

Proc 7.13/85

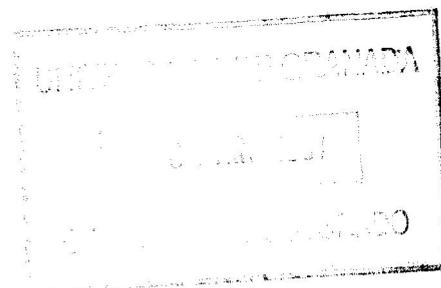
T
16
12

FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD DE GRANADA
Facultad de Ciencias
Fecha 15 MAR. 1991
ENTRADA NUM. 2215

Contribución al estudio de los factores que influyen
el crecimiento *in vitro* de hongos de las micorrizas VA
y su establecimiento en plantas micropropagadas.

M^a Teresa Vidal Domínguez
Tesis Doctoral



UNIVERSIDAD DE GRANADA
1991

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA
GRANADA
Nº Documento 619678071
Nº Copia 121225643

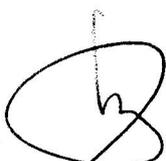
Contribución al estudio de los factores que influncian
el crecimiento *in vitro* de hongos de las micorrizas VA
y su establecimiento en plantas micropropagadas.

Memoria presentada para
optar al grado de Doctor.
Granada, Abril 1991

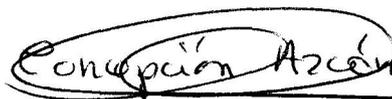


Fdo. M^a Teresa Vidal Domínguez
Lda. en Ciencias Biológicas

Directores de Tesis



Fdo. J. M. Barea Navarro
Profesor de Investigación
del C.S.I.C.



Fdo. C. Azcón-Aguilar
Investigador científico
del C.S.I.C.

Al finalizar este trabajo de Tesis Doctoral deseo expresar mi más sincera gratitud a los Profesores Arroyo y Flores, del Dpto. de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas (Universidad Complutense de Madrid), tanto por los conocimientos científicos que de ellos recibí, como por orientarme hacia la U. E. I. de Microbiología de la Estación Experimental del Zaidín (C. S. I. C.) de Granada, donde se ha llevado a cabo el trabajo de casi cuatro años, que se presenta en esta Memoria. Agradezco igualmente la aceptación del Director de la Estación y del Jefe del Departamento de Microbiología, así como la Beca del Plan de F. P. I. del Ministerio de Educación y Ciencia.

Mi especial gratitud a los directores de mi Tesis: José Miguel Barea Navarro y Concepción Azcón Gonzalez de Aguilar, en los que he encontrado siempre dedicación, apoyo y amistad para la realización de mi trabajo. Así como mi gratitud a la doctora Carmen LLuch, por su eficaz labor como tutora de esta Tesis.

Igualmente mi agradecimiento para todos los compañeros de la U. E. I. de Microbiología, con los que he compartido estos años de trabajo.

Al Dr. Fernando Pliego y a todo su grupo

de trabajo, en el Centro de Investigación y Desarrollo Agrario de "Campanillas-Churriana" (Málaga), por su grata colaboración y hospitalidad, en lo que se refiere al aprendizaje y aplicación de las técnicas de micropropagación del aguacate.

A la Lcda. Claudia M^c Allister, y a los Doctores Inés Martín y Jesus González por llevar a cabo, muy amablemente, la identificación de los microorganismos.

Así mismo, quisiera expresar mi agradecimiento a las Sras. Teresa, Pura y Pilar Medina por la realización del análisis mineral de las plantas, a D. Manuel Martínez, por la realización de trabajos gráficos y a los Sres. Paqui Gonzalez y Rafael Bellver, por su gran ayuda y colaboración en las tareas de mecanografía y diseño del proceso de edición del texto, que han permitido la elaboración del manuscrito de esta Memoria.

Y por último un enorme agradecimiento a toda mi familia, especialmente a mis padres y hermanos, y a Jorge, por su apoyo y seguimiento continuo desde que empecé la realización de este trabajo.

El material de aguacate (*Persea americana* Mill.) utilizado fue producido, por técnicas de micropropagación, en el Centro de Investigación y Desarrollo Agrario de "Campanillas-Churriana" (Málaga).

Este trabajo doctoral se encuadra dentro del proyecto del Plan Nacional (Biotecnología) BT 87/002 (CICyT).

INDICE

	pág.
I. Introducción	1
II. Objetivos e interés del trabajo	6
III. Revisión bibliográfica	9
A. Aspectos generales de las micorrizas VA	9
1. Características de la simbiosis	9
- Origen de las micorrizas VA	9
- Propiedades simbióticas de las micorrizas VA	10
2. Formación de micorrizas VA	12
- Estadíos de precolonización	12
- Inicio de la colonización de la raíz por el hongo	14
- Generalización de la colonización de la raíz	16
3. Fisiología de las micorrizas VA	18
4. Estructura y citología de micorrizas VA	21
5. Consecuencias de la formación de micorrizas sobre la fisiología de la planta	23
- Efecto de las MVA sobre la producción de biomasa	23
- Efecto sobre la adquisición de nutrientes	24
- Adquisición de fosfato	25
- Nutrición nitrogenada en MVA	28
- Adquisición de otros nutrientes	29
- Alteración de las relaciones hídricas	30
- Influencia de las MVA sobre la fotosíntesis del hospedador	31
- Resistencia a la salinidad en MVA	31
- Cambios en las relaciones hormonales	32
- Fisiología y bioquímica de la nutrición carbonada	33
- Balance energético en plantas micorrizadas	33
- Depresiones del crecimiento inducidas por las micorrizas	34
B. Biotecnología de micorrizas VA	35

1. Hongos formadores de micorrizas VA	35
- Taxonomía	35
- Mecanismo de germinación de las esporas	39
- Estructura de los tubos de germinación	42
- Crecimiento de los hongos VA en condiciones axénicas	43
- Factores que afectan al desarrollo de los hongos VA en cultivo axénico	45
- Capacidad metabólica de los hongos VA	53
2. Micorrización de material vegetal obtenido por cultivo de tejidos	57
3. Producción de inóculo	64
IV. Plan de trabajo	69
V. Material y Métodos	71
A. Estudio de los factores que afectan al desarrollo de <i>Glomus mosseae</i> en condiciones axénicas	71
1. Parte general	71
1.1. Obtención de esporocarpos	71
1.2. Obtención de esporas	72
1.3. Esterilización de esporas	72
1.4. Germinación de esporas	73
1.5. Crecimiento del micelio	74
1.6. Cuantificación del micelio	75
1.7. Análisis estadístico de los datos	76
2. Descripción de los ensayos	76
2.1. Estudio de la interacción <i>Glomus mosseae</i> - microorganismos del suelo	76
2.1.1. Efecto de los microorganismos acompañantes de las esporas de <i>G. mosseae</i> sobre su desarrollo	76
2.1.2. Aislamiento de microorganismos acompañantes de <i>Glomus mosseae</i>	78
2.1.3. Selección de los microorganismos más eficaces en la estimulación del desarrollo de <i>G. mosseae</i>	79

2.1.4. Estudio de los mecanismos implicados en la influencia de los microorganismos sobre el desarrollo de <i>Glomus mosseae</i>	80
2.1.4.1. Degradación de sustancias autoinhibidoras producidas por <i>G. mosseae</i>	80
2.1.4.2. Producción de compuestos estimuladores	82
2.1.4.2.1. Producción de estimuladores volátiles	82
2.1.4.2.2. Producción de compuestos estimuladores que difunden al medio. Influencia de las fitohormonas sobre el desarrollo de <i>G. mosseae</i>	83
- Efecto de las auxinas	83
- Influencia de las citoquininas	84
- Efecto de las giberelinas	84
- Influencia de la aplicación conjunta de auxinas, citoquininas y giberelinas	85
2.1.4.2.3. Efecto del etileno sobre el desarrollo de <i>Glomus mosseae</i>	86
- Estudio de la producción de etileno por parte de las esporas de <i>Glomus mosseae</i>	86
- Efecto del etileno sobre la germinación y crecimiento del micelio de <i>Glomus mosseae</i>	87
2.2. Estudio del efecto de la presencia de superficies en el medio de cultivo sobre el desarrollo axénico de <i>G. mosseae</i>	89
- Ensayos con arcilla expandida	89
- Ensayos con vermiculita	89
- Estudio de la capacidad infectiva del micelio producido a partir de esporas de <i>Glomus mosseae</i> crecidas en presencia o ausencia de vermiculita	90
B. Estudio de la influencia de los hongos VA sobre el desarrollo de plantas de aguacate (<i>Persea americana</i> Mill) obtenidas por propagación vegetativa <i>in vitro</i>	92

1. Parte general	92
1.1. Planta hospedadora y proceso de micropropagación	92
1.2. Diseño experimental	93
1.3. Inóculo de micorriza	93
1.4. Condiciones de crecimiento	94
1.5. Determinaciones	95
2. Descripción de los ensayos	96
C. Estudios destinados a mejorar las técnicas de producción de inóculo de micorrizas VA	98
1. Parte general	98
1.1. Material vegetal	98
1.2. Sistema experimental y sustratos empleados	98
1.3. Inóculo de micorriza	99
1.4. Inóculo de <i>Rhizobium</i> spp.	99
1.5. Condiciones de crecimiento	100
1.6. Determinaciones	101
2. Descripción de los ensayos	102
VI. Resultados	105
A. Estudio de los factores que afectan al desarrollo de <i>Glomus mosseae</i> en condiciones axénicas	105
1. Estudio de la interacción <i>Glomus mosseae</i> -microorganismos del suelo	105
1.1. Efecto de los microorganismos acompañantes de las esporas de <i>Glomus mosseae</i> sobre su desarrollo	105
1.2. Selección de los microorganismos más eficaces en la estimulación del desarrollo de <i>Glomus mosseae</i>	111
1.3. Estudio de los mecanismos implicados en el efecto de los microorganismos sobre el desarrollo de <i>Glomus mosseae</i>	115
1.3.1. Producción de sustancias autoinhibidoras por <i>Glomus mosseae</i>	115
1.3.2. Producción de compuestos estimuladores volátiles	117

1.3.3. Influencia de las fitohormonas sobre el desarrollo de <i>Glomus mosseae</i>	123
- Efecto de las auxinas	123
- Efecto de las citoquininas	123
- Efecto de las giberelinas	123
- Influencia de la aplicación conjunta de auxinas, citoquininas y giberelinas	123
1.3.4. Estudio de la producción de etileno por parte de las esporas de <i>Glomus mosseae</i>	127
1.3.5. Efecto del etileno sobre la germinación y crecimiento del micelio de <i>Glomus mosseae</i>	129
2. Efecto de la presencia de superficies en el medio de cultivo sobre el desarrollo de <i>Glomus mosseae</i>	132
2.1. Ensayos con arcilla expandida	132
2.2. Ensayos con vermiculita	134
2.2.1. Estudio de la capacidad infectiva del micelio producido a partir de esporas de <i>Glomus mosseae</i> crecidas en presencia o ausencia de vermiculita	136
B. Estudio de la influencia de los hongos VA sobre el desarrollo de plantas de aguacate (<i>Persea americana</i> Mill.) obtenidas por micropropagación	139
C. Estudio destinados a mejorar las técnicas de producción de inóculo de micorrizas VA	153
VII. Discusión	162
VIII. Conclusiones	183
IX. Bibliografía	185

I. INTRODUCCION

I. INTRODUCCION

Las raíces de la mayoría de las plantas que crecen sobre la corteza terrestre están colonizadas biotróficamente por ciertos hongos del suelo, dando lugar a una simbiosis mutualística denominada, por ello, micorriza (del griego "mikos" -hongo- y "riza" -raíz-). Se trata de una simbiosis prácticamente universal, no solo porque casi todas las especies vegetales son susceptibles de formarla (aproximadamente en el 97% de las familias investigadas hasta la fecha se ha descrito la existencia de especies formadoras de micorrizas), sino también por su presencia en la mayoría de los hábitats naturales (Barea y Azcón-Aguilar, 1983).

En esta simbiosis el hongo coloniza biotróficamente la corteza de la raíz, a partir de la cual desarrolla un micelio externo altamente efectivo para la captación de nutrientes (Smith y Gianinazzi-Pearson, 1988). Así pues, la planta suministra al hongo sustratos carbonados procedentes de la fotosíntesis mientras que el micosimbionte ayuda al vegetal a captar nutrientes minerales del suelo (Harley y Smith, 1983). Se puede decir que el hongo es realmente una parte integrante del sistema radical trófico de la planta. En la actualidad se acepta que las micorrizas desempeñan un papel clave en el ciclado de nutrientes en el ecosistema y en la supervivencia de las plantas en condiciones de estrés (Safir, 1986).

Históricamente las micorrizas se han venido clasificando según su estructura y morfología en tres grupos fundamentales: Ectotróficas, Endotróficas y Ectendotróficas. Una característica común de los tres

tipos de asociaciones es que la colonización del hongo queda limitada a la corteza de las raíces no suberizadas de la planta hospedadora (Calvet, 1990).

En las micorrizas Ectotróficas, el hongo, normalmente de micelio tabicado, forma un auténtico manto de hifas que rodea la raíz. El desarrollo del hongo en el interior de la corteza es solamente intercelular, formando una red de hifas denominada "red de Hartig" (Harley y Smith, 1983). Este tipo de micorriza es propio de las coníferas y otras especies de interés forestal fundamentalmente. Los hongos responsables ("superiores") pertenecen a los Basidiomicetos y Ascomicetos, y más raramente a los Zigomicetos (Barea, 1990a).

En las Endotróficas, por el contrario, el hongo no forma manto sobre la raíz, ni red de Hartig, y la colonización de la corteza por las hifas del hongo puede ser inter- e intracelular. En este grupo se incluyen las micorrizas Vesículo-Arbusculares, formadas por hongos aseptados pertenecientes a los Zigomicetos, y las Orquidoides y Ericoides, establecidas entre hongos superiores (Ascomicetos y Basidiomicetos) y grupos reducidos de plantas, concretamente miembros de las familias Orquidaceae y Ericaceae respectivamente (Harley y Smith, 1983).

El grupo de las Vesículo-Arbusculares (VA) es el más común y universal de micorrizas, y se ha descrito en el 95% de las familias botánicas estudiadas (Trappe, 1986). Tan solo un reducido grupo de familias, fundamentalmente Chenopodiaceae, Cruciferae, Fumariaceae, Urticaceae y Poligonaceae, incluyen especies que normalmente no presentan micorrizas VA

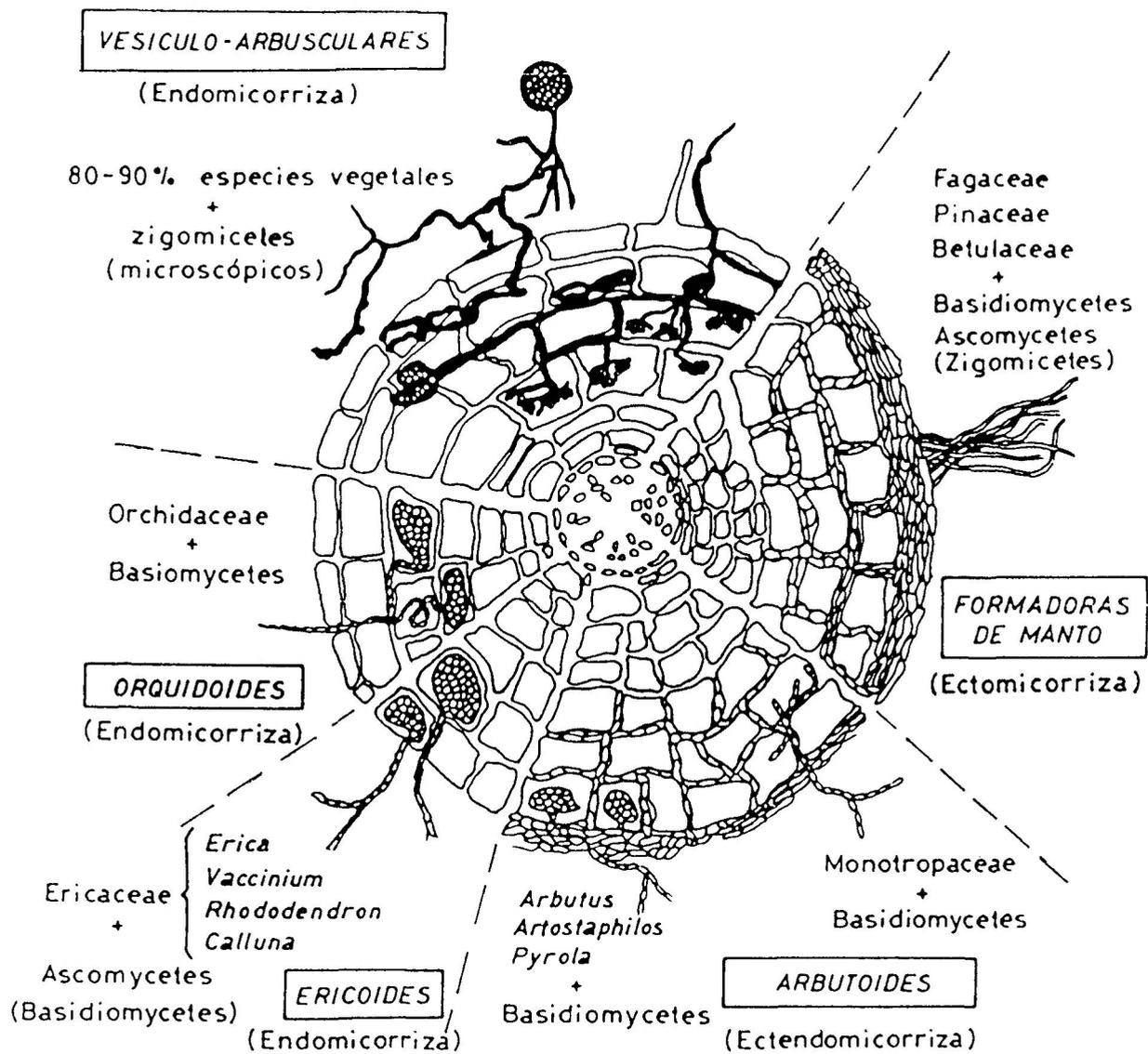
(Trappe, 1986).

El nombre de este tipo de micorrizas procede de sus estructuras características, los "arbúsculos", que se originan por división dicotómica repetida de hifas intracelulares, y las "vesículas". En un sentido más estricto debieran de ser llamadas micorrizas Arbusculares, ya que son los arbúsculos las unidades fisiológicas claves de la simbiosis, a través de los cuales se realiza el intercambio de nutrientes, y es el único elemento común a este tipo de micorriza puesto que algunos de los hongos que forman esta asociación no desarrollan vesículas dentro de la raíz (Morton, 1990).

Por último están las Ectendomicorrizas o micorrizas Arbutoides, con características estructurales comunes a ecto- y endo- micorrizas. Presentan manto externo y las hifas intercelulares forman una red de Hartig bien desarrollada, pero el hongo puede colonizar intracelularmente la corteza de la raíz. Se encuentran fundamentalmente en el género *Arbutus* y en miembros de la familia Monotropaceae, en asociación con Basidiomicetos (Barea, 1990a).

En el Esquema 1 se muestran resumidamente los distintos tipos de micorrizas mencionados (tomado de Barea, 1990a).

El estudio que se presenta en esta MEMORIA se centra en las micorrizas vesículo-arbusculares. La importancia ecológica y económica de este tipo de micorrizas está avalada por su presencia en más del 80% de las especies vegetales existentes, entre las que se incluyen plantas de gran interés agronómico. Entre otras son plantas formadoras de micorrizas VA las



Esquema 1. Representación gráfica de las características fundamentales de los distintos tipos de micorrizas.

leguminosas herbáceas y muchas leñosas, cereales, árboles frutales, plantas de interés industrial, como el algodón y tabaco, hortícolas, ornamentales y también muchas de interés forestal (Barea, 1990b).

A pesar de lo indicado anteriormente en relación al nombre que debe recibir esta asociación ("Arbusculares"), en la presente Memoria se va a utilizar la denominación "Vesículo-Arbuscular"(VA), ya que este es el término empleado en la actualidad y con el que aparece citado este tipo de micorrizas en la bibliografía científica.

II. OBJETIVOS E INTERES DEL TRABAJO

II. OBJETIVOS E INTERES DEL TRABAJO

Existe evidencia experimental de que las micorrizas VA son tan antiguas como las propias plantas, con las cuales han coevolucionado. La existencia de tal coevolución ha dado lugar a diversas interdependencias planta-hongo formador de micorrizas VA (en adelante hongo VA), de forma que hoy se sabe que la mayoría de las plantas necesitan, en mayor o menor grado, estar micorrizadas para captar nutrientes y crecer adecuadamente. Sin embargo, la dependencia es aún más marcada por parte de los hongos VA, ya que no se ha logrado evidenciar que éstos sean capaces de completar su ciclo de vida en ausencia de la planta hospedadora, por lo que estos hongos deben ser considerados actualmente simbioses obligados.

La búsqueda de los factores necesarios que permiten el crecimiento independiente del hongo constituye un tema de estudio de considerable interés, no sólo en lo referente a conocer ciertos aspectos que aún se ignoran, o se conocen de forma fragmentaria, sobre la biología y ecología de hongos y micorrizas VA (MVA), sino también por las repercusiones de índole aplicada derivadas de la obtención de cultivos *in vitro* de estos microorganismos.

En la Estación Experimental del Zaidín (U.E. de Microbiología) se llevan a cabo investigaciones para promover el crecimiento del hongo en ausencia de la planta, estudiar las causas de la dependencia e intentar la micorrización en condiciones controladas. Empleando diversos sistemas de estudio se ha conseguido estimular el crecimiento no-simbiótico (saprofítico) del hongo VA, pero no se ha logrado evidenciar que, *in*

vitro, este sea capaz de completar su ciclo de vida, por ello es importante proseguir la investigación en este sentido.

De otro lado, en los últimos años se está obteniendo experiencia en una metodología de investigación, interconectada con lo anterior, y que ahora se pretende establecer en este Departamento. La idea base es hacer prosperar y mantener el hongo VA en plantas propagadas axénicamente, o bien por cultivo de tejidos u órganos vegetales. Como consecuencia de esto se vislumbra, además, un aspecto práctico que se considera cargado de interés: La producción de plantas obtenidas por micropropagación, o en general por cualquier procedimiento en el que el desarrollo de la planta ocurra en condiciones axénicas, en las que el sistema radical porte una micorrización optimizada.

Como es conocido, las técnicas de micropropagación *in vitro* de plantas llevan consigo el hecho de que, durante un periodo de tiempo relativamente largo, ese material se desarrolla en ausencia de microorganismos, y por tanto de hongos VA. La situación se prolonga normalmente en las fases subsiguientes de crecimiento de las plántulas en medios inertes o fumigados. Está claramente demostrado que la micorrización, especialmente en plantas de interés hortofrutícola, debe producirse en los primeros estadios del desarrollo, ya que la micorrización ayuda a iniciar el crecimiento y coopera a evitar los riesgos del trasplante. De aquí el interés práctico de las acciones que se abordan en el presente estudio.

La investigación que se propone esta basada, en esencia, en el desarrollo de biotecnología apropiada

para acometer unos estudios de tipo básico y otros de índole aplicable, de acuerdo con los objetivos concretos siguientes:

- (1) Proseguir en la búsqueda de factores y/o condiciones que favorezcan el desarrollo de los hongos VA en ausencia de la planta hospedadora.
- (2) Producción de plantas micropropagadas con un nivel de micorrización optimizado para su uso en hortofruticultura.
- (3) Mejorar los sistemas actuales de producción de inóculo de hongos VA.

III. REVISION BIBLIOGRAFICA



III. REVISION BIBLIOGRAFICA

A. ASPECTOS GENERALES DE LAS MICORRIZAS VA

1. Características de la simbiosis

Origen de las micorrizas VA

El origen de las micorrizas VA parece ser tan antiguo como el de las propias plantas, como se deduce del estudio de los primeros registros de fósiles vegetales que se conservan. El fósil Rhynie, datado de 370 millones de años, y otros posteriores, muestran estructuras fúngicas en sus primitivas "raíces" similares a las de las actuales micorrizas (Nicolson, 1975; Stubblefield *et al.*, 1987; Boullard, 1988; Stubblefield y Taylor, 1988; Pirozynski y Dalpé, 1989). Se acepta actualmente que la colonización de los ecosistemas terrestres a partir de un medio acuático, y la evolución de las plantas, fue posible gracias al establecimiento de relaciones simbióticas entre un alga ancestral semiacuática y un hongo que le ayudó a superar los problemas de adquisición de agua y nutrientes minerales inherentes a un hábitat terrestre (Pirozynski y Malloch, 1975; Malloch *et al.*, 1980; Pirozynski y Dalpé, 1989). Desde entonces plantas y hongos formadores de micorrizas VA (hongos VA en adelante) han evolucionado conjuntamente, lo que ha dado lugar a que se establezcan una serie de dependencias entre ambos simbioses. Así, muchas plantas son incapaces de alcanzar un desarrollo óptimo, e incluso en algunos casos extremos de crecer, salvo que estén micorrizadas (Barea *et al.*, 1984). Sin embargo, esta dependencia es aún mayor para los hongos

VA puesto que no se ha conseguido que completen su ciclo de vida en ausencia de la planta hospedadora, por lo que hay que considerarlos en la actualidad como simbioses fisiológicamente obligados (Hepper, 1984a; Azcón-Aguilar *et al.*, 1991).

Propiedades simbióticas de las micorrizas VA

Como en toda simbiosis en micorrizas VA son característicos ciertos fenómenos o propiedades simbióticas relacionadas con conceptos tales como micotrofia, dependencia, reconocimiento, compatibilidad, especificidad, etc, todos ellos aspectos importantes en la formación, desarrollo y efecto de las micorrizas VA (Barea, 1990a y b).

Del significado ecofisiológico de la simbiosis surge el concepto de "micotrofia" o capacidad de la planta para adquirir nutrientes por medio del hongo. Las distintas especies cultivadas o ecotipos vegetales difieren en el grado en el que necesitan estar micorrizadas para sobrevivir, mejorar su estado nutritivo o alcanzar su "cosecha máxima relativa" (Baylis, 1975; Hayman, 1983). Esto es lo que se conoce como grado de dependencia de las plantas a las micorrizas.

En esta simbiosis no existe "especificidad" en sentido estricto (Barea, 1990b). La mayoría de las plantas pueden ser colonizadas por distintos hongos VA y, de otra parte, un mismo hongo puede colonizar sistemas radicales pertenecientes a una amplia variedad de especies vegetales diferentes (Mosse *et al.*, 1981). No obstante, las distintas especies, e incluso

cultivares o ecotipos de una misma, muestran un grado diferente de "susceptibilidad" a la colonización por un hongo VA determinado (Hayman, 1983). Aunque el genotipo de la planta hospedadora resulta crítico para definir el nivel máximo relativo de colonización VA que puede soportar, las distintas especies de hongos pueden mostrar una capacidad de colonización diferente para un mismo hospedador (Hayman, 1983; Gianinazzi-Pearson y Gianinazzi, 1988), lo cual se interpreta como diferencias en el grado de compatibilidad entre la planta y los distintos hongos VA.

Los fenómenos de reconocimiento entre simbioses en micorrizas VA son un tema de investigación abierto ya que se ignoran, o se conocen mal, muchos aspectos relacionados con el estadio del proceso de formación de la simbiosis en el cual se manifiestan, así como las bases moleculares que los justifican. Se acepta la existencia de fenómenos de reconocimiento a varios niveles: Contacto célula a célula, morfogénesis del hongo y respuesta al hospedador según la zona de la corteza colonizada, integración fisiológica de ambos simbioses y redistribución de actividades enzimáticas implicadas en la transferencia de nutrientes (Harley y Smith, 1983; Gianinazzi-Pearson, 1984; Smith y Gianinazzi-Pearson, 1988; Barea, 1990b).

El concepto de "susceptibilidad" antes expuesto se matiza con el de "compatibilidad", el cual va a ser un reflejo del grado de integración de los genomas de ambos componentes de la simbiosis, modulado por los factores edáficos y ambientales. El nivel de complementación entre el metabolismo del hongo y la planta va a determinar la "compatibilidad funcional" de la simbiosis, que junto con la "efectividad" del hongo

en la captación de nutrientes condicionan la "eficacia simbiótica", la cual contempla, fundamentalmente, la nutrición de la asociación, con especial referencia a la respuesta de la planta a la formación de la simbiosis.

Así pues, es obvio que la formación y desarrollo de las micorrizas VA va a depender de una serie de interacciones complejas entre el hongo y la planta, que a su vez van a estar influenciadas por el medio ambiente circundante (Hayman, 1983).

2. Formación de micorrizas VA

Estadios de precolonización

Las principales fuentes de inóculo MVA en suelo son las esporas de los hongos VA y las raíces previamente micorrizadas de plantas coexistentes, o fragmentos de las preexistentes (Hayman, 1982; Daniels, 1984). Se acepta que los fragmentos de raíz micorrizada son un inóculo más "infectivo" que el de las esporas, pero estas poseen una capacidad de supervivencia, incluso en condiciones adversas, que las hace responsables de perpetuar las MVA (Hayman, 1982; Daniels, 1984).

Las esporas de resistencia germinan cuando las condiciones del suelo son favorables, fundamentalmente en lo que respecta a humedad y temperatura. En algunos trabajos se ha descrito una estimulación de la germinación de las esporas inducida por los exudados radicales de plantas hospedadoras (Graham, 1982) o inhibición por productos volátiles, en el caso de

plantas que no son susceptibles de formar micorrizas VA (El-Atrach *et al.*, 1989).

Recientemente se ha detectado también que compuestos de tipo flavonoide excretados por fragmentos de raíces de alfalfa infectadas con *Glomus* sp. *in vitro* promueven la germinación de las esporas, el desarrollo de las hifas y la ramificación del micelio (Phillips y Tsai, 1990).

Los microorganismos del suelo pueden también, en determinadas circunstancias, acelerar el ritmo de germinación de las esporas (Azcón-Aguilar *et al.*, 1986a) y en presencia de algunos compuestos tóxicos ayudar a las esporas a superar la inhibición inducida por los mismos (Azcón-Aguilar *et al.*, 1986b).

En general, sin embargo, la germinación parece ser un proceso endógeno y en ausencia de planta o de cualquier otro microorganismo, es posible conseguir un 100% de germinación, proporcionando simplemente unas condiciones fisico-químicas adecuadas (Azcón-Aguilar *et al.*, 1986a).

Después de la germinación de la espora las hifas se desarrollan de forma radial y colonizan la zona del suelo que las rodea (Sanders y Sheikh, 1983). Los tubos de germinación crecen a expensas de las reservas del propágulo y no muestran tendencia direccional hacia la raíz. En general se acepta que llegan a la rizosfera erráticamente (Powel, 1976; Barea, 1986; Bécard y Fortin, 1988; Glenn *et al.*, 1988; Bécard *et al.*, 1988). Tan solo en una ocasión se ha descrito el crecimiento dirigido del tubo de germinación de *Gigaspora margarita* hacia la raíz de una planta susceptible (Koske, 1982),

efecto que fue atribuido a la producción de un estimulador volátil por parte de la raíz.

Una vez en la rizosfera el micelio es estimulado por los exudados radicales presentes en la zona y comienza a ramificarse profusamente (Barea, 1986; Elias y Safir, 1987; Glenn *et al.*, 1988; Bécard y Piché, 1989a). Los microorganismos del suelo pueden estar también implicados en la estimulación que el micelio experimenta al llegar a la rizosfera, dado que en esta zona, influenciada por los exudados de la planta, es en donde se concentra mayor actividad microbiana (Azcón-Aguilar y Barea, 1985; Barea, 1986; Azcón, 1987).

La ramificación inducida en la rizosfera favorece el contacto del hongo con la raíz y una vez establecido éste se forma un apresorio, a partir del cual se produce la penetración del hongo (Bonfante-Fasolo, 1984). El inicio de la infección conduce a un crecimiento acelerado del micelio del hongo (Glenn *et al.*, 1988; Bécard y Piché, 1989a), lo que indica un intercambio de compuestos químicos o de señales desde los primeros estadios de formación de la simbiosis.

Inicio de la colonización de la raíz por el hongo

En general se acepta que la colonización puede ocurrir en regiones de la raíz con distinto nivel de organización citológica (Buwalda *et al.*, 1984; Hepper, 1985; Smith *et al.*, 1986). El hongo expresa un mecanismo de reconocimiento al contactar con la raíz mediante el ensanchamiento apical de la hifa que va a penetrar en la misma, dando lugar al apresorio. A



partir de este se origina una hifa de penetración que puede entrar a la raíz por los espacios intercelulares, o penetrar la pared celular de las células epidérmicas o los pelos radicales (Bonfante-Fasolo, 1984). Se sabe que el "sitio" de penetración debe ser fisiológicamente activo, ya que el hongo no penetra ni por heridas ni por zonas dañadas de la raíz (Hayman, 1983).

Los mecanismos de entrada del hongo no están todavía claros. Según algunos autores podría tratarse de un proceso meramente mecánico, mediante la presión ejercida por la hifa de penetración (Harley y Smith, 1983). Sin embargo, parece lógico pensar que en la penetración de los tejidos de la raíz por el hongo debe de haber implicados enzimas líticos. La producción de estos debe de ser muy baja debido a las dificultades para evidenciarlos y a la limitada capacidad saprofítica de los hongos VA (Harley y Smith, 1983). Sin embargo, estudios recientes llevados a cabo en nuestro laboratorio sugieren la producción de enzimas hidrolíticos, tales como pectinasas, celulasas y hemicelulasas, por esporas del hongo VA *Glomus mosseae* (García-Romera, 1990; García-Romera et al., 1990).

Aunque en los primeros estadios de colonización de la raíz por los hongos VA se ha detectado cierta actividad peroxidásica ligada a la pared celular, lo cual se interpreta como un mecanismo inicial de defensa de la planta frente a una agresión externa, no se ha puesto de manifiesto una respuesta defensiva del vegetal durante la penetración intracelular del hongo. Esto apoya el elevado grado de compatibilidad existente entre ambos miembros de la simbiosis (Spanu y Bonfante-Fasolo, 1988).

La hifa de penetración que se origina crece, normalmente por los espacios intercelulares, se ramifica y a partir de ella se forma lo que se conoce como una "unidad de infección" (Wilson, 1984).

En las células mas externas del parénquima cortical las hifas pueden penetrar y formar una especie de lazadas u ovillos que pueden estar implicados en el intercambio de nutrientes, pero cuya función concreta no está completamente establecida (Bonfante-Fasolo, 1984).

Cuando las hifas alcanzan las zonas más internas de la corteza de la raíz, el hongo desarrolla una intensa colonización intracelular, que adquiere su máxima expresión con la formación de los arbúsculos. Estos se producen por ramificación dicotómica repetida de hifas intracelulares (Barea, 1990b). Es característico que la hifa de penetración, y todas sus ramificaciones, quedan rodeadas por el plasmalema de la célula hospedadora, que se invagina y crece alrededor del hongo sin que se produzca en ningún momento la perforación del mismo (Gianinazzi-Pearson y Gianinazzi, 1989). Debido a la proliferación de las membranas del hospedador para rodear las hifas intracelulares en el arbúsculo, se desarrolla una extensa superficie de contacto entre ambos organismos (Toth y Miller, 1984; Alexander *et al.*, 1988 y 1989).

Generalización de la colonización de la raíz

En un estadio posterior al desarrollo de los arbúsculos se forman las vesículas. Estas aparecen a lo largo de toda la raíz, entre las células corticales o

dentro de ellas, unidas a las hifas internas, en posición generalmente terminal. Se supone que actúan como órganos de almacenamiento de reservas que son fundamentalmente lipídicas (Jabaji-Hare *et al.*, 1984). La cantidad de vesículas dentro de la raíz va a depender, en primer lugar, del hongo causante de la colonización, ya que, como se ha indicado previamente, algunos de ellos no son capaces de producirlas, y, dentro de una determinada combinación hongo-planta, de la edad fisiológica de la simbiosis.

A medida que se generaliza la colonización se produce un gran desarrollo de las hifas del hongo VA que emergen desde la raíz hacia el suelo, formándose así una extensa red de micelio externo o extrarradical, capaz de explorar un volumen de suelo adicional, al que no pueden acceder las raíces por sí solas (Abbott y Robson, 1985). En resumen, se puede decir que la red de hifas del hongo puede explorar hábitats más allá de la zona de agotamiento en nutrientes que rodea a la raíz y que, de esta forma, se incrementa notablemente la capacidad de captación de nutrientes por la planta.

Con respecto a los cambios citológicos, es de destacar que estos son conducentes a facilitar el intercambio de nutrientes entre simbiosis. Así, las paredes de las hifas intracelulares tienen menor cantidad de quitina que las de las externas, y el citoplasma contiene una gran cantidad de mitocondrias, implicadas en un metabolismo energético muy activo. Ello, junto con la presencia de sistemas enzimáticos característicos permite llevar a cabo una captación de nutrientes altamente eficaz (Bonfante-Fasolo, 1984).

3. Fisiología de las micorrizas VA

Estudios histoquímicos y al microscopio electrónico muestran al arbusculo como una estructura especializada, con una gran actividad metabólica y bien adaptado para el intercambio de nutrientes entre el hongo y la planta, por lo que se asume que es aquí donde este tiene lugar preferentemente (Cox y Sanders, 1974; Cooper, 1984; Smith y Gianinazzi-Pearson, 1988).

Entre el plasmalema del hospedador y la pared del hongo se desarrolla una interfase en la que se acumulan vesículas membranosas y depósitos de un material continuo con la pared de la célula hospedadora, constituido fundamentalmente por fibrillas de polisacáridos dispersas, similares a los precursores de la pared celular del hospedador (Dexheimer *et al.*, 1979; Dexheimer *et al.*, 1986). En esta matriz interfacial se acumulan igualmente pequeñas cantidades de galactosa y N-acetilgalactosamina (este último de origen fúngico) de función desconocida hasta la fecha (Jabaji-Hare *et al.*, 1990).

El metabolismo relacionado con la síntesis de la pared celular en el hongo se modifica cuando este se desarrolla dentro la raíz, de forma que la pared gruesa, fibrilar y quitinosa de las hifas extrarradicales queda reducida a nivel de los arbusculos a una capa no quitinosa, muy simple, delgada y amorfa (Bonfante-Fasolo y Grippiolo, 1982; Bonfante-Fasolo, 1987 y 1988). Estas alteraciones conducen a un incremento de la plasticidad del hongo, facilitándose así el intercambio de nutrientes y el crecimiento continuo del mismo. De igual forma, la cantidad de material similar al de la pared depositado

por el hospedador alrededor de las hifas del hongo disminuye a nivel del arbúsculo. Así pues se produce un acúmulo de este material en la base del tronco del mismo, el cual conecta con la pared primaria del hospedador. Esta capa se va haciendo más delgada, hasta desaparecer prácticamente a nivel de las ramificaciones más finas del arbúsculo (Dexheimer *et al.*, 1979; Smith y Gianinazzi-Pearson, 1988).

De esta manera, entre ambos simbioses se establece una interfase constituida por el plasmalema del hospedador, la matriz interfacial, la pared del hongo, muy precaria como hemos indicado, y la membrana plasmática del mismo. Las barreras que suponen las paredes celulares entre los simbioses quedan pues reducidas a un mínimo (Bonfante-Fasolo, 1984; Smith y Gianinazzi-Pearson, 1988).

Se acepta que el hospedador afecta la morfogénesis del hongo (Bonfante-Fasolo y Gianinazzi-Pearson, 1986; Bonfante-Fasolo, 1987; Lackie *et al.*, 1987). Concretamente se ha sugerido que la planta hospedadora podría modular la síntesis de quitinasa. Esta enzima, producida por los hongos controla el crecimiento y la ramificación de los mismos, mientras que si es producida por la planta puede controlar el ataque de hongos patógenos. En micorrizas VA la actividad quitinasa es de origen tanto fúngico como vegetal (Bonfante-Fasolo, 1987) y parece lógico relacionar su presencia con los fenómenos de ramificación y pérdida de estructura fibrilar de la pared característica del arbúsculo.

Las membranas del hongo y de la célula hospedadora a nivel de la interfase del arbúsculo muestran rasgos

citológicos que sugieren que se trata de membranas normales y activas, y ambas poseen actividades ATPásicas, probablemente implicadas en el transporte de iones y otras sustancias (Marx *et al.*, 1982). Durante la formación del arbúsculo la actividad ATPásica de las células hospedadoras sufre una redistribución y se concentra en las membranas invaginadas alrededor de las hifas finas del arbúsculo, mientras que el plasmalema periférico, no invaginado, muestra una reducción de dicha actividad (Marx *et al.*, 1982; Smith y Smith, 1990). Este hecho, que no ha sido observado en otras colonizaciones intracelulares, implica una modificación de la membrana del hospedador alrededor del arbúsculo (Smith y Gianinazzi-Pearson, 1988).

La existencia de sistemas enzimáticos unidos a membranas, presentes tanto en el hospedador como en el hongo, garantiza un transporte activo y bidireccional de nutrientes entre ambos simbioses, en contraste con lo que ocurre en relaciones parasíticas, en donde la transferencia de nutrientes es unidireccional hacia el parásito (Smith y Smith, 1990; Gianinazzi-Pearson y Azcón-Aguilar, 1991).

La vida media del arbúsculo es muy corta, aproximadamente entre 4 y 10 días (Cox y Tinker, 1976; Alexander *et al.*, 1988 y 1989). Cuando este degenera los nutrientes presentes en sus ramificaciones pueden ser reabsorbidos por el hongo, o pasar al espacio apoplástico, en donde quedan disponibles a la célula hospedadora. En un principio se sugirió que la transferencia de nutrientes desde el hongo al hospedador ocurría fundamentalmente mediante la degeneración del arbúsculo. Se ha calculado sin embargo que este procedimiento puede justificar tan solo un 1%

del flujo de entrada de nutrientes a través del hongo (Cooper, 1984). Por lo tanto, la transferencia de metabolitos entre ambos simbioses debe tener lugar a través de las membranas intactas y estrechamente asociadas de ambos, cuando el arbusculo es maduro e incluso en formación (Gianinazzi-Pearson y Azcón-Aguilar, 1991).

Trabajos recientes (Alexander *et al.*, 1988 y 1989) en los que se estudia la dinámica del desarrollo de los arbusculos producidos por un mismo hongo en distintos hospedadores, muestran que el tiempo al cual comienzan a degenerar es similar en las distintas células hospedadoras, lo que sugiere que el desarrollo de los arbusculos y su degeneración están bajo control fúngico. Sin embargo, los cambios inducidos en el citoplasma del hospedador dependen tanto del hongo VA como de la planta implicada.

4. Estructura y citología de micorrizas VA

En plantas micorrizadas se producen diversos cambios anatómicos a nivel de la raíz (Bonfante-Fasolo, 1984), mientras que la parte aérea no sufre alteraciones destacables. Recientemente se han descrito cambios a nivel de la organización celular del meristemo apical y cilindro vascular de raíces colonizadas con micorrizas VA (Fusconi *et al.*, 1986). La micorrización parece detener la actividad meristemática, haciendo decrecer el índice mitótico medio y formándose, consecuentemente, un tejido parenquimatoso en los ápices radicales.

A nivel celular los cambios mas destacados ocurren

en la corteza de la raíz. En las células más externas se forman los "ovillos" y la célula colonizada experimenta algunos cambios. El núcleo, mitocondrias y retículo endoplasmático se distribuyen en la periferia de la célula, asociados a las hifas del hongo, y la vacuola, de considerable tamaño, permanece en el centro.

Las células de la corteza interna muestran cambios más profundos como consecuencia de la formación de los arbusculos. Se produce un aumento del volumen citoplasmático, que se multiplica hasta por ocho veces, y el plasmalema incrementa por más de diez veces su superficie como consecuencia de la invaginación que experimenta alrededor de las ramificaciones del arbusculo (Alexander *et al.*, 1988 y 1989). El núcleo aumenta también de volumen y esto es debido probablemente a un menor grado de condensación de la cromatina ya que no hay evidencia de que se produzca una endorreplicación del ADN (Blair *et al.*, 1988), ni de que haya un mayor contenido en ADN en las células colonizadas (Berta *et al.*, 1990a). El citoplasma contiene un número elevado de mitocondrias y el retículo endoplasmático se encuentra bien desarrollado (Gianinazzi-Pearson, 1986; Boudarga y Dexheimer, 1988), lo cual indica un incremento de la actividad metabólica celular. La vacuola disminuye notablemente su volumen, pero al fragmentarse en vacuolas más pequeñas, se puede llegar a duplicar la superficie del tonoplasto. Los gránulos de almidón desaparecen debido probablemente a una alteración del metabolismo carbonado de la célula hospedadora, como consecuencia de la demanda de productos carbonados por parte del hongo (Nemec, 1987; Dexheimer *et al.*, 1990).

En contraste con los cambios considerables que se producen en la pared del hongo a medida que coloniza la raíz, la de la célula hospedadora sufre pocas modificaciones. Observaciones recientes (Bonfante-Fasolo *et al.*, 1988) indican que el hongo induce alteraciones en la textura de la pared vegetal al penetrar en las células corticales, pero en ningún momento la pared celular de la planta ejerce una función de defensa como ocurre frente a patógenos (Spanu y Bonfante-Fasolo, 1988). Parece haber, por lo tanto, un elevado grado de compatibilidad en las relaciones hongo-planta a nivel celular. Esto está apoyado por los estudios realizados por Maffei y colaboradores (1986) en los que se observa que la célula vegetal no produce ni callosa ni compuestos fenólicos cuando el hongo penetra la pared e infecta la célula. En cualquier caso, parece claro que los modelos de penetración y colonización del hongo, y la respuesta de la planta son dependientes no sólo del hospedador sino también del tejido a colonizar (Bonfante-Fasolo, 1987 y 1988).

5. Consecuencias de la formación de micorrizas sobre la fisiología de la planta

Efecto de las MVA sobre la producción de biomasa

En numerosos trabajos de investigación se ha puesto de manifiesto un efecto positivo de los hongos VA en la estimulación del ritmo de crecimiento de la planta (Harley y Smith, 1983) y, consecuentemente, en el incremento de la producción de biomasa. Este efecto es más destacado en suelos de baja fertilidad, especialmente cuando el nivel de P asimilable es bajo

(Abbott y Robson, 1984). La causa fundamental de este hecho es que las micorrizas mejoran la nutrición mineral de la planta (Hayman, 1983), aunque como consecuencia de la formación de la simbiosis se producen diversos cambios fisiológicos que, en mayor o menor grado, contribuyen al incremento del crecimiento (Smith y Gianinazzi-Pearson, 1988).

En plantas micorrizadas no solo incrementa la producción de biomasa, sino que también se afecta la distribución de la misma entre parte aérea y raíz, con beneficio para la parte autotrófica (Smith, 1980). La relación peso fresco a peso seco suele ser también mayor en presencia de micorrizas (Stribley y Snellgrove, 1985).

Efecto sobre la adquisición de nutrientes

Para entender mejor el efecto de las micorrizas sobre la captación de nutrientes se van a hacer previamente unas consideraciones sobre los mecanismos que rigen su adquisición por las plantas.

La captación de nutrientes a partir del suelo va a depender, fundamentalmente, de la llegada de los mismos a la superficie de la raíz y de su ritmo de absorción por la misma. La velocidad de llegada está determinada, a su vez, por la concentración del nutriente en la solución del suelo, lo cual va a estar influenciado por la capacidad de tamponamiento de este para amortiguar las variaciones que se produzcan en dicha concentración, y por la velocidad de desplazamiento del nutriente a través de la solución del suelo (Barea, 1990b; Gianinazzi-Pearson y Azcón-Aguilar, 1991).

De otro lado, la capacidad de la planta para captar los diferentes elementos minerales va a depender de las características morfológicas y geométricas del sistema radical, lo cual determinará sus posibilidades para explorar el suelo en busca de nutrientes, y también de las características fisiológicas y bioquímicas, que van a influenciar la cinética de absorción.

Existen diferencias notables entre los distintos elementos minerales en cuanto a su presencia relativa en el suelo y la velocidad de desplazamiento a través del mismo (Nye y Tinker, 1977).

El ión fosfato, y en menor medida el amonio, son nutrientes que difunden lentamente en la solución del suelo, de forma que su difusión hacia la superficie de la raíz es el paso limitante de su absorción por la planta, más que la capacidad de ésta para captarlo (Tinker, 1980; Tinker y Gildon, 1983). La velocidad de captación por parte de la planta es mayor que la de difusión hacia la superficie de la raíz. Ello conduce a la formación de una zona de agotamiento en dicho nutriente alrededor de la misma (Barea y Azcón, 1989).

Adquisición de fosfato

En la actualidad está completamente establecido que las micorrizas captan fosfato, y algunos otros nutrientes del suelo, más eficientemente que las raíces por si solas (Gianinazzi-Pearson y Azcón-Aguilar, 1991).

Las diferencias entre plantas MVA y controles no micorrizados son más acusadas en suelos bajos en fósforo asimilable y decrecen al aumentar los aportes de P soluble, respondiendo más las plantas no micorrizadas a las aplicaciones de fertilizantes (Gianinazzi-Pearson y Azcón-Aguilar, 1991).

Se sabe que las hifas de la micorriza son capaces de desarrollarse y captar fósforo más allá de la zona de deficiencia en fósforo soluble que rodea la raíz, superando así los problemas mencionados anteriormente (Hayman, 1983). Los hongos VA pueden absorber y translocar grandes cantidades de fósforo a través de sus hifas y transferirlo a las células de la planta, a través de los arbuscúlos, en zonas bien definidas de los tejidos radicales (Gianinazzi-Pearson y Gianinazzi, 1986). La interacción hongo-hospedador a nivel intracelular, y el gran aumento en la superficie de las membranas que supone la formación de los arbuscúlos, representa un incremento notable en la superficie de raíz implicada en la absorción de fósforo por la planta.

Globalmente el proceso de transporte de P se divide en tres fases diferentes:

a) Absorción de P por las hifas: Se lleva a cabo mediante un mecanismo activo a nivel del plasmalema del hongo, en contra de un gradiente de concentración de 1 a 1000 entre el suelo y la hifa. Por similitud a lo que ocurre en otros organismos, se supone que la entrada del ion fósforo a la hifa del hongo debe ir acoplada a una entrada de protones, constituyendo un sistema simporte dependiente de una ATPasa translocadora de H^+ (Beever y Burns, 1980; Clarkson,

1985; Smith y Smith, 1990).

b) Translocación de P a lo largo de las hifas: Las hifas de los hongos VA acumulan el P en forma de polifosfato, osmóticamente inactivo. Los gránulos de polifosfato, libres en el citoplasma o incluidos en las vacuolas, circulan por las hifas en dirección hacia la raíz (Cappacio y Callow, 1982; Barea, 1990b). Se ha puesto de manifiesto la existencia de corrientes citoplasmáticas bidireccionales en las hifas de los hongos VA, así como la de un flujo masivo a favor de un gradiente de concentración citoplasmático (Cox *et al.*, 1980; Tinker, 1980; Harley y Smith, 1983). Todo ello contribuye a la translocación del fosfato a través de las hifas del hongo, hacia los tejidos más internos de la raíz. La actividad de la MVA se autoregula, según la disponibilidad de P en el suelo, por acción de unos mecanismos enzimáticos que se expresan en la formación (fijación de P_i citoplasmático) o degradación (liberación de P_i) de gránulos de polifosfato (Gianinazzi-Pearson y Azcón-Aguilar, 1991). Estudios bioquímicos implican en este proceso a una fosfatasa alcalina asociada de forma característica a las vacuolas del hongo (Gianinazzi-Pearson y Gianinazzi, 1978; Gianinazzi *et al.*, 1979; Gianinazzi-Pearson y Azcón-Aguilar, 1991).

c) Transferencia de P a la planta: Los gránulos de polifosfato desaparecen en las ramificaciones finas del arbúsculo, lo que sugiere que están siendo degradados mediante la actividad de sistemas enzimáticos específicos (Barea, 1990b). El fosfato liberado se acumula en el citoplasma del hongo adyacente a la célula hospedadora y, siguiendo un gradiente de concentración favorable, pasa de forma pasiva al

espacio apoplástico. De allí es captado por el hospedador mediante mecanismos activos dependientes de energía.

Se ha sugerido igualmente que la transferencia de P a la planta estaría acoplada a la transferencia de carbohidratos desde el hospedador, aunque no hay evidencias que justifiquen este hecho (Harley y Smith, 1983; Smith y Smith, 1990).

Nutrición nitrogenada en MVA

Diversos experimentos han evidenciado un incremento en la concentración de N en plantas micorrizadas. Este efecto puede tener diversas causas. Unas indirectas, que operan en leguminosas y actinorrizas y que están basadas en la estimulación de la fijación simbiótica de N_2 (FSN₂); y otras directas, basadas en el incremento de la captación de compuestos nitrogenados, posiblemente amonio, a partir del suelo (Barea y Azcón-Aguilar, 1983; Barea *et al.*, 1987; Barea *et al.*, 1989a y b). Concretamente, en las dos últimas publicaciones citadas se presente evidencia isotópica (¹⁵N) del efecto de las MVA en la nutrición nitrogenada de las plantas.

El efecto sobre la fijación simbiótica de N_2 parece deberse fundamentalmente a la mejora en la nutrición fosforada de la planta, debido a los elevados requerimientos en ATP de este proceso (Barea, 1990b). Igualmente podría ser debido a la captación por las micorrizas de otros elementos que en ocasiones pueden limitar la fijación de N_2 , como son por ejemplo el Fe o Mo (Munns y Mosse, 1980; Hayman, 1986; Rai, 1988). No

pueden descartarse, sin embargo, efectos directos de la micorriza sobre la actividad de los nódulos (Ames y Bethlenfalvay, 1987).

Con respecto a la captación de N del suelo, las micorrizas podrían jugar un papel importante en la captación de amonio por tratarse de un ión poco móvil, que puede originar zonas de deficiencia alrededor de las raíces. Las hifas del hongo no parecen representar, sin embargo, una ventaja importante en la captación de nitrato, debido a la facilidad de difusión de este nutriente en el suelo. Es por tanto en suelos ácidos, en los que la forma predominante de N es el amonio (Harley y Smith, 1983), donde las micorrizas podían mejorar significativamente la nutrición nitrogenada de las plantas.

Se han descrito también incrementos en plantas micorrizadas de actividades enzimáticas relacionadas con la asimilación del N (nitrato reductasa y glutamina sintetasa) (Smith *et al.*, 1985). Esto implica que una vez superado el estrés de la planta por P, la micorriza podría ayudar a satisfacer la mayor demanda de N.

Algunos autores han encontrado también mayor contenido en aminoácidos y un predominio de arginina y citrulina en raíces micorrizadas (Cooper, 1984).

Adquisición de otros nutrientes

Se ha puesto de manifiesto que las MVA incrementan la concentración foliar de Zn y Cu, independientemente del efecto mediado por la superación del estrés de P (Tinker y Gildon, 1983; Ames y Bethlenfalvay, 1987;

Manjunath y Habte, 1988; Bell *et al.*, 1989; Thompson, 1990). Este efecto era previsible dada la baja movilidad de dichos nutrientes en el suelo. También se han mostrado incrementos en la disponibilidad de Fe en algunos casos (Rai, 1988; Barea, 1990b).

Sin embargo, cuando la concentración de metales pesados, tales como Zn, Cd y Mn es muy alta, la presencia de MVA reduce su concentración en hoja (Heggo *et al.*, 1990). Así pues, se ha sugerido que las MVA actúan como un factor de amortiguación, y pueden proteger a la planta contra el efecto nocivo del exceso de metales en el suelo (Koomen *et al.*, 1990).

De otro lado el ión Ca^{++} suele ir asociado a los gránulos de polifosfato, por lo que la translocación de estos a través de las hifas justificaría igualmente su movimiento en raíces micorrizadas (Strullu *et al.*, 1981; Smith y Gianinazzi-Pearson, 1988; Barea, 1990b).

Se ha sugerido también que Br^- y Cl^- , y en general la suma total de aniones incrementan su concentración como respuesta a la formación de micorrizas, pero no a la adición de P (Buwalda *et al.*, 1982; Ames y Bethlenfalvay, 1987). Esto se interpreta en relación al mantenimiento del pH interno de la planta, el cual estaría regulado de forma distinta en plantas micorrizadas (Buwalda *et al.*, 1983).

Alteración de las relaciones hídricas

Las micorrizas vesículo-arbusculares mejoran la resistencia de las plantas al estrés hídrico. Esto se puede justificar por diferentes mecanismos. Uno

directo, incrementando la captación de agua a través de las hifas externas (Bethlenfalvay *et al.*, 1988), aunque no hay evidencia experimental clara que avale este hecho (Fitter, 1988), y otro indirecto como consecuencia de la mejora en la nutrición fosforada (Cooper, 1984), o de algún otro cambio fisiológico en la planta hospedadora que conduzca a un incremento de la resistencia a la sequía (Davies *et al.*, 1987; Augé, 1989; Augé y Stodola, 1990; Herderson y Davies, 1990).

Influencia de las MVA sobre la fotosíntesis del hospedador

La tasa fotosintética es normalmente mayor en plantas micorrizadas (Brown y Bethlenfalvay, 1987 y 1988), lo cual puede estar causado por una mejora en la nutrición fosforada. Se sabe, en efecto, que el fosfato es un activador de la fotosíntesis *in vivo*, y que una limitación en fosfato inorgánico reduce la actividad fotosintética. En consecuencia, el aporte de fósforo por acción de la micorriza puede promover un incremento en el ritmo de fijación de CO₂. Se ha sugerido, en cualquier caso, que la micorrización puede inducir en la planta la formación de compuestos capaces de influenciar la estructura y/o función de los cloroplastos, entre los cuales podrían encontrarse las fitohormonas (Brown *et al.*, 1988).

Resistencia a la salinidad en MVA

En suelos salinos las plantas muestran síntomas de toxicidad específicos, deficiencias y desequilibrios nutricionales, así como dificultades en la captación de

agua. La micorriza confiere a la planta una mayor tolerancia al estrés salino, con un consiguiente incremento de cosecha (Hirrel y Gerdemann, 1980; Pond *et al.*, 1984; Pfeiffer y Bloss, 1988; Estaun y Savé, 1990). El mecanismo por el que se ejerce esta acción no se conoce con exactitud, aunque la mejora en la nutrición fosforada de la planta debe estar implicada en este efecto (Hirrel y Gerdemann, 1980; Ojala *et al.*, 1983; Barea, 1990b).

Cambios en las relaciones hormonales

La micorrización altera el nivel de fitohormonas en los tejidos de la planta (Allen *et al.*, 1980; Allen *et al.*, 1982) y su transporte de unos tejidos a otros (Dixon *et al.*, 1988a). Concretamente, se han descrito incrementos en la concentración de citoquininas, aumento o disminución en el nivel de giberelinas, según el tejido implicado, y reducción en la concentración de ácido abscísico (Dixon, 1989; Baas y Kuiper, 1989). Esto puede explicarse en base a las diferencias fisiológicas existentes entre plantas micorrizadas y no micorrizadas. En cualquier caso, se ha puesto de manifiesto que el hongo formador de micorrizas VA *Glomus mosseae* es capaz de producir sustancias con actividad hormonal (Barea y Azcón-Aguilar, 1982), aunque no se ha evidenciado que el hospedador se beneficie de tal producción, si es que ocurre durante el desarrollo y función de la micorriza. Se ha demostrado, sin embargo, que la aplicación exógena de estos productos estimula el desarrollo y los efectos de las MVA (Azcón *et al.*, 1978).

Fisiología y bioquímica de la nutrición carbonada

Utilizando ^{14}C se evidenció que los requerimientos en carbono de los hongos de las MVA son satisfechos a expensas de la fotosíntesis del hospedador, y que muchos de los compuestos transferidos al hongo son convertidos rápidamente en metabolitos específicos suyos, fundamentalmente lípidos y glucógeno, que no pueden ser utilizados directamente por la planta hospedadora (Cooper, 1984). Recientemente se ha detectado también la presencia de trehalosa, disacárido específico de hongos, en hifas y esporas de hongos VA asociados con raíces (Bécard *et al.*, 1990). La transferencia de productos carbonados desde el hospedador al hongo se manifiesta en la desaparición de los gránulos de almidón de las células infectadas. De hecho, la formación de micorrizas estimula notablemente la actividad invertasa de la raíz (Dixon *et al.*, 1988b). Se ha propuesto también la utilización como fuente de carbono por parte del hongo, de los precursores, o componentes no polimerizados de la pared celular del hospedador que se acumulan en la matriz interfacial (Jeanmarie *et al.*, 1985).

Balance energético en plantas micorrizadas

La demanda de fotosintato por parte del hongo va a depender de la biomasa asociada con la raíz y su tasa metabólica (Gianinazzi-Pearson y Azcón-Aguilar, 1991). En el caso concreto de las leguminosas en doble simbiosis con su *Rhizobium* spp. específico y micorrizadas, se ha evidenciado un incremento del área foliar y también de la relación área foliar:peso seco de la planta, por lo cual la asimilación de C es

superior por unidad de peso frente a plantas controles noduladas y con adición de P, lo que compensaría el gasto de productos carbonados por parte del hongo (Harris *et al.*, 1985).

Depresiones del crecimiento inducidas por las micorrizas

En algunas ocasiones se han descrito reducciones del crecimiento de la planta como consecuencia de la formación de micorrizas (Cooper, 1984). Estas pueden ser transitorias, y ocurren durante los primeros estadios de formación de la simbiosis (cuando el hongo utiliza productos carbonados de la planta para su desarrollo inicial, sin que haya comenzado aún el aporte de nutrientes), o persistentes. Estas últimas tienen lugar normalmente cuando la planta crece en suelos de alto nivel de fertilidad, de forma que el aporte de nutrientes por parte del hongo se hace innecesario y no compensa el consumo de productos procedentes de la fotosíntesis (Gianinazzi-Pearson y Azcón-Aguilar, 1991).

B. BIOTECNOLOGIA EN MICORRIZAS VA.

1. Hongos formadores de micorrizas VA

Los hongos VA son habitantes comunes del suelo, por lo que es habitual encontrarlos en todos los ambientes ecológicos, incluso en los estresados por agentes o condiciones de diversa índole (Mosse *et al.*, 1981).

Como ya se ha mencionado anteriormente estos organismos no se han podido aislar en cultivo axénico. Este hecho limita enormemente las investigaciones que se llevan a cabo sobre ellos, lo que determina que se desconozcan aspectos básicos de su biología, o se conozcan de modo fragmentario, y dificulta además su aplicación en producción vegetal.

Puesto que uno de los objetivos de la presente Memoria es profundizar en el estudio de los factores que afectan al desarrollo de los hongos VA en ausencia de planta hospedadora, se resume a continuación la información disponible sobre el tema.

Taxonomía

Solo un reducido grupo de hongos es responsable de la formación de micorrizas VA. Se trata de hongos aseptados, incluidos en el grupo de los "hongos inferiores", antiguamente llamados ficomicetos. Su situación taxonómica se recoge en el Esquema 2.

Esquema 2. Clasificación taxonómica de los hongos formadores de micorrizas VA.

División: EUMYCOTA

Grupo: Zygomycotina ("Ficomycetes")

Clase: Zygomycetes

Orden: Glomales

Suborden: Glomineae

Familia: Glomaceae

Géneros: *Glomus*

Sclerocystis

Familia: Acaulosporaceae

Géneros: *Acaulospora*

Entrophospora

Suborden: Gigasporineae

Familia: Gigasporaceae

Géneros: *Gigaspora*

Scutellospora

Se agrupan todos ellos dentro del orden Glomales, perteneciente a la clase Zygomycetes (Morton y Benny, 1990; Schenck y Pérez, 1990) y dentro de este se subdividen, de acuerdo con las características morfológicas y el mecanismo de germinación de las esporas que producen, en dos subordenes distintos, Glomineae, con las familias Glomaceae (Pirozynsky y Dalpe, 1989) y Acaulosporaceae (Morton y Benny, 1990), y Gigasporineae, con una familia solamente, Gigasporaceae (Morton y Benny, 1990). Cada una de las familias citadas incluye dos únicos géneros, ambos con especies formadoras de micorrizas VA. La familia Glomaceae incluye *Glomus* y *Sclerocystis* (Gerdemann y Trappe, 1974), Acaulosporaceae, *Acaulospora* (Gerdemann y Trappe, 1974) y *Entrophospora* (Ames y Schneider, 1979) y finalmente Gigasporaceae, con *Gigaspora* (Gerdeman y Trappe, 1974) y *Scutellospora* (Walker y Sanders, 1986).

Esta agrupación en subordenes está basada en un estudio reciente sobre las relaciones evolutivas existentes entre los distintos hongos VA. En él se sugiere la existencia de dos ramas distintas, coincidentes con cada uno de los subordenes, originados a partir de un ancestro arbuscular común (Morton, 1990).

Las especies pertenecientes a los géneros *Glomus* y *Sclerocystis* producen esporas de resistencia (clamidosporas) de paredes gruesas y generalmente pigmentadas, originadas asexualmente en los extremos de hifas vegetativas (Walker, 1987). En el género *Glomus* las esporas se producen aisladamente en el suelo (ectocárpicas) o agrupadas en el interior de cuerpos



fructíferos llamados esporocarpos (endocárpicas). En *Sclerocystis* las esporas se forman únicamente dentro de esporocarpos, dispuestas radialmente de forma ordenada alrededor de un plexo central de hifas estériles (Hall, 1984; Morton, 1988).

Las familias Gigasporaceae y Acaulosporaceae incluyen géneros formadores de azigosporas, es decir, esporas similares a zigosporas, pero en las que no se ha puesto de manifiesto un origen sexual (Morton, 1988).

En *Acaulospora* y *Entrophospora* las esporas se originan a partir de un "sáculo esporógeno" o "espora madre" que se forma por acumulación de material citoplasmático en el extremo terminal de una hifa. En *Acaulospora* las azigosporas se forman lateralmente, sobre la hifa que sustenta el sáculo esporógeno, mediante migración del material acumulado hacia la nueva espora, mientras que en *Entrophospora* el proceso es similar pero con la diferencia de que las esporas se forman en el interior del cuello del "sáculo esporógeno" (Schenck y Pérez, 1990).

Las esporas pertenecientes a *Gigaspora* y *Scutellospora* se originan sobre un suspensor bulboso de apariencia similar al gametangio de las zigosporas del resto de los Zigomicetos. Las diferencias entre dichos géneros radican fundamentalmente en el proceso de germinación, que se comentará más adelante (Morton, 1988).

Mecanismo de germinación de las esporas

El ciclo de vida de los hongos VA se inicia con la germinación de las esporas. Estas poseen la información genética y la maquinaria biosintética necesaria para germinar y no requieren más que ser activadas, mediante cambios fisico-químicos del medio, para que se dispare el proceso (Hepper, 1984a; Siqueira, 1987; Azcón-Aguilar *et al.*, 1991). La germinación transcurre con facilidad en cultivo axénico en el laboratorio, en agar-agua simplemente, de lo que se deduce que no requiere ningún estímulo específico, producido por la planta o por los microorganismos del suelo para llevarse a cabo (Hepper, 1984a). Algunos trabajos han mostrado, sin embargo, una estimulación de la germinación en presencia de exudados radicales de plantas hospedadoras (Graham, 1982) o de microorganismos comunes de la rizosfera (Azcón-Aguilar *et al.*, 1986a; Mayo *et al.*, 1986; Azcón, 1987).

Se conoce poco acerca de los mecanismos implicados en la activación de las esporas. Según Siqueira (1987) la señal que desencadenaría la germinación se produciría durante la imbibición de las mismas. Tras este tratamiento las esporas pueden aumentar su peso hasta en un 40%, debido a la absorción de agua. Esto provocaría cambios biofísicos en la membrana, lo que conduciría a la activación de proteasas de membrana inactivas, almacenadas durante la formación de la espora. Como consecuencia de esta activación se liberarían aminoácidos necesarios para la síntesis de nuevas proteínas, con funciones específicas en el proceso de germinación.

El inicio de la germinación se detecta a nivel citológico por una activación y redistribución de la masa citoplasmática. Según algunos autores se produce también una división de los núcleos (Sward, 1981a), aunque en otras ocasiones no ha sido posible detectar síntesis de ADN nuclear durante este proceso (Burggraaf y Beringer, 1989).

El nacimiento del tubo de germinación se pone de manifiesto entre los tres y siete días después de iniciado el periodo de imbibición cuando las condiciones son favorables, aunque esto depende en gran medida de la viabilidad y madurez de la espora.

El mecanismo por el cual emerge el tubo de germinación se utiliza como criterio taxonómico para diferenciar los distintos hongos VA (Schenck y Pérez, 1990).

En las esporas del género *Glomus* el tubo de germinación emerge normalmente a través de la hifa de sustentación (Siqueira *et al.*, 1985), aunque en algunas especies, como por ejemplo *Glomus clarum*, se han observado numerosos tubos de germinación que nacen directamente a través de la pared de la espora (García-García *et al.*, 1988).

En las especies del género *Gigaspora* el tubo de germinación perfora directamente la pared de la espora (Walker y Sanders, 1986). En *Gigaspora margarita* concretamente, después de 24 horas de imbibición se observan corrientes citoplasmáticas que se dirigen hacia la base de la espora y conducen a la formación de una placa de germinación en la zona próxima al suspensor bulboso. A medida que se acumula el

citoplasma se produce un engrosamiento de la capa más interna de la pared, que deja un orificio por donde emerge el tubo de germinación, mediante la digestión de las capas media y externa de la pared y la extrusión de la placa de germinación (Sward, 1981b). En esporas viejas pueden producirse varios tubos de germinación simultáneamente, todos ellos próximos a la zona del suspensor.

En las especies pertenecientes al género *Scutellospora* el tubo o tubos de germinación emergen a partir de una estructura denominada "escudo de germinación". Este se origina como consecuencia del plegamiento de la pared más interna de la espora, de naturaleza membranosa, dando lugar a la formación de diversos compartimentos, a partir de cada uno de los cuales puede iniciarse un tubo de germinación diferente (Walker y Sanders, 1986).

El mecanismo de germinación de *Acaulospora* ha sido poco estudiado, exceptuando la especie *Acaulospora laevis*. En las esporas de este hongo la pared se separa a nivel de las dos capas más internas, el citoplasma se desplaza hacia la separación y se forman nuevos tabiques radiales que definen pequeños compartimentos. A partir de cada uno de estos se originan los tubos de germinación, mediante perforación directa de la capa más externa de la pared (Mosse, 1970).

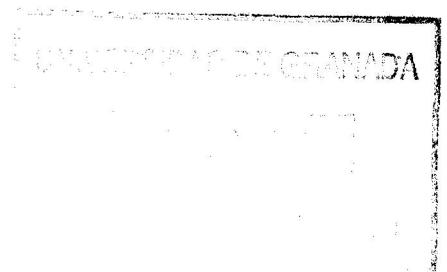
Por último, en los géneros *Sclerocystis* y *Entrophospora* no se ha realizado hasta la fecha ningún estudio sobre el mecanismo de germinación de las esporas, por lo que no se conoce nada al respecto.

Una vez producido el tubo de germinación, este crece, se ramifica y puede permanecer activo por un periodo de hasta 30 días.

Estructura de los tubos de germinación

Independientemente del mecanismo de emergencia, los tubos de germinación poseen una estructura común en todos los hongos VA. Son hialinos, no tabicados, con corrientes citoplasmáticas intensas de tipo bidireccional, aunque predomina el sentido hacia el ápice de la hifa (Siqueira *et al.*, 1985). Presentan una gran cantidad de núcleos (Cooke *et al.*, 1987; Burggraaf y Beriger, 1989) y se ha propuesto que estos proceden directamente de la espora, sin que haya mediado división nuclear previa (Burggraaf y Beringer, 1989). En cuanto a orgánulos citoplasmáticos poseen gran cantidad de mitocondrias, vesículas membranosas, que aparecen fundamentalmente en los extremos de las hifas por lo que se ha sugerido que estén implicadas en la síntesis de la pared celular, pequeñas vacuolas, retículo endoplasmático, ribosomas y dos tipos de orgánulos poco frecuentes en hongos: cuerpos cristalinos y organismos similares a bacterias ("BLOs") (Sward, 1981c).

Los cuerpos cristalinos se han descrito también en esporas de resistencia (Mosse, 1970; Sward, 1981a), pero no se han encontrado en estructuras intrarradicales del hongo. Son de composición protéica y probablemente constituyen una reserva de proteínas que al degradarse libera aminoácidos necesarios para el crecimiento de la hifa.



Los organismos similares a bacterias, de significado desconocido hasta la fecha, aparecen tanto en las esporas en reposo (Mosse, 1970; Sward, 1981a), como en estructuras de las MVA, hifas intercelulares y arbúsculos fundamentalmente (MacDonald y Chandler, 1981). Parecen capaces de mantener un ciclo de vida independiente en el interior de los hongos VA, y no se observan síntomas de patogenicidad en el citoplasma del hongo que los rodea.

Crecimiento de los hongos VA en condiciones axénicas

A partir del tubo de germinación se originan hifas que crecen y se ramifican, aunque en general alcanzan un desarrollo muy escaso. Sobre ellas se forman unas estructuras llamadas vesículas externas o esporas secundarias, similares en apariencia a esporas de resistencia, pero de menor tamaño. En los géneros *Gigaspora* y *Scutellospora* en vez de esporas secundarias se originan unas estructuras similares a las descritas, denominadas células auxiliares, que difieren de las anteriores en que normalmente se presentan agrupadas en racimos, aunque ocasionalmente pueden aparecer aisladas, y con una ornamentación muy característica en su superficie que se utiliza como criterio taxonómico (Morton, 1988). Al igual que las esporas de resistencia, tanto las esporas secundarias como las células auxiliares poseen un elevado contenido lipídico (Jabaji-Hare et al., 1986).

Ninguna de estas estructuras ha sido subcultivada hasta la fecha para iniciar nuevas germinaciones o colonizaciones de raíces hospedadoras (Gianinazzi-Pearson y Azcón-Aguilar, 1991), por lo que

su función permanece desconocida.

Transcurridas entre tres y cuatro semanas después de la germinación de las esporas, si las hifas producidas no encuentran una raíz susceptible de ser colonizada comienzan a tabicarse en sus extremos, a retraer el citoplasma hacia la espora, y ésta entra nuevamente en reposo. Esto no puede atribuirse al consumo de las reservas de la espora, ya que éstas, que representan entre el 45 y el 70% del contenido total de la misma (Beilby y Kidby, 1980), no se han agotado cuando el micelio deja de crecer. Es más, cuando las condiciones vuelven a ser favorables, la espora inicia nuevamente el proceso de germinación y desarrollo del micelio, con la finalidad de localizar una raíz susceptible de ser colonizada con la que formar la simbiosis y completar su ciclo de vida.

La posibilidad de emprender nuevas germinaciones depende del hongo VA, así como de las condiciones en que se hayan producido los periodos de crecimiento precedentes. Así, mientras que *Gigaspora gigantea* fue capaz de germinar durante 10 veces consecutivas (Koske, 1981a), *Glomus mosseae* no pudo hacerlo más que cuatro, y esta capacidad fue estimulada cuando el hongo crecía en presencia de sulfito potásico (Bago, 1990).

La capacidad de retraer el citoplasma de las hifas hacia la espora supone un ahorro de biomasa, lo que implica que el gasto invertido en cada periodo de germinación y crecimiento del micelio es relativamente bajo. Dado el carácter de simbiotes estrictos de los hongos VA, estos hechos se interpretan como un mecanismo de adaptación que les permite intentar localizar raíces con las que completar su ciclo de vida

a un bajo coste energético (Burggraaf y Beringer, 1989).

Factores que afectan al desarrollo de los hongos VA en cultivo axénico

En los últimos años se han llevado a cabo diversos estudios acerca de la influencia de distintos factores sobre el desarrollo *in vitro* de los hongos VA, a fin de determinar los requerimientos tanto nutritivos como fisico-químicos de estos hongos y poder establecer así las condiciones que permitan su crecimiento independiente (Hepper, 1984a; Siqueira, 1987; Azcón-Aguilar *et al.*, 1991).

Se ha investigado una amplia variedad de factores físicos, químicos y biológicos, sin que hasta hoy ninguno de ellos haya sido suficiente para promover el crecimiento continuo del hongo VA, aunque algunos de ellos sean capaces de inducir estimulaciones considerables. La gran mayoría, sin embargo, no muestra efectos destacados o son incluso inhibidores del desarrollo. A continuación se expone un resumen de los resultados más relevantes sobre el tema.

Los hongos VA crecen generalmente en condiciones aerobias. Estudios sobre *Glomus mosseae* llevados a cabo por Le Tacon *et al.* (1983) indican que a concentraciones de O₂ inferiores al 3% se produce una inhibición del desarrollo de las hifas, e igualmente, niveles de CO₂ altos (5%) limitan la extensión de las mismas, independientemente de la tensión de O₂. Más recientemente, sin embargo, se ha puesto de manifiesto

que ligeros incrementos en la concentración de CO_2 , del orden del 0.5%, inducen una gran estimulación del crecimiento del micelio de *Gigaspora margarita*, pero esto solo ocurre si simultáneamente se suministran exudados radicales de una planta hospedadora (Bécard y Piché, 1989a). Estudios posteriores con este mismo hongo muestran una estimulación aún mayor si la concentración de CO_2 se incrementa a niveles del 1 al 2.5% (Lei y Piché, 1990). Esta estimulación afecta fundamentalmente a la longitud de las hifas producidas, mas que a la ramificación de las mismas. Nuevamente se detecta una inhibición del desarrollo del hongo a concentraciones del 5% de CO_2 . Los autores destacan que ni el incremento en la concentración de CO_2 , ni los exudados radicales por si solos, ejercen un efecto significativo sobre el desarrollo del hongo. Este hecho puede tener un significado ecofisiológico puesto que en la rizosfera ambas circunstancias son coincidentes como consecuencia del metabolismo de la raíz.

Sin embargo no todos los resultados obtenidos en el estudio de los factores que influyen sobre el crecimiento del micelio de los hongos VA pueden ser fácilmente interpretados, ya que a menudo son contradictorios y dependen en gran medida de la especie de hongo VA utilizada.

Se ha estudiado también el efecto de una amplia variedad de compuestos carbonados. Entre los ácidos orgánicos se ha observado que el oxalacético, pirúvico, acético, cítrico y tartárico inducen una estimulación del desarrollo de las hifas de *Glomus mosseae* (Mosse, 1970). En cambio, la adición de pequeñas cantidades de succínico, málico y aspártico inhiben la formación de los tubos de germinación en *Gigaspora margarita*.

(Siqueira *et al.*, 1982).

Con respecto a la influencia de distintos carbohidratos, concentraciones de 4 g/l de sacarosa estimulan el desarrollo del micelio de *Gigaspora margarita* (Siqueira *et al.*, 1982). En cambio, tanto la maltosa como sacarosa, celulosa y glucosa mostraron un efecto inhibitorio sobre el desarrollo de *G. mosseae* (Mosse, 1970; Siqueira y Hubell, 1986). El manitol y la trehalosa, dos azúcares comunmente asociados con el metabolismo glucídico en hongos, y recientemente detectados también en hongos VA (Bécard *et al.*, 1990), no mostraron una influencia significativa sobre el crecimiento de *G. mosseae* (Mosse, 1970).

De las vitaminas estudiadas, la biotina y el ácido nicotínico apenas ejercen un efecto significativo, mientras que la tiamina estimula el desarrollo del micelio de forma notable (Hepper, 1979; Siqueira *et al.*, 1982).

Se ha investigado también la influencia de aminoácidos como la cistina, glicina y lisina, que estimularon ligeramente el crecimiento de *Glomus caledonium* (Hepper y Jackobsen, 1983), mientras que la cisteina incrementa notablemente el desarrollo de *G. mosseae* (García-García, 1989).

De las sales minerales, las más estudiadas han sido los fosfatos debido a la gran influencia que ejercen sobre la simbiosis MVA y su funcionamiento. En general estos compuestos no muestran un efecto significativo sobre la germinación de las esporas (Koske, 1981b; Kobayashi, 1988), aunque si se ha observado una inhibición de la elongación de las hifas

del micelio (Hepper, 1983) y en algunas ocasiones una estimulación de las mismas (Siqueira *et al.*, 1982).

En cuanto al efecto de las sales nitrogenadas, las hifas de *Gi. margarita* se afectaron negativamente por la adición de nitrato amónico (Siqueira *et al.*, 1982). Posteriormente se puso de manifiesto un efecto inhibitor del N cuando se aplicaba como nitrato, pero estimulador si se suministraba como amonio (Wong y Marschner, 1988).

Mucha más atención se ha dedicado a la influencia de los compuestos azufrados sobre el desarrollo de los hongos VA. En los primeros estudios se puso de manifiesto que el sulfato, tiosulfato, metabisulfito y sulfito provocaban una estimulación notable del desarrollo de *G. caledonium*, siendo los dos últimos compuestos los de mayor efecto (Hepper, 1984b). Posteriormente se investigó la influencia del ditionito, sulfuro y piro-sulfato, siendo el primero de ellos el más eficaz (Hepper, 1986). Más tarde se extendieron estos estudios a *G. mosseae*. La cisteína, antes mencionada, y el sulfito estimulaban notablemente el desarrollo de las hifas del hongo, siendo el sulfito el que inducía efectos más destacados (García-García, 1989).

En cuanto a elementos minerales, tanto el cobre como el aluminio y el zinc reducen el crecimiento del micelio incluso cuando se adicionan a bajas concentraciones (Hepper y Smith, 1976; Siqueira *et al.*, 1985; Barkdoll y Schenk, 1986).

En conclusión se puede decir que el sulfito, y en menor medida la cisteína, son los compuestos que

inducen un mayor crecimiento de los hongos VA en ausencia de una raíz compatible.

Puesto que los hongos VA poseen como hábitat natural el suelo y su situación ecológica normal es en simbiosis con la planta, se han tratado de simular estas condiciones en el laboratorio con la finalidad de proporcionarles un ambiente lo más favorable posible que facilite su cultivo axénico. Bajo esta aproximación se ha estudiado la influencia de sustratos nutritivos complejos, como son extracto de suelo y exudados radicales. Los resultados obtenidos dependen en gran medida de la metodología empleada en la obtención de estos sustratos complejos, aunque en general permiten deducir una serie de hechos comunes.

Siqueira y Hubell (1986) encontraron una estimulación del desarrollo de las hifas inducida por la presencia de extracto de suelo. Este efecto se atribuyó a la fracción protéica del mismo, la cual, según los autores del estudio, podría ser la base de la limitada capacidad saprofítica de los hongos VA en el suelo.

Con respecto al papel de los exudados radicales se ha evidenciado que los procedentes de *Citrus* promueven un incremento en la longitud y ramificación del tubo de germinación de esporas de *Glomus epigaeum* (Graham, 1982). En estudios posteriores se observó que la estimulación del micelio de *Glomus fasciculatum* en presencia de exudados radicales de trébol (*Trifolium repens* L.) solo ocurría cuando la planta crecía en condiciones de deficiencia en fósforo (Elias y Safir, 1987). Como no había diferencias significativas en la cantidad de exudados producidos por la planta cuando a

ésta se le adicionaba solución nutritiva con o sin P, los autores concluyeron que es la calidad de los exudados producidos, y no la cantidad, lo que determina su influencia sobre el desarrollo de las hifas de los hongos VA. También se observó que la estimulación era mayor si los exudados procedían de una planta joven, lo que hizo pensar en la presencia en las raíces de un factor estimulador de naturaleza desconocida, presente solamente de forma transitoria y no en todos los estadios del desarrollo de las mismas. Esto podría estar relacionado con los hechos descritos por Tsai y Phillips (1990), que encontraron que al menos un flavonoide liberado a partir de semillas de alfalfa (*Medicago sativa* L.) y otro exudado por las raíces, estimulan significativamente la germinación de las esporas de tres especies de *Glomus*, el crecimiento de las hifas producidas y la ramificación del micelio. Otros flavonoides liberados de forma natural a partir de semillas o raíces promovieron igualmente uno o dos de los procesos citados, aunque no los tres. En este sentido hay que tener en cuenta que en raíces de soja, la infección con *Glomus intraradices* induce la formación de un nuevo tipo de isoflavonoide denominado isosojagol y el incremento en la concentración de otros distintos (Morandi y Le Quéré, 1990).

Estos resultados apoyan la hipótesis de que los flavonoides son compuestos claves en la interacción planta-microorganismo. Se sabe, de hecho, que ciertos flavonoides exudados por las raíces de las leguminosas actúan como una señal que induce la expresión de los genes implicados en la nodulación en bacterias de los géneros *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* (Phillips y Tsai, 1990).

En otros estudios se investigó la influencia de la raíz sobre el crecimiento de las hifas de los hongos VA *in vivo* mediante la utilización de plantas susceptibles de formar micorrizas, como son el tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) y el tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.), así como variedades diferentes de no micorrizables pertenecientes al género *Brassica*, y los hongos formadores de micorrizas *G. mosseae* y *Gigaspora gigantea*. La proximidad de una raíz susceptible de ser infectada inducía la ramificación de los tubos de germinación producidos a partir de las esporas. Esto no ocurría sin embargo alrededor de las raíces de *Brassica*, por lo que se concluyó que las raíces de las plantas hospedadoras producen un factor estimulador difusible, ausente en los exudados de las raíces de plantas no hospedadoras (Glenn *et al.*, 1988).

De forma similar se ha evidenciado una notable estimulación del desarrollo del micelio producido a partir de esporas de *Gi. margarita* en presencia de raíces transformadas de zanahoria (*Daucus carota* L.), incluso en ausencia de contacto alguno entre el hongo y la raíz (Bécard y Piché, 1989a).

Ya con anterioridad se había demostrado la participación de un producto volátil en la estimulación de los hongos VA por raíces susceptibles. Así, Koske (1982) describió la producción por parte de los sistemas radicales de maíz (*Zea mays* L.) y judía (*Phaseolus vulgaris* L.) de un estimulador volátil capaz de atraer los tubos de germinación aéreos de *Gi. gigantea*. Se desconoce la naturaleza de tal estimulador, aunque podría tratarse del CO₂ al igual que en el sistema descrito por Bécard y Piché (1989a). Posteriormente se extendieron estos estudios al tomate

(*Lycopersicum esculentum* Mill.), col (*Brassica oleracea* L.) y remolacha (*Beta vulgaris* L.) estas dos últimas, plantas no formadoras de micorrizas VA, detectandose la producción de productos volátiles estimuladores de *Gi.giganteae* solo en el caso de los sistemas radicales de las plantas hospedadoras (Gemma y Koske, 1988).

Recientemente se ha profundizado en la influencia que ejerce la raíz sobre el desarrollo de los hongos VA, y se ha evidenciado que en presencia de factores producidos por la planta, que incluyen exudados radicales y productos volátiles, entre ellos CO₂, se incrementa notablemente la actividad ATPásica ligada al plasmalema del hongo y la absorción de P a partir del medio (Lei y Piché, 1990). Los autores sugirieron que la limitada capacidad de los hongos VA para absorber nutrientes de los hongos VA a partir del medio de cultivo puede ser un factor importante que limita el crecimiento *in vitro*, y que podría ser superado, en parte, por la presencia de la raíz, debido a su capacidad para incrementar la actividad ATPásica de membrana, implicada en la captación de nutrientes.

De otro lado, los hongos VA coexisten en el suelo con una amplia gama de microorganismos, la mayoría de los cuales dependen para crecer y llevar a cabo su actividad, de la presencia de una raíz que les proporcione los sustratos carbonados necesarios, en forma de exudados radicales o restos celulares (Barea y Azcón-Aguilar, 1982a).

Es lógico pensar, por lo tanto, que dentro de un mismo hábitat se produzcan interacciones entre las diversas poblaciones de microorganismos existentes, incluidos los hongos VA. En diversos estudios se ha

constatado una influencia positiva sobre el desarrollo de los hongos VA de distintos tipos de microorganismos del suelo, incluidos hongos (Azcón-Aguilar *et al.*, 1986a y b; Calvet *et al.*, 1988; Calvet, 1990), bacterias (Mayo *et al.*, 1986; Azcón, 1987) y dentro de estas, actinomicetos (Mugnier y Mosse, 1987). En determinadas circunstancias, sin embargo, se han descrito fenómenos de fungistasis hacia los hongos VA en el suelo, debido a competición por nutrientes en algunos casos (Wilson *et al.*, 1989; Hetrick *et al.*, 1989), o a la producción de antibióticos con actividad antifúngica en otros (Paulitz y Linderman, 1989).

En cualquier caso, el mecanismo concreto que justifica la acción de los microorganismos del suelo sobre el desarrollo de los hongos VA no se conoce en la actualidad y constituye uno de los objetivos de investigación de la presente Memoria.

Capacidad metabólica de los hongos VA

Debido a la dificultad para hacer crecer los hongos VA en cultivo puro, los estudios de tipo bioquímico sobre los mismos se han llevado a cabo mediante pruebas indirectas basadas, fundamentalmente, en la utilización de inhibidores metabólicos de rutas biosintéticas claves. De esta forma, estudiando el efecto de estos compuestos sobre la germinación de las esporas y/o el crecimiento del micelio, la inhibición de alguno de los procesos implicaría que la ruta biosintética inhibida es operativa en los hongos VA y fundamental para que dicho proceso se lleve a cabo.

La mayoría de los estudios se han realizado con *Glomus caledonium* y de los resultados obtenidos se deduce que durante la germinación y posterior elongación de las hifas se produce síntesis de proteínas citoplasmáticas, y de algunas formas de ARN y ADN mitocondrial (Hepper, 1979; Beilby, 1983). Parece ser que la germinación ocurre a expensas de ARN mensajero almacenado en la espora durante la formación de la misma, y solo es necesaria la síntesis *de novo* de este cuando se inicia el crecimiento de los tubos de germinación. La utilización de proflavina puso de manifiesto que la síntesis de otros tipos de ARN es esencial para la germinación, al igual que lo es la de ADN mitocondrial (Hepper, 1979).

De estos estudios se concluyó que aparentemente no hay ninguna lesión de la maquinaria biosintética de proteínas o ácidos nucleicos, que justifique la ausencia de un crecimiento independiente (no simbiótico) de los hongos VA, y la necesidad de interaccionar con el metabolismo de la planta hospedadora para completar su ciclo de vida. Por su capacidad biosintética los hongos VA parecen asemejarse más a otros saprófitos, que a simbioses estrictos (Hepper, 1979).

Existe, sin embargo, controversia en este punto en lo que respecta a su capacidad para sintetizar ADN. Mientras que, como se acaba de citar, Hepper (1979) no encontró ninguna deficiencia de este tipo, Burggraaf y Beringuer (1989) no pudieron detectar biosíntesis de ADN, ni replicación nuclear durante la germinación y posterior desarrollo del micelio de esporas de *Gigaspora margarita*. Consiguientemente, estos autores atribuyeron la ausencia de crecimiento independiente de

los hongos VA a su incapacidad para replicar el material genético. Estos resultados, sin embargo, son objeto de discusión puesto que no se han podido confirmar en otros hongos VA, ni incluso en otros ecotipos de *Gi. margarita* (Bécard, 1990).

Inmediatamente después de poner las esporas a imbibir en agua se produce una reactivación metabólica de las mismas. Esta se inicia con la degradación de las reservas lipídicas, fundamentalmente triglicéridos, dando lugar a la producción de ácidos grasos libres que son transformados en otros compuestos necesarios para el crecimiento del hongo. En estudios sobre *G. caledonium* se detectó síntesis de ARN inmediatamente después de poner las esporas en imbibición, mientras que la síntesis de proteínas, carbohidratos neutros, aminoácidos y ácidos orgánicos, así como la producción de ATP, se ponía de manifiesto entre 35 y 45 minutos más tarde (Beilby y Kidby, 1982). Entre 5 y 14 horas después se detectaba síntesis de lípidos y polisacáridos. Durante el periodo de germinación y desarrollo del micelio el contenido total de lípidos incrementó en un 34 % (Beilby y Kidby, 1980; Beilby y Kidby, 1982).

Mediante técnicas citoquímicas se demostró en los tubos de germinación producidos por *G. caledonium* la presencia de enzimas claves del sistema Embden-Mayerhof-Parnas, ciclo de los ácidos tricarboxílicos y vía de las hexosas monofosfato (Macdonald y Lewis, 1978), lo que sugiere que estas rutas son operativas en el hongo.

Las hifas de los hongos VA poseen también actividad nitrato reductasa, puesto que son capaces de

reducir nitrato a nitrito (Ho y Trappe, 1975; Sundaresan *et al.*, 1988). También se ha localizado en las hifas del micelio interno de *Glomus mosseae* actividad glutamino sintetasa (Smith *et al.*, 1985), lo que indica que los hongos VA son capaces de asimilar el nitrógeno procedente tanto del nitrato como del amonio.

La diferencia de los efectos provocados por la adición de sulfato y sulfito sobre el crecimiento de *G. mosseae* y *G. caledonium*, llevó a investigar la presencia en los hongos VA de las enzimas implicadas en la reducción del sulfato (García-García, 1989). Los resultados obtenidos indicaron la existencia de una deficiencia metabólica en dicha reducción, al igual que ocurre en otros hongos inferiores (Cantino, 1955).

A la vista de los datos bioquímicos de que se dispone acerca de las capacidades biosintéticas de los hongos VA es difícil encontrar la razón que justifica la ausencia de un crecimiento independiente, salvo que se confirme su limitación para replicar el ADN nuclear, lo que podría explicar tal deficiencia. Si este último supuesto es cierto, el hecho pudiera ser debido a que durante la evolución los hongos VA hubieran perdido la capacidad genética para el saprofitismo o quizás nunca llegaron a poseerla. Podría deberse igualmente a que tuvieran parte del material genético reprimido y necesitaran interaccionar con el metabolismo de la planta hospedadora para crecer. Esto ocurre de hecho en otros biotrofos obligados, que tienen parte del genoma reprimido y son los hospedadores los que aportan el(los) inductor(es) necesario(s) para desreprimirlo. En el caso de los hongos VA, si esto fuera cierto, el(los) inductor(es) debería(n) estar presente(s) en las plantas casi universalmente, ya que la gran mayoría

de ellas son susceptibles de asociarse simbióticamente con estos hongos y además la simbiosis carece de especificidad, lo que sugiere que la naturaleza del inductor sería similar para todos ellos.

Por otro lado, en condiciones naturales son los arbusculos los principales elementos implicados en la nutrición de los hongos VA, y es tras su formación cuando el hongo experimenta un mayor desarrollo. Pudiera ser que esta estructura fuera la única capaz de garantizar una adecuada nutrición del hongo, y puesto que no se ha conseguido su formación en cultivo *in vitro*, puede que la falta de una nutrición adecuada limite su desarrollo axénico. No parece fácil, en cualquier caso, conseguir la producción de arbusculos *in vitro*, debido a que es difícil reproducir las condiciones físico-químicas que se dan en el ambiente en que se forman, concretamente entre la pared de la célula hospedadora y su plasmalema.

Sea cual sea la razón implicada, la consecución del cultivo axénico de estos hongos permanece como un reto continuo para los investigadores sobre el tema y supondría un adelanto importante que facilitaría una mayor comprensión y manipulación de la simbiosis VA.

2. Micorrización de material vegetal obtenido por cultivo de tejidos

La propagación por cultivo de tejidos es una técnica alternativa a la propagación vegetativa convencional que se emplea fundamentalmente con plantas de interés económico. Presenta la ventaja de que solo

es necesaria una porción de tejido u órgano como explanto inicial para la regeneración de gran cantidad de individuos en un corto espacio de tiempo, mientras que por los métodos convencionales se tardarían años en propagar el mismo número de plantas (Barceló-Muñoz, 1987).

En general, la utilización de técnicas de micropropagación está justificada cuando los métodos existentes de propagación *in vivo* son muy lentos o cuando se requiere la producción de plantas libres de patógenos o mejoradas en alguna de sus características. Los requerimientos de un buen sistema de micropropagación son, básicamente, los siguientes: (i) Estabilidad genética del material obtenido; (ii) retención de la capacidad regenerativa tras sucesivos subcultivos; (iii) rentabilidad económica; y (iv) la transferencia del tubo de ensayo a condiciones más naturales de crecimiento no debe ser demasiado complicada (Pierik, 1984).

En este último punto es en donde las micorrizas pueden jugar un papel importante ayudando a la planta a superar el estrés del transplante y es en donde confluyen ambos tipos de metodologías: Micropropagación *in vitro* y micorrización en condiciones controladas.

Cada vez es más común el uso de técnicas de micropropagación para la producción de gran cantidad de plantas iguales. Dicha metodología se inició para la producción de plantas herbáceas y posteriormente, se ha utilizado para un elevado número de especies leñosas, incluidos árboles frutales (Carre *et al.*, 1979; Navatel, 1980 y 1982). Las técnicas de micropropagación suponen, en efecto, una ventaja desde el punto de vista

