

~~T. Rov. 22/39~~
3/137

UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD DE GRANADA
Facultad de Ciencias
Fecha 27-5-98
ENTRADA NUM. 1918

**Aspectos Moleculares de la Respuesta Defensiva de las
Plantas a la Formación de la Simbiosis Micorriza Arbuscular**

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA
GRANADA
Nº Documento: 1013375118
R. 15451938

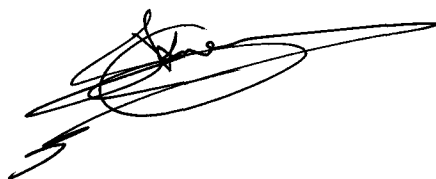
IKRAM BLILOU

TESIS DOCTORAL
1998

UNIVERSIDAD DE GRANADA
21 MAYO 1998
GRANADA

**Aspectos moleculares de la respuesta defensiva
de las plantas a la formación de la simbiosis
micorriza arbuscular**

Memoria que presenta la licenciada en Ciencias Biológicas
Ikram Blilou para aspirar al grado de Doctor



Fdo: Ikram Blilou

VºBº

Los Directores



Fdo: Juan Antonio Ocampo Bote



Jose Manuel García-Garrido

*A mis padres por apoyarme siempre
A mi hermana Manal por su paciencia
A mis hermanos Achraf; Rafia y Reda.*

Agradecimientos

Al finalizar este trabajo, quiero agradecer a todas las personas e instituciones que han contribuido de una forma u de otra a la realización de este trabajo.

A la agencia española de cooperación con el mundo árabe por concederme la beca para poder realizar este trabajo.

A mi director de tesis Dr. Juan Antonio Ocampo por aceptarme en su laboratorio para realizar la tesis, por su confianza y por permitirme trabajar en este tema que me resulta tan interesante y que me ha permitido aprender muchas metodologías.

A mi segundo director, el Dr. José Manuel García Garrido por estar siempre pendiente de mi trabajo, por sus consejos y sobre todo por su paciencia y por estar siempre dispuesto a responder a cualquier duda o resolver cualquier problema, esto sin mencionar la cantidad de cosas que me ha enseñado.

A la Dr. Carmen Lluch Plá por su eficacia y su buena disposición de ayudar a cualquier momento.

Al Dr. Nicolás Toro García por dirigirme durante mi primer año de tesis y sobre todo por dejarme usar su laboratorio.

A la gente de mi laboratorio sobre todo a Julia, a la que echamos mucho de menos, a Inma, a mis compañeras Toñi y Maris por su amistad dentro y fuera del laboratorio.

A los doctores J.M. Barea, R. Azcón, C. Azcón, E. Bedmar y J. Olivares por estar siempre a mi disposición para cualquier cosa.

A mis amigos Fernando y Sanae con quienes he pasado momentos inolvidables.

A toda la gente del departamento de micro, principalmente a Soco por su apoyo y sobre todo por animarnos siempre a seguir adelante, a Juan SanJuan por sus consejos y su apoyo durante mi primer año, a José y María José, mis primeros amigos españoles, a Pieter, María José Soto y Paco, a Pablo por sus bromas continuas y por enseñarme a poner mi primera PCR, a mis dos paisanos Karim y Jaber.

Al laboratorio del Dr. Juan Pedro Donaire por poner a mi disposición los aparatos de su laboratorio. Al Dr. Pablo Bueno por su colaboración en la realización de algunos experimentos, a Loubna y Badea por aguantarme cuando subía cada dos por tres "para que me pongan el Speedvacuum".

A mi amiga Natalia por las discusiones que teníamos y que seguimos teniendo, afortunadamente, para intentar comprender el mundo de las micorrizas.ç

A maxi y a Chechu por estar siempre dispuestos a ayudar a cualquier momento.

A las chicas "Micorrizas" sobre todo a Mariam, María José Pozo, Coral, Nuria y Estefania. También a Javier y Celerino.

Al Dr. Gérard Duc del laboratorio del INRA por enviarnos las semillas de guisantes con las que hemos podido obtener resultados interesantes.

Al Dr Emanuel Guiderdoni por poner a nuestra disposición las semillas de plantas de arroz transgénicas.

Bueno espero no haberme olvidado de nadie, si ha sido así, que me perdone.

Indice

Indice

Introducción	1
1.Micorrizas: Aspectos generales	2
2.Formación de la micorriza arbuscular	5
2.1 Fase de contacto y penetración intercelular.	5
2.2 Fase intracelular	7
3. Fisiología de las micorrizas arbusculares.	10
3.4 Fisiología de la adquisición de fósforo	11
3.5 Fisiología de la adquisición del carbono	13
3.3 Captación de Nitrógeno y otros nutrientes	13
3.4 Efectos fisiológicos no nutricionales	14
3.4.5 Alteración del balance hormonal	14
3.4.6 Resistencia a la sequia	15
7. Bioprotección	15
8. Susceptibilidad de las plantas a la colonización por hongos de la micorriza arbuscular	16
6. Respuesta de la planta a la colonización por hongos arbusculares	18
7. Similitudes entre la respuesta a la formación de la micorriza arbuscular y a la formación del nódulo por Rhizobium	21
8 Factores implicados en la respuesta defensiva de las plantas a la colonización por hongos arbusculares.	25
9. Otros Mecanismos de defensa en plantas	33
9.1 Proteínas de transporte de lípidos	33
9.2 Acumulación de ácido salicílico y resistencia sistémica adquirida	37
Objetivos	44
Materiales y métodos	46
1 Plantas y condiciones de cultivo	47
1.1 Plantas usadas	47

1.2 Soluciones nutritivas	47
1.3 Esterilización y germinación de las semillas	48
1.4 cultivo axenico	48
1.5 Cultivo en condiciones de invernadero	49
2 Inoculación de las plantas	49
2.1 Inoculación de las plantas por bacterias	49
2.1.1 Inoculación con la bacteria patógena <i>Ps syringae</i>	49
2.1.2 Inoculación con <i>Rhizobium</i>	50
2.2 Inoculación con el hongo arbuscular	51
3 Tinción de raíces micorrizadas	51
3.1 Cuantificación del porcentaje de longitud de raíz colonizada	52
3.2 Cuantificación de estructuras típicas en la asociación micorriza arbuscular	52
4 Germinación de las esporas del hongo arbuscular <i>G. mosseae</i>	53
4.1 Esterilización de las esporas	53
4.2 Germinación de las esporas	53
4.3 Cuantificación de la germinación de las esporas	53
5 Tratamiento de las plantas con ácido salicílico	54
6 Extracción de ARN	54
7 Determinación de la concentración de ADN, ARN y oligonucleótidos	55
8 Métodos de manipulación de ADN	56
8.1 Minipreparación de ADN plasmídico	56
8.2 Ligación de fragmentos de ADN	56
8.3 Preparación de células competentes de <i>E. coli</i>	57
8.4 Transformación	57
8.5 Purificación de los fragmentos de ADN	58
8.6 Secuenciación de ADN	58
8.7 Electroforesis de ADN	59
8.7.1 Revelado de geles y fotografía	59
9 Análisis diferencial por transcripción inversa por PCR (DDRT-PCR)	59

9.1 Tratamiento con Dnasa	61
9.2 Síntesis del ADNc (ADN complementario)	61
9.3 Amplificación por PCR	62
9.4 Electroforesis en gel de poliacrilamida	62
9.5 Tratamiento sw gel y exposición	63
10 Estudio de la expresión génica	
10.1 Northern blot	65
10.1.2 Electroforesis de ARN en gel desnaturalizzant	65
10.1.3 Marcaje de sondas de ADN	66
10.1.4 Hibridación y detección	67
10.5 Análisis de la expresión génica por RT-PCR	68
11 Sounthern blot	70
11.1 Transferencia de ADNc a filtros de nylon	70
11.2 Marcaje de sondas de ADN por el método no radioactivo	71
11.3 Hibridación con sonda no radioactiva	71
11.4 Cuantificación de los niveles de expresión	72
12 Extracción del ácido salicilico libre	72
12.1 Análisis TLC y cuantificación de SA	72
13 Extracción de proteínas	73
14 Derminación cuantitativa de las proteínas	73
15 Medida de actividades enzimaticas	74
15.1 Medida de la actividad ascorbato peroxidasa	74
15.2 Medida de la actividad catalasa	75
16 Localización de la actividad β -glucoronidasa en raíces de arroz transformadas con el gen <i>ltp</i> mediante tinción histoquimica	75
Resultados	76
Estudio de los marcadores de la respuesta defensiva de la planta durante el proceso de la formación de la micorriza arbuscular	77

1. Expresión de genes <i>ltp</i> durante el proceso de formación de la micorriza arbuscular	77
1.1 Determinación de la expresión genica de <i>ltps</i> en arroz	78
1.2 Estudio secuencial de la expresión de los genes <i>ltp</i> durante el desarrollo de la micorriza arbuscular mediante RT-PCR	82
1.3 Análisis histoquímico de la actividad Gus dirigida por el promotor <i>ltp</i> en plantas transgénicas de arroz no inoculadas y inoculadas con <i>G. mosseae</i>	98
2 Análisis de la expresión de un gen PAL (fenilalanin amonioliasa) durante el proceso de formación de la micorriza arbuscular	100
3 Estudio de la actividad catalasa y peroxidasa durante el proceso de formación de la micorriza arbuscular	110
Estudio de la participación del ácido salicílico como componente de la micorriza arbuscular	115
1. Inducción del ácido salicílico (SA) durante el proceso de micorrización	115
2 Efecto de la aplicación de ácido salicílico exógeno sobre el proceso de formación de la micorriza arbuscular	115
3 Efecto del SA exógeno sobre la germinación de las esporas de <i>G. mosseae</i>	122
4 Estudio de la relación entre acumulación de SA y resistencia a la micorrización y nodulación provocada por mutación.	122
Análisis de la expresión genica diferencial entre plantas micorrizadas y no micorrizadas mediante DDRT-PCR	132
Discusión	144
Conclusiones	155
Bibliografía	158

Introducción

Introducción

1. Micorrizas: Aspectos generales

Las raíces de las plantas tienen una zona de influencia en el suelo denominada rizosfera. Esta influencia se traduce a nivel ecológico en la alteración tanto cuantitativa como cualitativa de las poblaciones de microorganismos que habitan la rizosfera y cuyo metabolismo repercute directamente en la biología de la planta, especialmente en el crecimiento y nutrición de la misma.

Desde el punto de vista nutricional la relación planta-microorganismo puede ser parásita, mutualista o saprofítica.

Las micorrizas junto a la asociación simbiótica entre plantas leguminosas y bacterias de la familia Rhizobiaceae constituyen una de las asociaciones mutualistas más comunes del reino vegetal. La micorriza es una relación simbiótica establecida entre la raíz de plantas terrestres y hongos del suelo, cuyo establecimiento repercute positivamente en ambos asociados. Alrededor de 90% de las especies vegetales conocidas forman asociación con algún tipo de hongo micorrízico (Harley y Smith, 1983; Kendrick, 1985; Azcón-aguilar y col., 1991). El beneficio en la asociación es principalmente nutricional, estableciéndose un flujo bidireccional de nutrientes. Por un lado hay un aporte de fósforo por parte del hongo y por otro un aporte de fuentes de carbono por parte de la planta.

Las micorrizas se dividen tradicionalmente en tres grupos morfológicamente distintos en cuanto a la mayor o menor penetración de las células radicales por las hifas fúngicas (Figura 1). El primer grupo lo constituyen las ectomicorrizas, que son exclusivas especies arbóreas y se caracterizan por un gran desarrollo del micelio en la superficie de la raíz hospedadora, la cual puede llegar a estar completamente englobada en un manto fúngico. Algunas hifas del manto penetran entre los espacios intercelulares de las células más externas de la raíz formando una red intercelular. El segundo grupo, y mayoritario, lo constituyen las denominadas endomicorrizas, caracterizadas por el menor desarrollo fúngico en la superficie de la raíz y una colonización importante de las células corticales.

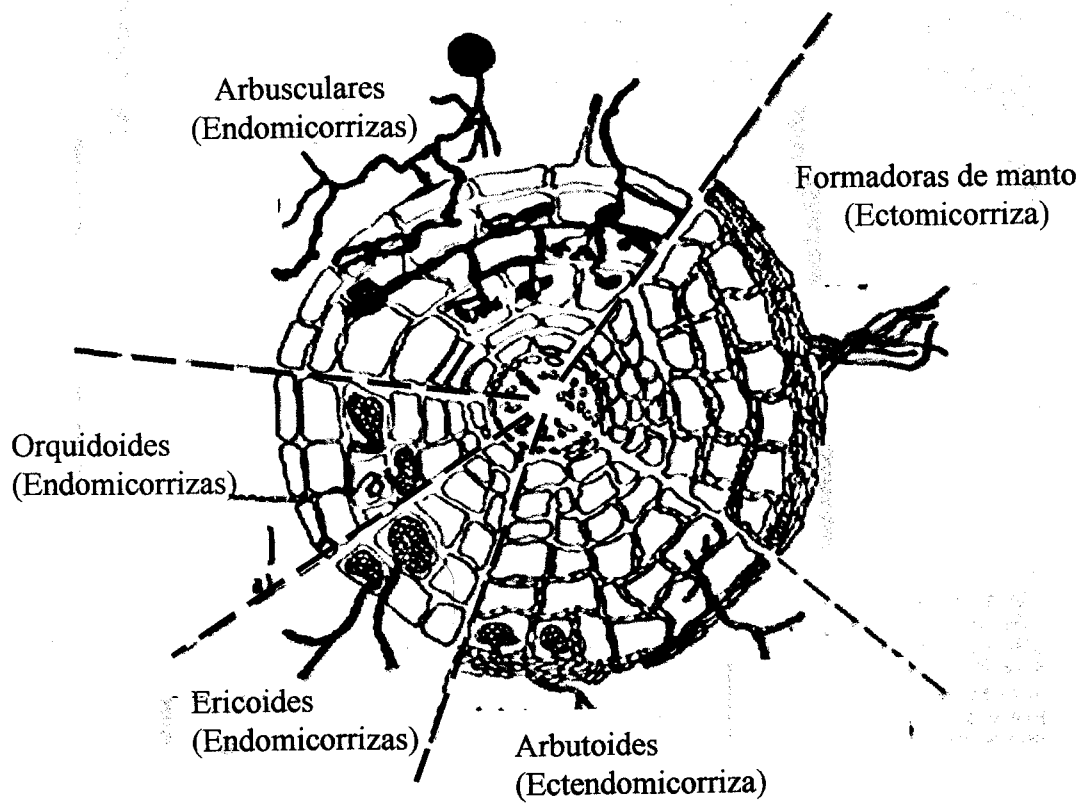


Figura 1: Los distintos tipos de micorrizas(Barea, 1990) donde se puede distinguir :
-Las ectomicorrizas o las formadoras de manto.
-Las endomicorrizas que se dividen en micorrizas arbusculares y las Ericoides.
-Las ectendomicorrizas.

Se distinguen tres tipos de endomicorrizas diferenciados según el patrón de infección y de plantas hospedadoras: ericoides, orquidales y arbusculares. El último grupo, ectendomicorrizas, presenta una forma intermedia de las dos anteriores, con una cubierta superficial de hifas y una penetración intra e intercelular de las células corticales. La forman un número limitado de plantas y hongos poco conocidos.

La simbiosis micorriza arbuscular formada por hongos de la clase Zygomycetes y la mayoría de las plantas superiores es una de las asociaciones más importantes por su biodiversidad e ubicuidad. Está caracterizada por la colonización de la raíz por hifas aseptadas y multinucleadas provenientes de otras raíces o de grandes esporas que se encuentran en el suelo. El desarrollo fúngico varía en detalle según la especie fúngica y el hospedador, pero en la mayoría de las asociaciones la hifa se diferencia para formar arbusculos intracelulares y vesículas tanto intra o intercelulares. La hifa se extiende considerablemente fuera de la raíz, por lo que el hongo posee parte interna y externa.

Plantas y hongos arbusculares han evolucionado conjuntamente, lo que ha dado lugar a que se establezcan una serie de dependencias entre ambos simbioses. De este modo muchas plantas requieren estar micorrizadas para alcanzar su crecimiento óptimo ya que presentan más capacidad de resistencia y supervivencia en condiciones de estrés ambiental (Mitchell, 1993), tanto de tipo biótico (ataque de patógenos), como abiótico (sequía, baja fertilidad del suelo, etc.). Los hongos arbusculares son componentes habituales de la rizosfera encontrándose en todos los ambientes, incluso en aquellos que han sufrido algún deterioro (Mosse y col., 1981).

El hecho de que la asociación micorriza arbuscular sea una de las asociaciones simbióticas más extendidas ha posibilitado que también sea de las más estudiadas, aunque paradójicamente también es de las más desconocidas en cuanto a su funcionamiento y regulación. Esto se debe principalmente a la imposibilidad de cultivo del hongo en condiciones axénicas de laboratorio y en ausencia de la planta hospedadora, lo que dificulta el manejo y estudio del microorganismo así como su manipulación con fines de experimentación. Hasta ahora no se ha conseguido que hongos arbusculares completen su ciclo de vida en ausencia de la planta hospedadora, por lo que se consideran simbioses

fisiológicamente obligados y la única posibilidad de desarrollarse y completar su ciclo vital es en el nicho ecológico que representa la raíz de la planta hospedadora. No se conoce la causa de la incapacidad del hongo para desarrollar una fase saprofítica, aunque se barajan varias hipótesis. Una de ellas justifica la carencia del crecimiento saprofítico por una ausencia de replicación de ADN tras la germinación de la espora (Burggraaf, y col., 1989). Sin embargo, no se ha podido demostrar de forma eficiente la falta de dicha actividad replicativa e incluso otros autores han puesto de manifiesto la existencia de mitosis durante el proceso de germinación (Tommerup y col., 1981). Para otros autores la causa es una deficiencia metabólica originada por la pérdida de los genes responsables del crecimiento saprofítico durante el largo proceso coevolutivo con las plantas (Fortin, y col., 1990). La función de estos genes sería aportada por la planta en las primeras etapas de la colonización.

2. Formación de las micorrizas arbusculares

2.1 Fase de contacto y penetración intercelular.- En el suelo existen dos tipos de estructuras fúngicas que pueden iniciar la formación de una simbiosis micorriza arbuscular: las esporas y las hifas provenientes de una raíz previamente micorrizada. Las esporas de resistencia son capaces de soportar condiciones muy adversas, por lo que son las principales responsables de la supervivencia de los hongos en el suelo (Hayman y col., 1982; Daniels, 1984). Bajo condiciones óptimas, estas formas de resistencia germinan originando una hifa fúngica con capacidad de colonizar una raíz hospedadora. Por otro lado las hifas procedentes de una raíz previamente micorrizadas constituyen un tipo de inóculo más eficaz e infectivo en la colonización de un nuevo sistema radical, en el sentido de que la formación de la micorriza ocurre más rápidamente.

Se han podido obtener esporas de algunos hongos formadores de micorrizas por cultivo "*in vitro*" usando raíces de zanahoria transformadas, (Mugnier y Mosse 1987). Sin embargo, se ha observado una pérdida de infectividad de estos hongos al subcultivarlos, lo que ha planteado la idea de averiguar cuanto tiempo podrían crecer las cepas del hongo arbuscular en agar sin perder su capacidad de infectar eficientemente la raíces de plantas

hospedadoras, además de averiguar como se podría mantener en estas condiciones el potencial de crecimiento, y relacionarlo de alguna manera con algún cambio genómico (Plenchette y col., 1996)

Las condiciones del suelo, en especial la humedad y temperatura, parecen ser los factores fundamentales que desencadenan la germinación de las esporas (Siqueira y col., 1985). Se sabe que el proceso de germinación puede, en ocasiones, ser estimulado por la presencia de exudados radicales y determinados microorganismos del suelo (Azcón-Aguilar y col., 1988), o inhibido por exudados radicales de plantas no hospedadoras (Vierheilig y col., 1996). Muchos estudios sugieren que los flavonoides y otros compuestos fenólicos están implicados en la estimulación del crecimiento del hongo arbuscular, de hecho se ha mostrado que algunos estimulan el desarrollo de las hifas fúngicas (Bécard y col., 1992; Chabot y col., 1992; Siquiera y col., 1991). Sin embargo, estudios recientes han mostrado que aunque los flavonoides pueden estimular el desarrollo del hongo no son necesarios para el establecimiento de la simbiosis (Bécard y col., 1995).

El hongo desarrolla un conjunto de hifas que colonizan el suelo a partir de la espora germinada (Sanders y col., 1983). Cuando una de estas hifas llega a la rizosfera de una planta susceptible sufre una estimulación que le induce a ramificarse de forma masiva (Barea, 1986; Bécard y col., 1988). Al contactar con la raíz, las hifas se engrosan formando los llamados apresorios que dan lugar a los puntos de entrada del hongo hacia el interior de la raíz. La formación del apresorio es un evento decisivo para el reconocimiento y la infección. Los estudios sobre la no formación del apresorio en las plantas no hospedadoras mostraron que los exudados radicales no inhiben el desarrollo del micelio del hongo arbuscular *Glomus mosseae* pero impiden que las hifas se enganchen a las raíces (Giovannetti y col., 1993). Otros estudios mostraron que su formación no requiere la señal de la raíz hospedadora ni tan siquiera la presencia de células vegetales intactas, sino que es un mecanismo de reconocimiento por contacto ya que se ha visto su formación en paredes celulares aisladas de células transformadas de zanahoria e inoculadas con esporas de *Gigaspora. margarita* (Nagahshi y col., 1997).

Los mecanismos de penetración del hongo en la raíz parecen ser una suma de procesos mecánicos, por la presión ejercida por la hifa (Harley y col., 1983), y enzimáticos,

mediante la producción de enzimas pectinolíticos, celolíticos y xiloglucanolíticos por parte del hongo. Estos enzimas se producen en pequeñas cantidades por lo que no llegan a producir la degradación total de la pared celular de la raíz pero si la desorganización de sus componentes (García-Romera y col., 1990, 1991; García-Garrido y col., 1992; Bonfate y Perotto, 1995; Rejón-Palomares y col., 1996). Por lo tanto, la hifa debilita primero la estructura de la pared vegetal al contactar con ella, para ejercer luego una presión mecánica que le permite introducirse en el interior de la célula.

Tras la penetración en el interior de la raíz, las hifas fúngicas suelen extenderse por los espacios intercelulares del parénquima cortical. Estas hifas intercelulares suelen estar conectadas entre sí y formar paquetes de tres o cuatro. Dentro de ellas aparecen orgánulos con aspecto de bacteria que se denominan organismos intracitoplasmáticos parecidos a bacterias (BLOs) y que se han observado en todos los estadios del ciclo de vida del hongo arbuscular. El hecho de que estas bacterias no pueden crecer en medios de cultivo dificulta su identificación. Su presencia en grandes proporciones contribuye al incremento del contenido de ADN de hongo. La presencia de secuencias procarióticas en el ADN genómico extraído del hongo arbuscular debe tenerse en cuenta a la hora de la construcción o en la búsqueda en las bibliotecas de ADN. El análisis filogenético de ADNr 16S identificó de manera ambigua estas bacterias como miembros del género *Bukholdera*. Por homología en las secuencias de ARNr parecen pertenecer al grupo II de pseudomonaceae (Biancotto y col., 1996). La presencia de estas bacterias dentro del hongo arbuscular, que es a su vez un simbiote obligado, revela un nuevo aspecto de complejidad de la micorriza arbuscular, además de ser un elemento más a tener en cuenta en el estudio de la biodiversidad microbiana en los ecosistemas.

2.2 Fase intracelular. - La hifa del hongo puede desarrollar estructuras intercelulares específicas en forma de ovillo en células más externas del parénquima cortical o estructuras intracelulares, los arbusculos, en las células del cortex más cercanas al cilindro vascular. Dichos arbusculos son los órganos principales de la simbiosis, pues son el lugar de intercambio bidireccional de nutrientes entre los dos simbioses (Smith y Gianinazzi-Pearson, 1988). Los arbusculos presentan un ciclo de formación y degeneración continua en

la raíz. La formación del arbusculo supone cambios drásticos a nivel celular para ambos simbios. La hifa fúngica intercelular que origina el arbusculo se ramifica sucesivamente en forma dicotómica y da lugar a ramas que proliferan en pequeñas hifas con terminales cortos bifurcados. La pared celular de las hifas arbusculares sufre un adelgazamiento y su estructura pasa a ser amorfa, donde desaparece la organización fibrilar de la quitina. Estas hifas aparecen con numerosos núcleos, mitocondrias, gránulos de glucógeno y vacuoladas, signo inequívoco de una gran actividad metabólica (Bonfate-Fasolo, 1994; Gianinazzi-Pearson, 1995; Gianinazzi-Pearson y col, 1996; Harrison, 1997). No se conoce cuales son las señales que modulan los cambios morfogenéticos que supone la formación del arbusculo, pero posiblemente se deban a la integración de señales procedentes de ambos simbios. De hecho se sabe que la distribución y número de arbusculos formados son variables en función de la anatomía y tipo de raíz.

La célula vegetal donde se desarrolla el arbusculo sufre también grandes cambios morfológicos como consecuencia de su adaptación a la nueva situación. Estos cambios son el resultado de una activación metabólica que la prepara para la función de intercambio. De una forma general podemos reseñar las principales modificaciones a tres niveles: activación de la transcripción, activación de la síntesis de componentes de pared y un desarrollo de membrana plástica muy activa que se invagina alrededor de las hifas arbusculares. A través de esta nueva membrana se realiza el proceso de intercambio de fuentes de carbono por fósforo.

Estructuralmente la zona de intercambio está formada por la membrana plasmática desarrollada alrededor de las hifas fúngicas, y que se denomina membrana periarbuscular, la membrana plasmática de pared delgada y desorganizada de la hifa y una zona intermedia que separa la célula vegetal del hongo, y que se denomina la matriz interfacial. La matriz interfacial está formada por un acumulo de nuevos componentes de pared segregados por la célula hospedadora que forma una estructura amorfa, no organizada, que permite una interacción a nivel celular entre ambos simbios.

El estudio de la composición y estructura de los materiales que componen la matriz interfacial puede contribuir al conocimiento de la respuesta de la célula vegetal al contacto con el hongo. En dicha matriz se han detectado, mediante pruebas inmunocitoquímicas una

serie de componentes, tales como: β 1-4 glucanos (Lemoine y col., 1995), componentes de la celulosa y ácidos galacturónicos pertenecientes a las pectinas, y numerosas proteínas, entre ellas enzimas de tipo hidrolítico como poligalacturonasas y celulasas, y una proteína típica de la pared celular: la extensina.

La extensina es una proteína rica en hidroxiprolina, muy abundante en la pared celular primaria de células vegetales. Tiene una función estructural interviniendo en procesos de ensamblaje de componentes de pared, por lo que tiene un papel fundamental en los cambios de rigidez de la pared celular primaria. Si bien existen diferencias entre plantas dicotiledoneas y monocotiledoneas a nivel de secuencia y número de genes que codifican las extensinas, la función que desempeñan es la misma. Estas proteínas son abundantes en las paredes celulares y se ha demostrado que los genes que codifican estas proteínas son regulables e inducibles por una serie de factores como herida, infección por hongos, o presencia de fitohormonas como el etileno (Showalter, 1993).

La presencia de extensinas en la matriz interfacial de células colonizadas (Balestrini y col., 1994) plantea la cuestión de si esta acumulación es producto de la activación de los mecanismos de la división celular, o es una respuesta defensiva de la planta, o incluso podría ser el resultado de los dos procesos (Gianinazzi-Pearson y col., 1996). Si consideramos que la colonización por hongos arbusculares no conlleva la inducción en las células colonizadas de otros mecanismos de defensa, como la acumulación de callosa o proteínas PR, proteínas relacionadas con la patogénesis, y dado el alto nivel de compatibilidad de la asociación micorriza arbuscular, es lógico considerar que la presencia de extensina es consecuencia de la activación del proceso de síntesis de componentes de la pared, hecho que se relaciona con la acumulación en esta zona de otros componentes de pared tales como β 1-4 glucanos y pectinas. Los arbusculos cuando dejan de ser funcionales, el citoplasma se retrae y sus ramificaciones se colapsan (Bonfate-Fasolo, 1984)

Las hifas del hongo pueden originar en la colonización del cortex unas estructuras globosas, de alto contenido lipídico, y con función de almacenamiento o reserva denominadas vesículas (Bonfate-Fasolo, 1984). Las vesículas no son efímeras como los arbusculos, sino que desde que aparecen van madurando y parece ser que, en algunas ocasiones, pueden llegar a convertirse en esporas del hongo. La transformación de estas

vesículas en esporas podría estar ligada a situaciones de estrés para la micorriza o a la muerte inminente de la planta (Bierman y Linderman, 1983)

Tras el establecimiento de los primeros arbusculos, las hifas externas del hongo se fortalecen y se ramifican intensamente, originando el denominado micelio externo, que coloniza el suelo alrededor del sistema radical. El micelio externo constituye una red tridimensional de hifas cuya extensión y distribución varía dependiendo de los organismos integrantes de la simbiosis (Smith y Gianinazzi-Pearson, 1988).

3. Fisiología de las micorrizas arbusculares

El significado de la simbiosis micorriza arbuscular está esencialmente ligado a la transferencia de nutrientes que se produce entre ambos componentes de la simbiosis. El transporte bidireccional de nutrientes que tiene lugar en el arbusculo provee al hongo de productos de la fotosíntesis, esenciales para su desarrollo ya que es heterótrofo, y compensa a la planta con la captación de agua y nutrientes del suelo, principalmente el fósforo, que son transportados a través del micelio externo. Ello significa que el hongo no es necesariamente dependiente de la planta en cuanto a nutrientes inorgánicos (Gianinazzi-Pearson y Smith, 1993). El micelio se comporta como una prolongación de la raíz, permitiendo explorar mayores volúmenes de suelo y superar así la zona de agotamiento cercana a la raíz. Por otro lado facilita la captación de nutrientes de baja o intermedia movilidad en el suelo como el P, Zn, Cu o NH_4^+ (Gianinazzi-Pearson y Smith, 1993; Jeffries y Barea, 1994).

El micelio fúngico es por tanto un elemento vital en el funcionamiento del ecosistema terrestre. La capacidad del micelio de crecer entre partículas de suelo y materia orgánica, llegando a sitios donde la raíz no alcanza, es fundamental en la captación de nutrientes. Ello, junto a la rápida absorción de los mismos, hace a la micorriza competir hábilmente con los microorganismos del suelo por nutrientes y beneficiar de esta manera a la planta. Además otros procesos como la liberación de exudados fúngicos (enzimas, compuestos carbonados etc.) así como cambios provocados en la hifosfera (zona influenciada por el micelio externo), como alteraciones del pH, pueden actuar

incrementando la disponibilidad de los nutrientes del suelo y en especial de los más insolubles (Gianinazzi-Pearson y Smith, 1993).

3.1 Fisiología de la adquisición de fósforo. A través de los estudios fisiológicos que se han llevado a cabo sobre las micorrizas arbusculares se ha puesto siempre de manifiesto su actuación preferente sobre la captación y aporte de P a la planta (Gianinazzi-Pearson y col., 1991; Jakobsen y col., 1994). El hecho de que este elemento sea esencial para los sistemas biológicos, y sin embargo, habitualmente se encuentre en el suelo en concentraciones muy bajas, justifica el interés por conocer los mecanismos que presenta la micorriza para ser más efectiva que las raíces no micorrizadas en su captación. Los niveles de P en las plantas micorrizadas son, en general, muy superiores a los de las no micorrizadas (Smith y col., 1988), lo que se explica por un mayor flujo de P hacia la planta gracias al aumento de la superficie de captación, como consecuencia de la formación del micelio externo del hongo (Cooper y col., 1978; Jakobsen y col., 1994; Jakobsen, 1995).

El transporte de nutrientes en la micorriza se suele dividir en tres etapas: la captación del nutriente por el micelio externo del hongo, su translocación a lo largo de las hifas hasta el córtex interno de la raíz y por último, su liberación a la interfase arbuscular y transferencia a las células corticales.

Una vez que las hifas externas han captado el P del suelo, este es translocado a lo largo del micelio del hongo para ser finalmente transferido a las células corticales de la raíz. El fósforo captado del suelo es transportado por las hifas fúngicas en forma de gránulos de polifosfato, osmóticamente inactivos y localizados fundamentalmente en el interior de las vacuolas fúngicas. Tras su llegada a las hifas arbusculares, los gránulos de polifosfato desaparecen de las vacuolas (Gianinazzi-Pearson y col., 1989), probablemente por su degradación mediante polifosfatasas, cuya actividad se localiza en el micelio interno del hongo, o bien mediante polifosfato quinasas. La liberación de fósforo desde el micelio a la interfase arbuscular así como la captación del mismo por la célula vegetal requiere transportadores aún no caracterizados, así como la presencia de actividad H^+ ATPasa asociada a la membrana e íntimamente ligada al transporte activo de nutrientes (Serrano, 1989).

La medida de la captación de fósforo por hifas de esporas germinadas de *G.margarita* sugiere la existencia de dos sistemas de captación de fósforo en hongos arbusculares (Beever y Bruns, 1980): uno activo con gran afinidad por el fósforo y otro pasivo. Harrison y Buuren (1995) han identificado un clon de ADN complementario (GvPT) del hongo *G. versiforme* que codifica un transportador de fósforo de alta afinidad y con expresión restringida al micelio externo por lo que se le atribuye una función esencial en la captación de fósforo del suelo.

En estudios recientes, se han clonado tres ADNcs (ADNs complementarios), MtPT1 y MtPT2 (Liu y col., 1998), y Mt4 (Burleigh y Harrison, 1997), que codifican transportadores de fosfato en planta. El estudio de la expresión de estos genes indica una represión de los mismos durante el establecimiento de la micorriza arbuscular lo que muestra la poca posibilidad de que estén implicados en el transporte de fosfato en la interfase arbuscular (Liu y col., 1998). Esta represión se detectó a partir de los estadios iniciales de la simbiosis. Este hecho confirma la existencia de señales específicas que controlan la expresión de ciertos genes durante el establecimiento de la micorriza arbuscular (Burleigh y Harrison, 1997).

El P liberado por el hongo en la interfase arbuscular es captado por las células corticales de la planta mediante un mecanismo activo, en el que muy probablemente estén implicadas ATPasas asociadas a la membrana periarbuscular (Marx y col., 1982; Gianinazzi-Pearson y col., 1991; Gianinazzi-Pearson, 1995).

El incremento de la actividad ATPasa en las plantas micorrizadas constituye un hecho diferencial de la membrana plasmática que rodea el haustorio formado por hongos patógenos, donde no se ha encontrado activación de ATPasas, quizás como consecuencia de la ausencia de un intercambio activo de nutrientes y la existencia de un flujo unidireccional de nutrientes hacía el hongo patógeno (Smith y Smith, 1990). La actividad ATPasa tampoco pudo ser detectada en los mutantes resistentes a la micorriza, en los cuales el hongo puede formar hifas intercelulares pero no puede desarrollar los arbusculos. (Lehrminier y col., 1993). Esto confirma el hecho de que el arbusculo es necesario para el intercambio entre el hongo y la planta..

El estudio de la expresión diferencial de algunos genes durante el establecimiento de la micorriza arbuscular ha permitido identificar una secuencia de ADNc que codifica un gen de ATPasa (Murphy y col., 1997). Este resultado confirma la alta actividad ATPasa de la membrana periarbuscular incrementada también por la proliferación extensiva de dicha membrana.

3.2 Fisiología de la adquisición del carbono - La planta hospedadora proporciona los compuestos carbonados requeridos por el hongo para su crecimiento y desarrollo. Estos compuestos provienen de la actividad fotosintética. Alteraciones en el proceso de fotosíntesis repercuten en el desarrollo de la colonización micorriza arbuscular (Hayman, 1974; Ocampo y Barea, 1982).

El mecanismo por el que las células vegetales liberan productos carbonados a la interfase es supuestamente pasivo (Gianinazzi-Pearson y col., 1991). Una vez en la interfase los productos carbonados han de ser captados por el hongo. Se ha postulado que esta captación se llevaría a cabo mediante procesos activos ya que en el citoplasma fúngico los esqueletos carbonados son transformados inmediatamente en compuestos típicamente fúngicos, como glucógeno y lípidos (Cooper, 1984), que se transportan hasta las hifas más externas. Esta rápida translocación de los productos carbonados permite que se mantenga su gradiente de concentración decreciente a nivel de la interfase, favorable al hongo, lo que probablemente facilite su exudación continua de las células vegetales y su captación por las hifas (Gianinazzi-Pearson y col., 1991).

Estudios recientes han identificado un ADNc que codifica un transportador vegetal de hexosas cuya expresión se incrementa en raíces de *Medicago truncatula* colonizadas por el hongo arbuscular *G. versiforme*. Este incremento no ocurre en los mutantes myc-, sugiriendo que el aumento de la expresión de este gen está relacionado con el establecimiento de una simbiosis micorriza arbuscular funcional (Harrison, 1996)

3.3 Captación de Nitrógeno y otros nutrientes. Las plantas micorrizadas poseen una mejor nutrición nitrogenada que plantas no micorrizadas. En el caso de plantas leguminosas, el efecto de las micorrizas sobre la nutrición nitrogenada parece estar mediado por la

estimulación de la fijación simbiótica, bien por una mejor nutrición fosforada (Barea, 1990), por la captación de elementos limitantes de la fijación simbiótica, tanto Fe como Mo (Raie, 1988), o bien por un efecto directo sobre la actividad de los nódulos (Ames y col., 1987).

La simbiosis leguminosa-hongo de la micorriza parece ser vital en la nutrición de dichas plantas debido al alto coste en P requerido para el proceso de nodulación y fijación de N₂ (Barea y col., 1992).

Es importante considerar no obstante que no todos los hongos son igual de eficaces en la captación de nutrientes. Así Jakobsen y colaboradores (1992), demostraron que ciertos hongos transportan el P de manera mas eficaz a la planta, mientras que otros por el contrario lo almacenan en su interior. Sin embargo, a pesar de que el micelio de algunos hongos no se muestra tan eficaz, representan un almacén de nutrientes importante e impide la dispersión, vía mineralización de los mismos al morir las plantas.

Otros nutrientes de baja movilidad en el suelo como Zn, Cu, S, K, y Fe se han encontrado en concentraciones más altas en plantas micorrizadas que en no micorrizadas, y este efecto parece ser independiente de una mejor nutrición fosforada (Cooper, 1984)

3.4 Efectos fisiológicos no nutricionales

3.4.1. Alteración del balance hormonal.

El balance hormonal en plantas micorrizadas se altera respecto a plantas no micorrizadas, tanto en cantidad como en su distribución en los tejidos vegetales (Beyrle y col., 1995). Este efecto se ha puesto de manifiesto con el ácido abscísico (Levy y col., 1980; Dixon y col., 1988; Goicoechea y col., 1995). Por otro lado se ha encontrado también un incremento de los niveles de citoquininas en algunas plantas micorrizadas (Allen y col., 1980; 1982). Este incremento en las plantas micorrizadas puede estar causado porque el hongo la produzca y la transloque a la planta, porque inhiba su degradación o porque sea el resultado de la mejora nutricional de la planta. También puede ser como consecuencia a la respuesta de una señal del hongo (Hirsch y col., 1997). Otra fitohormona que parece ser alterada por la simbiosis micorriza arbuscular es el etileno, ya que su nivel disminuye en plantas micorrizadas (McAcrthur y Knowles, 1992). El efecto de la micorriza arbuscular sobre el etileno parece estar relacionado con el efecto nutricional.

3.4.2 Resistencia a la sequía.

Las micorrizas arbusculares mejoran las relaciones hídricas en la planta. Se ha comprobado que cuando las condiciones de sequía son prolongadas, las plantas micorrizadas se muestran más tolerantes que las no micorrizadas (Azcón y col., 1988; Ruiz-Lozano y col., 1995). Sin embargo no se sabe si es un hecho atribuible a que incrementan los flujos de entrada de agua o es una respuesta secundaria, consecuencia de la mejora de la nutrición vegetal o de algún cambio fisiológico producido en la planta hospedadora que indirectamente incrementa su resistencia a la sequía (Gianinazzi y col., 1991; Al-Karaki y col., 1997).

4. Bioprotección.

El papel bioprotector de los hongos arbusculares está relacionado, generalmente, con casos de ataques de nematodos, hongos y bacterias que causan daños en el sistema radicular de muchas plantas (Dehne y Schönbeck, 1979; Dehne, 1982; Rosendahl, Barea y Jeffries, 1995; García-Garrido y Ocampo, 1988; 1989; Caron y col., 1986a; 1986b), aunque los efectos implicados en dicha protección a parte del efecto en la mejora de la nutricional, no son conocidos.

Trabajos recientes sobre la interacción tomate/*G. mosseae*/*Phytophthora parasítica*, mostraron el control que ejerce el hongo arbuscular sobre el hongo patógeno (Cordier y col., 1996; Pozo y col., 1996; Trotta y col., 1996): En estos trabajos se observó que la premicorrización de las raíces reduce de manera significativa del número de necrosis, y que el número de las células invadidas por el microorganismo patógeno disminuye en presencia del hongo arbuscular. Del mismo modo se observó una disminución del estado necrótico de las células que contenían arbusculos a pesar de estar adyacentes a aquellas que contenían el microorganismo patógeno (Cordier y col., 1997)

Los mecanismos por los que se produce la reducción de la enfermedad en las plantas micorrizadas no están claros y parecen complejos. Se propusieron varias hipótesis para explicar este fenómeno (Caron, 1989; Bethlenfalvay y Linderman, 1992). La nutrición

mineral más equilibrada resultante de la presencia de las endomicorrizas favorece el desarrollo de plantas sanas y fuertes, las cuales son más resistentes al estrés biótico o abiótico. La competición por los nutrientes provenientes de la raíz hospedadora entre el hongo de la micorriza y el hongo patógeno, las modificaciones morfológicas o anatómicas (aumento de la lignificación de las células endodermicas), así como el incremento de la biomasa del sistema radical debido a la micorrización podrían estar implicados en la reducción de la enfermedad. Por otra parte, la formación de la micorriza puede modificar los exudados radicales creando un ambiente rizosférico menos atrayente para los microorganismos patógenos (Bansal y col., 1994). Por otro lado, las hifas del hongo arbuscular se desarrollan en la rizosfera formando una micorrizosfera que puede favorecer la proliferación de microorganismos antagonistas de microorganismos patógenos (Linderman, 1992; Leeman, 1995; Citeresi y col., 1996).

En los tejidos de radicales, el efecto del hongo arbuscular frente a los microorganismos patógenos podría estar relacionado con una competición por los sitios de infección de las raíces, al igual que la competición por la infección de las distintas capas celulares. Sin embargo, existen pocos datos de los mecanismos celulares y moleculares que podrían estar implicados durante estas interacciones. La acumulación de ciertos compuestos durante la simbiosis micorriza arbuscular como la arginina (Baltruschat y Schönbeck, 1975), los compuestos fenólicos y los isoflavonoides antimicrobianos (Dehne y col., 1978; Morandi y col., 1984; 1996) podrían contribuir a un control del desarrollo de un agente patógeno. Otros estudios mostraron que la reducción del desarrollo del hongo patógeno *Fusarium oxysporum* en las raíces de zanahorias transformadas y mixorrizadas está relacionada con las reacciones de la pared celular de las plantas y con la acumulación de los compuestos fenólicos (Benhamou y col., 1994).

5. Susceptibilidad de las plantas a la colonización por hongos de la micorriza arbuscular.

La susceptibilidad de las plantas a la micorriza arbuscular o dicho de otro modo, la capacidad de una planta para ser colonizada por un hongo arbuscular en mayor o menor

grado va a depender de que haya un reconocimiento entre simbiontes y de que exista una compatibilidad entre los genomas de ambos simbiontes.

La especificidad en sentido estricto no existe en la asociación micorriza arbuscular, tanto desde el punto de vista del hongo como desde el punto de vista de la planta (Harley y col., 1983). Hay especies vegetales que no son susceptibles de micorrizarse y dentro de las susceptibles, distintas especies, e incluso distintas variedades de una misma especie, pueden mostrar un grado diferente de susceptibilidad (Azcón y col., 1981). De igual modo existen plantas con diferente grado de dependencia de la micorriza arbuscular, y los factores medioambientales influyen también en la mayor o menor susceptibilidad.

El uso de plantas mutantes, plantas no hospedadoras y variedades intraespecíficas constituye una metodología de especial validez en el estudio del fenómeno de la susceptibilidad desde el punto de vista del control genético de la misma por parte de la planta. En cada uno de estos sistemas podemos detectar fenómenos de incompatibilidad o de diferentes grados de susceptibilidad asociados a fondos genéticos diferentes.

Algunas plantas de ciertas familias (Cruciferae, Brassicaceae, Chenopodiaceae, Cypraceae, Juncaceae, Proteaceae y algunas especies del genero *Lupinus*), no forman micorrizas. Se han observado diferentes mecanismos que podrían estar relacionados con la susceptibilidad de estas plantas tanto por la ausencia de factores que estimulan el desarrollo del micelio, indicando la existencia de características específicas de plantas hospedadoras esenciales en la iniciación del proceso de infección por el hongo arbuscular (Bécard y col., 1990; Gianinazzi-Pearson y col., 1989; Giovannetti y col., 1993; Giovannetti y col., 1994), como por la presencia de efectos inhibidores, inducidos por la presencia del hongo o constitutivos, de ciertas especies vegetales. Sin embargo no existe un mecanismo general conocido que sea responsable de la no susceptibilidad.

Los mutantes resistentes a la micorriza representan otro tipo de plantas no hospedadoras. El estudio de los mecanismos celulares y moleculares de la resistencia a la micorrización en estas plantas ha permitido detectar la presencia de una respuesta defensiva caracterizada por el acumulo de compuestos fenolicos y β 1-3 glucanos en el lugar de la formación del apresorio, estos compuestos se observan normalmente en las plantas en presencia de microorganismos patógenos (Gollotte y col., 1993). La no susceptibilidad en

plantas mutantes se debe a la activación de la respuesta defensiva de la planta como consecuencia de la mutación producida en un gen esencial en la compatibilidad de la simbiosis y que afecta principalmente a las etapas iniciales de reconocimiento y formación del apresorio en la mayoría de los mutantes analizados.

6. Respuesta de la planta a la colonización por hongos arbusculares

En toda asociación compatible o incompatible entre planta y microorganismo se establece un intercambio de señales que inducen una reacción en la planta que puede ser de tipo hipersensitiva en caso de microorganismos patógenos o permisiva si se trata de microorganismos simbióticos. En el caso de micorrizas arbusculares las señales de intercambio y reconocimiento entre ambos simbioses empiezan antes de que tenga lugar el contacto físico. Está demostrado que la presencia de la raíz es necesaria para el desarrollo del micelio. Existen numerosos datos que sustentan la idea de que factores solubles producidos por la raíz estimulan la germinación de las esporas y el desarrollo del micelio en el suelo (Giovannetti y col., 1993), sin embargo, no está aclarado cual es el mecanismo de acción de esos factores, ni su naturaleza química, pues bien pueden actuar como simples factores nutricionales requeridos por el hongo o ser señales específicas que dirijan el desarrollo del micelio hacia la raíz. En un principio y por comparación con otras asociaciones entre plantas y microorganismos patógenos o simbioses, donde compuestos fenólicos producidos por la raíz tienen un papel fundamental en la comunicación, se estudió el papel de los exudados flavonoides de la raíz sobre el desarrollo de micelio fúngico de hongos arbusculares (Phillips y col., 1992). Si bien existen datos para afirmar que dichos compuestos tienen un efecto positivo sobre el desarrollo y crecimiento independiente del micelio, no está clara su función como verdaderas señales inductoras de la formación de micorrizas arbusculares. Se ha demostrado que la ausencia de dichos compuestos flavonoides en el medio no previene la formación de la micorriza (Bécard y col., 1995). Por lo tanto deben existir otros metabolitos capaces de estimular el desarrollo del hongo arbuscular y evidentemente queda demostrado que los flavonoides no son necesarios para el establecimiento de la simbiosis micorrízica (Bécard y col., 1995).

El contacto del hongo con la raíz hospedadora se realiza mediante la formación de una estructura similar a un apresorio. Este se origina por el engrosamiento apical de la hifa de contacto. Normalmente del apresorio suelen formarse varias hifas de penetración que pueden entrar en la raíz bien directamente a través de la pared de una célula epidérmica o por los espacios intercelulares. No existen conocimientos sobre las posibles señales que inducen la formación del apresorio, tras el contacto, pero si parece que la penetración en la raíz depende de las características y composición de la pared celular vegetal, y que es un mecanismo controlado por la planta en la cual se ha observado que se produce un acumulo de material de pared vegetal en las células epidérmicas penetradas por el hongo (Dexheimer y col 1979). Dicho acumulo no es comparable al producido en las interacciones planta microorganismo patógeno. En el caso de las plantas mutantes resistentes a la micorriza el hongo arbuscular es capaz de formar el apresorio en la superficie de la raíz pero su penetración se bloquea por los fenoles depositados en las paredes de la células expuestas a la colonización (Gollotte y col., 1993). En el caso de las plantas susceptibles a la micorrización, el contacto de las hifas con la raíz no produce ninguna respuesta incompatible, lo que muestra que las reacciones de defensa se producen después de la formación del apresorio, cuando el hongo ha pasado del estado saprofítico al estado infectivo (Giovannetti y col., 1994). Cuando la espora del hongo arbuscular germina, el tubo germinativo se ramifica en todas las direcciones. Este desarrollo incrementa la probabilidad de contactar con las raíces. Solo las señales químicas correctas provenientes de las raíces de las plantas promueven la proliferación de las hifas. Después de la formación del apresorio la penetración del hongo arbuscular en las raíces dependería del genoma de la planta hospedadora. Así el desarrollo del hongo dentro de la raíz puede ser inhibido en las plantas resistentes o estimulado en el caso de las plantas susceptibles a la micorrización (Giovannetti y col., 1994). El análisis de los factores implicados en el reconocimiento de ambos simbioses mostró la existencia de moléculas con un peso molecular de 500 Da capaces de inducir una respuesta de reconocimiento (Giovannetti y col., 1996).

El estudio de la respuesta de la planta a la colonización por hongos arbusculares tiene como mayor inconveniente el hecho de que el hongo no puede crecer en cultivo puro, y por tanto no es manipulable, a la vez que se dificulta su manejo como inoculante en condiciones

controladas para conseguir una respuesta sincronizada en la raíz. El desarrollo de sistemas de inoculación a partir de grandes cantidades de esporas, así como el uso de sistemas de "in vitro" para el cultivo conjunto de raíces y hongo arbuscular (Chabot y col., 1992; Mugnier y Mosse, 1987) facilitan el manejo del hongo con fines experimentales.

Los primeros estudios en la investigación de la respuesta diferencial de las raíces colonizadas por hongos arbusculares se basan en el análisis diferencial de los polipéptidos solubles, observándose numerosas modificaciones cualitativas y cuantitativas tanto en los estadios tempranos como en los estadios tardíos de las interacciones planta-hongo (Dumas y col., 1990; Arines y col., 1993; Simoneau y col., 1996). Los polipéptidos inducidos por la simbiosis micorriza arbuscular se denominaron micorrizinas en referencia a las nodulinas, actinorizinas y haustorinas en otras interacciones entre planta y microorganismos (Verma y col., 1992; Roberts y col., 1993; Seguin y Lalonde, 1993). Utilizando la técnica del análisis de polipéptidos se han identificado polipéptidos específicos, asociados a raíces de tomate transformadas (Ri-T-DNA) y colonizadas por el hongo arbuscular *G.intraradices* (Simoneau y col., 1994). En guisante, el uso de plantas sensibles (myc+nod+, myc+ nod-) y resistentes (myc-nod-) a la micorrización ha permitido la identificación de proteínas específicas del genotipo sensible a la micorriza arbuscular, tanto mediante electroforesis monodimensional (Schellenbaum y col., 1992) como bidimensional (Samra y col., 1997). Estos autores mostraron que las raíces resistentes a la micorriza se caracterizan por la represión de algunos polipéptidos cuando están en presencia del hongo arbuscular. Además, se observó la presencia de polipéptidos específicos de la micorriza en las raíces hospedadoras (Samra y col., 1997).

El hecho de que el fenómeno de represión de genes que se expresan constitutivamente en plantas este asociado a la incompatibilidad y resistencia en mutantes Myc-, hace pensar que el fenómeno de represión de estos genes en la interacción compatible sea uno de los componentes esenciales en el establecimiento de la micorriza arbuscular (Gianinazzi y col., 1995).

Las alteraciones cualitativas y cuantitativas de la expresión génica se confirmaron mediante el análisis de polipéptidos obtenidos por traducción "in vitro" del ARN

mensajero de raíces colonizadas o no por el hongo arbuscular *G. mosseae* (García-Garrido y col., 1993; Dumas-Gaudot y col., 1998).

El uso de la metodología del análisis diferencial del ADNc obtenido mediante transcripción inversa del ARN mensajero y reacción en cadena de la polimerasa (DDRT-PCR) aplicada a la investigación en micorrizas arbusculares ha permitido aislar genes vegetales implicados en la simbiosis, tales como un gen transmembranario que parece tener un papel regulador (Martin-Laurent y col., 1996; 1997). Mientras que el uso de la metodología de la RT-PCR permitió identificar una proteína intrínseca que se activa a la vez por la presencia del hongo arbuscula como por la de ciertos hongos patógenos (Roussel y col., 1997).

La construcción de bibliotecas de ADNc de raíces colonizadas y la búsqueda en ellas de genes de expresión diferencial ha permitido la identificación de un ADNc en sorgo cuya secuencia es muy similar a la de ATPasas (Murphy y col., 1996). Usando una biblioteca de ADNc obtenida a partir de raíces de *M. truncatula* se identificó un gen que codifica un transportador de hexosa (Harrison y col., 1995), además de tres genes, cuya expresión se reprime por el establecimiento de la micorriza arbuscular (Burleigh y col., 1997; Liu y col., 1998). El barrido diferencial de estas bibliotecas de ADNc es otra metodología que está dando sus frutos en la búsqueda de marcadores genéticos asociados a la colonización micorriza arbuscular (Tahiri-Alaoui y Antoniw, 1996; Murphy y col., 1997).

7. Similitudes entre la respuesta a la formación de la micorriza arbuscular y a la formación del nódulo por *Rhizobium*.

La simbiosis micorriza arbuscular junto a la formada por bacterias de la familia Rhizobiaceae y plantas leguminosas, constituyen los dos tipos de simbiosis más comunes establecidas por la raíz de las plantas. La simbiosis micorriza arbuscular está descrita como la más antigua de las dos, existiendo registro de estructuras arbusculares provenientes del periodo Devónico (Remy y col., 1994).

Son muchas las investigaciones llevadas a cabo sobre el estudio comparativo de ambas simbiosis, encontrando muchas similitudes tanto a nivel morfológico, fisiológico y

genético (Figura 2), que han llevado a pensar en la conservación de mecanismos de acción en la formación de ambos tipos de simbiosis.

Si observamos a nivel morfológico, los dos microsimbiontes no colonizan los meristemas ni el cilindro central de la raíz sino que penetran la raíz por la epidermis y se desarrollan en el parénquima cortical. En ambos tipos de simbiosis se desarrolla una fase de penetración en la cual el microsimbionte está aislado de la célula hospedadora por una matriz de material de pared celular vegetal, bien sea el canal de infección o la matriz que rodea la hifa fúngica. El establecimiento de ambos tipos de simbiosis origina una serie de modificaciones similares en los tejidos y células vegetales colonizadas, tales como la intensificación de la actividad metabólica citoplasmática y nuclear, la síntesis de glucoconjugados y componentes de la pared, la proliferación de la membrana citoplasmática activa (peribacteroida o periarbuscular) que rodea al microsimbionte, y la creación de una interfase simbiótica con intensa actividad de intercambio metabólico.

La molécula señal de la simbiosis en *Rhizobium* (factor Nod) está compuesta de residuos de β 1-4 N-acetil-glucosamina unidos a un ácido graso en su extremo no reductor y otros sustituyentes, tales como grupos sulfato o fucosa en el extremo reductor. Esta composición se asemeja más a un derivado de la quitina fúngica (formada por restos de β 1-4 N-acetil-glucosamina) que a cualquier molécula de la pared celular bacteriana. Este factor que es esencial en la interacción *Rhizobium*-leguminosa, es capaz de incrementar la colonización de plantas de soja por hongos arbusculares (Xie y col., 1995), al parecer mediante la activación de producción de flavonoides por la raíz.

Los flavonoides, que estimulan la transcripción de genes simbióticos de *Rhizobium*, favorecen el desarrollo de las hifas del hongo arbuscular. En este sentido se especula con la posibilidad de la existencia de un factor producido por hongos arbusculares y con una función similar a la del factor Nod, aunque sin el condicionante de especificidad que existe en la asociación leguminosa-*Rhizobium*.

El estudio de la identificación de respuestas de plantas ante la infección por hongos micorrizicos y bacterias fijadoras de nitrógeno en simbiosis mostró la existencia de una reacción inmunológica con anticuerpos frente a nodulinas solubles de al menos dos polipéptidos obtenidos por traducción "*in vitro*" de ARNm de plantas micorrizadas. Sin

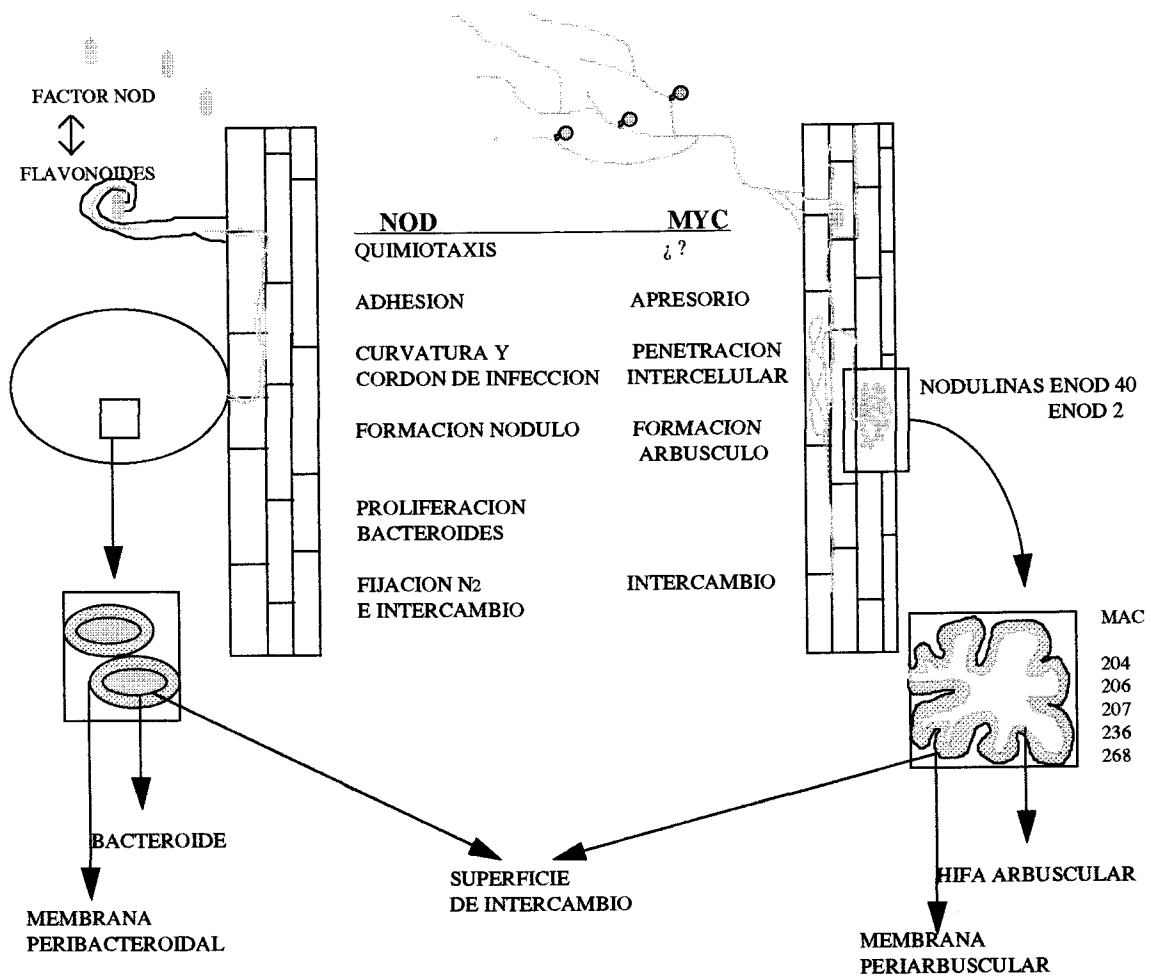


Figura 2. Esquema comparativo de las distintas etapas en el proceso de nodulación con las etapas del proceso de micorrización. De forma esquemática se muestran las estructuras más características formadas en cada una de las dos simbiosis.

embargo el tamaño molecular de esos polipeptidos no corresponde con ninguna de las nodulinas conocidas. También se detectó la presencia de polipeptidos con reacción inmunológica frente a suero de nodulinas del mismo tipo que las que están unidas a la membrana peribacteroidea (Wyss y col., 1990). Otros estudios mostraron una reacción inmunológica frente a glucoconjugados del compartimiento peribacteroideo y del canal de infección, localizadas respectivamente en la membrana periarbuscular e interfase arbusculo-célula vegetal o en la matriz formada de componentes de pared celular vegetal depositada alrededor de la hifa fúngica (Perotto y col., 1994; Gollotte y col., 1995). La presencia de ciertas nodulinas tempranas y algunas tardías en las raíces micorrizadas es un indicio de la conservación de señales y respuestas en los dos tipos de simbiosis (Van Rhjin y col., 1997; Frühling y col., 1997)

La presencia de estas proteínas producidas en la raíz de plantas micorrizadas y con reacción inmunológica frente a suero de proteínas del nódulo demuestra una posible correlación entre la respuesta de la planta a la micorrización y a la bacteria endosimbiótica mediante la expresión de genes simbióticos comunes.

La idea de la expresión de genes simbióticos comunes viene reforzada por los resultados de Duc y colaboradores (1989), los cuales muestran la relación a nivel genético entre la respuesta a la nodulación y la formación de micorrizas arbusculares. El estudio de una serie de mutantes de guisantes y haba que forman nódulos no efectivos (*nod+* *Fix-*) o bien incapaces de nodular (*nod-* *Fix-*) mostró que 50% de los mutantes de guisantes y uno de los de haba eran incapaces de formar asociación micorrízica con varios hongos ensayados. Estos mutantes se denominaron *myc-* (Duc y col., 1989). Posteriormente se han identificado otros mutantes en diferentes especies leguminosas con nodulación ineficiente o defectiva que presentan el carácter *myc-*, y caracterizados por un bloqueo de la micorrización a diferentes etapas. En guisante se han identificado dos tipos de mutantes *myc-*, los denominados *myc-1* caracterizados por un bloqueo de la colonización fúngica en la etapa inicial de formación del apresorio (Gollotte y col., 1993; Gianinazzi-Pearson, y col., 1994) y los *myc-2* defectivos para la formación de arbusculos en asociación con hongos arbusculares pero capaces de desarrollar una colonización de hifas intercelulares en el parenquima cortical (Lehrminier, 1993; Gollotte, 1994). Los mutantes de guisantes *myc-*

1 pertenecen a 4 grupos de complementación diferentes por lo que se supone que al menos 4 locis están implicados en el control del carácter *myc* (Duc y col., 1989; Gianinazzi-Pearson, 1994; Gollotte y col., 1996). El bloqueo de la micorrización en mutantes *myc-1* se debe a la alteración de la respuesta defensiva de la planta que normalmente es transitoria durante la colonización de la raíz por el hongo, y que en estos mutantes se convierte en una respuesta similar a la que origina un microorganismo patógeno (Gollotte y col., 1995, 1996). El hecho de que mutantes de guisantes *myc-* al igual que el cultivar salvaje no presenten resistencia a patógenos induce a pensar que la mutación afecta a un gen simbiótico.

Todos los datos aportados anteriormente sugieren claramente la existencia de un programa de expresión génica en la raíz que forma endosimbiosis, y la conservación de mecanismos y respuestas implicadas (Gianinazzi-Pearson y Denarié, 1997). En este sentido es razonable pensar que la mayoría de las plantas vasculares (que forman asociación micorriza arbuscular) posean los genes simbióticos necesarios para el establecimiento de la asociación con bacterias fijadoras de N_2 . La identificación de genes simbióticos en leguminosas y la búsqueda de su homólogo en otras especies vegetales contribuirá a la investigación sobre la evolución del programa genético para la nodulación a partir del ancestral programa para la formación de la micorriza arbuscular.

8. Factores implicados en la respuesta defensiva de las plantas a la colonización por hongos arbusculares.

El establecimiento de una asociación micorriza arbuscular funcional supone una coordinación e integración a nivel de fisiológico y genético entre ambos asociados, hongo arbuscular y raíz. Esta integración supone, por un lado, la capacidad del hongo de evitar, suprimir o superar los mecanismos de defensa de la planta y por otro la capacidad de la planta de mantener un control sobre el desarrollo del micelio fúngico en el interior de la raíz, que queda restringido al parénquima cortical y que nunca alcanza las zonas meristemáticas o el cilindro central.

Son numerosos los estudios realizados en la investigación de la simbiosis micorriza arbuscular enfocados sobre el análisis de marcadores de la respuesta defensiva de la planta durante el desarrollo de la simbiosis y su implicación en el control de la misma, tomando como ejemplo mecanismos de defensa observados en la planta frente al ataque de microorganismos patógenos.

Las plantas poseen la capacidad de defenderse frente al ataque de microorganismos mediante una serie de mecanismos constitutivos o inducidos por la presencia del microorganismo patógeno. Estos mecanismos son rápidamente activados en aquellas asociaciones planta-patógeno incompatibles, originando una serie de modificaciones a nivel citológico, morfológico y molecular que son responsables de la resistencia frente a ese microorganismo patógeno. En el caso de interacciones compatibles, la activación de mecanismos de defensa no es tan potente y las modificaciones asociadas con la resistencia no alcanzan ni la intensidad ni la extensión deseadas, produciéndose por tanto la infección y el desarrollo de la enfermedad. Básicamente la respuesta defensiva de la planta incluye modificaciones a nivel de su pared celular y el acumulo de metabolitos secundarios y proteínas PR (proteínas relacionadas con la patogénesis). La modificación de la pared celular constituye un elemento de defensa físico, de barrera frente a la penetración, mientras que la producción de metabolitos y proteínas PR está relacionada más con una acción directa sobre el microorganismo patógeno, si bien la función de muchos de estos metabolitos y proteínas no está aclarada.

A continuación se analiza el papel de algunos mecanismos de defensa en plantas durante el desarrollo de la micorriza arbuscular.

Modificaciones de la pared celular.- El análisis citoquímico de las modificaciones de la pared celular vegetal asociadas a la formación de la asociación micorriza arbuscular, y por tanto en respuesta a la colonización por el hongo arbuscular, no ha mostrado ningún signo de reforzamiento de la pared celular, tales como la acumulación de fenoles o callosa en las zonas de penetración y formación del apresorio (Gianinazzi-Pearson y col., 1996). Tan solo se han observado algunos engrosamientos de la pared celular en algunas plantas (puerro) en las zonas de penetración del hongo y nunca asociados con acumulo de callosa o

fenoles (Garriock y col., 1989). La única modificación de pared celular vegetal observada en relación con el establecimiento de la asociación micorriza arbuscular es la deposición de material de pared formando una matriz que rodea las hifas arbusculares y que constituye una estructura continua con la pared celular primaria (Bonfate-Fasolo, 1989). En esta matriz no se ha detectado callosa (Lemoine y col., 1995), y se considera una zona de contacto entre la pared fúngica y la célula vegetal.

Peroxidasas:- Son otras de los factores implicados en el reforzamiento de la pared celular en las interacciones frente a microorganismos patógenos (Dixon y col., 1990; Collinge y col., 1994), por su intervención en la lignificación y suberización de la pared celular, además de producir peróxido de hidrógeno que actúa como agente antimicrobiano (Stermer y col., 1995). El estudio de la actividad de peroxidasas durante el desarrollo de la colonización micorriza arbuscular solo ha puesto de manifiesto ciertos incrementos transitorios de actividad, sobre todo en etapas iniciales (Spanu y col., 1988; Gianinazzi y col., 1992; Mac Arthur y col., 1992). Estas enzimas parecen estar asociadas al control del desarrollo del hongo en los tejidos superficiales de la raíz y no en el control de la formación y la senescencia de arbusculos (Gianinazzi-Pearson, 1995)

Especies reactivas del oxígeno: - Uno de los aspectos que está teniendo especial relevancia en la investigación de la respuesta defensiva de la célula vegetal es la participación de las especies reactivas del oxígeno (O_2^- , H_2O_2 , etc.) en los mecanismos de defensa (Hammond-Kosack y Jones, 1996; Levine y col., 1994; Mehdy, 1994). Estas especies reactivas están relacionadas con la actividad de peroxidasas y otras enzimas relacionadas con el metabolismo del O_2 , tales como las catalasas y superóxido dismutasas. Se ha propuesto una participación directa del H_2O_2 en los fenómenos de formación de precursores de lignina vía peroxidasa (Bolwell y col., 1995), de reforzamiento de la pared por un entrecruzamiento vía oxidativa de proteínas de la pared celular (Bradley y col., 1992), e incluso se ha observado un fenómeno de toxicidad del H_2O_2 frente a microorganismos patógenos a concentraciones fisiológicamente normales en plantas (Peng y Ku'c, 1992). Independientemente del papel directo que puedan tener las especies reactivas del oxígeno en los mecanismos de defensa,

también se ha postulado su intervención como señales dentro del esquema general de traducción de señales en la respuesta defensiva. Así el H_2O_2 incrementa la actividad de la enzima ácido benzoico 2- hidroxilasa, uno de las enzimas implicadas en la síntesis de ácido salicílico (SA), molécula señal en muchas respuestas de tipo defensivo (León y col., 1995). También se ha encontrado un papel activador del H_2O_2 en la expresión de ciertos genes implicados en la protección, tales como el de la Glutathion S-transferasa (Levine y col., 1994). Por otro lado, la generación de especies reactivas del oxígeno conlleva la formación de lipóperóxidos, implicados también como señales en la generación de la respuesta defensiva mediada por SA (León y col., 1995). Sin embargo solo existe una evidencia directa de la participación de H_2O_2 en la protección frente a microorganismos patógenos. Plantas transgénicas de patata que expresan constitutivamente una glucosa oxidasa generadora de H_2O_2 poseen mayor resistencia frente a *Erwinia cartovora* sp. carotovora, y *Phytophthora infestans* (Wu y col., 1995). El mecanismo por el cual se hace efectiva esta protección es desconocido.

Evidentemente el papel de las enzimas relacionadas con el metabolismo de O_2 , como generadores de especies reactivas del oxígeno implicadas en mecanismos de transducción de señales en la respuesta defensiva es aún desconocido, y mucho más su posible participación en los fenómenos de reconocimiento e interacción de plantas con microorganismos simbióticos, tales como hongos arbusculares.

β1-3 glucanos.- Otras moléculas de la pared celular relacionadas con el mecanismo de defensa son los β 1-3 glucanos. Estos compuestos son constituyentes de la callosa y han sido inmunolocalizados alrededor del punto de penetración de la hifa al interior de la célula vegetal. La estructura homogénea del material de la pared celular en el sitio de penetración del hongo hace que sea probable que estos materiales represente más bien cadenas dispersas de glucano que polímeros de callosa. Estos compuestos desaparecen a lo largo del material de la pared cuando el hongo se ramifica para formar el arbúsculo (Gianinazzi-Pearson, 1995; Gollotte y col., 1995). Por otra parte la síntesis de β 1-3 glucano no es una característica constante de la reacción de pared en todas la plantas. Se ha observado en guisante, tabaco y

puerro micorrizado (Gianinazzi-Pearson, 1995; Gollotte y col., 1995), pero no en maíz (Balestrini y col., 1994).

HRGPs: - Las HRGPs (glucoproteínas ricas en hidroxiprolinas) son glucoproteínas estructurales de la pared celular pertenecientes al grupo de las extensinas. Si bien existen diferencias entre plantas mono y dicotiledoneas en cuanto a secuencia y número de genes que codifican para estas proteínas, hay importantes características comunes en cuanto a su función. Son proteínas estructurales que se acumulan en tejidos de la planta en respuesta a ataque por microorganismos patógenos, particularmente en espacios intercelulares (Benhamou y col., 1990; O'Connell y col., 1990). Estas glucoproteínas se acumulan en cantidades significativas en raíces de perejil (Franken y Gnädinger, 1994) y de maíz micorrizadas, y además han sido inmunolocalizadas alrededor de la hifa del arbusculo en el punto de penetración de la célula vegetal y en la zona de contacto interfacial (Bonfate y col., 1991; Balestrini y col., 1994). Dicha deposición puede reflejar un mecanismo de defensa en un limitado tiempo de desarrollo del hongo simbiótico dentro de la célula hospedadora, aunque su acumulación en esta zona parece estar relacionada con la activación metabólica general de la célula hospedadora y con el mecanismo de formación de la matriz interfacial con componentes de pared secretados por la célula hospedadora, tales como β 1-4 glucanos y pectinas (Bonfate-Fasolo, 1994; Gianinazzi-Pearson, 1995; Harrison, 1997).

Ruta del fenilpropanoide.- La acumulación de los derivados de la ruta del fenilpropanoide constituye uno de los mecanismos más complejos de respuesta defensiva inducido en la planta frente al ataque por microorganismos patógenos. En este grupo complejo de compuestos se incluyen productos implicados en diversos aspectos del crecimiento y desarrollo de las plantas, así como en las interacciones con microorganismos (Haklbrock y col., 1989; Dixon y col., 1990). Dentro de los compuestos implicados en la interacción con microorganismos tienen especial importancia los flavonoides e isoflavonoides por su implicación como moléculas señales en la interacción Rhizobium-leguminosa, así como las fitoalexinas por su acción como agentes antimicrobianos, los precursores de la lignina, suberina y ácidos fenólicos por su implicación en los fenómenos de reforzamiento de la

pared celular en respuesta al ataque de microorganismos patógenos, y el ácido salicílico por su implicación como molécula señal en la respuesta de resistencia sistémica adquirida (SAR) (Dixon y Paiva, 1995).

En estudios realizados en cuanto a la acumulación de estos compuestos en la asociación micorriza arbuscular se ha descrito un incremento en los niveles de gliceolinas y coumestrol (fitoalexinas) en raíces de soja micorrizadas (Morandi y col., 1984). Sin embargo estos niveles son mucho más bajos que aquellos encontrados durante las interacciones con microorganismos patógenos. Se detectó un incremento de los niveles de gliceolinas solamente cuando la micorriza estaba completamente establecida y no durante las etapas iniciales de la colonización, contrariamente a lo observado después de la inoculación de raíces con el hongo patógeno *Rhizoctonia solani* (Wyss y col., 1991).

En raíces de alfalfa micorrizadas se ha detectado la producción de formononetinas, acompañada por un incremento a nivel de transcripción de ARN de enzimas claves en la ruta del fenilpropanoide, tales como PAL y CHS (fenilalanine -amonio- liasa y chalcona sintasa). Este incremento fue seguido de un descenso en los niveles de transcripción de ambas enzimas hasta un nivel inferior al encontrado en las raíces de plantas no micorrizadas (Lambais y Mehdy, 1998; Volpin y col., 1994; 1995). Sin embargo, Harrison y Dixon (1993) mostraron que en plantas de *M. truncatula* los niveles de transcripción de ambas enzimas aumentan durante el establecimiento de la micorriza arbuscular. Usando la técnica de hibridación "in situ", Harrison y Dixon (1994) han demostrado una expresión de PAL y CHS restringida a las células que contienen arbusculos. Otras enzimas que participan en la ruta de biosíntesis de estos compuestos, tales como isoflavona reductasa (IFR) y chalcona isomerasa (CHI) no parecen afectarse por las micorrizas. La inducción de enzimas relacionadas con el metabolismo de fenilpropanoide no parece ser un fenómeno generalizado ni coordinado, y cuando ocurre, parece que depende de los genotipos de la planta y del hongo implicados (Bell y col., 1986). Además el patrón de expresión de todas estas enzimas es totalmente distinto del observado en las plantas cuando están infectadas por microorganismos patógenos. En este último caso las enzimas PAL y CHS están activadas en células adyacentes de las que están en contacto con el microorganismo patógeno (Schemlzer y col., 1989) y junto con las enzimas CHI y IFR están inducidas de forma

coordinada en las células infectadas (Bell y col., 1986). No hay, por tanto, conclusiones claras sobre la implicación de los productos de este metabolismo en las interacciones con las micorrizas. Su presencia parece estar relacionada con la fisiología de la simbiosis más que con una respuesta defensiva de la planta, y solo existen datos de acumulación de compuestos fenólicos e isoflavonoides asociada con una respuesta de hipersensibilidad en respuesta a la micorrización en la asociación específica de raíces transformadas (Ri T-DNA) de alfalfa (variedad Gilboa) colonizadas en un sistema “*in vitro*” con *Gi. margarita* (Douds y col., 1998). En este caso particular se sugiere un fenómeno específico de incompatibilidad asociado al genotipo del hongo. Si se han encontrado una serie de metabolitos secundarios de plantas que pueden tener importancia en el desarrollo de la simbiosis micorriza arbuscular. En este sentido se ha encontrado que el hongo arbuscular *G. intraradices* induce la acumulación de cantidades significativas de sesquiterpenoides (Nemec y col., 1990), y se ha relacionado la producción de estos compuestos con una respuesta específica de la planta a la micorrización (Maier y col., 1995; 1997). También se ha observado un incremento de los niveles de los ácidos ferúlicos y ácido coumárico (Grandmaison y col., 1991), así como de ácido abscísico (Danneberg y col., 1992) durante el desarrollo de la micorriza arbuscular.

Proteínas PR.- Otro de los componentes típicos de la respuesta defensiva de las plantas es la acumulación de proteínas de respuesta a microorganismos patógenos, o proteínas PR (Van Loon y col., 1994). Estas proteínas se han detectado en tejidos de numerosas especies vegetales inducidas por algún tipo de estrés biótico ó abiótico, o de manera constitutiva en tejidos de plantas sanas en determinadas condiciones fisiológicas (senescencia, floración, etc.). Se consideran una serie de características generales que poseen las proteínas PR. Según van Loon (1994) estas proteínas son estables y solubles a pH ácido, son resistentes a la degradación por exo y endo proteasas, poseen un peso molecular entre 8 y 50kD, tienen localización parietal ó vacuolar, y una vida media suficientemente larga que permite su acumulación. Las proteínas PR se agrupan en diferentes familias en función de sus características químicas, sus relaciones serológicas y/o su actividad biológica.

Las primeras investigaciones en relación a la acumulación de proteínas PR durante el establecimiento de la simbiosis micorriza arbuscular mostraron la presencia de una proteína

PR en las células de tabaco que contenían arbusculos de *G. mosseae* (Gianinazzi-Pearson y col., 1992). Posteriormente se ha detectado la presencia de transcritos de PR-1a en raíces micorrizadas de perejil (Franken y col., 1994). Dentro de las proteínas PR de función conocida se encuentran las quitinasas y las β -1-3 glucanasas. Las quitinasas y β -1-3 glucanasas son potentes inhibidores del crecimiento de hongos ya que pueden degradar la quitina y β -1-3 glucano, constituyentes mayoritarios de la pared celular de muchos hongos (Bartnicki-Garcia., 1987). Los hongos arbusculares tienen paredes quitinosas y aquellos géneros pertenecientes al suborden de los Glomineae tienen también paredes constituidas por β -1-3 glucano (Gianinazzi-Pearson y col., 1994).

Se han detectado incrementos transitorios de actividad quitinasa en las primeras etapas de la interacción entre las raíces de diferentes plantas y hongos arbusculares (Spanu y col., 1989; Lambais y col., 1993; Volpin y col., 1994). Una vez el hongo se establece dentro de la raíz la actividad de la quitinasa disminuye a niveles más bajos de aquellos encontrados en las raíces no colonizadas (Spanu y col., 1989; Vierheilig y col., 1994). Otros autores han detectado mediante hibridación "*in situ*" transcritos de quitinasa (Blee y Anderson, 1996) y β -1-3 glucanasa (Lambais y Mehdy, 1995) en células que contienen arbusculos. Se ha detectado un incremento de la actividad transcripcional en el inicio de la interacción planta-hongo seguido por una fuerte represión de los genes expresados (Tahiri-Alaoui y col., 1993), corroborando la inhibición de la transcripción de las enzimas citadas en estadios tardíos de la colonización (Lambais y col., 1993). Se ha propuesto un papel regulador del desarrollo fúngico en la raíz por parte de las quitinasas y β -1-3 glucanasas activadas en la simbiosis (Lambais y Mehdy, 1995), aunque otros autores (Gianinazzi-Pearson y col., 1996) consideran la activación de estas enzimas como una respuesta inespecífica de la raíz ante la invasión, ya que se cuestionan la accesibilidad de las enzimas al micelio fúngico debido a su compartimentación celular. Además se ha comprobado que la expresión constitutiva de proteínas PR (y entre ellas una quitinasa) en plantas transgénicas no previene ni altera los niveles de colonización por hongos arbusculares de dichas plantas (Vierheilig y col., 1994; 1995; Tahiri-Alaoui y col., 1994). Este hecho indica que los hongos arbusculares de alguna forma son capaces de evitar ciertos mecanismos de defensa de la planta.

En relación a la expresión de quitinasas durante el proceso de formación de la micorriza arbuscular hay que destacar el hecho de que se hallan detectado mediante técnicas electroforéticas ciertas isoformas ácidas de quitinasa relacionadas directamente con la micorrización en raíces de guisante, tabaco y tomate (Dumas-Gaudot y col., 1992a, b; Pozo y col., 1996). El origen y la función de estas proteínas directamente relacionadas con la micorrización es desconocido, aunque podrían tener un papel regulador importante como ocurre en el establecimiento de la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa (Staelin y col., 1994a; b).

Una conclusión general de todas estas investigaciones es que la presencia del hongo arbuscular en la raíz inicia la respuesta defensiva de la planta que sin embargo queda rápidamente bloqueada y no deja de ser débil, transitoria y localizada. Los mecanismos de control por parte de la planta del desarrollo del hongo arbuscular parecen ser diferentes a los que se utilizan frente a un microorganismo patógeno. Sin embargo, el hecho de que el hongo arbuscular sea capaz de inducir una respuesta defensiva importante en plantas que han perdido por mutación la capacidad de micorrizarse (*myc-*) (Golotte y col., 1993; 1994; Gianinazzi-Pearson y col., 1996) supone la capacidad de elicitación de dicha respuesta por parte del hongo, y por tanto la existencia de un mecanismo de represión de dicha respuesta en asociaciones compatibles y relacionado con la inducción de genes simbióticos. La represión de esta respuesta defensiva podría llevarse a cabo por varios mecanismos hipotéticos. La inducción de genes simbióticos podría prevenir la elicitación de respuestas de defensa, o bien la inducción de estos genes simbióticos origina supresores de la respuesta defensiva (Gianinazzi-Pearson 1995).

9. Otros mecanismos de defensa en plantas.

9.1 Proteínas de transporte de lípidos:

El grupo de proteínas de transporte de lípidos vegetales (LTP) constituyen un grupo homogéneo, caracterizado en un principio por una gran homología a nivel de secuencia y su capacidad para unir y transportar lípidos de una membrana a otra en condiciones de experimentación "*in vitro*". Su papel biológico teórico es la transferencia

citoplasmática de lípidos desde el retículo endoplasmático hasta las membranas de los diferentes orgánulos (Yamada, 1992; Kader, 1996). Sin embargo su función "in vivo" no está clara y parece ser más compleja (Wirtzs y col., 1990). Su supuesto papel en el tráfico citoplasmático de lípidos no concuerda con ciertas características moleculares, como la presencia de un péptido señal (Tchang y col., 1988), o con su localización en la pared celular (Thomas y col., 1993), o en el medio de cultivo de ciertos cultivos celulares (Sterk y col., 1991).

El aislamiento de clones de ADNc de genes que codifican LTP en diferentes especies vegetales ha posibilitado avanzar en el conocimiento de la estructura y función de estas proteínas. Se han aislado ADNc de coleoptilos de maíz (Tchang 1988), de hojas de espinacas (Bernhard y col., 1991), de cotiledones de ricino (Tsuboi y col., 1991), de las anteras de *Brassica napus* (Foster y col., 1992) y de flores de tabaco (Masuta y col., 1992). El análisis de la estructura de estas proteínas muestra una gran homología a nivel de secuencia, aunque cabe distinguir varios tipos (Jakobsen y col., 1989; García-Garrido, en prensa). Todas se caracterizan por poseer 8 restos de cisteína en posiciones conservadas de la molécula y un tamaño molecular de 9-10kD (Kader, 1996).

El estudio de la expresión génica ha puesto de manifiesto su capacidad de regulación frente a una serie de señales medioambientales de origen físico, químico o biológico. Algunos genes de *ltps* están inducidos por varios tipos de estrés, incluyendo las bajas temperaturas (Hughes y col., 1992), sequía y tratamiento salino (Plant y col., 1991; Torres-Shuman y col., 1992; García-Garrido, en prensa) o ácido salicílico (Vignols y col., 1997).

También se ha demostrado la existencia de varias familias distintas de genes que codifican LTP en cebada (Jakobsen y col., 1989) y arroz (Vignols y col., 1997; García-Garrido, en prensa) con expresión y regulación diferente, aunque mantienen homología a nivel de secuencia y las características estructurales comunes de todas las LTPs. En arroz se ha descrito la existencia de dos familias de LTP diferencialmente reguladas. Dentro de la familia LTP-1 se han identificado al menos tres grupos de ADNc con regulación diferencial y gran homología con otros miembros de LTP de otras especies vegetales (Vignols y col., 1997). La familia LTP-2 está constituida por un solo gen, regulado por ácido abscísico

(ABA) y con expresión similar a genes abundantes en embriogénesis tardía (García-Garrido, en prensa).

La familia de genes de *ltp-1* de arroz está constituida por al menos 3 grupos (I-II-III) con expresión y regulación génica diferente. Dentro del grupo I se incluyen los ADNcs denominados A14 y B1, con expresión preferencial en coleóptilo y hoja. Este grupo de genes está regulado positivamente por ácido salicílico, incrementando su expresión en raíz y coleóptilo en presencia de 10mM de SA. En el grupo II se incluye un ADNc denominado A15. Su expresión es mayoritaria en hojas, con niveles bajos en coleóptilo, raíz y endospermo. Su regulación es negativa (bajan los niveles de ARNm) por NaCl y SA. El ADNc denominado B21 pertenece al tercer grupo dentro de la familia *ltp-1* y su expresión es mínima en raíz y coleóptilo, aunque la presencia de ABA y SA inducen la acumulación de su ARNm en coleóptilo (Vignols y col., 1997)

Mediante aislamiento diferencial de proteínas en hojas de cebada con actividad antimicrobiana se observó que varias de las proteínas aisladas poseían una homología de secuencia con LTPs previamente aisladas (Molina y García-Olmedo, 1991; Molina y col., 1993). Posteriormente se ha observado la actividad antimicrobiana de LTPs de otras especies vegetales (Terras y col., 1992; Pyee y col., 1994). La concentración de LTP encontrada en algunos tejidos de cebada es tan grande como la requerida para la inhibición “*in vitro*” de la mayoría de microorganismos patógenos frente a la que es activa, lo cual refuerza su papel como proteína de defensa (Molina y García-Olmedo, 1993). La actividad antimicrobiana de diferentes LTPs varía según el microorganismo patógeno, lo que sugiere cierto grado de especificidad. También se ha sugerido que actúan de forma complementaria con otras proteínas con actividad antimicrobiana, tales como tioninas, formando parte de una barrera de defensa frente a microorganismos patógenos (Molina y García-Olmedo, 1991; Molina y col., 1993). Sin embargo el mecanismo de acción antimicrobiana de estas proteínas no es conocido y tan solo se tienen algunos datos acerca del antagonismo del Ca^{2+} sobre la acción inhibitoria de estas proteínas en el desarrollo de microorganismos patógenos (Terra y col., 1992).

El estudio de la expresión de genes de proteínas LTPs en respuesta a patógenos se ha realizado en cebada utilizando tres genes (*ltp2*, *ltp3* y *ltp4*), diferentes patógenos y dos

referencias comparativas de genes inducidos por patógenos, una treonina (Th), y un gen de una proteína PR (*PRHv-1*) (García-Olmedo y col., 1995). En este estudio se pone de manifiesto una respuesta diferencial de cada uno de los genes *ltp* estudiados en función del patógeno utilizado. Existen genes *ltp* que responden de manera inespecífica, independiente a la avirulencia o no del patógeno, expresándose tanto en asociaciones compatibles (infección) como incompatibles (resistencia) frente a *Erysiphe graminis* (García-Olmedo y col., 1995). De igual manera responde un gene *ltp1* de arroz en asociaciones compatibles o incompatibles con distintas variedades de arroz y cepas del hongo patógeno *Pyricularia oryzae* (García-Garrido, resultados no publicados). En otros casos la respuesta de genes *ltp* está totalmente relacionada con la incompatibilidad de la asociación y la resistencia al patógeno. Así un gen *ltp4* de cebada responde a la presencia del patógeno *Rhynchosporium secalis* en la asociación entre el cultivar sensible y la cepa virulenta (García-Olmedo y col., 1995) relacionándose directamente la resistencia con la acción de las LTPs.

El papel de las LTPs en la respuesta de defensa de la planta frente a microorganismos patógenos, así como frente a otras situaciones de estrés no está claro, y en la actualidad existen líneas de investigación abiertas al respecto, sobre todo en cuanto a la regulación génica y el estudio de los promotores de estos genes con capacidad de respuesta ante diversas situaciones medioambientales.

Pero no solo existen datos de la inducción de las proteínas LTP frente a microorganismos patógenos, sino que también está descrita la inducción de un gen de LTP en raíces de *Vigna unguiculata* en respuesta a la inoculación de *Rhizobium* (Krause y col., 1994). Se observó que después de inocular las raíces de esta planta por *Rhizobium*, los niveles de LTP, que normalmente son altos en hoja y bajos en raíces (Molina y col., 1993; Thomas y col., 1993), incrementan en los pelos radicales y alcanzan unos niveles casi 5 veces superiores a los niveles habituales. La inoculación de estas plantas con mutantes nod- no tuvo ningún efecto sobre la transcripción de estos genes, indicando que los factores Nod son necesarios para la inducción de estas proteínas. El hecho de que los factores Nod sean capaces de inducir las LTPs es una prueba de que haya señales simbióticas que regulan la actividad de estas proteínas (Krause y col., 1994).

Observando las características y propiedades descritas para las LTPs vegetales, así como su capacidad de regulación y respuesta frente a situaciones medioambientales diversas, es lógico pensar que su función teórica en el transporte de lípidos sea solo una parte dentro de su papel general como proteínas de respuesta de la planta al medio que le rodea.

9.2 Acumulación de ácido Salicílico y Resistencia Sistémica adquirida.

Las plantas poseen la capacidad de defensa y resistencia frente al ataque de un variado rango de organismos patógenos, incluyendo desde microorganismos hasta insectos herbívoros. La resistencia es el fenómeno habitual, aunque la planta está constantemente amenazada por múltiples y potenciales patógenos. El fracaso del patógeno se debe principalmente a tres razones. La primera es que la planta no sea capaz de ofrecer los requerimientos necesarios del patógeno, y por tanto es una planta no hospedadora. En segundo lugar puede ocurrir que la planta posea de forma constitutiva barreras de tipo físico-químico que hagan frente a la mayoría de patógenos y limitan la infección y enfermedad a solo un cierto tipo de patógeno especializado. La tercera razón se debe a la inducción de mecanismos de defensa en la planta tras el reconocimiento previo del patógeno. Sea una u otra razón del fracaso en la infección, la relación con la planta es de incompatibilidad, aunque solo en el último caso la incompatibilidad depende de mecanismos inducidos. En el caso de que se produzca infección y desarrollo de la enfermedad hablamos de compatibilidad de la interacción. En este caso las barreras preestablecidas de la planta son insuficientes, o bien la planta es incapaz de detectar al patógeno como tal, y si lo hace las defensas activadas son insuficientes.

La existencia de un complejo mecanismo de señales y receptores dificulta el estudio de los fenómenos inducidos de defensa. El sistema más estudiado es el de la resistencia localizada inducida y dependiente de un gen de resistencia (R) dominante en la planta, cuyo producto interacciona con el producto del gen de avirulencia (*Avr*) del patógeno y mediante un sistema más o menos complejo de transducción de señales se activan una serie de sistemas defensivos. Se han clonado varios genes de resistencia a la enfermedad. También se han analizado los posibles mecanismos de respuesta relacionados con este tipo de

defensa inducida, así como la posible ruta de transducción de señales establecida en este tipo de interacción (Hammond-Kosack y Jones, 1996).

Dentro de los fenómenos inducidos de resistencia, el denominado de resistencia sistémica adquirida (Systemic Acquired Resistance -SAR-) tiene gran importancia en los fenómenos de defensa de plantas frente a patógenos. Este sistema se caracteriza por un particular mecanismo de transducción de señales y una activación génica específica. El mecanismo de SAR es activado en la planta como consecuencia de la formación de una lesión necrótica, bien como parte de una reacción de hipersensibilidad o como síntoma de enfermedad. La activación de la SAR supone el desarrollo de resistencia sistémica frente a un amplio espectro de patógenos (Hunt y Ryals, 1996; Neuenschwander y col., 1996).

El espectro de protección y los cambios en la expresión génica que acompañan el desarrollo de la respuesta SAR la distinguen de otras respuestas de resistencia.

La planta modelo más estudiada en cuanto a la inducción de SAR es tabaco, si bien existen también numerosos estudios en otras plantas dicotiledoneas tales como *Arabidopsis* o pepino. En estos estudios se correlacionan los fenómenos de bioprotección y expresión de genes específicos con SAR.. En plantas monocotiledoneas no está bien establecido el fenómeno SAR, aunque existen evidencias de la expresión de genes homólogos a genes SAR, que responden a activadores químicos de defensa y que se expresan de manera coordinada (Görlach y col., 1996)

Los estudios de caracterización de proteínas asociadas a la resistencia sistémica adquirida han demostrado que la mayoría pertenecen al grupo de proteínas PR, siendo las más características la forma ácida de la proteína PR-1 y las proteínas PR-2 y PR-5. La inducción de proteínas asociadas a la SAR está relacionada con el inicio y mantenimiento de la resistencia, aunque los estudios de inducción de estas proteínas y sus genes han evidenciado que la expresión relativa de genes SAR varía según la especie vegetal. Existen diversos estudios que ponen de manifiesto que además de la relación temporal de inducción de proteínas SAR con resistencia, existe una relación causal, pues muchas proteínas codificadas por genes SAR están implicadas directamente en fenómenos de resistencia (Ryals y col., 1996).

Paralelamente al estudio de la respuesta de resistencia sistémica adquirida se observó que existía una correlación entre los incrementos en los niveles de ácido salicílico (SA) en plantas de tabaco y pepino y el inicio y mantenimiento de la respuesta SAR (Malamy y col., 1990; Métraux y col., 1990; Rasmussen y col., 1991). Posteriormente se ha descrito la correlación entre incrementos de SA y SAR en otras especies vegetales así como la capacidad de SA aplicado de manera exógena de inducir SAR (White, 1979; Ward y col., 1991; Vernooij y col., 1995) y expresión de genes SAR (Ward y col., 1991; Uknes y col., 1992). La prueba definitiva que implicaba al SA con la respuesta SAR la proporcionó el estudio de plantas transgénicas que expresan de manera constitutiva el gen *nahG* que codifica una salicilato deshidrogenasa bacteriana, con lo cual estas plantas no son capaces de acumular ácido salicílico, pues rápidamente es convertido en catecol por la acción de dicha enzima. Estas plantas son incapaces de desarrollar una respuesta SAR frente a un variado número de agentes patógenos (Gaffney y col., 1993; Bi y col., 1995; Friedrich y col., 1995; Lawton y col., 1995), con lo cual queda demostrado la necesidad de un incremento de los niveles de SA para desarrollar la respuesta SAR.

Pero no solo se ha demostrado la participación del SA en la respuesta de resistencia de tipo SAR, sino que estudios con mutantes *nahG* en *Arabidopsis* (Delaney y col., 1994) y con inhibidores del metabolismo general del fenilpropanoide (que incluye las posibles rutas de síntesis de ácido salicílico) se ha demostrado también la participación del SA en la respuesta de resistencia gen a gen, mediada por un gen de resistencia (R) (Mauch-Mani y Slusarenko, 1996). Por tanto la participación del ácido salicílico como molécula señal de la respuesta de resistencia de la planta es un hecho demostrado.

Sin embargo experimentos que combinan la técnica del injerto con el uso de plantas de tabaco normales y *nahG* (Vernooij y col., 1994) han demostrado que el SA no es la molécula señal translocable responsable de la inducción de la SAR en los tejidos no infectados. Esta molécula señal, sin embargo, requiere la presencia del SA en los tejidos lejanos del sitio de infección para inducir la SAR.

La Figura 3 muestra las posibles rutas de síntesis del ácido salicílico en plantas. Estudios realizados en tabaco han demostrado la existencia de precursores en la síntesis del SA, tales como el ácido benzoico y el transcinnámico. La conversión del ácido benzoico en

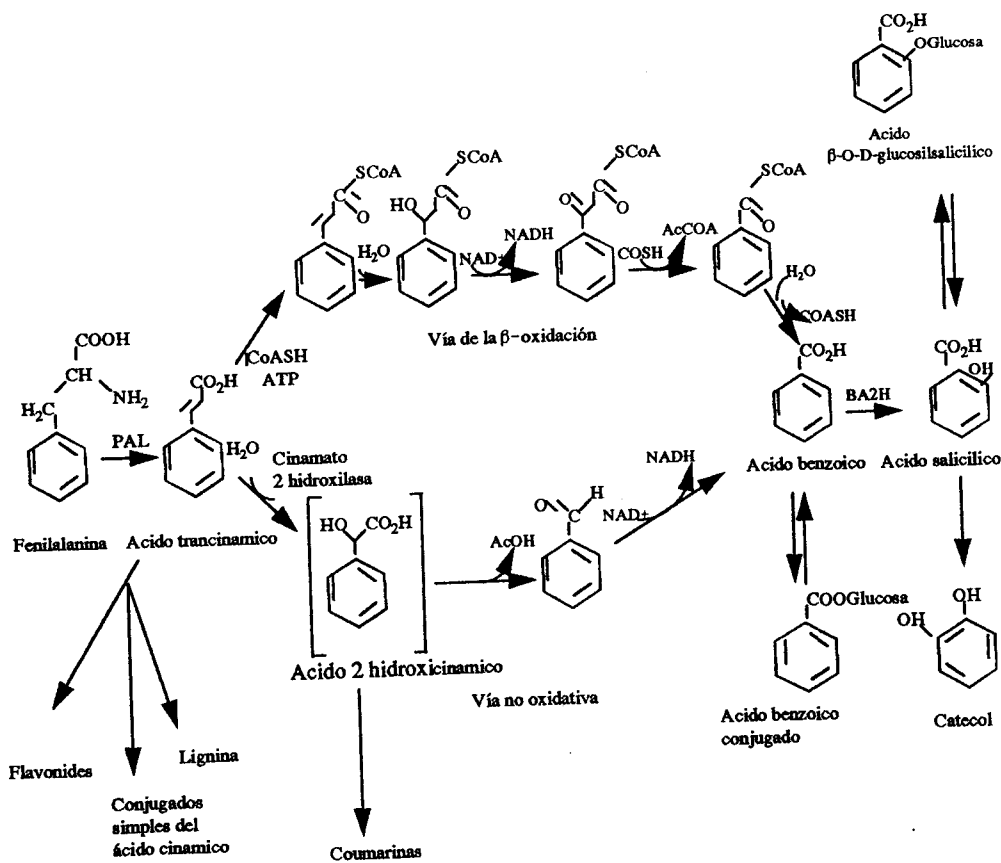


Figura 3: Posibles vías de síntesis del ácido salicílico

ácido salicílico se lleva a cabo por el enzima BA2H (ácido benzoico 2 hidroxilasa) (Yalpani y col., 1993). La producción de ácido trans-cinnámico se realiza vía fenil-alanina-amonioliasa (PAL), enzima clave en la ruta de síntesis de flavonoides e isoflavonoides relacionados a su vez con los procesos de interacción entre plantas y su entorno. Los pasos intermedios de la ruta de síntesis no están definidos ni aclarados y se han propuesto dos alternativas, la vía oxidativa (similar a la β -oxidación con participación de acetilCoA) y la no oxidativa. Dentro del metabolismo del ácido salicílico en plantas uno de los aspectos más interesantes es la capacidad del ácido benzoico y ácido salicílico de producir conjugados reversibles con glucosa. Este hecho supone la posibilidad de mantener una forma conjugada inactiva como almacén y que rápidamente puede ser disponible para generar ácido salicílico libre y activo (Yalpani y col., 1993; León y col., 1993).

Son muchos los estudios realizados sobre la participación y la implicación del ácido salicílico en los mecanismos de defensa en las plantas, sin embargo son pocos los conocimientos que se tienen acerca del mecanismo de transducción de señales en la respuesta de la planta y evidentemente muy poco se conoce sobre las conexiones de la ruta de transducción de señales en la que participa el salicílico con otras rutas de respuesta defensiva de la planta tales como la del ácido jasmonico o la relacionada con el estres oxidativo. De hecho existen evidencias experimentales de la relación entre las distintas rutas de transducción de señales, tales como la inhibición por el SA de la actividad catalasa, la biosíntesis del ácido jasmonico así que el incremento de los niveles del H_2O_2 , considerado como segundo mensajero, pero no está claro el funcionamiento y significado biológico de estas interacciones. La Figura 4 muestra un esquema general de la complejidad de la planta en la respuesta de defensa de la planta. La interacción del patógeno con la planta esta mediada por una serie de señales que pueden ser de diversa naturaleza: productos génicos (genes *Avr*), contacto físico, moléculas superficiales, fragmentos de pared celular, enzimas, etc.,. El resultado de la interpretación, específica para cada interacción, de las señales de reconocimiento supone la generación de una cascada de eventos entre los que destacan la acción de quinasas y fosfatasas, la alteración del flujo de iones, la producción de especies

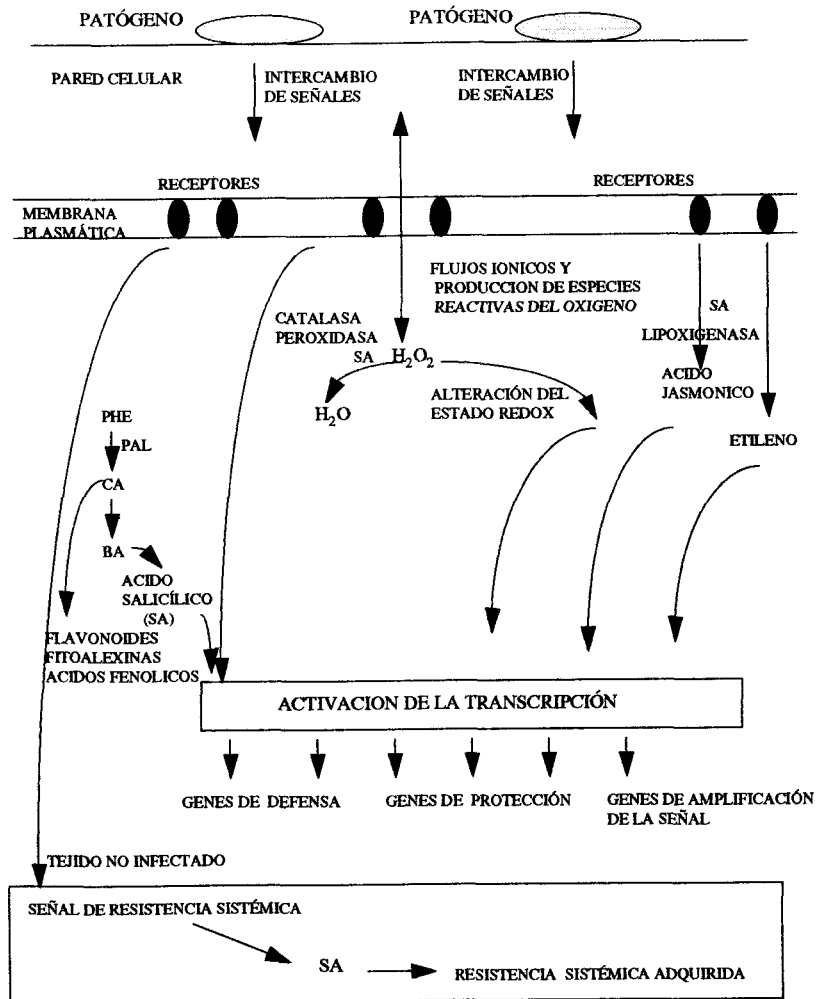


Figura 4. Esquema general de la respuesta defensiva de la planta. SA-ácido salicílico; BA-ácido benzoico; CA- ácido cinnámico; PAL- fenilalaninamoniohasa; Phe- Fenilalanina.

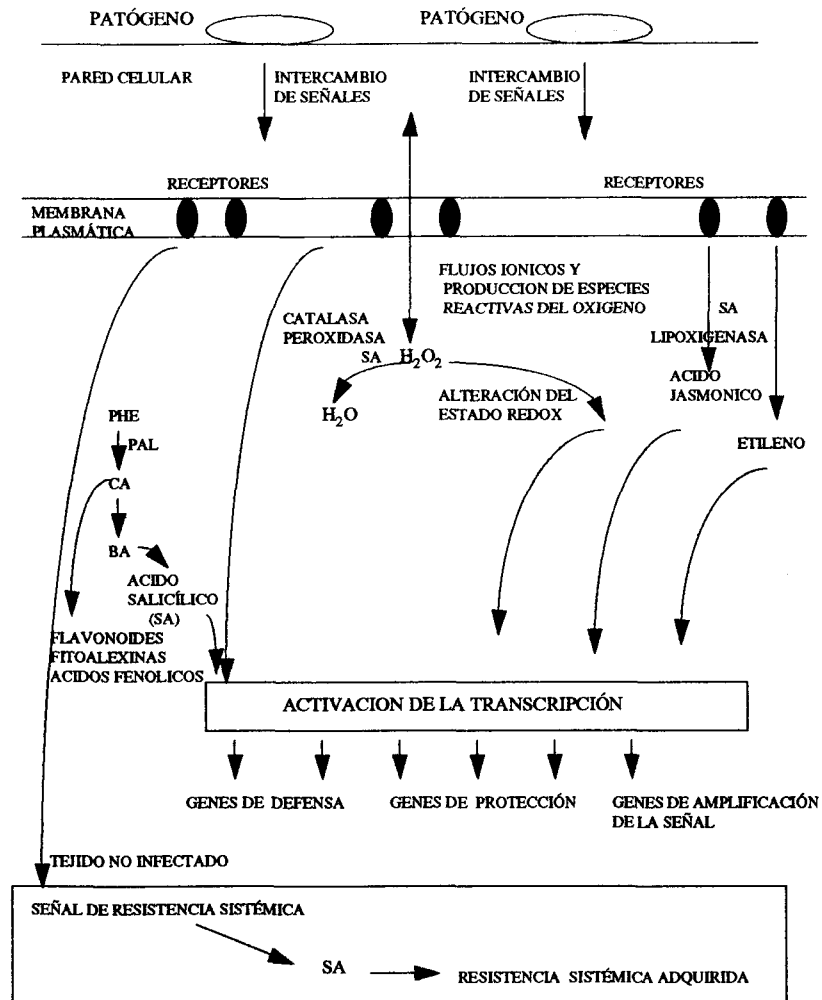


Figura 4. Esquema general de la respuesta defensiva de la planta. SA-ácido salicílico; BA-ácido benzoico; CA- ácido cinnámico; PAL- fenilalaninamonioliase; Phe- Fenilalanina.

reactivas del oxígeno, la inducción de la síntesis de moléculas intermediarias (jasmónico, etileno) o la inducción directa de la transcripción génica. La amplificación de la cascada de señales conlleva la generación de otras moléculas señales, tales como el ácido benzoico y salicílico que participan en la activación específica de otros genes de defensa y de la alteración metabólica de la célula. En el caso de la respuesta SAR, la señal translocable a larga distancia induce la resistencia mediada por incremento en los niveles de SA en tejidos alejados a la zona de infección. Las conexiones entre una u otra vía de respuesta defensiva están por descubrir, así como los puntos claves de su regulación.

Si bien resulta complicado comprender y avanzar en el conocimiento de la respuesta defensiva de la planta frente a un microorganismo patógeno, todavía es más complicado establecer los mecanismos de alteración de esta respuesta defensiva cuando la planta se encuentra con un microorganismo simbiótico.

En el caso de los hongos arbusculares ya se ha mencionado anteriormente su capacidad para inducir ciertas respuestas típicas de defensa, si bien en menor grado y de forma transitoria. El equilibrio entre los mecanismos de represión o inhibición de la respuesta defensiva y el control del desarrollo de microorganismo simbiote en planta son la clave de la compatibilidad y funcionamiento de la asociación.

Objetivo y interés del trabajo

OBJETO E INTERES DEL TRABAJO

La asociación Micorriza Arbuscular tiene gran importancia en los procesos de nutrición y crecimiento vegetal. Esta asociación forma parte relevante de muchos ecosistemas naturales, y participa de modo muy significativo en la nutrición de muchas especies vegetales de interés agrícola y ganadero.

El establecimiento de una simbiosis efectiva y compatible supone la expresión de caracteres por parte de la planta y del hongo, y el desarrollo de un diálogo molecular permanente entre ambos asociados.

La compatibilidad de la asociación supone por un lado el establecimiento y desarrollo de estructuras fúngicas en el interior de la raíz, y por otro la adaptación de las células vegetales a la situación simbiótica, de forma que se originan estructuras morfológica y funcionalmente compatibles. La planta en el proceso de adaptación al estado simbiótico pone en marcha un mecanismo de control del desarrollo del hongo en su interior, de tal forma que este queda limitado a ciertas zonas de la raíz, en concreto al parénquima cortical.

El estudio de los fenómenos que afectan a la compatibilidad de la asociación es clave para comprender mejor el funcionamiento de la misma, y por tanto contribuir al desarrollo de una simbiosis más efectiva. Dada la imposibilidad de cultivar a gran escala y en condiciones controladas de laboratorio a los hongos arbusculares, y por ello la imposibilidad de manipularlos con fines de experimentación, el único medio de estudiar la compatibilidad de la asociación es estudiar los aspectos relacionados con la misma desde la perspectiva de la planta. En este sentido son dos los aspectos más relevantes que afectan a la relación entre la planta y el hongo arbuscular: la especificidad y la resistencia del hospedador.

Dentro de la asociación MA, la especificidad en sentido estricto no existe, ya que un mismo hongo puede colonizar especies diferentes de plantas y viceversa una planta puede estar colonizada por diferentes especies de hongos. Este hecho contrasta con la especificidad encontrada en otras asociaciones mutualistas o parasíticas entre

plantas y microorganismos y da una idea de que los mecanismos implicados en el reconocimiento en la asociación MA son generales y funcionales en la mayoría de las especies vegetales. Por su parte el fenómeno de resistencia está descrito en la asociación MA, y afecta a la interacción de hongos arbusculares con ciertas especies vegetales pertenecientes a varias familias. Este fenómeno natural de resistencia se ha visto complementado en los últimos años por la obtención de plantas mutantes a la micorrización (Myc⁻) que han perdido la capacidad de formar MA como consecuencia de la mutación en un gen simbiótico, que a su vez está también implicado en el proceso de nodulación.

La clave de la comprensión del fenómeno de la compatibilidad, y asociada a ella la resistencia y la especificidad, es el estudio de los mecanismos y procesos implicados en las primeras etapas de la interacción, las de reconocimiento y contacto. Los mecanismos de reconocimiento van a ser claves para el desarrollo de la simbiosis y en gran parte la compatibilidad y el funcionamiento de la asociación va a depender de la correcta interpretación de las señales de reconocimiento entre ambos simbioses.

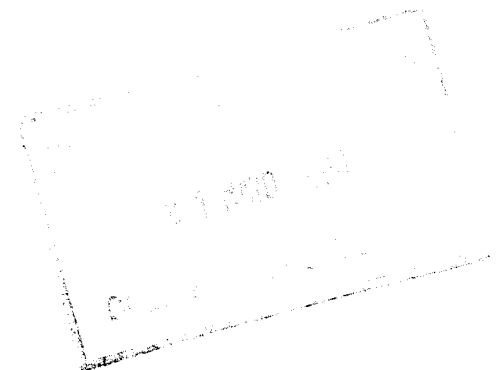
Dentro de este contexto de señales de reconocimiento y respuesta en las primeras etapas de desarrollo de la interacción MA se plantea una cuestión esencial que es si la planta es capaz de reconocer al hongo como un microorganismo mutualista o patógeno, teniendo en cuenta que se han observado respuestas de tipo defensivo en las plantas de carácter débil y transitorio. Lo que si es un hecho claro es que en la asociación compatible, el hongo bien no induce respuesta defensiva en la planta o es capaz de evitarla o suprimirla.

En este sentido se encuadra la investigación desarrollada en la presente memoria, cuyo objetivo principal es contribuir al conocimiento de los mecanismos de respuesta de la planta, desde el punto de vista defensivo, que son inducidos como consecuencia de la interacción con el hongo arbuscular. La investigación de los procesos moleculares que tienen lugar durante las primeras etapas de la colonización son la base del conocimiento de las señales que dirigen el diálogo entre planta y hongo. El conocimiento de estas señales nos proporcionará una información muy valiosa desde el punto de vista de la comprensión del funcionamiento de la simbiosis y por

tanto de su posible manipulación para incrementar su eficacia y aplicabilidad en agricultura.

Para contribuir al objetivo principal marcado, se han establecido una serie de objetivos previos y concretos. Estos son:

- Determinar la capacidad de hongos arbusculares de inducir una respuesta defensiva en las plantas y conocer algunos de los parámetros que rigen esa respuesta.
- Conocer la implicación de genes relacionados con la simbiosis en los procesos de control o inhibición de la respuesta defensiva de la planta.
- Adecuar la técnica de análisis DDRT-PCR como herramienta en la búsqueda y análisis de genes de expresión diferencial de la planta en su interacción con el hongo arbuscular.



Materiales y métodos

Materiales y métodos.

1. Plantas y condiciones de cultivo

1. 1 Plantas usadas

Se usaron plantas distintas en lo referente a cada experimento. Las plantas usadas fueron las siguientes: *Medicago sativa* var. Aragón ; *Allium cepa*, variedad Babosa; *Oriza sativa*, variedad Japonica, *Nicotiana tabacum*, variedad Teneesee; *Pisium sativum*, variedad Frisson.

1.2 Soluciones nutritivas.

Para las plantas cultivadas en condiciones de invernadero se utilizo la solución de Hewitt (1952)

	gr/100ml	para 1 l.
KN ₃	3,03	10ml
Ca(NO ₂) ₂	7,08	20ml
MgSO ₄ . 7H ₂ O	1.84	20ml
EDTA Fe(II)	0,25	10ml
MnSO ₄	0,22	1ml
CuSO ₄ . 5H ₂ O	0,24	0,1ml
ZnSO ₄ . 2H ₂ O	0,29	0,1ml
H ₃ BO ₃	1,86	0,1ml
NaNH ₄ MoO ₄	0,03	0,05ml
Agua		970ml

Para los cultivos hidropónicos de guisantes se ha utilizado una solución libre de nitrógeno de Rigaud y Puppo (1975)

KH_2PO_4	0,2g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,2g
KCl	0,2g
CaSO_4	0,12g
EDTA FeNa_2	0,025g
Na_2MoO_4	0,004g

Microelementos

H_3BO_3	0,018g
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,020g
ZnSO_4	0,03g
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,002g

El pH se ajusta a 7,5 y se esteriliza a 115°C durante 30 minutos

1.3 Esterilización y germinación de las semillas

Las semillas de las plantas usadas se esterilizaron en superficie en Hipochlorito sodico puro durante 5 min, Transcurrido este tiempo, se lavaron 5-6 veces con H_2O estéril y se dejaron en imbibición durante 2 h. Posteriormente, se extendieron en condiciones asépticas sobre papel de filtro humedecido con H_2O colocado en placas petri, y se dejaron finalmente en oscuridad a 28°C durante desde 48h para alfalfa, arroz y guisante hasta una semana para cebolla y tabaco.

Para ensayos de invernadero, las semillas después de la germinación se depositaron en semilleros con mezcla turba-arena-vermiculita estéril.

1.4 Cultivo axénico.

Se ha seguido la técnica descrita por Olivares y colaboradores (1980). Cuando las plantulas han alcanzado 1-2cm de longitud, se colocan en condiciones asépticas en tubos de 20 x 200 mm que contienen 10ml de solución nutritiva y un soporte de papel de filtro. Para evitar que la luz incida directamente sobre las raíces, los tubos se cubren en su mitad inferior con papel opaco y se llevan a una cámara de cultivo de plantas mantenida en las siguientes condiciones: 500 μ E/m².s (400-700nm) de intensidad luminosa, fotoperíodo de 16/8 horas (luz/oscuridad), 25°C/18°C de temperatura (día/noche) y 50% de humedad relativa.

1.5 Cultivo en condiciones de invernadero.

Una semana después de que hayan germinado, las plantulas se transplantaron a las macetas (100ml de capacidad), siendo para ello cuidadosamente seleccionadas en base a un desarrollo de la parte aérea y radical homogéneo.

Las plantas de alfalfa y de cebolla se cultivaron en suelo procedente de la provincia de Granada, con un pH 7.6 (Garcia-Romera y Ocampo,1988) esterilizado con vapor fluente y mezclado con arena con una proporción 1:1 (V:V).Mientras que las de arroz y de tabaco se cultivaron en arena, vermiculita, turba en una proporción 3:3:1

2.Inoculación de las plantas.

2.1 Inoculación de las plantas por bacterias

La inoculación de las plantulas de arroz y guisante (tipo salvaje y mutante P2) se hizo tras 10 días de permanencia en la cámara de cultivo, añadiendo a cada tubo una suspensión bacteriana de la cepa correspondiente (10⁷células/ml) .

2.1.1. Inoculación con la bacteria patógena *Pseudomonas syringae*.

La bacteria *Pseudomonas syringae* caracterizada como *Pseudomonas pisi* de la NCPPB (Colección nacional de bacterias patógenas de plantas) se cultivo en el medio CN al 0,8%.

La plantas de arroz se inocularon durante 24h mientras que en el caso de plantas de guisantes, los tiempos de inoculación fueron de 0, 48 y 72 h.

Medio CN

Consiste en un caldo nutritivo (PANREAC) cuya composición es la siguiente:

Extracto de carne 3g

Peptona de gelatina 5g

El medio preparado al 0,8% a pH 7 se autoclavó a 120°C 20min.

2.1.2 Inoculación con *Rhizobium*

Las plantas de guisantes se inocularon con las cepas de *Rhizobium* siguientes:

Rhizobium meliloti Rlv13

R. Leguminosarum cepa salvaje 248

Estas dos especies de *Rhizobium* se obtuvieron en el departamento de microbiología de suelos y de sistemas simbióticos de .

Rhizobium leguminosarum NodC- mutante. (Canter Cremers y col., 1988)

Las distintas cepas de *Rhizobium* se cultivaron en el medio YGT, y después de alcanzar su curva logarítmica, se utilizaron para inocular las plantas de guisantes durante 0, 48 y 72 h.

Medio YGT

Glucosa 15g

Triptona 5g

NaCl 0,6g

Extracto de levadura 2,5g

Agar 1,5g

Agua hasta un litro

Regular el pH a 7, autoclavar 115°C durante 30min.

2.2 Inoculación con el hongo arbuscular

Las plantas se inocularon a partir de 5 g de una mezcla de suelo, proveniente de plantas de alfalfa (*Medicago sativa*), conteniendo esporas, micelio y raíces colonizadas por el endofito *Glomus mosseae*.

A las plantas no micorrizadas se le echa un filtrado de inóculo que contiene todos los microorganismos del suelo menos los propagulos del hongo. El sistema de cultivo mantenido inalterable a lo largo de los ensayos, se realizó bajo condiciones controladas de luz, temperatura y humedad (450 μ E.m⁻² s⁻², 400-700 nm; 16/8 h luz / oscuridad; 25/18/14c día/noche y 60-70% H.R.). Las plantas se regaron por capilaridad para no alterar las propiedades físicas del suelo (García-Romera y Ocampo, 1990). Semanalmente las plantulas se fertilizaron con 10ml por maceta de una solución nutritiva (Hewitt, 1952) diluida a la mitad con 0.5g/l de PO₄H₂Na.

3. Tinción de raíces micorrizadas

Para evaluar la extensión del sistema radical que poseía colonización MA, se tomó una alícuota del mismo constituida por la fracción central cortada en segmentos de 1 cm de longitud aproximada. Esta fracción fue tratada y teñida de acuerdo con la técnica descrita por Phillips y Hayman (1970). El método consiste en sumergir las raíces en KOH al 10% y mantenerla durante una hora a 100°C. Una vez atacadas por este procedimiento las cubiertas celulósicas de la raíz, se lavan los trozos de raíz repetidamente con agua de grifo para eliminar restos de KOH y posteriormente se tratan durante unos minutos con ClH 0.1 N a temperatura ambiente, con objeto de neutralizar su pH. En este estado se procede a la tinción de las raíces. El colorante utilizado para visualizar las estructuras fúngicas fue el Azul-Tripan, que presenta afinidad por la quitina de la pared fúngica. El Azul-Tripan se disuelve al 0,05% en ácido láctico y se mantiene en contacto con las raíces neutralizadas

durante 10 minutos a una temperatura de 100°C. Pasado este tiempo se elimina el colorante y se conservan las raíces en ácido láctico.

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

3.1 Cuantificación del porcentaje de longitud de raíz colonizada.

Esta cuantificación se realizó según la técnica descrita por Giovannetti y Mosse (1980) que utiliza una placa cuadrada de un 10cm de lado. Toda la superficie de la placa esta dividida en cuadrículas de 1.3 cm de lado y sobre ella se extienden, al azar los fragmentos de raíz teñidos. Mediante examen al microscopio binocular de disección, se puede observar fácilmente si las raíces son colonizadas por el hongo arbuscular por el color y morfología diferenciada que presentan las estructuras características de la asociación.

Para calcular el porcentaje de la longitud de raíces colonizadas, se determina el número de intersecciones de las raíces con las líneas de las cuadrículas, contando tanto las intersecciones de los trozos de raíz que presentan micorrización en este punto de cruce como las que no la presentan. De acuerdo con los autores citados, el porcentaje de intersecciones que muestran micorrización con respecto al total de intersecciones se considera el porcentaje de longitud de raíz que esta colonizada.

3.2 Cuantificación de estructuras típicas en la asociación micorriza arbuscular.

La medida del número de puntos de entrada por cm de raíz y del porcentaje total de arbusculos se realizó según el método descrito por Ocampo y colaboradores (1980), según el cual se colocaron 30 segmentos, elegidos al azar, de 1cm de cada raíz teñida como se describió anteriormente, en portaobjetos y se examinan al microscopio óptico, contándose el nº de puntos de entrada que aparecen en cada segmento de raíz así como el nº de vesículas, pudiéndose calcular el nº medio de ambas estructuras en los 30 segmentos, que se da como dato del nº de vesículas y puntos de entrada por cm de raíz.

De igual forma se cuantifica el % de la longitud total del segmento que está ocupado por arbusculos, calculando posteriormente el porcentaje medio de arbusculos en los 30 trozos examinados, que se da como dato del % de arbusculos de la raíz colonizada..

4. Germinación de las esporas del hongo arbuscular *G. mosseae*

4.1 Esterilización de las esporas.

Las esporas una vez extraídas de los esporocarpos se esterilizaron en superficie usando el método descrito por Mosse (1962), que propone la siguiente solución esterilizante:

Cloramina T	1g
Streptomicina	0,01g
Tween 80	gotas
Agua destilada	50ml

Las esporas una vez colocadas en un papel de filtro se pusieron sobre una unidad millipore adaptable a jeringa a travez de la cual se pasa la solución de esterilización. La esporas estuvieron en contacto con la solución 20 min después de las cuales se procedio a efectuar tres lavados, con agua estéril, de 10 min cada uno

4.2 Germinación de las esporas

Una vez esterilizadas superficialmente, las esporas se colocaron en placas de petri conteniendo 10ml de medio constituido con agar agua al 1%, pH 7 y esterilizado a 120° C durante 20min.

4.3 Cuantificación de la germinación de esporas.

La germinación de las esporas y el crecimiento del micelio cuantificaron después de la aparición del tubo germinativo usando el método descrito por Marsh (1971).

5. Tratamiento de las plantas con ácido salicílico

Después de una semana de estar en la cámara de cultivo, a las plantas de arroz se les añadieron una solución de ácido salicílico 10mM, para que tenga una concentración final de 1mM, y se incubaron 24h después de las cuales se procedió a cortar las plantas.

Las plantas de arroz y guisante cultivadas en condiciones de invernadero se regaron con una solución de 0,5mM, 1mM y 1.5mM de ácido salicílico, y se cortaron después de 2, 3 y 4 semanas de inoculación con el hongo arbuscular *G. mosseae*.

6. Extracción de ARN

A partir de 0,5 a 1g de raíces, lavadas y secadas con papel de filtro, se extrajo el ARN usando el método adaptado por Ray y colaboradores (1987).

1. Macerar en un mortero de porcelana estéril el tejido congelado con nitrógeno líquido.
2. Añadir 900 μ l de tampón REB y homogeneizar bien.
3. Extraer con fenol cloroformo isoamílico (50:24:1).
4. centrifugar 10min, 12000 rpm a 4°C.
5. Recoger la fase superior y reextraer con el mismo volumen de fenol cloroformo isoamílico (25:24:1).
6. Centrifugar en las mismas condiciones y volver a extraer con un volumen de fenol cloroformo isoamílico.(25:24:1).
7. Recoger la fase acuosa, tras la centrifugación y extraer con 900 μ l de cloroformo isoamílico (24:1).
8. Recoger la fase superior, pasarla a un nuevo tubo y medir el volumen de la misma.
9. precipitar con cloruro de litio (LiCl_2) 10M hasta alcanzar una concentración final de 2M
10. Dejar en hielo O/N a 4°C.
11. centrifugar 15min a 4°C, y lavar el precipitado con LiCl_2 2M.
12. Recoger el precipitado en 200 μ l de TE, y precipitar con 2 volúmenes de etanol y 0,1 volumen de Acetato sódico 3M.

13. Centrifugar 15min, lavar con etanol 80%.

Secar y recoger en H₂O DEPC (Dietilpirocarbonato).

Preparación de reactivos:

Tampón RBE:

Tris-HCl pH 8	25mM	2,5 ml	de un stock 1M
EDTA	25mM	5 ml	0,5M
NaCl	75mM	1,5 ml	5M
SDS	1%	10 ml	10%

Añadir 75ml de H₂O DEPC, y autoclavar.

Al tampón se le añade después de autoclavarle 7ml de β-mercaptoetanol.

Todas las soluciones se preparan con H₂O DEPC.

7. Determinación de la concentración de ADN, ARN y oligonucleotidos.

Se ha seguido el método espectrofotométrico descrito por Sambrook y colaboradores (1989). Se mide la absorbancia de la solución de ADN o ARN en agua ó en TE a 260 y 280nm. La concentración en la muestra se calcula respecto a los valores estándar de $DO_{260nm} = 1$ para soluciones con 50µg/ml de ADN de cadena doble, 40µg/ml de ADN de cadena sencilla ARN, y 20µg/ml de oligonucleotidos. La relación DO_{260nm}/DO_{280nm} se usa como estimador de la pureza de la preparación, considerándose valores por debajo de 1,8 como indicadores de contaminación por proteínas o fenol. Para muestras de ADN de baja concentración, se empleó el método de comparación de fluorescencia en gel de agarosa bajo luz UV frente a marcadores de ADN de concentración conocida, también descrito por Sambrook y colaboradores (1989).

8. Métodos generales de manipulación de ADN

8.1 Minipreparación del ADN plasmidico.

El ADN plasmidico se obtuvo usando el kit (QIAGENE).

Se centrifugaron en un tubo eppendorf células precedentes de un cultivo de 3 ml. Después de una lisis alcalina llevada a cabo con las soluciones de suspensión, lisis y neutralización que son aportadas por el kit, se centrifuga el lisado obtenido a 15000 rpm durante 5min. El sobrenadante se pasa por una columna y se centrifuga 1min, después de varios lavados, el ADN se recupera de la columna por elución con 50 µl de H₂O bidestilada.

8.2 Ligación de fragmentos de ADN.

Las reacciones de ligación se efectuaron usando unas relaciones molares vector: inserto variables dependiendo del tamaño de los fragmentos.

Se uso el vector PGMT (PROMEGA) que lleva resistencia a ampicilina y una actividad β-galactosidasa en presencia de una enzima T4 ADN ligasa (PROMEGA), la mezcla de la ligación se uso para transformar en E coli (Sambrook et al.,1989), los clones positivos se seleccionaron en un medio LB (Lauria Bertani) en presencia de ampicilina (200mg/ml) y X-gal (1mg/ml).

Composición del medio LB

NaCl	5g
Triptona(DIFCO)	10g
Extracto de levadura	5g
Agar	15g
Agua destilada	1000g

El medio se esteriliza a 120°C durante 20min.

La temperatura de incubación para E.coli es de 37°C.

8.3 Preparación de células competentes de E. coli

La preparación de células competentes de E.coli se realizó según la técnica descrita por Dan Denny.

Partiendo de un cultivo unificador de la cepa de E.coli, se inocula un matraz de medio 2XL, y se incuba en agitación a 30°C toda la noche.

1 ml de cultivo se tomó para inocular un matraz de 100ml de 2XL, el cultivo se incuba in agitación hasta alcanzar una DO_{600} de 0,2, entonces se le añade el cloruro de magnesio de tal manera que quede a una concentración final de 20mM, se vuelve a incubar otra vez hasta alcanzar una DO_{600} de 0,5. Tras enfriar en hielo durante dos horas, se centrifuga a 5000rpm durante 5min a 4°C.

Las células se resuspenden en 1/2 volumen de una solución fría compuesta de 100mM de $CaCl_2$, 70mM de $MnCl_2$, 40mM de NaAc pH 5,5 (la solución se prepara al momento de usa y se esteriliza por filtración), la células se incuban en hielo durante 1 a 2 horas. Centrifugar a 3000rpm 5min a 4°C

El precipitado se resuspende en 1/20 de volumen original en la misma solución anterior a la cual se le añadió glicerol estéril para que tenga una concentración finale de 15%. Se reparten alícuotas de 200 μ l en tubos eppendorf preenfriados, se congelan rápidamente con nitrógeno liquido y se guardan en el -80.

8.4 Transformación.

Para la transformación de células competentes con ADN plasmídico se siguió la técnica descrita por Rodriguez y Tait (1983) modificada.

A las alícuotas de 200 μ l se les añade ADN (0,05-0,5 μ g) y la mezcla se deja en hielo 30min. Posteriormente se le somete un choque de calor (2min a 42°C). Se deja 5min en hielo, y se le añade 1ml de LB y se deja incubar a 37°C por lo menos una hora. Transcurrido este tiempo se siembran alícuotas de 0,1ml en placas LB adicionado del correspondiente antibiótico.

8.5 Purificación de los fragmentos de ADN

Para obtener un ADN suficientemente limpio se procedió a la purificación de los ADNc obtenidos usando el kit comercial Geneclean^R Bio 101 Inc.

Al fragmento de ADN cortado se le añade 65-75µl de TBE modificado y tres volúmenes de NaI, y se deja a 55°C hasta que se funde la agarosa. Se le añade 5µl de Glassmilk (aportado por el kit), después de mezclar, la solución se deja en hielo durante al menos 5min para permitir que el ADN se une a la matriz, a continuación se sedimenta la matriz mediante centrifugación durante 30s, y tras eliminar el sobrenadante, el precipitado que contiene el ADN unido a la matriz se lava 3 veces con la solución New Wash fría (700µl) aportada también por el Kit. Tras eliminar el ultimo sobrenadante, el ADN de eluye resuspendiendo el precipitado en 10µl de agua bidestilada y calentando a 55°C durante 5min. Después de una centrifugación de 30seg., el sobrenadante se recoge con cuidado y se pasa a un nuevo tubo. Esta operación se repite una segunda vez para eluir el ADN restante.

8.6 Secuenciación de ADN.

La secuenciación de ADN se efectuó en el secuenciador automático láser de fluorescencia de Millipore o bien en el Applied Biosystems.

Preparación de las muestras.

Se prepara una mezcla de 500ng de ADN plasmidico, de 3 a 6pmol de cebador en un volumen final de 12µl con agua, y se envió a los servicios de secuenciación.

Análisis informático de las secuencias.

Los análisis previos de las secuencias de ADN obtenidas, búsqueda de sitios de enganche de los cebadores se hicieron con el programa ADN Strider.

Por otra parte se utilizaron determinados programas FASTA (Pearson y Lipman, 1988) y BLAST(Altschul y col., 1990), para la búsqueda de homologías en las secuencias de ADN y proteínas.

8.7 Electroforesis de ADN

La detección de los ADNcs sintetizados se llevo a cabo mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa(SIGMA tipo I), sumergidos en TBE (Tris 89mM, EDTA Na₂ 2,5mM, BO₃H₂ 89mM, pH 8,2). Como solución de carga se utilizo sacarosa 40% y azul de bromofenol 0,25% en una relación 5µl de solución de ADN/1µl solución de carga.

8.7.1 Revelado de geles y fotografía.

Los geles de agarosa se revelan sumergiéndolos en agua a la que previamente se añaden unas gotas de solución de bromuro de etidio (1mg/ml) durante 15min.

Posteriormente se observa con luz UV de 260nm en un transluminador.

Las fotografía de los geles se han realizado con una videocámara de la marca GelStation.

9. Análisis diferencial por transcripción inversa y por PCR (DDRT-PCR): Figura 1

La técnica descrita por Liang y Pardee (1992) consiste en usar una enzima la transcriptasa inversa RT-MMLV y un cebador del extremo 3' de la cola poli A del ARN mensajero, el cebador es un oligo dT₁₁MN. Estos autores sugieren el uso de 12 cebadores dT₁₁MN, en los cuales M podría ser un A,C ó G.

mientras que N podría ser uno de los 4 nucleótidos (A, T, G, C) Usando estos cebadores, se puede generar 12 subfracciones de ADNc, que podrían representar 1/12 de los genes expresados en una célula, 15000 genes pueden expresarse en una célula en el mismo tiempo, lo que hace que una subfracción de ADNc podría representar 1250 genes..

En nuestro caso se usaron tres oligo dT₁₁MN : dT₁₁CA, dT₁₁GA y dT₁₁GC por cada reacción de síntesis de ADNc seguida por una amplificación por PCR usando cebadores al azar. Las secuencias de los oligonucleótidos utilizados en este experimento se muestran en la Figura 2.

9.1 Tratamiento con DNasa.

ARN total	50 µg
Rnasine	40u
DNasa I	3µl
Tampón de DNasa 10X	6µl
H ₂ O-DEPC hasta	60µl

Incubar 30 min. a 37 °C, y extraer con fenol cloroformo isoamilico (25: 24: 1).

El ARN se precipita con 0,1 volumen de Acetato Sodico 3M, pH 5,5 y 2 volúmenes de etanol a -20°C durante dos horas por lo menos.

El precipitado se lava con etanol al 80%, y se resuspende en 50µl de H₂O-DEPC .

9.2 Síntesis del ADNc (ADN complementario)

La síntesis de ADN complementario se hizo por transcripción inversa del ARN al ADNc usando la enzima la transcriptasa inversa (RT M-MLV, PROMEGA), y un cebador d(T)₁₁MN que se engancha a la cola poli A del ARN mensajero permitiendo la síntesis del ADNc según esta reacción:

ARN	1µg
RT M-MLV	200u
d NTPs (BOEHRINGER)	200µM (usar un stock de 1mM)
Rnasine (BOEHRINGER)	25u
oligo-(dT) ₁₁ MN	2,5µM(partir de un stock de 250µM)
Tampón de -RTMMLV (5x)	5µl
H ₂ O-DEPC	hasta 25µl

los ARNs están incubados junto con el oligo dT₁₁MN y el agua 10min a 70°C, luego se ponen en hielo. Los dNTPs, ARNasine, y el tampón se añaden a los ARNs y se incuba el todo a 37°C 5min, luego se añade la enzima la transcriptasa reversa.

La reacción se hace a 37°C durante 1h y se para por incubación a 95°C.

9.3 Amplificación por PCR.

El ADNc sintetizado se amplifica por PCR usando cebadores del RAPD "cebadores diseñados para amplificar distintas regiones del extremo 5' del ADN " (Figura 2), en presencia de la enzima Taq polimerasa, del oligo dT₁₁MN, de dNTP (deoxinucleotidos trifosfatos), y de un deoxinucleotido marcado radioactivamente ($\alpha^{35}\text{S}$ dATP, 1000 Ci/mmol), la reacción se hace en condiciones específicas del PCR (94°C 30s, 42°C 2min, 72°C 30s con 40 ciclos más 5 min. de elongación a 72°C).

Los productos del PCR marcados se detectaron por autoradiografía mediante un gel de poliacrilamida.

9.4 Electroforesis en gel de poliacrilamida.

Los geles fueron preparados sobre placas de Sequi-gen, de 21x 40 cm. Una placa del sistema fue tratada, cada 2 veces de uso, con dimetildiclorosilano (SIGMA) o con PLOT concentrate (SERVA), diluido con acetona, con objeto de formar una capa hidrófoba que previniese la adhesión del gel, y sea fácilmente arrastrado hacia la otra. Una vez preparado el dispositivo, se carga la solución de acrilamida para formar un gel de 6%.

Composición del gel

29,45 g de Urea (MERCK)

7 ml de tampón TBE 10 X.

14 ml de un stock de acrilamida al 30 % (Acrilamida-bisacrilamida (SIGMA) 28,5:1,5 en agua)

Ajustar el volumen con agua hasta llegar a 70ml.

Para la preparación del margen inferior del gel se utilizaron 15 ml de la solución antes preparada adicionada de los catalizadores: 105µl de perulfato de amonio (SIGMA) preparado al 25% en agua bidestilada, y 75µl de TEMED (SIGMA) y vertida entre las placas de vidrio.

El gel esta preparado con el resto de la solución a la que se añaden 50µl de APS y 50µl de TEMED, vertiéndose entre las dos placas de vidrio con cuidado de que ni se formen burbujas. El borde superior del gel se define introduciendo los peines por su lado plano y se sella la parte superior del sistema con celofán.

Las muestras se cargaron entre los espacios definidos consecutivos en un volumen de 3µl, una vez que hayan sido desnaturalizadas durante 5 min a 95°C. La electroforesis se efectuó sobre geles precalentados a 50°C, durante 1h 30min a 1700V en tampón TBE.

9.5 Tratamiento del gel y exposición

Terminada la electroforesis y después de dejar enfriar un poco, se transfiere el gel a un papel Whatman 3MM. Después de cubrirlo con papel celofán se seca al vacío a 80°C durante 1 h. Una vez seco se expone a temperatura ambiente sobre película de autoradiografía (HyperfilmTM β-Max (AMERSHAM) durante dos a tres días.

Secuencias de los RAPD usados

CTACTGCCGT	1
GGACTGCAGA	2
GTGACATGCC	4
GTTTCGCTCC	5
CATCCCCCTG	6
CCTCGACGCA	8
GGAGGGTGTT	10

Oligo d(T)₁₁MN:

dT(11)CA 5' TTTTTTTTTTTTCA 3'
dT(11)GA 5' TTTTTTTTTTTTGA 3'
dT(11)GC 5' TTTTTTTTTTTTGC 3'

Figura 2 Secuencias de los Oligonucleotidos utilizados en las reacciones de la DDRT-PCR

Las bandas diferenciales de ADNc se eluyeron a partir del gel, se amplificaron usando las mismas condiciones de PCR y se detectaron mediante un gel de agarosa

10. Estudio de la expresión genica.

El estudio de la expresión genica se llevo a acabo usando dos metodologías : la técnica del Northern blot y la RT-PCR.

10.1 Northern blotting

Consiste en la transferencia de ARN fraccionado mediante electroforesis en gel de agarosa a una membrana de nylon (Alwine y col., 1977). Posteriormente, se híbrido con sondas de ADN-ARN (en nuestro caso fragmento de ADNc) marcadas.

10.1.1. Electroforesis de ARN en gel desnaturizante.

El ARN al ser de cadena sencilla, tiene gran tendencia a formar estructuras secundarias, por lo que la electroforesis se realiza en condiciones desnaturizantes.

a- Preparacion del gel

El gel se preparo a una concentración del 1,5% de agarosa añadiéndole un 1/10 del volumen final de tampón Mops 20X y la cantidad necesaria de formaldehído 13.43M para alcanzar una concentración final de 2.2M.

b- Preparación de las muestras:

Se tomaron unas cantidades de 15-20µg de ARN en un volumen de 5µl de H₂O-DEPC, se añaden:

-12,5 µl de formamida desionizada (50% del volumen total en el que se va preparar la muestra)

-4,25 µl de formaldehído para tener una concentración final del 2,3 M.

-1,25 µl del Mops 20X

Se incuba la mezcla a 65 °C durante 5 min., se pone en hielo y se le añade 5µl de tampón de carga.

Se cargan las muestras en el gel y se corre a 5-10V/cm hasta que el azul de bromofenol llegue a 3/4 de la longitud del gel, cada 30 min. aproximadamente se recirculariza el tampón de electroforesis.

c-Tinción del gel:

Se sumerge el gel de agarosa en una bandeja con 400ml de acetato amónico 0,1M y se agita suavemente durante una hora, a continuación se sumerge el gel en agua estéril con Bromuro de Etidio durante 10mn, se lava el gel con agua estéril hasta que este totalmente desteñido, paralelamente se equilibra la membrana de nylon con SSC 2X (citrato sodico 3 M y Cloruro sodico 0,3M), se deja el gel transferiendose a la membrana toda la noche, a la mañana siguiente se lava con SSC 2X y se fija mediante vacío a 80°C durante 2 horas.

10.1.2. Marcaje de sondas de ADN:

El marcaje se hizo usando el Kit Rediprime (AMERSHAM) por unas sondas o siguiendo el protocolo de marcaje radioactivo de BOEHRINGER

Se desnaturaliza el ADN va a ser marcado calentándolo 10min a 95°C, luego se incuba 1 h a 37°C en presencia de la mezcla que viene preparada en el Kit de marcaje: dNTPs, Cebadores al azar, enzima Klenow, a la que se le añade 5µl de $\alpha^{32}\text{P}$ dCTP (3000Ci/mmol) radioactivo.

La reacción se para con 2µl de EDTA 0,2 M pH 8.

10.1.3. Hibridación y detección

Las hibridaciones se hicieron según los métodos estándar establecidos por Sambrook y colaboradores (1989)

Los filtros se prehibridaron durante dos horas con una solución de prehibridación a 65°C, se les añade la sonda desnaturalizada y se deja hibridar en una solución de hibridación durante toda la noche.

a. Solución de prehibridación

SSPE 20X	6%
Solución Denhardt	5x
SDS	0,5%
ADN de Esperma de Salmón	0,1mg/ml
Se completa el volumen con agua.	

b. Solución de hibridación

Es la misma que la solución de prehibridación pero no contiene la solución Denhardt.

c. Lavados y detección

Después de recoger la sonda, las membranas fueron lavadas de la manera siguiente: Las membranas se incubaron con una solución de 1X SSPE/0,1% SDS durante 15min a 65°C, luego se lavaron con 0,1XSSPE/0,1%SDS en las mismas condiciones. Las membranas se pusieron luego con placas de autoradiografía a -80°C, en casetes con doble pantalla amplificadora durante 4 a 5 semanas, después de las cuales se procedió a revelar las placas de autoradiografía usando los reactivos de revelado y fijación preparados según las proporciones que proveen las casas comerciales.

10.2 Análisis de la expresión genica por RT-PCR.

El aislamiento de ARN se hizo a partir de raíz y de parte aérea y se procedió a la síntesis de ADNc usando dicho ARN, libre de ADN, y el oligo dT₁₅ como iniciador de la reacción de síntesis catalizada por la enzima RT (Transcriptasa reversa).

La reacción de síntesis de ARN se realizó de la manera siguiente:

ARN(tratado con Dnasa)	1μg
dT ₁₅	2μM
Rnasine	25u
Tampón de la RT	4μl
dNTP	20μM
RTMMLV	200u
H ₂ O-DEPC	hasta 20μl

El ARN una vez desnaturalizado a 65°C en presencia del oligo dT₁₅ y el H₂O durante 10min, se le añade la mezcla de la reacción constituida por los dNTPs, el tampón de la enzima RT y el inhibidor de ARNasas (Rnasine) y se deja 5min a 37° después de las cuales se les añade la enzima RT.

El ADNc sintetizado se amplificó mediante PCR, usando distintas combinaciones de primers específicos (Figura 3) con secuencias conservadas de ADNcs que codifican para tres tipos de proteínas transportadoras de lípidos en arroz y pertenecientes a tres familias distintas con expresión diferencial.

En concreto se utilizaron:

Primers A14/24.- específicos para la amplificación de la región 3' no codificante del ADNc de la familia denominada A14.

Primers A15/27.- específicos para la amplificación de la región 3' no codificante del ADNc de la familia denominada A15.

Primers B21/24.- específicos para la amplificación de la región 3' no codificante del ADNc de la familia denominada B21.

Ub1: ATGCAGATCTTGTGAAGAC
Ub2: ACGCAGACCGAGGTGGAG
PAL1: CGAGCAGCACAAACAGGA
PAL2: GAGCGGATACGACCTGCA
A14: TACTTCTGCATGTACACTG
24: TGCTCCAGCGTGAAC
B21: TTTCAATGTTTACATGTT
27: GCTTCATCGACTGCTCC
A15: GGGTCGATGTGTGAGCCG

Figura 3: Secuencias de los oligonucleotidos utilizados en el estudio de la expresión génica por RT-PCR

Además de los genes *ltps* se analizó también la expresión del gen que codifica la enzima (Fenil-alanina-amonio-liasa) PAL, usando oligonucleotidos específicos para amplificar dicho gen.

Se utilizó también una combinación de primers que amplifican una región del gen constitutivo de la poliubiquitina, que es una proteína estructural altamente conservada en plantas, y que nos proporciona una medida interna de la cantidad de ARN mensajero existente en cada uno de las muestras analizadas, ya que esta proteína al ser constitutiva su gen no sufre ningún cambio en cuanto a su expresión lo que nos permite usarla como control interno.

Las secuencias correspondientes a los oligonucleotidos utilizados se muestran en la Figura 3.

Los productos de cada reacción de amplificación se analizaron en gel de agarosa y se transfirieron a membranas de Nylon para su posterior hibridación con sondas específicas de cada ADNc.

11. Southern blot

Los experimentos de hibridación se efectuaron usando una sonda específica de ADN, la cual se hibridó con el ADNc obtenido por RT-PCR, usando primers específicos correspondientes a cada sonda.

11.1 Transferencia de ADNc a filtros de nylon.

La transferencia de ADNc amplificados a filtros de nylon se realizó según la técnica de Southern (1975).

Los fragmentos de ADNc obtenidos se corren en un gel de agarosa. Una vez fotografiado el gel se procede a su tratamiento que consiste siempre con agitación, en dos pasos de 15 min de desnaturalización en una solución de NaOH 0,5M y NaCl 1,5M, tras lavar varias veces con agua destilada, se procede a neutralizar con una solución de Tris-HCl 0,5M, NaCl 3M pH7. Otros dos pasos de 15min. Después de lavar el gel con agua

destilada se coloca sobre una superficie regular cubierta con papel Whatman 3MM que funciona como mecha conectado con un reservorio de tampón de transferencia 20X SSC (NaCl 3M, 0,3M de citrato sódico, pH 7). Sobre el gel se coloca un filtro de nylon (AMERSHAM) y tres piezas de Whatman 3MM de tamaño similar al gel (el filtro se embebe primero en agua durante 2 min y luego junto con las piezas Whatman se saturan previamente en el tampón SSC 2X durante 10min. Sobre todo este dispositivo se colocan varias piezas de papel de celulosa y sobre éstas peso suficiente para mantener ligeramente comprimido el sistema.

Una vez finalizada la transferencia (12-16h), el filtro de nylon se lava en una solución de 2X SSC para eliminar restos de agarosa, y se cuece al vacío durante 20min a 120°C.

11.2 Marcaje de sondas de ADN por el método no radioactivo.

El marcaje de sondas y los protocolos de hibridación han sido realizados siguiendo las recomendaciones del kit de marcaje y detección no radioactivos de BOEHRINGER. Los ADNs usados como sonda fueron fragmentos obtenidos por PCR y purificados por GeneClean.

La preparación de sondas de ADN no radioactivas consiste en la síntesis parcial de ADN a partir de ADN molde que se requiere usar como sonda, usando una mezcla de hexanucleótidos como cebadores, la mezcla de nucleótidos a la cual se le añade la digoxigenina-dUTP como nucleotido marcado.

Las reacciones de marcaje se hicieron habitualmente con 20 a 50ng de ADN desnaturalizado en un volumen de reacción de 20µl. El tiempo de incubación fue siempre durante toda la noche a 37°C.

11.3 Hibridación con sonda no radioactiva.

Igualmente se siguieron las indicaciones del kit antes mencionado. El filtro de nylon se incubó en una solución de prehibridación compuesta de 5X SSC; N-lauril sarcosina 0,1%; SDS 0,02% y agente bloqueante al 2% a 65°C, durante 2h. Esta solución se sustituye por la

solución de hibridación (5ml/100cm²), que es la misma a la que se ha añadido el ADN sonda desnaturalizado, y se incuba a 65°C toda la noche.

Terminada la hibridación se lavan los filtros siguiendo las recomendaciones del kit, y posteriormente se lleva a cabo la detección inmunológica.

La detección no radioactiva de las bandas de hibridación se efectuó usando el protocolo de detección quimioluminiscente. La impronta de las señales se realizó sobre películas Kodak X-OMAT.

11.4 Cuantificación de los niveles de expresión.

La diferencia de la intensidad de las bandas se detectó mediante el programa NIH image 1.6. Los niveles de expresión se cuantificaron usando como control el gen constitutivo de la ubiquitina,

12. Extracción del ácido salicílico libre

1. Homogeneizar 0,5g de raíces con nitrógeno líquido y extraer con 1,5ml de etanol.
2. Centrifugar 15 minutos a 13000 rpm.
3. Recuperar el sobrenadante y secar al vacío.
4. El precipitado se recoge en 200ml de ácido tricloroacético al 5%.
5. Extraer dos veces con 400ml de una mezcla orgánica (etilacetato, ciclopentano, isopropanol, 50:50:1).
6. Secar por vacío y resuspender en 10µl de etanol.

12.1 Análisis TLC y cuantificación de SA

Las muestras se cargan en una placa de sílica gel previamente activada a 105°C durante una hora y se desarrollan en una cubeta de cromatografía durante 2 horas, utilizando tolueno:dioxano:ácido acético (60:30:10) como líquido de desarrollo. La placa se analiza bajo luz ultravioleta y las bandas de interés que coinciden con la banda patrón de ácido salicílico libre se aisló de la sílice y se cuantificó el contenido en ácido salicílico por fluorometría en un rango de absorción de 310-400nm.

13.Extracción de proteínas

Las raíces de las plantas inoculadas y no inoculadas con el hongo arbuscular, después de ser lavadas y pesadas se molieron con Nitrógeno líquido, el polvo resultante de la maceración se homogeneizó en el tampón extractante, utilizando la proporción 1:3 (peso raíz: volumen tampón).

La suspensión obtenida se filtró por una gasa y se centrifugó durante 20min a 13000 rpm, el sobrenadante obtenido se sometió a concentración con 2 volúmenes de acetona fría (-20). Las muestras se dejaron en agitación durante 2-4 horas a 4°C, después de las cuales se centrifugaron a 15000rpm durante 20min.

El precipitado obtenido se resuspendió en una solución de fosfato potasico 1mM, pH 7.

Tampón de extracción

PVPP	6%
Tritón X-100	0.1
PMSF	1mM
DTT	1mM
En fosfato potasico	50mM, pH 7

14. Determinación cuantitativa de las proteínas

El contenido proteico se determinó siguiendo la metodología de Lowry y colaboradores (1951), con las modificaciones introducidas por Makwell y colaboradores (1978).

A la muestra se le añade 950 ul de NaOH, luego se le adiciona 3ml del reactivo C.

Se agita y se espera 15min, después de las cuales se echa a la muestra 0.3ml de reactivo de Fenol (Folin) preparado a una proporción 1:1 con agua, agitar y esperar 30min.

Medir a una longitud de onda de 660nm

Además de las muestras se prepara un blanco que se trata igual manera que las muestras que se vayan a medir.

Reactivo A

Na ₂ CO ₃	2%
NaOH	0.4%
K-Na-Tartrato	0.16%
SDS	1%

Reactivo C

Se prepara con el reactivo A al cual se le añade una solución de SO₄Cu en un proporción 100:1

15. Medida de actividades enzimáticas.

Las medidas de actividades enzimáticas se realizaron usando substratos correspondientes a cada enzima.

15.1 Medida de la actividad Ascorbato Peroxidasa

La cantidad relativa de peróxido de hidrogeno dependiente de la oxidación del ascorbato, como un donador de electrones, se determinó por una mezcla de reacción que contiene 50mM de fosfato potasico pH 7, 0.1mM de peróxido de hidrogeno, 0.5mM de ascorbato en un volumen total de 1ml. La reacción se inicia por la adición de peróxido de hidrogeno. La cantidad relativa de la oxidación del ascorbato esta estimada por una disminución en la absorbancia a 290nm, entre 1.5 y 6.5segundos después de que empiece la reacción con un coeficiente de absorción de 2.8mM⁻¹ cm⁻¹.

La actividad APX se estimó por nmol mg⁻¹ de proteína.

15.2 Medida de la actividad catalasa.

La actividad catalasa se determino usando el método descrito por Aebi (1984). La reacción se inicia adicionando 1ml de una solución de 30mM de H₂O₂, la variación de la absorbancia se efectuó a 25°C cada minuto. La determinación de la actividad especifica se expreso como $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ por minuto y por mg de proteína

16. Localización de la actividad β -glucuronidasa en raíces de arroz transformadas con el gen *ltp* mediante tinción histoquímica

En este experimento se usaron tres tipo de plantas de arroz distintas de la variedad Tapei.309

Plantas no transformadas control.

Plantas transformadas denominadas pGus 1177 que llevan el promotor *ltp1-gus*: un homocigota 64a de la línea T3.

Plantas que llevan el promotor *ltp1-gus* con una pauta de lectura: heterocigota 24 a de la línea T1 representando el control negativo

La raíces después de ser lavadas y cortadas se sumergieron en la solución de coloración que consiste en 50mM de fosfato sodico (pH 7.0), 0,1% de Tritón X-100, Ferro y Ferri cianato potasico 5mM de cada uno y 0,5% de X-Gluc (5-bromo-4cloro-3indolyl β -D-glucoronide), el volumen de la solución debe de ser suficiente para cubrir por completo el tejido. Se aplica el vacío a las muestras durante 5min para infiltrar la solución y a continuación se incuban en la oscuridad a 28°C durante 16 a 18horas.

Las muestras una vez coloreadas y fijadas, con la solución de fijación formada por el glutaraldehido al 4% y ácido cacodilato sodico 0,1M pH 7,2 se almacenaron con glicerol al 50% a 4°C.

Resultados

Resultados.

Estudio de marcadores de la respuesta defensiva de la planta durante el proceso de formación de la micorriza arbuscular.

1. Expresión de genes *ltp* durante el proceso de formación de la micorriza arbuscular.

Por varias razones resulta interesante estudiar y profundizar en el estudio de la expresión de genes de proteínas transportadoras de lípidos vegetales en el sistema simbiótico que supone la micorriza arbuscular. En primer lugar por el hecho de que están como se ha descrito anteriormente relacionadas con la formación de la membrana plasmática y los procesos de secreción celular, los cuales se activan en presencia del hongo en la raíz. En segundo lugar por su localización en la pared celular vegetal que es una estructura que de forma directa sufre mas cambios morfológicos y estructurales como consecuencia del establecimiento de la micorriza arbuscular. Sin olvidar mencionar también la inducción de estas proteínas por la bacteria simbiótica *Rhizobium* en las primeras etapas de la colonización y antes de la formación del nódulo (Krause y col., 1994). Lo que hace lógico pensar que estas proteínas puedan tener un papel relevante en el contexto de la asociación micorriza arbuscular, bien como parte de una reacción defensiva o de control por parte de la planta sobre el desarrollo del hongo en la raíz o bien como participes de la activación metabólica general que sufren las células vegetales colonizadas por hongos arbusculares.

1.1 Determinación de la expresión genica de *ltps* en arroz.

Como punto de partida de nuestra investigación se realizó un estudio sobre la metodología más adecuada para llevar a cabo nuestra investigación de expresión diferencial de genes *ltps* en raíces de arroz inoculadas o no con *G. mosseae*.

El análisis de la expresión genica de los genes *ltp* se hizo en primer lugar por Northern blot, en raíz y en parte aérea de plantas de arroz cultivadas 30 días, no inoculadas y inoculadas (35% de longitud de raíz colonizada) con *G. mosseae*. Los resultados de este experimento mostraron por parte una que los genes A14 y A15 son muy abundantes en parte en aérea (Figura 1 a y b) y por otra parte que la expresión en raíz de estos genes es tan débil que no puede detectarse por esta técnica. De hecho, estudios anteriores ya habían evidenciado que la expresión de los genes *ltp* en raíz de arroz es débil (Vignols y col., 1997). Hay que señalar que la diferencia observada en la intensidad de las bandas correspondientes a los genes A14 y A15 en hojas inoculadas y no inoculadas es debida a la diferencia en cantidades de ARN presentes en cada muestra.

Debido a que la expresión genica es débil en raíces, y que la detección de la expresión genica por el método del Northern se ve dificultada por el hecho de la dilución de los ARNm dentro del conjunto total de ARNs, se utilizó una técnica alternativa de detección de expresión genica, la metodología RT-PCR. La técnica RT-PCR al ser mas sensible permite, además de detectar ARNm poco abundantes, comparar niveles de expresión bajos. Como se muestra en las Figuras 2 y 3, tanto la expresión del gen A14 como A15 pudo ser detectada en raíces y parte aérea de las mismas plantas de arroz utilizadas en el experimento del Northern. La técnica RT-PCR confirmó, tanto para el gen A14, como por el A15 que la expresión es mayor en hojas que en raíz.

El uso de la técnica de la RT-PCR nos permite detectar la expresión de genes poco abundantes, sin embargo esta técnica requiere un control de los niveles iniciales de ADNc de cadena simple usados como muestra de la reacción PCR. Solo así podrá ser usada con carácter cuantitativo de la expresión genica. Para ello se eligió el gen que codifica la

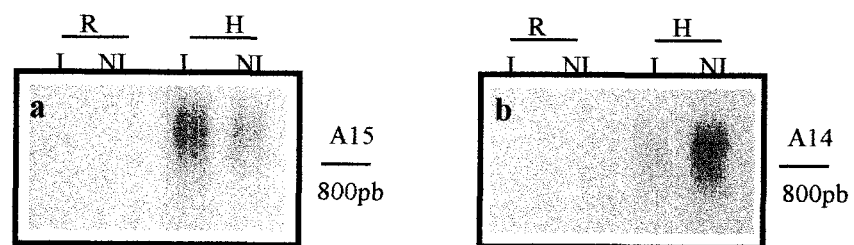


Figura 1 Northern blot de los ARNs de raíz (R) y hoja (H) de plantas de arroz no inoculadas (NI) y inoculadas (I) con el hongo arbuscular *G. mosseae*. Se utilizaron 15 μ g por carril.
a- Hibridación con la sonda específica del gen A15
b- Hibridación con la sonda específica del gen A14

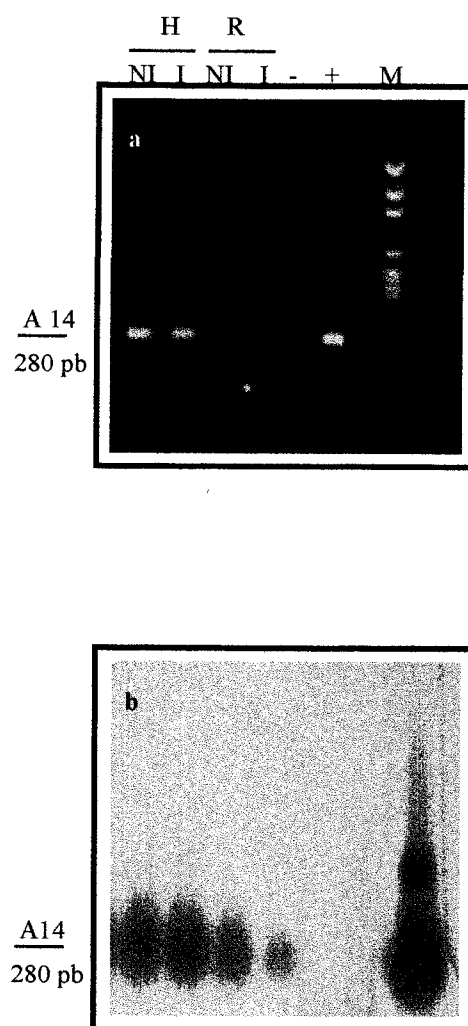


Figura 2. Estudio de la expresión del gen A14 en raíz (R) y en hoja (H) en plantas de arroz no inoculadas (NI) e inoculadas (I) con el hongo arbuscular *G. mossae*.
a-Electroforesis en gel de agarosa de los productos de la reacción PCR
b-hibridación del gel con la sonda A14
+ representa la reacción de la amplificación utilizando como ADN molde el clon A14
- represente la reacción control sin enzima RT.

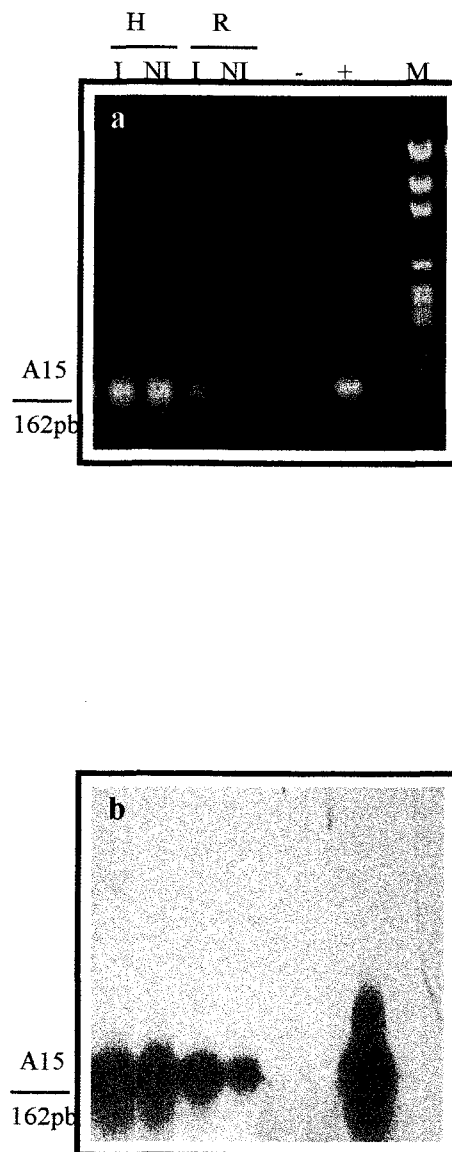


Figura 3. Estudio de la expresión del gen A15 en raíz (R) y en hoja (H) en plantas de arroz no inoculadas (NI) e inoculadas (I) con el hongo arbuscular *G. mossae*.

a-Electroforesis en gel de agarosa de los productos de la reacción PCR

b-hibridación del gel con la sonda A15

+ representa la reacción de la amplificación utilizando como ADN molde el clon A15

- represente la reacción control sin enzima RT.

poliubiquitina como control interno de los niveles de ADNcs ya que este gen no se afecta por la presencia del hongo arbuscular dentro de la raíz.

A partir de oligonucleotidos específicos, diseñados para la amplificación de un monomero de la ubiquitina, se hizo una amplificación del ADNc de arroz (Figura 4). A partir del producto de la PCR se aisló y se clonó una banda de 228pb que representa un monomero de esta proteína. La Figura 5 muestra la gran homología a nivel de secuencia entre la secuencia del ADN clonado con el gen de la poliubiquitina de arroz (Rubq1). Este resultado permite utilizar el gen de la ubiquitina como control interno de cantidad y calidad del ARN utilizado en los experimentos de RT-PCR.

Otro aspecto importante en el uso de la metodología PCR con carácter cuantitativo es la determinación de los niveles iniciales óptimos de ADN de cadena simple para la reacción y se encuentren dentro de los niveles de relación lineal entre la cantidad inicial de ADN de cadena simple inicial y ADN de cadena doble final obtenido, y por tanto evitan el fenómeno de saturación.

En nuestro caso en concreto, se utilizaron dos concentraciones de ADN de cadena simple obtenido por transcripción inversa, 0,5 μ l y 2 μ l. La Figura 6a muestra que cuando se usa la concentración mayor de ADN de cadena simple, los niveles de ADNc *ltp* (clon A14) detectados tras PCR e hibridación no muestran diferencia entre sí en muestras de raíz inoculada o no inoculada e incluso son iguales todas las muestras usadas, excepto en las raíces de 7 días, donde los niveles, aunque iguales entre inoculadas y no inoculadas son menores al resto de las muestras. Cuando partimos de cantidades bajas de ADN de cadena simple (0,5 μ l) se puede detectar una diferencia en los niveles de expresión entre muestras que con 2 μ l mantenían un nivel de expresión similar (Figura 6 a y b)

1.2 Estudio secuencial de la expresión de los genes *ltp* durante el desarrollo de la micorriza arbuscular mediante RT-PCR.

En principio se utilizaron plantas de arroz no inoculadas y inoculadas con *G. mosseae* y cosechadas a una, dos, cuatro y ocho semanas después de la inoculación con el hongo arbuscular.

Los porcentajes de micorrización figuran en la tabla 1

<i>Tiempo</i>	<i>% de micorrización</i>
1semana	0%desarrollo de micelio externo
2semanas	9%
3semanas	25%
4semanas	45%

El estudio de la expresión de los genes *ltp*, A15 y A14 en las raíces y en parte aérea a los distintos tiempos de colonización mostró que la expresión en la parte aérea y no varía en los tiempos de cultivo en las plantas ensayadas. La expresión del gen A 14 es similar a la

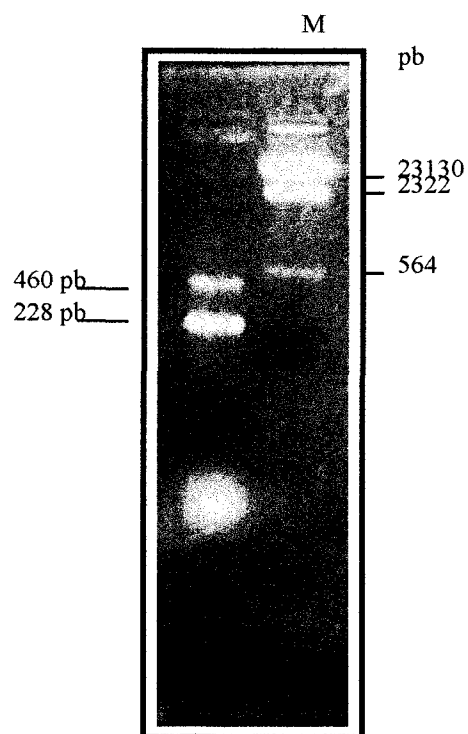


Figura 4 Electroforesis en gel de agarosa de los productos de la reacción RT-PCR usando los oligonucleotidos específicos del gen de la ubiquitina.
M: marcador de peso molecular λ Hind III

Ubi-1	<u>ATGCAGATTTTGTGAAGACCCTGACTGGCAAGACCATTACCTTGAGGTTGAGTCGTCGGACACTATTGACAACGTGAAGGC</u>	83
Rubq1	ATGCAGATCTTTGTGAAGACCCTCACCGCAAGACCATCACCTCGAGGTTGAGTCCTCGGACACCATTGACAATGTCAAGGC	136
Ubi-1	GAAGATCCAGGACAAGGAGGGCATCCCCCGGACCAGCAGCGTCTGATCTTTGCTGGTAAGCAGCTTGAGGATGGCCGCACCC	166
Rubq1	CAAGATCCAGGACAAGGAGGGCATCCCCCGGACCAGCAGCGTCTCATCTTCGCTGGCAAGCAGCTTGAGGATGGCCGCACCC	219
Ubi-1	TTGCGGATTACAACATCCAGAAGGAGTCCACACTCCACCTGGTGCTCCGCTCTCCGTTGGTGGT	228
Rubq1	TGGCCGACTACAACATCCAGAAGGAGTCCACCCTCCACCTTGTCTCAGGCTCAGGGGAGGC	281
Ubi-1	<u>ATGCAGATTTTGTGAAGACCCTGACTGGCAAGACCATTACCTTGAGGTTGAGTCGTCGGACACTATTGACAACGTGAAGGC</u>	83
Rubq1	ATGCAGATCTTCGTCAAGACCTTGACTGGCAAGACCATCACCTTGAGGTCGAGTCGTCGACACCATTGACAATGTCAAGGC	364
Ubi-1	GAAGATCCAGGACAAGGAGGGCATCCCCCGGACCAGCAGCGTCTGATCTTTGCTGGTAAGCAGCTTGAGGATGGCCGCACCC	166
Rubq1	CAAGATCCAGGACAAGGAGGGCATCCCCCGGACCAGCAGCGTCTCATCTTCGCTGGCAAGCAGCTTGAGGATGGCCGCACCC	447
Ubi-1	TTGCGGATTACAACATCCAGAAGGAGTCCACACTCCACCTGGTGCTCCGCTCTCCGTTGGTGGT	228
Rubq1	TGGCTGACTACAACATCCAGAAGGAGTCCACCCTCCACCTTGTGCTCAGGCTCAGGGGAGGT	509
Ubi-1	<u>ATGCAGATTTTGTGAAGACCCTGACTGGCAAGACCATTACCTTGAGGTTGAGTCGTCGGACACTATTGACAACGTGAAGGC</u>	83
Rubq1	ATGCAGATCTTCGTCAAGACCTTGACTGGCAAGACCATCACCTTGAGGTCGAGTCGTCGACACCATTGACAATGTCAAGGC	592
Ubi-1	GAAGATCCAGGACAAGGAGGGCATCCCCCGGACCAGCAGCGTCTGATCTTTGCTGGTAAGCAGCTTGAGGATGGCCGCACCC	166
Rubq1	CAAGATCCAGGACAAGGAGGGCATCCCCCGGACCAGCAGCGTCTCATCTTCGCGGCAAGCAGCTGGAGGATGGCCGCACCC	675
Ubi-1	TTGCGGATTACAACATCCAGAAGGAGTCCACACTCCACCTGGTGCTCCGCTCTCCGTTGGTGGT	228
Rubq1	TTGCTGACTACAACATCCAGAAGGAGTCCACCCTCCACCTTGTGCTCAGGCTCAGGGGAGGT	737
Ubi-1	<u>ATGCAGATTTTGTGAAGACCCTGACTGGCAAGACCATTACCTTGAGGTTGAGTCGTCGGACACTATTGACAACGTGAAGGC</u>	83
Rubq1	ATGCAGATCTTCGTCAAGACCTTGACTGGCAAGACCATCACCTTGAGGTCGAGTCCTCGGACACGATCGACAATGTGAAAGC	820
Ubi-1	GAAGATCCAGGACAAGGAGGGCATCCCCCGGACCAGCAGCGTCTGATCTTTGCTGGTNAGCAGCTTGAGGATGGCCGCACCC	166
Rubq1	CAAGATCCAGGACAAGGAGGGTATCCCCCGGACCAGCAGCGTCTCATCTTCGCGGCAAGCAGCTGGAGGATGGCCGCACCT	903
Ubi-1	TTGCGGATTACAACATCCAGAAGGAGTCCACACTCCACCTGGTGCTCCGCTCTCCGTTGGTGGT	228
Rubq1	TGGCTGACTACAACATCCAGAAGGAGTCCACCCTTACCTGGTACTCAGGCTCAGGGGTGGG	965
Ubi-1	<u>ATGCAGATTTTGTGAAGACCCTGACTGGCAAGACCATTACCTTGAGGTTGAGTCGTCGGACACTATTGACAACGTGAAGGC</u>	83
Rubq1	ATGCAGATCTTCGTGAAGACCTGACTGGCAAGACCATTACCTTGAGGTTGAGTCGTCGGACACTATTGACAACGTGAAGGC	1048
Ubi-1	GAAGATCCAGGACAAGGAGGGCATCCCCCGGACCAGCAGCGTCTGATCTTTGCTGGTAAGCAGCTTGAGGATGGCCGCACCC	166
Rubq1	GAAGATCCAGGACAAGGAGGGCATCCCCCGGACCAGCAGCGTCTCATCTTCGCGGCAAGCAGCTGGAGGATGGCCGCACCT	1131
Ubi-1	TTGCGGATTACAACATCCAGAAGGAGTCCACACTCCACCTGGTGCTCCGCTCTCCGTTGGTGGT	228
Rubq1	TGGCTGACTACAACATCCAGAAGGAGTCCACCCTTACCTGGTACTCAGGCTCAGGGGTGGG	1193
Ubi-1	<u>ATGCAGATTTTGTGAAGACCCTGACTGGCAAGACCATTACCTTGAGGTTGAGTCGTCGGACACTATTGACAACGTGAAGGC</u>	83
Rubq1	ATGCAGATCTTCGTGAAGACCTGACTGGCAAGACCATTACCTTGAGGTTGAGTCGTCGGACACTATTGACAACGTGAAGGC	1276
Ubi-1	GAAGATCCAGGACAAGGAGGGCATCCCCCGGACCAGCAGCGTCTGATCTTTGCTGGTAAGCAGCTTGAGGATGGCCGCACCC	166
Rubq1	GAAGATCCAGGACAAGGAGGGCATCCCCCGGACCAGCAGCGTCTGATCTTTGCTGGTAAGCAGCTTGAGGATGGCCGCACCT	1359
Ubi-1	TTGCGGATTACAACATCCAGAAGGAGTCCACACTCCACCTGGTGCTCCGCTCTCCGTTGGTGGT	228
Rubq1	TGGCGGATTACAACATCCAGAAGGAGTCCACACTCCACCTGGTCTCCGCCTCCGTTGGTGGC	1421

Figura 5: Comparación de la secuencia de ADN del clon ubi-1 obtenida por RT-PCR a partir de raíces de arroz, con la secuencia Rubq1 presente en el banco de datos (Huq y col., 1997)

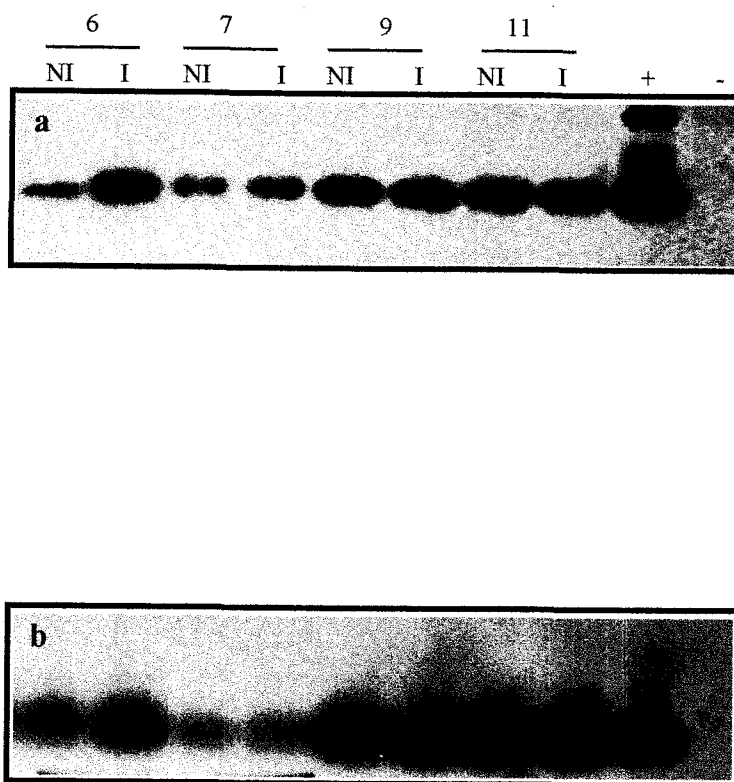


Figura 6. Hibridación de los productos de la reacción RT-PCR, con la sonda específica del gen A14. La reacción RT se realizó con ARN obtenido de plantas no inoculadas (NI) o inoculadas (I) con *G. mosseae* a y cosechadas a distintos tiempos (días) después de la inoculación, utilizando 0,5 μ l (a) o 2 μ l (b) de la reacción RT en la amplificación PCR.

del A15 en la parte aérea.(Figuras 7 y 8). La expresión de A14 y A15 es mayor en la parte aérea que en la raíz. Por otro lado no se detectó expresión del gen B21 ni en parte aérea ni en raíz..

Sin embargo el análisis de la expresión de estos genes *ltp* en la raíz si mostró cambios relacionados con el proceso de infección de la raíz por parte de hongos formadores de micorrizas arbusculares y con el tipo de gen *ltp* analizado. Por una parte pudimos constatar que la expresión del gen A15 (Figura 7) no se afectó por la presencia del hongo arbuscular, mostrando las plantas controles no micorrizadas el mismo patrón de expresión que las plantas micorrizadas a todos los tiempos de micorrización ensayados. Dicho patrón de expresión se caracteriza por una disminución significativa de los niveles de expresión en raíz respecto a la parte aérea y por la ausencia de variación a lo largo de los tiempos de cultivo ensayados.

Por otra parte, cuando se analizo la expresión del gen A14, si se observó un cambio en el patrón de expresión en raíz en plantas micorrizadas respecto a la no micorrizadas. En raíces de micorrizadas de 1 y 2 semanas se observa un incremento en la expresión del gen A14 con respecto a las plantas no micorrizadas de la misma edad y condiciones de cultivo, mientras que a las 4 y 8 semanas de cultivo los niveles de expresión son idénticos tanto en plantas micorrizadas como en plantas no micorrizadas (Figura 8)

La comparación de los niveles de ADNcs usando el gen constitutivo de la ubiquitina usando como control interno no mostró cambios en la cantidad de ADNc obtenido por cada muestra (Figura 9). Los niveles de inducción relativa en raíz (I/NI) de la expresión del gen A14 calculado utilizando la relación expresión A14/expresión ubiquitina son los siguientes:

Tiempo(semanas)	1S	2S	4S	8S
I/NI	1,63	2,16	1,19	1,08

Los resultados de los experimentos anteriores muestran que las diferencias en la expresión del gen A14 como consecuencia de la colonización por hongos arbusculares se deben a una inducción de los niveles de expresión durante etapas iniciales de la interacción

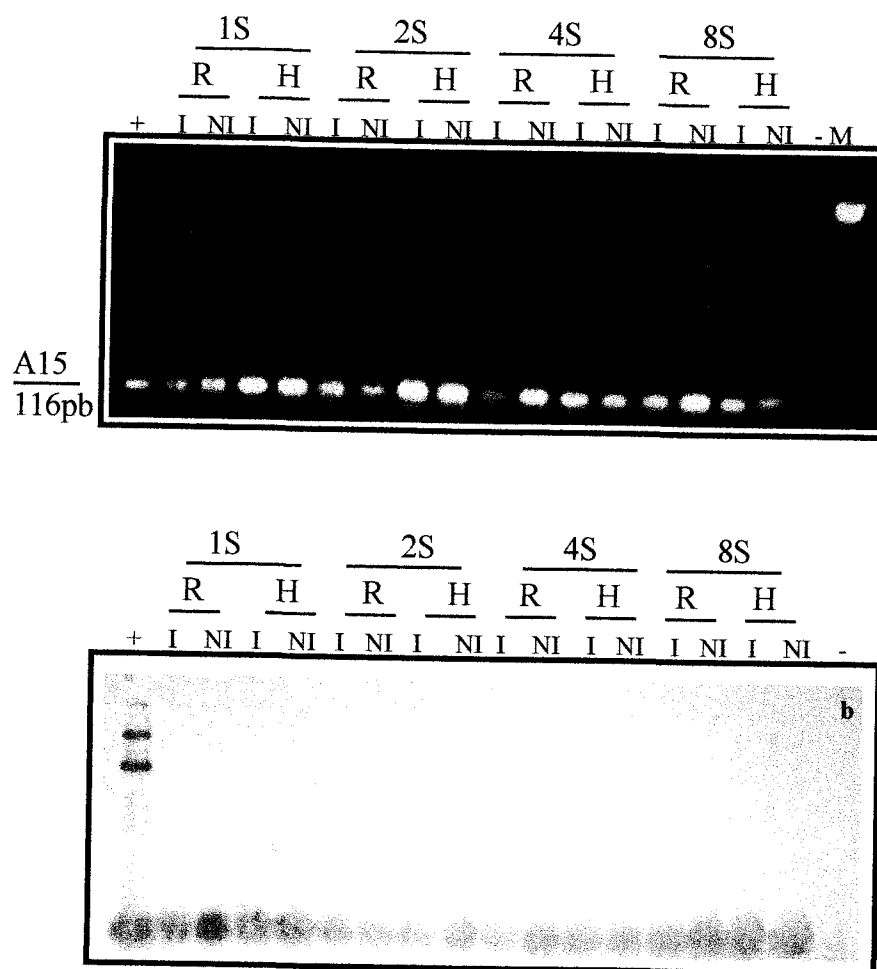


Figura 7. Análisis de la expresión del gen A15 mediante RT-PCR a partir de ARN obtenido de plantas no inoculadas (NI) y inoculadas (I) con *G. mosseae* y cosechadas a distintos tiempos (semanas) después de la colonización.

En a se muestran las electroforesis en gel de agarosa de los productos amplificados. En b la hibridación del gel a con la sonda específica del gen A15

+ representa la reacción de la amplificación usando como molde el ADN del clon A15
 - reacción control sin enzima RT

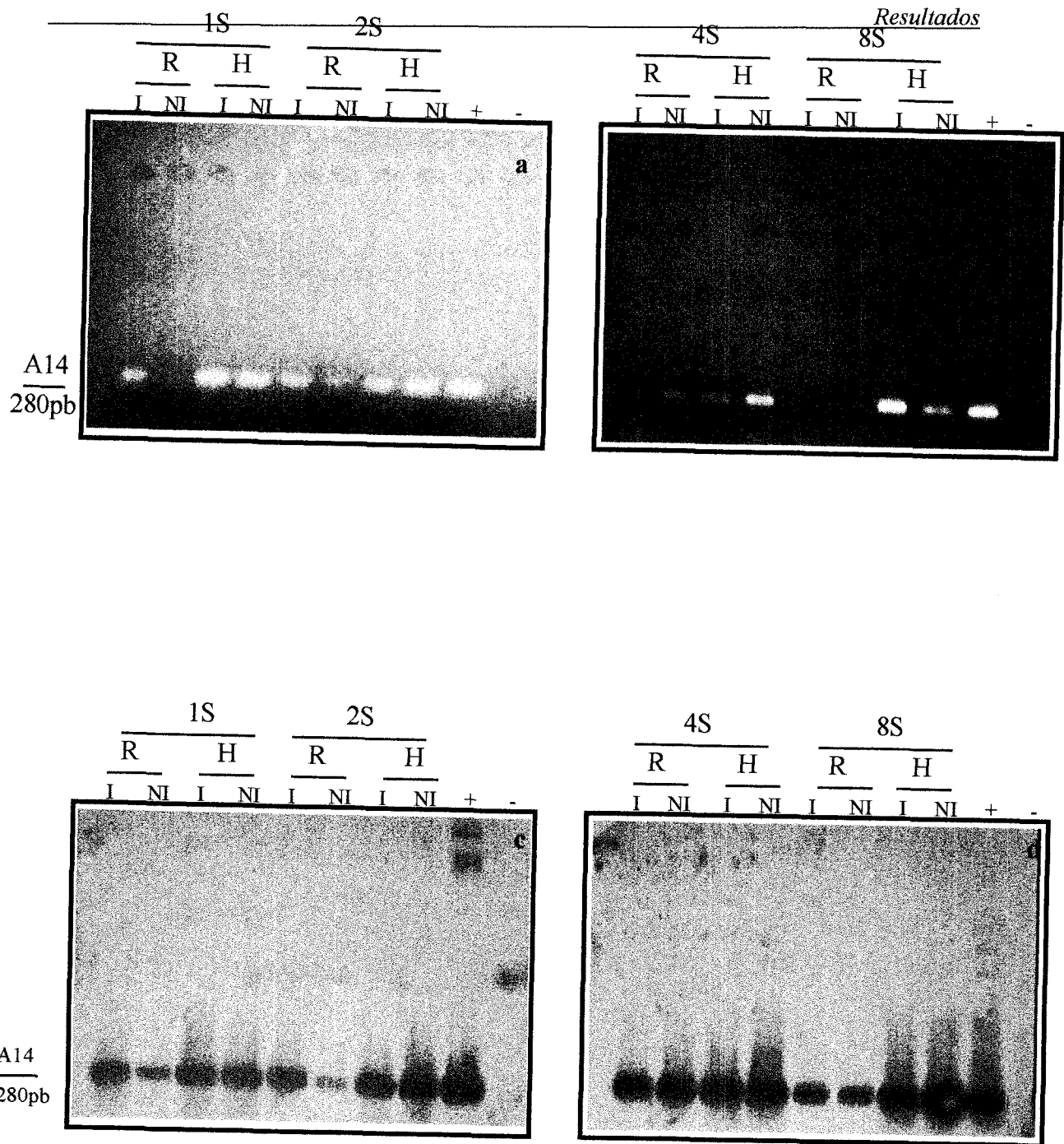


Figura 8 . Análisis de la expresión del gen A14 mediante RT-PCR a partir de ARN obtenido de plantas no inoculadas (NI) y inoculadas (I) con *G. mosseae* y cosechadas a distintos tiempos (semanas) después de la colonización.

En a y b se muestran las electroforesis en gel de agarosa de los productos amplificados. En c y d la hibridación de los geles a y b con la sonda específica del gen A14

+ representa la reacción de la amplificación usando como molde el ADN del clon A14
 - reacción control sin enzima RT

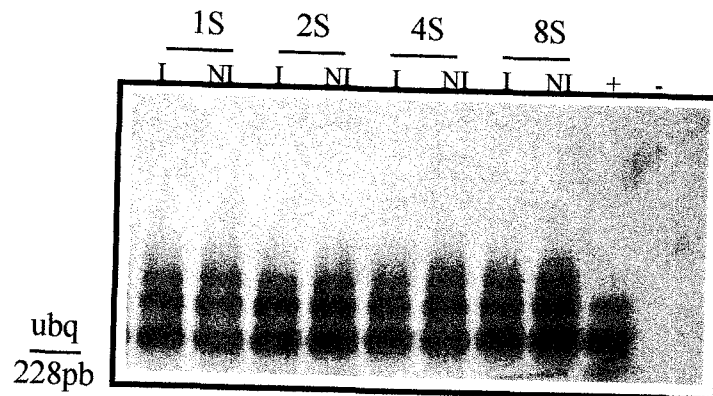


Figura 9. Hibridación de los productos de la reacción RT-PCR con la sonda constitutiva ubiquitina. La reacción RT-PCR se realizó con ARN obtenido de plantas no inoculadas (NI) y (I) con *G.mossae* y cosechadas a distintos tiempos (semanas) de colonización.
+ representa el control positivo de la amplificación del gen de la poliubiquitina.
- reacción control sin enzima RT

(entre 1 y 2 semanas). Por tanto se planteó el estudio de la expresión de dichos genes durante etapas iniciales de la colonización, en concreto se utilizaron plantas cosechadas a los 0, 3, 4, 5, 6, 7, 9 y 11 días después de inoculación con el hongo arbuscular *G.mosseae*.

En este caso los porcentajes de infección fueron como indica la tabla 3

TIEMPO	% DE MICORRIZACIÓN
0	0%
3 días	0%
4 días	0%
5, 6, 7 días	desarrollo de micelio externo + puntos de entrada
9 días	7%
11 días	12,5%

Usando la técnica RT-PCR, y utilizando parejas de oligonucleotidos como cebadores específicos de cada uno de los tres genes *ltp* empleados (A14, A15, B21), se realizó el análisis de la expresión génica durante los tiempos mencionados. La Figura 10 muestra los niveles de expresión para el gen A15, y la Figura 11 los correspondientes al B21. En ambos casos los niveles obtenidos en raíces de plantas inoculadas con el hongo arbuscular *G. mosseae* no muestran ninguna diferencia con aquellos encontrados en las plantas controles no inoculadas, y cosechadas en el mismo tiempo después de la inoculación.

La Figura 12 muestra los niveles de expresión del gen *Ltp A 14* y obtenidos en las raíces inoculadas o no inoculadas. En este caso podemos apreciar un incremento en los niveles de expresión en plantas inoculadas entre el día 6 y 7 en relación a la expresión de las plantas controles cosechadas el mismo día. Los niveles de expresión del gen de la ubiquitina

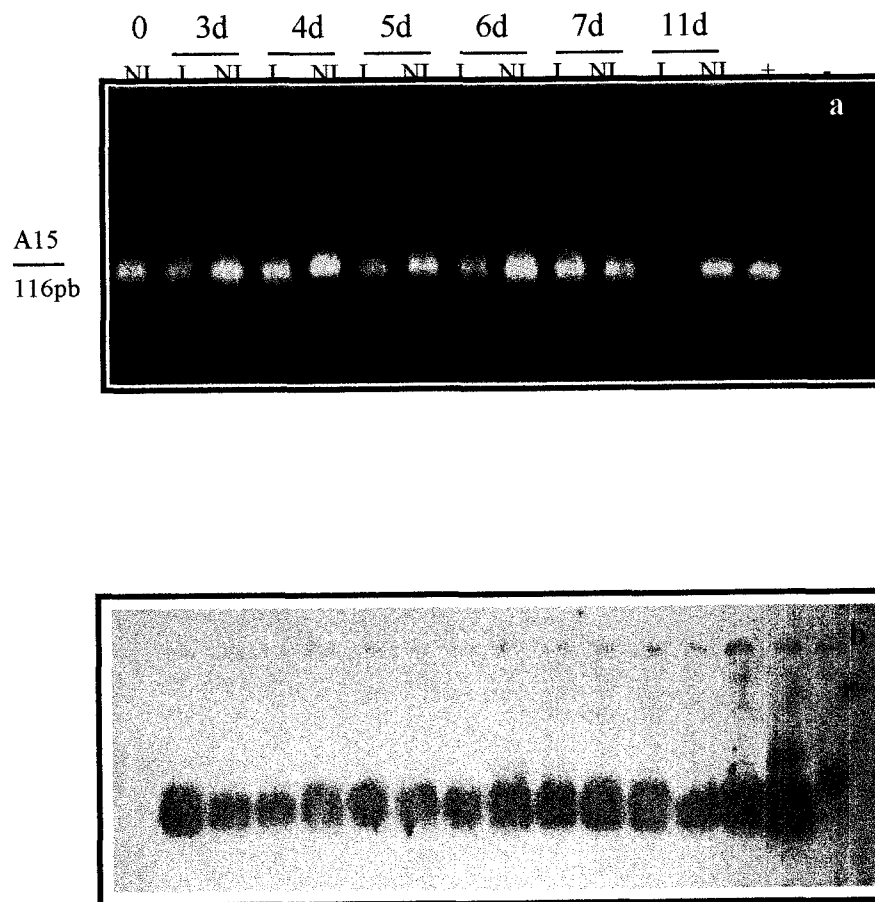


Figura 10 . Análisis de la expresión del gen A14 mediante RT-PCR a partir de ARN obtenido de plantas no inoculadas (NI) y inoculadas (I) con *G. mosseae* y cosechadas a distintos tiempos (días) después de la colonización.

En a se muestra las electroforesis en gel de agarosa de los productos amplificados. En b la hibridación del gel a con la sonda específica del gen A15

+ representa la reacción de la amplificación usando como molde el ADN del clon A15

- reacción control sin enzima RT

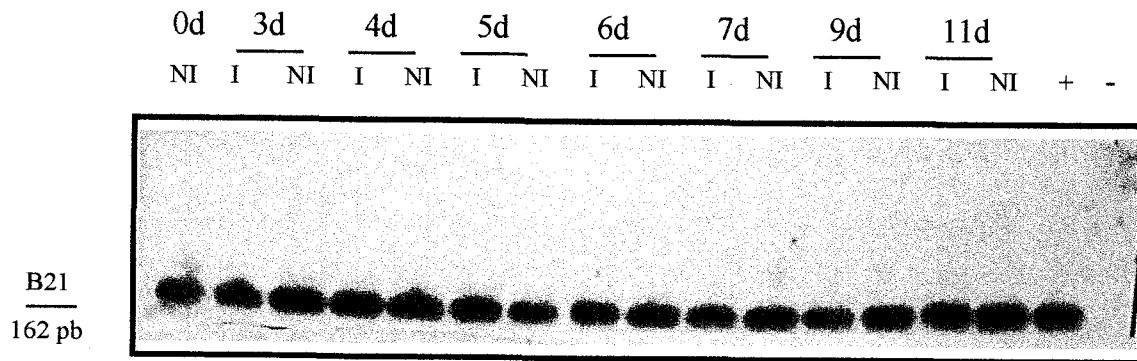


Figura 11. Análisis de la expresión del gen B21 mediante RT-PCR a partir de ARN obtenido de plantas no inoculadas (NI) y inoculadas (I) con *G. mosseae* y cosechadas a distintos tiempos (días) después de la colonización. La Figura muestra la hibridación con la sonda específica del gen B21 + representa la reacción de la amplificación usando como molde el ADN del clon B21 - reacción control sin enzima RT

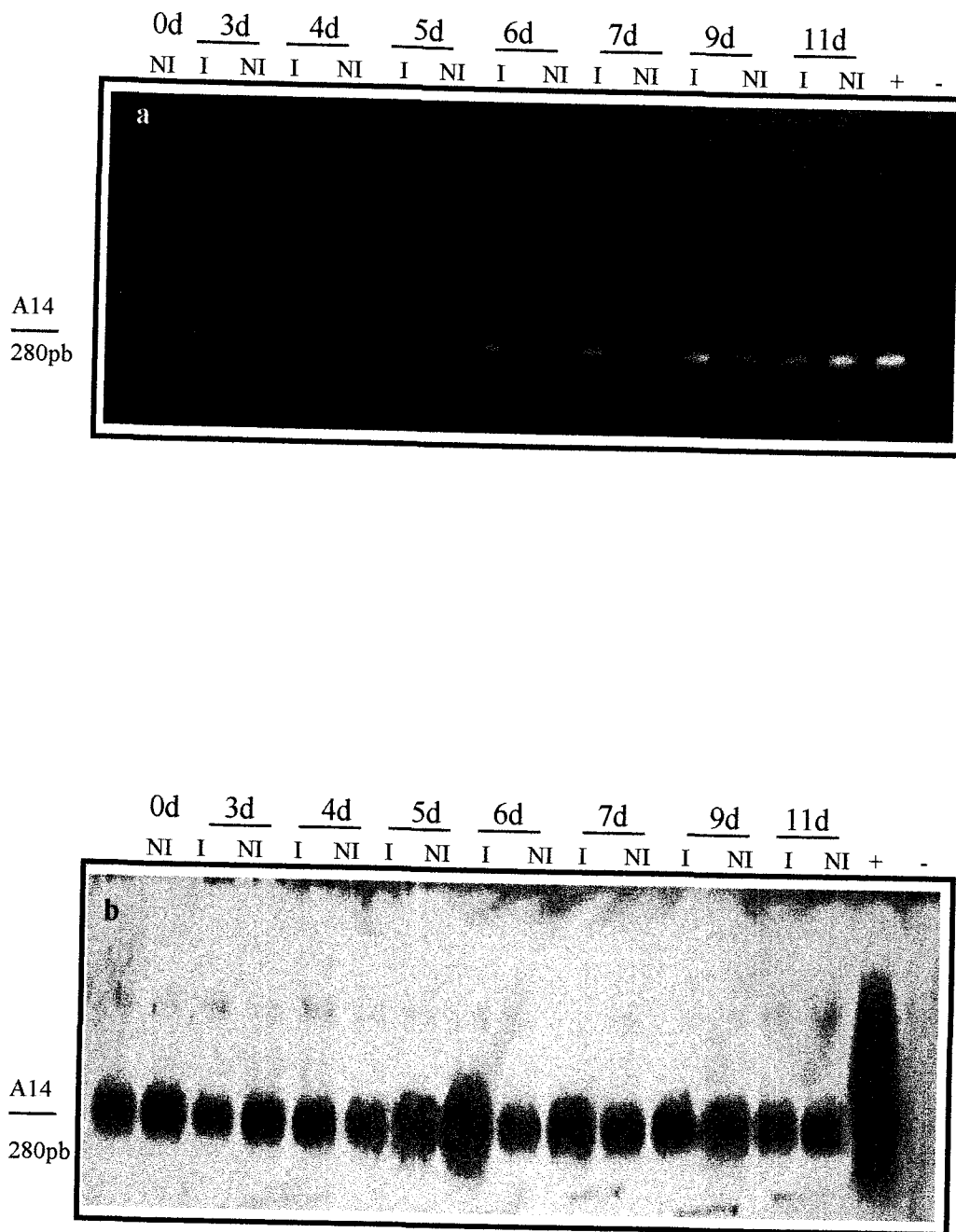


Figura 12. Análisis de la expresión del gen A14 mediante RT-PCR a partir de ARN obtenido de plantas no inoculadas (NI) y inoculadas (I) con *G. mosseae* y cosechadas a distintos tiempos (días) después de la colonización.

En a se muestra la electroforesis en gel de agarosa de los productos amplificados. En b la hibridación del gel a con la sonda específica del gen A14

+ representa la reacción de la amplificación usando como molde el ADN del clon A14
- reacción control sin enzima RT

(Figura 13) muestran que no hay diferencias significativas en los niveles de expresión entre tratamientos, lo cual significa que la cantidad de ADN de cadena simple utilizada en todas las reacciones fue similar.

Los niveles de inducción relativa en raíz (I/NI) de la expresión del gen A14 calculado utilizando la relación expresión A14/expresión ubiquitina son los siguientes:

Tiempo (días)	0	3	4	5	6	7	9	11
I/NI	1,12	1,2	1,32	0,74	2	1,4	0,9	0,8

Estos resultados indican que durante las primeras etapas de colonización de la raíz por el hongo arbuscular hay alteración en el patrón de expresión de uno de los tres genes analizados, el gen A14 cuyo nivel de expresión se ve incrementado de manera transitoria durante las primeras etapas de la interacción.

En un intento de relacionar la inducción del gen A14 con la respuesta defensiva de la planta se estudió el efecto del ácido salicílico y la inoculación con la bacteria *Pseudomonas syringae* sobre la expresión del gen A14 en las raíces de arroz. Ambos agentes son inductores de la respuesta defensiva de la planta. Por un lado el SA está implicado en respuesta de tipo defensivo de las plantas (ver introducción) y por otro la bacteria ha sido utilizada como agente avirulente inductor de la respuesta de hipersensibilidad y proteínas PR en arroz (Smith y Métroux, 1991). Se utilizaron plantas de arroz cultivadas en sistema hidróponico e inoculadas con SA 1mM o *P. syringae* 10^8 células /ml. Los resultados en cuanto a la expresión del gen A14 tanto en el tratamiento con la bacteria como con SA (Figura 14) muestran claramente una inducción de la expresión génica debida a ambos agentes, por lo que podemos considerar el gen A14 como ligado a la respuesta defensiva de la planta.

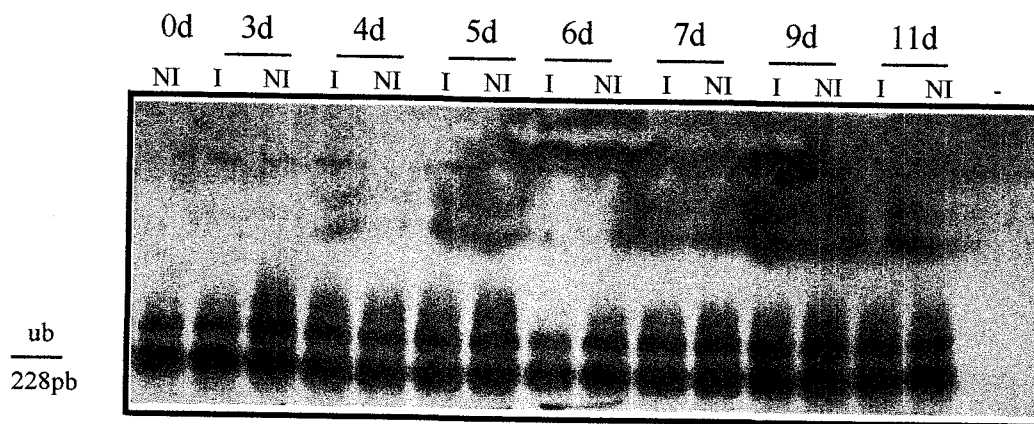
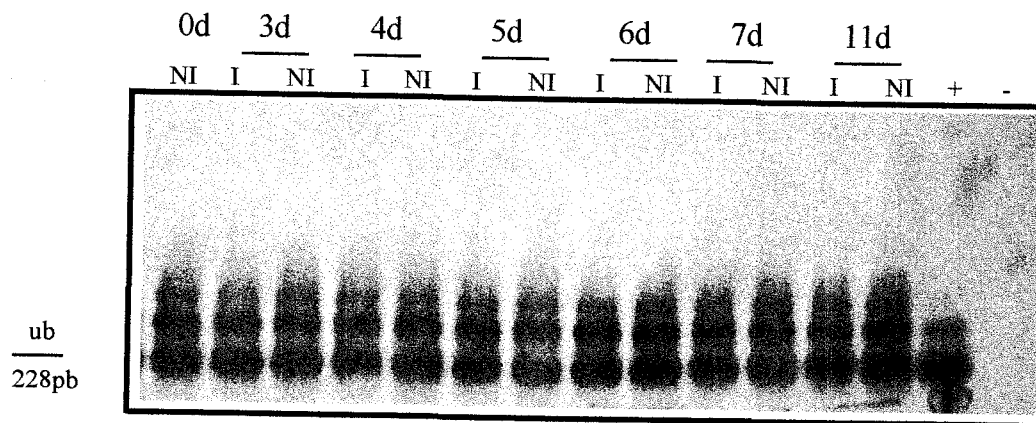


Figura 13. Hibridación de los productos de la resción RT-PCR con la sonda constitutiva ubiquitina. La reacción RT-PCR se realizó con ARN obtenido de plantas no inoculadas (NI) y (I) con *G.mosseae* y cosechadas a distintos tiempos (días) de colonización.
 + representa el control positivo de la amplificación del gen de la poliubiquitina.
 - reacción control sin enzima RT



Figura Análisis de la expresión de la expresión del gen A14 mediante RT-PCR a partir de ARN obtenido de plantas controles (C), inoculadas con la bacteria patógena *P. syringae* (Ps) y de plantas tratadas con ácido salicílico 1mM durante 24h.

a- Electroforesis en gel de agarosa de los productos amplificados.

b- hibridación con del gel (a) con la sonda específica del gen A14

c- Hibridación de los productos amplificados, usando oligonucleotidos específicos de la ubiquitina, con la sonda específica de la ubiquitina.

+ representa la reacción de la amplificación usando como molde el ADN del clon A14 (a y b) y ub (c)

- reacción control sin enzima RT

1.3 análisis histoquímico de la actividad GUS dirigida por el promotor *Ltp-1* en plantas transgenicas de arroz no inoculadas y inoculadas con *G. mosseae*.

En este estudio se han utilizado plantas de arroz transformadas que portan la construcción Ltp-1-GUS.

Dicha construcción es una fusión tradicional del promotor del gen Ltp-1 (correspondiente con el clon A14) con la secuencia codificante para la proteína β -Glucuronidasa

En nuestros experimentos utilizamos plantas pGus 1177 que portan la construcción Ltp-1-Gus un homocigota denominado 64 a de la línea T3, plantas 24 a de la línea T1 que llevan una construcción control en la cual la proteína β -Glucuronidasa sintetizada no es funcional y plantas salvajes variedad Tapei 309 no transformadas. Las plantas fueron inoculadas o no con *G. mosseae* y fueron cosechadas entre el 5 y el 10 día después de la inoculación. Tras la cosecha, la raíz de las plantas se trocó y los fragmentos de aproximadamente 1 cm de longitud se sometieron a la tinción GUS:

Los resultados del análisis cualitativo de la tinción histoquímica de la actividad GUS presentados en la Figura 15 muestran que no hay actividad β -Glucuronidasa en las plantas 24 a así que en las no transformadas 309 tanto inoculadas como no inoculadas y utilizadas como control negativo del experimento. En las plantas 64 a no inoculadas la actividad GUS se detectó en el cilindro central de la raíz y en las zonas de aparición de las raíces laterales. La actividad GUS en plantas inoculadas con *G. mosseae* se detectó también en el cilindro central, al igual que en plantas no inoculadas, y en zonas del parénquima cortical colonizadas y asociadas a la penetración del hongo arbuscular, pues se ha detectado una relación especial entre las zonas de coloración GUS y presencia de hifas fúngicas y formación de apresorios.

Estos resultados confirman la relación entre incrementos en la expresión del gen *Ltp* A14 asociados a las etapas iniciales de la colonización fúngica.

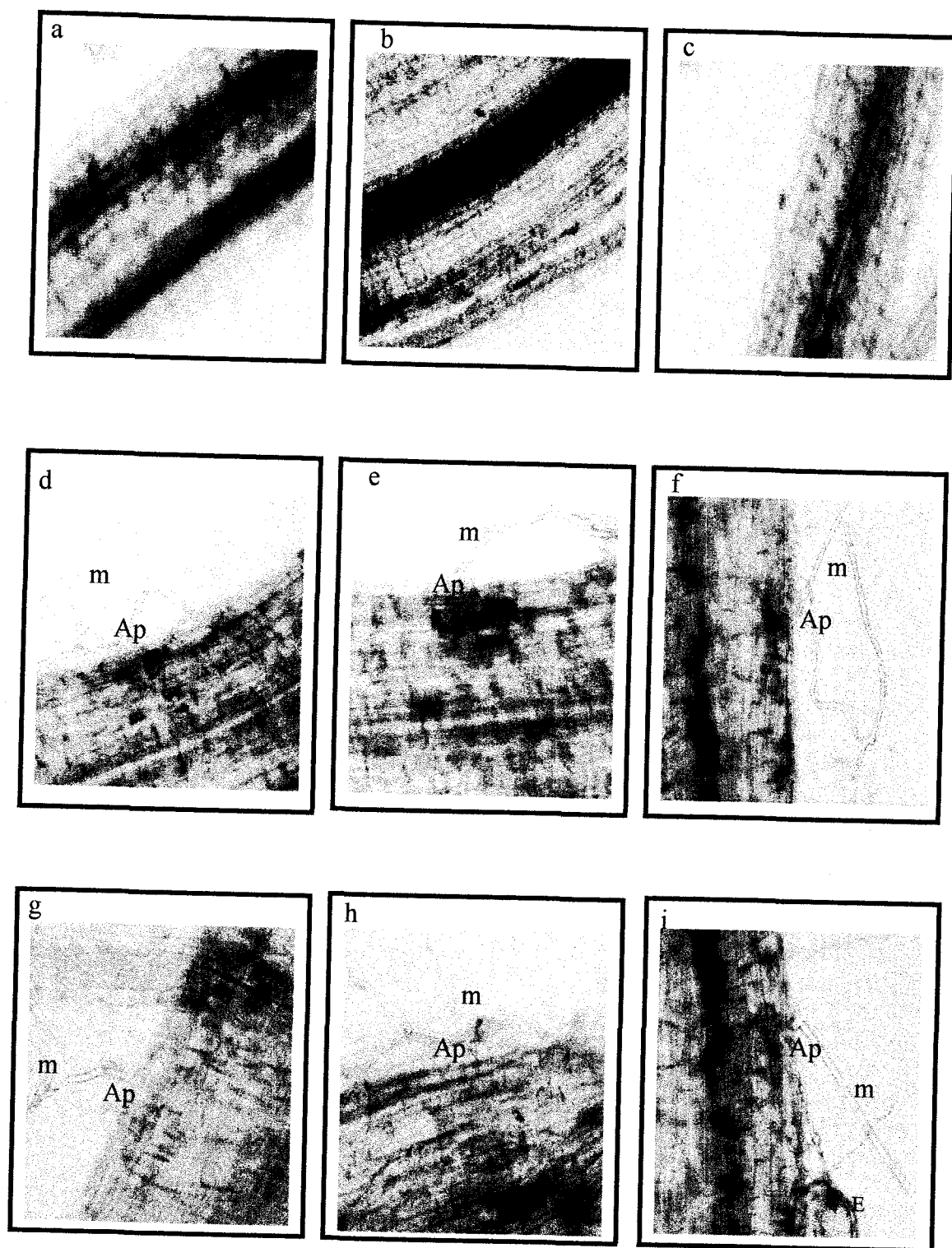


Figura 15.- Tinciones de la actividad β - glucuronidasa en raíces de arroz transformadas con *ltp/gus* (a, b, d, e, f, g, h, i) y no transformadas c, no inoculadas (a y b) y inoculadas con el hongo arbuscular *G. mosseae* (c, d, e, f, g, h, i). m: micelio externo, Ap: apresorio, Rs: raíz secundaria, E: espora del hongo arbuscular.

2. Análisis de la expresión de un gen PAL (fenil-alanina-amonoliasa) durante el proceso de formación de la micorriza arbuscular.

En nuestros experimentos se intenta relacionar la inducción del gen *Ltp* con la inducción de otros genes relacionados con la respuesta defensiva de la planta, al objeto de establecer un mecanismo general de respuesta de la planta frente a la colonización del hongo arbuscular.

La enzima PAL es una de las enzimas claves en la respuesta defensiva de la planta debido a que juega un papel importante tanto en la síntesis de compuestos antimicrobianos (fitoalexinas), como intermediarios y señales moleculares de la respuesta de la planta (flavonoides, ácido salicílico, etc.). Existen evidencias de la evidencia de la inducción de la enzima PAL en respuesta a la micorrización en plantas de *M. truncatula* (Harrison y Dixon. 1993) y de forma concreta en células vegetales que contienen arbusculos (Harisson y Dixon. 1994), aunque no existe una relación clara entre la inducción de PAL y la respuesta defensiva de la planta.

En un principio y a partir de secuencias de ADN disponibles en bancos de datos se diseñaron oligonucleótidos específicos que utilizamos como cebadores en la reacción RT-PCR para obtener un clon de ADNc (*Pal-1*) de la región codificante del gen y a partir de ARN de raíces de arroz tratadas con la bacteria *P. syringae*. La Figura 16 muestra el resultado de esta reacción observándose una banda de SDN de aproximadamente 550pb que correspondía al tamaño teórico calculado por análisis de secuencias para el fragmento obtenido por PCR. El análisis y la comparación de la secuencia Pal-1 con la secuencia del gen ZB8 que codifica para una fenil-amonio-liasa en arroz() confirmaron que nuestro clon Pal-1 obtenido por RT-PCR contenía efectivamente ADN perteneciente a la regio codificante del gen Pal-1(Figura 17).

El análisis de la expresión del gen Pal-1 confirmo su carácter de inducible frente a agentes inductores de respuesta defensiva, tanto biológicos (*P. syringae*) como químicos (ácido salicílico). La Figura 18 muestra la inducción del gen Pal-1 en raíces de arroz tratadas con la bacteria *P. syringae*. El análisis tanto en experimentos de hibridación por northern ,

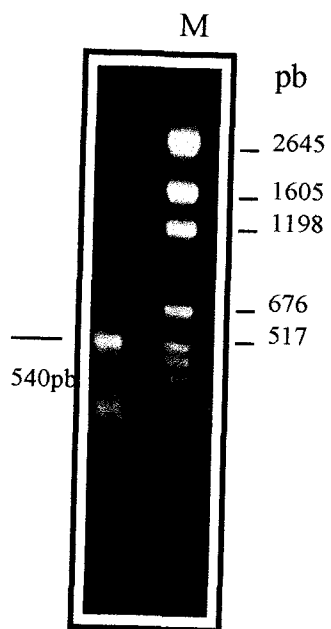


Figura 16. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de la reacción RT-PCR, usando los oligonucleotidos específicos del gen de la PAL
M: marcador de peso molecular PGEM.

```

Pal-1  CGAGCAGCACAAACCAGGACGTCAACTCTCTTGGACTCATTTCTCCTCCAGGAAGACGGAGGAGGCAATCGA 70
      |||
ZB8    CGAGCAGCACAAACCAGGACGTCAACTCTCTTGGACTCATTTCTCCTCCAGGAAGACCGCCGAGGCAATCGA 3948

Pal-1  ACATCCTGAAGCTCATGTCTCCACGTTCTTGATCGCCTTCTGCCAGGCCGTCGACCTGCGGCAACATCG 140
      |||
ZB8    ACATCCTGAAGCTCATGTCTCCACGTTCTTGATCGCCTTCTGCCAGGCCGTCGACCTGCGGCAACATCG 4018

Pal-1  AGGAGAACGTC AAGAGCGCCGTC AAGAGCTGCGTCATGACGGTGCC AAGAAGACACTCAGCACCAACTC 210
      |||
ZB8    AGGAGAACGTC AAGAGCGCCGTC AAGAGCTGCGTCATGACGGTGCC AAGAAGACACTCAGCACCAACTC 4088

Pal-1  CACCGCGATCTCCACGTCGCACGCTTCTGCGAGAAGGACCTGCTCAAGGAGATCGACCGGAGGCGGTG 280
      |||
ZB8    CACCGCGATCTCCACGTCGCACGCTTCTGCGAGAAGGACCTGCTCAAGGAGATCGACCGGAGGCGGTG 4158

Pal-1  TTCGCGTACGCGGACGACCCGTCGAGCCACAACACTACCCGCTGATGAAGAAGCTGCGCAACGTGCTCGTGG 350
      |||
ZB8    TTCGCGTACGCGGACGACCCGTCGAGCCACAACACTACCCGCTGATGAAGAAGCTGCGCAACGTGCTCGTGG 4228

Pal-1  AGCGCGCCCTCGCCAACGGCGCGCCGAGTTC AAGCGCGACACCTCGGTGTTCCGCAAGGTCGCGCAGTT 420
      |||
ZB8    AGCGCGCCCTCGCCAACG . CG . GGCCGAGTTC AAGCGCGACACCTCGGTGTTCCGCAAGGTCGCGCAGTT 4296

Pal-1  CGAGGAGGAGCTGCGCGGACTCTGCCAGGTGCGATCGAGGCCGACGTCGCGCTGTGGAGAACGGCAC 490
      |||
ZB8    CGAGGAGGA . CTGCGCGGACTCTGCCAGGTGCGATCGACGG . . . ACGTGC GGCTGTGGAGAACGGCAC 4362

Pal-1  GGCGGCGATTCC CAGCAGAATCACC GAGTGCAGGTCGTATCCGCTC 545
      |||
ZB8    GGCGGCGATTCC CAGCAGAATCACC GAGTGCAGGTCGTATCCGCTC 4408

```

Figura 17: Alineamiento de las secuencias de nucleótidos del clon pal-1 y del gen ZB-8 que codifica para PAL. La secuencia de los oligonucleótidos PAL1 y PAL2 utilizados en la RT-PCR para la obtención del clon Pal-1 están subrayados.

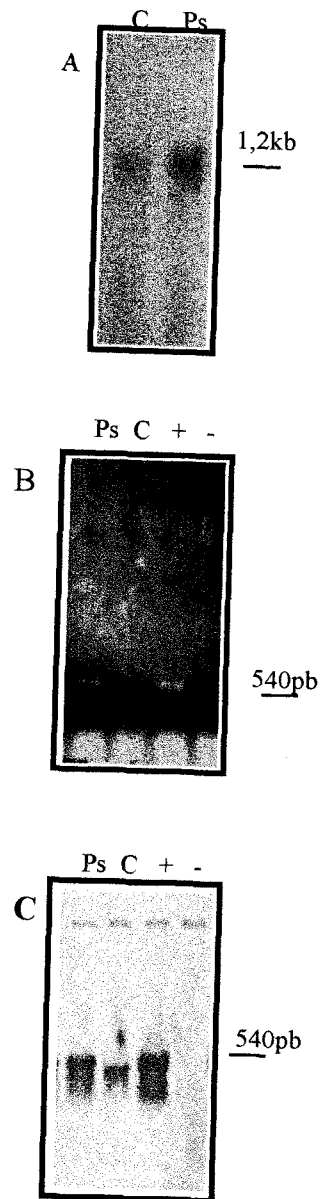


Figura 18 Análisis de la expresión del gen PAL mediante northern blot (A) y por RT-PCR (B y C) a partir de ARN obtenido de plantas inoculadas con la bacteria patógena *Pseudomonas syringae* (Ps) y de las plantas control (C).
+ representa la reacción de amplificación PCR usando como molde el clon de PAL
- la reacción control sin del ARN enzima RT.

como de RT-PCR mostró una clara inducción de la expresión del gen *Pal-1*. De igual forma el análisis mediante RT-PCR de la expresión del gen en respuesta al tratamiento con 1mM de SA mostró la inducción de dicho gen en presencia del SA (Figura 19). En la Figura 20 se muestran los niveles de expresión para las muestras de ARN utilizadas mediante RT-PCR, observándose que no hay diferencias en la expresión del gen de la ubiquitina en los distintos tratamientos.

Una vez demostrada la capacidad de respuesta del gen *Pal-1* frente a agentes inductores de la respuesta defensiva en la planta, se realizó el análisis de la expresión de dicho gen durante las primeras etapas del desarrollo de la simbiosis micorriza arbuscular.

En estos experimentos se utilizó ARN de raíces de plantas no inoculadas o inoculadas con *G. mosseae* y cosechadas a los 3, 4, 5, 6, 7 y 9 días después de la inoculación con el hongo arbuscular. Los estudios de análisis de la expresión mediante northern blot muestran que los niveles de expresión del gen *Pal-1* son mayores en las raíces de plantas inoculadas y cosechadas a los días 4, 5, 6 y 7 después de la inoculación (Figura 21). El mismo resultado en cuanto a la inducción de la expresión del gen *Pal-1* se obtuvo utilizando la técnica RT-PCR (Figura 22). La Figura 23 muestra la expresión del gen de la ubiquitina analizada por RT-PCR utilizando las mismas muestras de ADN de cadena simple que para el experimento con *Pal-1*. Los valores de inducción relativa I/NI utilizando la relación expresión *Pal-1*/ expresión ubiquitina fueron los siguientes

Tiempo (días)	0	3	4	5	6	7	9
I/NI		1,5	1,3	1,5	3	3,7	1

Los resultados obtenidos claramente muestran la inducción del gen *Pal-1* durante las primeras etapas de la colonización de arroz por *G. mosseae*. La expresión de dicho gen *Pal-1* se incrementa también en respuesta de inductores de la respuesta defensiva de la planta.

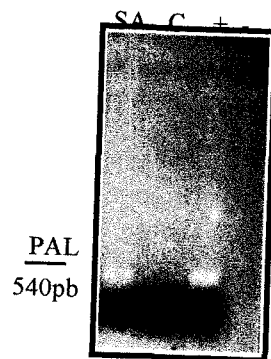


Figura 19 Estudio de la expresión de la PAL por RT-PCR en raíces de arroz tratadas con el SA 1mM durante 24h y en raíces control (C) no tratadas.
+ representa la reacción de amplificación PCR usando como ADN molde el clon PAL.
- la reacción control sin enzima RT.

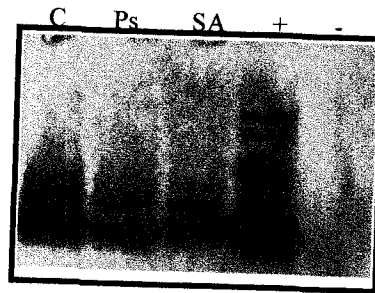


Figura 20 . Hibridación del gen de la ubiquitina con ADNc obtenido a partir de raíces infectadas por la bacteria patógena *Pseudomonas syringae*, de raíces tratadas con ácido salicílico (SA) a una concentración mM durante 24h y de raíces controles (C).
+ representa la reacción de amplificación PCR usando como ADN molde el clon de la ubiquitina.
- el control del ARN sin enzima RT.

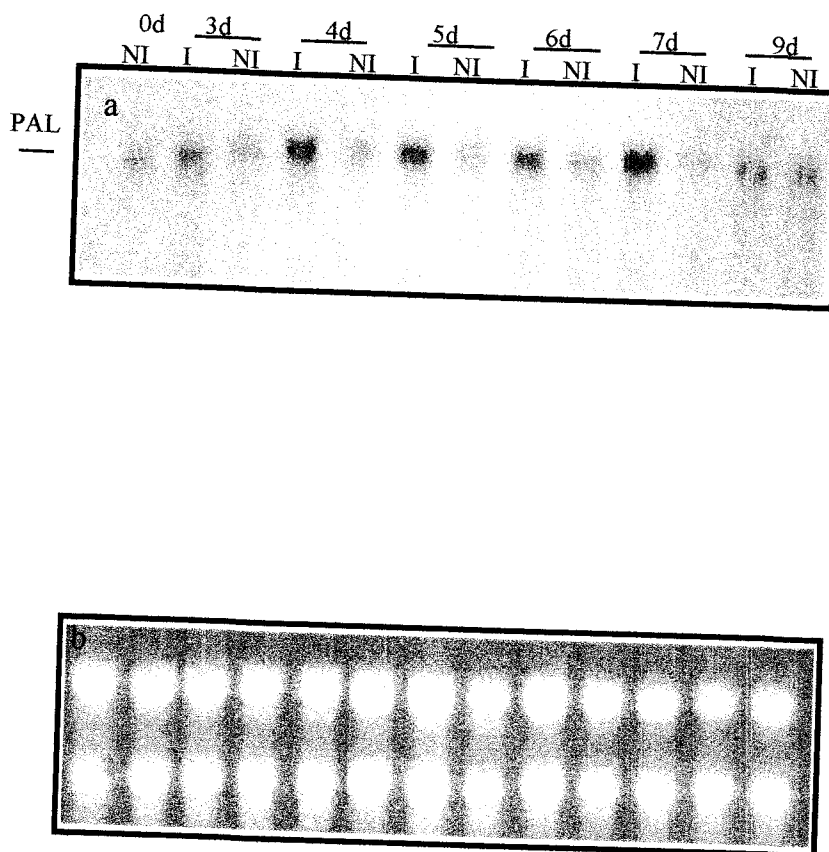


Figura 21. Estudio de la expresión del gen de la PAL por northern blot de raíces de arroz no inoculadas (NI) y inoculadas con el hongo arbuscular *G. mosseae* y cosechadas a distintos tiempos de colonización (días).
a- representa la hibridación con la sonda específica del gen de la PAL.
b- filtro de la membrana teñido con Bromuro de etidio.

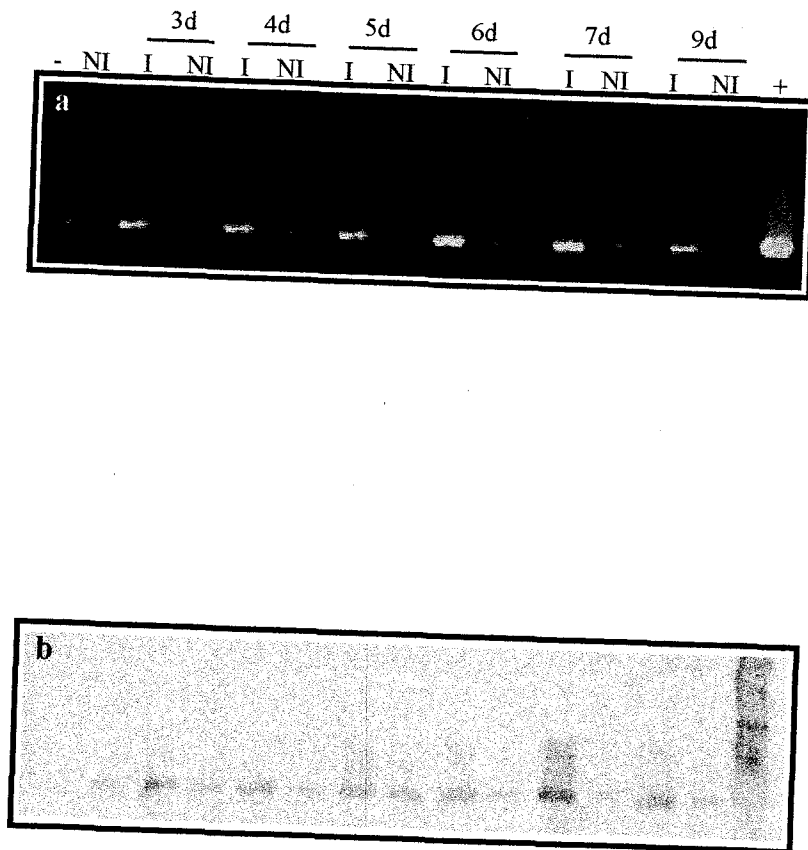


Figura 22: Análisis de la expresión del gen PAL por RT-PCR a partir de ARN obtenido de plantas no inoculadas (NI) y inoculadas con *G. mosseae* y cosechadas a distintos tiempos de colonización (días). En a se muestra la electroforesis en gel de agarosa de los productos amplificados, en b la hibridación del gel con la sonda específica de la PAL.
 + es la reacción de la amplificación usando como ADN molde el clon PAL
 - es la reacción de control del ARN sin enzima RT.

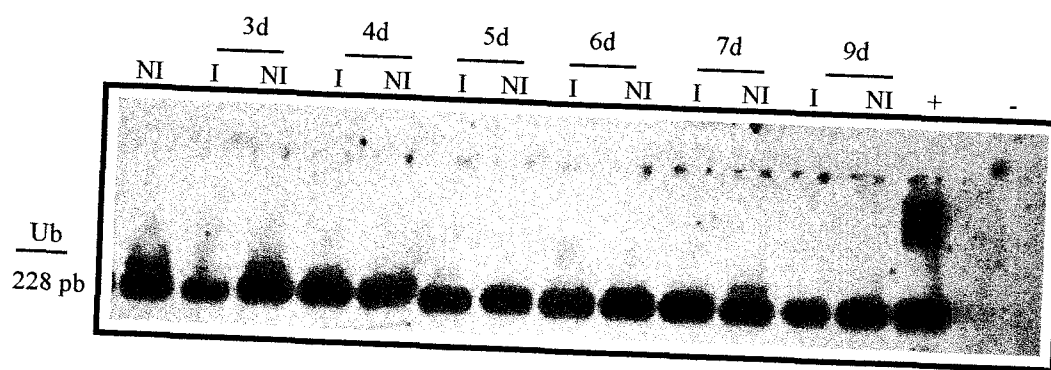


Figura 23. Hibridación del gen de la ubiquitina con ADNc obtenido a partir de raíces no inoculadas (NI) y inoculadas (I) con el hongo arbuscular *Glomus mosseae* y cosechadas a distintos tiempos (días) de colonización.
 + representa la reacción de amplificación PCR usando como ADN molde el clon de la ubiquitina
 - representa la reacción control del ARN sin enzima RT.

3. Estudio de actividad Catalasa y Peroxidasa durante el proceso de formación de la micorriza arbuscular.

Otras de las actividades enzimáticas que participan en la respuesta defensiva de la planta son las catalasas y peroxidases. Estas enzimas tienen una participación destacada en los fenómenos de respuesta al estrés y entre ellos la respuesta a patógenos. Su acción, mediada por su participación en el metabolismo de especies reactivas de oxígeno, principalmente de H_2O_2 , no está clara, aunque se han descrito como importantes para los fenómenos de respuesta tanto a nivel de pared celular, como citoplasmática y de transducción de señales en la activación génica seguida al estrés.

En nuestros experimentos se planteó el análisis de la actividad de estas enzimas durante las etapas iniciales de la micorrización y respuesta de la planta. En un principio se analizó la expresión genica mediante northern blot de dos genes de catalasa (cat-2 y cat-3) y de un gen de ascorbato peroxidasa (APX) en plantas de tabaco no colonizadas o colonizadas por el hongo *G. mosseae*. Mediante esta técnica no pudimos detectar diferencias en los niveles de expresión entre raíces de plantas no inoculadas e inoculadas a los distintos tiempos ensayados. La Figura 24 muestra un ejemplo del análisis de northern blot de los tres genes utilizados en raíces de plantas de tabaco no inoculadas y inoculadas con *G. mosseae* y cosechadas a los 5 días de la inoculación, observándose una mayor expresión de los genes en la hoja de las plantas que en la raíz.

El análisis de la actividad enzimática en raíces de tabaco no inoculadas o inoculadas con *G. mosseae* durante los primeros días de la interacción mostró que tanto en la actividad catalasa (Figura 25) como ascorbato peroxidasa (Figura 26) están incrementadas de manera transitoria en las plantas inoculadas. Durante los 3 y 5 días después de la inoculación los niveles de actividad catalasa fueron ligeramente superiores en plantas micorrizadas (alrededor de 2 veces) que no micorrizadas (Figura 25). De igual forma los niveles de actividad ascorbato peroxidasa fueron del orden de 3 veces superiores en plantas inoculadas durante los días 3 y 5 después de la inoculación.

3. Estudio de actividad Catalasa y Peroxidasa durante el proceso de formación de la micorriza arbuscular.

Otras de las actividades enzimáticas que participan en la respuesta defensiva de la planta son las catalasas y peroxidasas. Estas enzimas tienen una participación destacada en los fenómenos de respuesta al estrés y entre ellos la respuesta a patógenos. Su acción, mediada por su participación en el metabolismo de especies reactivas de oxígeno, principalmente de H_2O_2 , no está clara, aunque se han descrito como importantes para los fenómenos de respuesta tanto a nivel de pared celular, como citoplasmática y de transducción de señales en la activación génica seguida al estrés.

En nuestros experimentos se planteó el análisis de la actividad de estas enzimas durante las etapas iniciales de la micorrización y respuesta de la planta. En un principio se analizó la expresión genética mediante northern blot de dos genes de catalasa (cat-2 y cat-3) y de un gen de ascorbato peroxidasa (APX) en plantas de tabaco no colonizadas o colonizadas por el hongo *G. mosseae*. Mediante esta técnica no pudimos detectar diferencias en los niveles de expresión entre raíces de plantas no inoculadas e inoculadas a los distintos tiempos ensayados. La Figura 24 muestra un ejemplo del análisis de northern blot de los tres genes utilizados en raíces de plantas de tabaco no inoculadas y inoculadas con *G. mosseae* y cosechadas a los 5 días de la inoculación, observándose una mayor expresión de los genes en la hoja de las plantas que en la raíz.

El análisis de la actividad enzimática en raíces de tabaco no inoculadas o inoculadas con *G. mosseae* durante los primeros días de la interacción mostró que tanto en la actividad catalasa (Figura 25) como ascorbato peroxidasa (Figura 26) están incrementadas de manera transitoria en las plantas inoculadas. Durante los 3 y 5 días después de la inoculación los niveles de actividad catalasa fueron ligeramente superiores en plantas micorrizadas (alrededor de 2 veces) que no micorrizadas (Figura 25). De igual forma los niveles de actividad ascorbato peroxidasa fueron del orden de 3 veces superiores en plantas inoculadas durante los días 3 y 5 después de la inoculación.

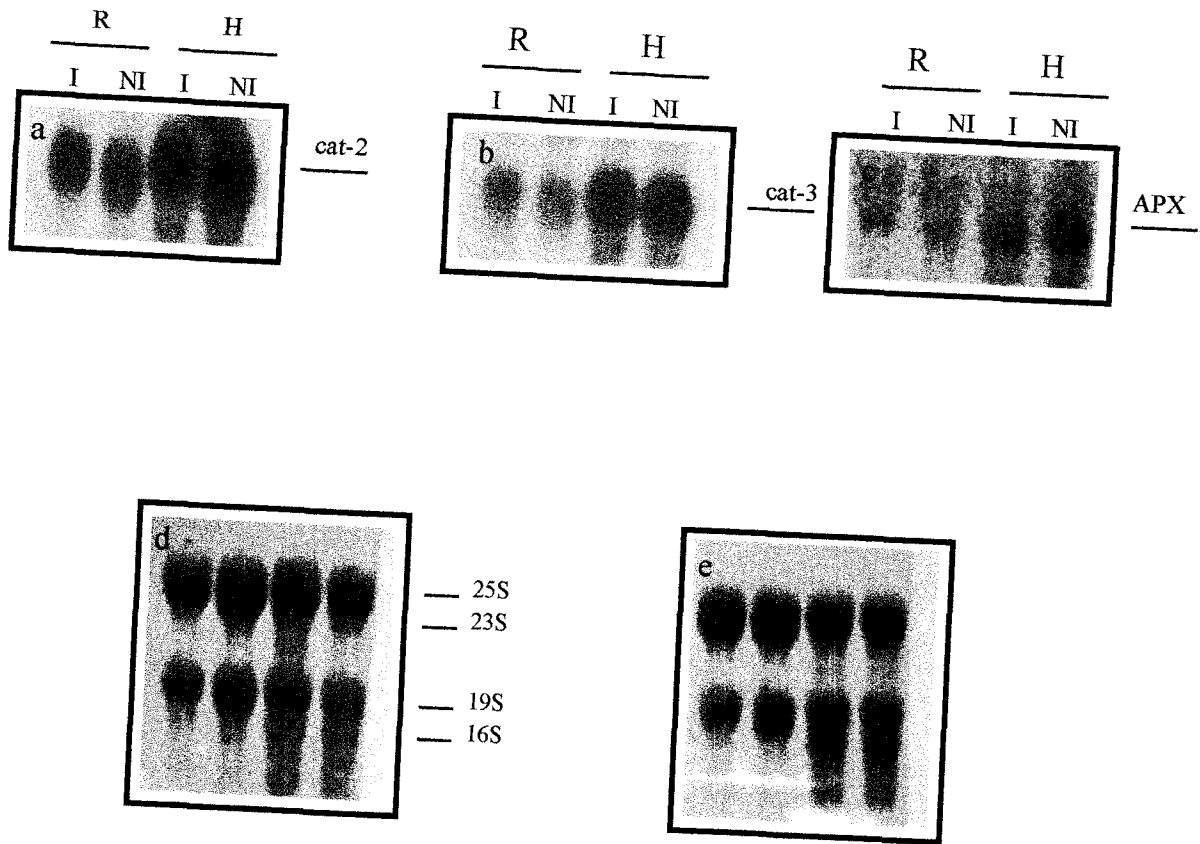


Figura 24. Estudio de la expresión de dos genes que codifican catalasa (a,b) y Ascorbatc peroxidasa (APX) (c) mediante Northern blot del ARN extraído de plantas de tabaco inoculadas (I) con *G. mosseae* y no inoculadas (NI) después de 30 días de colonización. d y e- Filtros hibridados con las sondas cat y APX, teñidos con azul de metileno mostrando la uniformidad en las cantidades de ARN.

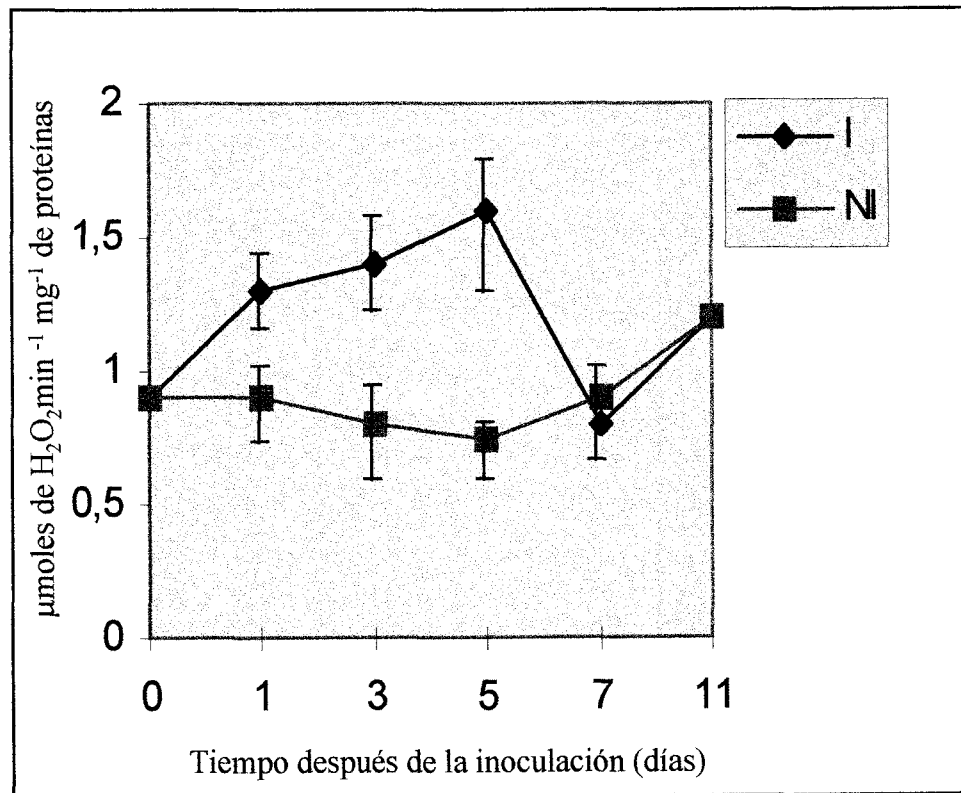


Figura 25. Estudio de la actividad catalasa en raíces de plantas de tabaco en las primeras etapas de colonización por el hongo arbuscular *G. mosseae*, la actividad catalasa se expresa por μmoles de H₂O₂ por minuto y por mg de proteína

Los niveles de % de raíz colonizada y los eventos más importante en cuanto al desarrollo de la colonización en las raíces de las plantas de tabaco se expresan en la tabla siguiente

<i>TIEMPO</i>	<i>% DE MICORRIZACIÓN</i>
2, 3, 4 días	puntos de entrada
5 días	9%
6 días	15%
7 días	20%
11 días	38%

El análisis de la secuencia de los clones de catalasa y peroxidasa de tabaco nos permitirá diseñar oligonucleótidos de específicos la secuencia de cada uno de ellos y la realización del análisis de expresión génica mediante RT-PCR cuyo efectividad se ha puesto de manifiesto para la expresión de otros genes tal y como se ha demostrado para el gen de la *Ltp* y el gen *Pal*

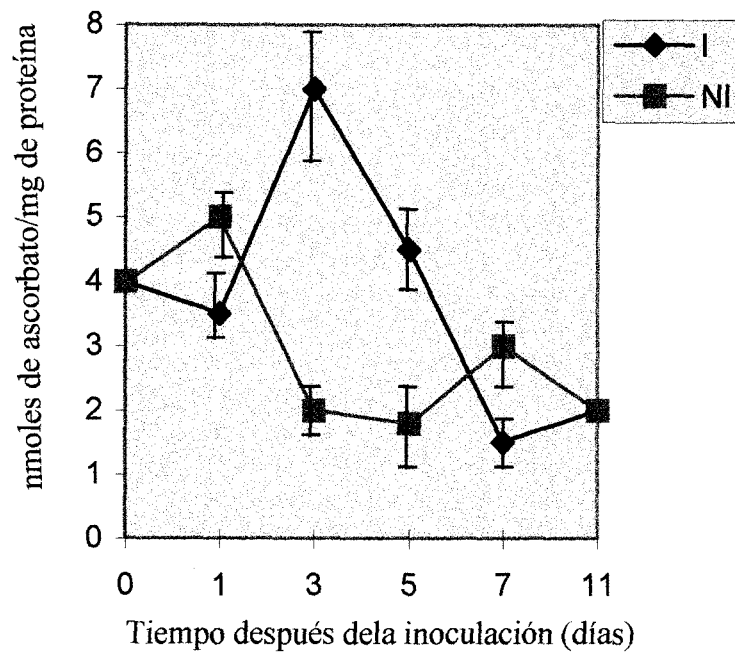


Figura 26. Estudio de la actividad Ascorbato peroxidasa (APX) en raíces de plantas de tabaco en las primeras etapas de colonización por el hongo arbuscular *G. mosseae*, la actividad APX se expresa por nmoles de ascorbato por mg de proteína

Los niveles de % de raíz colonizada y los eventos más importante en cuanto al desarrollo de la colonización en las raíces de las plantas de tabaco se expresan en la tabla siguiente

<i>TIEMPO</i>	<i>% DE MICORRIZACIÓN</i>
2, 3, 4 días	puntos de entrada
5 días	9%
6 días	15%
7 días	20%
11 días	38%

El análisis de la secuencia de los clones de catalasa y peroxidasa de tabaco nos permitirá diseñar oligonucleótidos de específicos la secuencia de cada uno de ellos y la realización del análisis de expresión génica mediante RT-PCR cuyo efectividad se ha puesto de manifiesto para la expresión de otros genes tal y como se ha demostrado para el gen de la *Ltp* y el gen *Pal*

Estudio de la participación del ácido Salicílico como componente de la respuesta de la planta a la formación de la micorriza arbuscular

1. Inducción del ácido salicílico (SA) durante el proceso de micorrización.

Con objeto de conocer si la interacción del hongo arbuscular con la planta provoca la activación de una respuesta defensiva en la planta mediada por la acumulación de ácido salicílico, se realizaron estudios de medida de los niveles de SA en plantas de tabaco y arroz inoculadas con el hongo arbuscular *G. mosseae*. Se tomaron medidas secuenciales de niveles de SA en raíz durante las primeras etapas de la interacción dado que nuestro interés se centra en las etapas de contacto, reconocimiento y penetración del hongo en la raíz.

La tabla 1 muestra los niveles de porcentaje de la longitud de raíz micorrizada por *G. mosseae* en cada una de las plantas utilizadas a los distintos tiempos de cultivo tras la inoculación del hongo arbuscular.

La Figura 1 muestra las medidas de los niveles de SA en forma libre en plantas de arroz (A) y tabaco (B). El resultado de esta medida mostró la existencia de un pico de acumulación de SA durante el quinto (tabaco) y sexto (arroz) día de la interacción. Este pico en los niveles de SA es transitorio en las plantas inoculadas y alcanza niveles de 3 a 4 veces superiores al de planta no inoculadas.

En ambos sistemas (tabaco y arroz) la aparición de micelio externo rodeando a la raíz se observó a partir del segundo día de interacción y formación de apresorios y puntos de entrada en la raíz son los mostrados en la tabla 1.

2. Efecto de la aplicación de ácido salicílico exógeno sobre el proceso de formación de la micorriza arbuscular.

La existencia de una inducción transitoria en la acumulación de SA en las raíces de las plantas micorrizadas nos llevó a plantear una serie de experimentos encaminados al

% de micorrización	Tabaco	Arroz
2, 3, y 4 días	puntos de entrada	desarrollo de micelio externo
5 días	9%	desarrollo de micelio externo
6 días	15%	6%
7 días	20%	9%
9 días	25%	10%
11 días	38%	12,5%

Tabla 1 Porcentaje de longitud de raíces de tabaco y de arroz inoculadas con el hongo arbuscular *G. mosseae*

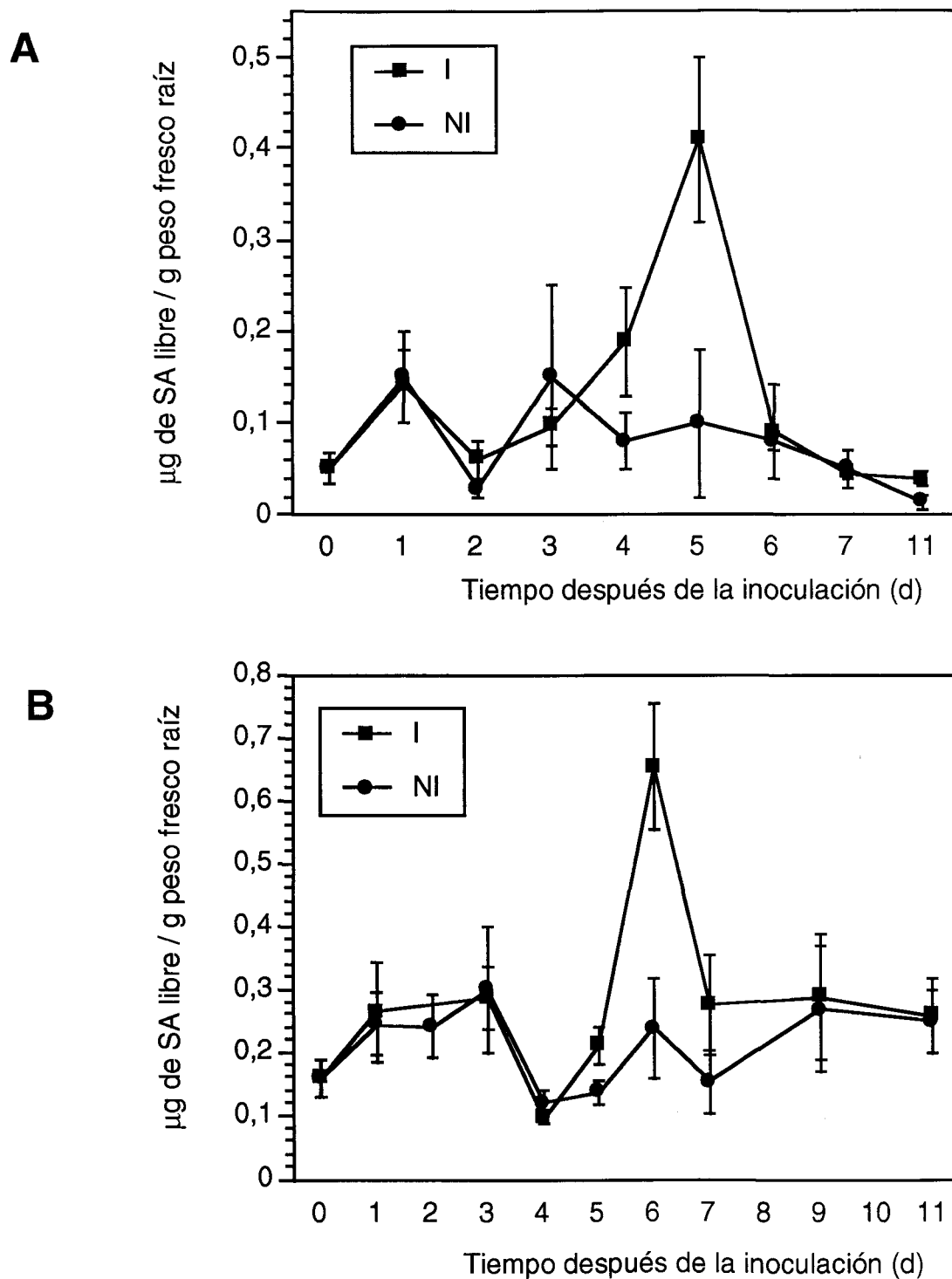


Figura 1.- Medida de los niveles de Acido Salicílico en forma libre en raíces de plantas de arroz(A) y tabaco (B), no inoculadas (NI) o inoculadas con *G. mosseae* (I) y cosechadas a diferentes tiempos después de la inoculación. Los valores representan la media obtenida de los valores de 4 plantas diferentes \pm error estándar.

estudio de la cinética de micorrización en plantas sometidas a la acción de SA aplicado de forma exógena.

Se utilizaron plantas de arroz y guisante inoculadas con *G. mosseae* y sometidas a la acción de distintas concentraciones de SA (0; 0,5; 1 y 1,5) añadido en el agua de riego. Se observó el efecto de la administración de estas dosis de SA sobre el número de apresorios formados en la superficie de la raíz y el % de longitud de raíz colonizada, medidos después de 5 y 25 días de la inoculación.

En las tablas 2 y 3 se muestra que no hubo influencia negativa del SA añadido sobre el desarrollo de las plantas, medido este como peso fresco de raíz y parte aérea, observándose que no hubo diferencias entre plantas tratadas y no tratadas.

A los 15 días de la inoculación y aplicación de SA se observó una disminución del % de micorrización de raíz colonizada en ambas plantas (Tablas 5 y 6) que fue proporcional a la concentración de SA añadido. Sin embargo no hubo efecto sobre la capacidad del hongo de adhesión a la raíz, pues el número de apresorios no se vio afectado en los tratamientos con SA respecto al control no tratado (Tablas 5 y 6). Resulta interesante, sin embargo, la observación de que a los 25 días después de la inoculación los niveles del % de raíz colonizada y el número de apresorios formados son iguales tanto en plantas no tratadas como en las tratadas con las diferentes concentraciones de SA. El efecto de inhibición de la micorrización observado a los 15 días desaparece a los 25 días de colonización. Por lo tanto el efecto observado es transitorio y afecta a etapas iniciales de la interacción.

La medida del efecto inductor de mecanismos de defensa del SA añadido en nuestro sistema de experimentación se realizó mediante análisis por RT-PCR de la expresión del gen *ltp A14*, cuya inducción por SA la habíamos confirmado anteriormente. La Figura 2 muestra los niveles de expresión del gen *ltp* en raíces de plantas de arroz tratadas con 0,5 y 1 mM de SA, así como en los controles no tratados. Se muestra también la expresión del gen de la poliubiquitina en los distintos tratamientos. Claramente los niveles de expresión del gen *ltp* están incrementados en las raíces de las plantas tratadas con SA, lo cual indica que el SA añadido fue efectivo en su papel de inductor de la expresión génica, sobre todo de genes relacionados con la respuesta defensiva

Tabla.4- Peso fresco de raíz y parte aérea por planta de arroz cosechada tras 15 y 25 días de la inoculación con *Glomus mosseae* y tratadas con distintas concentraciones de NaSA.

NaSA (mM)	Peso Parte aérea (g)		Peso raíz (g)	
	15	25	15	25
0	0,086 ± 0,01	0,100 ± 0,01	0,12 ± 0,01	0,13 ± 0,01
0,5	0,086 ± 0,003	0,09 0± 0,01	0,09 ± 0,006	0,10 ± 0,01
1	0,083 ± 0,006	0,096 ± 0,002	0,10 ± 0,003	0,12 ± 0,01
1,5	0,083 ± 0,006	0,090 ± 0,01	0,10 ± 0,01	0,09 ± 0,01

Los datos son valores de la media obtenida de 4 plantas ± error standar.

Tabla.5- Puntos de entrada por cm de raíz y % de micorrización por planta de arroz cosechada tras 15 y 25 días de la inoculación con *Glomus mosseae* y tratadas con distintas concentraciones de NaSA.

NaSA (mM)	Puntos de entrada por cm / raíz		% de Micorrización	
	15	25	15	25
0	1,50 ± 0,3	3,2 ± 0,5	10 ± 2	25,4 ± 4
0,5	1,80 ± 0,1	3,1 ± 0,3	6,2 ± 1	29,1 ± 1,2
1	1,67 ± 0,5	2,8 ± 0,6	4,2 ± 1	23,4 ± 6
1,5	1,50 ± 0,6	2,5 ± 0,4	1,2 ± 0,5	22,5 ± 5

Los datos son valores de la media obtenida de 4 plantas ± error standar.

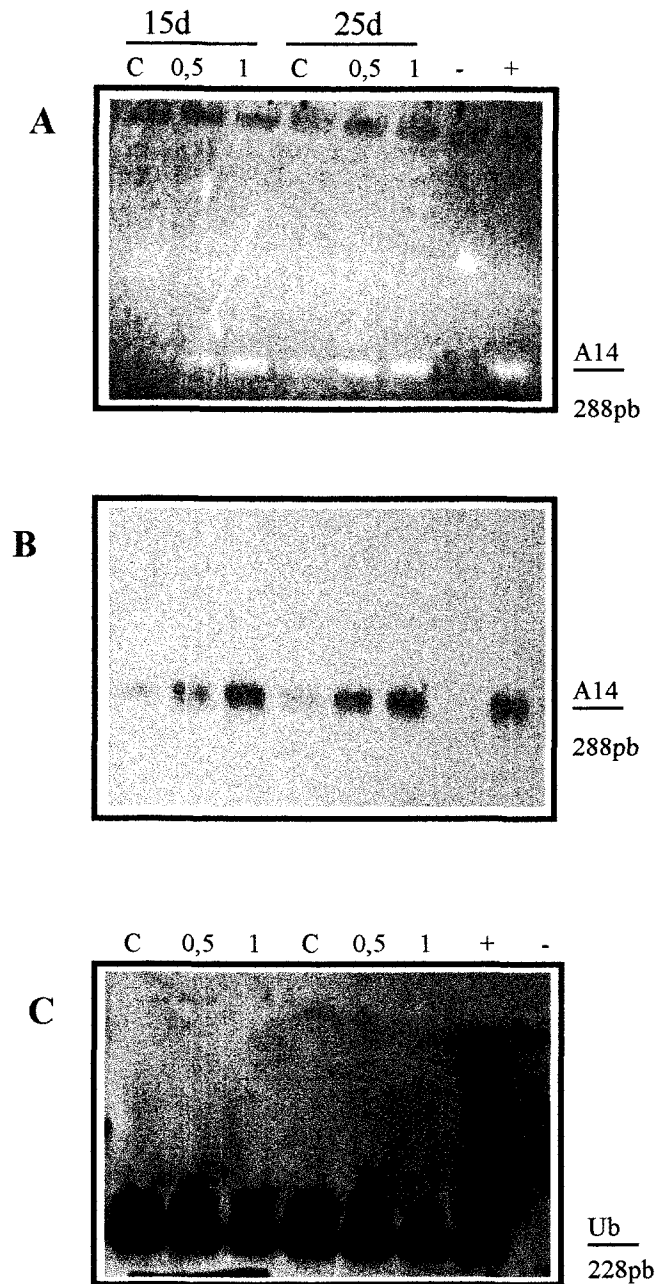


Figura 3. Estudio de la inducción de A14 por SA detectado por RT-PCR en plantas inoculadas por *G.mosseae* y tratadas con las concentraciones 0,5 y 1mM de SA y en plantas inoculadas y no tratadas (C) después de 15 y 21 días (d) de colonización.

A- Electroforesis en gel de agarosa

B- Hibridación con la sonda específica del gen A14.

C- Hibridación con la sonda constitutiva de la ubiquitina.

+ es el control positivo

- representa el control de la reacción del ARN sin la enzima RT

3. Efecto del SA exógeno sobre la germinación de esporas de *G. mosseae*

Con objeto de determinar un posible efecto antifúngico del SA sobre *G. mosseae*, se estudio la capacidad de germinación de las esporas de dicho hongo en presencia de distintas concentraciones de SA en el medio de germinación. La Figura 3 muestra los niveles de germinación alcanzados a lo largo del tiempo y bajo diferentes concentraciones de SA. Se observa un efecto inhibitor del SA añadido al medio sobre la germinación de esporas. Dicho efecto inhibitor es patente en la primera determinación a los 5 días de incubación de las esporas y se mantiene a lo largo del experimento.

Curiosamente el efecto inhibitor observado es semejante en todos los tratamientos de SA y no está relacionado directamente con la concentración del SA añadida al medio.

4. Estudio de la relación entre acumulación de SA y resistencia a la micorrización y nodulación provocada por mutación.

Además del análisis de la participación del SA (endógeno o exógeno) en el proceso de micorrización, nuestro interés se centró en la participación del SA en la interacción incompatible, de resistencia, entre *G. mosseae* y plantas de guisantes P2 mutadas en el gen simbiótico sym 30 (Gérard Duc, comunicación personal). Estas plantas presentan los caracteres nod- y myc- como consecuencia de la mutación y son incapaces de nodular y /o formar micorrizas arbusculares.

La Figura 4 muestra los niveles de SA en forma libre obtenidos en raíces de plantas de guisante de genotipo salvaje (variedad Frisson) o mutantes P2 inoculadas o no con el hongo *G. mosseae*. Los niveles de SA para cada tiempo de inoculación ensayados son similares en plantas de genotipo salvaje, independientemente de la inoculación o no con el hongo *G. mosseae*, y solo a los 10 días de la inoculación los niveles de SA en plantas inoculadas son significativamente superiores (3,3 veces) a los de plantas no inoculadas. La

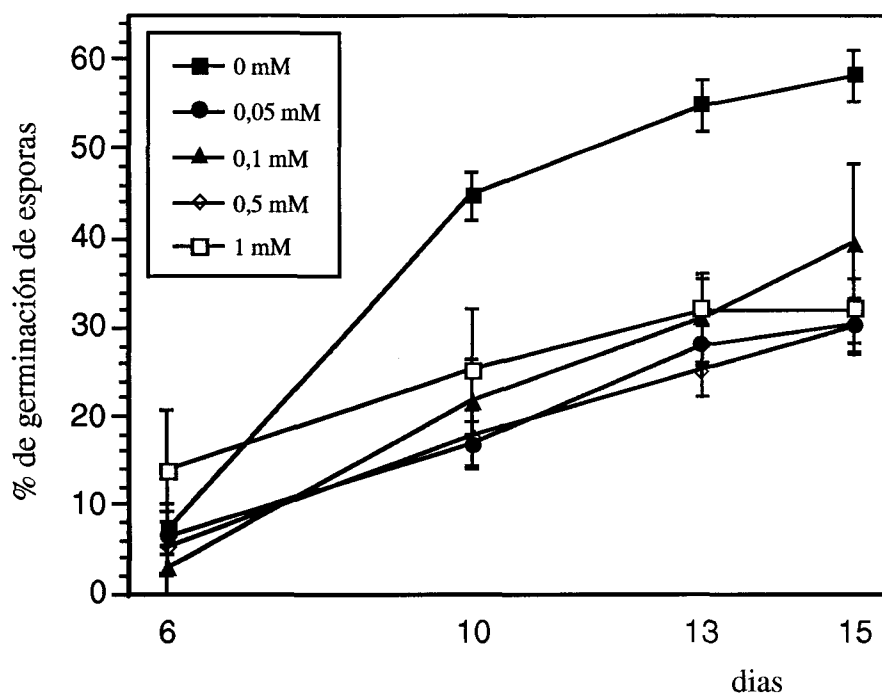


Figura 3.- % de germinación de esporas de *G. mosseae* en medio de cultivo agar-agua, adicionado de distintas concentraciones de Acido Salicílico. Los valores representan la media obtenida de los datos de germinación de 40 esporas por tratamiento \pm error estándar.

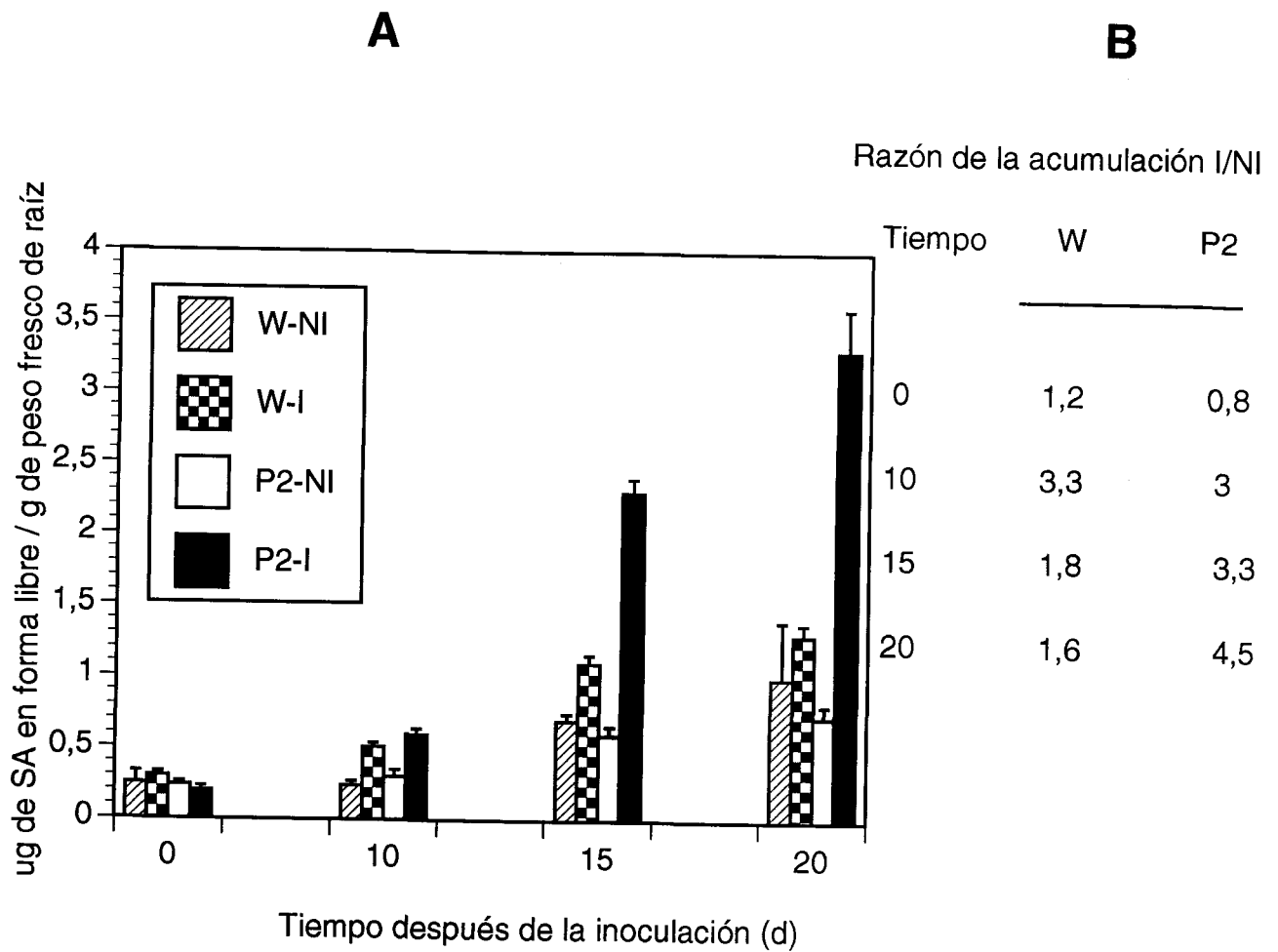


Figura 4.- Medida de los niveles de Acido Salicílico en forma libre (A) en raíces de plantas de guisante de genotipo salvaje (W) o mutante (P2), no inoculadas (NI) o inoculadas con *G. mosseae* (I) y cosechadas a diferentes tiempos después de la inoculación. Los valores representan la media obtenida de los valores de 4 plantas diferentes \pm error estándar. En B se muestra la razón de la acumulación de SA entre plantas I/NI.

tendencia tanto en plantas inoculadas como no inoculadas es de incremento tenue de los niveles de SA a lo largo del tiempo.

La medida de SA en forma libre en plantas P2 muestra también una tendencia de incremento a lo largo del tiempo, independientemente de la inoculación o no con el hongo *G. mosseae*. No obstante las diferencias observadas en los niveles de SA entre plantas P2 inoculadas y no inoculadas son evidentes y significativas tanto a los 10, 15 y 20 días de la inoculación, mostrando las plantas P2 inoculadas unos niveles de SA de 3; 3,3 y 4,5 veces superiores a los de plantas P2 no inoculadas, respectivamente. Claramente, la acumulación de SA en plantas P2 inoculadas con *G. mosseae* no tiene el carácter transitorio y se mantiene a partir del día 10 de la inoculación hasta el final del experimento.

Los niveles de % de raíz colonizada en las plantas de genotipo salvaje fueron de 8%, 20% y 30% a los 10, 15 y 20 días, respectivamente.

La relación a nivel genético entre el carácter nod y myc puesto de manifiesto por la mutación en plantas P2, nos planteó la cuestión de averiguar si la respuesta observada en cuanto a la acumulación de SA en la interacción *G. mosseae* sería similar en la interacción con *Rhizobium*. Para llevar a cabo los experimentos relacionados con esta cuestión se utilizó en primer lugar un aislado de *R. leguminosarum* bv. *Viciae* (Rlv13) obtenido de la colección del departamento de Microbiología de suelos y Sistemas simbióticos (EEZ-CSIC) que mostró un nivel de efectividad en la nodulación (medido como nº de nódulo y peso fresco de la planta) alto en la variedad salvaje de guisante Frisson. La Tabla 6 muestra los resultados en cuanto a número de nódulos y peso fresco de las plantas noduladas con distintos aislados de *R. leguminosarum*.

La Figura 5 muestra las medidas de SA en forma libre en raíces de plantas de guisante de genotipo salvaje (Frisson) y mutantes P2 inoculadas en un sistema hidropónico con *R. leguminosarum* Rlv13 o no inoculadas y determinadas a las 24, 48 y 73 horas de la inoculación. Las raíces de plantas de genotipo salvaje e inoculadas con *Rhizobium* muestran unos niveles de SA iguales o inferiores a los encontrados en las raíces de plantas no inoculadas, por el contrario los niveles de SA en raíces de plantas P2 inoculadas con

Tabla 6.- número de nódulos y peso fresco de raíz y parte aérea obtenidos por planta cosechada de guisante (Frisson) después de 20 días de la inoculación con diferentes cepas de *Rhizobium leguminosarum*.

Tratamiento	Nº de nódulos	Peso parte aérea (g)	Peso raíz (g)
0	—	0,93 ± 0,01	2,30 ± 0,1
Rlv 11	94 ± 5,7	1,30 ± 0,1	1,70 ± 0,2
Rlv 12	130 ± 6,6	1,50 ± 0,17	1,90 ± 0,2
Rlv 13	112 ± 6	1,78 ± 0,08	1,90 ± 0,2
Rlv 38	76 ± 4	1,40 ± 0,2	1,70 ± 0,3
UPM 791	109 ± 17	1,59 ± 0,14	1,67 ± 0,2

Los datos son valores de la media obtenida de 4 plantas ± error standar.

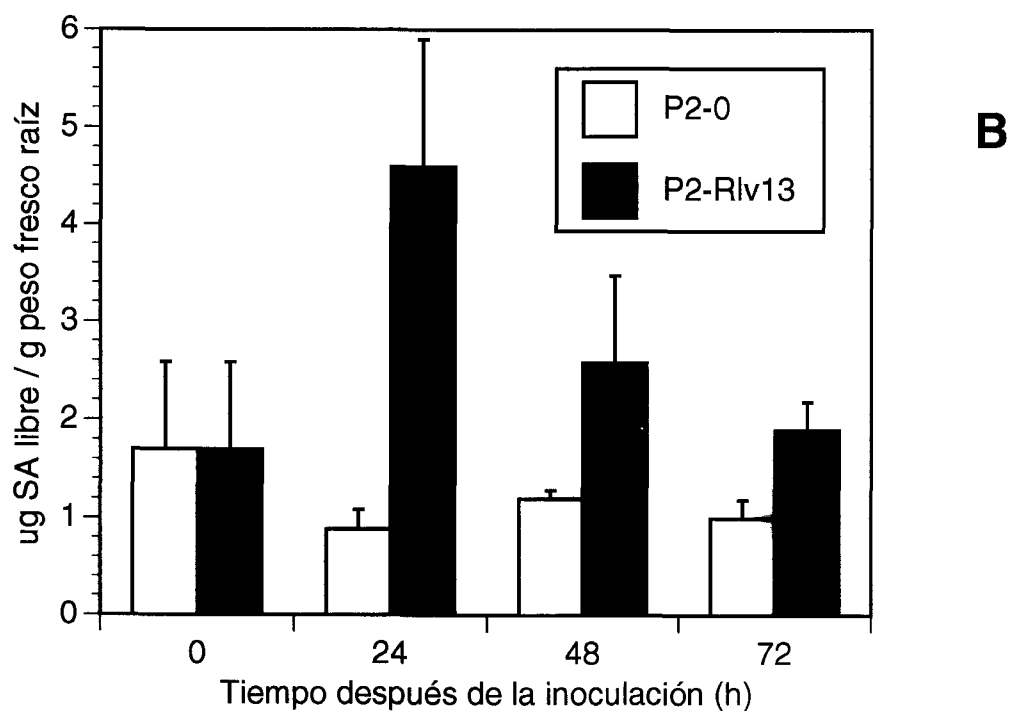
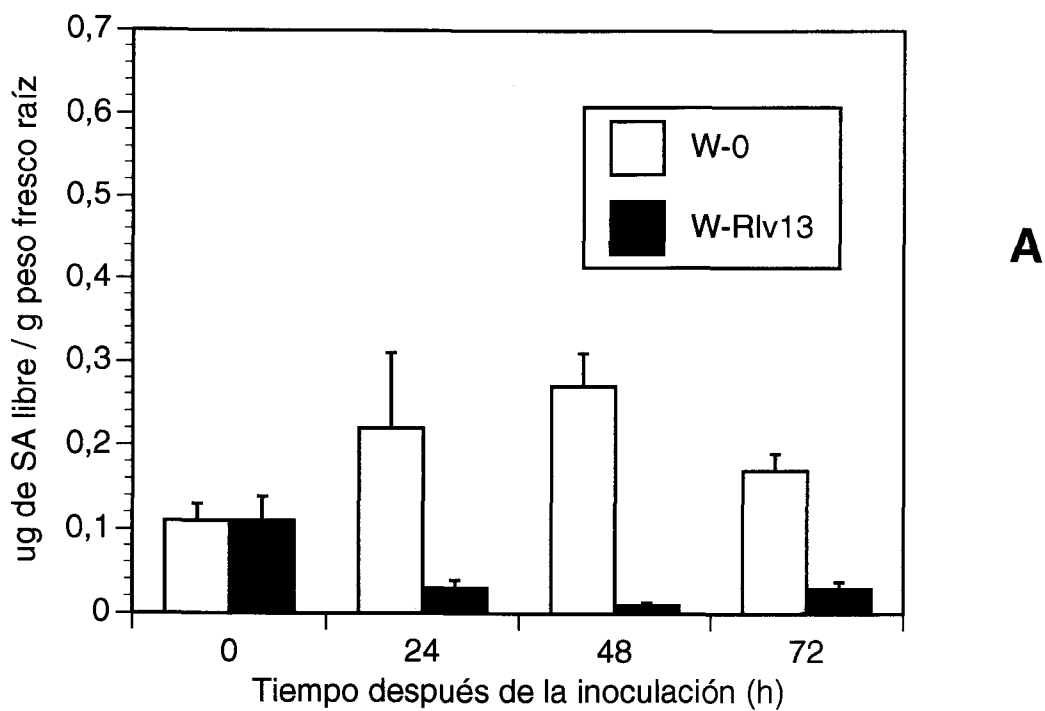


Figura 5.- Medida de los niveles de Acido Salicílico en forma libre en raíces de plantas de guisante de genotipo salvaje (A) o mutante P2 (B), no inoculadas (0) o inoculadas con *R. leguminosarum Rlv13* y cosechadas a diferentes tiempos después de la inoculación. Los valores representan la media obtenida de los valores de 4 plantas diferentes \pm error estándar.

Rhizobium fueron significativamente superiores a sus controles no inoculados a las 24, 48 y 72 horas de la inoculación.

Por tanto el efecto en la acumulación de SA como consecuencia de la interacción entre plantas P2 y *Rhizobium* es similar al observado en la interacción con *G. mosseae*, si bien en el caso de *Rhisobium*, los niveles de SA en plantas inoculadas muestran una tendencia decreciente a partir de del punto 24 h y con *G. mosseae* la tendencia observada en nuestros experimentos es un incremento en el tiempo.

Estudios en la interacción de plantas de alfalfa inoculadas con un mutante derivado de *Rhizobium meliloti* e incapaz de sintetizar el factor Nod (NodC-) han mostrado la acumulación de SA en forma libre como consecuencia de dicha interacción incompatible (Martinez-Abarca y col., 1998). Al objeto de analizar si dicho acumulo de SA debido a la presencia de la bacteria NodC- es similar al observado en nuestros experimentos con la planta Nod-, nos planteamos una serie de experimentos donde combinamos diferentes asociaciones entre guisante salvaje y P2 (Nod-) con *R. leguminosarum* salvaje (248) y mutante NodC- (incapaz de sintetizar el factor Nod y por lo tanto incapaz de nodular). El resultado de dicho estudio se muestra en la Figura 6. En la figura 6A se muestran los niveles de SA en forma libre obtenidos de raíces de guisante Frisson de genotipo salvaje inoculadas con *R. leguminosarum* 248 (genotipo salvaje) o mutante isogenico Nod C- (genotipo Nod-) después de 24, 48 y 72 horas de la inoculación. En la gráfica B de la figura 6 se muestran los resultados de la interacción con la planta P2.

El análisis de los resultados muestra claramente dos fenómenos independientes. Por un lado, la inoculación con el mutante *R. leguminosarum* NodC- causa el mismo efecto en cuanto a la acumulación de SA en plantas de genotipo salvaje como mutantes P2, lo que significa que el efecto es independiente del genotipo de la planta. Este efecto se manifiesta mediante una acumulación de SA a las 48 y 72horas de la inoculación, con un incremento máximo (10veces) a las 48 horas. En segundo lugar, podemos observar una acumulación de SA en plantas P2 inoculadas con el *R. leguminosarum* salvaje y que no tiene lugar en plantas de guisante de genotipo salvaje. Por tanto este segundo efecto de acumulación de SA está ligado al genotipo Nod- de plantas P2. Esta acumulación se manifiesta a las 48 y 72

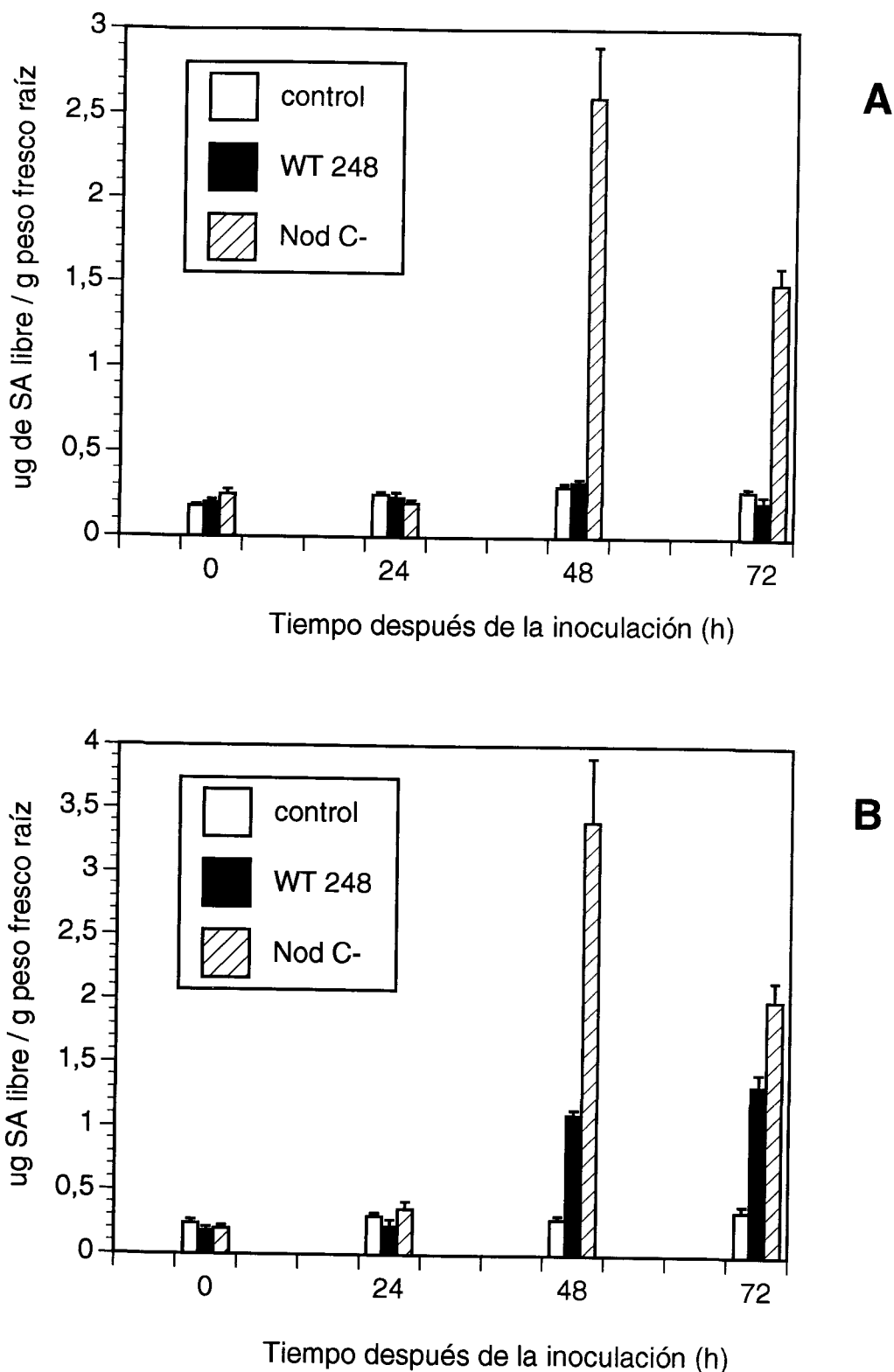


Figura 6.-Medida de los niveles de Acido Salicílico en forma libre en raíces de plantas de guisante de genotipo salvaje (A) o mutante P2 (B) no inoculadas (control), o inoculadas con *R. leguminosarum* wt 248 (WT 248), o *R. leguminosarum* Nod C- (Nod C-) y cosechadas a diferentes tiempos después de la inoculación. Los valores representan la media obtenida de los valores de 4 plantas diferentes \pm error estándar.

horas de la inoculación y representa un incremento de 3 a 4 veces respecto a los controles no inoculados. Hemos de señalar que este efecto en acumulación de SA ligado al genotipo P2 en la interacción con *R. leguminosarum* 248 es similar al observado en la interacción de P2 con *R. leguminosarum* Rlv13 o *G. mosseae*.

Para comprobar que el efecto en la acumulación de SA en plantas P2 está ligado a las interacciones de dicha planta con organismos mutualistas, realizamos un experimento de inoculación en cultivo hidropónico (similar al usado con *Rhizobium*) en el cual cuantificamos los niveles de SA en forma libre en la raíz de plantas de guisante Frisson y P2 inoculadas con la bacteria *Pseudomonas syringae* y medidos a las 48 y 72 horas de la inoculación. Los resultados presentados en la Tabla 7 muestran que no hubo diferencias entre plantas Frisson salvajes y P2 inoculadas con la bacteria y solo se observó un incremento de SA ligado a la inoculación a la 72 horas, tanto en plantas salvajes como P2. A partir de las 48 horas se observó un oscurecimiento en las raíces de las plantas (salvajes y P2) indicando síntomas de enfermedad.

Table 7. Medida de los niveles de Acido Salicílico en forma libre en raíces de plantas de guisante (genotipo salvaje y mutante P2) no inoculadas o inoculadas con *P. syringae* y cosechadas a distintos tiempos después de la inoculación.

	Tiempo después de la inoculación (h)		
	0	48	72
genotipo Frisson			
control	0,20 ± 0,03	0,32 ± 0,05	0,25 ± 0,04
<i>P. syringae</i>	0,18 ± 0,05	0,25 ± 0,03	0,40 ± 0,05
genotipo P2			
control	0,19 ± 0,02	0,28 ± 0,01	0,24 ± 0,02
<i>P. syringae</i>	0,22 ± 0,01	0,30 ± 0,02	0,41 ± 0,05

Los datos son valores de la media obtenida de los valores de 4 plantas ± error estándar, y expresan la medida de μg de SA en forma libre / g peso fresco de raíz.

Análisis de la expresión génica diferencial entre plantas micorrizadas y no micorrizadas mediante DDRT-PCR.

La formación de la simbiosis micorriza arbuscular parece estar controlada por una coordinación estricta de la expresión de los genes tanto de la planta como del hongo. Estudios de la traducción "in vitro" de los ARNs mensajeros de plantas micorrizadas y no micorrizadas pusieron de manifiesto la existencia de una expresión génica diferencial durante el proceso de la micorrización, con la aparición de polipeptidos específicos de plantas micorrizadas que no aparecen en plantas no micorrizadas y viceversa (García-Garrido y col., 1993). Otros estudios realizados mediante análisis electroforético de las proteínas totales aisladas de raíces han puesto también de manifiesto la existencia de cambios asociados al estado de micorrización o no de la raíz. Estos cambios afectan tanto al contenido cualitativo como cuantitativo de los polipéptidos analizados (Samra y col., 1997).

En nuestro estudio se pretende analizar la expresión génica diferencial entre las raíces de plantas micorrizadas y no micorrizadas y determinar las características y la posible función de los genes diferenciales encontrados. Por tanto el uso de la metodología adecuada es fundamental para poder llevar a cabo nuestro objetivo. En este sentido se utilizó la técnica del DDRT-PCR (Differential Display Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction) descrita por Liang y Pardee (1992) cuyas características permiten lo siguiente:

- Visualizar la composición de los ARNm de muestras en dos tratamientos distintos, en nuestro caso sería de ARNm de raíces de plantas micorrizadas y plantas no micorrizadas presentándolas en forma de bandas cortas de ADNc.
- Gran capacidad de análisis. La técnica permite el análisis de gran número de ADNc, pues la utilización de diferentes combinaciones de cebadores permite una gran variabilidad y versatilidad.

- Comparar muestras de ADNcs sintetizados a partir de los ARNms diferentes de ambas plantas.
- Clonar y secuenciar de forma rápida los ADNcs diferenciales, ya que tienen un tamaño pequeño. Esto posibilita su comparación con secuencias conocidas en un banco de datos . Los fragmentos clonados son fácilmente utilizados como sondas marcadas en estudios de expresión, mediante Northern blot.

Por lo tanto esta técnica parece idónea para visualizar los cambios de expresión génica producidos en la raíz de las plantas colonizadas por el hongo de la micorriza arbuscular .

En nuestros experimentos se utilizaron plantas de alfalfa, cebolla y arroz cosechadas 30 días después de ser inoculadas con el hongo arbuscular *G. mosseae*. Los porcentajes de longitud de raíz micorrizada tras ese periodo de cultivo fueron 50, 60 y 30 respectivamente.

El ARN extraído se utilizó para sintetizar el ADNc que luego se amplificó por PCR usando distintas combinaciones de oligonucleótidos como cebadores y un nucleótido radioactivo ($\alpha^{35}\text{SdATP}$) . Mediante autoradiografía a partir de geles de poliacrilamida se observó la existencia de bandas diferenciales de ADNc de plantas micorrizadas y no micorrizadas (Figuras 1, 2, 3 y 4).

Estas bandas son el resultado del uso de 3 cebadores de la cola poli A: $d(\text{T})_{11}\text{CA}$, $d(\text{T})_{11}\text{GA}$ y $d(\text{T})_{11}\text{GC}$, combinados con los cebadores RAPD nº 1, 2, 4, 5, 6, 8 y 10. La combinación de diferentes oligonucleotidos tanto en la primera como en la segunda reacción son la clave de la gran capacidad de análisis que permite la técnica, pues por cada pareja de oligonucleotidos, uno específico de cada reacción, obtenemos una serie de 50 a 100 ADNcs diferentes.

La comparación de las bandas obtenidas por DDRT-PCR usando 30 combinaciones de cebadores tipo $d(\text{T})_{11}(\text{MN})/\text{RAPD}$ reveló 3 tipo de diferencias:

- a- Bandas de ADNc que se obtuvieron únicamente en las muestras de raíces micorrizadas. Así se obtuvieron los ADNcs: OA_1I_1 , OA_1I_2 , OA_1I_3 , OC_2I_1 , OC_6I_1 y OC_6I_2 (Tabla1, Figura 1); OBI_1I_1 , OB_1I_2 , OB_5I_1 , OB_5I_2 , OC_1I_1 , OC_1I_2 , OC_1I_3 (Tabla 1, Figura 2) obtenidos a partir de ADNc de raíces de arroz.

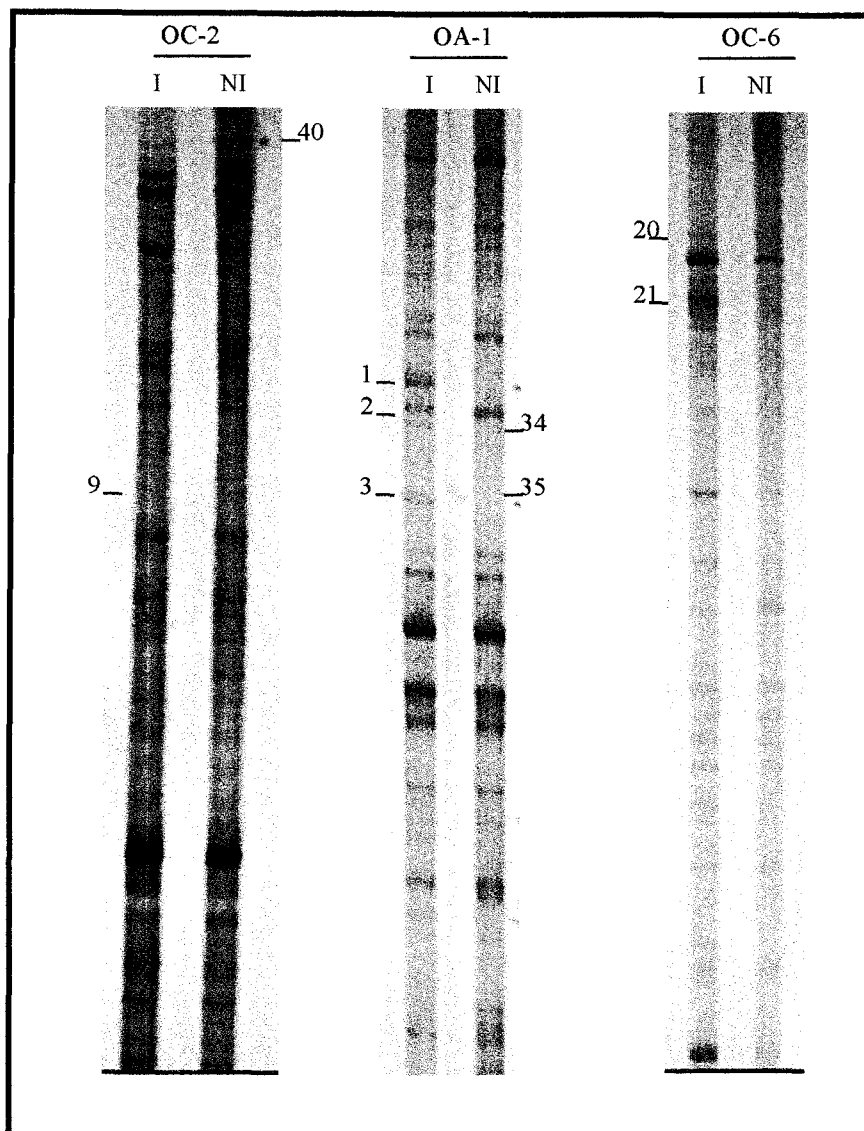


Figura 1: Autoradiografía de la electroforesis en geles de poliacrilamida de fragmentos de ADNc obtenidos por DDRT-PCR a partir de raíces de arroz no inoculadas (NI) y inoculadas (I) con *G.mosseae* usando las siguientes combinaciones de oligo d(T)₁₁MN y de RAPD :

OC-2: oligo d(T)₁₁GC / RAPD 2

OC-6: oligo d(T)₁₁GC/ RAPD 6

OA-1: oligo d(T)₁₁CA/ RAPD 1

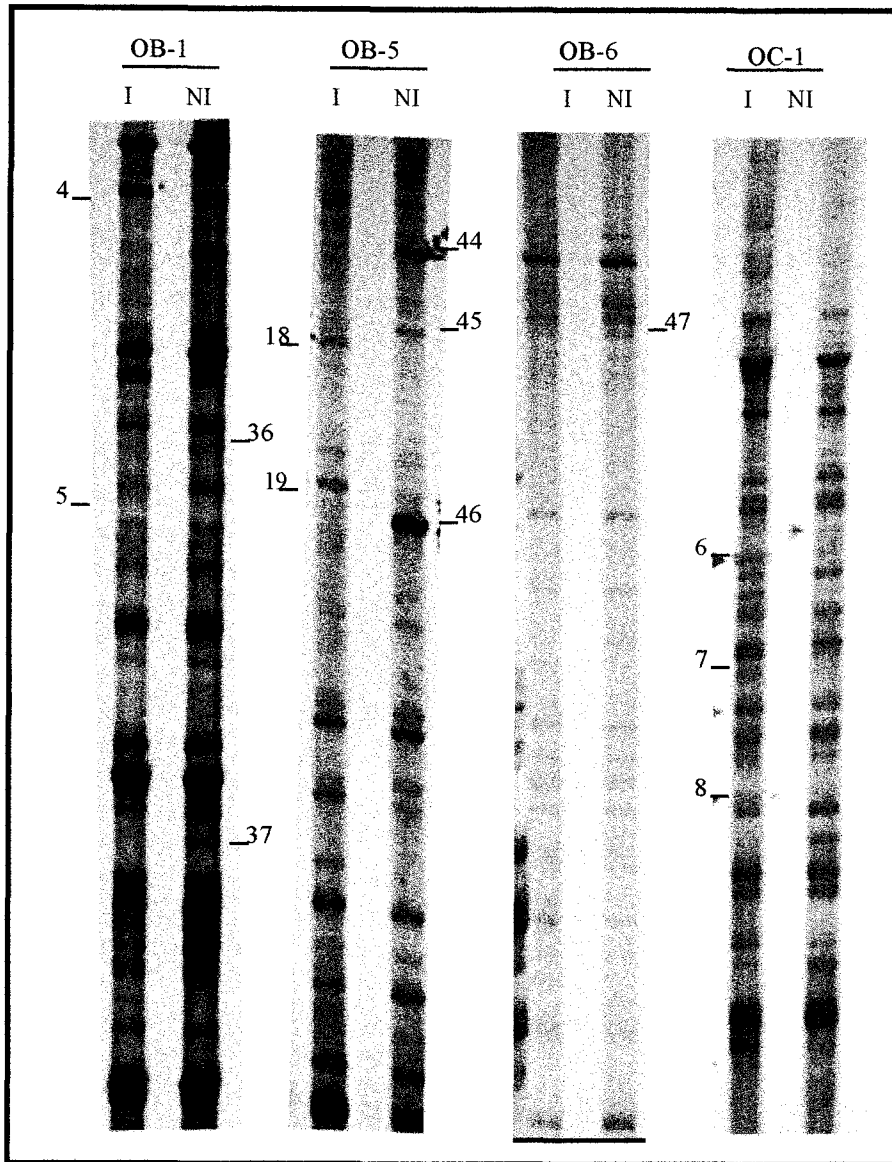


Figura 2. Autoradiografía de la electroforesis en geles de poliacrilamida de fragmentos de ADNc obtenidos por DDRT-PCR a partir de raíces de arroz no inoculadas (NI) y inoculadas (I) con *G. mossae* usando las siguientes combinaciones de oligo $d(T)_{11}MN$ y de RAPD :

OB-1: oligo $d(T)_{11}GA$ / RAPD 1.

OB-5: oligo $d(T)_{11}GA$ / RAPD 5.

OB-6: oligo $d(T)_{11}GA$ / RAPD 6.

OC-1: oligo $d(T)_{11}GC$ / RAPD 1.

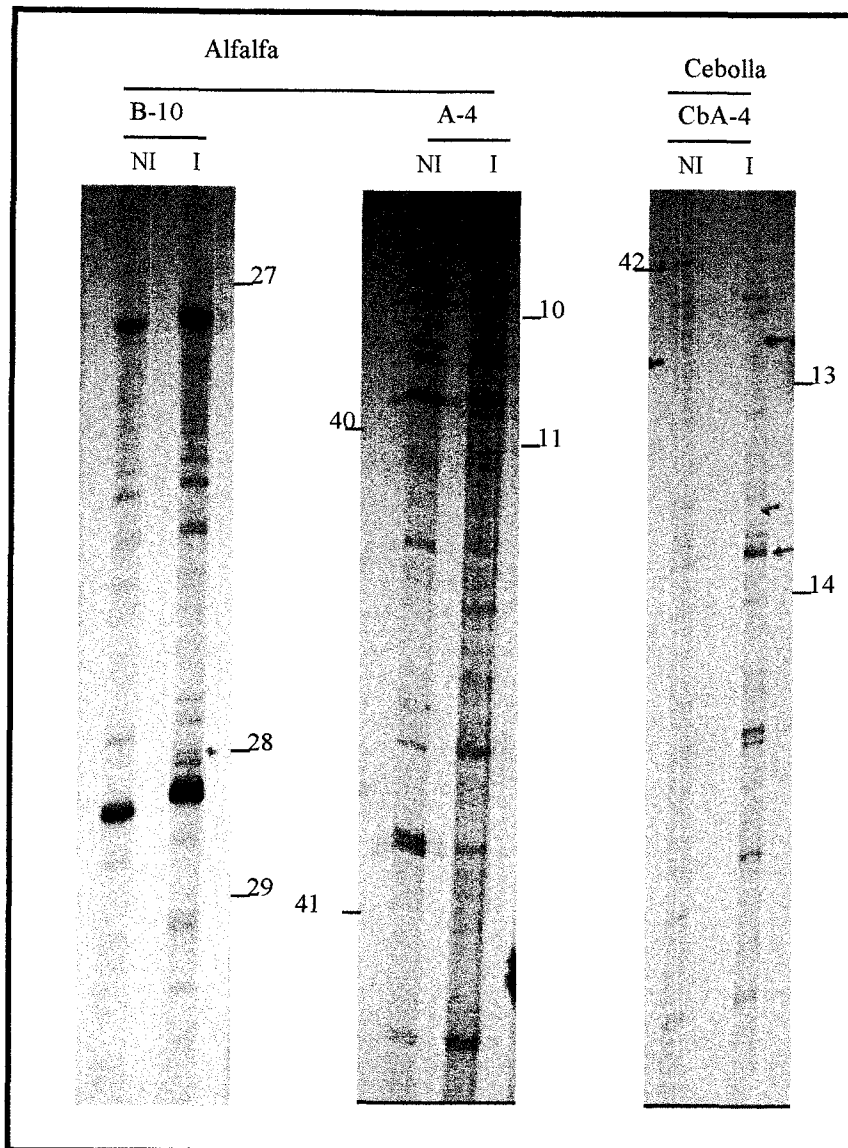


Figura 4. Aunoradiografía de la electroforesis en geles de poliacrilamida de fragmentos de ADNc obtenidos por DDRT-PCR a partir de raíces de alfalfa y de cebolla (Cb) no inoculadas (NI) y inoculadas (I) con *G.mosseae* usando las siguientes combinaciones de oligo d(T)₁₁MN y de RAPD:

A4: d(T)₁₁CA/ RAPD 4

B10: d(T)₁₁GA/ RAPD 10

Fragmento	Tamaño en pb	Oligonucleótidos	Origen
1 OA ₁ I ₁	350	dT ₁₁ CA	arroz
2 OA ₁ I ₂	300	RAPD1	Inoculado
3 OA ₁ I ₃	220		
4 OB ₁ I ₁	700	dT ₁₁ GA	arroz
5 OB ₁ I ₂	350	RAPD1	Inoculado
6 OC ₁ I ₁	400	dT ₁₁ GC	arroz
7 OC ₁ I ₂	350	RAPD1	inoculado
8 OC ₁ I ₃	230		
9 OC ₂ I ₁	290	dT ₁₁ GC RAPD2	arroz inoculado
10 A ₄ I ₁	396	dT ₁₁ CA	alfalfa
11 A ₄ I ₂	300	RAPD 4	inoculada
12 CbA ₄ I ₁	460	dT ₁₁ CA	cebolla
13 CbA ₄ I ₂	250	RAPD 4	inoculada
14 A ₅ I ₁	500	dT ₁₁ CA	alfalfa
15 A ₅ I ₂	350	RAPD 5	inoculada
16 A ₅ I ₃	300		
17 A ₅ I ₄	280		
18 OB ₅ I ₁	500	dT ₁₁ GA	arroz
19 OB ₅ I ₂	470	RAPD5	inoculado
20 OC ₆ I ₁	700	dT ₁₁ GC	arroz
21 OC ₆ I ₂	600	RAPD6	inoculado
22 B ₈ I ₁	350	dT ₁₁ GA	alfalfa
23 B ₈ I ₂	200	RAPD 8	inoculada
24 A ₁₀ I ₁	470	dT ₁₁ CA	alfalfa
25 A ₁₀ I ₂	300	RAPD 10	inoculada
26 A ₁₀ I ₃	250		
27 B ₁₀ I ₁	330	dT ₁₁ GA	alfalfa
28 B ₁₀ I ₂	240	RAPD 10	inoculada
29 B ₁₀ I ₃	200		
30 C ₁₀ I ₁	400	dT ₁₁ GC	alfalfa
31 C ₁₀ I ₂	300	RAPD 10	inoculada
32 C ₁₀ I ₃	250		
33 C ₁₀ I ₄	200		

Tabla 1. Características de los fragmentos diferenciales presentes en plantas micorrizadas obtenidos por DDRT-PCR

Los ADNcs obtenidos exclusivamente a partir de ARN de raíces de alfalfa fueron: B₈I₁, B₈I₂, A₁₀I₂, A₁₀I₃, C₁₀I₁, C₁₀I₂, C₁₀I₃, C₁₀I₄, A₅I₁, A₅I₂, A₅I₃, A₅I₄ (Tabla 1, Figura 3); B₁₀I₁, B₁₀I₂, B₁₀I₃, A₄I₂ (Tabla 1, Figura 4).

Por ultimo, dentro de este grupo y obtenidos a partir de ARN de raíces micorrizadas de cebolla obtuvimos los ADNcs: CbA₄I₁, CbA₄I₂ (Tabla 1, Figura 4).

b- Bandas de ADNc específicamente detectadas en las muestras obtenidas de ARN de raíces no inoculadas tales como las bandas : OA₁NI₁, OA₁NI₂, OC₂NI₁ (Tabla 2, Figura 1), OB₁NI₁, OB₁NI₂, OB₂NI₁, OB₅NI₁, OB₅NI₂, OB₅NI₃ y OB₆NI₁ (Tabla 2, Figura 2) detectadas en plantas de arroz no inoculadas y las bandas A₄NI₁, A₄NI₂ (Tabla 2, Figura 4), B₈NI₁, B₈NI₂, B₈NI₃ y B₈NI₄ (Tabla 2, Figura 3) presentes en plantas de alfalfa no micorrizadas.

c- Bandas que estaban tanto en muestras obtenidas de ARN de raíces de plantas micorrizadas o no micorrizadas aunque la intensidad de la misma varía en función del tratamiento de micorrización. Así los ADNcs A₁₀I₁ y A₄I₁ (Tabla 1, Figura 3 y 4) presentes en las muestras de plantas de alfalfa inoculadas o no inoculadas con el hongo arbuscular mostraban una intensidad más alta en las plantas micorrizadas que con el control. Contrariamente, la banda CbA₄NI₁ (Tabla 2, Figura 4) es más intensa en las muestras de ADNc obtenidas a partir de raíces de cebolla no micorrizadas que en raíces micorrizadas.

Las bandas diferenciales se eluyeron del gel de poliacrilamida y después de una nueva amplificación por PCR se visualizaron en un gel de agarosa (Figura 5). Estas bandas, una vez conocido sus tamaños (Tablas 1 y 2) se clonaron en el vector PGMT (PROMEGA) para una análisis posterior.

Hasta el momento tan solo el 10% de las bandas de ADNc diferenciales obtenidas han sido secuenciadas e utilizadas como sonda de ADN en estudios de expresión génica mediante "Northern blot".

El análisis mediante Northern blot de la acumulación de ARN mensajero (ARNm) utilizando sondas marcadas de las bandas B₈I₁, C₁₀I₁, A₅I₁ y OB₅I₁ a lo largo del periodo de desarrollo de la simbiosis mostró que no se ha podido detectar la señal radioactiva por el Northern debido a la acumulación del ARNm específico, sugiriendo este resultado la

Fragmento	Tamaño en pb	Oligos	Origen
34 OA ₁ NI ₁	250	dT ₁₁ GA	arroz no
35 OA ₁ NI ₂	240	RAPD1	Inoculado
36 OB ₁ NI ₁	450	dT ₁₁ GA	arroz no
37 OB ₁ NI ₂	300	RAPD1	inoculado
38 OB ₂ NI ₁	425	dT ₁₁ GA RAPD2	arroz no inoculado
39 OC ₂ NI ₁	900	dT ₁₁ GC RAPD2	arroz no inoculado
40 A ₄ NI ₁	240	dT ₁₁ CA	alfalfa no
41 A ₄ NI ₂	160	RAPD4	inoculada
42 CbA ₄ NI ₁	400	dT ₁₁ CA RAPD4	Cebolla no inoculada
43 A ₅ NI ₁	200	dT ₁₁ CA RAPD5	alfalfa no inoculada
44 OB ₅ NI ₁	540	dT ₁₁ GA	arroz no
45 OB ₅ NI ₂	500	RAPD5	inoculado
46 OB ₅ NI ₃	440		
47 OB ₆ NI ₁	550	dT ₁₁ GA RAPD6	arroz no inoculado
48 B ₈ NI ₁	250	dT ₁₁ GA	alfalfa no
49 B ₈ NI ₂	230	RAPD8	inoculada
50 B ₈ NI ₃	180		

Tabla 2. Características de los fragmentos diferenciales presentes en plantas no micorrizadas obtenidos por DDRT-PCR

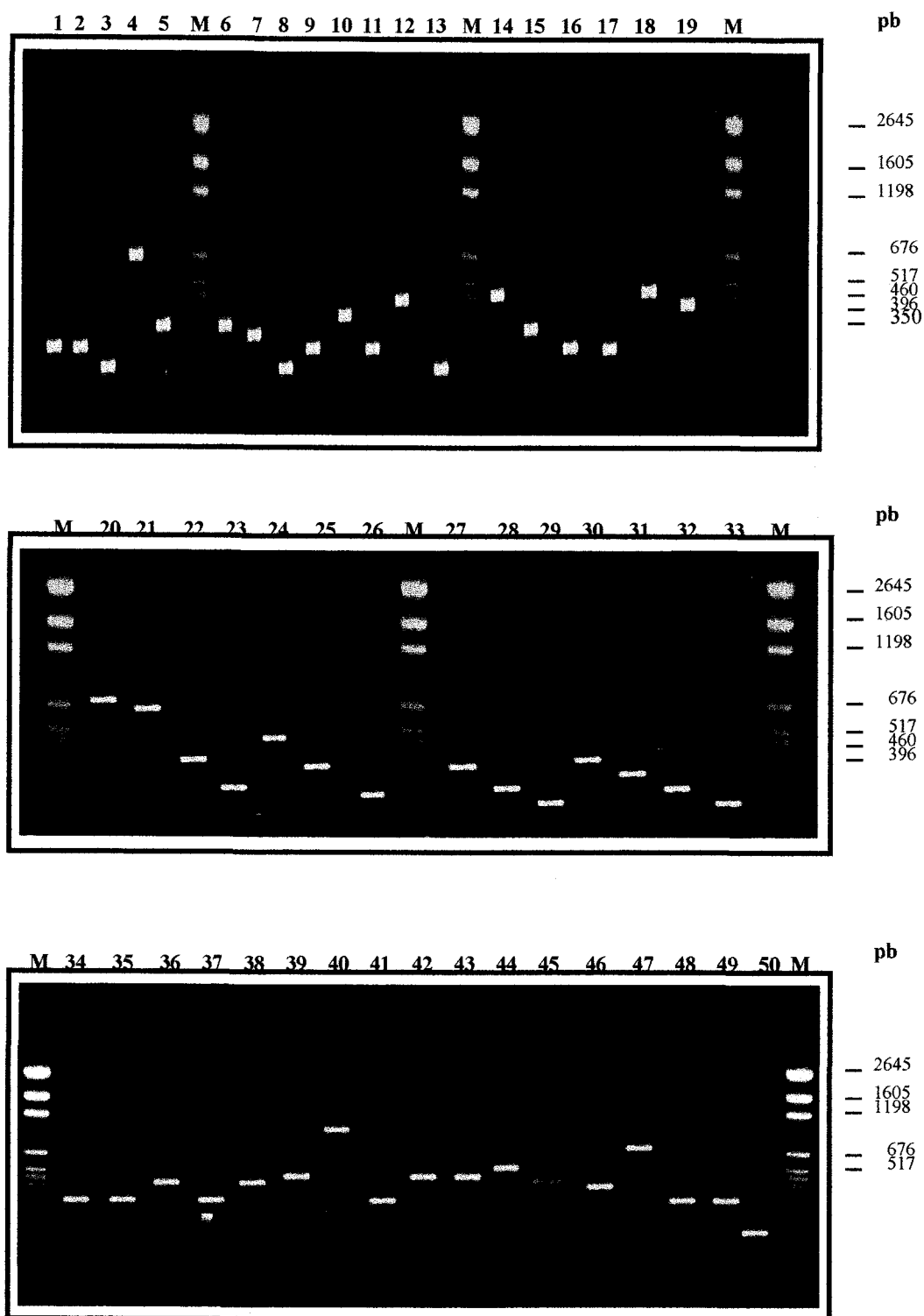


Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa de los fragmentos diferenciales obtenidos por DDRT-PCR eluidos del gel de poliacrilamida y amplificados por PCR. El origen y características de los fragmentos representados por numeros se muestran en las tablas 1 y 2. M: Marcador de peso molecular PGEM. pb: pares de bases

posibilidad de una expresión débil no detectable mediante esta técnica. Tan solo hemos podido detectar bandas de hibridación en la membrana que contenía ARN proveniente de raíces de arroz no inoculadas o inoculadas con *G. mosseae*, utilizando como sonda el fragmento marcado OB₅NI₁ (Figura 6). El análisis de la expresión muestra la presencia de dos bandas de hibridación, siendo en las muestras de ARN de raíces no inoculadas donde la intensidad de las bandas es mayor, lo que concuerda con la banda OB₅I₁ se identificó como específica de raíces NI. El análisis mediante Southern-blot utilizando ADN total extraído de plantas de arroz confirma el origen vegetal de ADNc OB₅ NI₁ (Figura 6).

Sin embargo el análisis de las secuencias de nucleótidos de los clones de ADNcs seleccionados, no proporcionó datos suficientes sobre la posible proteína codificada, ya que las secuencias obtenidas corresponden en su mayoría regiones 3' no codificante del ARNm o no poseen homología con ninguna secuencia conocida.

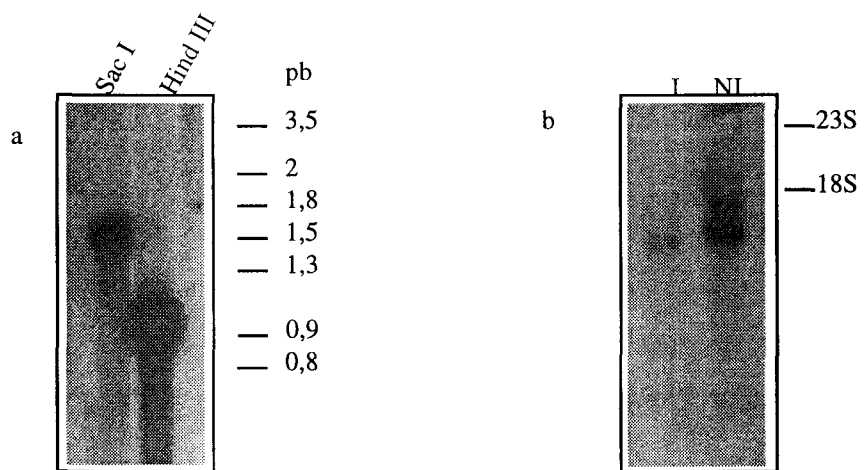


Figura 6: Hibridación del fragmento OB5NI1 con el de ADN obtenido de raíces de arroz y digerido con las enzimas Sac I y Hind III (a) y con el ARN de raíces de plantas no inoculadas(NI) y inoculadas (I) con *G. mosseae*.

Discusión

Discusión

La formación de la simbiosis micorriza arbuscular consiste en una invasión masiva del hongo de los tejidos de la raíz, sin embargo el hongo arbuscular nunca coloniza totalmente la raíz, y nunca invade el citoplasma de las células radicales, lo que indica claramente que la planta ejerce un cierto grado de control sobre su desarrollo en el interior de la raíz, restringiendo su propagación y la formación del arbusculo dentro del parénquima cortical. Muchos estudios mostraron que durante las primeras etapas de la colonización de la raíz de la planta por el hongo de la micorriza arbuscular se produce una respuesta de defensa débil, transitoria y muy localizada y que no alcanza los niveles encontrados en el caso de la interacción de la planta con un microorganismo patógeno (Gianinazzi-Pearson, y col. 1996; Kapulnik, y col. 1996). Sin embargo, hay pocos datos que pongan de manifiesto dicha respuesta.

Nuestros estudios se centraron principalmente en poner de manifiesto algunos de los mecanismos implicados en la respuesta defensiva que se produce cuando el hongo penetra la raíz, principalmente después de la formación del apresorio. Se ha descrito que después de la formación del apresorio el hongo pasa del estado saprofítico al estado infectivo y solo después de que se haya formado el apresorio se ha observado la respuesta defensiva (Giovannetti y col., 1994).

Varios son los mecanismos implicados en la respuesta defensiva de la plantas tales como el acúmulo de sustancias de refuerzo de su pared celular, la acumulación de fitoalexinas, la producción de las proteínas PR, y la activación de enzimas tales como las catalasas, peroxidasas, o las implicadas en la ruta del fenilpropanoico.

En el estudio de la respuesta de la planta a la colonización por el hongo arbuscular se analizó la expresión de ciertos genes y implicados en la respuesta defensiva. En un principio se estudio la expresión de las proteínas transportadoras de lípidos vegetales por el hecho de que estas proteínas además de tener un actividad antifúngica y antibacteriana

(García-Olmedo y col., 1995) están también implicadas en la formación de otras simbiosis, tales como la de *Rhizobium*-leguminosa (Krause y col., 1994).

Los resultados de nuestra investigación, en cuanto a la expresión de diferentes familias de genes *ltp* de arroz durante el proceso de desarrollo de la simbiosis micorriza arbuscular ponen de manifiesto claramente la alteración en el patrón de expresión de uno de los genes estudiados, el perteneciente a la familia denominada A14. Esta alteración supone el incremento en los niveles de expresión durante las primeras etapas de la interacción. Los resultados obtenidos de los cortes secuenciales en las primeras etapas del establecimiento de la micorriza arbuscular pusieron de manifiesto el hecho de que no es necesaria la colonización de la raíz para que se produzca la inducción. Esto concuerda con los resultados obtenidos por Krause y colaboradores (1994), respecto a la inducción de un gen de *ltp* en raíz de *Vigna unguiculata* durante las primeras etapas de la interacción con *Rhizobium* donde la inducción se detectó únicamente en los pelos radicales y antes de la formación del nódulo y del pseudonódulo.

Si consideramos que las LTPs participan en los procesos de secreción de sustancias lipídicas durante la creación de la membrana plasmática y formación ó modificación de la pared celular, y asociamos que estos procesos ocurren durante la fase de penetración del hongo arbuscular en la raíz hospedadora, sería lógico pensar en la inducción de este gen en estos estadios de infección. Sin embargo no podemos olvidar que los genes *ltp* han sido puestos de manifiesto en respuestas de tipo defensivo de la planta frente a microorganismos patógenos (Segura y col., 1993; García-Olmedo y col., 1995), y que algunos estudios efectuados por García-Garrido y colaboradores (resultados no publicados) mostraron que durante la infección de plantas de arroz con el patógeno *Pyricularia oryzae* se produce una inducción de los genes A14 y A15 tanto frente a razas virulentas como avirulentas del hongo patógeno, lo cual indica una respuesta inespecífica frente al patógeno.

El patrón de expresión del clon A14 muestra como tras la inducción inicial existe una disminución de los niveles de expresión. Este hecho supone que la inducción es puntual y no se mantiene, aunque se incremente el contacto de las hifas del hongo con la raíz hospedadora a través del tiempo, lo cual nos puede hacer pensar que existe un mecanismo de control de la expresión de dicho gen tras la inducción inicial. Este hecho se puede

conectar con resultados obtenidos otros autores respecto a la inducción transitoria de mecanismos de defensa en plantas colonizadas por hongos arbusculares (Golotte y col., 1995; Gianinazzi-Pearson, 1996). Evidentemente la inducción detectada en nuestros experimentos es de menor orden que la detectada en asociaciones planta patógeno (García-Garrido y colaboradores resultados no publicados).

Estudios preliminares efectuados en raíces de arroz transformadas con el promotor del gen *ltp* han mostrado la actividad β -glucuronidasa en las células corticales que están en contacto o muy cerca de las hifas del hongo arbuscular. La activación del promotor *ltp* durante el establecimiento de la micorriza arbuscular corrobora el hecho de que haya una activación de los genes *ltp* por la presencia del hongo arbuscular como respuesta defensiva localizada ya que dicha respuesta tan solo se observó en las células cercanas de las hifas del hongo arbuscular. Este estudio confirma los resultados obtenidos por la técnica de la RT-PCR y aunque es preliminar, abre una vía de investigación a nivel histoquímico acerca de la localización de las células vegetales que se ven afectadas por la inducción de la actividad *Ltp* durante el proceso de interacción y preinfiltración del hongo arbuscular.

La capacidad de inducción del gen A14 frente a situaciones de estrés biótico (*P. syringae*) o frente a inductores químicos (SA) es otra prueba de su participación en procesos de respuesta defensiva. En este sentido su inducción en estadios tempranos de la micorrización sería como consecuencia de la activación en la planta de un proceso de defensa. Asociado a este proceso se ha observado la inducción del gen que codifica para el enzima PAL. La inducción de esta enzima está normalmente relacionada con las interacciones planta patógeno (Bell y col., 1986). De hecho este gen se induce por la presencia del ácido salicílico y en las plantas infectadas por la bacteria *Ps syringae*. PAL es un enzima clave en el metabolismo del fenilpropanoico, ya que convierte la fenilalanina en ácido trans-cinnámico que después de una serie de reacciones da lugar a la síntesis del ácido salicílico.

Si un enzima clave en la síntesis del ácido salicílico se induce durante las primeras etapas de colonización por el hongo arbuscular, no es de extrañar el hecho que haya acumulación del SA en estas etapas de la colonización, como molécula señal implicada en la respuesta defensiva durante estos tiempos de colonización.

Los resultados muestran que se produce una acumulación de ácido salicílico. Esta acumulación se produce en raíces de plantas de tabaco, arroz y de guisante en las primeras etapas de la interacción con el hongo arbuscular. Esto nos indica que el hongo arbuscular puede inducir la acumulación de SA en raíces de las plantas. Sin embargo el pico de SA detectado es débil y transitorio y nunca alcanza ni los niveles ni la duración de los incrementos observados en la interacción planta-patógeno (Métroux y col., 1990; Yalpani y col., 1993). Esta inducción coincide con la formación del apresorio, un evento clave en la colonización micorriza arbuscular, indicando que el hongo arbuscular durante las primeras etapas de colonización induce una respuesta defensiva, mediada por SA, que queda bloqueada cuando la planta reconoce al hongo arbuscular como simbionte mutualista.

Se ha estudiado también la actividad catalasa y Ascorbato peroxidasa (APX) durante las primeras etapas de la colonización, encontrándose un incremento en la actividad de ambas enzimas, como parte de la respuesta defensiva débil y transitoria de la planta a la micorrización y que coincide con incrementos de actividad encontrados por otros autores (Spanu y col., 1988). Estas dos enzimas se inducen por el estrés oxidativo y convierten el peróxido de hidrogeno (H_2O_2) en agua.

Algunos estudios mostraron que el peróxido de hidrogeno incrementa la actividad enzimática de la enzima ácido benzoico-2-hidroxilasa (León y col., 1995), que es requerida para la biosíntesis del ácido salicílico. El hecho de que haya incremento del ácido salicílico en las primeras etapas de colonización y que además haya incremento en la actividad de las catalasas y APX indica que probablemente durante estas etapas de colonización hay producción de H_2O_2 , un producto que se acumula normalmente en las interacciones incompatibles entre planta y patógeno desencadenando así los mecanismos de defensa de la planta, hecho que de cierto modo podría ser muy parecido a lo que ocurre en las primeras etapas de colonización de la raíz de la planta con el hongo arbuscular *G. mosseae*.

La adición del SA exógeno a las plantas micorrizadas retrasa la colonización, sobre todo durante las primeras etapas. Además, hemos comprobado que el SA añadido induce la activación de las enzimas relacionadas con la respuesta defensiva. De hecho el gen A14 se induce en las plantas tratadas con SA después de 15 y 21 días de comienzo del experimento. Por tanto el SA añadido actúa como activador de la expresión de genes de

defensa, entre ellos el gen A14, y produce un efecto de retraso en la colonización de las plantas por el hongo arbuscular. Este hecho es similar a lo que ocurre en plantas de alfalfa colonizadas con *Rhizobium*, donde el SA inhibe la nodulación (Martinez-Abarca y col., 1998). Sin embargo, en el caso de la micorriza arbuscular, el efecto inhibitor del SA desaparece a medida que la colonización de la raíz por el hongo se desarrolla. El SA añadido parece dificultar la penetración del hongo en las etapas iniciales, activando los mecanismos de defensa de la planta, pero una vez el hongo ha conseguido penetrar la raíz hospedadora, los mecanismos activados no son efectivos frente a él. En este sentido, los trabajos de Vierheilig y col. (1995) muestran como la colonización por hongos arbusculares de plantas transgénicas que expresan de manera constitutiva proteínas PR no se ve afectada, y sí por hongos patógenos.

El SA no solo retrasa la colonización del hongo arbuscular sino que también inhibe la germinación de las esporas, esta inhibición parece ser independiente de la concentración del SA añadido al medio, y podemos pensar que bien la dosis mínima usada en nuestros experimentos es suficientemente grande como para llevar a cabo el efecto inhibitorio, o bien la inhibición es un efecto indirecto y por tanto no relacionado con la concentración de SA.

Los datos aportados por nuestras investigaciones apoyan la hipótesis de la existencia de un mecanismo de respuesta defensiva (mediado por SA) de la planta ante la interacción con el hongo arbuscular. Sin embargo este mecanismo de respuesta es rápidamente bloqueado, previo reconocimiento de los condicionantes de simbiote mutualista del hongo por parte de la planta. En este proceso de reconocimiento intervendrían productos fúngicos y productos de genes simbióticos vegetales.

En un intento de relacionar la acumulación del SA con la presencia del hongo arbuscular y con la implicación de los genes simbióticos en el bloqueo de este mecanismo de defensa, se plantearon los experimentos usando plantas de guisante P2 mutantes para el gen simbiótico *sym 30* y con genotipo *Myc⁻, Nod⁻* (Duc y col., 1989)

La inoculación de plantas P2 con *G. mosseae* produce una acumulación continua de SA en la raíz, que se mantiene con el tiempo de contacto con el hongo arbuscular, reflejando así una típica respuesta defensiva. La mutación en el gen simbiótico *sym 30* relacionada con la resistencia, también provoca la alteración de la respuesta defensiva de la

planta frente al hongo en cuanto a acumulación de SA. Por tanto este gen podría intervenir de forma directa en el bloqueo de esa respuesta defensiva mediada por SA. De igual manera, los experimentos de inoculación de *R. leguminosarum* en plantas P2 muestran la clara relación entre resistencia ocasionada por mutación en el gen *sym 30* y respuesta defensiva mediada por SA, lo cual confirma el resultado obtenido con *G. mosseeae* y demuestra la función común que este gen desempeña en el establecimiento de ambas simbiosis. De hecho la relación a nivel genético entre el proceso de micorrización y nodulación es un hecho demostrado (Duc y col., 1989; Bradbury y col., 1993) y algunos autores (Van Rhijn y col., 1997) sugirieron una conservación de señales en las dos simbiosis, sin olvidar mencionar que los factores Nod estimulan la colonización de las plantas por la micorriza (Xie y col., 1995). Nuestros resultados muestran además que existe una relación a nivel molecular, la acumulación de SA, entre resistencia a la colonización y mutación en genes simbióticos. De particular importancia es resaltar que esta alteración en la respuesta defensiva en plantas P2 en cuanto a acumulación de SA no tiene lugar frente a microorganismos patógenos, y que solo afecta a la interacción con microsimbiontes, lo que confirma el carácter simbiótico de la función del gen. De hecho cuando las plantas de guisantes se inocularon con la bacteria patógena *P. syringae*, no se observó diferencia en la acumulación de SA entre las plantas de guisante tipo salvaje y los mutantes P2. Además las raíces de esas plantas presentaban síntomas de necrosis indicando una reacción compatible con la bacteria patógena y por consiguiente la no activación de la respuesta defensiva. Esto confirma el hecho de que la mutación e plantas P2 no aumenta su resistencia a patógenos. Estudios realizados en plantas P2 inoculadas con el hongo patógeno *Aphanomyces eutiches*, mostraron que las plantas de guisantes tipo salvaje y mutante no muestran ningún tipo de diferencia en cuanto a la susceptibilidad al hongo patógeno (Gianinazzi-Pearson y col., 1994). Otros estudios comparativos mostraron que los niveles de pisatina (fitoalexina) y actividad PAL eran iguales en plantas con genotipo salvaje que en plantas P2 previo tratamiento de ambos tipos de plantas con un inductor físico de respuesta defensiva, la luz ultravioleta (Morandi y Paynot, 1996).

La inoculación de plantas de guisante con la bacteria *R. leguminosarum* Nod C⁻ también provoca una acumulación de SA en las raíces de las plantas tratadas. Este efecto,

sin embargo está asociado al genotipo de la bacteria, ya que es el mismo en plantas de guisante de genotipo salvaje o en mutantes P2. Este mismo resultado se obtuvo con plantas de alfalfa (Martinez-Abarca y col., 1998), donde se observó además un efecto inhibitor del SA sobre la nodulación y la acción del factor Nod. Nuestros resultados complementan los obtenidos por estos autores en el sentido de que hacen extensivo el mismo efecto a otra asociación *Rhizobium*-leguminosa y por tanto refuerzan la hipótesis de un mecanismo de defensa en plantas leguminosas asociado a la acumulación de SA y que queda bloqueado por la presencia del factor Nod.

Por tanto, bien por ausencia de factor Nod o por mutación en genes simbióticos, el mecanismo de defensa mediado por SA en la planta leguminosa se activa y como consecuencia de ello se produce la resistencia a la invasión por *Rhizobium*. Haciendo extensivo este modelo a la asociación micorriza arbuscular y dado que la acumulación de SA asociada con la mutación en los genes simbióticos es un hecho, también podríamos pensar en la existencia de un producto fúngico con una función similar a la del factor Nod, y cuyo reconocimiento por parte de la planta supone la represión del mecanismo de defensa activado inicialmente ante el primer contacto con el hongo. Este modelo supone la existencia de un mecanismo de defensa transitorio y medido en nuestros experimentos como acumulación transitoria de SA y expresión transitoria de genes *Ltp*, y *Pal* y actividades enzimáticas como catalasa y peroxidasa. La presencia de ese factor ya ha sido postulada por otros autores en estudios comparativos de expresión de nodulinas en raíces de plantas colonizadas por el hongo arbuscular (Van Rhijn y col., 1997), y nuestros resultados apoyan la misma idea, si bien desde el punto de vista de su participación como factor de reconocimiento crucial para la represión de la respuesta defensiva de la planta y por tanto necesario para la compatibilidad de la simbiosis.

Diversos estudios bioquímicos y citológicos han puesto de manifiesto que en asociaciones compatibles entre hongo y se producen alteraciones en la la planta (García-Romera y col., 1991; García-Garrido y col., 1992, Gollotte y col., 1995). Estos cambios son el resultado del diálogo planta-hongo y van encaminados a permitir el desarrollo y control del hongo en el interior de la raíz, y a la adaptación de la raíz a la situación simbiótica. En este proceso de compatibilidad y adaptación a la situación simbiótica se

debe poner de manifiesto una expresión específica importante de genes tanto de la planta como del hongo.

Uno de los mayores inconvenientes en el estudio de expresión diferencial de genes en la simbiosis micorriza arbuscular es encontrar la metodología adecuada que permita identificar la respuesta localizada de la planta a nivel celular que se produce como consecuencia de la colonización fúngica. La respuesta de la planta es difícil de detectar mediante la técnica del Northern, donde la señal que buscamos queda muy diluida dentro del total de las moléculas extraídas de la raíz. Esto constituye también un factor limitante en el análisis de la expresión de los genes del hongo dentro de la raíz debido a la baja proporción del ARN fúngico en la raíz, teniendo en cuenta además que el ARN mensajero constituye solo un 3-5% de la población total del ARN extraído. Por ello se requiere de la utilización de una metodología de análisis diferencial que nos asegure la posibilidad de poner de manifiesto dichas señales tan diluidas.

La utilización de la metodología descrita por Liang y Pardee (1992) para el análisis diferencial de ARNm constituye una herramienta ideal en nuestro sistema de experimentación, debido a su sensibilidad, reproducibilidad y rapidez en comparación con otras metodologías tales como la construcción de bibliotecas de ADNc de sustracción ó el análisis por hibridación diferencial de bibliotecas de ADNc.

Nuestros resultados de análisis diferencial de la expresión génica mediante la técnica de DDRT-PCR muestran claramente que hay una expresión génica diferencial entre raíces colonizadas por el endofito arbuscular y las raíces no micorrizadas, aunque esta diferencia no se detecta por técnicas convencionales como la del Northern blot. Sin embargo esta técnica tiene el inconveniente de generar fragmentos de ADNc que al estar cerca de la cola poli A del ARNm, pertenecen a la región no codificante del ARNm y por lo tanto no informativa sobre la proteína codificada y por tanto la posible función que desempeñan. Además, la mayoría de los fragmentos aislados no dan diferencia a nivel de expresión por Northern blot, lo cual quiere decir que o bien son falsos positivos o que se expresan muy poco, sobre todo en los estadios avanzados de la micorrización, de tal manera que la diferencia de expresión no se puede detectar por la técnica del Northern blot. En nuestros

experimentos tan solo uno de los ADNc obtenidos pudo ser usado con éxito en experimentos de Northern, aunque el análisis de la secuencia no reveló datos significativos.

En estos experimentos se usó una selección muy limitada de primers. Cada cebador d(T)₁₁MN tan solo reconoce 1/12 del total de la población de ARNm, ya que hay doce combinaciones por cada primer, y cada primer solo permite la iniciación de la transcripción inversa de una subpoblación.

Este método solo permite detectar las diferencias que podrían existir entre una planta donde ya se ha establecido la simbiosis y otra no micorrizada, pero en general no permite identificar fácilmente las proteínas diferenciales ni conocer el papel que podrían tener en la simbiosis. De la misma manera esta técnica tampoco permite identificar los genes que codifican esta proteína. Se podría decir que la técnica DDRT-PCR es útil desde el punto de vista cualitativo ya que no permite una estimación cuantitativa de los ARNms específicos. Sin embargo, la técnica de hibridación de los de plantas micorrizadas y no micorrizadas permitiría identificar los genes diferenciales, pero esta técnica tiene el inconveniente de que se necesita grandes cantidades de ADNc para llevarla a cabo con cierta posibilidad de éxito.

Algunos autores han usado esta técnica para analizar diferencialmente la acumulación del ARN en plantas de guisante en las primeras etapas de colonización por el hongo arbuscular *G. mosseae*. De los 118 fragmentos diferencialmente detectados, solo 7 eran realmente diferenciales y de estos solo encontraron un gen *Psam 1* que codifica para una proteína transmembranaria (Martin-Laurent y col., 1997). Este gen se induce en las etapas iniciales de la colonización arbuscular de la raíz, el análisis mediante Northern mostró la acumulación de los ARNm específicos de este gen en plantas de guisante de carácter salvaje y en plantas mutantes resistentes a la nodulación (myc+, nod-), lo que indica que este gen esta específicamente asociado a la formación de la micorriza

Progresos significativos se realizaron en los últimos años en el análisis de las interacciones simbióticas de la micorriza arbuscular. Los mutantes myc- han puesto de manifiesto la existencia de genes simbióticos específicos. La compleja relación celular ente la raíz y el hongo arbuscular esta basada sobre un intercambio continuo de señales que afecta

la regulación de genes cuyos productos participan en los cambios metabólicos y estructurales que lleva a cabo la formación de la simbiosis (Gianinazzi y col., 1995)

Conclusiones

Conclusiones.

1.- Durante las etapas iniciales de la formación de la Micorriza-Arbúscular se activa una respuesta defensiva en la planta que viene reflejada por la inducción transitoria de la expresión del gen que codifica para una proteína transportadora de lípidos, de un gen que codifica para una fenil-alanina-amonoliase y de las actividades catalasa y peroxidasa.

2.- El incremento transitorio en los niveles de ácido Salicílico, en forma libre, en las raíces de tabaco y arroz inoculadas con *G. mosseae* forma parte de la activación transitoria de la respuesta defensiva en la planta durante las etapas iniciales de formación de la Micorriza-Arbuscular .

3.- La inducción y mantenimiento de la respuesta defensiva en la planta mediante la aplicación exógena de ácido Salicílico provoca un retraso en el proceso de formación de la Micorriza-Arbuscular.

4.- Existe una relación directa entre resistencia a la micorrización provocada por la mutación en el gen simbiótico *sym 30* en plantas de guisante y acumulación de ácido Salicílico en la raíz de las plantas inoculadas con el hongo arbuscular *G. mosseae*. Dicha relación se mantiene en la interacción de las plantas mutantes con *Rhizobium*, y no en la interacción con *P. syringae*, lo cual confirma a nivel molecular la participación de genes simbióticos en el control de la respuesta defensiva de la planta frente a microorganismos simbióticos mutualistas.

5.- Se confirma y se hace extensiva la participación del factor Nod en la inhibición de la respuesta defensiva mediada por la acumulación de ácido Salicílico en plantas leguminosas.

6.- El uso de la metodología del DDRT-PCR permite la detección de la expresión génica diferencial de la planta durante el proceso de formación de la Micorriza-Arbuscular, aunque necesita del análisis de gran cantidad de especies de ADNc y de la utilización de metodologías complementarias.

Bibliografía

Bibliografía

- Aebi, H.** 1984. Catalase *in vitro*. Methods Enzymol. 105: 121-126.
- Al-Karaki, G.N., Al-Raddad, A.** 1997. Effects of arbuscular mycorrhizal fungi and drought stress on growth and nutrient uptake of two wheat genotypes differing in drought resistance. Mycorrhiza. 7: 83-88.
- Allen, M.F., Moore, T.S.Jr., Christensen. M.** 1980. Phytohormone changes in *Bouteloua gracilis* infected by vesicular-arbuscular mycorrhizae. I. Cytokinin increases in the host plant. Can. J. Bot. 58: 371-374.
- Allen, M.F, Moore, T.S. Jr., Christensen. M.** 1982. Phytohormone changes in *Bouteloua gracilis* infected by vesicular -arbuscular mycorrhizae. II. Altered levels of gibberilin-like substances and abscisic in the host plant. Can.J.Bot.60: 468-471.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J.** 1990. Basic local alignment search tool. J. Mol. Biol. 215: 403-410
- Alwine, J.C., Kemp, D.J., Stark, G.R.** 1977. Method of detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymetil-paper and hybridization with DNA probes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 74: 5350-5354
- Arines,J., Palma, J.M., Vilariño, A.** 1993. Comparison of protein patterns in non-mycorrhizal and vesicular-arbuscular roots of red clover. New Phytol. 123: 763-768
- Azcón-Aguilar, C., Garcia-Garcia, F., Barea, J.M.** 1991. Germinación y crecimiento axénico de los hongos formadores de micorrizas vesiculo-arbusculares. En: Fijación y movilización biológica de nutrientes vol II. Pp. 129-147. Nuevas tendencias. Eds. J. López Gorgé, J. Olivares, y J M Barea
- Azcón-Aguilar, C., Barea, JM.** 1996. Arbuscular mycorrhizas and biological control of soil-born plant pathogens- an overview of the mechanisms involved.

- Mycorrhiza. 6: 475-464.
- Azcón, R., El-Atrach, F., Barea, J.M.** 1988. Influence of mycorrhiza vs. Soluble phosphate on growth, nodulation and N₂ fixation from two ¹⁵N-labelled sources by *Glomus mosseae*, a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus. *New Phytol.* 97: 381-396.
- Balestrini, R., Romera, C., Pulgdomenech, P., Bonfate, P.** 1994. Location of a cell wall hydroxyproline-rich glycoprotein, cellulose and β-1,3 glucans in apical and differentiated regions of maize mycorrhizal roots. *Planta.* 195: 201-213.
- Baltruschat, H., Schönbeck, F.** 1975.. The influence of endotrophic mycorrhiza on the infestation of tobacco by *Thielaviopsis basicola*. *Phytopatol. Z.* 84: 172-188.
- Bansal, M., Mukerji, K.G.** 1994. Positive correlation between VAM-induced changes in root exudation and mycorrhizosphere mycoflora. *Mycorrhiza.*5: 39-44
- Barea, J.M.** 1986. Importance of hormones and roots exudates in mycorrhizal phenomena. *Mycorrhiza: Physiology and Genetics.* Eds. Gianinazzi-Pearson, V., Gianinazzi, S. INRA, Paris, pp.177-187.
- Barea, J.M., El-Atrach, F., Azcon, R.** 1989. Mycorrhiza and phosphate interactions as affecting plant development, N₂ fixation, N-transfer and N uptake from soil in legume-grass mixtures by using a ¹⁵N dilution technique. *Soil Biol. Biochem.*21: 581-589
- Barea, J.M.** 1990. Vesicular-arbuscular mycorrhizae as modifiers of soil fertility. *Soil Science.* 15: 1-40
- Barea, J.M.** 1990. Micorrizas vesículo-arbusculares. *Microbiología.* 271-278.
- Barea, J.M., Azcón Aguilar, C., Ocampo, J.A. Azcón, R.** 1991. Morfología, anatomía y citología de las micorrizas vesículo-arbusculares. En: Fijación y Movilización Biológica de Nutrientes. Vol. II Eds. Barea, J.M., Olivares, J., Gorgé, J. CSIC, Madrid, pp. 149-173.
- Barea, J.M., Azcón, R., Azcón- Aguilar, C.** 1992. Vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in nitrogen-fixing systems. In: Norris JR, Read AJ, Varma, AK(de) *Methods in Microbiology.* Academic Press, London. 24: 391-461
- Barea, J.M., Jeffries, P.** 1995. Arbuscular mycorrhizas in sustainable soil plant

- Systems Mycorrhiza Structure and Function, Molecular Biology and Biotechnology, B. Hock and A.Varma, eds., pp.121-137
- Bartincki-García., S.** 1987. The cell wall: a crucial structure in fungal evolution . In : Rayner ADN, Brasio CM, Moore D, eds. Evolutionary Biology of the Fungi. Cambridge University Press. 89-403
- Bécard, G., Fortin, J.A.** 1988. Early events of vesicular-arbuscular mycorrhizal formation on Ri-T-DNA transformed roots. *New Phytol.* 108: 211-218.
- Bécard, G., Douds, D.D., Pfeffer, P.E.** 1992. Extensive hyphae growth of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in the presence of CO₂ and flavonols. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 821-825.
- Bécard, G., Loverine, Taylor, L.P., Douds, D.D., Pfeffer, P.E., Doner, L.W.** 1995. Flavonoids are not necessary plant signal compounds in arbuscular mycorrhizal. *Symbiosis Mol. Plant Microbe. Interact.* 8: 252-258.
- Bell , J.N., Ryder, T.B., Wingate, V.P.M., Bailey, J.A., Lamb, C.J.** 1986. Diferential accumulation of plant defense gene transcripts in compatible and incompatible plant-pathogen interaction. *Mol. Cell. Biol.* 6, 1615-1623.
- Benhamou, N., Joosten,, M.H.A.J., De Wit, P. J.G..M.** 1990. Subcellular localisation of chitinase and of its potential substrate in tomato root tissues infected by *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici*. *Plant Physiol.* 92: 1108-1120.
- Benito, P., E.P., Prins, T., van Kan, J.A.L.** 1996. Application of differential display RT-PCR to the analysis of gene expression in a plant-fungus interaction. *Plant. Mol. Biol.* 32: 947-957.
- Bernhard, W.R., Thomas, S., Botella, J., Somerville, C.R.** 1991. Isolation of a cDNA clone for spinach lipidtransfer protein and evidence that this protein i s synthesized by the secretory pathway. *Plant. Physiol.* 95: 164-170.
- Bethlenfalvay, G.J., Linderman, R.G.** 1992. Mycorrhizae in sustainble Agriculture. American Society of Agronomy Special publication No. 54.(Madison, WI: American Society of agronomiy).
- Beyrle, H.** 1995. The role of phytohormones on the function and biology of

- mycorrhizas. Mycorrhiza: Structure, Function, Molecular Biology and Biotechnology. Efs. Varma, A. y Hock, B. Springer-Verlag, Berlin, pp.365-391
- Bi, Y.M., Kenton, P., Darby, R., Draper, J.** 1995. Hydrogen peroxid does not function downstream of salicylic acid in the induction of PR protein expression. *Plant J.* 8, 235-245.
- Biermann, B., Linderman, R.G.** 1983. Use of the vesicular arbuscular mycorrhizal roots, intraradical vesicles and extraradical vesicles as inoculum. *New Phytol.* 95: 97-105.
- Blee, K.A., Andeson, A.J.** 1996. Defense-related transcript accumulation in *Phaseolus vulgaris* L. colonized by the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* Schencke & Smith. *Plant Physiol.* 110. 675-688.
- Bolwell, G.P., Butt, V.S., Davies, D.R., Zimmerlin, A.** 1995. The origin of oxidative burst in plants *Free rad. Res. Comm.* 23: 517-532
- Bonfate, P.** 1994. Ultrastructural analysis reveals the complex interactions between root cells and arbuscular mycorrhizal fungi. In : Gianinazzi S, Schüepp H, eds. *Impact of Arbuscular Mycorrhizas on Sustainable Agriculture and Natural Ecosystems.* Basel : Birkhauser Verlag, 73-87.
- Bonfate-Fasolo, P., Tamagone, L., Peretto, R., Esquerré-Tugayé, M.T., Mazau, D., Mosiniak, M., Vian, M.** 1991. Immunocytochemical location of hydroxyproline rich glycoproteins at the interface between a mycorrhizal fungus and its host plants. *Protoplasma.* 165: 127-138.
- Bonfate P., Perotto, S.** 1995. Strategies of arbuscular mycorrhizal fungi when infecting host plants. *New Phytol.* 130: 3-21
- Bradley, D.J., Kjellbom, P., Lamb, C.J.** 1992. Elicitor and wound induced oxidative cross linking of a proline-rich plant cell wall protein: A novel, rapid defense response. *Cell.* 70: 21-30.
- Breu, V., Guerbette, F., Kader, J.C., Kanangara, C.G., Svensson, B., Von Wettstein-Knowles.** 1989. A 10-kD barley basic protein transfers phosphatidylcholine from liposome to mitochondria. *Carlsberg Res. Commun.* 54: 81-84.
- Burggraaf, A.J.P., Beringer, J.E.** 1989. Absence of DNA synthesis in vesicular-

- arbuscular mycorrhizal fungi during in vitro development. *New Phytol.* 111: 25-33.
- Burleigh, S.H., Harrison, M.J.** 1997. A novel gene whose expression in *Medicago truncatula* roots is suppressed in response to colonisation by vesicular-arbuscular mycorrhizal (VAM) fungi and to phosphate nutrition. *Plant. Mol. Biol.* 34: 199-208
- Caron, M., Fortin, J.A., Richard, C.** 1986a. Effect of *Glomus intraradices* on infection by *Fusarium oxysporum* f.sp. *redicis-lycopersici* in tomatoes over 12-week period. *Can. J. Bot.* 64: 552-556.
- Caron, M., Richard, C., Fortin, J.A.** 1986b. Effect of preinfestation of the soil by a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus, *Glomus intraradices*, on *Fusarium* crown and root rot of tomato. *Phytoprotection.* 67: 15-19.
- Caron, M.** 1989. Potentiel use of mycorrhizae in control of soil-borne diseases. *Can.J.Plant.pathol.* 11:177-179
- Chabot, S., Bel-Rhild, R., Chêvert, R., Pichet, Y.** 1992. Hyphae growth promotion *in vitro* of the VA mycorrhizal fungus, *Gigaspora margarita* Becker et Hall, by the activity of structurally specific flavonoid compounds under CO₂-enriched conditions. *New Phytol.* 122: 461-467.
- Citernesi, A.S., Fortuna, P., Filippi, C., bagnoli, G., Giovannetti, M.,** 1996. The occurrence of antagonistic bacteria in *Glomus mosseae* pot cultures. *Agronomie.* 16:671-677
- Codignola, A., Verotta, L., Maffel, M., Spanu, P., Scannerini, S., Bonfate-Fasolo, P.,** 1989. Cell wall bound phenols in roots of vesicular-arbuscular mycorrhizal plants. *New Phytol.* 112:221-22
- Collinge, D.B., Gregersen, P.L., Thordal-Christensen, H.** 1994. The induction of genes expression in response to pathogenic microbes. In *Mechanisms of Plant Growth and improved Productivity: Modern Approaches and Perspectives*, A.S. Basra, ed (New York: Marcel Dekker), pp. 391-433
- Cooper, J.B., Varner, J.E.** 1984. Cross-linking of soluble extensin in isolated cell wall. *Plant Physiol.* 57: 414-417.

- Cordier, C., Gianinazzi, S., Gianinazzi-Pearson, V.** 1996. An immunological approach for study of spatial relationships between mycorrhizal fungi in planta. Dans "Mycorrhizas in Integrated Systems from genes to Plant Development", C, Azcon-Aguilar, J.M.Barea eds, pp 25-34
- Cordier, C.** 1997. Bases Cellulaires et moléculaires du contrôle biologique de *Phytophthora* sp., au niveau des racines, par le champignon endomycorrhizogènes *Glomus mosseae*. Thèse de doctorat de l'universite de Bourgogne
- Daniels, B.A.** 1984. Ecology of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. En: VA Mycorrhiza. Powell C LI. Bagraaj DJ eds. CRC Press Boca Raton Florida pp. 55-46.
- Davis, R., Menge, J.A., Zentmyer, G.A.** 1978: Influence of vesicular-arbuscular mycorrhizae on *Phytophthora* root rot of three crop plants. *Phytopathol.* 68: 1614-1617
- Danneberg, G., Latus, C., Zimmer, W., Hundeshagen, B., Schneider-Poestch, H.H., Bothe, J.** 1992. Influence of vesicular arbuscular mycorrhiza on phytohormone balances in maize (*Zea mays* L.). *J. Plant Physiol.* 141: 33-39.
- Dehne, H.W., Schönbeck, F.** 1978. Untersuchungen zum einfluss der endrophen mycorrhiza auf planzenkrankheiten.3. Chitinase-aktivat und ornithinzyklus. *Planzenkr.Pflanzenschutz.* 85: 666-678
- Dehne, W.H., Schönbeck, F.** 1979. The influence of endotrophic mycorrhiza on plant diseases.II.Phenol metabolism and lignification. *Phytopath.Z.* 95: 210-216
- Dehne, H.W.** 1982. Interaction between vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi and plant pathogens. *Phytopathology.* 72: 1115-1118
- Delaney, T.P., Uknes, S., Vernooij, B., Friedrich, L., Weymann, K., Negrotto, D., Gaffney, T., Gut-Rella, M., Kessmann, H., Ward, E., Ryals, J.** 1994. A central role of salicylic acid in plant disease resistance. *Science.* 266: 1247-1250.
- Dexheimer, J., Gianinazzi, S., Gianinazzi-Pearson, V.** 1979. Ultrastructure cytochemistry of the host-fungus interfaces in the endomycorrhizal association *Glomus mosseae/Allium cepa*. *Z.Pflanzenphysiol.* 92:191-206.
- Dixon, R.K., Garret, H.E., Cox, G.S.** 1988. Cytokinins in the root pressure exudate of

- Citrus jambhiri* Lush colonized by vesicular-arbuscular mycorrhizae. Tree Physiol.4: 9-18
- Dixon, R.A., Harrison, M.J.** 1990. Activation, structure and organization of genes involved in microbial defence in plants. Adv. Genet. 28: 165-234
- Dixon, R.A., Harrison, M., Lamb. C.J.** 1994. Early events in the activation of plant defense responses. Annu.Rev.Phytopathol. 32: 497-501.
- Dixon, R.A., Paiva, N.L.** 1995. Stress induced phenylpropanoid metabolism. Plant Cell. 7: 1085-1097.
- Douds, D.D., Galvez, L., Bécard, G., kapulnik, Y.** 1998. Regulation of arbuscular mycorrhizal development by plant host and fungus species in alfalfa. New Phytol. 138: 27-35.
- Duc, G., Trouvelot, A., Gianinazzi-Pearson, V., Gianinazzi, S.** 1989. First report of non-mycorrhizal plant mutants (Myc-) obtained in pea (*Pisium sativum* L.) and fababean (*Vicia faba* L.). Plant Sci. 60: 215-222.
- Dumas, E., Gianinazzi-Pearson, V., Gianinazzi, S.** 1989. Production of new soluble proteins during VA endomycorrhizae formation. Agriculture, Ecosystems and Environment 29: 111-114.
- Dumas, E., Tahiri-Alaoui, A., Gianinazzi, S., Gianinazzi-Pearson, V.** 1990. Observations on modifications in gene expression with VA en gene expression with VA endomycorrhiza development in tobacco qualitative and quantitative changes in protein profiles. Endocytobiology IV. Eds. P. Nardon, V.Gianinazzi-Pearson, A.H. Granier, L. Margulis and D.C. Smith. INRA, Lyon. France, pp.153-157.
- Dumas-Gaudot, E., Furlan, V., Grenier, J., Asselin, A.** 1992a. new acidic chitinase isoforminduced in tobacco roots by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. Mycorrhiza.1: 133-136.
- Dumas-Gaudot, E., Grenier, J., Furlan, V., Asselin, A.** 1992b. Chitinase, chitosanase and β 1-3 glucanase in *Allium* and *Pisium* roots colonized by *Glomus* species. Plant Sci. 84, 17-24.
- Fortin, J.A.** 1990. New vistas on mycorrhiza research. In 8th NACOM Innovation and hierarchical integration. Jackson, Wyoming.

- Foster , G.D., Robinson, S.W., Blundell, R.P., Roberts, M.R., Hodge, R., Draper, J., Scott, R.J.** 1992. A *Brassica napus* mRNA encoding a protein homologous to phospholipid transfer proteins, is expressed specifically in the tapetum and developing microspores. *Plant Sci.* 84: 187-192.
- Franken, P., Gnädinger, F.** 1994. Analisis of parsley arbuscular endomycorrhiza: infection development and mRNA levels of defense related genes. *MPMI.* 7: 612-620.
- Friedrich, L., Vernooij, B., Gaffney, T., Morse, A., Ryals, J.** 1995. Characterization of tobacco plants expressing a bacterial salicylate hydroxylase gene. *Plant Mol Biol.* 29: 959-968.
- Frühling, M., Rossel, H., Gianinazzi-Pearson, V., Pühler, A., Perlick, A.M.** 1997. The *Vicia faba* Leghmoglobin Gene VfLb29 Is Induced in Root Nodules and in Roots Colonized by the Arbuscular mycorrhizal Fungus *Glomus fasciculatum*. *MPMI.* 10: 124-131
- Fujishige, N., Kapulnik, Y., Hirsh, A.M.** 1997. Expression of early nodulin genes in alfalfa mycorrhizae indicates that signal transduction pathways used iforming arbuscular mycorrhizae and Rhizobium-induced nodules may be conserved. *Proc.Natl. Acad. Sci.USA.* 94: 5467-5472
- Gaffney, T., Friedrich, L., Vernooij, B., Negrotto, D., Nye, G., Uknes, S., Ward, E., Kessman, H., Ryals, J.** 1993 Requirement of salicylic acid for the induction of systemic acquired resistance. *Science.*261: 754-756.
- García-Garrido, J.M., Ocampo, J.A.** 1988. Interaction between *Glomus mosseae* and *Erwinia carotovora* and its effects on the growth of tomato plants. *New Phytol.* 110: 551-555.
- García-Garrido, J.M., Ocampo, J.A.** 1989. Effect of VA mycorrhizal infection of tomato on damage caused by *Pseudomonas syringae*. *Soil Biol.Biochem.* 21: 165-167.
- Garica-Garrido, J.M., García-Romera, I., Ocampo, J.A.** 1992. Cellulase production by the vesicular arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* (Nicol. y Gerd.) Gerd. y Trappe. *New Phytol.* 121:221-226.

- García-Garrido, J.M., Toro, N., Ocampo, J.A.** 1993. Presence of specific polypeptides in onions roots colonized by *Glomus mosseae*. *Mycorrhiza*. 2: 175-177.
- García olmedo, F., Molina, A., Segura, A., Moreno, M.,** 1995. The defensive role of nonspecific lipid-transfer proteins in plants. *Trends Micobiol.* 3: 72-74.
- García-Romera, I., Ocampo, J.A.** 1988. Effect of the herbicide MCPA on VA mychizal infection and growth of *Pisium sativum*. *Z Pflanzenernähr Bondenk.* 151: 225-228.
- García-Romera, I., Garcia-Garrido, J.M., Marinez-Molina, E., Ocampo, J.A.** 1990. Possible influence of hydrolitic enzymes on vesicular-arbuscular mycorrhizal infection of alfalfa. *Soil Biol. Biochem.* 22: 149-152.
- García-Romera, I., García- Garrido, J.M., Ocampo, J.A.** 1991. Pectolytic enzymes in the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *FEMS Microbiol.let.* 78:343-346.
- Garriock, T.L., Peterson, R.L., Ackerley, C.A.** 1989. Early stages in colonization of *Allium porrum* (leek) roots by the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus, *Glomus versiforme*. *New Phytol.* 112: 85-92
- Gianinazzi, S., Gianinazzi-Pearson, V.** 1992. Cytology, histochemistry and immunocytochemistry as tools for studying structure and function in endomycorhiza. *Methods in Mycrobiology.* 14: 109-139.
- Gianinazzi, S., Gianinazzi-Pearson, V., Franken, P., Dumas-Gaudot, E., van Tuinen, D., Samra, A., Martin-Laurent, F., Dassi, B.** 1995. Molecules and genes involved in mycorrhiza functioning. In *Biotechnology of Ectomycorrhizae*, V. Scocchi, P. Bonfante, and M. Nuti, eds (London: Plenum Press), pp. 67-76.
- Gianinazzi-Pearson, V., Gianinazzi, S.** 1989. Phosphorous metabolism in mycorrhizae. En: *Nitrogen, Phosphorous and Sulphur utilisation by Fungi*. Eds, Boddy, L., Marchant, R. y Read, D.J., Cambridge University Press, Cambridge, pp.227-241.
- Gianinazzi-Pearson, V., Gianinazzi, S., Guillemin, J.P., Trouvelot, A., Duc, G.** 1991 Genetic and cellular analysis of resistance to vesicular-arbuscular(VA)

- mycorrhizal fungi in pea mutants, In: Henckes H, Verma DPS, eds. *Advances in Molecular Genetics of Plant-Microbe Interaction 1*. Boston and London: Kluwer Academic publishers, 336-342
- Gianinazzi-Pearson, V., Smith, S.E., Gianinazzi, S., Smith, F.A.** 1991. Enzymatic studies on the metabolism of vesicular-arbuscular mycorrhizas V. Is H⁺ ATPase a component of ATP-hydrolysis enzymes activities in plant-fungus interfaces? *New Phytol.* 117: 61-76.
- Gianinazzi-Pearson, V., Smith, S.E.** 1993. Physiology of mycorrhizal mycelia. *Advances in Plant Pathology.* 9: 55-82.
- Gianinazzi-Pearson, V., Gollotte, A., Dumas-Gaudot, E., Franken, P., Gianinazzi, S.** 1994. Gene expression and molecular modifications associated with plant responses to infection by arbuscular mycorrhizal fungi. Dans: M Daniels(Eds) *Advances in molecular genetics of plant-microbe interactions*. Kluwer Academic Publishers, Boston and London. pp.179-186.
- Gianinazzi-Pearson, V., Gollotte, A., Lherminier, J., Tisserant, B., Franken, P., Dumas-Gaudot, E., Lemoine, M.C., Van Tuinen, D., Gianinazzi, S.** 1995. Cellular and molecular approaches in the characterisation of symbiotic events in functional arbuscular mycorrhizal associations. *Can. J. Bot.* 73: 526-532.
- Gianinazzi-Pearson, V.** 1995. Morphofunctional compatibility in interactions between roots and arbuscular endomycorrhizal fungi : molecular mechanisms, genes and gene expression. In : Kohmoto K, Singh RP, Singh US, eds. *Pathogenesis and Host Specificity in Plant Diseases*. Oxford: Pergamon Press, Elsevier Science Ltd., vol. II, 251-263.
- Gianinazzi-Pearson, V., Dumas-Gaudot, E., Gollotte, A., Tahiri-Alaoui, A., Gianinazzi, S.** 1996. Cellular and molecular defence-related root responses to invasion by arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol.* 133: 45-57.
- Gianinazzi-Pearson, V., Denarié, J.** 1997. Red Carpet genetic programmes for root endosymbioses. *Trends in plant science.* 1997. 2:371-372

- Giovannetti, M., Citrenesi, A.S.** 1993. Time course of appressorium formation on host plants by arbuscular mycorrhizal fungi . *Mycological Research* 97: 1140-1142.
- Giovannetti, M., Mosse, B.** 1980. An evaluation of techniques for measuring vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytol.* 84: 489-500
- Giovannetti, M., Sbrana, C., Citrenesi, A.S.** 1993. Factors affecting appressorium development in the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* (Nicol.& Gerd) Gerd Trapp. *New Phytol.* 123: 115-122
- Gionanetti, M., Sbrana, C., Citrenesi, A.S., Gollotte, A., Gianinazzi-Pearson, V., Gianinazzi, S.** Recognition and infection process, basis of host specificity. In *Impact of Arbuscular Mycorrhizas on Sustainable Agriculture and Natural Ecosystems*, S. Gianinazzi and H. Scheúpp, eds(Basel, Switzerland: Birkhäuser Verlag), pp.61-72
- Giovannetti, M., Sbrana, C., Citrenesi, A.S., Avio, L.** 1996. Analysis of factors involved in fungal recognition responses to host-derived signals by arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol.* 133: 65-71
- Goicoechea, N., Dolézal, K., Antolin, M.C., Strnad, M., Sanceh-Díaz, M.** 1995. Influence of mycorrhizae and Rhizobium on cytokinin content in drought-stressed alfalfa. *Journal of experimental Botany.* 46: 1543-1549
- Gollotte, A., Gianinazzi-Pearson, V., Giovannetti, M., Sbrana, C., Avio, L., Gianinazzi, S.** 1993. Cellular localization and cytochemical probing of resistance reaction to arbuscular mycorrhizal fungi in a locus a myc- mutant of *Pisium sativum* L. *Planta.* 191: 112-122.
- Gollotte, A.** 1994. Etudes cellulaires et moléculaires des interactions racine-champignon symbiotique ou non chez des pois sensibles (myc+) ou résistant (myc-) à la mycorrhization. Thèse de doctorat de l'universite de Bourgogne
- Gollotte, A., Gianinazzi-Pearson, V., Gianinazzi, S.** 1995. Immunodetection of infection thread glycoprotein and arabinoglucan protein in wild type *Pisium sativum*(L) or an isogenic mycorrhiza-resistant mutant interacting with *Glomus mosseae*. *Symbiosis.* 18: 69-85.

- Görlach, J., Volrath, S., Knauf-Beiter, G., Hengy, G., Beckhove, U., Kogel, K.H., Oodtendorp, M., Ward, E., Kessmann, H., Ryals, J.** 1996. Benzoithiadiazole, a novel class of inducers of systemic acquired resistance, activates gene expression and disease resistance in wheat. *Plant Cell*. 8: 629-643.
- Grandmaison, J., Benhamou, N., Furlan, V., Visser, S.A.** 1988. Ultrastructural localisation of N-acetylglucosamine residues in the cell wall of *Gigaspora margarita* throughout its life cycle. *Biology of the Cell*. 63: 89-100.
- Haklbrock, K., Scheel, D.** 1989. Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 40: 347-369.
- Hammond-Kosack, K.E., Jones, J.D.G.** 1996, Resistance gene-dependent plant defense responses. *Plant cell*. 8: 1855-1869.
- Harborne, J.B.** 1993. Introduction to Ecological Biochemistry, 4th edn. Academic Press, London.
- Harley, J.L., Smith, S.E.** 1983. Mycorrhizal Symbiosis. (London: Academic Press).
- Harrison, M.J., Dixon, R.A.** 1994. Spatial patterns of expression of flavonoid/isoflavonoid pathway genes during interaction between roots of *Medicago truncatula* and the mycorrhizal fungus *Glomus versiforme*. *Plant J.* 6:9-20.
- Harrison, M.J.** 1996. A sugar transporter from *Medicago truncatula*: altered expression pattern in roots during vesicular-arbuscular (VA) mycorrhizal associations. *Plant J.* 9: 491-503.
- Harrison, M.J.** 1997. The arbuscular mycorrhizal symbiosis: an underground association. *Trends in plant science*. 2: 54-60
- Hayman, D.S.** 1974. Plant growth responses to vesicular-arbuscular mycorrhiza, VI. Effect of light and temperature. *New Phytol.* 73: 71-80
- Hirsch, A.M., Fang, Y., Asad, S., Kapulnik, Y.** 1997. The role of phytohormones in plant-microbe symbioses. *Plant and soil*. 194: 171-184.
- Hughes, M.A., Dunn, M.A., Pearce, R.S., White, A.J., Zhang, L.,** 1992. An abscisic acid responsive, low temperature barley gene has homology with a maize phospholipid transfer protein. *Plant Cell Environ.* 15: 861-865.

- Hunt, M., Ryals, J.** 1996. Systemic acquired resistance signal transduction. Crit. Rev. Plant Sci 15: 583-606.
- Jakobsen, I., Abbot, L. K., Robson, A.D.** 1992. External hyphas of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Trifolium subterraneum* L. 2. Hyphal transport of ^{32}P over defined distances. New Phytol. 120: 509-516
- Jakobsen, I.** 1995. Transport of phosphorus and carbon in VA mycorrhizas. In Mycorrhiza, Structure, Function, Molecular Biology and Biotechnology, A. Varma and B. Hock, eds (Berlin: Springer-Verlag), pp. 297-324.
- Jeffries, P., Barea, J.M.** 1994. Biogeochemical cycling and arbuscular mycorrhizas in the sustainability of plant-soil systems. En: Impact of arbuscular mycorrhizas on sustainable Agriculture and Natural Ecosystems. Eds. Gianinazzi, S. y Schüepp, H. Birhäuser Verlag, Basel, pp. 101-116.
- Kader, J.C.** 1990. Intracellular transfer of phospholipids, galactolipids and fatty acids in plants cell Subcell. Biochem. 16: 69-111.
- Kay, R., Chan, A., Daly, M., Mcpherson, J.** 1987. Duplication of CaMV 35S promotor Sequences creates a Strong enhancer for plant genes. Science. 236: 1299-1302
- Kendrick, B., Berch, S.** 1985. Mycorrhizae: applications in agriculture and forestry. En Comprehensive Biotechnology. Vol.4.De. Robinson, C.W. Pergamon Press, Oxford, pp. 109-152
- Krause, A., Broughton, W.J.** 1992. Proteins associated with root -hair deformation and nodule iniciation in *Vigna unguiculata*. Mol. Plant-Microbe Interact. 5: 96-103
- Lambais, M.R., Mehdy M.** 1993. Suppression of endochitinase, β -1,3-endoglucanase, and chalcone isomerase expression in bean vesicular-arbuscular mycorrhizal roots under different soil phosphate conditions. MPMI. 6: 75-83.
- Lambais, M.R., Mehdy, M.C.** 1995. Differetial expression of defense-related genes in arbuscular mycorrhizas. Canadian Journal of Botany. 73(Suppl.1): S533-S540.
- Lawton, K., Weymann, K., Friedrich, L., Vernooij, B., Uknes, S., Ryals, J.** 1995. Systemic acquired resistance in Arabidopsis requires salicylic acid but not ethylene. Mol. Plant-Microbe Interact. 8: 863-870.

- Leeman, M., Vanpelt, J.A., Denouden, F:m., Heinsbroeck, M., Bakker, P., Schippers, B.** 1995. Induction of systemic resistance by *Pseudomonas fluorescens* in radish cultivars differing in susceptibility to *Fusarium*-wilt, using a novel bioassay. *Eur.J.Plant Pathol.*101: 655-664
- Lehrminier, J.** 1993. Apport de la cytologie moléculaire à l'étude des relations hôtes-microorganismes non cultivables 'Mycoplasma-like organisms' et champignons endomycorhizogènes. PhD Dissertation (Dijon, France: University of Burgundy).
- Lemoine, M.C., Van Tuinen, D., Gianinazzi, S.** 1995. Cellular and molecular approaches in the characterisation of symbiotic events in functional arbuscular mycorrhizal associations. *Can. J. Bot.* 73: 526-532
- Lemoine, M.C., Gollotte, A., Gianinazzi-Pearson, V.** 1995. Localisation of $\beta(1-3)$ glucan in walls of the endomycorrhizal fungi *Glomus mosseae* (Nicol. & Gerd.) Gerd & Trappe and *Acaulospora laevis* Gerd & Trappe during colonization of host roots. *New Phytol.* 129: 97-105
- León, J., Yalpani, N., Lawton, M.A., Raskin, I.** 1995. Hydrogen peroxide stimulates salicylic acid biosynthesis in tobacco. *Plant Physiol.* 108: 1673-1678
- Levine, A., Tenhaken, R., Dixon, R.A., Lamb, C.** 1994. H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell.* 79: 583-593
- Levy, O.A., Krikun, J.** 1980. Effect of vesicular-arbuscular mycorrhiza on Citrus jambhiri water relations. *New Phytol.* 85: 25-32.
- Liang, P.L., Pardee, A.B.** 1992. Differential Display of Eucaryotic messenger RNA by means of the Polymerase Chain Reaction. *Science.* 257: 967-971
- Linderman, R.G.** 1994. Role of VAM fungi in biocontrol. Dans : FL Pfleger et RG Linderman (Eds.) Mycorrhiza and plant health. The American Phytopathological Society, pp. 1-25
- Liu, H., Trieu, A.T., Blaylock, L.A., Harrison, M.J.** 1998. Cloning and characterization of two phosphate transporters from *Medicago truncatula* roots: Regulation in response to phosphate and to colonization by arbuscular mycorrhizal (AM) fungi. *Mol.Plant-Microbe. Interact.* 11: 14-22.

- Lowry, O.H., Roserbrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J.** 1951. Protein measurement with the Folin-phenol reagent. *J.Biol.Chem.* 193: 267-275
- Lynch, J., Brown, K.M.** 1997. Ethylene and plant responses to nutritional stress. *Physiol. Plant.* 100: 613-619
- Mackhan, H.I., Paiva, N.L., Dixon, R.A., Hirsch, A.M.** 1997. Chalcone synthase transcripts are detected in alfalfa root hairs following inoculation with wild type *Rhizobium meliloti*. *MPMI.* 10: 50-58.
- Maier, W., Piepp, H., Schmidt, J., Wray, V., Strack, D.** 1995. Levels of a terpenoid glycoside(blumenin) and cell wall-bound phenolics in some cereal mycorrhizas. *Plant Physiol.* 109: 465-470.
- Maier, W., Hammer, K., Dammann, U., Schulz, B., Strack, D.** 1997. Accumulation of sesquiterpenoid cyclohexenone derivatives induced by an arbuscular mycorrhizal fungus in members of the Poaceae. *Planta.* 202: 36-42.
- Malamy, J., Carr, J.P., Kleissig, D.F., Raskin, I.** 1990. Salicylic acid: A likely endogenous signal in the resistance response of tobacco to viral infection. *Science.* 250: 1002-1004.
- Markwell, M.A.K., Hass, S.M., Bieber, L.L., Tolberg, N.E.** 1979. A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination. *Anla. Bioche.,* 87: 206-210
- Martinez-Abarca, F., Herrera-Cervera, J.A., Bueno, P., Sanjuan, J., Bisseling, T., Olivares, J.** 1998. Involvement of salicylic acid in the establishment of the *Rhizobium meliloti*-alfalfa symbiosis. *MPMI.*
- Martin-Laurent, F., Franken, P., Gianinazzi, S.** 1995. Screening of cDNA fragments generated by differential RNA display. *Anal. Biochem.*228: 182-184.
- Martin-Laurent, F., Franken, P., van Tuinen, D., Dumas-Gaudot, E., Schlichter, U., Antoniw, J.F., Gianinazzi-Pearson, V., Gianinazzi, S.** 1996. Differential display reverse transcription polymerase chain reaction: A new approach to detect symbiosis related genes involved in arbuscular mycorrhiza. In *Mycorrhizas in Integrated Systems: From genes to plant development*, C.Azcón-Aguilar and J.M Barea.eds (brussels, Belgium: European Comission 9, pp.195-198.

- Martin-Laurent, F., van Tuinen, D., Dumas-Gaudot, E., Gianinazzi-Pearson, V., Gianinazzi, S., Franken, 1997.** Differential display analysis of RNA accumulation in arbuscular mycorrhiza of pea and isolation of a novel symbiosis-regulated plant gene. *Mol Gen Genet.* 256: 37-44
- Marx, C., Dexheimer, J., Gianinazzi-Pearson, V., Gianinazzi, S. 1982.** Enzymatic studies on the metabolism of vesicular-arbuscular mycorrhizas. IV. Ultracytoenzymological evidence(ATPase) for active transfer processes in the host-arbuscule interface. *New Phytol.* 90: 37-43
- Masuta, C., Van der Bulke, M., baw, G., Van Montagu, M., Caplan, A.B. 1991.** Differential effects of elicitors on the viability of rice suspension cells. *Plant Physiol.* 97: 619-629.
- McArthur, D.A.J, Knowles N.R. 1992.** Resistance responses of potato to vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi under varying abiotic fosforus levels. *Plant Physiol.* 100: 341-351.
- Mauch-Mani, B., Slusarenko, A.J. 1996.** Production of salicylic acid precursors is a major function of Phenulalanine ammonia-lyase in the resistance of Arabidopsis to *Peronospora parasitica*. *Plant Cell.* 8: 203-212.
- Mehdy, M.C. 1994.** Active oxygen species in plant defenses against pathogens. *Plant Physiol.* 105: 467-472
- Métraux , J.P., Signer, H., Ryals, J., Ward, E., Wyss-Benz, M., Gaudin, J., Raschdoorf, K., Schmid, E., Blum,W., Inverardi, B. 1990.** Increase in salicylic acid at the onset od systemic acquired resistance in cucumber. *Science.* 250: 1004-1006.
- Mitchell, DT. 1993.** Mycorrhizal associations. En : DG Jones (eds.) *Exploitation of Microorganisms.* Chapman et hall, London. Pp. 169-196
- Molina , A., Garcia-Olmedo, F.1993.** Developemental and pathogen-induced expression of three barley genes encoding lipid transfer proteins. *Plant J.* 4: 983-991.
- Morandi,D., Bailey, J.A., Gianinazzi-Pearsson, V. 1984.** Isoflavonoid accumulation

- in soybean roots infected by the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Physiol. Plant. Pathol.* 24: 357-364.
- Morandi, D., Paynot, M.** 1996. Comparison between a myc+ pea cultivar (Frisson) and one of its myc- mutant (P2) in their ability to produce defense reactions after elicitation with UV light. "Mycorrhizas in Integrated Systems from genes to Plant Development" From genes to plant development, C.Azcón-Aguilar and J.M. Barea, eds (brussels, Belgium: European Commission 9. pp 245-247.
- Morandi, D.** 1996. Occurrence of phytoalexins and phenolic compounds in endomycorrhizal interactions, and their potential role in biological control. *Plant Soil.* 185: 241-251
- Mosse, B., Stribley, D.P., Le Tacon, F.** 1981. Ecology of mycorrhizae and mycorrhizal fungi. *Adv. Microbiol. Ecol.* 5: 137-210.
- Mugnier, J., Mosse, B.** 1987. Vesicular-arbuscular infections in transformed Ri-T-DNA root grow axenically. *Phytopathology.* 77: 1045-1050.
- Mundy, J., Rogers, J.C.** 1986. Selective expression of a probable amylase/protease inhibitor in barley aleurone cells: Comparison to the barley amylase/subtilisin inhibitor. *Planta.* 169: 51-63.
- Murphy, P.J., Langridge, P., Smith, S.E.** 1997. Cloning plant genes differentially expressed during colonization of roots of *Hordeum vulgare* by the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *New Phytol.* 135: 292-301
- Nagahashi, G., Douds, D.D.** 1997. Appressorium formation by AM fungi on isolated cell walls of carrot roots. *New Phytol.* 299-304.
- Navi, J., Noat, G., Diamantidis, G., Woudstra, M., Richard, J.** 1986. Electrostatic effects and the dynamics of enzyme reactions at the surface of the plant cells, 3: Interplay between limited cell wall autolysis, pectin methyl esterase activity and electrostatic effects in soybean cell walls. *Eur.J.Biochem.* 155: 199-202
- Neuenchwander, U., Lawton, K., Ryals, J.** 1996. Systemic acquired resistance. In *Plant-Microbe Interaction*, Vol 1, G. Stacey and N.T. Keen, eds (New York: Chapman and Hall). pp. 81-106.
- Norman, J.R., Atkinson, D., Hooker, J.E.** 1996. Arbuscular mycorrhizal fungal

- induced alteration to root architecture in strawberry and induced resistance to the root pathogen *Phytophthora fragariae*. Plant and soil. 185: 191-198
- Ocampo, J.A., Martin, J., Hayman, D.S.** 1980. Influence of plant interactions on vesicular-arbuscular mycorrhizal infections. I. Host and non-host plants grown together. New phytol. 84: 27-35.
- Ocampo, J.A., Barea, J.M.** 1982. Depressed metabolic activity of VA mycorrhizal fungi by photosynthesis inhibitor herbicides. Collq. INRA. 13: 267-270.
- O'Connell, R.J., Brown, I.R., Mansfield, J.W., Bailey, J.A., Mazau, D., Rumeau, D., Esquerré-Tugayé,** Immunocytochemical localisation of hydroxyproline rich glycoproteins accumulating in melon and bean at sites of resistance to bacteria and fungi. Mol.Plant-Microbe.Intract. 3: 33-40.
- Olivares, J., Casadesús, J. Bedmar, E.J.** 1980. Method for testing degree of infectivity of *Rhizobium meliloti* strains. App. Environ. Microbiol. 39: 967-970.
- Pearson, W.R., Lipman, D.J.** 1988. Improved tools for biological sequence comparison. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 85: 2444-2448
- Peipp, H., Maier, W., Shmidt, J., Wray, V., Strack, D.** 1997. Arbuscular mycorrhizal fungus-induced changes in the accumulation of secondary compounds in barley roots. Phytochemistry. 44: 581-587.
- Peng, M., Kuc', J.** 1992. Peroxidase generated hydrogen peroxide as a source of antifungal activity in vitro and on tobacco leaf desks. Phytopathology. 82: 696-699.
- Perotto, S., Brewin, N.J., Bonfate, P.** 1994. Colonization of pea roots by the mycorrhizal fungus *Glomus versiforme* and by *Rhizobium* bacteria: Immunological comparison using monoclonal antibodies as probes for plant cell surface components. Mol. Plant. Microbe Interact. 7: 91-98
- Phillips, J.M., Hayman, D.S.** 1970. Improved procedure of clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. Trans. Brit. Mycol. Soc. 55:159-161
- Phillips, D.A., Tsai, S.M.** 1992. Flavonoids as plant signals to rhizosphere microbes. Mycorrhiza. 1: 55-58.
- Plant, A.I., Cohenm A., Moses, M.S., Bray, E.A.** 1991. Nucleotide sequence and

- spatial expression pattern of a drought- and abscisic acid-induced gene of tomato. *Plant Physiol.* 97: 900-906
- Plenchette, C., Declerck, S., Diop, T.A., Strullu, D.G.** 1996. Infectivity of monoxenic subcultures of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus versiforme* associated with Ri-T-DNA-transformed carrot root. *Appl Microbiol Biotechnol.* 46: 545-548
- Pozo, M.J., Dumas-Gaudot, E., Slezack, S., Cordier, C., Asselin, A., Gianinazzi, S., Gianinazzi-Pearson, V., Azcón-Aguilar, C., Barea, J.M.** 1996. Induction of new chitinase isoforms in tomato roots during interactions with *Glomus mosseae* and/or *Phytophthora nicotianae* var *parasitica*. *Agronomie.* 16: 689-697
- Rai, R.** 1988. Interaction responses of *Glomus albidus* and *Cicerorhizobium* strains on iron uptake and symbiotic N₂ fixation in calcareous soil. *J. Plant Nut.* 11: 863-869.
- Raskin, I.** 1992. Salicylate, a new plant hormone. *Plant Physiol.* 99: 799-803
- Rasmussen, J.B., Hammerschmidt, R., Zook, M.N.** 1991. Systemic induction of salicylic acid accumulation in cucumber after inoculation with *Pseudomonas syringae* pv *syringae*. *Plant Physiol.* 97: 1342-1347.
- Rejon-Palomares, A., García-Garrido, J.M., Ocampo, J.A., García-Romera, I.** 1996. Presence of xyloglucan-hydrolyzing glucanases (xyloglucanases) in arbuscular mycorrhizal symbiosis. 21: 249-261
- Remy, W., Taylor, T.N., Hass, H., Kerp, H.** 1994. Four hundred-million-year-old vesicular arbuscular mycorrhizae. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91: 11841-11843
- Rigaud, J., Puppo, A.** 1975. Indole-3 acetic catabolism by soybean bacteroids. *J. Gen. Microbiol.* 88: 223-228
- Rodríguez, R.L., Tait, R.C.** 1983. Recombinant DNA techniques. Addison-Wesley Publishing
- Rosendahl, S.** 1985. Interaction between the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus fasciculatum* and *Aphanomyces euteiches* root rot of peas. *Phytopath.Z.* 114: 31-40.
- Roussel, H., Bruns, S., Gianinazzi-Pearso, V., Hahlbrock, K., Franken, P.** 1997.

- Induction of a membrane intrinsic protein-encoding mRNA in arbuscular mycorrhiza and elicitor-stimulated cell suspension culture of parsley. *Plant Science*. 126: 203-210
- Ryals, J., Lawton, K.L., Delaney, T.P., Friedrich, L., Kessmann, H., Neuenschwander, U., Uknes, S., Vernooij, B., Weymann, K.** 1995. Signal transduction in systemic acquired resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 92: 4202-4205.
- Ryals, J.A., Neuenschander, U.H., Willits, M.G., Molina, A., Steiner, H.Y; Hunt, M.D.** 1996. Systemic acquired resistance. *Plant Cell*. 8: 1809-1819.
- Sambroock, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T.** 1989. *Molecular cloning-a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, USA: Cold Spring Harbor laboratory Press.
- Samra, A., Dumas-Gaudot, E., Gianinazzi-Pearson, V., Gianinazzi, S.** 1996. Soluble proteins and polypeptide profiles of spores of arbuscular mycorrhizal fungi. Interspecific variability and effects of host (myc+) and non-host (myc-) *Pisium sativum* root exudates. *Agronomie*. 16: 709-719
- Samra, A., Dumas-Gaudot, E., Gianinazzi, S.** 1997. Detection of symbiosis-related polypeptides during the early stages of the establishment of arbuscular mycorrhiza between *Glomus mosseae* and *Pisium sativum* roots. *New Phytol*. 135: 711-722
- Sanders, F.E., Sheikh, N.A.** 1983. The development of vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in plant roots systems. *Plant soil*. 71: 223-246
- Schellenbaum, L., Gianinazzi, S., Gianinazzi-Pearson, V.** 1992. Comparison of acid soluble protein synthesis in roots of endomycorrhizal wild type *Pisium sativum* and corresponding isogenic mutants. *Journal of plant Physiol*. 141: 2-6
- Showalter, A.M.** 1993. Structure and function of plant cell wall proteins. *Plant Cell*. 5: 9-23
- Segura, A., Moreno, A., Garcia-Olmedo, F.** 1993. Purification and antipathogenic activity of lipid transfer proteins(LTPs) from the leaves of *Arabidopsis* and spinach. *FEBS.Lett*. 332: 243-246.
- Serrano, R.** 1989. Structure and function of plasma-membrane ATPase. *Annu. Rev.*

- Plant. Physiol. Plant Mol. Biol. 40: 61-94
- Simoneau, P., Feugey, L., Viéumont, J.D., Swoboda, I., Heberle-Bors, E., Strulu, D.G.** 1996. Induction of Phenyl Amonia-Lyase in Birch Challenged with ectomycorrhizal Fungi. In Mycorrhizas in Intgrated Systems: From genes to plant development, C.Azcón-Aguilar and J.M. Barea.eds(brussels, Belgium: European Comission, pp.203-206.
- Siqueira, 1991, Safir, G.R., Nair, M.G.** 1991. Stimulation of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation and growth of white clover by flavonoid compounds. New Phytol. 118: 87-93
- Siqueira,J.O., Sylvia, D.M., Gibsom, J., Hubbel, D.H.** 1985. Spore, germination and germ tubes of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. Can. J. Microbiol. 31: 965-972
- Smith, J. A., Métroux, J.P.** 1991. Pseudomonas syringae pv syringae induces systemic resistance to Pyricularia oryzae in rice. Physiol Mol Plant Pathol 39: 451-461.
- Smith, S.E, Gianinazzi-Pearson, V.** 1988. Physiological interactions between symbionts in vesicular-arbuscular mycorrhizal plants. Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 39: 221-144.
- Smith, S.E. Smith, F.A.**1990. Structure and function of the interfaces in biotrophic symbioses as they relate to nutrient transport. New Phytol. 114: 1-38
- Southern, E.M.** 1975.Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol. 98: 503-517.
- Spanu, P., Bonfate-Fasolo, P.** 1988. Cell wall bound peroxidase activity in roots of mycorrhizal *Allium porum*.. New Phytol. 109: 119-124
- Spanu, P., Boller, T., ludwig, A., Wiemken, A., Faccio, A., Bonfate-Fasolo, P.** 1989. Chitinase in roots of mycorrhizal *Allium porum*: regulation and localisation. Planta. 177: 447-455.
- Staelin, C., Granado, J., Müllerm J., Wiemken, A., Mellor, RB., Felix, G. Regenass, M., Broughton, W.J. Boller, T.** 1994 a. Perception of Rhizobium nodulation factors by tomato cells and inactivation by root chitinases. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 91: 2196-2200

- Staelin, C., Schultze, M., Kondorosi, E., Mellor, R.B., Boller, T., Kondorosi, A.**
1994 b. Structural modifications in *Rhizobium meliloti* nod factors influence their stability against hydrolysis by root chitinases. *Plant J.* 5: 319-330.
- St-Arnaud, M., Hamel, C., Caron, M., Fortin, J.A.** 1995. Endomycorrhizes VA et sensibilité des plantes aux maladies: synthèse de la littérature et mécanismes d'interaction potentiels. In : Fortin J.A, Charest, C., Piché. (Eds.) *La symbiose mycorrhizienne état des connaissances.* Editions Orbits, Frelighsburg, Qc, Canada. Pp.51-87
- Sterk, P., Booij, H., Schellkens, G.A., van Kammen, A., de Vries, S.C.** 1991. Cell-specific expression of the carrot EP2 lipid transfer protein gene. *Plant. Cell.* 3: 907-921
- Stermer, B.A.** 1995. Molecular regulation of systemic induced resistance. R Hammersmidt y J Kuc (Eds.) *Induced resistance to disease in plants.* Vol.4. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht/Boston/London. pp.111-140
- Tahiri-Alaoui, A., Grison, R., Gianinazzi-pearson, V., Toppam, A., Gianinazzi, S.**
1994. The impact of the constitutive expression of chitinases in roots of transgenic tobacco on arbuscular mycorrhizal fungi. Résumé dans: Seventh International Symposium on Molecular Plant-Microbe Interactions. Edinburgh, 26 June-1st July 1994
- Tahiri-Alaoui, A., Antoniw, J.F.** 1996. Cloning of genes associated with the colonization of tomato roots by the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *Agronomie*, 16: 699-707
- Tchang, F., This, P., Stiefel, V., Arondel, V., Morch, M.D., Pages, M., Puigdonmench, P., Grellet, F., Delsney, M., Bouillon, P., Huet, J.C., Guerbette, F., Beauvais-Cante, F., Duranton, H., Kader, J.C.** 1988. Phospholipid transfer protein: full length cDNA and amino acid sequence in maize. *J.Biol. Chem.* 263: 16849-16855
- Thoma, S., Kaneko, Y., Somerville, C.** 1993. A non-specific lipid transfer protein from *Arabidopsis* is a cell wall protein. *Plant J.* 3: 427-436

- Tommerup, I.C., Abbott, L.K.** 1981. Prolonged survival and viability of VA-mycorrhizal hyphae after root death. *Soil Biol, Biochem.* 13: 431-433.
- Torres-Schuman, S., Godoy, J.A., Pintor-Toro, J.A.** 1992. A probable lipid transfer protein gene is induced by NaCl in stems of tomato plants. *Plant Mol. Biol.* 18: 749-757
- Trotta, A., Varese, G.C., Gnani, E., Fusconi, A., Sampo, S., Berta, G.** 1996. Interactions between the soil born root pathogen *Phytophthora nicotianae* var. *parasitica* and the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* in tomato plants. *Plant and Soil* 185: 199-209
- Tsai, S.M., Phillips, D.A.** 1991. Flavonoids released naturally from alfalfa promote development of symbiotic *Glomus* spores *in vitro*. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 1485-1488
- Tsuboi, S., Suga, T., Takishima, K., Mamiya, G., Matsui, K., Ozeki, Y., Yamada, M.** 1991. Non specific lipid transfer protein in castor bean seedlings, and molecular cloning of a full-length cDNA for a cotyledon-specific isoform. *J. Biochem.* 110: 823-831
- Uknes, S., Mauch-Mani, B., Moyer, M., Potter, S., Williams, S., Dincher, S., Chandler, D., Slusarenko, A., Ward, E., Ryals, J.** 1992. Acquired resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 4: 645-656.
- Van Loon, L.C., Pierpoint, W.S., Boller, T., Conejero, V.** 1994. Recommendations for naming plant pathogenesis-related proteins. *Plant Mol. Biol. Reporter.* 12: 245-264
- Van Rhijn, P., Fang, Y., Galili, S., Shaul, O., Atzmon, N., Wininger, S., Eshed, Y., Lum, M., Li, M., To, V., Fujishige, N., Kapulnik, Y., Hirsch, A.M.** 1997. Expression of early nodulin genes in alfalfa mycorrhiza indicates that signal transduction pathways used in forming arbuscular mycorrhizae and *Rhizobium*-induced nodules may be conserved. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94: 5467-5472
- Varner, J.E., Lin, L.S.** 1989. Plant cell wall architecture. *Cell.* 56: 231-239
- Vierheilig, H., Alt, M., Mohr, U., Boller, T., Wiemken, A.** 1994. Ethylene biosynthesis and activities of chitinase and β -1,3-glucanase in the roots of host and

- non-host plants of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi after inoculation with *Glomus mosseae*. *J. Plant Physiol.* 143: 337-343
- Vierheilig, H., Alt, M., Lange, J., Gut-Rella, M., Wiemken, A., Boller, T.** 1995. Colonization of transgenic tobacco constitutively expressing pathogenesis-related proteins by the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 3031-3034
- Vierheilig, H., Iseli, B., Alt, B., Raikhel, N., Wiemken, A., Boller, T.** 1996. Resistance of *Urtica dioica* to colonization: a possible involvement of *Urtica dioica* agglutinin. *Plant and soil.* 183: 131-136
- Vernooij, B., Friedrich, L., Morse, A., Reist, R., Kolditz-Jawhar, R., Ward, E., Uknes, S., Kessmann, H., Ryals, J.** 1994. Salicylic acid is not the translocated signal responsible for inducing systemic acquired resistance but is required in signal transduction. *Plant Cell.* 6: 959-965
- Vernooij, B., Friedrich, L., Ahl-Goy, P., Staub, T., Kessmann, H., Ryals, J.** 1995. 2,6-Dichloroisonicotinic acid-induced resistance to pathogens does not require the accumulation of salicylic acid. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 8: 228-234.
- Vignols, F., Wigger, M., García-Garrido, J.M., Grellet, F., Kader, J.C., Delseny, M.** 1997. Rice lipid transfer protein (LTP) genes belong to a complex multigene family and are differentially regulated. *Gene.* 195: 177-186
- Volpin, H., Elkind, Y., Okon, Y., Kapulnik, Y.** 1994. A vesicular arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradix* induces a defense response in alfalfa roots. *Plant Physiol.* 104: 683-689.
- Volpin, H., Phillips, D.A., Oken, Y., Kapulnik, Y.** 1995. Suppression of an isoflavonoid phytoalexin defense response in mycorrhizal alfalfa roots. *Plant Physiology.* 108: 1449-1454.
- Ward, E.R., Uknes, S.J., Williams, S.C., Dincher, S.S., Wiederhold, D.L., Alexander, D.D., Ahl-Goy, P., Métraux, J.P., Ryals, J.A.** 1991. Coordinate gene activity in response to agents that induce systemic acquired resistance. *Plant Cell.* 3: 1085-1094.
- Whipps, J.M., McQuilken, M.P.** 1993. Aspects of biocontrol of fungal plant pathogens.

- DG Jones(Eds.) Explotation of microrganisms, Chapman & Hall, London.pp.45-79.
- White, R.F.** 1979. Acetylsalicylic acid (aspirin) induces resistance to tobacco mosaic virus in tobacco. *Virology*. 99: 410-412
- Wirtzs, K.W.A., Gadella, Jr., T.W. J.** 1990. Properties and modes of action of specific and non-specific phospholipid transfer proteins. *Experientia*. 46: 592-599.
- Wu, G., shortt, B.J., lawrence, E.B., Levine, E.B., Fitzsimmons, K.C., Shah, D.M.** 1995. Diseases resistance conferred by expression of a gene encoding H₂O₂-generating glucose oxidase in transgenic potato plant. *Plant cell*. 7: 1357-1368
- Wyss, P., Mellor. R.B., Wiemken, A.** 1990. Vesicular-arbuscular mycorrhizas of wild-type soybean and non nodulating mutants with *Glomus mosseae* contain symbiosis-specific polypeptides (mycorrhizins) immunologically cross-reactive with nodulins. *Planta*. 182: 22-26
- Wyss, P., Boller, T., Wiemken, A.** 1991. Phytoalexin response is elicited by a pathogen (*Rhizoctonia solani*) but not by a mycorrhizal fungus(*Glomus mosseae*) in soybean roots. *Experientia*. 395-399.
- Xie, Z.P., Staehelin, C., Vierheilig, H., Wiemeken, A., Jabbouri, S., Broughton, W.J., Vögli-Lange, R., Boller, T.** 1995. Rhizobial nodulation factors stimulate mycorrhizal colonization of nodulating and nonnodulating soybeans. *Plant Physiol*. 108: 1519-1525.
- Yalpani, N., Schulaev, V., Raskin, I.** 1993. Endogenous salicylic acid levels correlate with the accumulation of pathogenesis-related proteins and virus resistance in tobacco. *Phytopathology*. 83: 702-708.
- Yamada, M.** 1992. Lipid Transfer Proteins in Plants and Microorganisms. *Plant cell Physiol*. 33: 1-6