1993; Vierheilig *et al.*, 1994, 1995; Volpin *et al.*, 1994, Blee y Anderson 1996), interpretando esta activación como una respuesta de defensa no específica frente al hongo MA, que es posteriormente reprimida específicamente. El presente trabajo muestra que la colonización de las raíces de tomate por distintos hongos MA (*G. mosseae*, *G. intraradices*, *Gigaspora rosea*) ha dado lugar a la inducción de nueva actividad quitinasa (quitM), de carácter ácido y diferente de las isoformas inducidas por *Phytophthora*. La inducción de esta nueva isoforma ocurre sólo durante la interacción simbiótica y no por la mera presencia del hongo MA, puesto que plantas inoculadas con la misma cantidad de inóculo no presentan esta isoforma si no está suficientemente colonizados. Tampoco parece ser consecuencia de la mejora en el nivel de fósforo en la planta puesto que en las plantas no micorrizadas la isoforma no fue inducida con la suplementación de fósforo en la solución nutritiva. La señal de esta nueva actividad, detectada tras el sistema Davis como una amplia zona de lisis, resulta comprender dos isoformas de pI muy próximas (4.5 y 4.7) según se deduce del análisis mediante isoelectroenfoque. Cabe destacar que las isoformas de quitinasa

presentes en los extractos de raíces de tomate micorrizadas mostraron una mejor y mayor capacidad de renaturalización tras la desnaturalización en condiciones no reductoras que las de raíces de plantas control o infectadas con el patógeno. Esto podría deberse a modificaciones conformacionales de la proteína, quizás relacionadas con diferencias en el ambiente celular, puesto que se ha descrito un estatus oxidativo distinto en las células micorrizadas en comparación a las no micorrizadas (Arines *et al.*, 1994 b), que en nuestro sistema se ve apoyado por los cambios detectados en las actividades superóxido dismutasa y peroxidasa (capítulo 5).

La inducción específica en raíz de isoformas ácidas de quitinasa por la colonización de un hongo micorrícico, distintas a las inducidas por hongos patógenos ha sido descrita previamente en tabaco (Dumas-Gaudot *et al.* 1992a) o guisante (Dassi *et al.*, 1996). No parece probable que estas diferencias se deban a enzimas aportadas por los hongos puesto que las isoformas inducidas parecen variar en función de la planta y no del hongo (Gianinazzi *et al.*, 1995) y no se han encontrado dichas isoformas en los extractos proteícos del micelio extraradical de *G. mosseae* y *G. intraradices* (Figura 14) ni en los de esporas germinadas o no de *G. mosseae* (Slezack *et al.*, 1996). En el micelio extraradical de *P. parasitica* tampoco encontramos la actividad quitinasa que aparecen en raíces infectadas, lo que apoya que las diferencias sean el resultado de una reacción diferencial de la planta hospedadora ante los dos tipos de organismos simbiótico y patogénico. Puesto que la inducción de isoformas de quitinasa durante la simbiosis MA parece constituir un fenómeno general, estas deben desempeñar alguna función en el proceso aunque aún se desconoce. Varios trabajos han demostrado la acumulación de ARNm codificantes de quitinasas en las células que contienen los arbusculos (Blee y Anderson, 1996; Lambais y Mehdy, 1998), datos que parecen indicar una función de las quitinasas en la micorriza. Esta hipótesis sobre su implicación en la simbiosis se ve apoyada por la inducción de quitinasas de la planta en otras interacciones simbióticas de la raíz, como en nódulos de leguminosas (Stahelin *et al.*, 1992) y en ectomicorrizas (Albretch *et al.*, 1993; Salzer *et al.*, 1997). Sin embargo no se puede descartar que la actividad quitinasa sea expresada en el hongo como enzimas inducidas por el hospedador durante la colonización del parenquima cortical, y que

desempeñen un papel en la extensión y ramificación de las hifas como se ha descrito para hongos no micorrizicos (Rast *et al.*, 1991; Cabib *et al.*, 1992).

Dentro de las posibles funciones que se han propuesto para las isoformas de quitinasa inducidas específicamente durante la micorrización, se considera su implicación en el control de la colonización de la raíz por el hongo, el intercambio de señales entre los dos simbiontes, su intervención en los cambios morfológicos del hongo hasta la formación de arbusculos, la degradación de los arbusculos degenerados, y por otro lado su participación en la protección frente a patógenos del suelo conferida por la micorriza (Dumas-Gaudot *et al.*, 1996).

Los hongos de la micorriza parecen ser insensibles a las quitinasas de las plantas (Arlorio *et al.*, 1992). Éstas no entran en contacto directo con las estructuras intracelulares de los hongos AM, y tampoco parecen unirse a las hifas externas, excepto en el caso de que se eliminen las proteínas y los polisacáridos solubles de la pared con un tratamiento térmico (Spanu *et al.*, 1989). Además la sobreexpresión de genes de quitinasa ácidas o básicas en plantas transgénicas de tabaco no afectó al establecimiento y funcionamiento de la simbiosis, aunque esas plantas sí mostraban mayor resistencia a ciertos patógenos (Vierheilig *et al.*, 1995). A pesar de estos datos si se especula con la implicación de las quitinasas en el control del hongo, por ejemplo Lambais y Mehdy (1998) describen la acumulación de ARNm de quitinasas ácidas en las células con arbusculos y/o en las células adyacentes en condiciones altas de fósforo -inhibitorias de la colonización- y proponen que las proteínas que codifican, localizadas extracelularmente, se encargarían de restringir el crecimiento intraradical del hongo MA en estas condiciones. Este no parece ser el caso de la isoforma nueva quitM puesto que su actividad es mayor a mayor porcentaje de colonización y en condiciones de mayor concentración de fósforo, que efectivamente inhibieron la colonización, no fue detectada. Estos mismos autores apuntan que las quitinasas básicas no parecen desempeñar un papel destacable en el control de la simbiosis ya que aunque previamente se describió una represión transitoria en los primeros estadios de la simbiosis (Lambais y Mehdy, 1993), no observaron diferencias en los niveles de

ARNm de esta enzima entre las plantas no micorrizadas o micorrizadas a bajos ni altos niveles de fósforo. Nuestros datos concuerdan con esta observación al no apreciarse diferencias entre las plantas no micorrizadas y las micorrizadas sobre quitinasas básicas. Sin embargo recientemente David y colaboradores (1998) han descrito la represión de la expresión de una quitinasa básica en tabaco durante los estadios activos de la colonización radical por *G. intraradices*, independientemente del nivel de micorrización alcanzado y no dependiente de fósforo, y podría correlacionar con la disminución de la actividad quitinasa descrita en algunos trabajos (Spanu *et al.*, 1989; Lambais y Mehdy, 1993; Volpin *et al.*, 1994), pero aunque proponen que esta inhibición favorezca la colonización, no es considerada esencial puesto que plantas transgénicas sobreexpresando quitinasas básicas no ven afectados sus niveles de colonización (Vierheileg *et al.*, 1995).

Por otro lado estas isoformas podrían estar implicadas en los procesos de intercambio de señales entre el microsimbionte y la planta, como se ha descrito en las ectomicorrizas y en la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa. Durante la formación de ectomicorrizas las quitinasas apoplásticas de la raíz destruyen elicitores del hongo simbiótico sin dañarlo, con lo que la planta podría atenuar la señal de elicitación y por tanto ajustar las defensas a niveles que permitan la interacción simbiótica (Salzer *et al.*, 1997), habiéndose descrito incluso una mayor formación de micorriza cuando la inducción de actividad quitinasa es mayor (Albretch *et al.*, 1994b). En cuanto a la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa se ha descrito que los factores Nod son sustratos para las quitinasas de la planta (Schultze *et al.*, 1993) y que éstos enzimas pueden estar implicadas en el reconocimiento de las señales de nodulación y por tanto en el proceso de comunicación entre los simbioses (Staelin *et al.*, 1994b, Mellor y Collinge, 1995; Mathesis *et al.*, 1998). Slezack y colaboradores (1996) describieron la estimulación de las isoformas constitutivas de quitinasa en las zonas sin nódulos de plantas de guisante inoculadas con *Rhizobium leguminosarum*, y la presencia de isoformas adicionales en nódulos, de modo similar a lo descrito para las micorrizas arbusculares, aunque estas isoformas no corresponden con la inducida por la micorrización en esas plantas. Un descubrimiento interesante en esta línea ha sido el hecho de que la adición a las raíces de factores Nod muy purificados incrementó

el grado de colonización micorrizica en plantas de soja (Xie *et al.*, 1995) y de *Lablab purpureus*, además de inducir la formación de esporocarpos en *G. mosseae* (Xie *et al.*, 1997). Más aún, aunque el tomate no es planta hospedadora para los rizobios noduladores presenta un sistema sensitivo de percepción de quitoooligosacáridos que puede reconocer factores Nod (Felix *et al.*, 1993, 1998; Staehelin *et al.*, 1994a), probablemente mediante proteínas de alta afinidad por fragmentos de quitina, demostradas en las membranas plasmáticas de células de tomate (Baureithel *et al.*, 1994). En base a todos estos datos cabe especular que la simbiosis MA haya explotado este sistema de percepción de oligosacáridos para el intercambio de señales simbióticas, y que la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa, que es posterior, adoptara este sistema desarrollado por la micorriza perfeccionandolo con el refinamiento de las señales, añadiendo al núcleo de quitina las decoraciones o sustituyentes que finalmente son los responsables de la especificidad de esta interacción. En el caso de las micorrizas, y puesto que no parece que haya señales especie-específicas al no existir en general especificidad entre los simbioses, la planta podría distinguir entre un hongo micorrizico, de crecimiento lento, de uno patógeno, de crecimiento rápido, en función de la cantidad de elicitores de glucosamina liberados (Salzer *et al.*, 1997).

Las quitinasas podrían también ser necesarias para la formación de los arbusculos (Koide y Schreiner, 1992). La quitina parece tener un papel fundamental en la interacción simbiótica a nivel morfológico. En la pared del hongo se observan alteraciones de la distribución de la quitina relacionadas con cambios en la composición y estructura de la pared durante los distintos estadios de su desarrollo. Bago y colaboradores (1996) mostraron que la aplicación de nicomicina Z, inhibidor competitivo de la quitina sintasa, induce en el hongo la reducción en el grosor de la pared de la hifa junto con modificaciones de su estructura y organización, cambios en la cantidad o distribución de oligómeros de quitina y alteraciones en la morfología, plasticidad y frecuencia del crecimiento de la hifa. Todos estos fenómenos son similares a los inducidos por el hospedador en la pared del hongo durante la fase simbiótica, por lo que proponen que el control de la quitina sintetasa por el hospedador sea uno de los mecanismos simbióticos que permitan la formación de las estructuras de colonización (ovillos, arbusculos..) quizás en combinación con la acción

hidrolítica de las quitinasas del hospedador que se acumulan en las células con arbusculos (Blee y Anderson, 1996).

Por último, en cuanto al posible papel en bioprotección, se considera que la actividad quitinasa inducida en la micorriza arbuscular podría ayudar a la planta para afrontar la invasión de un hongo patógeno directamente con su actividad lítica (sóla o en combinación con otras enzimas), o mediante la liberación de elicitores que desencadenen rápidamente los mecanismos implicados en las reacciones de defensa. Puesto que *Phytophthora* pertenece a los oomicetos, considerados como carentes de quitina (Bartnicki-García, 1968) el papel antifúngico de las quitinasas frente a este patógeno parece poco probable, pero no se puede descartar la posibilidad de un papel activo de estas enzimas ya que se ha detectado la presencia de polisacáridos conteniendo glucosamina en especies de *Phytophthora* (Bartnicki-García y Wang, 1983), y la presencia de una quitin sintasa en miembros de este género (Bruyere *et al.*, 1996). Además cabe suponer un efecto sinérgico con otras enzimas hidrolíticas con un papel más directo, como se ha descrito en numerosas interacciones planta-patógeno la inducción coordinada de quitinasas y β -1,3-glucanasas (Mauch *et al.*, 1988a), y su actividad sinérgica en la degradación de las paredes celulares fúngicas (Mauch *et al.*, 1988b). Ya se ha descrito para *P. capsici* que la capacidad para inhibir su crecimiento que presenta una isoforma básica de β -1,3-glucanasa en plantas de pimienta se ve fuertemente potenciada cuando se combina con una quitinasa básica Kim y Hwang (1997).

Quitosanases

Las quitosanases (EC 3.2.1.99) actúan sobre el quitosán, un derivado parcial o totalmente deacetilado de la quitina (Monaghan *et al.*, 1973). Al igual que en el caso de las quitinasas, no se conoce sustrato para este enzima en planta, pero sí que está presente en la pared celular de muchos hongos, entre ellos los Zigomicetos, entre los que se encuadran los hongos formadores de la micorriza (Bartinicki-García, 1968; Araki e Ito, 1975). El quitosán y los oligosacáridos del quitosán han sido ampliamente estudiados por su capacidad de provocar respuestas de defensa en plantas tratadas e incrementar la resistencia a distintos patógenos (Doares *et al.*, 1995; Mason y Davis, 1997), entre ellos a *Fusarium* en plantas de tomate (Benhamou y Theriault, 1992, Benhamou *et al.*, 1994, 1998). Entre las distintas reacciones que su aplicación desencadena en la planta, se produce la inducción de isoformas de quitinasa, quitosanasa y β -1,3-glucanasas (El Ghaouth *et al.*, 1994, Chang *et al.*, 1995, Mason y Davis, 1997). En tejidos estresados químicamente o por ataque de patógenos se han descrito distintas formas moleculares de quitosanases (Grenier y Asselin, 1990; Sharma *et al.*, 1993), y algunas han sido identificadas como proteínas extracelulares relacionadas con la patógenesis (PRs). Son monoméricas, y entre ellas hay isoformas de carácter ácido y básico, con un peso molecular aparente se estima entre 10 y 23 kDa (El Ouakfaoui y Asselin, 1992a). Al igual que se ha descrito para otros enzimas hidrolíticos (quitinasas y β -1,3-glucanasas) aunque la actividad parece ser regulada en función del órgano y/o estado de desarrollo de la planta, (El Ouakfaoui y Asselin, 1992a, b), se considera que las quitosanases están implicadas en la defensa frente a la invasión por patógenos debido a su potencial para romper los polisacáridos de la pared celular de diversos hongos (Grenier y Asselin, 1990).

Las quitosanases del tomate han sido estudiadas en semillas, hojas y frutos, pero no en raíz (El Ouakfaoui y Asselin, 1992a). Aunque estos autores detectaron actividad

quitosanasa en hojas previamente estresadas con un agente químico, no se encontró actividad alguna de este tipo en los tejidos no estresados.

1. QUITOSANASAS ÁCIDAS

Mediante el sistema Davis (Figura 19) se comprobó la ausencia de señal correspondiente a esta actividad en las raíces no micorrizadas o controles (Figura 19, calle Nm). Sin embargo en los extractos de raíces micorrizadas (Figura 19, calles Gm y Gi) se detectaron 5 isoformas con actividad quitosanasa (quito1- quito 5). El patrón de bandas correspondiente a plantas colonizadas por uno u otro hongo formador de micorriza resultó similar, excepto ciertas diferencias sutiles en la intensidad de las señales. En los extractos de raíces infectadas por el patógeno *P. parasitica* no se detectó ninguna actividad quitosanasa (Figura 19, calle Pp). Las plantas micorrizadas tanto por *G. mosseae* como por *G. intraradices* y posteriormente infectadas por el patógeno mostraron las mismas actividades quitosanasa que las colonizadas unicamente por el hongo formador de la micorriza. No se detectó ninguna señal de actividad quitosanasa en las muestras de los extractos proteicos del micelio de *G. mosseae* ni *G. intraradices* (datos no mostrados).

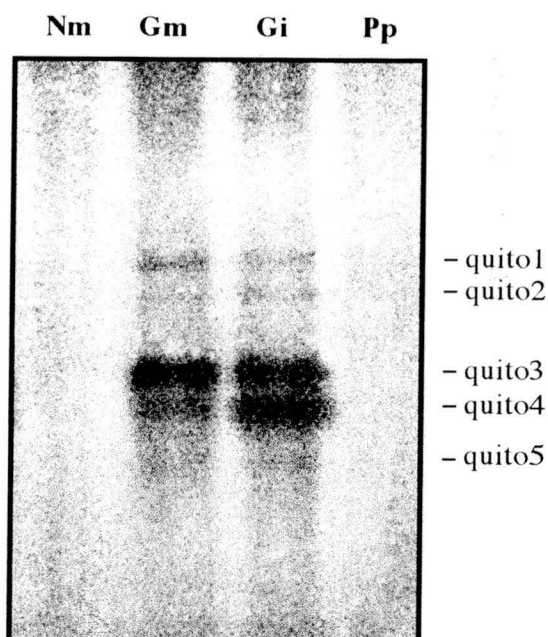


Figura 19. Actividades quitosanasa de caracter ácido tras electroforesis en condiciones nativas.

Se hizo un seguimiento del patrón isoenzimático a lo largo del tiempo con plantas de 4, 6, 8, 10 y 12 semanas, y excepto en los dos primeros periodos que no se aprecian diferencias, el patrón fue cambiando durante los sucesivos estadios del desarrollo de la planta (Figura 20). En las raíces control no se detectó actividad quitosanasa tras 4 o 6 semanas de crecimiento (Figura 20, 6 s, calle Nm). A las 8 semanas aparece una banda de intensidad débil en la parte alta del gel, y su intensidad es mayor a las 10 semanas (Figura 20, 8 y 10 s, calle Nm). A las 12 semanas se detecta otra banda en la parte alta del gel (Figura 20, 12 s, calle Nm). En las raíces colonizadas por *G. mosseae* se detectan 5 bandas a las 4 y 6 semanas de crecimiento (Figura 20, 6 s, calle Gm). A partir de las 8 semanas las señales de las isoformas con menor movilidad relativa -MR- (quito 1 y quito 2) y la de mayor MR (quito 5) eran muy débiles (Figura 20, 8 s, calle Gm). Dos semanas más tarde, estas isoformas no eran detectadas en el gel, y la actividad de las otras dos (quito 3 y quito 4) también disminuyó (Figura 20, 10 s, calle Gm). En las plantas cosechadas en la 12ª semana no aparecen las isoformas de quitosanasa inducidas por la micorriza (Figura 20, 12

s, calle Gm), sin embargo aparece una señal débil en la parte alta del gel, al mismo nivel que en las plantas control pero con menor intensidad.

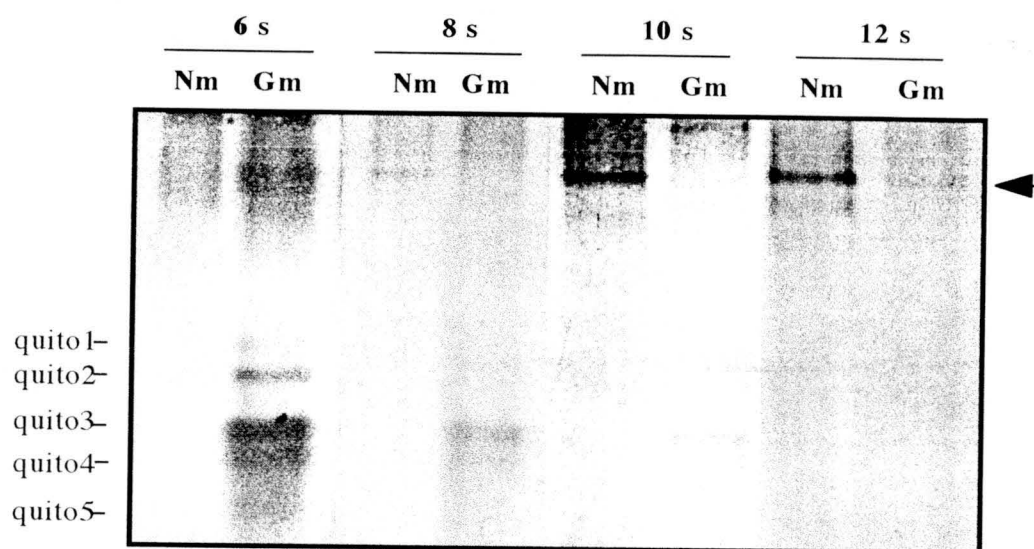


Figura 20. Cambios a lo largo del tiempo (6, 8, 10 y 12 semanas de crecimiento) en la expresión de quitosanasas en raíces de tomate control (Nm) o micorrizadas (Gm).

2. QUITOSANASAS BÁSICAS

Mediante el sistema Reisfeld se confirmó la ausencia de quitosanasas en raíces no micorrizadas (Figura 21, calle Nm -Phyt), mientras que se detectaron dos isoformas de carácter básico en los extractos de plantas micorrizadas (Figura 21, calle Gm -Phyt). La inoculación con el patógeno no provocó inducción de ninguna actividad (Figura 21, bloque +Phyt), incluso en las plantas micorrizadas se detectó una disminución de la intensidad de la señal de las isoformas detectadas (Figura 21, calle Gm + Phyt).

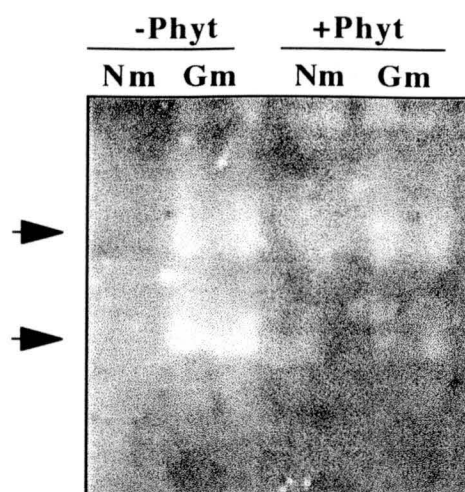


Figura 21. Actividades quitosanasa de caracter básico tras separación mediante el sistema Reisfeld. Leyendas como en figura 14.

3. DETERMINACIÓN DEL PESO MOLECULAR

Se sabe que las quitosanases son muy sensibles a los agentes reductores (El Ouakfaoui y Asselin, 1992a). Por ello el estudio bajo condiciones desnaturalizantes se realizó en ausencia de agentes reductores. Al igual que mediante los métodos anteriores, no se detectó ninguna señal en los extractos de plantas no micorrizadas (control) o infectadas por el patógeno (Figura 22, calles Nm y Pp). En los extractos de plantas micorrizadas se detectan dos bandas muy próximas, una de ellas de mayor intensidad, con un peso molecular aproximado de 20 kDa. En algunos casos las bandas se solapan y se detectan como una sola (Figura 22, calle Gm). Mediante una tinción corta del gel con azul Coomassie, que presenta gran afinidad por el quitosán, se confirma la autenticidad de esta actividad, quedando la zona de lisis blanca frente al fondo azul del quitosán intacto.

El análisis de las muestras procedentes del ensayo *in vitro* confirmó una banda de intensidad débil en los extractos de raíces micorrizadas por *Gigaspora rosea* (Figura 22, calle Gir, *in vitro*), con un peso molecular aparente similar al de la isoforma detectada en plantas micorrizadas *in vivo* con *G. mosseae* (Figura 22, calle Gm, *In vivo*). En los

extractos de las plantas crecidas en condiciones monoxénicas, tanto de los controles no micorrizados como las colonizadas por *Gi. rosea* (Figura 22, calles Nm y Gir, *in vitro*), se detectó una señal en la parte alta del gel, no detectada en las raíces crecidas en condiciones abiertas (Figura 22, calles Nm y Gm *in vivo*).

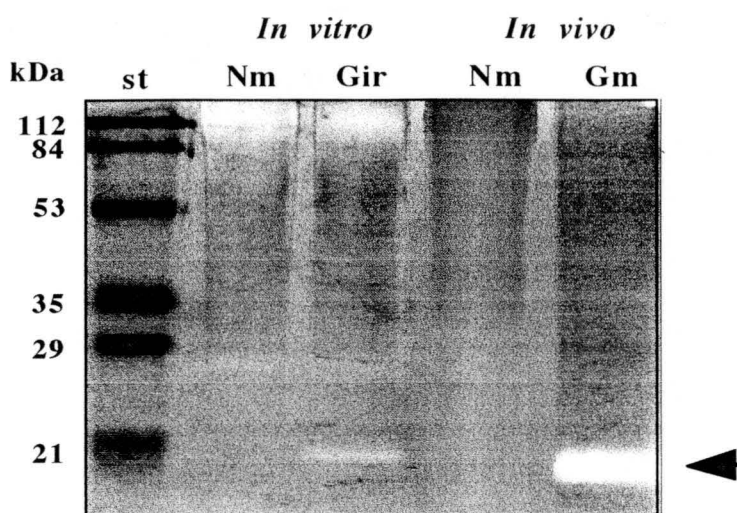


Figura 22. Actividad quitosanasa detectada tras electroforésis en condiciones desnaturalizantes en extractos de raíces del modelo simple (*in vivo*) o del modelo *in vitro*. Leyendas como en figura 15

4. DETERMINACIÓN DEL PUNTO ISOELECTRICO

Mediante isoelectroenfoque se detectó actividad quitosanasa en los extractos de plantas micorrizadas sólo tras periodos muy largos de incubación con el sustrato (18 h). Al igual que en los otros sistemas electroforéticos, no se detectó actividad alguna en los extractos de plantas control o infectadas por el patógeno (Figura 23, calles C y Pp), mientras que en los extractos de plantas micorrizadas (Figura 23, calle Gm) se detecta una señal amplia pero difusa, situada en la zona de rango ácido del gel con el máximo de actividad aproximadamente en 6.5. Aunque la señal no aparece resuelta en bandas diferenciadas, se confirmó que era el resultado de actividad quitosanasa tras la tinción del gel con azul de coomasie.

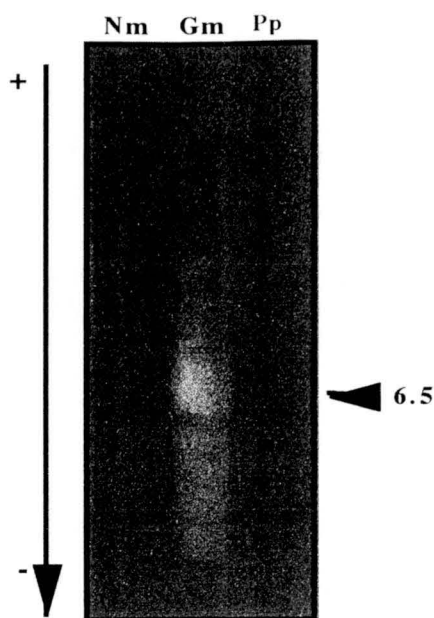


Figura 23. Actividad quitosanasa después de la separación de las muestras proteicas mediante isoelectroenfoque. Leyendas como en figura 17.

5. DISCUSIÓN

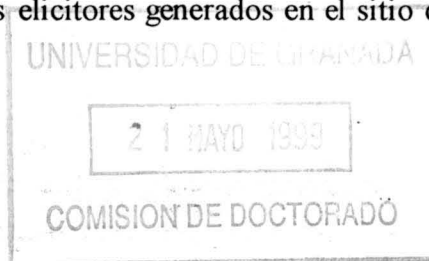
En plantas de tomate jóvenes, sin tratamiento ni condiciones de estrés no se detecta ninguna actividad quitosanasa en raíz, en concordancia con lo descrito previamente para semillas, hojas y frutos (El Ouakfaoui y Asselin, 1992a). Sin embargo la colonización de las raíces con *G. mosseae* o *G. intraradices* resulta en la inducción de distintas isoformas en estos tejidos. Esta inducción parece una respuesta específica a la simbiosis y no parte de mecanismos inespecíficos de defensa, ya que la infección de la raíz por el patógeno *P. parasitica* no tuvo ningún efecto en cuanto a inducción de actividad quitosanasa. Aunque la inducción de quitinasas durante la simbiosis micorriza arbuscular se ha descrito en numerosos sistemas, como se discute en el capítulo anterior, la inducción de actividad quitosanasa en raíces micorrizadas sólo ha sido descrito en puerro y cebolla, pero no en guisante (Dumas-Gaudot *et al.*, 1992b).

La actividad quitosanasa principal presenta un peso molecular aparente de 20 kDa según se determina mediante SDS-PAGE, y se detecta otra de peso molecular muy próximo, aproximadamente 19kDa, que presenta una actividad más débil. Estos datos encajan en el rango descrito para las quitosanasas, entre 10 y 23 kDa (El Ouakfaoui y Asselin, 1992a). La inducción de actividad quitosanasa se confirmó también en raíces de tomate colonizadas *in vitro* con *Gi. rosea*, aunque la intensidad de ésta era menor que las inducidas en plantas micorrizadas en condiciones abiertas. La detección de actividad quitosanasa tras la separación de los extractos proteicos mediante isoelectroenfoque confirmó la presencia de esta actividad exclusivamente en las plantas micorrizadas por una amplia zona de lisis, en la zona ácida del gel, con el máximo de actividad alrededor del pH 6.5.

Mediante cosechas secuenciales se realizó un seguimiento en el tiempo de la expresión de estas enzimas, encontrando una disminución progresiva de estas actividades quitosanasas de las plantas micorrizadas, desapareciendo en estadios más tardíos del desarrollo. El Ouakfaoui y Asselin (1992b) describieron que la intensidad de la expresión de las distintas isoformas de quitosanasa cambia con la edad de la planta, y en general, decrece. Sin embargo, en este trabajo se detectó la presencia de otras isoformas con actividad quitosanasa en estadios tardíos del desarrollo de la planta tanto en plantas controles no micorrizadas como en micorrizadas, aunque en éstas últimas su aparición es más tardía que en las no micorrizadas, que podrían estar relacionadas con condiciones de estrés por el crecimiento en un recipiente limitado. En los extractos proteicos de tomates obtenidos por cultivo monoxénico se detectó una señal de actividad quitosanasa en la parte alta del gel, independientemente de si la planta estaba micorrizada o no. Estas señales podrían interpretarse parte de una respuesta de estrés a las condiciones de crecimiento *in vitro*. Estos datos en conjunto indican que el patrón isoenzimático de la quitosanasa es complejo y muy sensible a las condiciones ambientales y de cultivo.

Se ha atribuido a las quitosanases un caracter antifúngico por distintos ensayos *in vitro*, por ejemplo, esta enzima purificada de *Streptomyces* causó la inhibición del crecimiento de distintos hongos, incluyendo a *Pythium*, agente patógeno perteneciente a los Oomicetos, y mantuvo su actividad cuando se expresó en tabaco transgénico (El Ouakfaoui *et al.*, 1995). Grenier y Asselin, en 1990, demostraron que ciertas quitosanases, entre ellas la quitosanasa básica procedente del fluido intercelular de hojas de tomate estresadas químicamente, son capaces de romper las esporas de hongos como *Fusarium oxysporum*, *Verticillium albo-atrum* y *Ophiostoma ulmi* incluidas en geles de poliacrilamida. Por tanto, las quitosanases inducidas por la micorrización podrían estar implicadas en el fenómeno de bioprotección actuando en concierto con quitinasas y β -1,3-glucanasas frente a posibles invasores fúngicos. Esta acción podría ser ejercida de un modo directo, por su actividad lítica, o indirectamente, mediante la liberación de oligosacáridos de la pared del patógeno que pueden a su vez desencadenar los mecanismos de defensa del hospedador.

También se ha propuesto el papel de las quitosanases en la regulación de las interacciones planta-microbio (Hadwiger y Beckman, 1980) por su intervención en el procesamiento del quitosán, capaz de activar numerosos procesos biológicos, como la inducción de numerosas enzimas implicadas en defensa, entre ellas quitinasas, β -1,3-glucanasas, y resistencia a patógenos (Kendra *et al.*, 1989, Benhamou y Theriault, 1992, Benhamou *et al.*, 1992, Mason y Davis, 1997, Benhamou *et al.*, 1998), además de tener un efecto inhibitorio directo frente a numerosos hongos patógenos (Leuba y Stossel, 1986). La naturaleza policationica del quitosán parece ser clave en sus propiedades, y podría permitirle interactuar con los residuos cargados negativamente de las macromoléculas expuestas en la superficie celular, originando importantes cambios en la membrana que pueden resultar en la activación de los mecanismos de traducción de señales. Doares y colaboradores (1995) describen que la acumulación de inhibidores de proteasas en hojas de tomate inducida por quitosán de origen fúngico es reducida por inhibidores de la ruta de los octadecanoides, por lo que sugieren que estos elicitores generados en el sitio de la invasión



Resultados

por las enzimas de la planta, darían lugar a fenómenos de reconocimiento que mediante esta ruta llevarían a la expresión de mecanismos de defensa a nivel local o sistémico.

Quitinasas / Quitosanases

Se sabe que algunas quitinasas purificadas de planta pueden degradar sustratos distintos a la quitina, como peptidoglucanos bacterianos, mostrando actividad lisozima (Graham y Sticklen, 1994), y/o quitosán, comportandose por tanto como una quitosanasas (Mayer *et al.*, 1996). En este contexto se considera que estas enzimas pueden tener un carácter multifuncional, con lo que la distinción entre quitinasas y quitosanases puede no ser tan clara. En relación al tomate, Pegg y Young en 1982 describieron una quitinasa constitutiva en tallos de tomate con un punto isoelectrico aproximado de 8.5 capaz de romper los puentes internos del quitosán.

En este capítulo se muestran los resultados en relación a la posible capacidad de las quitinasas de la raíz para hidrolizar quitosán.

1. CONDICIONES NATIVAS

Con el fin de determinar si algunas isoformas tenían la capacidad de degradar quitina y quitosán se modificó el método de detección de estas actividades añadiendo conjuntamente a la matriz del gel los sustratos empleados para la determinación de ambas actividades (glicolquitina y glicolquitosán). Puesto que las plantas infectadas por *P. parasitica* no mostraban actividad quitosanasas, y que no se detectaron diferencias significativas entre los patrones isoenzimáticos de las plantas colonizadas por *G. mosseae* y *G. intraradices*, este estudio se centró en el análisis de los extractos de raíces no micorrizadas como control y las plantas colonizadas por *G. mosseae*.

Tras la electroforesis, los geles se incubaron en tampón acetato de sodio a 50mM (Figura 24, A, B), como se ha descrito para la actividad quitinasa, y a 10 mM, como para las quitosanases (Figura 24, C, D). Los geles se tiñeron en primer lugar con Calcofluor M2R (Figura 24, A y C), un fluorocromo que se une a la glicol-quitina y al glicol-quitosán. Cuando el gel así teñido se ilumina con luz ultravioleta, las zonas líticas correspondientes a

actividades quitinasa o quitosanasa aparecen como bandas oscuras (no fluorescentes) frente al fondo fluorescente correspondiente a la mezcla de sustratos intacta. Cuando los geles se incubaron en tampón acetato de sodio 50 mM, tras la tinción con calcofluor se observaron 4 isoformas en las raíces control (Figura 24 A, calle Nm), de las que 3 mostraban movilidad relativa similar a las isoformas de quitinasa descritas en raíces control (Figura 14, calles Nm, quit1, quit2, quit3). En los extractos radicales de plantas micorrizadas (Figura 24 A, calle Gm) se aprecia un incremento en la actividad lítica total. En concreto, la actividad de la isoforma quit2 es considerablemente mayor que en las plantas Nm, además aparecen tres nuevas bandas que no se observan en las raíces control (Figura 24 A, calle Gm, flechas). Cuando los geles se incubaron en el tampón acetato de sodio 10 mM se detectaron sólo 3 isoformas constitutivas en las raíces control no micorrizadas (Figura 24 C, calle Nm), que parecían corresponder con la quit1, quit2 y quit3 de las Figura 14 y 24 A. En las raíces micorrizadas (Figura 24 C, calle Gm) las actividades constitutivas con mayor MR (quit2 y quit3) se detectaban con mayor intensidad, además de presentar 3 isoformas adicionales (Figura 24 A, calle Gm, indicadas por flechas). Dos de estas isoformas, detectadas en las raíces micorrizadas con los dos procesos de incubación (Figura 24 A y C, calles Gm) mostraban una MR similar a la amplia señal de actividad quitinasa que aparece en los extractos micorrizados y que hemos llamado quitinasa específica de la micorrización en el cap. 2 (Figura 15, calles Gm, y Gir).

Los mismos geles se tiñeron posteriormente con azul coomasie para comprobar cuales de las zonas de lisis detectadas corresponden a actividades quitosanasa (Figura 24 C y D). El azul coomasie presenta gran afinidad por el quitosán, por lo que tiñe intensamente el glicol quitosán intacto, mientras que las zonas líticas permanecen sin teñir, por lo que permite detectar como zonas blancas frente al fondo azul donde ha habido actividad quitosanasa. En las raíces control, no micorrizadas, se observó una señal positiva correspondiente a actividad quitosanasa cuando los geles se habían incubado en tampón acetato de sodio 50 mM (Figura 24 B, calle Nm, a), pero esta señal no se detectó en el mismo extracto tras la incubación en el tampón de menor fuerza iónica (10mM) (Figura 24 D, calle Nm). En las raíces colonizadas por *G. mosseae* además de la isoforma observada en

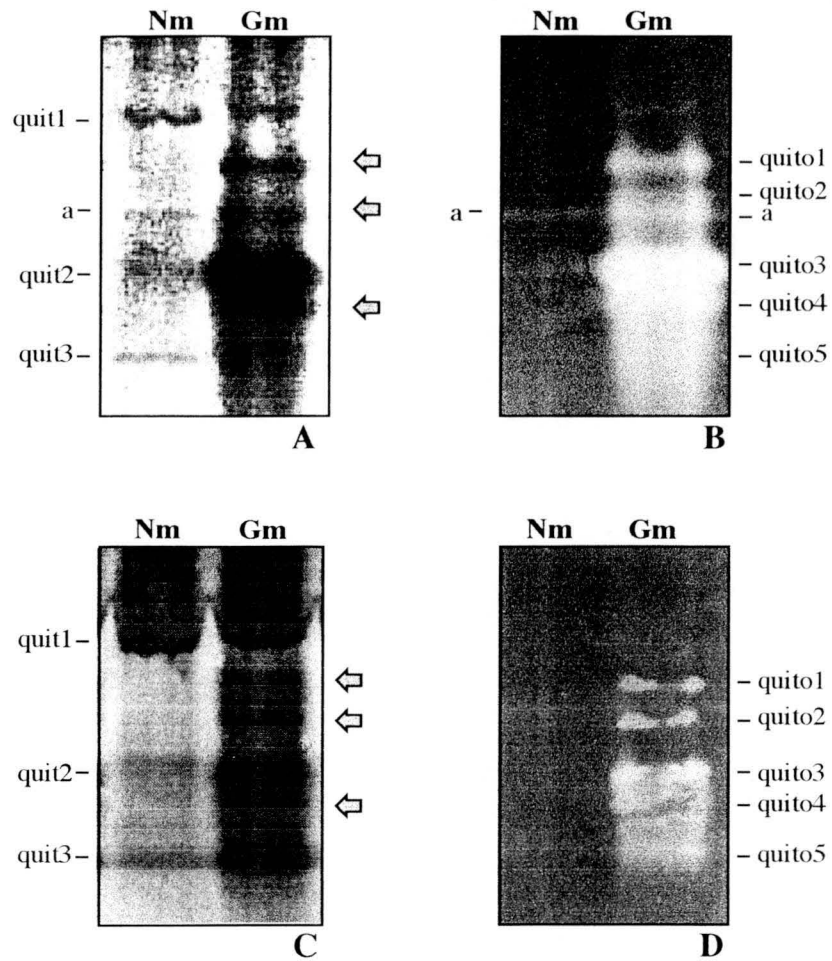


Figura 24. Patrón isoenzimático tras electroforesis nativa en geles con glicolquitina y glicolquitosán. Los geles A y B se incubaron en tampón acetato de sodio 50mM, y los geles C y D en tampón acetato de sodio 10 mM. Los geles A y C están teñidos con Calcofluor MR2 y los geles B y D con azul Coomasie.

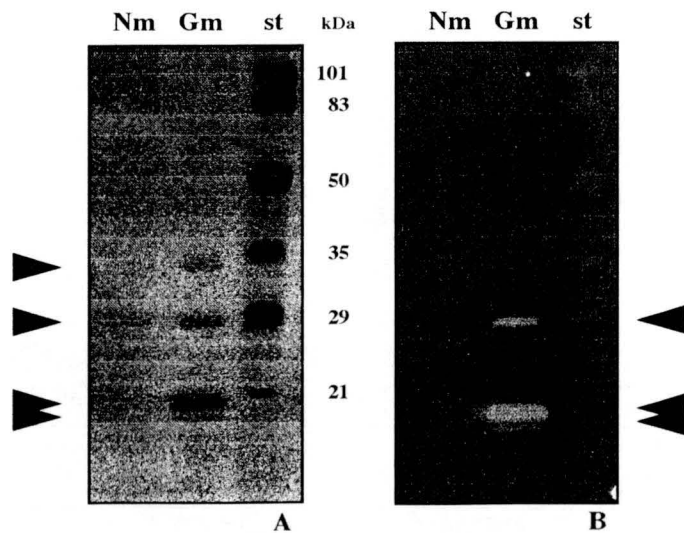


Figura 25. Actividades quitinasa/quitosanasa tras electroforesis en condiciones desnaturalizantes no reductoras (SDS-PAGE). Se analizan extractos de raíz de plantas no micorrizadas como controles (Nm) o micorrizadas por *G. mosseae* (Gm), y se incluye marcador de peso molecular como referencia (st). El gel en A está teñido con calcofluor, y el gel en B con azul coomasie. Las actividades líticas se indican con flechas.

las controles (Figura 24 B, calle Gm, a), aparecen 5 bandas adicionales tras la incubación a 50mM (Figura 24 B, calle Gm, quito1-quito5), que parecen corresponder a las bandas detectadas previamente como nuevas (Figura 24 A, flechas) y a las isoformas de quitinasa constitutivas quit2 y quit3 (Figura 24 A). La isoforma que muestra actividad quitosanasas tanto en controles como en plantas micorrizadas (Figura 24 B, a) no se detectó tras la incubación del gel en el tampón a 10 mM. Por el contrario, en las raíces colonizadas por el hongo MA sí se detectan 5 bandas tras la incubación a 10mM (Figura 24 B, calle Gm, quito1 a quito5) corresponden con las detectadas tras la incubación en tampón 50mM (Figura 24 B, calle Gm), y parecen ser las identificadas como quitosanasas quito 1 a quito 5 en la figura de quitosanas ácidas (Figura 19).

2. CONDICIONES DESNATURALIZANTES

La electroforésis bajo condiciones desnaturizantes en geles conteniendo los dos sustratos (Figura 25) reveló tras la tinción con calcofluor 4 bandas en las raíces colonizadas por *G. mosseae* (Figura 25 A, calle Gm, flechas a la izquierda) con PM aparentes de 34, 28, 20 y 19 kDa, y una única señal con un PM aparente de 28 kDa (Figura 25 A, calle Nm) en raíces control. Según el PM estimado las bandas entre 28 y 34 kDa corresponderían a isoformas de quitinasa según se describe en el capítulo 2, y las dos isoformas de menor PM, (20 y 19 kDa) a quitosanasas, según los resultados del capítulo 3. Cuando los geles se tiñeron con azul coomasie (Figura 25 B) las bandas de 28, 20 y 19 kDa se confirman como quitosanasas en los extractos de plantas colonizadas por *G. mosseae* (Figura 25 B, calle Gm, flechas a la derecha). La banda de 34 kDa no se detecta tras esta tinción, por lo que se deduce que se trata de una quitinasa sin actividad quitosanasas. En las raíces control no se observa ninguna señal tras la tinción con coomasie (Figura 25 B, calle Nm).

3. DISCUSIÓN

Algunas quitinasas de origen vegetal son capaces de degradar sustratos distintos de la quitina, como peptidoglucano y quitosán (Mayer *et al.*, 1996). Cabe mencionar que las quitinasas, quitosanasas y lisozimas procarióticas y eucarióticas a pesar de presentar secuencias primarias distintas, presentan un núcleo muy conservado estructuralmente, constituido por dos hélices y una lámina beta de tres hebras que forman el sitio de unión al sustrato y el centro catalítico (Monzingo *et al.*, 1996). Pegg y Young, en 1982, purificaron una endoquitinasa en los tallos de tomate capaz de hidrolizar enlaces internos en el quitosán, que se caracterizó como una enzima monomérica de PM entre 27 y 31 kDa y un punto isoelectrico de 8.5. Existen varios trabajos que describen hidrolasas con ambas actividades en bacterias y células de *Citrus* (Watanabe *et al.*, 1992; Fukamizo *et al.*, 1992, 1994; Osswald *et al.*, 1992, 1993, 1994; Mayer *et al.*, 1995, 1996), pero este fenómeno no ha sido observado mediante técnicas electroforéticas previamente. En el trabajo presentado en esta memoria se muestra mediante ésta técnica que en las plantas de tomate micorrizado algunas isoformas de quitinasa de la raíz muestran actividad quitosanasasa. En las plantas no micorrizadas sólo una de las isoformas de quitinasa constitutivas muestran cierta actividad quitosanasasa tras condiciones de incubación específicas (tampón acetato de sodio 50 mM). En cambio en las plantas micorrizadas algunas de las isoformas constitutivas (quit2 y quit3), junto con las dos isoformas adicionales específicas de la micorrización mostraron capacidad de degradar quitosán (quito1, quito2, quito3 y quito5). Otra isoforma inducida por la micorrización mostró exclusivamente actividad quitosanasasa (quito4) ya que no aparece en los geles nativos con glicolquitina como único sustrato. La posibilidad de que algunas isoformas de quitinasa y quitosanasasa migren a la misma velocidad no puede ser descartada, aunque parece poco probable que se de este fenómeno para todas las isoformas descritas aquí. Previamente Dumas-Gaudot y colaboradores (1994) encontraron también cierta bifuncionalidad de la isoforma inducida por la micorrización en guisante, que se trataba de una isoforma ácida de 27 kDa capaz de desarrollar cierta actividad lisozima.

El estudio de las dobles actividades bajo condiciones desnaturalizantes permitió estimar el PM aparente de las distintas isoformas. En las raíces control se detectó una banda de actividad lítica de 28kDa, que no mostró actividad quitosanasa, mientras que en las raíces de plantas colonizadas por *G. mosseae* se detectaron cuatro bandas de 34, 27, 20 y 19 kDa. De éstas, según su PM, las bandas de 34 y 28 kDa corresponden a las isoformas de quitinasa previamente descritas en el capítulo 2, y las dos de menor PM a quitosanases, correspondiendo su peso al de las isoformas descritas en el capítulo 3, siendo confirmada además su capacidad de hidrolizar quitosán con la tinción con azul coomasie. Esta tinción permitió detectar que la isoforma de 28 kDa también mostraba actividad quitosanasa, por lo que, en resumen, en los extractos de raíz micorrizada aparecieron una isoforma de quitinasa sin actividad quitosanasa de 34 kDa, otra quitinasa de 28 kDa capaz de hidrolizar el quitosán y dos quitosanases con PM muy próximos a 20 kDa.

Un factor muy importante en los estudios sobre enzimas con doble actividad quitinasa/quitosanasa es el grado de acetilación del quitosán. Por ejemplo, las quitinasas aisladas de cultivos de callos de *Citrus sinensis* mostraron distintas especificidades de sustrato usando quitosán con distintos grados de acetilación y con longitudes de cadena variables (Mayer *et al.*, 1996). Previamente Osswald y colaboradores (1992) habían encontrado grandes diferencias en las actividades quitosanasa detectadas usando distintas preparaciones de quitosán. Más tarde, los mismos autores (1994) purificaron 8 isoformas de quitinasa de callos de *Citrus* de las que cuatro eran capaces de degradar quitosán, obteniendo la actividad óptima de estas enzimas con doble actividad quitinasa-quitosanasa con quitosán acetilado entre un 18 a 20%. La actividad decrecía con niveles menores de acetilación, aunque eran capaces de ejercer su acción sobre quitosán totalmente deacetilado. No obstante no se descartó la posibilidad de que algunas de las isoformas fueran las mismas aunque variando en algunos aminoácidos como resultado de modificaciones post-transcripcionales. En el presente trabajo se usaron como sustratos glicolquitina acetilada en un 95% (Sannan *et al.*, 1976, Grenier y Asselin, 1990) y glicolquitosán deacetilado en un 94% (El Ouakfaoui y Asselin, 1992a), por lo que un estudio de las actividades en función

de una gradación de acetilación del quitosán permitiría definir las especificidades de sustrato de las distintas isoformas de la raíz de tomate.

Como se ha postulado en el capítulo 2 en relación a su mayor y mejor capacidad de renaturalización, las quitinasas de raíces micorrizadas podrían sufrir alguna modificación conformacional, que podría afectar su especificidad de sustrato además de otras propiedades bioquímicas. Por ejemplo, se ha propuesto que ciertos residuos ricos en prolina presentes en dos quitinasas básicas de tabaco podrían ser hidroxilados por mecanismos postranscripcionales como en otras HPRP para modular la actividad quitinasa y alterar su especificidad de sustrato (Sticher *et al.*, 1992).

La multifuncionalidad de los enzimas de un sistema biológico parece una gran ventaja desde el punto de vista de la conservación de energía (Osswald *et al.*, 1994). Como se ha discutido en los capítulos anteriores, las propiedades antifúngicas de las quitinasas y quitosanas han sido demostradas en varios sistemas. En base a ello, la habilidad de las quitinasas-quitosanas para hidrolizar quitosán con distintos grados de acetilación, y por tanto, un amplio rango de sustratos (Fukamizo *et al.*, 1992, 1994) permitiría a la planta resistir mejor a un gran número de patógenos que contienen quitina y quitosán (Mayer *et al.*, 1995), ya que, de hecho, los quitosanes aislados de numerosos hongos son parcialmente N-acetilados (Wessels y Sietsma, 1982).

Además del cometido de quitinasas y quitosanas en defensa, podrían desempeñar un papel clave en el establecimiento y funcionamiento de la simbiosis MA como se ha discutido en los capítulos 2 y 3. En la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa se ha demostrado que la estabilidad de los factores Nod frente a las quitinasas de la planta se ve influenciada por los parámetros estructurales que determinan su especificidad frente al hospedador, como la longitud de la cadena oligosacáridica, la acetilación del extremo no-reductor y la sulfatación del extremo reductor (Stahelin *et al.*, 1994b). En el supuesto de que la simbiosis MA use este sistema de percepción de oligómeros para la comunicación entre planta y hongo, los oligómeros modificados de quitina y quitosán procedentes de las paredes celulares de los hongos MA son buenos candidatos a compuestos señal durante el proceso

de colonización de dichos hongos. La modulación de la especificidad de sustrato de la quitinasa de la planta podría ser crucial en el intercambio de señales entre los simbioses, y finalmente, en los fenómenos de reconocimiento. El quitosán, que se encuentra de modo natural en paredes fúngicas, es sintetizado a partir de la quitina mediante la enzima quitina-deacetilasa, que hidroliza los grupos N-acetamido de las cadenas de quitina convirtiendo la quitina en quitosán. Hasta el momento no se ha descrito la presencia de estas enzimas en plantas, pero se han descrito diversas isoformas en algunos Zigomicetos (Michaud y Asselin, 1995). La confirmación de la presencia de esta enzima en los hongos MA permitiría aclarar las interrelaciones entre quitina, quitosán, quitinasas y quitosanases en relación a posibles intervenciones en la comunicación entre los simbioses.

Un trabajo reciente (Brunner *et al.*, 1998) describe la purificación de 10 quitinasas de tabaco que muestran claras diferencias en cuanto a sus preferencias de sustrato, aunque parecen aceptar una amplia variedad de ellos. Según estos autores, la amplia batería de quitinasas que presentan las plantas no sería redundante sino complementaria, actuando sinérgicamente y con distintas tasas de hidrólisis según el sustrato. De hecho los productos de la hidrólisis de la quitina por las distintas clases de quitinasa presentan capacidades de elicitación muy diferentes, y además su vida media es muy variable dependiendo de la longitud de la cadena y del tipo de quitinasa que lo procesa. Así, la batería de quitinasas y quitosanases con sus diferentes especificidades de sustrato y cinéticas de hidrólisis podrían tener un papel pivotante entre la defensa de la planta, la regulación de su desarrollo y el establecimiento de las interacciones simbióticas mediante la liberación, maduración o destrucción de las moléculas señal formadas por residuos de glucosamina implicadas en estos procesos. La modulación de estas enzimas (inducción de nuevas isoformas, modificaciones de su especificidad de sustrato) por la colonización de hongos MA podría suponer cambios a todos esos niveles.

β-1,3-glucanasas

Las β -1,3-glucanasas (EC 3.2.1.39) catalizan la hidrólisis de los enlaces glucosídicos del tipo β -1,3-D en los β -D-glucanos. Este polisacárido es, junto con la quitina, un componente fundamental de la pared de la mayoría de los hongos (Bartnicki-García, 1968; Wessels y Sietma, 1981), por lo que se ha atribuido a las β -1,3-glucanasas un carácter antifúngico al ser capaces de degradar parcialmente las paredes celulares de estos hongos (Mauch *et al.*, 1988; Boller, 1993). Además de este papel en defensa se han propuesto otras funciones para las β -1,3- glucanasas y otros enzimas hidrolíticos, tanto en la morfogénesis y el desarrollo de la planta como en el intercambio de señales en las interacciones planta-microbio. Estas enzimas se expresan constitutivamente en los distintos tejidos y órganos de las plantas superiores, formando un complejo patrón isoenzimático con formas moleculares que pueden diferir en sus características bioquímicas, estructura primaria, antigenicidad, actividad enzimática, localización subcelular y propiedades antifúngicas (Simmons, 1994; Graham y Sticklen, 1994). Numerosos trabajos muestran que las distintas isoformas están reguladas diferencialmente durante el desarrollo, frente al ataque por patógenos o en respuesta a agentes inductores bióticos y abióticos, mostrando respuestas específicas según el tejido y el estímulo, y actuando normalmente de modo sinérgico con las quitinasas (revisado en Mauch *et al.*, 1988; Boller, 1993; Simmons, 1994). Ambos enzimas han sido ampliamente estudiados en distintos patosistemas. Entre ellos, la mayoría de los trabajos en relación al tomate tratan hojas infectadas con virus, hongos patógenos o tratadas con elicitores químicos (Young y Pegg, 1981; Pegg y Young, 1981; Granell *et al.*, 1987; Joosten y de Wit, 1989; Fischer *et al.*, 1989; Wubben *et al.*, 1992; van Kan *et al.*, 1992; Domingo *et al.*, 1994; Ashfield *et al.*, 1994; Wubben *et al.*, 1996). Sin embargo, y pese a que gran número de patógenos fúngicos se encuentran en el suelo y atacan la planta a nivel de la raíz, y a que existe un gradiente en la expresión de β -1,3-glucanasa en la planta que alcanza el nivel máximo en raíz (Simmons, 1994), hay pocos

trabajos realizados en interacciones con hongos a nivel de raíz (Ferraris *et al.*, 1987; Benhamou *et al.*, 1989).

En este capítulo se presentan los resultados del estudio de las actividades β -1,3-glucanasa en raíces de tomate tras las interacciones simbiótica y patógena mediante técnicas electroforéticas, que han demostrado ser una herramienta sensible y eficaz para el estudio de las actividades hidrolíticas al permitir el seguimiento de isoformas específicas.

1. ISOFORMAS DE CARACTER ÁCIDO

La separación de proteínas de los extractos de raíz mediante el sistema Davis para proteínas ácidas y neutras permitió la detección en las raíces de plantas control de tomate, no micorrizadas, de dos bandas principales con actividad β -1,3-glucanasa correspondientes a isoformas expresadas constitutivamente (Figura 26, calles Nm, g1 y g2). De estas isoformas, la de menor movilidad relativa (g1) presentaba niveles de actividad mayores a estadios más tardíos del desarrollo de la planta, mostrando por tanto un incremento en su actividad con el tiempo. Ambas isoformas fueron detectadas en los extractos proteicos de raíces micorrizadas por cualquiera de los dos hongos MA estudiados (*G. mosseae* o *G. intraradices*), y en ambos casos la isoforma de mayor movilidad relativa (g2) resultaba estimulada en las micorrizas en cualquiera de los tiempos estudiados (Figura 26, calles Gm y Gi). Aparte de estas actividades, en las raíces de plantas colonizadas por *G. mosseae* aparecen dos nuevas isoformas (Figura 26, calles Gm, flechas de la izquierda, gGm, gGm'), que no están presentes en los extractos de plantas colonizadas por *G. intraradices*.

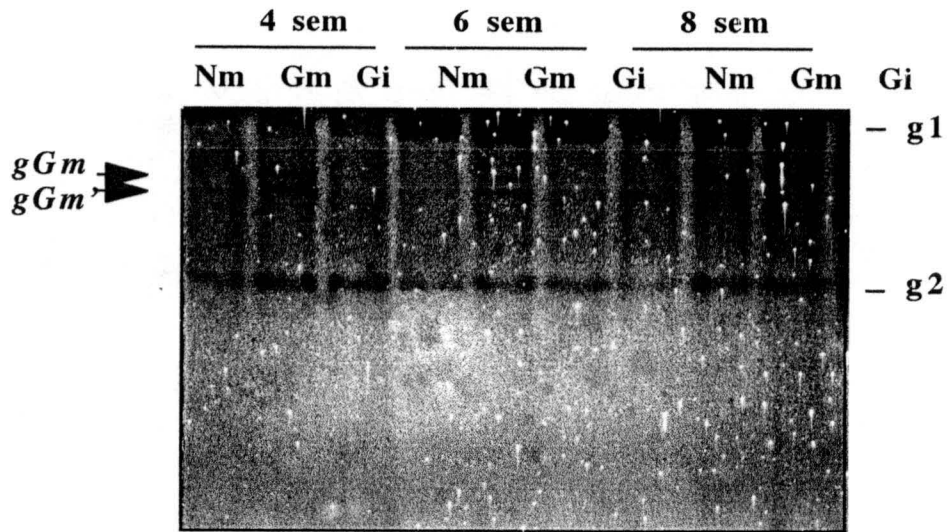


Figura 26. Actividades β -1,3-glucanasa en raíces de tomate no micorrizadas (Nm) colonizadas por *G. mosseae* (Gm) o por *G. intraradices* (Gi) tras 4, 6 y 8 semanas de crecimiento. g1 y g2 indica isoformas constitutivas. Las gGm y gGm' isoformas inducidas por *G. mosseae*.

Las plantas infectadas por el patógeno, estuvieran o no previamente micorrizadas, mostraron un incremento general de las actividades β -1,3-glucanasa, además de presentar una banda de intensidad débil y de mayor movilidad que las previamente descritas (Figura 27, bloque +Phyt, calles Nm, Gm y Gi, gPh).

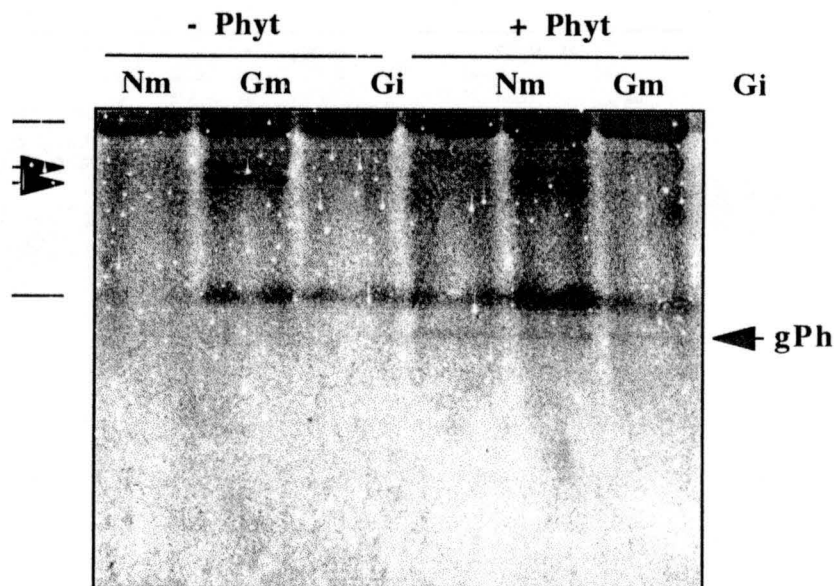


Figura 27. β -1,3-glucanasas ácidas de raíces de tomate de seis semanas infectadas (+Phyt) o no (-Phyt) por *Phytophthora parasitica*. Las barras indican las isoformas constitutivas, las flechas las isoformas inducidas, a la izquierda las inducidas por *G. mosseae*, a la derecha por *P. parasitica*.

Con el fin de discernir el origen de las nuevas isoformas detectadas, se analizaron los extractos proteicos de micelio de los hongos. No se detectó actividad β -1,3- glucanasa en los extractos obtenidos a partir del micelio externo de los hongos de la micorriza *G. mosseae* o *G. intraradices*. Por el contrario en el extracto correspondiente al micelio de *P. parasitica* sí se detectó una amplia zona de lisis en la parte alta del gel, pero a pesar de que se probaron distintos porcentajes de acrilamida y cantidades de proteínas, no se consiguió resolución suficiente en bandas bien definidas que permitan la comparación con las obtenidas para los extractos de plantas infectadas por este hongo.

2. ISOFORMAS DE CARACTER BÁSICO

Para la detección de las posibles isoformas con actividad β -1,3-glucanasa de caracter básico los extractos proteicos se sometieron a electroforesis a pH ácido de acuerdo con el

sistema descrito por Reisfeld y colaboradores (1962). Siguiendo este método se detectó una única isoforma constitutiva de carácter básico en todos los extractos (Figura 28, barra). No se detectaron cambios en el nivel de actividad de esta isoforma en relación a la micorrización (Figura 28, bloque -Phyt, calles Nm, Gm, Gi,) ni en relación a los distintos tiempos de cosecha estudiados. Sin embargo la respuesta a la infección por el patógeno si fue considerablemente distinta entre las plantas de los distintos tratamientos. Mientras que los extractos de plantas no micorrizadas así como los de plantas previamente colonizadas por *G. intraradices* no mostraron cambios en relación a la inducción de glucanasas tras la infección con el patógeno (Figura 28, bloque +Phyt, calles Nm y Gi,), los extractos correspondientes a plantas previamente colonizadas por *G. mosseae* e infectadas por el patógeno presentaban dos isoformas nuevas (Figura 28, bloque +Phyt calle Gm, flechas), no detectadas en plantas colonizadas por ninguno de los dos hongos por separado (Figura 28, bloque -Phyt calle Gm, bloque + Phyt calle Nm).

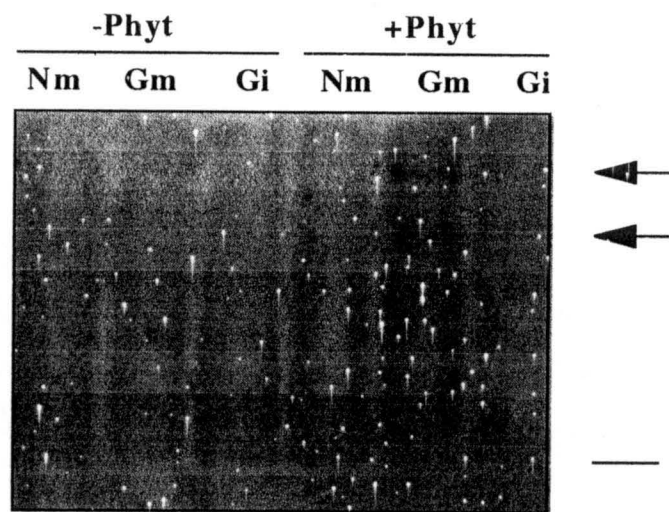


Figura 28. β -1,3-glucanasas básicas en extractos proteicos de raíz de plantas de tomate de 6 semanas infectadas (+Phyt) o no (-Phyt) por *Phytophthora parasitica*. La línea indica la isoforma constitutiva, y las flechas las isoformas nuevas.

3. ACTIVIDAD β -1,3-GLUCANASA TRAS ELECTROFORESIS EN CONDICIONES DESNATURALIZANTES

Con el fin de profundizar en la caracterización de las distintas isoformas y determinar su peso molecular, los extractos proteicos se separaron electroforéticamente bajo condiciones desnaturalizantes, pero a pesar de que se probaron distintos procedimientos para la renaturalización de la actividad no conseguimos detectar actividad β -1,3-glucanasa alguna tras el proceso. La sensibilidad de estas enzimas a la desnaturalización ya había sido descrita (Coté *et al.*, 1991), y aunque estos autores consiguieron la renaturalización de β -1,3-glucanasas de origen fúngico, no consiguieron recuperar dicha actividad tras la desnaturalización en extractos proteicos de origen vegetal.

4. DISCUSION

La familia génica de las glucanasas en tomate es relativamente pequeña, con pocos genes codificando para isoformas tanto ácidas como básicas (Simmons, 1994). En el presente trabajo se han detectado dos isoformas ácidas y una básica expresadas constitutivamente en las raíces de tomate. Una de las isoformas ácidas, la de menor movilidad electroforética (g1) mostró un incremento de actividad en el tiempo, según se deduce del seguimiento mediante cortes secuenciales. Este resultado concuerda con la ya descrita tendencia de la actividad β -1,3-glucanasa a incrementar con la edad en raíces y hojas basales (Simmons, 1994). Aparte de éstas isoformas constitutivas, las raíces de tomate respondieron a la colonización por los hongos de la micorriza y del patógeno con la inducción de nuevas isoformas, pero de modo específico ya que la reacción fue distinta dependiendo del hongo implicado. En los extractos proteicos de raíces colonizadas por *G. mosseae* se detectaron dos nuevas isoformas ácidas, que sin embargo no aparecen en los extractos correspondientes a plantas colonizadas por *G. intraradices*. La inducción de nuevas isoformas por la formación de micorrizas sólo ha sido descrita por Dumas-Gaudot

et al. (1992) en plantas de guisante, usando una técnica similar de detección de actividad en gel de poliacrilamida. Los extractos de raíz de guisante micorrizada presentaban una nueva banda cuya intensidad era variable dependiendo de los distintos hongos MA usados en el estudio (*G. versiforme*, *G. intraradices*, *G. fasciculatum*), siendo la menor intensidad la correspondiente a las raíces colonizadas por *G. intraradices*. Sin embargo no encontraron una respuesta similar en puerro ni cebolla frente a ninguno de los hongos, por lo que consideraron esa inducción como respuesta a una situación de estrés. Dassi *et al.* (1996) en un trabajo posterior no encontraron modificación alguna en raíces de guisante colonizadas por *G. mosseae*, mientras que la inoculación de estas plantas con el hongo patógeno *Aphanomyces eutiches* resultó en un aumento de actividad de una glucanasa básica. En nuestro sistema se detecta la inducción de una isoforma ácida por la infección de las raíces de tomate con el patógeno *P. parasitica*, pero no se observa ningún cambio en cuanto a isoformas básicas. Esta nueva isoforma, con baja actividad, es distinta a las inducidas por *G. mosseae*. Todos estos datos indican que la inducción de nuevas isoformas de β -1,3-glucanasa en las raíces colonizadas por hongos MA es una respuesta específica de ciertas interacciones planta-simbionte, tanto en relación al hongo, como se desprende de este trabajo, como de la planta, como muestran Dumas-Gaudot *et al.* (1992).

El origen de estas actividades parece ser vegetal, como apuntan la mencionada especificidad y la ausencia de actividad β -1,3-glucanasa detectada en el micelio extraradical de *G. mossae*. Además parece coherente con el hecho demostrado por trabajos moleculares de la acumulación en planta de ARNm codificantes para estas proteínas como respuestas a gran variedad de estímulos, y recientemente la demostración por Lambais y Mehdy (1998) de la acumulación localizada de ARNm de β -1,3-glucanasa en las células que contienen arbusculos y las adyacentes. No se puede excluir, no obstante, que las isoformas detectadas en el presente trabajo sean producidas por el hongo MA en determinados momentos de su desarrollo, con funciones en su morfogénesis o autólisis, o inducidas en ellos por alguna señal del hospedador.

En relación a las diferencias encontradas entre plantas colonizadas por uno u otro hongo MA, ya se han descrito previamente respuestas diferenciales del hospedador a distintos hongos. Dumas-Gaudot y colaboradores (1994) describieron cambios en los patrones polipeptídicos de raíces de tabaco colonizadas por *G. mosseae* y *G. intraradices*, aunque probablemente muchos de estos cambios respondan a proteínas de uno y otro hongo, una parte de ellos podrían corresponder al hospedador. Más tarde Lambais y Mehdy (1996) han demostrado variaciones en las respuestas incluso a cepas de la misma especie con las diferencias en la regulación y expresión de genes codificantes de quitinasas y β -1,3-glucanasas en plantas de soja colonizadas por dos cepas de *G. intraradices* que diferían en sus capacidades infectivas. Con una de las cepas observaron una reducción de la actividad endoglucanasa a estadios tardíos de la simbiosis, pero no pudieron correlacionarla con los niveles de ARNm de glucanasa detectados. Este punto señala la necesidad del seguimiento de las distintas isoformas como complemento a las medidas de actividad, puesto que cambios en los niveles de isoformas específicas pueden no verse reflejados en variaciones en la medida de la actividad total. Por este motivo los resultados de trabajos sobre actividad glucanasa, que muestran una represión general de la actividad en la micorriza en determinados momentos, no son contradictorios con la inducción de nuevas isoformas durante la simbiosis, como se desprende en este trabajo. Recientemente Lambais y Mehdy (1998) han demostrado mediante hibridización *in situ* la acumulación localizada de ARNm de β -1,3-glucanasa en las células que contienen los arbusculos y en las células adyacentes, mientras que en la raíz en general la acumulación de estos ARNm es reprimida, apuntando que las alteraciones de la expresión están implicadas en la regulación del crecimiento del hongo AM.

Teniendo en cuenta la variedad de técnicas y sistemas empleados en los distintos trabajos, las distintas capacidades de los hongos para modificar la expresión de los enzimas de defensa en su hospedador, y las variaciones de dicha expresión a lo largo del tiempo se

comprende la dificultad para sacar conclusiones sobre la regulación de éstas enzimas en la simbiosis MA.

Los hongos formadores de micorrizas arbusculares contienen β -1,3-glucanos, quitina y/o quitosán y glicoproteínas (Gollote *et al.*, 1997). Puesto que todos estos polisacáridos son conocidos por su capacidad de actuar como elicitores de reacciones de defensa en las plantas (John *et al.*, 1997), es lógico suponer que cuando la colonización por el hongo MA se ha realizado con éxito, o el hongo ha recurrido a alguna estrategia de camuflaje, por ejemplo mediante modificaciones de su pared durante el proceso de colonización, o que los mecanismos de defensa de la planta hayan sido reprimidos (Gollote *et al.*, 1997). De hecho, la planta hospedadora influye la morfología y composición de la pared del hongo MA conforme éste se desarrolla en los tejidos radicales. Lemoine y colaboradores (1995) describen una desaparición progresiva de los β -1,3-glucanos de la pared durante la colonización radical, observación que se confirmó en *G. mosseae* durante el proceso de colonización de raíces de tomate. Mientras que las paredes de las hifas extraradicales presentaban una gran cantidad de β -1,3-glucanos, en las hifas intercelulares se detectaba una menor proporción, hasta llegar a los arbusculos en los que no se detectó su presencia (Gollote *et al.*, 1997). En este contexto, cabe hipotetizar que las nuevas isoformas ácidas de glucanasa podrían estar implicadas en el control del desarrollo del hongo por la planta. Sin embargo es difícil interpretar el hecho de que sean inducidas en las raíces colonizadas por *G. mosseae* y no por *G. intraradices*. Queda pues por comprobar si esta diferencia pudiera estar relacionada con diferencias en las dinámicas de colonización de ambos hongos o a diferencias en la composición y/o estructura de su pared.

También se han detectado importantes diferencias en relación a la respuesta a la infección con el patógeno *P. parasitica* entre las plantas colonizadas por *G. mosseae*, *G. intraradices* y las no micorrizadas. En los extractos de raíces plantas no micorrizadas o colonizadas por *G. intraradices* inoculadas con *P. parasitica* se detectó una sola isoforma

básica, al igual que en los extractos de plantas no infectadas con el patógeno micorrizadas o no, mientras que en los extractos de raíz de plantas previamente colonizadas por *G. mosseae* e infectadas con el patógeno -interacción que resultó en daños mínimos por el patógeno (capítulo 1) - se detectaron dos nuevas isoformas básicas.

Numerosos trabajos correlacionan niveles altos de actividad β -1,3-glucanasa en planta con la resistencia de la planta a distintos patógenos, incluyendo algunos perteneciente al grupo de los oomicetos (Tuzun *et al.*, 1989, Jutidamrongphan *et al.*, 1991 Lusso y Kuc, 1996). Este resultado parece lógico al considerar que los β -1,3-glucanos son uno de los principales componentes de las paredes de los Oomicetos, entre los que se encuentra *P. parasitica*. Ahl Goy *et al.* (1992) encontraron relación entre niveles constitutivos de hidrolasas altos y la resistencia a *P. parasitica* var. *nicotianae* y otros patógenos en el híbrido *Nicotiana glutinosa* x *Nicotiana debney*. Poco después se demostró la resistencia a *P. parasitica* var. *nicotianae* de plantas de tabaco transgénico que sobreexpresaban actividad β -1,3-glucanasa (Yoshikawa *et al.* 1993). Recientemente, Cordier *et al.* (1998) han descrito modificaciones en la pared de *P. parasitica* durante la infección de raíces de tomate micorrizadas con *G. mosseae*, ya que no se detectaron β -1,3-glucanos en las paredes de las hifas de *Phytophthora* cuyo desarrollo se ve bloqueado por la formación de estructuras tipo papila en los tejidos micorrizados. Esta reacción no se observa cuando el patógeno colonizaba la raíz de plantas de tomate no micorrizadas, lo que parece sugerir alguna acción lítica en la planta micorrizada, para lo que las β -1,3-glucanasas son el candidato más lógico. Para entender la implicación de estas actividades es fundamental tener en cuenta que distintas isoformas pueden tener diferentes localizaciones subcelulares y estar diferencialmente reguladas, cumpliendo funciones específicas. Ward *et al.* en 1991 demostraron con ensayos *in vitro* que las distintas clases de β -1,3-glucanasas pueden tener actividades radicalmente diferentes frente a determinados sustratos y sugirieron que estas diferencias podrían reflejar diferentes funciones *in vivo*. Además algunos trabajos apuntan que el patrón temporal y espacial de la inducción de estos

enzimas es un punto clave en las interacciones compatibles e incompatibles (Domingo *et al.*, 1994, Ashfield *et al.*, 1994), e incluso algunos asocian las variaciones en estas actividades enzimáticas en respuesta a la inoculación con el patógeno con la severidad de la enfermedad y la extensión de la colonización fúngica más que con fenómenos de resistencia (Ferraris *et al.*, 1987, Mozzetti *et al.*, 1995). Benhamou y colaboradores (1989) demostraron mediante localización inmunocitoquímica que la acumulación de β -1,3-glucanasa en plantas de tomate sensibles ocurría como consecuencia de la colonización por el patógeno, mientras que en tejidos resistentes esta acumulación era temprana y parecía asociada a la limitación de la difusión del hongo patógeno. Aparte de una posible actividad lítica como causante directo de la inhibición del hongo, se sabe que las β -1,3-glucanasas pueden liberar carbohidratos de la pared celular de los hongos que actúen como elicitores activos induciendo la síntesis de fitoalexinas, como ya describieron Keen y Yoshikawa en 1983 al caracterizar y purificar dos isoformas de β -1,3-endoglucanasas básicas en soja capaces de liberar elicitores de la pared de *P. megasperma*, que mostraron una capacidad de elicitación de la respuesta de defensa muy alta, más que otras sustancias normalmente consideradas como potentes inductores (Keen *et al.*, 1983).

En resumen, los resultados presentados en esta memoria muestran cambios en el patrón isoenzimático de la actividad β -1,3-glucanasa, tanto en relación a isoformas de carácter básico como ácido, en respuesta a interacciones de tipo simbiótico (*Glomus*) y patógeno (*P. parasitica*). Sin embargo, como se discute anteriormente, la información disponible hasta la fecha no permite correlacionar de forma concluyente el carácter ácido o básico de dichas isoformas con sus funciones *in vivo*, aunque cabe especular sobre ella partiendo de los indicios existentes. La inducción de dos nuevas isoformas ácidas en raíces colonizadas por *G. mosseae* fue independiente de la presencia del patógeno. Vierheilig *et al.* (1995) usando plantas transgénicas demostró que la expresión constitutiva de una β -1,3-glucanasa ácida inhibía la colonización radical por *G. mosseae* retardando el proceso, mientras que la expresión de una β -1,3-glucanasa básica no afectó la micorrización. Estos

datos podrían sugerir la implicación de isoformas ácidas específicas en el control del desarrollo de *G. mosseae* dentro de la raíz. Por otro lado, la inducción de dos isoformas básicas tras la infección por el patógeno *P. parasitica* ha sido observada exclusivamente en las plantas previamente colonizadas por *G. mosseae*, que como se describe en el capítulo 1 fueron las más resistentes al ataque del patógeno. Las isoformas básicas, por tanto, parecen buenos candidatos a ser uno de los mecanismos implicados en la protección frente al ataque del patógeno fúngico *P. parasitica* derivada de la simbiosis establecida con *G. mosseae*. Esta hipótesis se ve fuertemente reforzada por trabajos recientes que concluyen que la actividad antifúngica de los extractos proteicos de plantas frente a distintas especies de *Phytophthora* reside en isoformas básicas de glucanasa (Anfoka y Buchenauer, 1997; Kim y Hwang, 1997; Yi y Hwang, 1997).

Superóxido dismutasas y peroxidasas

Entre los mecanismos de la planta para reconocer y defenderse de patógenos, uno de los eventos más notables es la rápida producción y acumulación de especies reactivas de oxígeno como radicales superóxido (O_2^-) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2), conocida como la **explosión oxidativa** (Doke *et al.*, 1996; Low y Merida, 1996). Los elicitores del patógeno parecen provocar esta explosión mediante múltiples cascadas de señales, activando proteínas G, la entrada de Ca^{2+} , intercambio H^+/K^+ , inducción de fosfolipasas y fosforilación de proteínas (Low y Merida, 1996). Se consideran dos fases, una primera que se da pocos minutos después de la detección del patógeno en interacciones tanto compatibles como incompatibles, y una segunda, prolongada, que ocurre horas después de la infección y sólo en las interacciones resistentes (Yang *et al.*, 1997). Tanto los O_2^- como los H_2O_2 generados pueden desempeñar distintas funciones en la defensa, bien mediante actividad antimicrobiana directa, bien actuando como segundos mensajeros. Además el H_2O_2 contribuye a la defensa mediante el reforzamiento de la pared celular (Yang *et al.*, 1997). De hecho se ha demostrado la resistencia de plantas de patata transgénicas que sobreproducen H_2O_2 frente a *Phytophthora infestans* y a la bacteria *Erwinia carotovora* (Wu *et al.*, 1995). Como segundos mensajeros parecen intervenir en la inducción de los genes relacionados con la defensa y en la respuesta hipersensitiva (Doke 1983 a y b; Yang *et al.*, 1997). También se ha descrito que el anión superóxido estimulado por elicitores es esencial para la activación de genes de defensa y la síntesis de fitoalexinas en perejil (Jabs *et al.*, 1997). Además, de modo análogo a lo que sucede en mamíferos, se ha propuesto que las especies reactivas de oxígeno activen la expresión génica en los procesos de defensa alterando el estado redox de las células, modulando de este modo la actividad de los factores de transcripción sensibles a cambios redox (Yang *et al.*, 1997).

Todo este proceso implica una fina regulación, para lo cual se requiere la actividad de varios enzimas que intervengan en el metabolismo de estas especies reactivas de oxígeno, entre las que destacan las superoxido dismutasas y las peroxidasas.

Las superóxido dismutasas (EC 1.15.1.1) son un grupo de metaloenzimas que catalizan la transformación de los radicales superóxido (O_2^-) de gran toxicidad, a H_2O_2 y O_2 (Fridovich, 1995), por lo que constituyen una primera defensa frente a los efectos deletereos derivados de los O_2^- que se pueden producir en la célula (Fridovich, 1989; Bowler *et al.*, 1992).

Hay tres tipos de SOD dependiendo del grupo prostético implicado en el sitio activo de la enzima, y se designan según éste como CuZn-SOD, Mn-SOD, Fe-SOD. Las CuZn-SOD se asignan típicamente a organismos eucarióticos (Mc Cord 1979; Fridovich 1983) aunque posteriormente se ha demostrado su presencia en procariotas (Parker *et al.*, 1984; Langford *et al.*, 1992). Las MnSOD se han descrito tanto en procariotas como en eucariotas (Mc Cord 1979; Fridovich 1989, 1995). Por último, las FeSOD se consideraron propias de procariotas, pero más tarde se comprobó su existencia en distintas familias vegetales (Fridovich 1983).

Las peroxidasas (EC 1.11.1.7), presentes en plantas superiores bajo diversas formas moleculares, parecen estar implicadas en distintos procesos fisiológicos como lignificación y suberización de la pared celular, deposición de polifenoles, formación de estructuras papilares, reforzamiento de la pared por entrecruzamiento de las proteínas, oxidación de compuestos fenólicos y la producción de radicales tóxicos. La toxicidad del H_2O_2 frente a microorganismos patógenos se ha observado incluso a concentraciones fisiológicamente normales en plantas (Peng y Kuc, 1992). Numerosos trabajos correlacionan fenómenos de resistencia en distintos patosistemas con incrementos en la actividad peroxidasa tras la infección por el patógeno, e incluso se ha demostrado la inducción específica de ciertas peroxidasas en interacciones incompatibles, por lo que se les asocia con resistencias inducida y/o sistémica

1. SUPEROXIDO DISMUTASAS

La separación electroforética en condiciones nativas permitió la detección de dos isoformas principales en los extractos de raíz correspondientes a todos los tratamientos (Figura 29 A, barras). En los extractos de plantas micorrizadas, tanto con *G. mosseae* como con *G. intraradices*, estas isoformas presentan mayor actividad, y además aparece una nueva isoforma de menor movilidad relativa (Figura 29 A, calles Gm y Gi, flecha). Cuando las plantas fueron infectadas con el patógeno *P. parasitica* (Figura 29 A, calles +Phyt), aunque no se observaron diferencias en las plantas no micorrizadas (no se detecta ninguna isoforma nueva ni alteraciones en la actividad de las constitutivas), en las plantas micorrizadas la isoforma inducida presenta menor intensidad.

Este patrón se repitió en los extractos correspondientes a las plantas cosechadas a distintos tiempos (4, 6, 8, 10 semanas) sin que se detectaran diferencias significativas, aunque la actividad de la isoforma inducida por la micorrización tiende a disminuir.

Para caracterizar las isoformas presentes en los distintos extractos se usaron inhibidores específicos de cada tipo de SOD. Las isoformas CuZnSOD son sensibles tanto al cianuro como al peróxido de hidrógeno, las FeSOD son insensibles al CN^- pero son inhibidas por el H_2O_2 , mientras que las Mn-SOD no se inhiben por ninguno de estos compuestos. En la figura 1B se muestran los resultados obtenidos tras la incubación de las actividades en presencia de cianuro potásico, CNK, e idénticos resultados se obtuvieron tras el tratamiento con H_2O_2 . En ambos casos la isoforma constitutiva principal es inhibida, indicando que se trata de una Cu-Zn SOD, mientras que la isoforma inducida en las plantas micorrizadas se detectó después de ambos tratamientos, tratándose por tanto de una Mn-SOD.

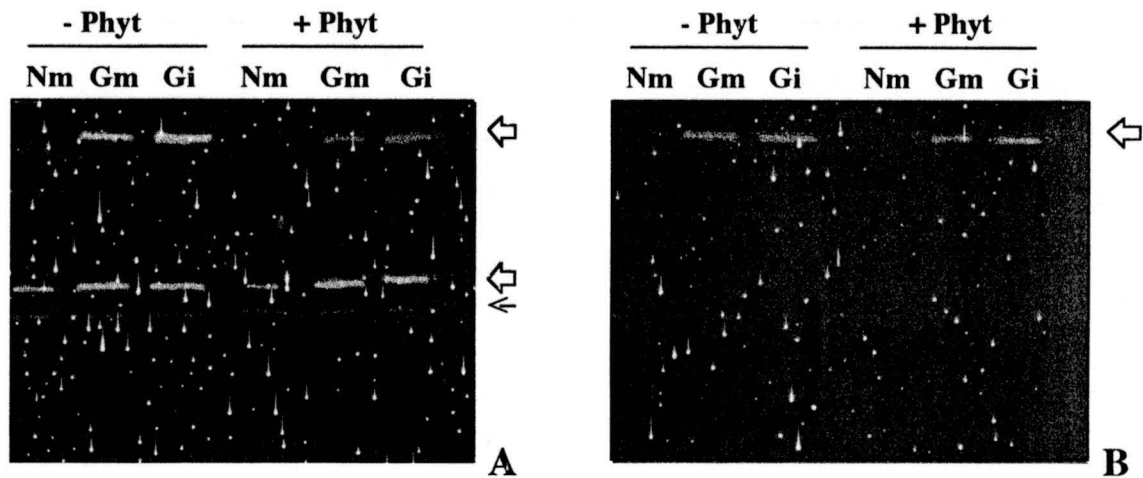


Figura 29. Actividades superoxido dismutasa en geles de poliacrilamida incubadas en ausencia de inhibidores (A), o en presencia de CNK (B)

2. PEROXIDASAS

La separación de los extractos proteicos mediante electroforesis nativa según el sistema Davis reveló 8 isoformas principales de peroxidasa en todos los extractos. Las diferencias entre tratamientos en el patrón isoenzimático obtenido fueron poco evidentes. Sin embargo las muestras correspondientes al modelo compartimentado permitieron un análisis más exhaustivo de estas actividades, por lo que los resultados en relación a peroxidasas se describen en detalle en el capítulo correspondiente a este modelo.

3. DISCUSIÓN

Las distintas isoformas de SOD suponen un buen mecanismo de protección celular frente a la oxidación por los iones superóxido, que pueden ser inducidos por diversas circunstancias, como la senescencia, la acumulación de oxígeno, los procesos patogénicos y situaciones ambientales estresantes para la planta (Del Rio *et al.*, 1991).

El análisis isoenzimático mediante electroforesis nos ha permitido caracterizar una isoforma constitutiva principal en las raíces de tomate del tipo Cu-Zn-SOD, en concordancia con lo previamente descrito para esta planta por Zacheo y Bleve-Zacheo (1988). Las plantas micorrizadas, tanto por *G. mosseae* como por *G. intraradices*, mostraron además una nueva isoforma caracterizada mediante inhibidores como una Mn-SOD. Por sus propiedades antioxidantes, un incremento en la actividad SOD en las plantas micorrizadas podría ser responsable de la protección de distintas enzimas frente a la oxidación, entre ellas las quitinasas, cuya mayor capacidad de renaturalización bajo condiciones no reductoras, posiblemente consecuencia de una menor sensibilidad a la oxidación se ha puesto de manifiesto en el capítulo 2 para las plantas micorrizadas.

Pero el significado biológico de la inducción de nuevas isoformas de SOD aún se desconoce. Numerosos trabajos muestran que una mayor producción de radicales O_2^- , junto con la síntesis de nuevas isoenzimas SOD podría ser un mecanismo protector de las células vegetales en respuesta a la entrada de un organismo extraño. Por ejemplo se ha relacionado la expresión de SODs inducibles con la resistencia o susceptibilidad a la roya en plantas de café (Daza *et al.*, 1993). Además se han detectado diferencias en el patrón isoenzimático de SOD entre plantas de *Phaseolus vulgaris* susceptibles o resistentes al patógeno *Uromyces phaseoli* (Buonario *et al.*, 1987). También se han descrito cambios en este patrón durante asociaciones simbióticas entre plantas y distintos microorganismos. A este respecto son numerosos los estudios que muestran la importancia de la SOD en los nódulos de leguminosas como sistema antioxidante protegiendo la nitrogenasa en el proceso de fijación de N_2 (Puppo *et al.*, 1982; Dimitrijevic *et al.*, 1984; Becana *et al.*, 1989). En la simbiosis MA se ha descrito la inducción de 2 nuevas isoformas de SOD en trébol colonizado por *G. mosseae*, una Mn-SOD y otra Cu-Zn-SOD, habiéndose detectado también la isoforma Mn-SOD en los nódulos formados por *Rhizobium* en esa planta (Palma *et al.*, 1993). Sin embargo, en guisante, a pesar de una mayor actividad SOD en las raíces tras la micorrización con *G. mosseae* no se encontraron alteraciones cualitativas en su patrón (Arines *et al.*, 1994a). Aunque se ha especulado con la implicación de este sistema enzimático en el proceso de micorrización (Arines, 1994b), aún se desconoce su significado

en la simbiosis MA. Estos autores proponen que los incrementos en Mn-SOD podrían estar relacionados preferentemente con la fase biotrófica en la célula hospedadora, mientras que un incremento en las Cu-ZnSOD podría estar relacionado con procesos de tipo necrótico, asociados con reacciones de hipersensibilidad. Podría ser que la simbiosis implique necesariamente una mayor actividad de las SODs, como ocurre en las situaciones de estrés, quizás por la alta actividad celular asociada al proceso. Según esto las diferencias en la respuesta entre las distintas plantas podrían deberse a diferencias en la eficacia de la simbiosis. Recientemente Martín y colaboradores (1998) describen la inducción en cebolla y trébol de una nueva isoforma CuZn-SOD tras la colonización por *G. mosseae*, pero no con *G. intraradices*, por lo que postulan el origen fúngico de la actividad, con la posible función de contrarrestar el incremento local de la presión de O₂ que podría originarse con la entrada del hongo. Sin embargo no se detectó la presencia de esa banda en los extractos proteicos de micelo de *G. mosseae*, con lo que o bien la enzima se induce en el hongo durante la colonización, o bien se induce en la planta en respuesta a la entrada del hongo, como se ha postulado para infecciones por patógenos como *Phytophthora* (Ivanova *et al.*, 1991 SOD) y no patógenos (Fink *et al.*, 1991; Williamson y Scandalios, 1992). Por otro lado, puesto que los radicales superóxido parecen ser clave como molécula señal en las respuestas de defensa, y puesto que la actividad SOD parece ser capaz de bloquear la respuesta hipersensitiva (Able *et al.*, 1998), la inducción de esta actividad en las interacciones simbióticas podría intervenir en el bloqueo de la señal y por tanto de la reacción de defensa permitiendo así la colonización del tejido por el microorganismo.

En relación a las peroxidasas, son muchos los trabajos que correlacionan incrementos en su actividad con resistencia a patógenos. Ya en 1939 Gretschnickoff relacionó los niveles de actividad peroxidasa con la resistencia en campo de la patata frente a *P. infestans*. Fehrmann y Dimmond (1967) encontraron una fuerte correlación entre la actividad peroxidasa de diferentes órganos de esta planta y su resistencia al patógeno. Recientemente se han relacionado niveles altos de expresión de peroxidasa en plantas de tabaco híbridas y transgénicas y su tolerancia frente a *P. parasitica* var. *nicotianae* (Ahl Goy *et al.*, 1992; Kazan *et al.*, 1998). En tomate, la inducción de resistencia sistémica frente a *P. infestans*

por la preinoculación con el virus de la necrosis del tabaco fue acompañada de un aumento de la actividad peroxidasa total de las hojas inoculadas y las superiores a estas, así como la inducción de 3 isoformas nuevas (Anfoka y Buchenauer, 1997).

También se han descrito cambios en estas actividades durante interacciones simbióticas, por ejemplo en simbiosis *Rhizobium*-leguminosa (Stahelin *et al.*, 1992; Salzzwedel y Dazzo, 1993). La inducción de peroxidasas con la formación de ectomicorrizas se ha descrito en eucalipto, siendo el incremento mayor y continuado en el tiempo durante las interacciones con la cepa más agresiva del hongo EM (Albretch *et al.* 1994). En cuanto a micorrizas arbusculares los trabajos realizados muestran incrementos transitorios de la actividad peroxidasa, sobre todo en etapas iniciales (Spanu y Bonfanfe-Fasolo, 1988; Mac Arthur y Knowles, 1992), y han sido asociadas al control del desarrollo del hongo en los tejidos superficiales de la raíz más que de estadios más avanzados de la simbiosis, puesto que no se ha encontrado su activación en células con arbusculos (Gianinazzi-Pearson, 1995). Más tarde Mathur y Vyas (1995) describieron un incremento en la actividad peroxidasa total y la presencia de dos isoformas adicionales en raíces de *Ziziphus* colonizadas por *G. fasciculatus* en estadios avanzados, que estos autores relacionaron con el incremento en el nivel de fósforo en la planta.

Modelo compartimentado

Puestas de manifiesto numerosas diferencias entre plantas micorrizadas y no micorrizadas tanto a nivel de la respuesta al ataque de *P. parasitica* como en cuanto a las actividades enzimáticas ensayadas, se abre el interrogante de si estos cambios ocurren a nivel local, en las partes colonizadas, o si por el contrario se dan de modo sistémico en toda la planta. Desde hace años se discute si la protección de la planta frente a distintos patógenos a consecuencia del establecimiento de la micorriza se trata de un fenómeno de interacción directa, localizado, o si es extensivo a las partes no colonizadas de una planta micorrizada. A este respecto se han descrito resultados contradictorios. Por ejemplo Schönbeck en 1979 describió que las raíces no colonizadas del sistema radical de plantas micorrizadas eran infectadas por *Olpidium brassicae* igual que las plantas no micorrizadas, y defendió que la protección es un efecto estrictamente local en las zonas infectadas, mientras que otros autores describían un incremento de la resistencia frente a *Phytophthora* en las partes no micorrizadas de los sistemas radicales de plantas micorrizadas (Davis y Menge, 1980). Más tarde, Dehne (1987) describió el efecto protector de carácter sistémico de las micorrizas frente a *Thielaviopsis basicola* usando un modelo compartimentado.

En este capítulo se pretende dilucidar mediante el uso de un sistema compartimentado, el carácter localizado o sistémico de la protección frente a *P. parasitica* y de las actividades enzimáticas evaluadas en esta Tesis Doctoral.

1. DATOS FISIOLÓGICOS

El sistema compartimentado descrito en el apartado 2.2 de la sección de Material y Métodos de la presente Memoria nos permitió considerar por separado las partes colonizada (+Gm / +Gi) y no colonizada (-Gm / -Gi) del sistema radical de las plantas inoculadas con los hongos MA, y compararlas con el sistema radical de plantas no inoculadas con hongos MA (Nm). El porcentaje medio de raíz colonizada en el

compartimento inoculado con el hongo MA fue de un 50% para *G. mosseae* y de un 55% para *G. intraradices*. Estos niveles de colonización no se vieron afectados en las plantas posteriormente infectadas por el patógeno, puesto que en el momento de la cosecha las plantas inoculadas con *P. parasitica* presentaban porcentajes de micorrización similares a las no inoculadas con este hongo. En todos los casos se comprobó la ausencia de colonización en el compartimento complementario. En la tabla 14 se presentan las medias obtenidas para los parámetros de crecimiento y desarrollo de las plantas, indicándose la significación estadística de las diferencias según el análisis de la varianza de dos vías (ANOVA-2) (Tratamiento de micorriza - Nm/ Gm/ Gi - frente a tratamiento de *Phytophthora* -Ausencia de inoculación con el patógeno, inoculación del patógeno en el compartimento que contiene el hongo de la micorriza, o inoculación en el compartimento sin micorriza de una planta micorrizada).

Tabla 14. Parámetros de desarrollo de las plantas con el modelo compartimentado

Tratamiento		Peso fresco (g)					A/R	I.E.*	Phy**
Raíz 1	Raíz 2	P. Aérea	Raíz 1	Raíz 2	R Total	Total			
Nm	Nm	11.00 ab	1.91 ab	1.86 ab	3.77 a	14.77 a	2.94 bc	0 c	--
-Gm	+Gm	11.08 ab	1.75 ab	1.65 abc	3.40 ab	14.40 a	3.26 bc	0 c	--
-Gi	+Gi	9.74 bc	1.60 ab	1.98 a	3.58 ab	13.32 ab	2.76 c	0 c	--
C-P	C+P	10.39 abc	1.75 ab	1.04 d	2.79 b	13.19 ab	4.19 ab	3.5 a	1.98
-Gm-P	+Gm+P	11.45 a	2.13 a	1.37 bcd	3.50 ab	14.94 a	3.64 abc	1.8 b	0.97
-Gi-P	+Gi+P	10.06 abc	1.50 b	1.14 cd	2.64 b	12.70 ab	4.11 ab	2.8 ab	1.72
+Gm-P	-Gm+P	9.87 abc	2.06 ab	1.54 abcd	3.59 ab	13.46 ab	2.80 c	2.0 b	1.07
+Gi-P	-Gi+P	8.96 c	1.63 ab	1.08 d	2.71 b	11.66 b	4.59 a	3.0 ab	1,56

A./R- Relación parte aérea/raíz.

*I.E: Índice de enfermedad-Estimación visual de los síntomas de la enfermedad, desde 0 (ausencia de síntomas) a 5 (raíz completamente necrosada).

**Cuantificación de *Phytophthora* en raíz, expresado como unidades de absorbancia obtenidos mediante la técnica de ELISA.

Los valores de una misma columna con alguna letra en común difieren significativamente ($p \leq 0.05$) según la Mínima Diferencia Significativa de Fisher tras un ANOVA-2.

Considerando exclusivamente las plantas no inoculadas con patógeno, el análisis estadístico de los datos mostraron que el tratamiento con los hongos MA ocasionó cambios en el peso fresco de parte aérea ($p=0.04$), en la raíz colonizada, aunque con menor consistencia ($p=0.09$), en la biomasa total de la planta ($p=0.065$), y en la relación parte aérea/raíz -A./ R. ($p=0.056$). Las plantas colonizadas por *G. intraradices* presentaron un menor desarrollo de la parte aérea y la parte de su sistema radical no colonizado en comparación con las no micorrizadas o las colonizadas por *G. mosseae*, mientras que esta tendencia era opuesta en la parte de la raíz colonizada, que era generalmente mayor. La relación A/ R era distinta en función del tratamiento con el hongo MA de forma estadísticamente significativa ($p=0.05$), siendo la mayor para plantas colonizadas por *G. mosseae* y la menor para las plantas colonizadas por *G. intraradices*.

La aplicación de *P. parasitica* dañó considerablemente la parte del sistema radical inoculada con el patógeno en las plantas no micorrizadas ($p=0.0016$) o las micorrizadas con *G. intraradices* provocando una reducción en el peso de un 44% para las primeras y entre un 42% y un 45% para las segundas según la inoculación se hubiera realizado en el compartimento conteniendo la micorriza (+Gi) o no (-Gi). Sin embargo esta reducción en plantas colonizadas por *G. mosseae* fue del 17% y 6.6% según la inoculación se llevara a cabo en los compartimentos +Gm o -Gm respectivamente, sin llegar a ser estadísticamente significativa. Estos daños se vieron reflejados a nivel de la biomasa total de raíz, afectada significativamente en las plantas no micorrizadas y en las colonizadas por *G. intraradices* independientemente de si la infección con el patógeno se efectuó en el compartimento conteniendo la micorriza o no, mientras que en las plantas colonizadas por *G. mosseae* la masa total de raíz no se vió afectada. Respecto a la parte aérea, la infección por *Phytophthora* no llegó a ser estadísticamente significativa, probablemente porque la enfermedad se encuentra en estadios tempranos a ese tiempo de cosecha. Por tanto en las plantas más afectadas la razón peso parte aérea/ raíz (A/R) sufre un considerable incremento al verse su masa radical fuertemente afectada por la enfermedad sin que los efectos deletéreos hayan alcanzado aún la parte aérea. Este fenómeno se observa tras la inoculación por el patógeno en plantas no micorrizadas (Nm+P) y colonizadas por *G.*

intraradices (-Gi+P, +Gi+P), mientras que en las plantas colonizadas por *G. mosseae* la razón no se altera de modo significativo. En relación a los síntomas visuales de la enfermedad el valor máximo, 3.5, se alcanzó en las plantas infectadas no micorrizadas (Nm+P) y mínimo, 1.8, en las plantas colonizadas por *G. mosseae* cuando el patógeno se inocula junto al hongo MA (+Gm+P). Las plantas colonizadas por *G. intraradices* (-Gi+P, +Gi+P) presentaron un grado de sintomatología intermedio, aunque frecuentemente alcanzaban niveles comparables a los obtenidos para las plantas no micorrizadas (Nm+P). Cuando el patógeno fue inoculado en el compartimento sin micorriza de las plantas en inoculadas con *G. mosseae* (-Gm+P) los síntomas eran menores que los del sistema radical de las plantas no micorrizadas (Nm+P) de forma estadísticamente significativa.

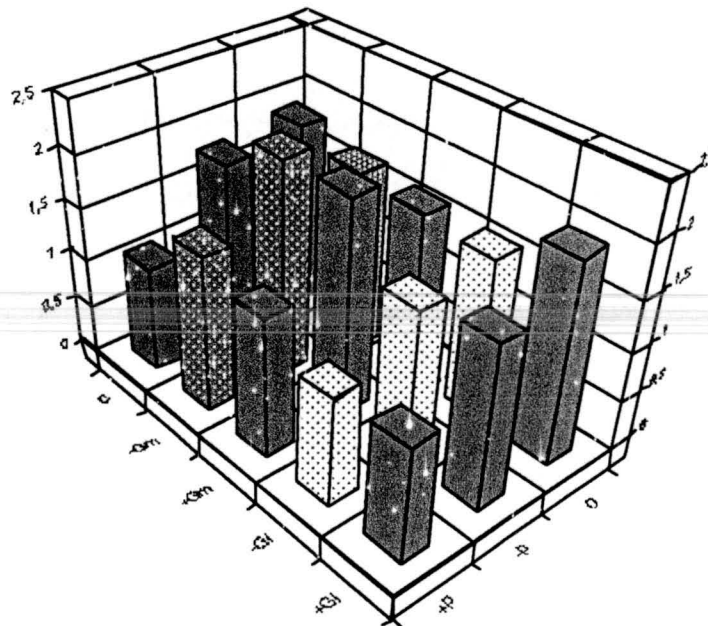


Figura 30. Datos de peso fresco (en gramos), de cada una de las partes de los sistemas radicales considerados por separado (Nm, -Gm, +Gm, -Gi, +Gi), de plantas no inoculadas con patógeno (0), inoculadas con *Phytophthora* en la mitad complementaria del sistema radical (-P) o inoculadas directamente (+P)

La estimación de la cantidad de patógeno en la raíz de los distintos tratamientos mediante la técnica de ELISA, expresada en valores de absorbancia, apoyó las diferencias entre tratamientos, siendo máxima en las plantas no micorrizadas (Nm+P), seguido de las

colonizadas por *G. intraradices* (+Gi+P) y el valor mínimo se obtuvo para las inoculadas por *Phytophthora* en el compartimento de raíz colonizada por *G. mosseae* (+Gm+P).

La inoculación con el patógeno en experimentos en que no se alcanzaron niveles altos de colonización por el hongo MA(M<20%) no se observaron los efectos de reducción de síntomas, de cantidad de patógeno y pérdida de peso radical en las plantas colonizadas por *G. mosseae* en comparación con las no micorrizadas (datos no mostrados).

2. ANÁLISIS ISOENZIMÁTICOS

Los extractos proteicos de las muestras del sistema radical correspondientes a los distintos tratamientos se sometieron a separación electroforética para el análisis de las distintas actividades enzimáticas objeto de estudio en este trabajo de investigación. El contenido en proteínas de los distintos extractos se muestra en la tabla 15.

Tabla 15. Concentración de proteínas de los extractos radicales

Tratamiento		mg proteína/ g peso fresco	
Raíz 1	Raíz 2	Raíz 1	Raíz 2
Nm	Nm	0.74 abc	0.75 abc
- Gm	+Gm	0.76 abc	1.12 d
- Gi	+Gi	0.80 bc	1.11 d
C-P	C+P	0.58 a	0.70 abc
-Gm-P	+Gm+P	0.81 bc	1.10 d
- Gi-P	+Gi+P	0.66 ab	1.14 d
+Gm-P	- Gm+P	0.74 abc	0.69 ab
+Gi-P	- Gi+P	0.87 c	0.80 bc

Las tendencias reflejadas en esta tabla se confirmaron en todos los ensayos realizados, lo cual indica que la concentración de proteínas de las partes no micorrizadas de raíces de plantas micorrizadas (-Gm, -Gi) es igual o ligeramente mayor que en las plantas no colonizadas (Nm), mientras que esta concentración es mayor de forma estadísticamente

significativa en las partes colonizadas por cualquiera de los dos hongos MA (+Gm, +Gi). La inoculación con el patógeno *P. parasitica* (+P) no altera en general este parámetro, o resulta en una ligera disminución que no llega a ser significativa. Sin embargo destaca el hecho de que la concentración de proteínas disminuye en los extractos de las raíces colonizadas por el hongo MA cuando la planta ha sido inoculada con el patógeno en la otra parte de su sistema radical (+Gm-P, +Gi-P), en relación a sus equivalentes en plantas no infectadas por el patógeno (+Gm, +Gi).

A continuación se muestran los cambios en los patrones isoenzimáticos de las actividades estudiadas que hayan sido detectados de forma consistente en los distintos ensayos.

2.1 Quitinasas/Quitosanasas

El sistema experimental compartimentado no parece afectar de modo apreciable a las actividades quitinasa y quitosanasas, ya que el patrón isoenzimático obtenido para ambas enzimas en las muestras de plantas control, no micorrizadas (Nm) es equivalente a los descritos para plantas crecidas según el modelo simple en los capítulos 2, 3 y 4 de la sección de Resultados de la presente Memoria (tres isoformas principales con actividad quitinasa, y ausencia de actividad quitosanasas). Los extractos correspondientes a las partes no colonizadas de plantas inoculadas con los hongos MA (-Gm, -Gi) no mostraron diferencias con respecto a dichos controles no micorrizados (Nm). Por último, en las raíces colonizadas (+Gm, +Gi), crecidas en el compartimento con inóculo de los hongos MA se confirmó la inducción de nuevas actividades quitinasa, la mayor capacidad de renaturalización de las quitinasas en estos extractos y la aparición de actividades quitosanasas, como se describió en los capítulos 2 y 3 para las plantas micorrizadas cultivadas según el sistema experimental simple. En la Figura 31 se muestran las actividades líticas detectadas en geles con glicolquitina y glicolquitosán como sustrato, tras tinción con calcofluor (A) o con azul coomasie (B). No se observan cambios en la parte no micorrizada del sistema radical de una planta micorrizada con cualquiera de los dos hongos MA (-Gm, -

Gm-Pp, -Gm+Pp, -Gi) con respecto a la raíz de plantas control no micorrizadas (Nm), y sí la presencia de las actividades quitinasa/quitosanasa previamente descritas (capítulo 4) sólo en la parte del sistema radical colonizada, confirmando el carácter localizado de la doble actividad.

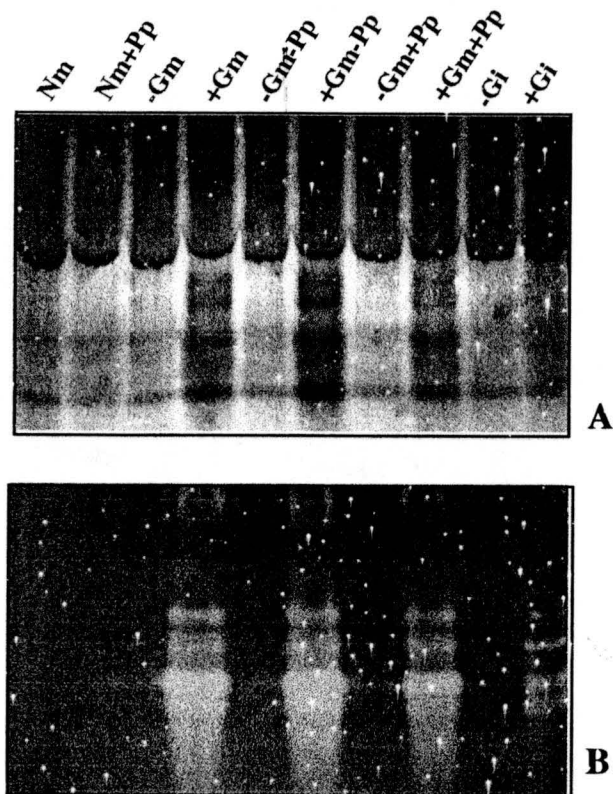


Figura 31. Actividades líticas detectadas en geles con glicolquitina y glicolquitosán como sustrato. Gel en A teñido con Calcofluor. Gel en B teñido con azul Coomassie. Leyendas como en Figura 8.

Sin embargo, cuando se observó la evolución de las actividades a lo largo del tiempo, se observaron diferencias cuantitativas en cuanto a la actividad de las isoformas de quitosanas de baja MR que aparecen en la parte alta del gel a estadios más tardíos del desarrollo de la planta (mostradas en el capítulo 3). La Figura 32 muestra los resultados obtenidos tras la separación electroforética de los extractos correspondientes a plantas tras 10 semanas de crecimiento en el sistema compartimentado. La banda indicada con la flecha aparece en todos los extractos a este estadio, aunque presenta mayor intensidad en las plantas control (Nm), que en las micorrizadas, siendo casi inapreciable en las raíces colonizadas por *G. mosseae* (+Gm). En los extractos de raíces infectadas por el patógeno (+P) esta actividad aparece incrementada además de detectarse al menos una isoformas más. Este incremento es mayor en las raíces no micorrizadas de plantas colonizadas por el hongo *G. intraradices* cuando son infectadas por el patógeno (-Gi+P), siendo las raíces colonizadas (+Gm+P, +Gi+P) las que reaccionan con menor intensidad. Las raíces colonizadas por *G. intraradices* presentan además otra isoforma (línea discontinua). Las isoformas de baja MR características de la simbiosis desde estadios tempranos solo se mantienen en esta fase más tardía del desarrollo en las plantas colonizadas por *G. mosseae*.

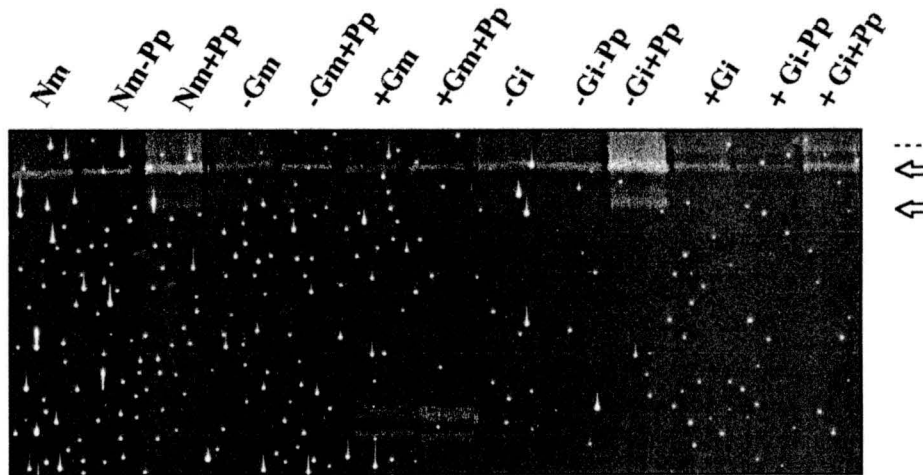


Figura 33. Actividades quitosanas en los extractos correspondientes a plantas tras 10 semanas de crecimiento. Leyendas como en Figura 8

2.2 β -1,3-glucanasas

El análisis de las actividades β -1,3-glucanasa permitió la detección de dos isoformas constitutivas en las plantas no micorrizadas (Nm) y en las partes no colonizadas de los sistemas radicales de plantas micorrizadas (- Gm, - Gi), al igual que en plantas crecidas según el modelo simple. Las isoformas detectadas en plantas micorrizadas con *G. mosseae* (capítulo 4, figuras 26 y 27, *gGm*, *gGm'*) aparecen sólo en los extractos de las raíces colonizadas por este hongo (+Gm, +Gm-P, +Gm+P), lo que indica una inducción localizada de estas actividades. En relación a la respuesta ante el ataque del patógeno, las raíces infectadas, correspondientes al compartimento inoculado con *P. parasitica*, al igual que en el modelo simple, mostraron un incremento de toda la actividad β -1,3-glucanasa, además de presentar una banda de intensidad débil y de mayor movilidad (Figura 27 *gPh*). La inducción de glucanasas ácidas ante el ataque de *Phytophthora* es por tanto, local, y no sistémica. Aunque las diferencias no son muy significativas, si parece una tendencia general que este aumento sea mayor en las partes no colonizadas de plantas micorrizadas.

Respecto a las isoformas de carácter básico no se detectó ningún cambio en las partes no colonizadas de los sistemas radicales de plantas micorrizadas (-Gm, -Gi) en comparación con las plantas no micorrizadas, y las dos isoformas presentes en los extractos de plantas colonizadas por *G. mosseae* y posteriormente infectadas por el patógeno (fig. 5.3, flechas) aparecen sólo en el caso en que ambos hongos son inoculados conjuntamente (+Gm+P), y no cuando se inocula el patógeno en el compartimento sin inóculo de este hongo MA (-Gm+P).

2.3 SOD

La inducción de una nueva isoforma de SOD, de tipo Mn-SOD, en plantas colonizadas por *G. mosseae* o *G. intraradices* (Capítulo 6) se da exclusivamente en la parte del sistema radical colonizada (+Gm, +Gi) infectadas o no por el patógeno, y no de forma generalizada en toda la raíz, según se deduce de los resultados obtenidos tras la separación

electroforética. En la figura 34 se muestra el patrón isoenzimático obtenido para los distintos extractos, similar al que presentan las plantas correspondientes al modelo simple. La actividad de la isoforma inducida por la micorrización parece menor cuando las raíces colonizadas son atacadas por el patógeno (+Gm+P).

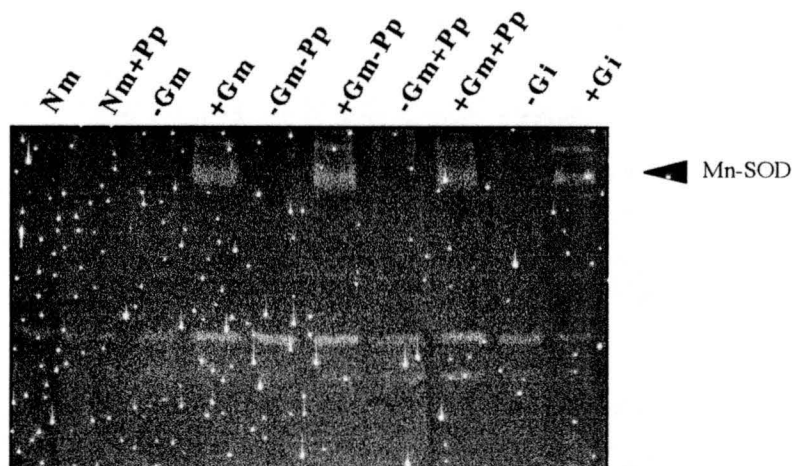


Figura 34. Actividades superóxido dismutasa de los extractos proteicos del modelo compartimentado. Leyendas como en figura 8. La isoforma inducida en plantas micorrizadas, caracterizada como Mn-SOD, está indicada con una flecha.

2.4 Peroxidasa

El análisis de las muestras obtenidas según el modelo compartimentado amplió considerablemente la información sobre las actividades peroxidasa obtenida con el sistema simple, en que apenas se detectaron diferencias. La pormenorización de los tratamientos permitió comprobar por la intensidad de las distintas señales que isoformas son estimuladas en cada uno de ellos (Figura 35). Numeradas todas las isoformas del 1 al 8, en sentido creciente de menor a mayor MR, las isoformas 1 y 2 son apenas evidentes en plantas no micorrizadas (Nm). Las isoformas 3, 4 y 5 presentan una fuerte señal, y de las restantes destaca la 6, ya que la 7 y la 8 muestran muy poca intensidad en estos extractos. En los extractos de plantas micorrizadas por *G. mosseae* las isoformas 1 y 2 presentan más actividad tanto en las partes colonizadas (+Gm) como en las no colonizadas (-Gm).

Además en la parte colonizada (+Gm) las isoformas 6 y 7 aparecen con similar intensidad, destacando sobre ellas la número 8. Para las plantas inoculadas con *G. intraradices* no se observan diferencias claras en el patrón isoenzimático de las partes colonizadas (+Gi) y no colonizadas (-Gi), mostrando ambas incrementadas la actividad de las isoformas 2 y 8 con respecto a las de plantas controles no micorrizadas (Nm). La isoforma número 6 presenta, por el contrario, menor actividad que en las no micorrizadas (Nm) y en las partes colonizadas (+Gm) o no (-Gm) de plantas inoculadas con *G. mosseae*. Estos patrones se ven además afectados con la inoculación con el patógeno. En los extractos de plantas no micorrizadas infectadas por *P. parasitica* (Nm+P) se observa la estimulación de las isoformas 2 y ligeramente de las número 6, 7 y 8 con respecto al patrón en plantas no atacadas por el patógeno (Nm). Cuando la inoculación del patógeno se realizó en la parte no colonizada de plantas micorrizadas con *G. mosseae* (-Gm+P) el patrón isoenzimático fue muy similar al de Nm+P. En el caso del ataque del patógeno en la parte colonizada de estas plantas (+Gm+P) la diferencia principal respecto a su equivalente no infectada (+Gm) es la disminución de la actividad de la isoforma 8, que pasa a ser menor que la de la 6, que sí aumenta ligeramente. Para plantas micorrizadas con *G. intraradices*, la inoculación del patógeno en cualquiera de las dos partes de su sistema radical (-Gi+P, +Gi+P) provocó la inducción de las isoformas 4 y 6 respecto al patrón de las plantas sin patógeno (-Gi, +Gi).

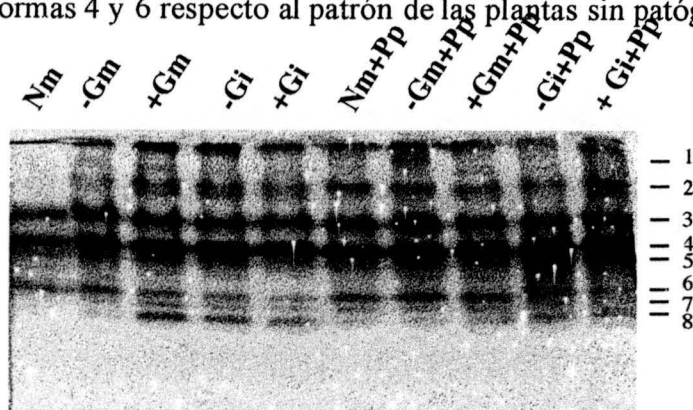


Figura 35. Patrón isoenzimático de las actividades peroxidasa en los extractos correspondientes al modelo experimental compartimentado. Leyendas como en Figura 8. Las isoformas principales se numeran del 1 al 8.

2.5 Actividad antifúngica

Se realizaron ensayos para comprobar la capacidad de los distintos extractos proteicos para inhibir el crecimiento del hongo patógeno, como se indica en el apartado 4.5.1 de la sección de Material y Métodos. No se observaron halos de inhibición en el crecimiento de la colonia fúngica alrededor de las zonas de aplicación de las muestras a ninguna de las diluciones. Tampoco se detectaron efectos sobre su crecimiento de los enzimas comerciales quitinasa y β -1,3-glucanasa, purificados de *Streptococcus griseus* y *Helix pomatia* respectivamente.

Para comprobar la capacidad lítica de los extractos proteicos frente a las paredes celulares del micelio de *Phytophthora parasitica* se procedió a incorporar un extracto de éstas (apartado 4.5.2 de la Sección de Material y Métodos) en el gel de separación, obteniendo un gel translúcido. Tras la incubación del gel durante 24 horas a 37° y observando el gel a contraluz se detectó una banda con distintas dimensiones según el tratamiento. Los extractos de raíces no micorrizadas y no inoculadas con el patógeno (Nm), o los correspondientes a la parte no infectada de una planta inoculada con el patógeno (Nm-P) no presentaron indicios de esta señal, siendo ésta apenas perceptible en las raíces inoculadas (Nm+P). Sin embargo, considerando las plantas micorrizadas, la señal en los extractos de raíces micorrizadas (+Gm, +Gm+P, +Gi+P) es muy evidente, presentando la máxima intensidad para el caso de raíces colonizadas por *G. mosseae* y postinfectadas por el patógeno (+Gm+P). Cuando el patógeno fue inoculado en el compartimento sin micorriza de una planta colonizada por *G. moseae* (-Gm+P) se detecta señal de actividad, que sin llegar a la intensidad de las partes colonizadas (+Gm), fue mayor que la de las raíces no micorrizadas (Nm+P) en todos los ensayos. Sin embargo esta señal es apenas evidente en el caso de las raíces no micorrizadas de plantas colonizadas por *G. intraradices* (-Gi+P).

Los extractos también se sometieron a electroforesis según el sistema Reisfeld para detectar posibles actividades líticas de carácter básico sobre el micelio de *Phytophthora* mediante la posterior transferencia hacia otro gel conteniendo el extracto de pared como

sustrato durante 24 horas. No se observó señal alguna en ninguno de los extractos probados.

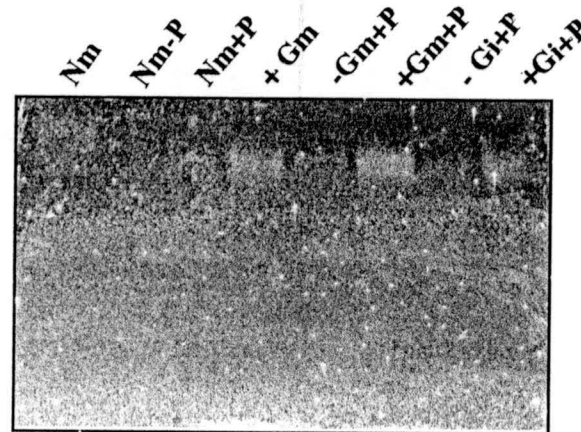


Figura 36. Actividad lítica frente a un extracto de pared celular del micelio de *Phytophthora*

3. DISCUSIÓN

La inoculación con los hongos de la micorriza *G. mosseae* y *G. intraradices* tuvo distintas repercusiones sobre el desarrollo de las plantas de tomate. Mientras que las plantas colonizadas por *G. mosseae* no manifestaron diferencias importantes en relación al peso con respecto a los controles no micorrizados, la inoculación con *G. intraradices* sí afectó tanto a la raíz como a la parte aérea de la planta. En estas plantas, mientras que el peso de la parte de raíz colonizada es ligeramente mayor, la parte no colonizada de su sistema radical y especialmente, su parte aérea, tuvieron un menor desarrollo que en las no micorrizadas o colonizadas por *G. mosseae*. Estas diferencias se ven reflejadas a nivel de la relación parte aérea / raíz, que fue más favorable en las plantas colonizadas por *G. mosseae* y fue mínima en el caso de la simbiosis con *G. intraradices*. La respuesta en crecimiento de la planta a la colonización por hongos MA depende del balance de los requerimientos de carbono para la producción y mantenimiento de la biomasa fúngica, o coste de la simbiosis, y de los beneficios de la interacción en cuanto a la mejora de la nutrición de la planta. Efectivamente algunos trabajos sobre modelos compartimentados han demostrado que una

mayor cantidad de carbono es traslocada al lado micorrizado del sistema radical (Koch y Johnson, 1984, Wang *et al.*, 1989). En los casos en que el coste neto de la simbiosis exceda los beneficios netos, la relación puede pasar del mutualismo a una situación de parasitismo (Smith y Smith, 1996; Johnson *et al.*, 1997). A este respecto numerosos trabajos demuestran falta de estimulación e incluso depresiones en el crecimiento de la planta en interacciones con *G. intraradices*, considerado un hongo muy agresivo, probablemente debido al elevado número de vesículas, de alto contenido lipídico, y de esporas intraradicales que desarrolla, por lo que actuaría como sumidero de carbono (Peng *et al.*, 1993).

En relación a la respuesta frente al ataque del patógeno, los datos de desarrollo de las plantas corroboran los resultados previamente descritos (capítulo 1 de la sección de Resultados) en cuanto a la protección por la formación de micorrizas con los hongos MA estudiados. La colonización por el hongo *G. intraradices* no tuvo efectos significativos sobre la repercusión de la enfermedad causada por el patógeno, independientemente de que la inoculación se lleve a cabo en la parte colonizada o no colonizada de su sistema radical. Sin embargo la enfermedad causada por *Phytophthora* alcanzó menor extensión en las plantas colonizadas por el hongo *G. mosseae*. La cantidad de patógeno y los síntomas de la enfermedad en cuanto a pérdida de peso y extensión de la necrosis fueron mínimos cuando el patógeno se inoculó en la parte del sistema radical colonizada por este hongo MA. Pero además, los daños también fueron menores de forma estadísticamente significativa cuando la inoculación con *Phytophthora* se llevó a cabo en la parte no colonizada del sistema radical de plantas en simbiosis con *G. mosseae*. **Se deduce por tanto que la bioprotección resulta de una combinación de mecanismos locales y sistémicos.** Estos resultados se han visto confirmados por el análisis de los sistemas radicales mediante microscopía electrónica de transmisión (Cordier *et al.*, 1998), que han demostrado la existencia de: i) efectos localizados, ya que las células corticales que contienen los arbusculos muestran resistencia asociada a la acumulación de compuestos fenólicos y el desarrollo de *apositiones-engrosamientos* en la pared celular reforzadas por callosa, y de ii) efectos sistémicos que se aprecian en las partes de la raíz no micorrizadas caracterizados por la formación de

engrosamientos en la pared celular del hospedador, en los que se detectan pectinas no esterificadas y acumulación de proteínas PR-1, además de la formación de papilas ricas en callosa, que previenen la proliferación de *Phytophthora* en las células de la raíz. Ninguna de estas reacciones se detectó en los sistemas radicales de plantas no micorrizadas ante el ataque del patógeno, en las que el desarrollo de la enfermedad lleva a la necrosis de las células del hospedador.

Algunos trabajos previos ya habían considerado la existencia de cierto efecto sistémico mediante ensayos compartimentados. Por ejemplo Rosendahl (1985) demostró que aunque la colonización por *G. fasciculatus* reducía significativamente la infección con *Aphanomyces eutiches* en plantas de guisante cuando los dos hongos estaban presentes en el mismo compartimento, y no cuando se inoculaban en partes separadas del sistema radical, la capacidad de esporulación del hongo sí se veía afectada negativamente en ambos casos. El autor propuso que la resistencia inducida frente a la infección por el patógeno era de naturaleza sistémica pero de alcance limitado, quizás mediada por señales de difícil difusión explicando así que no se manifestara en la mitad no inoculada del sistema radical. Postuló además la existencia de otro efecto sistémico, distinto al anterior, responsable de la reducción en la producción de oosporas por el patógeno, descartando que la causa fuera la mayor nivel de fósforo en planta.

A la luz de los resultados obtenidos con los análisis isoenzimáticos de los extractos proteicos de las muestras correspondientes se deduce que la inducción de las nuevas isoformas con actividad quitinasa, quitosanasas, β -1,3-glucanasa o SOD en las plantas micorrizadas, descrita en capítulos previos, tiene un carácter localizado ya que aparecen exclusivamente en la parte colonizada del sistema radical de las plantas micorrizadas, y no en las partes no colonizadas correspondiente a esas plantas. Otras propiedades, como la mayor capacidad de renaturalización de las actividades quitinasa tras desnaturalización bajo condiciones reductoras y la capacidad bifuncional de algunas isoformas quitinasa-quitosanasas son apreciables sólo en las muestras correspondientes a la parte colonizada.

Además de estos efectos localizados se observaron también cambios en las partes no micorrizadas de plantas micorrizadas, evidenciando la existencia de efectos sistémicos. Por ejemplo, a estadios más tardíos de la interacción triple planta -*G. intraradices*-*Phytophthora* se observa más actividad quitosanasa tras la infección por el patógeno en la parte no colonizada de plantas inoculadas con el hongo MA que en las plantas no micorrizadas. El análisis de de peroxidasas también reveló diferencias entre el patrón isoenzimático que presentan las plantas no micorrizadas y las partes colonizadas y no colonizadas de plantas micorrizadas, observandose también diferencias entre las plantas colonizadas por uno y otro hongo MA. Puesto que las peroxidasas pueden desempeñar distintas funciones en los complejos procesos que suceden a la entrada de un microorganismo en la planta, tanto a nivel de reconocimiento como de posible reacción defensiva, no es fácil especular con la función de las distintas isoformas sin más datos. Los cambios detectados sí revelan la sensibilidad del sistema isoenzimático de peroxidasa en la planta y el hecho de que estas actividades se ven afectadas, además de localmente, de forma sistémica en las plantas micorrizadas, y que el efecto es distinto según el hongo MA implicado.

Por otro lado, en la parte no colonizada del sistema radical de plantas micorrizadas se detectó tras el ataque del patógeno un mayor nivel de glucanasas ácidas en comparación con las raíces de plantas no micorrizadas. En principio no sería éste un factor clave en la protección, puesto que se observa también en plantas con *G. intraradices*, que no desarrollaron resistencia, pero sí reflejan en cualquier caso, -sean causa o efecto del nivel de síntomas- el efecto sistémico de las micorrizas sobre distintos aspectos del metabolismo y cierta regulación sistémica de las respuestas de defensa frente a la invasión por patógenos. Esta hipótesis se ve confirmada por la actividad lítica frente al micelio de *Phytophthora parasitica* demostrada directamente en el gel de electroforesis. La señal con máxima intensidad correspondió a las muestras de raíces colonizadas por *G. mosseae* e infectada posteriormente por el patógeno (+Gm+P), aunque también se detectó en muestras de raíces colonizadas por *G. mosseae* exclusivamente (+Gm). El aspecto más destacable es la presencia de halo de lisis en los extractos de la parte no micorrizada de la planta colonizada

por *G. mosseae* y postinfectada por el patógeno (-Gm+P), lo que constituye otra evidencia del efecto sistémico sobre la capacidad de defenderse del hongo invasor, ya que esa señal no se detectó en las plantas no micorrizadas atacadas por el patógeno (Nm+P). Para el caso de plantas colonizadas por *G. intraradices*, ambas partes de su sistema radical, colonizadas o no, reaccionaron frente al ataque de *Phytophthora* (+Gi+P, -Gi+P) detectándose cierta actividad, más fuerte en el caso en que los dos hongos están juntos (+Gi+P), pero en ambos casos mucho más débil que la mostrada por las partes equivalentes (+Gm+P, -Gm+P) de plantas colonizadas por *G. mosseae*.

Estos datos no pudieron ser corroborados a nivel de actividad inhibitoria del crecimiento del hongo ya que no se detectaron efectos sobre éste por la aplicación de los extractos proteicos ni de los enzimas purificados. Sin embargo no se puede descartar que este fenómeno ocurra *in vivo*, puesto que el sistema en placa tiene numerosas inconvenientes técnicos: la vida media de las distintas actividades enzimáticas en esas condiciones experimentales, la dosis de enzima aplicada, el no considerar la compartimentación celular o tisular de las distintas actividades *in vivo*, que podría ser fundamental para su función, la posible inhibición de éstas por otros componentes liberados en el extracto, la propia estructura del hongo, cuyo crecimiento, morfología y estructura probablemente sean distintos en su crecimiento vegetativo en medio rico respecto a su fase infectiva en el interior de la raíz. En el caso de los enzimas purificados, ya se ha descrito la no susceptibilidad de los oomicetos a quitinasas y β -1,3-glucanasas por separado o aplicados conjuntamente en ensayos de este tipo (Mauch *et al.*, 1988b). Puesto que se conoce que los enzimas relacionados con defensa suelen actuar de modo sinérgico podría ser que su acción requiera de la presencia de otras actividades para poder ejercer su acción lítica o acceder a su sitio de acción.

Recientemente Lambais y Mehdy (1998) pusieron de manifiesto la existencia de efectos localizados y sistémicos de la colonización micorrizica sobre la expresión de enzimas de defensa. Estos autores describen la acumulación de ARNm de quitinasas y β -1,3-glucanasas en las células que contienen arbusculos y en las adyacentes, pero también la

represión de la acumulación de ARNm para β -1,3-glucanasa a varios milímetros de la unidad de infección fúngica. Estas diferencias en los patrones locales o sistémicos de expresión génica para RNAs de enzimas de defensa podrían indicar la existencia de múltiples mecanismos de señales (Lambais y Mehdy, 1995). Otra evidencia de los efectos a distancia la aportan Fieschi y colaboradores (1992) al describir que el potencial transmembrana en las células no infectadas de las raíces micorrizadas está hiperpolarizado en comparación con las células de raíces no micorrizadas.

Previamente ya se habían descrito señales de larga distancia en raíces micorrizadas, por ejemplo se han demostrado alteraciones en los niveles de auxinas, citoquininas y ácido abscísico en las plantas micorrizadas (Allen *et al.*, 1980; 1982; Danneberg *et al.*, 1992). Las fitohormonas son consideradas posibles mediadores en los efectos sistémicos ya que pueden ser transportados a través del sistema vascular desde los sitios de infección a otras partes del sistema radical. En un trabajo reciente, Dugassa y colaboradores (1996) usando un modelo compartimentado para plantas de tomate, describen un efecto sistémico de la MA sobre los niveles hormonales, ya que las concentraciones de auxinas y giberlinas en la parte aérea de plantas micorrizadas aumentaron considerablemente. Puesto que ha sido descrita la relación entre alteraciones en el balance de fitohormonas y la modulación de la expresión de los genes implicados en reacciones de defensa en plantas (Mohnen *et al.*, 1985; Felix y Meins, 1986, 1987; Peña-Cortés *et al.*, 1990), es posible que estos elementos estén implicados en el control de la expresión de estos genes. Por otro lado, en el mismo sistema Dugassa y colaboradores mostraron un efecto localizado de la colonización del hongo sobre la tasa respiratoria celular de la raíz de tomate, que aumenta en más del 50%, y sobre la metilación del ADN del hospedador, que es menor en un 26%. Ambos fenómenos son indicios de una mayor actividad génica, que se ve confirmada en el presente trabajo con la mayor concentración de proteínas en los extractos y la existencia de nuevas isoformas de enzimas relacionados con procesos de defensa en la parte colonizada del sistema radical.

Volviendo a la expresión fenotípica de resistencia a nivel sistémico observada en las plantas de tomate colonizadas con *G. mosseae*, con el fin de determinar si se trata de un

fenómeno de Resistencia Sistémica Inducida, estos resultados se consideran y discuten a continuación según los criterios para la verificación de la existencia de SAR adaptados para la ISR por Van Loon y colaboradores en una revisión reciente (1998), diferenciándolas de otros mecanismos que pueden reducir la incidencia o severidad de las enfermedades.

1. Ausencia de efectos tóxicos del agente inductor sobre el patógeno. Este criterio descarta los efectos antagónicos directos de metabolitos del inductor sobre el patógeno. El uso de un modelo compartimentado que permita mantener separados el agente inductor, y el patógeno facilita la observación de este punto (aunque no se puede descartar sin embargo la existencia de algún metabolito tóxico directamente sobre el patógeno que sea difusible y transportado por la planta hasta el lugar donde está el patógeno, aunque esta posibilidad parece más aplicable para el caso de bacterias productoras de antibióticos y sustancias inhibitoras). La disminución en los daños causados por *Phytophthora* en las plantas de tomate colonizadas por *G. mosseae* cuando ambos hongos estén físicamente separados constituyen una evidencia en favor de esta característica de la ISR.

2. Necesidad de un intervalo de tiempo entre la aplicación del inductor y la aparición de la protección en la planta, ya que la planta necesita un tiempo para alcanzar el estado inducido. En el caso de la micorriza es ampliamente aceptado que la protección frente al ataque de patógenos requiere la colonización previa de la planta por el hongo MA, y que normalmente la inoculación conjunta no presenta resultados positivos, confirmado en el modelo tomate/*G. mosseae*/*P. parasitica* por Cordier (1997). En el caso de la simbiosis MA el periodo requerido es mayor que el necesario en interacciones con rizobacterias puesto que se requiere un tiempo para la colonización del sistema radical por el hongo MA y el establecimiento de la simbiosis.

3. Ausencia de la típica respuesta dosis-dependiente que caracteriza los compuestos tóxicos. La resistencia inducida por rizobacterias aparece normalmente cuando la planta ha sido inoculada con una dosis de bacterias que supera un umbral. A partir de éste un incremento en la dosis de bacterias inoculadas no conlleva un incremento de la resistencia. De modo similar, para que se ponga de manifiesto la protección inducida por la interacción

MA se requiere un buen nivel de colonización radical. En nuestro caso niveles de colonización de un 20% no tuvieron efectos sobre el desarrollo del patógeno en la parte de la raíz no colonizada. De igual modo Cordier, 1997, describe que niveles de colonización muy inferiores no confieren protección.

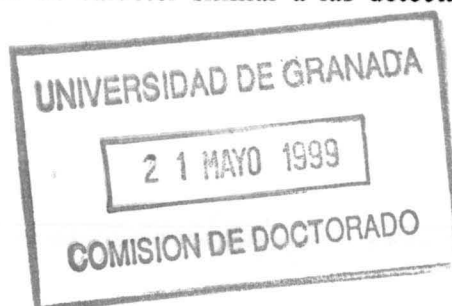
4. Ausencia de especificidad en la protección. La resistencia sistémica inducida (ISR), al igual que la adquirida (SAR) supone una mayor capacidad de la planta para defenderse de distintos hongos, bacterias, virus y, ocasionalmente, de insectos y nemátodos. Aunque en el presente trabajo de investigación sólo se han estudiado los efectos sobre el hongo *P. parasitica*, la protección conferida por hongos MA frente a enfermedades causadas por gran variedad de hongos, bacterias y nemátodos ha sido demostrada en numerosas ocasiones, como se describe en la Introducción de la presente Memoria. En el caso del tomate se ha demostrado la protección por la colonización con *G. mosseae* frente a las bacterias patógenas *Pseudomonas syringae* y *Erwinia carotovora pv. carotovora* García-Garrido y Ocampo (1988, 1989).

5. La protección puede ser localizada y sistémica. En nuestro modelo se ha observado la protección a ambos niveles, aunque como apunta Van Loon, es difícil verificar la existencia de resistencia inducida localizada por la posibilidad de que intervengan otros efectos directos sobre el patógeno.

6. Dependencia en el genotipo de la planta. Este criterio presupone diferencias significativas en el nivel y tipo de resistencia en distintos cultivares, puesto que la resistencia inducida constituye un aumento de la capacidad defensiva ya existente. Aunque en el presente trabajo no se han estudiado cultivares distintos, sí se ha discutido que la protección frente a patógenos resultante de la interacción MA depende de la planta y el hongo implicados según se deduce de los numerosos trabajos descritos en la literatura científica. Por ejemplo (Norman *et al.*, 1996) describe diferencias en cuanto a la protección por hongos MA frente a *Phytophthora fragariae* en distintos cultivares de fresa.

Por otro lado, el hecho de que *Glomus intraradices* no sea capaz de inducir ningún tipo de resistencia frente al patógeno parece un fenómeno similar al observado para rizobacterias, ya que sólo determinadas cepas son capaces de inducir ISR, dependiendo además de la planta hospedadora (Van Loon, 1998).

Desde el punto de vista bioquímico SAR e ISR presentan numerosas diferencias a pesar de ser fenotípicamente muy similares (Van Loon *et al.*, 1998). Mientras que la SAR requiere la acumulación de salicílico y es modulada por etileno y ácido jasmónico, la ISR parece no depender de salicílico, pero sí del etileno, puesto que su percepción parece un paso específico y fundamental en la transducción de señales para desencadenar ISR. Además, mientras que la SAR está asociada a la acumulación de PRs, parece demostrado que la ISR normalmente no va acompañada de la inducción de estas proteínas, aunque sí se observan ciertas alteraciones metabólicas de la planta que podrían estar relacionadas con la ISR (aumento de actividad peroxidasa, acumulación de fitoalexinas, aparición de forma aislada de ciertas proteínas de tipo PR) pero ninguno asociado de forma consistente con el estado de inducción en los distintos sistemas biológicos ensayados. Sí se han descrito de forma más general varios sistemas modificaciones estructurales (reforzamientos de la pared, acumulación de compuestos fenólicos, formación de papilas) frente a la entrada del patógeno en plantas que presentan ISR. La respuesta inducida en la planta por la simbiosis MA coincide con estas características definidas para la ISR inducida por rizobacterias: La acumulación de ácido salicílico durante la colonización es débil y transitoria en los primeros estadios (Blilou, 1998), por lo que no parece estar implicada en el estado inducido de defensa. Los cambios en los patrones isoenzimáticos de enzimas relacionados con defensa se dan fundamentalmente de forma localizada y concreta: no hay una acumulación masiva de éstas, pero sí hay evidencias de alteraciones en la actividad de ciertas isoformas a nivel sistémico. Por otro lado las modificaciones estructurales descritas a nivel citológico en nuestro sistema (Cordier *et al.*, 1998) son de caracter similar a las detectadas en plantas colonizadas por las rizobacterias.



Todos estas consideraciones nos permiten suponer que la colonización de las raíces de tomate por el hongo *G. mosseae* da lugar a Resistencia Sistémica Inducida similar a las inducidas por rizobacterias, efectiva frente al patógeno *P. parasitica*. La activación de ISR en tomate ya ha sido demostrada tras la inoculación con *Pseudomonas fluorescens* WCS417, *Pseudomonas fluorescens* 89B-27 y *Serratia marcescens* 90-166 (Duijff *et al.*, 1997; Raupach *et al.*, 1996). Un prometedor campo es el estudio de los efectos de la aplicación de micorrizas y PGPR en cuanto al nivel de resistencia inducida y el espectro de patógenos al que pueda afectar.

Discusión General

El establecimiento de la simbiosis micorriza arbuscular contribuye a la sanidad de los cultivos desde varios ángulos, por su conocido papel en la mejora de la nutrición mineral de la planta, la adaptación de ésta al medio y su potencialidad para conferir a la planta resistencia/tolerancia frente al ataque de patógenos. En la presente Memoria se muestra el efecto protector de esta simbiosis sobre el modelo tomate/ *P. parasitica*. La protección se vió confirmada en diferentes sustratos y bajo distintas condiciones experimentales en el contexto del proyecto de investigación en que se encuadra este trabajo. Mientras que las plantas no micorrizadas sufrieron drásticas reducciones de peso tanto en parte aérea como en raíz, las plantas colonizadas por *G. mosseae* no vieron afectado su crecimiento tras la inoculación con el patógeno; además, el desarrollo de la enfermedad fue considerablemente menor en estas plantas, según se deduce de la estimación de la extensión de las lesiones necróticas y síntomas en general, y del número de ápices necróticos en las raíces adventicias, muy inferiores en plantas micorrizadas (Berta *et al.*, 1998). Estos datos fueron confirmados mediante tinción vital con cloruro 2,3,5 trifeniltetrazolio TPTC (Cordier *et al.*, 1998). La reducción en los síntomas viene asociada a una reducción de la cantidad de patógeno presente en los tejidos radicales, como refleja la cuantificación de éste en los extractos proteicos mediante la técnica de ELISA (este trabajo), y en la cantidad de hifas intraradicales del patógeno detectadas por inmunocitoquímica (Cordier *et al.*, 1996).

Sin embargo este fenómeno no es universal. El grado de protección depende de la especie de hongo MA implicada, como se deduce de los resultados obtenidos para raíces colonizadas por *G. intraradices*, en las que no se apreció efecto positivo sobre el impacto del patógeno en nuestras condiciones experimentales. Cabe también destacar que la mera presencia del hongo MA en la rizosfera no es suficiente para observar los efectos beneficiosos sobre la interacción con el patógeno, sino que la protección requiere una simbiosis bien establecida (este trabajo y Cordier, 1997). Este hecho indica que, aunque se han descrito alteraciones en la microbiota de la rizosfera por la presencia del hongo MA, estos fenómenos por sí solos no son suficientes para que la protección se manifieste, lo que demuestra que aparte de posibles fenómenos de antagonismo o competencia a nivel del

suelo han de darse otros procesos ya en el interior de la raíz. En el mismo sentido, la adición en todos los casos de los microorganismos acompañantes del inóculo del hongo MA, aseguran que el efecto protector, así como los cambios detectados a nivel enzimático, están directamente relacionados con la simbiosis MA y no con otros microorganismos asociados.

El desarrollo de un modelo experimental compartimentado nos permitió considerar por separado las partes colonizadas y no colonizadas del sistema radical de plantas micorrizadas. De este modo se ha demostrado que la bioprotección resulta de una combinación de mecanismos locales y sistémicos, puesto que aunque la máxima reducción del desarrollo de la enfermedad se observó cuando el patógeno fue inoculado en el compartimento que contenía la micorriza, la inoculación de *Phytophthora* en el compartimento complementario resultó también en menor cantidad de daños que los obtenidos en plantas no micorrizadas (presente trabajo y Cordier *et al.*, 1998). Esta protección sistémica presenta las características descritas para la resistencia sistémica inducida por rizobacterias, la llamada Resistencia Sistémica Inducida (ISR) (ver capítulo 7).

Esta capacidad de la simbiosis MA para hacer frente a estreses bióticos mediante la inducción de resistencia hace que el uso de estos hongos MA para el control de agentes patógenos sea una alternativa muy prometedora frente a las medidas de control tradicionales, especialmente teniendo en cuenta que muchos de los fungicidas y fumigantes de suelos actualmente registrados y comercializados tienden a desaparecer del mercado por los altos riesgos toxicológicos y de contaminación ambiental que presentan, entre los que se encuentra el bromuro de metilo, uno de los fumigantes de suelo más extendidos y muy usado para el control de *Phytophthora* spp. Sin embargo, a pesar de las innumerables ventajas que presenta el uso de la simbiosis MA en este campo, el conocimiento sobre las bases funcionales de la simbiosis es mínimo, lo que impide su óptimo rendimiento y ha llevado en numerosas experiencias a la dilución o el enmascaramiento de posibles resultados positivos. Es imprescindible, especialmente en el campo de las interacciones con patógenos, la comprensión del diálogo fisiológico, metabólico y genético que durante todo el proceso de micorrización mantienen ambos simbiosistas, y que diferencia esta interacción de una de

caracter patogénico. Con este fin el uso de una combinación de sistemas planta-patógeno y planta-hongo MA nos permitió investigar algunos aspectos de los mecanismos por los que la planta puede detectar a cada uno de los dos tipos de hongo, mutualista y patógeno, y cómo la traducción de las señales podría llevar o no a la activación de los distintos procesos de defensa.

Se ha propuesto que los simbioses de plantas autótrofas podrían haber llegado durante la evolución a la utilización de algunos sistemas de la defensa del hospedador como elementos de reconocimiento (Koide y Schereiner, 1992). Entre los complejos mecanismos de defensa que se inducen de forma coordinada en las plantas en respuesta a la entrada de un microorganismo se encuentra la inducción de enzimas hidrolíticos. Estos enzimas podrían actuar a varios niveles en el caso de interacciones planta-hongo controlando directamente el desarrollo del hongo en la raíz, por sus propiedades antifúngicas, e interviniendo en el procesamiento de señales, ya que normalmente la actividad biológica de los elicitores depende del grado de polimerización, que generalmente ha de ser de 5 en adelante. Los enzimas hidrolíticos podrían actuar modulando la actividad biológica de estos oligómeros, bien al liberar fragmentos activos de polímeros grandes, bien al romperlos en fragmentos más pequeños, inactivos. La planta puede recurrir para ello a isoformas distintas, diferencialmente reguladas y con funciones probablemente complementarias, lo que justificaría la amplia batería de isoenzimas de que dispone. Así estas actividades tendrían un papel pivotante entre la defensa de la planta, la regulación de su desarrollo, y el control del establecimiento y/o funcionamiento de las interacciones simbióticas mediante la liberación, maduración o destrucción de las moléculas señal formadas por residuos oligosacáridicos normalmente implicados en estos procesos. La modulación de estos enzimas (inducción de nuevas isoformas, modificaciones de su especificidad de sustrato) durante la colonización de hongos MA podría ser clave en los procesos de reconocimiento y control del desarrollo del simbiote, y a la vez en su efecto sobre el ataque de otros organismos.

A pesar de esto la mayoría de trabajos sobre la inducción de enzimas de defensa en micorrizas arbusculares, y también algunos sobre la infección por patógenos basan el estudio en medidas de actividad total. Estas medidas pueden no reflejar todas las alteraciones de las actividades específicas de isoformas individuales, que pueden neutralizarse o diluirse en los valores globales de actividad. Por este motivo en el presente trabajo se optó por la detección de actividades enzimáticas asociadas a técnicas electroforéticas que permiten la separación isoenzimática, ya que su eficacia para este tipo de estudios parece demostrada por su gran sensibilidad (Grenier y Asselin, 1993) y por su carácter cuantitativo, establecido en ensayos que demuestran una correlación lineal entre la cantidad de enzimas purificadas cargadas en el gel y el área integrada de las bandas obtenidas (Pan *et al.*, 1989).

El análisis de las actividades enzimáticas objeto del presente estudio mediante estas técnicas reveló que el proceso de micorrización conlleva alteraciones en los patrones isoenzimáticos de las principales proteínas consideradas dentro de las llamadas PR. Estas alteraciones en general son específicas de la interacción simbiótica, y no reacciones inespecíficas a la entrada de un organismo extraño, puesto que aunque la infección por el patógeno indujo cambios en estas actividades, éstas fueron de distinta índole.

En los capítulos 2, 3 y 4 de la presente Memoria se describen los cambios a nivel de actividades líticas sobre quitina y quitosán, demostrando la inducción de nuevas isoformas durante la simbiosis MA y modificaciones en las propiedades de ciertas isoformas a nivel de especificidad de sustrato y estabilidad frente a la oxidación, y se discute su posible significado biológico. Entre estos cambios, que ocurren fundamentalmente a nivel local, la inducción de actividad quitinolítica de carácter ácido es hasta el momento el más universal puesto que se ha descrito en las distintas interacciones planta-hongo MA estudiadas (Dumas *et al.*, 1996). Teniendo en cuenta que estas isoformas sólo aparecen en las plantas capaces de establecer la simbiosis y no en mutantes *myc⁻* (Dumas-Gaudot *et al.*, 1994a), este fenómeno parece estar más implicado en los procesos de intercambio de señales entre ambos simbiosis que en reacciones de defensa frente al hongo. Podrían actuar liberando

oligómeros de quitina con una función análoga a los factores Nod en la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa, hecho que apoyaría la hipótesis de que los miembros de la familia Rhizobiaceae hayan “copiado” los mecanismos de reconocimiento de la simbiosis MA, aunque haciendo más sofisticado el sistema de señales al añadir sustituyentes al núcleo de quitina -muy inusual entre las bacterias Gram-negativas- hasta conseguir los complejos factores Nod (Van Rhjin *et al.*, 1997). La existencia de un sistema de percepción de oligómeros de quitina y derivados -entre ellos factores Nod- en las células de tomate (Staelin *et al.*, 1994) apoya esta hipótesis (capítulo 2). Algunos de los cambios puestos de manifiesto en los patrones polipeptídicos a nivel de membrana durante la simbiosis MA en tomate (Benabdellah *et al.*, 1998, 1999) podrían tener relación con éste fenómeno en cuanto a posibles inducciones o modificaciones de receptores específicos para las moléculas elicitoras en esta interacción.

El patrón isoenzimático de la actividad β -1,3-glucanasa de la raíz se vió también afectado durante las interacciones simbiótica y patogénica. La inducción de dos nuevas isoformas ácidas en raíces colonizadas por *G. mosseae* fue independiente de la presencia del patógeno, y los datos existentes sugieren su implicación en el control del desarrollo de *G. mosseae* dentro de la raíz (capítulo 5). Por otro lado, la inducción de dos isoformas básicas en la situación de biocontrol, -en plantas infectadas por *Phytophthora* pero previamente colonizadas por *G. mosseae*- podría tener un papel en la resistencia localizada de los tejidos colonizados frente al patógeno, cuya pared se compone fundamentalmente de β -1,3-glucanos. Esta hipótesis se ha visto apoyada recientemente por numerosos trabajos que demuestran que son las isoformas básicas de β -1,3-glucanasa las responsables de la actividad antifúngica de los extractos proteicos de ciertas plantas frente a distintas especies de *Phytophthora* (Anfoka y Buchenauer, 1997; Kim y Hwang, 1997; Yi y Hwang, 1997).

A pesar de que la función principal de la mayoría de las actividades hidrolíticas inducidas durante el establecimiento y desarrollo de la simbiosis sea probablemente el reconocimiento de ambos simbioses o el control de las fases posteriores de la colonización, estas isoformas podrían actuar sobre otro organismo entrante como efecto colateral. La

eficacia de este mecanismo no es improbable teniendo en cuenta los resultados positivos que se describen en la literatura en relación a la expresión en plantas transgénicas y en agentes de control biológico (Chernin *et al.*, 1995, Singh *et al.*, 1999) de enzimas hidrolíticas y su repercusión sobre posibles patógenos, e incluso a la efectividad de estas enzimas cuando se aplican exógenamente -valga como ejemplo la correlación directa encontrada entre la cantidad de quitinasa inyectada en judía y la digestión de los haustorios del patógeno y su posterior desarrollo en los tejidos (Toyoda *et al.*, 1991).

Además de las alteraciones de enzimas hidrolíticas, en el presente trabajo se muestran alteraciones en las actividades específicas de distintas isoformas de peroxidasa en estadios avanzados de la simbiosis, y otros autores han observado aumentos en esta actividad en estadios iniciales de la colonización. Además, incrementos transitorios de actividades catalasa y ascorbato peroxidasa detectados durante estos periodos parecen sugerir picos en los niveles de H_2O_2 con un papel regulador en el proceso de respuesta de la planta (Blilou, 1998). En conjunto, los indicios existentes apuntan a una respuesta defensiva de la planta a la colonización durante las primeras etapas, que sería seguidamente bloqueada al reconocer al hongo MA como simbionte mutualista. En este proceso de bloqueo podrían estar implicados algunos de los llamados genes simbióticos, considerados comunes para la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa. De hecho en plantas mutadas para uno de esos genes -*sym 30*-, con fenotipo *Myc⁻*, *Nod⁻* los intentos de colonización por el hongo MA dan lugar a una acumulación continua de salicílico (Blilou, 1998), y a respuestas defensivas típicas (Gollote *et al.*, 1993). Sin embargo estas plantas se comportaron igual que el fenotipo silvestre ante el ataque de bacterias y hongos patógenos (Blilou, 1998; Gianinazzi-Pearson *et al.*, 1994) y frente a inductores físicos (Morandi y Paynot, 1996), lo que sugiere que la respuesta de defensa es regulada de manera específica durante la interacción mutualista. Los productos de los genes simbióticos podrían ser receptores o activadores de receptores para moléculas señal del simbionte, que una vez reconocidas podrían llevar al control localizado de la respuesta defensiva en la célula colonizada.

En el proceso de regulación de la respuesta de la planta frente a los simbioses podrían estar implicadas las alteraciones en los niveles de fitohormonas descritas durante interacciones MA en distintas plantas, incluyendo el tomate (Allen *et al.*, 1980; 1982; Danneberg *et al.*, 1992, Dugassa *et al.*, 1996), y durante interacciones *Rhizobium*-leguminosa. En este último caso se ha propuesto que las alteraciones en el balance(s) hormonal(es) formen parte de los mecanismos de transducción de la señal tras la percepción de los factores Nod por la planta para llevar al desarrollo del nódulo (Hirsch *et al.*, 1997). De hecho un aumento en los niveles de citoquininas es capaz de inducir numerosos genes codificantes de nodulinas tempranas, incluso cuando la hormona es aportada exógenamente en plantas mutantes nod⁻. Estos genes son también inducidos durante la colonización por hongos MA, un indicio más de la conservación de señales y respuestas en los dos tipos de simbiosis (Van Rhjin *et al.*, 1997). Las fitohormonas además, son posibles mediadores en los efectos sistémicos, ya que pueden ser transportadas a través del sistema vascular desde los sitios de infección. Teniendo en cuenta este punto, y que alteraciones en sus niveles pueden modular la expresión de los genes implicados en reacciones de defensa (Mohnen *et al.*, 1985; Felix y Meins, 1986, 1987; Peña-Cortés *et al.*, 1990), es posible considerar que los cambios en la concentración de fitohormonas observados en plantas colonizadas por hongos MA resulte en diferencias en la regulación de los mecanismos de defensa entre las plantas micorrizadas y no micorrizadas, y que por ello las primeras tengan la capacidad de responder a un ataque por agentes patógenos de una manera distinta.

El efecto final de la simbiosis MA en cuanto al control de patógenos resultaría de la conjunción de mecanismos de la más diversa índole, actuando a varios niveles sobre diversos estadios del desarrollo del patógeno y la enfermedad. Muchos de los mecanismos propuestos en los últimos años (sintetizados en el apartado 4.1 de la Introducción de esta Memoria) se han puesto de manifiesto sobre el patosistema tomate / *P. parasitica* durante los trabajos desarrollados en el marco del proyecto multidisciplinar al que se adscribe el presente trabajo. A continuación se describen brevemente los mecanismos que parecen intervenir en la protección de las plantas de tomate frente a *P. parasitica* por el hongo *G. mosseae*.

En primer lugar se dan fenómenos de antagonismo en la micorrizosfera, que podrían reducir el potencial infectivo del patógeno en el suelo al interferir con su ciclo de vida, como apunta el hecho de que la germinación de zoosporas de *Phytophthora* se reduce drásticamente en presencia de esporas pregerminadas de *G. mosseae*, y que existen varios microorganismos capaces de inhibir el crecimiento *in vitro* del micelio de *Phytophthora* en los esporocarpos y micelio de éste hongo MA (Giovanetti *et al.*, 1998). Por otro lado los cambios en el pH rizosférico a consecuencia de la alteración de los exudados radicales durante la simbiosis podrían afectar la atracción de *Phytophthora*, normalmente por electrotaxis, hacia las raíces (Hooker *et al.*, 1998). Además la alteración de la arquitectura del sistema radical que se da generalmente en plantas micorrizadas -en este caso un mayor índice de ramificación- podría tener una repercusión indirecta en la resistencia al patógeno (Hooker *et al.*, Berta *et al.*, 1998).

En una segunda etapa, una vez dentro del sistema radical, el patógeno podría encontrarse con otra dificultad ya que las plantas micorrizadas presentan más capas celulares en el cortex, y puesto que el patógeno no entra en las células que contienen arbusculos (Cordier *et al.*, 1996) tendría más dificultades para alcanzar el cilindro central. Además de posibles efectos de competencia por nichos y nutrientes, los enzimas relacionados con la defensa cuya inducción se muestra en el presente trabajo, probablemente finamente regulados para el control del hongo simbiótico, podrían actuar sobre el patógeno bien directamente lisando su pared, bien liberando de éste elicitores, que al no ser reconocidos como pertenecientes al simbiote, podrían ser detectados por los receptores implicados en los procesos normales de patogénesis, desencadenando la cascada de mecanismos de defensa en la planta. En el caso de que este reconocimiento se de también en las plantas no micorrizadas, porque otras enzimas actúen liberando los elicitores, el fenómeno en las plantas micorrizadas podría suponer: i) una amplificación de la señal -mayor actividad enzimática, más señal, más respuesta), ii) posibles alteraciones en la distribución espacial de ésta respuesta, por modificar/ampliar las zonas donde se liberaban los elicitores iii) que el proceso de reconocimiento del patógeno y la consiguiente respuesta sea más rápida, puesto que parte de los enzimas están ya presentes en la célula. Los tres

Los tres aspectos (amplificación de la señal, cambios en la distribución y mayor rapidez en la respuesta) son aspectos fundamentales para una defensa efectiva frente a un patógeno, como se ha demostrado en numerosos trabajos comparativos entre cultivares sensibles y resistentes a determinados patógenos. Este podría ser el tercer nivel de actuación, por una hipersensibilización de la planta, que se manifestaría de modo sistémico como una reacción de **Resistencia Inducida**.

Otros aspectos podrían contribuir indirectamente a la mejor salud de las plantas micorrizadas tras el desarrollo del patógeno, como la menor senescencia nuclear, la reducción en la pérdida de ADN y de la condensación de la cromatina. Además se ha demostrado que la presencia del hongo MA afecta la regulación del ciclo celular, favoreciendo la endoreplicación en la célula que ocasiona un aumento en la población de núcleos 8C. Esta mayor endoreplicación podría llevar a una mayor transcripción de genes implicados en la defensa (Berta *et al.*, 1998-AIR). De hecho, uno de los genes cuya expresión se estimula durante la interacción simbiótica con *G. mosseae*, presenta alta similitud con uno de los genes implicados en el control celular. El gen se expresa fundamentalmente en las células corticales colonizadas por el hongo MA, que muestran una alta actividad metabólica pero paradójicamente no entran en división celular. Puesto que la división celular del hospedador es un proceso fisiológico esencial por el que los patógenos fúngicos invaden extensivamente los tejidos del hospedador y se extienden por él, este fenómeno podría contribuir a la bioprotección (Tahiri- Aloui *et al.*, 1998).

En resumen, son muchos los factores y mecanismos que pueden intervenir en una protección efectiva frente a patógenos por la simbiosis MA. Aunque algunos de ellos comienzan a desvelarse, quedan aún muchos puntos por conocer para llegar a entender el fenómeno en toda su amplitud. Las técnicas de biología molecular e hibridación *in situ* contribuyen a este proceso al intentar dilucidar la cascada de eventos que ocurren tras la infección y la secuencia temporal de la expresión de los genes de defensa y la localización espacial de los productos de estos genes. El reciente aislamiento de un mutante de tomate con una capacidad muy reducida para la colonización MA (Barker *et al.*, 1998) aparece

como una herramienta muy útil para profundizar en los mecanismos por los que la planta acepta o rechaza la simbiosis. El conocimiento de los mecanismos que regulan la simbiosis y de los que intervienen en la fitoprotección permitirá favorecer las condiciones óptimas para ésta. Por otro lado parece necesario realizar estudios comparativos entre distintos patosistemas para comprobar si los mecanismos son universales o específicos de cada interacción, así como considerar la posibilidad de aplicar conjuntamente micorrizas y otros agentes de control biológico para conseguir un aprovechamiento máximo de los recursos de defensa que presenta la planta de forma natural.

Conclusiones

1. La colonización del sistema radical de *plantas* de tomate por el hongo formador de micorrizas *Glomus mosseae* dió lugar a una disminución de los daños causados por el patógeno *Phytophthora parasitica*.

2. El nivel de protección frente al hongo patógeno varía con el hongo micorrícico. En nuestro sistema el hongo *Glomus intraradices* no ejerció este efecto sobre la planta.

3. La formación de micorrizas arbusculares afecta a determinadas actividades hidrolíticas de la planta mediante la inducción de nuevas isoformas de carácter ácido con actividad quitinasa, quitosanasa y β -1,3-glucanasa. Esta inducción es una respuesta específica a la simbiosis micorrícica y no forma parte de reacciones de defensa inespecíficas.

4. En las plantas previamente colonizadas por *Glomus moseae* tras la infección por *Phytophthora parasitica* se detectaron dos nuevas isoformas de β -1,3-glucanasa de carácter básico que podrían estar implicadas en bioprotección.

5. Ciertas isoformas con actividad quitinasa sufren en las plantas micorrizadas modificaciones que alteran sus propiedades en el sentido de:

-Adquirir una mayor capacidad para recuperar la actividad en condiciones oxidantes.

- Cambiar la especificidad de sustrato. Algunas quitinasas en plantas micorrizadas son capaces de degradar quitosán.

6. La actividad de las isoformas constitutivas de los enzimas hidrolíticos estudiados tiende a aumentar con el tiempo, mientras que la de las formas específicas de la micorriza parece disminuir.

7. Durante la simbiosis se producen también cambios en los enzimas relacionados con el metabolismo de formas reactivas de oxígeno. Aparece una nueva isoforma de superóxido dismutasa del tipo Mn-SOD, y se afecta diferencialmente la actividad de distintas isoformas de peroxidasa.

8. La bioprotección ejercida por la simbiosis micorríca es el resultado de la combinación de efectos localizados y sistémicos. Los enzimas hidrolíticos pueden intervenir en los procesos que tienen lugar a nivel localizado, pero, en general, no parecen responsables directos de la mayor resistencia a nivel sistémico.

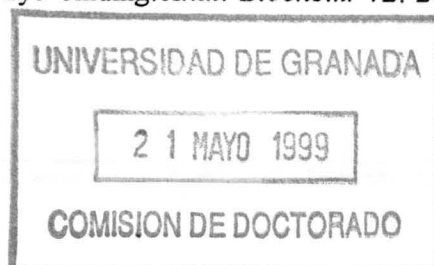
9. La protección a nivel sistémico debida a las micorrizas se ajusta a la definición de Resistencia Sistémica Inducida.

Bibliografía

- Able, A. J., Guest, D. I. y Sutherland, M. W. 1998. Use of a new tetrazolium-based assay to study the production of superoxide radicals by tobacco cell cultures challenged with avirulent zoospores of *Phytophthora parasitica* var *nicotianae*. *Plant Physiol.* 117: 491-499.
- Agrios, G. N. 1989. Fitopatología. Ed. Limusa, México DF.
- Ahl Goy, P., Felix, G., Métraux, J. P. y Meins, F. 1992. Resistance to disease in the hybrid *Nicotiana glutinosa* x *Nicotiana debneyi* is associated with high constitutive levels of β -1,3-glucanase, chitinase, peroxidase and polyphenoloxidase. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 41: 11-21.
- Albrecht, C., Asselin, A., Piché, Y. y Lapeyrie, F. 1993. Comparison of *Eucalyptus* root chitinase patterns following inoculation by ectomycorrhizal or pathogenic fungi *in vitro*. En: *Mechanisms of Plant Defence Responses, Developments in Plant Pathology*. vol 2. (B. Fritig y M. Legrand, Eds.) Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands. pp. 380-página final.
- Albrecht, C., Asselin, A., Piche, Y. y Lapeyrie, F. 1994a. Chitinase activities are induced in *Eucalyptus globulus* roots by ectomycorrhizal or pathogenic fungi during early colonization. *Physiol Plant.* 91: 104-110.
- Albrecht, C., Burgess, T., Dell, B. y Lapeyrie, F. 1994b. Chitinase and peroxidase activities are induced in eucalyptus roots according to aggressiveness of Australian ectomycorrhizal strains of *Pisolithus* sp. *New Phytol.* 127: 217-222.
- Allen, M. F. 1996. The ecology of arbuscular mycorrhizas: a look back into the 20th century and a peek into the 21st. *Mycological Research* 100: 769-782.
- Anfoka, G. y Buchenauer, H. 1997. Systemic acquired resistance in tomato against *Phytophthora infestans* by pre-inoculation with tobacco necrosis virus. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 50: 85-101.
- Araki, B. y Ito, E. 1975. A pathway of chitosan formation in *Mucor rouxii*. Enzymatic deacetylation of chitin. *Eur. J. Biochem.* 55: 71-78.
- Arines, J., Palma, J. M. y Vilariño, A. 1993. Comparison of protein patterns in non-mycorrhizal and vesicular-arbuscular mycorrhizal roots of red clover. *New Phytol.* 123: 763-768.
- Arines, J., Quintela, M., Vilariño, A. y Palma, J. M. 1994a. Protein patterns and superoxide dismutase activity in non-mycorrhizal and arbuscular mycorrhizal *Pisum sativum* L. plants. *Plant Soil* 166: 37-45.
- Arines, J., Vilariño, A. y Palma, J. M. 1994b. Involvement of the superoxide dismutase enzyme in the mycorrhization process. *Agric. Sci. Finn.* 3: 303-306.
- Arlorio, M., Ludwig, A., Boller, T., Mischiati, P. y Bonfante, P. 1992. Effects of chitinase and β -1,3-glucanase from pea on the growth of saprophytic, pathogenic and mycorrhizal fungi. *Giorn. Bot. Ital.* 126: 956-958.
- Ashfield, T., Hammond-kosack, K. E., Harison, K. y Jones, J. D. G. 1994. Cf gene-dependent induction of a β -1,3-glucanase promoter in tomato plants infected with *Cladosporium fulvum*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 7: 645-657.
- Asiegbu, F. O., Lonneborg, A. y Johansson, M. 1996. Chitin and glucans detected in the cell walls of *Pythium dimorphum*- An oomycetous fungus. *Eur. J. Forest. Pathol.* 26: 315-321.

- Audy, P., Trudel, J. y Asselin, A. 1988. Purification and characterization of a lyozyme from wheat germ. *Plant Sci.* 58: 43-50.
- Azcón, R., Gomez, M., y Tobar, R. 1992. Effects of nitrogen-source on growth, nutrition, photosynthetic rate and nitrogen metabolism of mycorrhizal and phosphorus-fertilized plants of *Lactuca sativa* L. *New Phytol.* 121: 227-234.
- Azcón-Aguilar, C. y Bago, B. 1994. Physiological characteristics of the host plant promoting an undisturbed functioning of the mycorrhizal symbiosis. En: *Impact of Arbuscular Mycorrhizas on Sustainable Agriculture and Natural Ecosystems.* (S. Gianinazzi y H. Shüepf, Eds.) Birkhauser-Verlag, Basel. pp. 47-60.
- Azcón-Aguilar, C. y Barea, J. M. 1996. Arbuscular mycorrhizas and biological control of soil-borne plant pathogens - An overview of the mechanisms involved. *Mycorrhiza.* 6: 457-464.
- Azcón-Aguilar, C. y Barea, J.M. 1997. Applying mycorrhiza biotechnology to horticulture: Significance and potentials. *Sci. Horticult.* 68: 1-4.
- Bääth, E. y Hayman, D. S. 1984. No effect of vesicular arbuscular mycorrhiza on red core disease of strawberry. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 82: 534-536.
- Balestrini, R., Josã-Estanyol, M., Puigdomãnech, P., Bonfante, P. 1997. Hydroxyproline-rich glycoprotein mRNA accumulation in maize root cells colonized by an arbuscular mycorrhizal fungus as revealed by in situ hybridization. *Protoplasma* 198: 36-42.
- Bansal, M. y Mukerji, K. G. 1994. Positive correlation between VAM-induced changes in root exudation and mycorrhizosphere mycoflora. *Mycorrhiza.* 5: 39-44.
- Barea, J. M. 1986. Importance of hormones and root exudates in mycorrhizal phenomena. En: *Mycorrhizae: Physiology and Genetics* (V. Gianinazzi-Pearson y S. Gianinazzi, Eds.) INRA, Paris. pp. 177-187.
- Barea, J. M., Azcón-Aguilar, C., Ocampo, J. A. y Azcón, R. 1991. Morfología, anatomía y citología de las micorrizas vesículo-arbusculares. En: *Fijación y Movilización Biológica de Nutrientes.* vol. II. Fijación de N y Micorrizas. (J. Olivares y J. M. Barea, Eds.) CSIC, Madrid. pp.149-173.
- Barea, J. M., Jeffries, P. 1995. Arbuscular mycorrhizas in sustainable soil plant systems. En: *Mycorrhiza Structure, Function, Molecular Biology and Biotechnology.* (B. Hock, A. Varma, Eds.) Heidelberg, Springer, 521-559.
- Barea, J. M. y Olivares, J. 1998. Manejo de las propiedades biológicas del suelo. En: *Agricultura Sostenible* (R. M. Jiménez Díaz y J. Lamo de Espinosa, Eds.) Mundi-Prensa, Madrid. pp. 173-193.
- Barker, S. J., Tagu, D. y Delp, G. 1998. Regulation of root and fungal morphogenesis in mycorrhizal symbioses. *Plant Physiol.* 116: 1201-1207.
- Bartinicki-García, A. 1968. Cell wall chemistry, morphogenesis, and taxonomy of fungi. *Annu. Rev. Microbiol.* 22: 87-108.

- Bartnicki-Garcia, S. y Wang, M. C. 1983. Biochemical aspects of morphogenesis in *Phytophthora*. En: *Phytophthora. Its Biology, Taxonomy, Ecology and Pathology*. (D. C. Erwin, S. Bartnicki-Garcia, P. H. Tsao, Eds.) APS press, St Paul, USA. pp. 121-137.
- Bärtschi, H., Gianinazzi-Pearson, V. y Vegh, I. 1981. Vesicular-Arbuscular mycorrhizal formation and root rot disease (*Phytophthora cinnamomi*) development in *Chamaecyparis lawsoniana*. *Phytopathol. Z.* 102: 213-218.
- Beauchamp, C.O. y Fridovich, I. 1971. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal. Biochem.* 44: 276-287.
- Bécard G., Béguiristain T., Nagahashi G., 1997. Signaling in plants and root-infecting fungi associations. En: *Radical Biology: Advances and Perspectives on the Function of Plant Roots* (H. E. Flores, J. P. Lynch y D. Eissenstat, Eds.) American Society of Plant Physiologists. pp. 164-177.
- Benabdellah, K., Azcón-Aguilar, C. y Ferrol, N. 1998. Soluble and membrane symbiosis-related polypeptides associated with the development of arbuscular mycorrhizas in tomato (*Lycopersicon esculentum*). *New Phytol.* 140: 135-143.
- Benhamou, N., Grenier, J., Asselin, A. y Legrand, M. 1989. Immunogold localization of β -1,3-glucanases in two plants Infected by vascular wilt fungi. *Plant Cell.* 1: 1209-1221.
- Benhamou, N., Joosten, M. H. A. J, y de Wit, P. J. G. M. 1990. Subcellular localization of chitinase and of its potential substrate in tomato root tissues infected by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. *Plant Physiol.* 92: 1108-1120.
- Benhamou, N. y Theriault, G. 1992. Treatment with chitosan enhances resistance of tomato plants to the crown and root pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 41: 33-52.
- Benhamou, N., Lafontaine, P. J. y Nicole, M. 1994. Induction of systemic resistance to *Fusarium* Crown and root rot in tomato plants by seed treatment with chitosan. *Phytopathol.* 84: 1432-1444.
- Blee, K. A. y Anderson, A. J. 1996. Defense-related transcript accumulation in *Phaseolus vulgaris* L colonized by the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* Schenck and Smith. *Plant Physiol.* 110: 675-688.
- Blee, K. A. y Anderson, A. J. 1998. Regulation of arbuscule formation by carbon in the plant. *Plant J.* 16: 523-530.
- Bol, J. F., Buchel, A. S., Knoester, M., Baladin, T., Vanloon, L. C. y Linthorst, H. J. M. 1996. Regulation of the expression of plant defence genes. *Plant Growth Regulation.* 18: 87-91.
- Boller, T. 1993. Antimicrobial functions of the plant hydrolases, chitinase and β -1,3-glucanase. En: *Mechanisms of Plant Defense Responses*. (B. Fritig, M. Legrand, Eds.) Kluwer Academic Publishers. Netherlands, pp. 391-400.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.



- Brent, K. J.** 1987. Fungicide resistance in crops- its practical significance and management. En: *Rational Pesticide Use, Proceedings of the Ninth Long Ashton Symposium*. (K. J. Brent. y R. K. Atkin, Eds.) Cambridge University Press, Cambridge, U.K. pp. 137-151.
- Broglie, K., Chet, I., Holliday, M., Cressman, R., Biddle, P., Knowlton, S., Mauvais, C. J. y Broglie, K.** 1991. Transgenic plants with enhanced resistance to the fungal pathogen *Rhizoctonia solani*. *Science*. 254: 1194-1197.
- Bruyere, T., Unger, C. y Moesinger, E.** 1996. Chitin synthase in phytopathogenic fungi. En: *Chitin Enzymology*. vol. 2. (R.A.A. Muzzarelli Ed.) Atec Edizioni, Italy. pp. 477-479.
- Buchenaer, H.** 1998. Biological control of soil-borne diseases by rhizobacteria. *J. Plant Diseases Protection*. 105: 329-348.
- Buol, S. W.** 1995. Sustainability of soil use. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 26: 25-44.
- Cabello, F, Jorrin, J. V. y Tena, M.** 1994. Chitinase and β -1,3-glucanase activities in chickpea (*Cicer arietinum*). Induction of different isoenzymes in response to wounding and ethephon. *Physiol. Plant.* 92: 654-660.
- Cabib, E. y Bowers, B.** 1971. Chitin and yeast budding. *J. Biol. Chem.* 246: 152-159.
- Cabib, E., Silverman, S. J. y Shaw, J. A.** 1992. Chitinase and chitinase synthase 1: counterbalancing activities in cell separation of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.* 138: 97-102.
- Caron, M., Fortin, J. A. y Richard, C.** 1986. Effect of *Glomus intraradices* on infection by *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici* in tomatoes over a 12-week period. *Can. J. Bot.* 64: 552-556.
- Cartwright, D. K. y Spurr, H. W.** 1998. Biological control of *Phytophthora parasitica* var. *Nicotianae* on tobacco seedlings with non-pathogenic binucleate *Rhizoctonia* fungi. *Soil Biol. Biochem.* 30: 1879-1884.
- Caron, M., Richard, C., Fortin, J. A.** 1986. Effect of preinfestation of the soil by a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus, *Glomus intraradices*, on *Fusarium crown* and root rot of tomato. *Phytoprotection* 67: 15-19.
- Citernesi, A. S., Fortuna, P., Filippi, C., Bagnoli, G. y Giovanetti, M.** 1996. The occurrence of antagonistic bacteria in *Glomus mosseae* pot cultures. *Agronomie*. 16: 671-677.
- Cohen, Y., Niderman, T., Mösinger, E. y Fluhr, R.** 1994. β -Aminobutyric acid induces the accumulation of pathogenesis-related proteins in tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) plants and resistance to late blight infection caused by *Phytophthora infestans*. *Plant Physiol.* 104: 59-66.
- Collinge, D. B., Kragh, K. M., Mikkelsen, J. D., Nielsen, K. K., Rasmussen, U. y Vad, K.** 1993. Plant chitinases. *Plant J.* 3: 31-40.
- Cook, J., Thomashow, L. S., Weller, D. M., Fujimoto, D., Mazzola, M., Bangera, G. y Kim, D. S.** 1995. Molecular mechanisms of defense by rhizobacteria against root disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92: 4197-4201.

- Cook, R. J., Bruckart, W. L., Coulson, J. R., Goettel, M. S., Humber, R. A., Lumsden, R., Maddos, J. V., McManus, M. L., Moore, L., Meyer, S., Quimby, P. C., Stack, J. P. y Vaughn, J. L. 1996. Safety of microorganisms intended for pest and plant disease control: A framework for scientific evaluation. *Biol. control*. 7: 333-351.
- Cooper, K. M. 1984. Physiology of VA mycorrhizal associations. En: *VA Mycorrhiza*. (Cll Powell y D.J. Bagyaraj; Eds) CRC Press, Boca Raton, Florida. pp. 155-203.
- Cordero, M. J., Raventos, D. y San Segundo, B. 1994. Differential expression and induction of chitinases and β -1,3-glucanases in response to fungal infection during germination of maize seeds. *Mol. Plant-Microbe Interact*. 7: 23-31.
- Cordier, C., Gianinazzi, S. y Gianinazzi-Pearson, V. 1996. Colonisation patterns of root tissues by *Phytophthora nicotianae* var *parasitica* related to reduced disease in mycorrhizal tomato. *Plant Soil*. 185: 223-232.
- Cordier, C., Pozo, M. J., Barea, J. M., Gianinazzi, S. y Gianinazzi-Pearson, V. 1998. Cell defense responses associated with localized and systemic resistance to *Phytophthora* induced in tomato by an arbuscular mycorrhizal fungus. *Mol. Plant-Microbe Interact*. 11: 1017-1028.
- Coscollá, R. 1998. Residuos de productos fitosanitarios y su control. En: *Agricultura Sostenible*. (R. M. Jiménez-Díaz y J. Lamo de Espinosa, Eds.) Mundi-Prensa, Madrid. pp. 377-397.
- Côté, F., Cutt, J. R., Asselin, A. y Klessig, D. F. 1991. Pathogenesis-related acidic β -1,3-glucanase genes of tobacco are regulated by both stress and developmental signals. *Mol. Plant-Microbe Interact*. 4: 173-181.
- Cotte, F., Letarte, J., Grenier, J., Trudel, J. y Asselin, A. 1989. Detection of β -1,3-glucanase activity after native polyacrylamide gel electrophoresis: Application to tobacco pathogenesis-related proteins. *Electrophoresis*. 10: 527-529.
- Crush, Y. R. y Hay, M. J. M. 1981. A technique for growing mycorrhizal clover in solution culture. *New Zealand J. Agric. Resch*. 24: 371-372.
- Dassi, B., Dumas-Gaudot, E., Asselin, A., Richard, C. y Gianinazzi, S. 1996. Chitinase and β -1,3-glucanase isoforms expressed in pea roots inoculated with arbuscular mycorrhizal or pathogenic fungi. *Eur. J Plant Pathol*. 102: 105-108.
- Dassi, B., Martin-Laurent, F.A., Gollotte, A., Dumas-Gaudot, E., Gianinazzi-Pearson y V. Gianinazzi, S. 1996. Expression of a PR-1a protein-related gene in pea roots (*Pisum sativum*) after pathogenic (*Chalara elegans*) or symbiotic (*Glomus mosseae*) infection and chemical induction. En: *Mycorrhizas in Integrated Systems: from Genes to Plant Development*. (Azcón-Aguilar C., Barea J.M., Azcón R. & Ocampo J.A., eds), COST, Academic Publishers, Dordrecht, 222-225.
- Dassi, B., Samra, A., DumasGaudot, E. y Gianinazzi, S. 1999. Different polypeptide profiles from tomato roots following interactions with arbuscular mycorrhizal (*Glomus mosseae*) or pathogenic (*Phytophthora parasitica*) fungi. *Symbiosis* 26: 65-77.

- Datnoff, L. E., Nemec, S. y Pernezny, K. 1995.** Biological control of *Fusarium* crown and root rot of tomato in Florida using *Trichoderma harzanium* and *Glomus intraradices*. *Biological Control*. 5: 427-431.
- Davidse, L. C. 1981.** Mechanism of action of metalaxyl in *Phytophthora megasperma* f. sp. medicaginis. *Neth. J. Plant Pathol.* 87: 254-255.
- Davis, B. J. 1964.** Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins. *Ann. New York Acad. Sci.* 121: 404-427.
- Davis, R. M., Menge, J. A. y Zentmyer, G. A. 1978.** Influence of vesicular-arbuscular mycorrhizae on *Phytophthora* root rot of three crop plants. *Phytopathol.* 68: 1614-1617.
- Davis, R. M. y Menge, J. A. 1980.** Influence of *Glomus fasciculatus* and soil phosphorus on *Phytophthora* root rot of citrus. *Phytopathology*. 70: 447-452.
- Davis, R. M. 1989.** Effectiveness of flocetil-Al against *Phytophthora parasitica* on tomato. *Plant Dis.* 73: 215-217.
- Dehne, H. W. 1982.** Interaction between vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi and plant pathogens. *Phytopathol.* 72: 1115-1119.
- Díaz, G., Azcón-Aguilar C. y Honrubia M. 1996.** Influence of arbuscular mycorrhizae on heavy metal (Zn and Pb) uptake and growth of *Lygeum spartum* and *Anthyllis cytisoides*. *Plant Soil*. 180: 241-249.
- Doares, S. H., Syrovets, T., Weiler, E. W. y Ryan, C. A. 1995.** Oligogalacturonides and chitosan activate plant defensive genes through the octadecanoid pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 92: 4095-4098.
- Doke, N. 1983a.** Generation of superoxide anion by potato tuber protoplasts during the hypersensitive response to hyphal wall components of *Phytophthora infestans* and specific inhibition of the reaction by suppressors of hypersensitivity. *Physiol. Plant Pathol.* 23: 359-367.
- Doke, N. 1983b.** Involvement of superoxide anion generation in the hypersensitive response of potato tuber tissues to infection with an incompatible race of *Phytophthora infestans* and to the hyphal wall components. *Physiol. Plant Pathol.* 23: 345-357.
- Doke, N., Miura, Y., Sánchez, L. M., Park, H. J., Toritake, T., Yoshioka, H. y Kawakita, K. 1996.** The oxidative burst protects plants against pathogen attack: Mechanism and role as an emergency signal for plant bio-defense. *Gene*. 179: 45-51.
- Domingo, C., Conejero, V. y Vera, P. 1994.** Genes encoding acidic and basic class III β -1,3-glucanases are expressed in tomato plants upon viroid infection. *Plant Mol. Biol.* 24: 725-732.
- Dugassa, G. D., von Alten, H. y Schonbeck, F. 1996.** Effects of arbuscular mycorrhiza (AM) on health of *Linum usitatissimum* L infected by fungal pathogens. *Plant Soil*. 185: 173-182.
- Duijff, B.J., Gianinazzi-Pearson, V. y Lemanceau, P. 1997.** Involvement of the outer membrane lipopolysaccharides in the endophytic colonization of tomato roots by biocontrol *Pseudomonas fluorescens* strain WCS417r. *New Phytol.* 135: 325-334.

- Dumas, E., Gianinazzi-Pearson, V. y Gianinazzi, S. 1989. Production of new soluble proteins during VA endomycorrhiza formation. *Agric. Ecosys. Environ.* 29: 111-114.
- Dumas-Gaudot, E., Furlan, V., Grenier, J. y Asselin, A. 1992a. New acidic chitinase isoforms induced in tobacco roots by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycorrhiza*. 1: 133-136.
- Dumas-Gaudot, E., Grenier, J., Furlan, V. y Asselin, A. 1992b. Chitinase, chitosanase and β -1,3-glucanase activities in *Allium* and *Pisum* roots colonized by *Glomus* species. *Plant Sci.* 84: 17-24.
- Dumas-Gaudot, E., Asselin, A., Gianinazzi-Pearson, V., Gollotte, A. y Gianinazzi, S. 1994. Chitinase isoforms in roots of various pea genotypes infected with arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Sci.* 99: 27-37.
- Dumas-Gaudot, E., Guillaume, P., Tahiri-Alaoui, A., Gianinazzi-Pearson, V. y Gianinazzi, S. 1994. Changes in polypeptide patterns in tobacco roots colonized by two *Glomus* species. *Mycorrhiza*. 4: 215-221.
- Dumas-Gaudot, E., Slezack, S., Dassi, B., Pozo, M. J., Gianinazzi-Pearson, V. y Gianinazzi, S. 1996. Plant hydrolytic enzymes (chitinases and β -1,3-glucanases) in root reactions to pathogenic and symbiotic microorganisms. *Plant Soil*. 185: 211-221.
- Ebel, J. y Mithofer, A. 1998. Early events in the elicitation of plant defence. *Planta*. 206: 335-348.
- El Ghaouth, A., Arul, J., Grenier, J., Benhamou, N., Asselin, A. y Bélanger, R. 1994. Effect of chitosan on cucumber plants: Suppression of *Pythium aphanidermatum* and induction of defense reactions. *Phytopathol.* 84: 313-320.
- El Ouakfaoui, S. y Asselin, A. 1992a. Multiple forms of chitosanase activities. *Phytochem.* 31: 1513-1518.
- El Ouakfaoui, S. y Asselin, A. 1992b. Diversity of chitosanase activity in cucumber. *Plant Sci.* 85: 33-41.
- El Ouakfaoui, S., Potvin, C., Brezezinski, R. y Asselin, A. 1995. A *Streptomyces* chitosanase is active in transgenic tobacco. *Plant Cell Reports*. 15: 222-226.
- Elias, K. S. y Safir, G. R. 1987. Hyphal elongation of *Glomus fasciculatum* in response to root exudates. *Appl. Env. Microbiol.* 53: 1928-1933.
- Elliott, L.F. y Lynch, J.M. 1995. The international workshop on establishment of microbial inocula in soils: cooperative research project on biological resource management of the organization for economic cooperation and development (OECD). *Am. J. Alter. Agric.* 10: 50-73.
- Enkerli, J., Gisi, U. y Mössinger, E. 1993. Systemic acquired resistance to *Phytophthora infestans* in tomato and the role of pathogenesis related proteins. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 43: 161-171
- Felix, G., Regenass, M. y Boller, T. 1993. Specific perception of subnanomolar concentrations of chitin fragments by tomato cells: induction of extracellular alkalization, changes in protein phosphorylation, and establishment of a refractory state. *Plant J.* 4: 307-316.
- Ferraris, L., Abbattista, G. I. y Matta, A. 1987. Activation of glycosidases as a consequence of infection stress in *Fusarium* wilt of tomato. *J. Phytopathol.* 118: 317-325.

- Fischer, W., Christ, U., Baumgartner, M., Erismann, K. H. y Möisinger, E. 1989. Pathogenesis-related proteins of tomato: II. Biochemical and immunological characterization. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 35: 67-83.
- Francel, L. J. 1993. Interactions of nematodes with mycorrhizae and mycorrhizal fungi. En: *Nematode Interactions*. (M. W. Khan Ed.) Chapman & Hall, Londres. pp. 203-216.
- Franken, P. y Gnädinger, F. 1994. Analysis of parsley arbuscular endomycorrhiza: Infection development and mRNA levels of defense-related genes. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 7: 612-620.
- Fukanizo, T., Ohkawa, T., Sonoda, K., Toyoda, H., Nishiguchi, T., Ouchi, S. y Goto, S. 1992. Chitinous components of the cell wall of *Fusarium oxysporum*. *Biosci. Biotech. Biochem.* 56: 1632-1636.
- Fukamizo, T., Ohkawa, T., Ikeda, Y. y Goto, S. 1994. Specificity of chitosanase from *Bacillus pumilus*. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1205: 183-188.
- Furlan, V. y Fortin, J. A. 1973. Formation of endomycorrhizae by *Endogone calospora* on *Allium cepa* under three temperature regimes. *Can.* 100: 467-477.
- Garcia-Breijo, F. J., Garro, R. y Conejero, V. 1990. (C7 (P32) and C6 (P34) PR proteins induced in tomato leaves by citrus exocortis viroid infection are chitinases. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 36: 249-260.
- Garcia Garrido, J. M. y Ocampo, J. A. 1989. Effect of VA mycorrhizal infection of tomato on Damage caused by *Pseudomonas syringae*. *Soil Biol. Biochem.* 21:165-167.
- Garcia-Garrido, J. M., Toro, N. y Ocampo, J. A. 1993. Presence of specific polypeptides in onion roots colonized by *Glomus mosseae*. *Mycorrhiza.* 2: 175-177.
- Gianinazzi-Pearson, V., Gollotte, A., Gollote A, Dumas-Gaudot, E., Franken, P. y Gianinazzi, S. 1994. Gene expression and molecular modifications associated with plant responses to infection by arbuscular mycorrhizal fungi. En: *Advances in Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions*. Vol 3. (M. J. Daniels Ed.) Kluwer Academic Publishers, Netherlands. pp. 179-186.
- Gianinazzi-Pearson, V. 1995. Morphofunctional compatibility in interactions between roots and arbuscular endomycorrhizal fungi: molecular mechanisms, genes and gene expression. En: *Pathogenesis and Host-Parasite Specificity in Plant Diseases. II*. (K. Kohmoto, R. P. Singh y U. S. Singh, Eds.) Oxford: Pergamon Press, Elsevier Science. pp. 251-263.
- Gianinazzi-Pearson, V., Dumas-Gaudot, E., Gollotte, A., Tahiri-Alaoui, A. y Gianinazzi, S. 1996. Cellular and molecular defence-related root responses to invasion by arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol.* 133: 45-57.
- Gianinazzi-Pearson, V. 1996. Plant cell responses to arbuscular mycorrhizal fungi: Getting to the roots of the symbiosis. *Plant Cell.* 8: 1871-1883.
- Gianinazzi-Pearson, V., Gollotte, A., Dumas-Gaudot, E., Franken, P. y Gianinazzi, S. 1995. Gene expression and molecular modifications associated with plant responses to infection by arbuscular mycorrhizal fungi. En: *Advances in Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions*.

- (M. J. Daniels, J. A. Downie y A. E. Osbourne, Eds) Dordrecht: Kluwer, Academic Publishers. pp 179-186.
- Giovannetti, M. y Mosse, B. 1980. An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular infections in roots. *New Phytol.* 84: 489-500.
- Giovannetti, M., Sbrana, C. y Logi, C. 1994. Early processes involved in host recognition by arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol.* 127: 703-709.
- Giovannetti, M., Sbrana, C., Citernesi, A. S., Avio, L., Golotte, A., Gianinazzi-Pearson, V. y Gianinazzi, S. 1994. Recognition and infection process, basis for host specificity of arbuscular mycorrhizal fungi. En: *Impact of Arbuscular Mycorrhizas on Sustainable Agriculture and Natural Ecosystems* (S. Gianinazzi y H. Schüepp, Eds.) Birkhäuser Verlag, Basel, Switzerland, pp 61-72.
- Golotte, A., Gianinazzi-Pearson, V., Giovannetti, M., Sbrana, C., Avio, L. y S. Gianinazzi. 1993. Cellular localization and cytochemical probing of resistance reactions to arbuscular mycorrhizal fungi in a 'locus A' myc- mutant of *Pisum sativum* L. *Planta.* 191: 112-122.
- Giovannetti, M., Sbrana, C., Citernesi, A. S. y Avio, L. 1996. Analysis of factors involved in fungal recognition responses to host-derived signals by arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol.* 133: 65-71.
- Golotte, A., Lemoine, M. C. y Gianinazzi-Pearson, V. 1996. Morphofunctional integration and cellular compatibility between endomycorrhizal symbionts. En: *Concepts in Mycorrhizal Research.* (K. G. Mukerji Ed.) Kluwer Academic Press, Netherlands, pp- 91-111.
- Golote, A., Cordier, C., Lemoine, M. C. y Gianinazzi-Pearson, V. 1997. Role of fungal wall components in interactions between endomycorrhizal symbionts, En: *Eukaryotism and Symbiosis.* (H. E. A. Schenck, R. Herrmann, K. W. Jeon, N. E. Muller y W. Schwemmler Eds.) Springer-Verlag, Berlin. pp. 412-428.
- Goodwin, S. B., Smart, C. D., Sandrock, R. W., Deahl, K. L., Punja, Z. K. y Fry, W. E. 1998. Genetic change within populations of *Phytophthora infestans* in the United States and Canada during 1994 to 1996: Role of migration and recombination. *Phytopathol.* 88: 939-949.
- Graham, J. H. y Egel, D. S. 1988. Phytophthora root rot development on mycorrhizal and phosphorus-fertilised nonmycorrhizal sweet orange seedlings. *Plant Dis.* 72: 611-614.
- Graham, L. S. y Sticklen, M. B. 1994. Plant chitinases. *Can. J. Bot.* 72: 1057-1083.
- Graham, T. L. y Graham, M. Y. 1991. Cellular coordination of molecular responses in plant defense. *Mol. Plant Microb. Interact.* 4: 415-422.
- Granell, A., Bellés, J. M. y Conejero, V. 1987. Induction of pathogenesis-related proteins in tomato by citrus exocortis viroid, silver ion and ethephon. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 31: 83-90.
- Greathead, D. J. y Greathead, A. H. 1992. Biological control of insect pests by parasitoids and predators: The BIOCAT database. *Biocontrol News Information.* 13: 61-68.
- Grenier, J. y Asselin, A. 1990. Some pathogenesis-related proteins are chitosanases with lytic activity against fungal spores. *Mol. Plant Microbe Interact.* 3: 401-407.

- Grenier, J. y Asselin, A. 1993.** Detection of β -1,3-glucanase activity in gels containing alkali-soluble yeast glucan. *Anal. Biochem.* 212: 301-302.
- Gretschuschnikoff, A. I. 1939.** Role of peroxidase in immunity against *Phytophthora infestans* de Bary (in Russian). *Compt. Rend. Acad. Sci. USSR N.S.* 25: 685-689.
- Grisson, R., Grezes-Besset, B., Schneider, M., Lucante, N., Olsen, L., Leguay, J. J. y Toppan, A. 1996.** Field tolerance to fungal pathogens of *Brassica napus* constitutively expressing a chimeric chitinase gene. *Nature Biotechnol.* 14: 643-646.
- Grote, D. y Bucsi, C. 1998.** Chemical control of *Phytophthora nicotianae* on tomato roots with fosetyl-aluminium in hydroponics. *Gartenbauwissenschaft.* 63: 78-87.
- Guillemin, J. P., Gianinazzi, S., Gianinazzi-Pearson, V. y Marchal, J. 1994.** Contribution of arbuscular mycorrhizas to biological protection of micropropagated pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merr.) against *Phytophthora cinnamomi* Rands. *Agric. Sci. Fin.* 3: 241-251.
- Hadwiger, L. A., Beckman, J.M. y Adams, H.J. 1981.** Chitosan, as a component of pea-*Fusarium solani* interactions. *Plant Physiol.* 66: 205-211.
- Hadwiger, L. A., Chiang, C., Victor, S. y Horovitz, D. 1988.** The molecular biology of chitosan in plant-pathogen interactions and its application to agriculture. En: *Chitin and Chitosan: Sources, Chemistry, Biochemistry, Physical Properties and Applications.* (G. Skjak, B. Anthonsen y P. Sandford Eds.) Elsevier Applied Sciences, Amsterdam. pp 119-138.
- Hammond-Kosack, K. E. y Jones, J. D. G. 1996.** Resistance gene-dependent plant defense responses. *Plant Cell.* 8: 1773-1791.
- Harley, J. L. 1971.** Associations of microbes ant roots In: *Microbes and biological productivity.*(D.E. Hughes y A.H. Rose Eds). The Society for General Microbiology. Cambridge University Press, Londres. pp. 309-332.
- Harley, J. L. 1989** The significance of mycorrhiza. *Mycol Res.* 92: 92-129.
- Harley, J. L. y Smith, S. E. 1983.** *Mycorrhizal symbiosis.* London, New York: Academic Press.
- Harrison, M. J. 1997.** The arbuscular mycorrhizal symbiosis: an underground association. *Trends Plant Sci.* 2: 54-60.
- Harrison, M. J. y Dixon, R. A. 1993.** Isoflavonoid accumulation and expression of defense gene transcripts during the establishment of vesicular-arbuscular mycorrhizal associations in roots of *Medicago truncatula*. *Mol. Plan-Microbe Interact.* 6: 643-654.
- Harrison, M. J. y Dixon, R. A. 1994.** Spatial patterns of expression of flavonoid/isoflavonoid pathway genes during interactions between roots of *Medicago truncatula* and the mycorrhizal fungus *Glomus versiforme*. *Plant J.* 6: 9-20.
- Henry, 1931.** Occurrence of sporulation of *Helminthosporium sativum* in the soil. *Can. J. Res.* 5, 407.
- Hewitt, E. J. 1966.** Sand and water culture methods used in the studies of plant nutrition. En: *Tech. Comm.* vol. 22. London: Comm. Agri. Bur. pp. 430-434.
- Hoffland, E., Hakulinen, J. y van Pelt, J. A. 1996.** Comparison of systemic resistance induced by avirulent and nonpathogenic *Pseudomonas* species. *Phytopathol.* 86: 757-762.

- Hoffman, C. A. y Carroll, C. R. 1995. Can we sustain the biological basis of agriculture?. *Ann. Rev. Ecol. Systematics*. 26: 69-92.
- Hooker, J. E., Jaizme-Vega, M. y Atkinson, D. 1994. Biocontrol of plant pathogens using arbuscular mycorrhizal fungi. En: *Impact of Arbuscular Mycorrhizas on Sustainable Agriculture and Natural Ecosystems*. (S. Gianinazzi y H. Schuepp Eds.) Birkhäuser Verlag, Basel, Switzerland, pp.191-201.
- Howard, A. 1943. An agricultural testament. Oxford University Press, Geoffrey Cumberlege, London, UK.
- Hwang, B. K., Sunwoo, J. Y., Kim, Y. J. y Kim, B. S. 1997. Accumulation of β -1,3-glucanase and chitinase isoforms, and salicylic acid in the DL-b-amino-n-butyric acid-induced resistance response of pepper stems to *Phytophthora capsici*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 51: 305-322.
- Jeffries, P. y Barea, J. M. 1994. Biogeochemical cycling and arbuscular mycorrhizas in the sustainability of plant-soil systems. En: *Impact of Arbuscular Mycorrhizas on Sustainable Agriculture and Natural Ecosystems*. (Eds. S. Gianinazzi y H. Schüepp) Birkhäuser Verlag, Basel, Switzerland, pp. 101-115.
- Jimenez-Diaz, R. M. 1998. Control de enfermedades. En: *Agricultura Sostenible* (R. M. Jiménez Díaz y J. Lamo de Espinosa, Eds.) Mundi-Prensa, Madrid. pp. 345-375.
- John, M., Röhrig, H., Schmidt, J., Walden, R. y Schell, J. 1997. Cell signalling by oligosaccharides. *Trends Plant Sci.* 2: 111-115.
- Johnson, N. C., Graham, J. H. y Smith, F. A. 1997. Functioning of mycorrhizal associations along the mutualism-parasitism continuum. *New Phytol.* 135: 575-586.
- Joosten, M. H. A. J. y de Wit, P. J. G. M. 1989. Identification of several pathogenesis-related proteins in tomato leaves inoculated with *Cladosporium fulvum* (syn. *Fulvia fulva*) as 1,3- β -glucanases and chitinases. *Plant Physiol.* 89: 945-951.
- Joosten, M. H. A. J., Verbakel, H. M., Nettekoven, M. E., Van Leeuwen, J., Van Der Vossen, R. T. M. y De Wit, P. J. G. M. 1995. The phytopathogenic fungus *Cladosporium fulvum* is not sensitive to the chitinase and β -1-3-glucanase defence proteins of its host, tomato. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 46: 45-59.
- Julien, M. H. (ed). 1992. Biological Control of Weeds: a World Catalogue of Agents and Their Targets Weeds, 3rd ed. Commonwealth Agricultural Bureaux International, Wallingford, U.K.
- Jutidamrongphan, W., Andersen, J. B., Mackinnon, J. M., Manners, J. M., Simpson, R. S. y Scott, K. J. 1991. Induction of β -1,3-glucanase in barley in response to infection by fungal pathogens. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 4: 234-238.
- Kim, D. S., Weller, D. M. y Cook, R. J. 1994. Biocontrol activity of *Bacillus* sp. strain L324-92 to root pathogens of wheat. *Phytopathol.* 84: 1090-.
- Kim, K. D., Nemeč, S. y Musson, G. 1997. Effects of compost and soil amendments on soil microflora and *Phytophthora* root and crown rot of bell pepper. *Crop protection.* 16: 165-172.

- Kim, Y. J. y Hwang, B. K. 1997. Isolation of a basic 34 kiloDalton β -1,3-glucanase with inhibitory activity against *Phytophthora capsici* from pepper stems. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 50: 103-115.
- Kling, M. y Jakobsen, I. 1998. Arbuscular Mycorrhiza in soil quality assessment. *Ambio.* 27: 29-34.
- Kloepper, J. W. 1992. Plant growth-promoting rhizobacteria as biological control agents. En: *Soil Microbial Ecology. Applications in Agriculture Forestry and Environmental Management.* (F. Blaine y Jr. Meeting Eds.) Marcel Dekker, pp. 255-274.
- Kloepper, J. W. Tuzun, S., Liu, L. y Wei, G. 1993. Plant growth- promoting rizobacteria as inducers of systemic disease resistance. En: *Pest Management:Biologically Based Technologies.* (R. D. Lumsden y J. L. Vaughn, Eds). American Chemical Society Books, Washington, DC. pp. 156-165.
- Koide, R. T. y Schreiner, R. P. 1992. Regulation of the vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 43: 557-581.
- Kragh, K. M., Hendricks, T., De Jong, A. J., Lo Schiavo, F., Bucherna, N., Hojrup, P., Mikkelsen, J. D. y de Vries, S. C. 1996. Characterization of chitinases able to rescue somatic embryos of the temperature-sensitive carrot variants ts 11. *Plant Mol Biol.* 31: 631-645.
- Lamb, C. y Dixon, R. A. 1997. The oxidative burst in plant disease resistance. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49: 251-275.
- Lambais, M. R. y Mehdy, M. C. 1993. Suppression of endochitinase, β -1,3 endoglucanase, and chalcone isomerase expression in bean vesicular-arbuscular mycorrhizal roots under different soil phosphate conditions. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 6: 75-83
- Lambais, M.R. y Mehdy, M. C. 1995. Differential expression of defense-related genes in arbuscular mycorrhiza. *Canad. J. of Bot* 73: 533-540.
- Lambais, M. R. y Mehdy, M. C. 1996. Soybean roots infected by *Glomus intraradices* strains differing in infectivity exhibit differential chitinase and β -1,3-glucanase expression. *New Phytol.* 134: 531-538.
- Leeman, M., Van Pelt ,J.A., Hendrickx, M.J., Scheffer, R.J., Bakker, P.A.H.M. et al., 1995. Biocontrol of fusarium wilt of radish in commercial greenhouse trials by seed treatment with *Pseudomonas fluorescens* WCS374. *Phytopathol.* 85: 1301-1305.
- Lemoine, M. C., Gollotte, A., Gianinazzi-Pearson, V. y Gianinazzi, S. 1995. Localization of β (1-3) glucan in walls of the endomycorrhizal fungi *Glomus mosseae* (Nicol. & Gerd.) Gerd. & Trappe and *Acaulospora laevis* (Gerd. & Trappe) during colonization of host roots. *New Phytol.* 29: 97-105.
- Linderman, R. G. 1994. Role of VAM fungi in biocontrol. En: *Mycorrhizae and Plant Health.* (F.L. Pflieger y R. G. Linderman, Eds.) The American Phytopathological Society Press, St Paul. pp. 1-27.
- Liñan, C. 1999. Vademecum de productos fitosanitarios y nutricionales, (15ª ed.) Ed. Agrotecnica S S.L.

- Ligterink W., Kroj, T., zur Nieden, U., Hirt, H. y Scheel, D. 1997. Receptor-mediated activation of a MAP kinase in pathogen defense of plants. *Science*. 276: 2054-2057.
- Low, P. S. y Merida, J. R. 1996. The oxidative burst in plant defense: Function and signal transduction. *Physiol. Plant*. 96: 533-542.
- Lusso, M. y Kuc, J. 1996. The effect of sense and antisense expression of the PR-N gene for beta-1,3-glucanase on disease resistance of tobacco to fungi and viruses. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 49: 267-283.
- Malajczuk, N. 1983. Microbial antagonism to *Phytophthora*. En: *Phytophthora. Its Biology, Taxonomy, Ecology and Pathology*. (D. C. Erwin, S. Bartnicki-Garcia y P. H. Tsao Eds.) APS press, St Paul, USA. pp. 197-218.
- Mao, W., Lewis, J. A., Lumsden, R. D., Hebbar, K. P. 1998. Biocontrol of selected soilborne diseases of tomato and pepper plants. *Crop Protection*. 17: 535-542.
- Mark, D. H. y Davey, C. B. 1969. The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance of pine roots to pathogenic infections. IV. Resistance of naturally occurring mycorrhizae to infections by *Phytophthora cinnamomi*. *Phytopathol.* 59: 559-565.
- Mark, G. L. y Cassells, A. C. 1996. Genotype-dependence in the interaction between *Glomus fistulosum*, *Phytophthora fragariae* and the wild strawberry (*Fragaria vesca*). *Plant Soil*. 185: 233-239.
- Marschner, P. y Crowley, D. E. 1996. Root colonization of mycorrhizal and nonmycorrhizal pepper (*Capsicum annuum*) by *Pseudomonas fluorescens* 2-79RL. *New Phytol.* 134: 115-122.
- Martin, J., García-Romera, I., Ocampo, J.A., Palma, J.M. 1998. Superoxide dismutase and arbuscular mycorrhizal fungi: Relationship between the isoenzyme pattern and the colonizing fungus. *Symbiosis* 24: 247-257.
- Martínez, E. y Velázquez E. 1992. Organismos fijadores de nitrógeno atmosférico. En: Interacción Planta-Microbio: Biología del Nitrógeno. (J. González López y C. Lluch Plá Eds). Editorial Rueda, Madrid. pp. 55-70.
- Marx, D. H. 1969. The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance of pine roots to pathogenic infections. II. Production, identification, and biological activity of antibiotics produced by *Leucopazillus cerealis* var. *piceina*. *Phytopathol.* 59: 411-417.
- Marx, D. H. 1973. Mycorrhizae and feeder root diseases. En: *Ectomycorrhizae: their Ecology and Physiology*. (G. C. Marks y Kozlowsky) Academic Press, New York. pp. 351-382.
- Mathesis, U., Schlaman, H. R. M., Spaink, H. P., Sautter, C., Rolfe, B. G. y Djordjevic, M. A. 1998. Auxin transport inhibition precedes root nodule formation in white clover roots and is regulated by flavonoids and derivatives of chitin oligosaccharides. *Plant J.* 14: 23-43.
- Mathur, N. y Vyas, A. 1995. Changes in isozyme patterns of peroxidase and polyphenol oxydase by VAM fungi in roots of ziziphus species. *J. Plant Physiol.* 145: 498-500.

- Mauch, F., Hadwiger, L. A. y Boller, T. 1988a.** Antifungal hydrolases in pea tissue. I. Purification and characterization of two chitinases and two β -1,3-glucanases differentially regulated during development and in response to fungal infection. *Plant Physiol.* 87: 325-333.
- Mauch, F., Mauch-Mani, B. y Boller, T. 1988b.** Antifungal hydrolases in pea tissue. II. Inhibition of fungal growth by combinations of chitinase and β -1,3-glucanase. *Plant Physiol.* 88: 936-942.
- Mayer, R. T., McCollum, T. G., Niedz, R. P., Hearn, C. J., McDonald, R. E., Berdis, E. y Doostdar, H. 1996.** Characterization of seven basic endochitinases isolated from cell cultures of *Citrus sinensis* (L.). *Planta.* 200: 289-295.
- Mayer, R., Shapiro, J., Berdis, E., Hearn, C., McCollum, T., McDonald, R. y Doostdar, H. 1995.** *Citrus* rootstock responses to herbivory by larvae of the sugarcane rootstock borer weevil (*Diaprepes abbreviatus* L.). *Physiol. Plan.* 94: 164-173.
- Meins, F. y Ahl, P. 1989.** Induction of chitinase and β -1,3-glucanase in tobacco plants infected with *Pseudomonas tabacci* and *Phytophthora parasitica* var *nicotianae*. *Plant Sci.* 61: 155-161.
- Mellor, R. B. y Collinge, D. B. 1995.** A simple model based on known plant defence reactions is sufficient to explain most aspects of nodulation. *J. Exp. Bot.* 46: 1-18.
- Memelink, J., Linthorst, H. J. M., Schilperoort, R. A. y Hoge, J. H. C. 1990.** Tobacco genes encoding acidic and basic isoforms of pathogenesis-related proteins display different expression patterns. *Plant Mol. Biol.* 14: 119-126.
- Michaud, D. y Asselin, A. 1995.** Application to plant proteins of gel electrophoretic methods. *J. Chromatographie A.* 698: 263-279.
- Mitsutomi, M., Isonø, M., Uchiyama, A., Nikaidou, N., Ikegami, T. y Watanabe, T. 1998.** Chitosanase activity of the enzyme previously reported as beta-1,3-1,4-glucanase from *Bacillus circulans* WL-12. *Bios. Biotech. Biochem.* 62: 2107-2114.
- Mohr, U., Lange, J., Boller, T., Wiemken, A. y Vogeli-Lange, R. 1998.** Plant defence genes are induced in the pathogenic interaction between bean roots and *Fusarium solani*, but not in the symbiotic interaction with the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *New Phytol.* 138: 589-598.
- Monaghan, R. L., Eveleigh, D. E., Tewari, R. P. y Reese, E. T. 1973.** Chitosanase, a novel enzyme. *Nature. New Biol.* 245: 78-80.
- Monzingo, A. F., Marcotte, E. M., Hart, P. J. y Robertus, J. D. 1996.** Chitinases, chitosanases, and lysozymes can be divided into procaryotic and eucaryotic families sharing a conserved core. *Nat Struct Bio.* 3: 133-140.
- Mozzetti, C., Ferraris, L., Tamietti, G. y Matta, A. 1995.** Variation in enzyme activities in leaves and cell suspensions as markers of incompatibility in different *Phytophthora*-pepper interactions. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 46: 95-107.
- Nagahashi, G. y Douds, D.D. 1997.** Appressorium formation by AM fungi on isolated cell walls of carrot roots. *New Phytol.* 136: 299-304.

- Neher, D. y Duniway, J. M. 1991. Relationship between amount of *Phytophthora parasitica* added to field soil and the development of root rot in processing tomatoes. *Phytopathol.* 81: 1124-1129.
- Nemec, S. 1987. VA mycorrhizae in horticultural systems. En: *Ecophysiology of VA Mycorrhizal Plants*. Gene & Safir Ed., CRC Press. Boca de Raton, Florida. pp. 193-211.
- Nemec, S., Datnoff, L. E. y Strandberg, J. 1996. Efficacy of biocontrol agents in planting mixes to colonize plant roots and control root diseases of vegetables and citrus. *Crop Protection.* 15: 735-742.
- Norman, J. R., Atkinson, D. y Hooker, J. E. 1996. Arbuscular mycorrhizal fungal-induced alteration to root architecture in strawberry and induced resistance to the root pathogen *Phytophthora fragariae*. *Plant Soil* 185: 191-198.
- Nuez F. 1997. El cultivo del tomate. Mundi Prensa
- Ocampo, J.A. 1993. Influence of pesticides on VA mycorrhizae. En: *Pesticide Interactions in Crop Production. Beneficial and Deleterious Effects.* (Ed. Altman, J.). CRC Press, Florida, pp 213-226.
- O'Gara, F., Dowling, D. N. y Boesten, B. 1994. Molecular ecology of rhizosphere microorganisms. VCH. Weinheim.
- Olivares, J. y Sanjuan, J. 1997. Respuesta hipersensible y resistencia sistémica adquirida en plantas. *Bol. Soc. Esp. Fisiol. Veg.*, 26: 15-20.
- Osswald, W. F., McDonald, R. E., Niedz, R. P., Shapiro, J. P. y Mayer, R. T. 1992. Quantitative fluorometric analysis of plant and microbial chitosanases. *Anal. Biochem.* 204: 40-46.
- Osswald, W., Shapiro, J., McDonald, R., Niedz, R., Mayer, R. 1993. Some citrus chitinases also possess chitosanase activities. *Experientia.* 49: 888-892.
- Osswald, W., Shapiro, J., Doostdar, H., McDonald, R., Niedz, R., Nairn, J., Hearn, J. y Mayer, R. 1994. Identification and characterization of acidic hydrolases with chitinase and chitosanase activities from sweet orange callus tissue. *Plant Cell Physiol.* 35: 811-820.
- Pacovsky, R. S. 1989. Carbohydrate, protein and aminoacid status of *Glycine-Glomus-Bradyrhizobium* symbiosis. *Physiol. Plant.* 75: 346-354.
- Pan, S.Q., Ye, X.S. y Kuc J. 1989. Direct detection of β -1,3-glucanase isozymes on polyacrylamide electrophoresis and isoelectrofocusing gels. *Anal. Biochem.* 182: 136-140.
- Pan, S. Q., Ye, X. S. y Kuc, J. 1991. A technique for detection of chitinase, β -1,3-glucanase, and protein patterns after a single separation using polyacrylamide gel electrophoresis or isoelectrofocusing. *Phytopathol.* 81: 970-974.
- Patil, V. R. y Widholm, J. M. 1997. Possible correlation between increased vigour and chitinase activity expression in tobacco. *J. Exp. Bot.* 48: 1943-1950.
- Pauli, F. W. 1967. Soil Fertility. A biochemical approach. Adam Hilger, Londres.
- Pegg, G.F., Young, D.H. 1981. Changes in glycosidase activity and their relationship to fungal colonization during infection of tomato by *Verticillium albo-atrum*. *Physiol. Plant Pathol.* 19: 371-382.

- Pegg, G. F. y Young, D. H. 1982.** Purification and characterization of chitinase enzymes from healthy and *Verticillium albo-atrum*-infected tomato plants, and from *V. albo-atrum*. *Physiol. Plant Pathol.* 21: 389-409.
- Peipp, H., Maier, W., Schmidt, J., Wray, V. y Strack, D. 1997.** Arbuscular mycorrhizal fungus-induced changes in the accumulation of secondary compounds in barley roots. *Phytochem.* 44: 581-587.
- Peng, M., Kuc, J. 1992.** Peroxidase generated hydrogen peroxide as a source of antifungal activity *in vitro* and on tobacco leaf disks. *Phytopathol.* 82: 696-699.
- Perrin, R. 1990.** Interactions between mycorrhizae and diseases caused by soil borne fungi. *Soil Use Management.* 6: 189-195.
- Phillips, J. M y Hayman, D. E. 1970.** Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 55: 158-161.
- Pieterse, C. M. J., van Wees, S. C. M., Hoffland, E., van Pelt, J. A. y van Loon, L.C. 1996.** Systemic resistance in *Arabidopsis* induced by biocontrol bacteria is independent of salicylic acid accumulation and pathogenesis-related gene expression. *Plant Cell.* 8: 1225-1237.
- Pinochet, J., Calvet, C., Camprubí, A. y Fernández, C. 1996.** Interactions between migratory endoparasitic nematodes and arbuscular mycorrhizal fungi in perennial crops: a review. *Plant Soil.* 185: 183-190.
- Plenchette, C., Furlan, V. y Fortin, J. A. 1983.** Responses of endomycorrhizal plants grown in a calcined morillonite clay to different levels of soluble phosphorus. I. Effects of growth and mycorrhizal development. *Can. J. Bot.* 61: 1377-1383.
- Pozo, M. J., Dumas-Gaudot, E., Slezack, S., Cordier, C., Asselin, A., Gianinazzi, S., Gianinazzi-Pearson, V., Azcón-Aguilar, C. y Barea, J. M. 1996.** Induction of new chitinase isoforms in tomato roots during interactions with *Glomus mosseae* and/or *Phytophthora nicotianae* var *parasitica*. *Agron.* 16: 689-697.
- Pozo, M. J., Azcón-Aguilar, C., Dumas-Gaudot, E. y Barea, J M. 1998.** Chitosanase and chitinase activities in tomato roots during interactions with arbuscular mycorrhizal fungi or *Phytophthora parasitica*. *J. Exp. Bot.* 49: 1729-1739.
- Pozo, M. J., Azcón-Aguilar, C., Dumas-Gaudot, E. y Barea, J. M. 1999.** β -1,3-glucanase activities in tomato roots inoculated with arbuscular mycorrhizal fungi and/or *Phytophthora parasitica*: time course analysis and possible involvement in bioprotection. *Plant Sci.* 141, 2: 149-157.
- Rast, D. M., Horsch, M., Furter, R. y Gooday, G. 1991.** A complex chitinolytic system in exponentially growing mycelium of *Mucor rouxii* properties and function. *J. Gen. Microbiol.* 137: 2797-2810.

- Raupach, G.S., Liu, L., Murphy, J.F., Tuzun, S. y Kloepper, J.W. 1996. Induced systemic resistance in cucumber and tomato against cucumber mosaic cucumovirus using plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR). *Plant Dis.* 80: 891-894.
- Read, D. J. 1999. Mycorrhiza-The state of the art. En: *Mycorrhiza 2nd*. (A. Varma y B. Hock, Eds.) Springer-Verlag Berlin, Heidelberg. pp. 3-34.
- Reisfeld, R. A., Lewis, V. J. y Williams, D. E. 1962. Disk electrophoresis of basic proteins and peptides on polyacrylamide gels. *Nature.* 195: 281-283.
- Ryals, J. A., Neuenschwander, U. H., Willits, M. G., Molina, A., Steiner, H. y Hunt, M. D. 1996. Systemic acquired resistance. *Plant Cell.* 8: 1809-1819.
- Sahai, A. S. y Manocha, M. S. 1993. Chitinases of fungi and plants: their involvement in morphogenesis and host-parasite interaction. *FEMS Microbiol. Rev.* 11: 317-338.
- Salzwedel, J. L. y Dazzo, F. B. 1993. pSym nod gene influence on elicitation of peroxidase activity from white clover and pea roots by rhizobia and their cell-free supernatants. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 6: 127-134.
- Samra, A., Dumas-Gaudot, E. y Gianinazzi, S. 1997. Detection of symbiosis-related polypeptides during the early stages of the establishment of arbuscular mycorrhiza between *Glomus mosseae* and *Pisum sativum* roots. *New Phytol.* 135: 711-722.
- Samways, M. J. 1981. Biological control of pests and weeds. En: *Studies in Biology.* (E. Arnold, Ed.) The Camelot Press, Londres.
- Sánchez -Díaz M y Honribia M. 1994. Water relations and alleviation of drought stress in mycorrhizal plants. En: *Impact of Arbuscular Mycorrhizas on Sustainable Agriculture and Natural Ecosystems.* (Eds. S. Gianinazzi y H. Schüepp) Birkhäuser Verlag, Basel, Switzerland, pp. 167-178.
- Sanford, G. B. 1926. Some factors affecting the pathogenicity of *Actinomyces scabies*. *Phytopathol.* 16: 525-547.
- Sannan, T., Kurita, K. y Iwakura, Y. 1976. Studies on chitin 2. Effect of deacetylation on solubility. *Die Makromolekulare Chemie.* 177: 3589-3600.
- Satour, M. M. y Butler, E. E. 1967. A root and crown rot of tomato caused by *Phytophthora parasitica*. *Phytopathol.* 57: 510-515.
- Schellenbaum, L., Gianinazzi, S. y Gianinazzi-Pearson, V. 1993. Comparison of acid soluble protein synthesis in roots of endomycorrhizal wild type *Pisum sativum* and corresponding isogenic mutants. *J. Plant Physiol.* 141: 2-6.
- Schlumbaum, A., Mauch, M., Vogeli, U. y Boller, T. 1986. Plant chitinases are potent inhibitors of fungal growth. *Nature.* 324: 365-367.
- Schultze, M., Kondorosi, E., Kondorosi, A., Staehelin, C., Mellor, R. B. y Boller, T. 1993. The sulfate group on the reducing end protects Nod signal of *R. meliloti* against hydrolysis by *Medicago* chitinases. En: *New Horizons in Nitrogen Fixation.* (R. Palacios, J. Mora y W. Newton, Eds.) Dordrech, Kluwer Academic Publishers. pp. 159-164.

- Sela-Buurlage, M. B., Ponstein, A. S., Bres-Vloemans, S. A., Melchers, L. S., van den Elzen, P. J. M. y Cornelissen, B. J. C. 1993. Only specific tobacco (*Nicotiana tabacum*) chitinases and β -1,3-glucanases exhibit antifungal activity. *Plant Physiol.* 101: 857-863.
- Sharma, P., Borja, D., Sougaard, P. y Lönneborg, A. 1993. PR-proteins accumulating in spruce roots infected with a pathogenic *Pythium* sp. isolate include chitinases, chitosanase and β -1,3-glucanases. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 43: 57-67.
- Shirliff, S. J. y Vessey, J. K. 1996. A nodulation (Nod (+)/Fix-) mutant of *Phaseolus vulgaris* L has nodule-like structures lacking peripheral vascular bundles (Pvb(-)) and is resistant to mycorrhizal infection (Myc(-)) *Plant Sci.* 118: 2, 209-220.
- Simmons, C. R. 1994. The physiology and molecular biology of plant 1,3- β -D-glucanases and 1,3;1,4- β -D-glucanases. *Crit. Rev. Plant Sci.* 13: 325-387.
- Slezack, S., Dassi, B. y Dumas-Gaudot, E. 1996. Arbuscular mycorrhiza-induced chitinase isoforms. En: *Chitin Enzymology*, vol 2 (R. A. A. Muzzarelli, Ed.) Atec Edizioni, Italy 2, pp. 339-347.
- Smith F.A. y Smith S.E. 1996. Mutualism and parasitism: Diversity in function and structure in the "arbuscular" (VA) mycorrhizal symbiosis. *Adv. Bot. Res.* 22: 1-43.
- Smith, S.E. y Read, D.J. 1997. *Mycorrhizal symbiosis*, 2nd edn. Academic Press, London.
- Somssich, I.E., Hahlbrock, K. 1998. Pathogen defence in plants - a paradigm of biological complexity. *Trends Plant Sci.* 3: 3, 86-90.
- Spanu, P., Boller, T., Ludwig, A., Wiemken, A., Faccio, A. y Bonfante-Fasolo, P. 1989. Chitinase in roots of mycorrhizal *Allium porrum*: regulation and localization. *Planta.* 177: 447-455.
- Spanu, P. y Bonfante-Fasolo, P. 1988. Cell-wall bound peroxidase activity in roots of mycorrhizal *Allium porrum*. *New Phytol.* 109: 119-124.
- Stachelin, C., Muller, J., Mellor, R. B., Wiemken, A. y Boller, T. 1992. Chitinase and peroxidase in effective (fix⁺) and ineffective (fix⁻) soybean nodules. *Planta.* 187: 295-300.
- Stachelin, C., Granado, J., Muller, J., Wiemken, A., Mellor, R. B., Felix, G., Regenass, M., Broughton, W. J. y Boller, T. 1994a. Perception of *Rhizobium* nodulation factors by tomato cells and inactivation by root chitinases. *Proc. Natl Acad Sci. U.S.A.* 91: 2196-2200.
- Stachelin, C., Schultze, M., Kondorosi, E., Mellor, R., Boller, T. y Kondorosi, A. 1994b. Structural modifications in *Rhizobium meliloti* Nod factors influence their stability against hydrolysis by root chitinases. *Plant J.* 5: 319-330.
- St-Arnaud, M., Hamel, C., Caron, M. y Fortin, A. 1995. Endomycorrhizes VA et sensibilité des plantes aux maladies: Synthèse de la littérature et mécanismes d'interaction potentiels. En: *La Symbiose Mycorrhizienne, État des Connaissances*. (Publishing O, Ed.) Frelighsburg, Orbis Publishing. pp. 51-87.
- Sticher, L., Hofsteenge, J., Milani, A., Neuhaus, J. M. y Meins, F. 1992. Vacuolar chitinases of tobacco: A new class of hydroxyproline-containing proteins. *Science.* 257: 655-657.

- Sukarno, N., Smith, F. A., Scott, E. S., Jones, G. P. y Smith, S. E. 1998. The effect of fungicides on vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis III. The influence of VA mycorrhiza on phytotoxic effects following-application of fosetyl-Al and phosphonate. *New Phytol.* 139: 321-330.
- Thomashaw, L. S. y Weller, D. M. 1995. Current concepts in the use of introduced bacteria for biological control: Mechanisms and antifungal metabolites. En: *Plant-Microbe Interactions*, vol. 1. (G. Stacey y N. Keen, Eds.) Chapman y Hall, New York, USA. pp 187-235.
- Torres-Barragan, A., Zavaleta-Mejia, E. González-Chávez, C. y Ferrera-Cerrato, R. 1996. The use of arbuscular mycorrhizae to central onion white rot (*Sclerotium cepivorum Berk*) under field conditions. *Mycorrhiza*. 6: 253-257.
- Trotta, A., Varese, G. C., Gnani, E., Fusconi, A., Sampo, S. y Berta, G. 1996. Interactions between the soilborne root pathogen *Phytophthora nicotianae* var *parasitica* and the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* in tomato plants. *Plant Soil*. 185: 199-209.
- Trudel, J. y Asselin, A. 1989. Detection of chitinase activity after polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal Biochem*. 178: 362-366.
- Tsai, S. M. y Phillips, D. A. 1991. Flavonoids released naturally from alfalfa promote development of symbiotic *Glomus* spores *in vitro*. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 1485-1488.
- Tuzun S, Rao MN, Vögeli U, Schardl CL, Kuc J. 1989. Induced systemic resistance to blue mold; early induction and accumulation of β -1,3-glucanases, chitinases, and other pathogenesis-related proteins (β -proteins) in immunized tobacco. *Phytopathol.* 79: 979-983.
- Vaast, Ph., Caswell-Chen, E. P. y Zasoski, R. J. 1998. Influences of a root-lesion nematode, *Pratylenchus coffeae*, and two arbuscular mycorrhizal fungi, *Acaulospora mellea* and *Glomus clarum* on coffee (*Coffea arabica* L.). *Biol Fertil Soils*. 26: 130-135.
- Van Buuren, M.L., Maldonado-Mendoza, I.E., Trieu, A.T., Blaylock, L.A. y Harrison, M.J. 1999. Novel genes induced during an arbuscular mycorrhizal (AM) symbiosis formed between *Medicago truncatula* and *Glomus versiforme*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* (in press)
- Van Driesche, R. G. y Bellows, T. S. 1996. Biological control. Chapman y Hall, New York, USA.
- Van Kan, J. A. L., Joosten, H. A. J., Wagemakers, C. A.M., Van der Berg-Velthuis, G. C. M. y de Wit P. J. G. M. 1992. Differential accumulation of mRNAs encoding extracellular and intracellular PR proteins in tomato induced by virulent and avirulent races of *Cladosporium fulvum*. *Plant Mol. Biol.* 20: 513-527.
- Van Loon, L. C. 1997. Induced resistance in plants and the role of pathogenesis-related proteins. *Eur. J. Plant Pathol.* 103: 753-765.
- Van Loon, L.C., Bakker, P.A.H.M. y Pieterse, C.M.J. 1998. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* 26: 453-483.
- Van Wees, S. C. M., Pieterse, C. M. J., Van'trijssenaar, A., Van't Westende, Y. A. M., Hartog, F., Van Loon, L. C. 1997. Differential induction of systemic resistance in *Arabidopsis* by biocontrol bacteria. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 10: 716-724.

- Vandermeer, J. 1995. The ecological basis of alternative agriculture. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 26: 201-224.
- Vierheilig, H., Alt, M., Mohr, U., Boller, T. y Wiemken, A. 1994. Ethylene biosynthesis and activities of chitinases and β -1,3 glucanase in the roots of host and non-host plants of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi after inoculation with *Glomus mosseae*. *J. Plant Physiol.* 143: 337-343.
- Vierheilig, H., Alt, M., Lange, J., Gut-Rella, M., Wiemken, A. y Boller, T. 1995. Colonization of transgenic tobacco constitutively expressing pathogenesis-related proteins by the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 3031-3034.
- Volpin, H., Elkind, Y., Okon, Y. y Kapulnik, Y. 1994. A vesicular arbuscular mycorrhizal fungus (*Glomus intraradix*) induces a defense response in alfalfa roots. *Plant Physiol.* 104: 683-689.
- Ward, E. R., Payne, G. B., Moyer, M. B., Williams, S. C., Dincher, S. S., Sharkey, K. C., Beck, J. J., Taylor, H. T., Ahl-Goy, P., Meins, F. y Ryals, J. A. 1991. Differential regulation of β -1,3-glucanase messenger RNAs in response to pathogen infection. *Plant Physiol.* 96: 390-397.
- Watanabe, T., Yamada, T., Oyanagi, W., Suzuki, K. y Tanaka, H. 1992. Purification and some properties of chitinase B1 from *Bacillus circulans* WL-12. *Biosci. Biotech. Biochem.* 56: 682-683.
- Wegel, E., Schauser, L., Sandal, N., Stougaard, J. y Parniske, M. 1998. Mycorrhiza mutants of *Lotus japonicus* define genetically independent steps during symbiotic infection. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 11: 933-936.
- Wessels, J. G. H. y Sietsma, J. H. 1981. Fungal cell walls: A survey. En: *Encyclopedia of Plant Physiology, New series, Plant Carbohydrates II*, (W. Tanner, F. A. Loewus, Eds.) Berlin, Springer-Verlag. pp. 352-394.
- Whipps, J. M. 1997. Developments in the biological control of soil-borne plant pathogens. *Advances in Botanical Research Incorporating. Adv. Plant Pathol.* 26: 1-134.
- Widmer, T. L., Graham, J. H. y Mitchell, D. J. 1998. Composted municipal waste reduces infection of citrus seedlings by *Phytophthora nicotianae*. *Plant Dis.* 82: 683-688.
- Wojtaszek, P. 1997. Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. *Biochem. J.* 322: 681-692.
- Wright, D. P., Scholes, J. D. y Read, D. J. 1998. Effects of VA mycorrhizal colonisation on photosynthesis and biomass production of *Trifolium repens* L. *Plant Cell Environ.* 21: 209-216.
- Wu, G., Shortt, B. J., Lawrence, E. B., Levine, E. B. y Fitzsimmons, K. C. 1995. Disease resistance conferred by expression of a gene encoding H₂O₂-generating glucose oxidase in transgenic potato plants. *The Plant Cell.* 7: 1357-1368.
- Wu, G. S., Shortt, B. J., Lawrence, E. B., Leon, J., Fitzsimmons, K. C., Levine, E. B., Raskin, I., Shah, D. M. 1997. Activation of host defense mechanisms by elevated production of H₂O₂ in transgenic plants. *Plant Physiol.* 115: 427-435.

- Wubben, J. P., Joosten, M. H. A. J., Van Kan, J. A. L. y de Wit, P. J. G. M. 1992. Subcellular localization of plant chitinases and 1,3- β -glucanases in *Cladosporium fulvum* (syn. *Fulvi fulva*)-infected tomato leaves. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 41: 23-32.
- Wubben, J. P., Lawrence, C. B. y de Wit, P. J. G. M. 1996. Differential induction of chitinase and 1,3- β -glucanase gene expression in tomato by *Cladosporium fulvum* and its race-specific elicitors. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 48: 105-116.
- Wyss, P., Mellor, R. B. y Wiemken, A. 1990. Vesicular-arbuscular mycorrhizas of wild-type soybean and non-nodulating mutants with *Glomus mosseae* contain symbiosis-specific polypeptides (mycorrhizins), immunologically cross-reactive with nodulins. *Planta.* 182: 22-26.
- Yang, Y., Shah, J. y Klessig, D. F. 1997. Signal perception and transduction in plant defense responses. *Genes Dev.* 11: 1621-1639.
- Yi, S. Y. y Hwang, B. K. 1997. Purification and antifungal activity of a basic 34 kDa β -1,3-glucanase from soybean hypocotyls inoculated with *Phytophthora sojae* f. sp. *glycines*. *Mol. Cells.* 7: 408-413.
- Yoshikawa, M., Tsuda, M. y Takeuchi, Y. 1993. Resistance to fungal diseases in transgenic tobacco plants expressing the phytoalexin elicitor-releasing factor, β -1,3-endoglucanase from soybean. *Naturwissenschaften* 80: 417-420.
- Young, D. H. y Pegg, G. F. 1981. Purification and characterization of 1,3- β -glucan hydrolases from healthy and *Verticillium albo-atrum*-infected tomato plants. *Physiol. Plant Pathol.* 19: 391-417.
- Yu, L. X., Djebrouni, M., Chamberland, H., Lafontaine, J. G. y Tabaeizadeh, Z. 1998. Chitinase: Differential induction of gene expression and enzyme activity by drought stress in the wild (*Lycopersicon chilense* Dun.) and cultivated (*L-esculentum* Mill.) tomatoes. *J. Plant Physiol.* 153: 745-753.
- Xie, Z. P., Staehelin, C., Vierheilig, H., Wiemken, A., Jabbouri, S., Broughton, W. J., Vögeli-Lande, R. y Boller, T. 1995. Rhizobial nodulation factors stimulate mycorrhizal colonization of nodulating and nonnodulating soybeans. *Plant Physiol.* 108: 1519-1525.
- Xie, Z.P., Muller, J., Wiemken A., Broughton W.J. y Boller T. 1998. Nod factors and triiodobenzoic acid stimulate mycorrhizal colonization and affect carbohydrate partitioning in mycorrhizal roots of *Lablab purpureus*. *New Phytol.* 139, 361-366.
- Zehnder, G., Kloepper, J., Yao, C. y Wei, G. 1997. Induction of systemic resistance in cucumber against cucumber beetles (*Coleoptera: Chrysomelidae*) by Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria. *J. Econ. Entomol.* 90: 391-396.