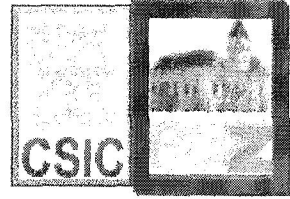


T 7/60



Universidad de Granada
Facultad de Ciencias
Tesis Doctoral

UNIVERSIDAD DE GRANADA
Facultad de Ciencias
Fecha ..14/7/03.....
ENTRADA NUM. 2237.....

Producción de enzimas hidrolíticos de la pared celular por hongos arbusculares, saprobios y otros endofitos y su repercusión en los mecanismos de formación de la simbiosis

UNIVERSIDAD DE GRANADA
30 JUN. 2003
COMISIÓN DE DOCTORADO

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA
GRANADA
Nº Documento 613658049
Nº Colección 11573223x

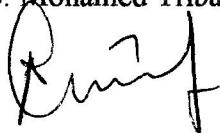
Mohamed Tribak

2003

Producción de enzimas hidrolíticos de la pared celular por hongos
arbusculares, saprobios y otros endofitos y su repercusión en los
mecanismos de formación de la simbiosis

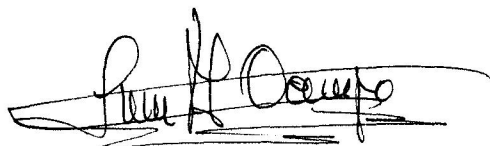
Memoria que presenta el licenciado en
CC. Biológicas Mohamed Tribak
para aspirar al grado de Doctor

Fdo: Mohamed Tribak



Vº Bº

Los Directores



Fdo: D. Juan Antonio Ocampo Bote
Doctor en Ciencias Biológicas
Profesor de Investigación del C.S.I.C



Fdo: Dª. Inmaculada García Romera
Doctor en Ciencias Biológicas
Científico Titular del C.S.I.C

Universidad de Granada

2003

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada en el Grupo de Microorganismos rizosféricos que promueven el crecimiento y desarrollo vegetal, del Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos de la Estación Experimental del Zaidín. (C.S.I.C).

Parte de los resultados presentados en esta tesis Doctoral han sido publicados o aceptados en las siguientes revistas internacionales:

García-Garrido, J.M., Tribak, M., Rejón-Palomares, A., Ocampo, J.A., García-Romera, I. 2000. Hydrolytic enzymes and ability of arbuscular mycorrhizal fungi to colonize roots. *Journal Experimental Botany* 51: 1443-1448.

Tribak, M., Ocampo, J.A., García-Romera, I. 2002. Production of xyloglucanolytic enzymes by *Trichoderma viride*, *Paecilomyces farinosus*, *Wardomyces inflatus*, and *Pleurotus ostreatus*. *Mycologia* 94: 404-410.

INDICE

Indice

INTRODUCCION	3
1. Agricultura sostenible.....	3
2. Importancia de microorganismos rizosféricos en agricultura	4
2.1. Conceptos generales.....	4
2.2. Rizosfera.....	5
2.3. Micorrizas	7
2.3.1. Conceptos generales.....	7
2.3.2. Micorrizas arbusculares	8
a. Conceptos generales.....	8
b. Formación de la simbiosis	10
c. Mecanismos de penetración y desarrollo de la simbiosis	12
d. Fisiología de las micorrizas	15
e. Función y regulación de los mecanismos de defensa de la planta frente a la colonización micorrízica	21
f. Interacciones de las micorrizas arbusculares con microorganismos rizosféricos	24
2.4. Hongos saprobios	26
2.5. Rhizobium.....	28
3. Pared celular	30
3.1. Composición química	31
3.1.1. Celulasa.....	31
3.1.2. Pectina	32
3.1.3. Hemicelulosas	32
3.2. Enzimas degradativos de la pared celular	33
3.2.1. Celulasas	33
3.2.2. Pectinasas.....	36
3.2.3. Hemicelulasas	37

MATERIAL Y METODOS	41
1. Características del suelo empleado	41
2. Plantas y condiciones de cultivo	41
2.1. Plantas	41
2.1.1. Esterilización de las semillas	42
2.1.2. Germinación y condiciones de crecimiento	42
3. Inoculantes microbianos empleados	43
3.1. Referencia y características	43
3.2. Medios y condiciones de cultivo	46
3.3. Obtención y cuantificación de inoculantes	48
3.3.1. Hongos saprobios	48
3.3.2. Bacterias	48
3.4. Inoculación de microorganismos	49
3.4.1. Inoculación de hongos saprobios	49
3.4.2. Inoculación de bacterias	49
3.4.3. Inoculación de micorrizas	49
4. Determinaciones generales	50
4.1. Tinción de raíces	50
4.2. Cuantificación del porcentaje de longitud de raíz colonizada	50
4.3. Recuento de nódulos	51
5. Estudios bioquímicos	51
5.1. Obtención y preparación de muestras enzimáticas	51
5.1.1. Método de obtención de extractos de raíz	51
5.1.2. Método de obtención de extractos de micelio externo de hongos micorrízicos	52
5.1.3. Método de obtención de extractos enzimáticos de hongos saprobios	53
5.1.4. Método de obtención de extractos enzimáticos bacterianos	54
5.2. Sustratos utilizados y preparación de los mismos	58
5.3. Detección de actividades hidrolíticas	59
5.3.1. Condiciones electroforéticas	59
5.3.2. Visualización de bandas de actividad hidrolíticas en geles	61
5.4. Cuantificación de las actividades hidrolíticas	61
5.4.1. Viscosimetría	62
5.4.2. Valoración de grupos reductores	63

5.5. Cuantificación de proteínas	65
6. Análisis estadístico	65
I. ENZIMAS HIDROLITICOS EN MICORRIZAS	68
Introducción.....	68
Material y Métodos	69
Diseño experimental	69
Sistema de cultivo	70
Determinaciones	70
Resultados	71
Discusión	83
II. ENZIMAS HIDROLITICOS EN HONGOS SAPROBIOS	89
Introducción.....	89
Ensayos.....	89
1. Condiciones de experimentación para la detección de actividad xiloglucanasa por hongos saprobios	91
1.1. Efecto de distintos medios de cultivo en la producción de actividad xiloglucanasa por hongos saprobios.....	91
Material y Métodos	91
Resultados	92
1.2. Efecto del tiempo de incubación en la producción de xiloglucanasas por hongos saprobios	95
Material y Métodos	95
Resultados	96
1.3. Efecto de los distintos métodos de concentración en la producción de xiloglucanasas por hongos saprobios	97
Material y Métodos	97
Resultados	98
1.3. Efecto de distintos detergentes en la producción de xiloglucanasas por hongos saprobios	99
Material y Métodos	99
Resultados	100

1.4. Detección cualitativa de actividad xiloglucanasa	
por hongos saprobios	102
Material y Métodos	103
Resultados	103
2. Producción de xiloglucanasas por hongos saprobios	104
Material y Métodos	105
Resultados	105
Discusión	109
III. XILOGLUCANASAS EN INTERACCIONES MA-HONGOS SAPROBIOS	117
Introducción	117
Material y Métodos	119
Diseño experimental	119
Sistema de cultivo	119
Determinaciones	120
1. Efecto de la inoculación conjunta del hongo formador de micorriza arbuscular <i>G. mosseae</i> y distintos hongos saprobios sobre el desarrollo y actividades hidrolíticas de plantas de guisante	121
Resultados	121
2. Efecto de la inoculación conjunta del hongo formador de micorriza arbuscular <i>G. mosseae</i> y distintos hongos saprobios sobre el desarrollo y actividades hidrolíticas de plantas de lechuga	121
Resultados	127
Discusión	132
IV. ENZIMAS HIDROLITICOS EN <i>RHIZOBIUM</i>	142
Introducción	142
Material y Métodos	145
Resultados	146
Discusión	148
V. ENZIMAS HIDROLITICOS EN INTERACCIONES MA- <i>RHIZOBIUM</i>	153
Introducción	153
Materiales y Métodos	156
Diseño experimental	156
Sistema de cultivo	157
Determinaciones	157

Resultados	158
Discusión	169
 DISCUSIÓN GENERAL	 176
 BIBLIOGRAFÍA	 184

INTRODUCCION

INTRODUCCIÓN

1. Agricultura sostenible

A mediados del siglo XX la utilización de productos químicos en la agricultura fue un acontecimiento innovador y rentable para muchos agricultores, ya que se incrementaba la producción al utilizar fertilizantes y disminuían las pérdidas al proteger los cultivos con plaguicidas. Sin embargo, durante mucho tiempo no se tuvo en cuenta los efectos tóxicos para los organismos en general y la permanencia de éstos compuestos en el ambiente.

Como consecuencia de las prácticas agrícolas convencionales, que se caracterizan por un uso excesivo e irracional de agroquímicos, existe el peligro de que muchas especies microbianas existentes desaparezcan o tal vez nunca lleguemos a conocerlas y no sólo eso, los cambios drásticos en el ecosistema del suelo afectan también a las plantas y animales. La agricultura sostenible se define como una gestión exitosa del suelo para satisfacer las necesidades humanas manteniendo al máximo la calidad medioambiental y conservando los recursos naturales (Bohlool *et al.*, 1992; Ladha, 1992). Un acercamiento a la agricultura sostenible implicaría un empleo racional de los recursos naturales en lugar de una explotación de ellos. La agricultura sostenible debe ser un sistema que a larga pueda satisfacer las necesidades alimentarias del hombre; aumentar la calidad del medio ambiente y la fuente de recursos, base de la cual depende la economía de la agricultura; reducir el uso de recursos no renovables y generar una producción eficiente y económicamente rentable. Sin embargo una verdadera agricultura sostenible es difícil de conseguir salvo en el caso de ecosistemas naturales. El termino de agricultura sostenible es ya en si contradictorio ya que

agricultura implica la manipulación artificial de los ecosistemas para la obtención de alimentos. Por ello el objetivo fundamental de un sistema agrícola sostenible no consiste en una reducción drástica del uso de fertilizantes, sino en la utilización racional de los mismos que permita un aumento de la productividad por unidad de coste de producción y una menor dependencia de productos agroquímicos.

Por ello con la agricultura sostenible se pretende optimizar el uso de fertilizantes, combatir las actividades patogénicas a través de sus enemigos antagonistas naturales y manipular las propiedades biológicas del suelo y en particular el uso de microorganismos que ayuden al ciclado de nutrientes (Kennedy y Smith, 1995). La alternativa más viable para obtener alimentos con calidad y en la cantidad necesaria es una agricultura sostenible basada en el uso de biofertilizantes fitoestimuladores o agentes de control biológico que permitan proteger la fertilidad del suelo a largo plazo.

2. Importancia de microorganismos rizosféricos en agricultura

2.1. Conceptos generales

La microbiota (componente biológico) del suelo que incluye todos los microorganismos del suelo (algas, bacterias y hongos) junto con los virus y los distintos integrantes de la microfauna (amebas, artrópodos, flagelados, nematodos y otros) juega un papel importante en la fertilidad de un suelo agrícola o en ecosistemas naturales (Barea *et al.*, 1997). La actividad y diversidad de la microbiota no solo es un factor clave en la fertilidad del suelo, sino también en la estabilidad y funcionamiento de los ecosistemas naturales y de los agroecosistemas (Olivares y Barea, 1995; Barea, 1998; Barea y Olivares,

1998). La diversidad microbiana es esencial para garantizar el ciclado de los nutrientes y los procesos de descomposición del material vegetal en cualquier ecosistema terrestre (Jeffries y Barea, 2000). De hecho, la microbiota del suelo lleva a cabo procesos de renovación de la materia orgánica así como diversas funciones ecológicas de gran importancia en el desarrollo de los agroecosistemas, de modo tal, que si esta diversidad se pierde, el precio que el sistema tendría que pagar podría resultar muy caro (Altieri, 1994). En cambio, cuando la biodiversidad se restaura, se reestablecen interacciones complejas entre suelo, planta y microorganismos que pueden resultar beneficiosas para el desarrollo de la planta.

2.2 Rizosfera

Según Kennedy (1998) en el suelo se pueden distinguir tres zonas separadas entre sí pero interrelacionadas llamadas rizosfera, rizoplana y raíz. La rizosfera es la zona de suelo afectada por la presencia de raíces que constituye un microcosmos donde proliferan gran número y diversidad de microorganismos (Kennedy, 1998) y que se diferencia del resto del suelo tanto física, química como biológicamente (Bowen y Rovira, 1999). La rizoplana es la superficie de la raíz pero también se incluyen las partículas de suelo firmemente adheridas a la superficie de esta. La raíz en sí también es parte del sistema suelo ya que, contiene microorganismos llamados endofitos que colonizan los tejidos de la raíz y lleva a cabo actividades relacionadas con la promoción del crecimiento y la protección de la planta (Kloepper, 1994; Chanway, 1996; Sturz *et al.*, 2000). La colonización microbiana de la rizoplana así como de los tejidos radicales se conoce como colonización radical mientras

que la colonización del suelo afectado por las raíces se denomina colonización rizosférica (Kloepper *et al.*, 1991).

La intensa actividad fisiológica en la rizosfera produce la estimulación del crecimiento microbiano alrededor de la raíz, debido a los exudados de una gran variedad de compuestos orgánicos, así como de las células corticales y epidérmicas en descomposición (Werner, 1998). También constituyen sustratos para los microorganismos los detritos, mucílago y lisados (Bolton *et al.*, 1993). Dentro de los exudados radicales que se encuentran en la rizosfera están los **compuestos solubles en agua** (azúcares, aminoácidos, ácidos orgánicos, hormonas y vitaminas), **secreciones** (polisacáridos y enzimas), **lisados** (provenientes de autólisis de las células) y **elementos volátiles** (etileno y CO₂). Esta amplia variedad de compuestos orgánicos ayuda a la planta a crear un entorno microbiano que juega un papel primordial en el control de crecimiento y desarrollo de la planta (Hale *et al.*, 1981), ya que no solo aumenta la población microbiana sino que también aumenta la variabilidad de microorganismos (Lynch y Whipps, 1990).

Los microorganismos de mayor relevancia para su uso en la agricultura son aquellos que van a llevar a cabo mayor cantidad de acciones beneficiosas, destacando los que van a incrementar la disponibilidad de nutrientes, así como aquellos que a través de su proceso metabólico estimulan el crecimiento vegetal.

Durante su crecimiento, las plantas interactúan con los microorganismos del suelo presentando interacciones complejas que influyen en la fertilidad del suelo y en la nutrición y salud de la planta. Por otro lado, los microorganismos rizosféricos pueden beneficiar el crecimiento y desarrollo de las plantas.

Las acciones beneficiosas implican, principalmente:

-Ciclado biogeoquímico de nutrientes incluyendo fenómenos como la fijación biológica de nitrógeno, solubilización de elementos minerales, captación de nutrientes solubles etc, que incrementan el suministro y disponibilidad de nutrientes para la planta.

-Protección de la planta frente a estreses bióticos y abióticos.

-Desarrollo de agentes de biocontrol de enfermedades de plantas mediante la prevención del crecimiento de organismos patógenos de estas.

-Producción de sustancias fitoactivas destacando las hormonas, vitaminas, y otras sustancias que estimulan el crecimiento vegetal.

-Mejora de la estructura del suelo mediante la formación de agregados estables.

-Eliminación de productos o residuos xenobioticos tales como detergentes, pesticidas, fungicidas, herbicidas, etc.

Entre los microorganismos más relevantes caben destacar los simbioses mutualistas como los hongos formadores de micorrizas y las bacterias simbióticas fijadoras de N₂ (*Rhizobium*, *Frankia* y cianobacterias), que son susceptibles de aplicación práctica (Requena, 1996).

2.3. Micorrizas

2.3.1. Conceptos generales

El término micorriza hace referencia a la asociación mutualista establecida entre determinados hongos del suelo y raíces de plantas superiores (angiospermas, gimnospermas, etc.). Se estima que aproximadamente el 96% de las especies vegetales existentes pueden formar micorrizas, y que unas 6.000 especies de hongos son capaces de

Introducción

colonizar la raíz. Dicha asociación es de tipo mutualista ya que, normalmente, incrementa la eficiencia en la adquisición de elementos minerales, principalmente fósforo, por la planta hospedadora, la que a su vez, proporciona al hongo compuestos carbonados. En un sentido general puede decirse que el sistema resultante de esta simbiosis es realmente el principal órgano de la captación de nutrientes por la mayoría de las plantas (Smith y Read, 1997).

Hoy en día se han establecido seis tipos de asociaciones micorrízicas han sido reconocidos, involucrando diferentes tipos de hongos y plantas hospederas y distintos patrones morfológicos. Estas asociaciones se engloban en tres grupos fundamentales según que el hongo colonice o no a la planta intracelularmente: ectomicorrizas, ectendomicorrizas (arbutoides) y endomicorrizas (micorrizas arbusculares, ericoides y orquidoides).

2.3.2. Micorrizas arbusculares

a) Conceptos generales

La simbiosis micorriza arbuscular (MA) tiene un carácter universal no sólo porque la forman la gran mayoría de las especies vegetales, aproximadamente 225.000 especies vegetales (pertenecientes a 11.000 géneros) pueden presentar este tipo de simbiosis incluyendo la mayoría de plantas de interés agronómico, industrial, ornamental o forestal (Linderman, 1988), sino también por su omnipresencia en casi todos los ecosistemas y climas. Debido a la imposibilidad de cultivo de los hongos arbusculares en condiciones axénicas en ausencia de raíz de planta, la clasificación de los hongos arbusculares se ha basado principalmente, en criterios morfológicos de sus esporas, por lo que su taxonomía ha sufrido cambios constantes. Según los criterios taxonómicos clásicos más actuales los

hongos formadores de micorrizas arbusculares se sitúan dentro de la clase Zigomicotina; orden Glomales, con los géneros *Acaulospora*, *Entrophospora*, *Gigaspora*, *Glomus*, *Scutellospora* y *Sclerocystis* (Morton y Benny, 1990). Sin embargo, los datos obtenidos mediante análisis de secuencia de genes, indican que es necesaria una reconsideración general de los conceptos genéricos dentro del orden Glomales con la reestructuración e inclusión de nuevas familias y géneros (Schüßler *et al.*, 2001; Schwarzott *et al.*, 2001).

Las plantas y las micorrizas arbusculares tienen un origen común, ya que existen evidencias en registros fósiles de que las plantas primitivas tenían estructuras similares a arbusculos, y se acepta que la simbiosis ha coevolucionado y se ha perpetuado con la propia planta. En base a estos estudios se aceptó el papel primordial de las micorrizas arbusculares en la evolución de las plantas superiores y en la estructuración de los ecosistemas terrestres hasta llegar a su estado actual (Pirozynski *et al.*, 1989; Simon *et al.*, 1993; Reynol *et al.*, 1994). Desde hace 350 millones de años ha existido una íntima relación entre los hongos arbusculares y las plantas (Simon *et al.*, 1993; Remy *et al.*, 1994; Taylor *et al.*, 1995), esta co-evolución ha implicado numerosas interacciones a nivel ecológico, fisiológico y molecular entre estos organismos durante el largo desarrollo de la simbiosis.

Los hongos arbusculares son biotrofos obligados, puesto que no pueden completar su ciclo de vida en ausencia de la planta hospedadora. La imposibilidad del cultivo de los hongos arbusculares dificulta tanto la producción masiva, como la utilización de estos en agricultura extensiva (Jarstfer y Silvia, 1992). Sin embargo, es posible cultivar los hongos arbusculares en cultivos estériles con explantos de raíces (Diop *et al.*, 1994) y/o con raíces transformadas por *Agrobacterium rhizogenes* (Becard y Fortin, 1998).

b) Formación de la simbiosis

El hongo MA se mantiene en el suelo en forma de esporas de resistencia o 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 (Daniels, 1984). Los factores esenciales para la germinación de AM esporas no deben de ser señales provenientes de la planta hospedadora ya que los hongos arbusculares son capaces de germinar en cultivos axénicos en ausencia de la planta (Mugnier y Mosse, 1987).

Por otro lado, las raíces no hospedadoras y sus exudados no producen efecto sobre la germinación de espora o el desarrollo de micelio por lo que se sugiere que los efectos de inducción de crecimiento son dependientes del hospedador (Giovannetti y Sbrana, 1998). 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 (Siquiera *et al.*, 1991). Sin embargo, estudios recientes han puesto de manifiesto que aunque los flavonoides pueden estimular el desarrollo del hongo no son necesarios para el establecimiento de la simbiosis (Bécard *et al.*, 1995). Además, es poco probable que los flavonoides puedan ser considerados como señales universales ya que solo se han encontrado en una pequeña parte de las plantas que son capaces de formar simbiosis.

Aunque, de momento no se conozcan las señales moleculares que activen el ciclo de vida de las esporas parece que la humedad, temperatura, pH, sustancias nutritivas y microorganismos del suelo parecen ser los factores fundamentales que desencadenaría la germinación (Giovannetti, 2000). Las raíces y sus exudados influyen sobre el crecimiento

de las hifas dependiendo de la planta y de la especie de hongo arbuscular (Ishii *et al.*, 1997).

El hongo desarrolla un conjunto de hifas que colonizan el suelo a partir de la espora germinada (Sanders *et al.*, 1983). Cuando una de estas hifas llega a la rizosfera de una planta susceptible, cambia su morfología, se ramifica abundantemente y forma un apresorio en la superficie de la raíz (Giovannetti *et al.*, 1993; 1994). La formación del apresorio es un evento decisivo para el reconocimiento entre ambos componentes de la simbiosis y para el inicio de la infección de la raíz. La no formación del apresorio en plantas no hospedadoras impidió que las hifas del hongo arbuscular *Glomus mosseae* se enganchen a las raíces (Giovannetti *et al.*, 1993). Otros estudios mostraron que la formación del apresorio 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 observado su formación en paredes celulares aisladas de células transformadas de zanahoria cuando se inocularon con esporas de *Gigaspora margarita* (Nagahshi *et al.*, 1997).

Aunque los modelos varían dependiendo de las especies de hongo y plantas implicadas, la colonización de la corteza radical por un hongo MA transcurre, generalmente según el siguiente modelo: La hifa de penetración avanza entre o a través de las células de la epidermis y se extiende hacia la corteza de la raíz. Cuando la penetración es intracelular, las hifas mediante un enrollamiento forma estructuras intracelulares no ramificadas llamadas ovillos (Barea *et al.*, 1991). Cabe mencionar que en cualquier colonización intracelular el hongo no perfora la membrana plasmática de la célula colonizada sino que se invagina en torno a él. Según el tipo de penetración se distinguen dos tipos principales de micorriza, el tipo Paris y el tipo Arum. En el tipo Paris el hongo penetra de forma intracelular. La formación tipo Paris lo forman plantas tropicales en su mayoría, que no

dejan canales de aire entre las células corticales por los que puede avanzar el hongo MA, por eso la extensión del hongo dentro de la raíz es muy lenta mediante el paso célula-a-célula. En el tipo Arum la penetración es intercelular y lo forman la mayoría de las plantas que crecen en climas templados y en el que las células del cortex de la raíz dejan canales de aire entre ellas por lo que el crecimiento y la colonización son mucho más rápidos. Por ser este último el tipo de micorriza más frecuentemente descrito en la bibliografía científica, será en el que nos centraremos en el resto de esta revisión bibliográfica.

Las hifas siguen su desarrollo longitudinalmente por los espacios intercelulares y en las zonas más internas del parénquima cortical se ramifican lateralmente, penetran en las células y se dividen de forma dicotómica repetida, formando una estructura en forma de árbol característica de este tipo de simbiosis, llamada arbusculo, incluso algunos hongos MA desarrollan vesículas ricas en lípidos dentro de la raíz, y que actúan posiblemente como órganos de reserva del hongo (Smith y Read, 1997).

c) Mecanismos de penetración y desarrollo de la simbiosis

Se desconocen los mecanismos por los que los hongos arbusculares entran y colonizan los tejidos vegetales. Las diferentes etapas en el proceso de infección como la formación de puntos de entrada y la colonización intracelular necesitan la penetración de las paredes celulares vegetales por las hifas fúngicas.

Generalmente se ha especulado que la penetración de los hongos biotróficos en la raíz se producía de forma mecánica. Así, se ha descrito que el hongo no micorrízico *Magnaporthe grisea*, genera una gran presión en los puntos de penetración (Howard y Ferrari, 1989), que permitiría al hongo perforar las paredes del hospedador mediante la

formación de puntos de penetración (Smith y Read, 1997). Por otro lado, se sabe que algunos componentes de la pared celular, como la melanina, juegan un papel importante en el incremento de la presión hidrostática ya que actúan reteniendo determinados solutos en el apesorio, haciendo que el agua sea absorbida como consecuencia del aumento del gradiente osmótico (Howard y Ferrari, 1989).

La mayoría de los hongos y bacterias fitopatógenas producen enzimas hidrolíticos capaces de degradar polisacáridos de la pared celular, como la pectina, celulosa y hemicelulosa. Estos enzimas juegan un papel fundamental en la patogénesis (Hahn *et al.*, 1989; Hayashi, 1989; Walton, 1994). Las poligalacturonasas juegan un papel clave en la infección patogénica permitiendo al hongo colonizar la raíz del hospedador y obtener nutrientes a partir de la degradación de sustratos pécticos. Además estas poligalacturonasas pueden producir oligogalacturonidos, moléculas responsables de la inducción de una respuesta defensiva en la planta (Bonfante y Perotto, 1995).

Muchos de los enzimas que degradan la pectina, celulosa y hemicelulosa de la pared celular vegetal se producen en epicotilos, cotiledones, y en frutos. Sin embargo son escasos los estudios sobre la presencia de estos enzimas en las raíces de plantas así como en los procesos de penetración y desarrollo de los microorganismos simbióticos en las raíces de estas (Collmer *et al.*, 1991; Fry *et al.*, 1992; Maclachlan y Brady, 1992; Carpita, 1996). Se ha descrito que la infección de las raíces por microorganismos mutualistas, como *Rhizobium* y *Azospirillum* parece estar mediada por enzimas hidrolíticos de la pared celular (Umali-García *et al.*, 1980; Mateos *et al.*, 1992; Jiménez-Zurdo *et al.*, 1996).

El hecho de que el hongo MA durante el establecimiento de la simbiosis intracelular penetre en las paredes celulares de la planta por el sitio de contacto indica que los enzimas hidrolíticos pueden estar implicados en el proceso de colonización AM (Bonfante-Fasolo y

Perotto, 1992). Sin embargo, debido a la imposibilidad del cultivo axénico de estos hongos en ausencia de las raíces de la planta y a los bajos niveles de actividad hidrolítica producida, tal y como ocurre con otros microorganismos mutualistas, ha sido difícil confirmar la producción de estas enzimas hidrolíticas por el hongo MA y su posible participación en la colonización de las raíces. No obstante, se ha demostrado la producción de pectinasas, celulasas y xiloglucanas tanto en el micelio externo como en las raíces micorrizadas, por lo que se piensa que el hongo MA coloniza los tejidos de la raíz de su planta hospedadora utilizando mecanismos enzimáticos (García-Garrido *et al.*, 2002). Por otro lado, se ha descrito como consecuencia de la formación de la simbiosis un aumento en la expresión de un gen de la planta que codifica una xiloglucano endotransglucosilasa, enzima implicada en la relajación de la pared celular de la planta hospedadora durante la colonización (Van Buuren *et al.*, 1999).

Durante la penetración del hongo arbuscular en las células epidérmicas o en su desarrollo a través de la lámina media del tejido parenquimal, solo se observaron cambios localizados en la textura de la pared lo que sugiere que la producción de enzimas degradativas de la pared es muy limitada (Gianinazzi-Pearson *et al.*, 1995). A diferencia de los hongos patógenos, en los que la producción de estas enzimas es muy abundante (Walton, 1994), los hongos arbusculares producen una cantidad muy limitada de enzimas hidrolíticas (García-Romera *et al.*, 1996), por lo que no se llega a producir la degradación total de las paredes celulares de la raíz, sino tan solo una desorganización de sus componentes. La producción débil y localizada de estas enzimas hidrolíticas asegura que no sean un elemento agresivo y generador de respuesta defensiva, lo que contribuye a mantener la viabilidad del hospedador permitiendo la compatibilidad entre la planta y el hongo (Varma, 1999).

d) Fisiología de las micorrizas

Las micorrizas MA juegan un papel primordial sobre el crecimiento, desarrollo y nutrición de las plantas aumentando la biomasa vegetal de estas, debido principalmente a un incremento en el contenido y, frecuentemente, la concentración de algunos nutrientes minerales en los tejidos vegetales. 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 asimilable del suelo, que es 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).

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 *et al.*, 1991; Jakobsen, 1995). 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 Gianinazzi-Pearson, 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, 1984; Jakobsen, 1995).

Las hifas externas de los hongos MA captan moléculas de ortofosfato (Pi) a partir de la fracción soluble del suelo. Se sugiere la existencia de dos sistemas de captación de

fósforo en hongos arbusculares (Beever y Burn, 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. La energía necesaria para el transporte activo de P del suelo al hongo se generaría por una ATPasa- H^+ presente en la membrana plasmática (Lei *et al.*, 1992). Una vez que las hifas externas han captado el P del suelo, este es translocado a lo largo del micelio del hongo mediante transporte activo, para ser finalmente transferido a las células corticales de la raíz (Harrison *et al.*, 1995). 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 Gianinazzi, 1989), probablemente por su degradación mediante polifosfatasas, cuya actividad se localiza en el micelio interno del hongo, o bien mediante polifosfato quinasas (Solaiman *et al.*, 1999). 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).

En estudios más recientes, se han clonado tres ADNcs (ADNs complementarios), MtPT1 y MtPT2 (Liu *et al.*, 1998), y Mt4 (Burleigh y Harrison, 1997), que codifican transportadores de fosfato de la 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 *et al.*, 1998). Esta represión se detectó a partir de las primeras etapas de la simbiosis, lo que confirma la existencia de señales específicas que controlan la expresión de ciertos genes implicados en la captación y transporte de fósforo durante el establecimiento de la micorriza arbuscular (Burleigh y Harrison, 1997).

Las células corticales de la planta captan el P liberado por el hongo en la interfase arbuscular mediante un mecanismo activo, en el que muy probablemente estén implicadas ATPasas (Marx *et al.*, 1982; Gianinazzi-Pearson *et al.*, 1991; Gianinazzi-Pearson, 1995). Esta actividad ATPasa se ha detectado tanto en la membrana plasmática del hongo como de la planta y en la matriz interfacial asociada a arbusculos jóvenes (Gianinazzi-Pearson *et al.*, 1991). Los niveles de esta actividad decrecen en el caso de arbusculos senescentes y no se encuentra actividad en la membrana periarbuscular del hospedador que rodea los arbusculos no funcionales (Gianinazzi-Pearson *et al.*, 1995).

El incremento de la actividad ATPasa en las plantas micorrizadas constituye un hecho diferente al 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 hacia el hongo patógeno (Smith y Smith, 1990). Tampoco se ha podido detectar la actividad ATPasa en mutantes resistentes a micorrizas, en los cuales el hongo puede formar hifas intercelulares pero no puede desarrollar los arbusculos (Lehrminier, 1993). Esto confirma el hecho de que el arbusculo es necesario para el intercambio de nutrientes 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 de la planta (Murphy *et al.*, 1997). Este resultado confirma el incremento de

la actividad ATPasa de la membrana periarbuscular, potenciado también por la proliferación extensiva de dicha membrana.

Uno de los factores más importantes implicados en el control de la colonización de raíces son los niveles de P del suelo y planta ya que a altas concentraciones de P inhiben la colonización arbuscular (Smith *et al.*, 1994). La actividad fosfatasa alcalina de distintas especies de *Glomus* disminuye en presencia de niveles altos de P (Guillemín *et al.*, 1995; Tisserant *et al.*, 1996), lo que podría sugerir que estas enzimas puedan estar implicados en la regulación de la colonización de raíces mediante el contenido de las plantas en P. Sin embargo, en suelos con una concentración alta de P disminuye la colonización de raíces por especies de *Gigaspora* pero no se afecta la actividad fosfatasa alcalina (Boddington y Dodd, 1999). El mecanismo por el que el contenido de P del hospedador regula la colonización arbuscular de la raíz aún no se conoce.

En diversos estudios se han puesto de manifiesto incrementos en la concentración de N captado del suelo en planta, como consecuencia de la formación de micorrizas (Johansen *et al.*, 1992; Tobar *et al.*, 1994a; 1994b; Ibijbjen *et al.*, 1996). Debido a la movilidad del ión nitrato, rara vez se producen zonas de agotamiento de este en el suelo, sin embargo en suelos ligeramente ácidos donde la forma de N más importante es el amonio, ión poco móvil, si se pueden observar zonas de agotamiento. La simbiosis micorriza jugaría un papel importante en la captación de N en suelos donde se encuentre en concentraciones bajas (Gianinazzi-Pearson y Azcón-Aguilar, 1991). Se ha demostrado la capacidad del micelio de hongos MA para captar NO_3^- , especialmente en condiciones de baja difusibilidad (escasez de agua) (Tobar *et al.*, 1994b). También se han descrito incrementos en la actividad de determinadas enzimas implicadas en la asimilación del N, concretamente la nitrato reductasa en plantas micorrizadas (Azcón y Tobar, 1998).

En general, los efectos directos de la simbiosis sobre la nutrición mineral están limitados a aquellos nutrientes que son pocos móviles y están presentes en bajas concentraciones en la solución del suelo, como es el caso del Zn, Cu, S, K, Mn y Fe (Cooper, 1984; Kothari *et al.*, 1990; Thompson, 1990).

También se ha descrito que las micorrizas juegan un papel destacado en aspectos no nutritivos de la planta como su salud y su desarrollo. Entre estos aspectos cabe destacar:

1) Las MA mejoran las relaciones hídricas de plantas e incrementan su resistencia al estrés hídrico. Los mecanismos mediante los cuales las MA incrementan la resistencia a la sequía, pueden ser el mantenimiento de un potencial de agua más elevado en la planta, menor resistencia al transporte de agua, ritmos de transpiración superiores (Sánchez-Díaz y Honrubia, 1994), efectos indirectos de la captación de las hifas de nutrientes como N (Frey y Schüepp, 1993; Tobar *et al.*, 1994a) o cambios fisiológico (Al-Karaki *et al.*, 1997) u hormonales (Ebel *et al.*, 1994; Goicoechea *et al.*, 1995, 1996) producido en la planta hospedadora que indirectamente incrementa su resistencia a la sequía

2) Alteración del balance hormonal (Smith *et al.*, 1994). El balance hormonal en plantas micorrizadas se altera respecto a plantas no micorrizadas, tanto en cantidad de hormonas como en su distribución en los tejidos vegetales (Beyrle, 1995). Este efecto se ha puesto de manifiesto con el ácido abscísico (Levy y Krikun, 1980; Dixon *et al.*, 1988; Goicoechea *et al.*, 1995), las citoquininas (Allen *et al.*, 1980; 1982) y otras sustancias que pueden alterar la morfología y fisiología de la raíz (Atkinson *et al.*, 1994).

El incremento de las citoquininas en las plantas micorrizadas puede deberse a: que el hongo la produzca y la transloque a la planta, que el hongo inhiba su degradación, que sea el resultado de la mejora nutricional de la planta o también puede ser consecuencia de la respuesta a una señal del hongo (Hirsch *et al.*, 1997). Otra fitohormona que parece alterarse

por la simbiosis micorriza arbuscular es el etileno, ya que su nivel disminuye en plantas micorrizadas (McArthur y Knowles, 1992). El efecto de la micorriza arbuscular sobre el etileno parece estar relacionado con el efecto nutricional de la simbiosis.

3) Aumento de la tasa fotosintética que podría ser debido a la formación de compuestos que influyen en la estructura y/o función de los cloroplastos, entre los cuales podrían estar implicados las fitohormonas (Wright *et al.*, 1998). También se sabe que la disponibilidad de fosfato inorgánico puede limitar la tasa fotosintética por estar este nutriente implicado directamente en la regulación de la fotosíntesis.

4) Alteraciones en la distribución de la fitomasa, ya que el aumento en la captación de nutrientes y su subsiguiente translocación a la parte aérea de la planta hace que se incremente la utilización de los fotosintatos en la misma, por lo que la cantidad de fotosintatos transferidos a raíces es relativamente menor.

5) Mayor resistencia de las plantas a la salinidad, incrementando la concentración de K^+ en plantas micorrizadas, que induce una relación K^+/Na^+ más alta que en plantas no micorrizadas, lo que resulta en una protección frente al efecto negativo del Na^+ en los tejidos vegetales.

6) Inducción de una menor susceptibilidad de las raíces, o una mayor tolerancia, a ciertos microorganismos patógenos. Ello puede ser ejercido mediante distintos mecanismos. Uno sería de tipo nutritivo, ya que debido al incremento en la captación de nutrientes, la planta se encuentra en una mejor situación fisiológica para hacer frente al patógeno. De otro lado, la micorriza puede actuar directamente protegiendo al sistema radical o indirectamente activando los mecanismos de defensa de la planta (Gianinazzi-Pearson, 1996; Pozo *et al.*, 1998; 1999).

e) Función y regulación de los mecanismos de defensa de la planta frente a la colonización micorrízica

Generalmente, los hongos arbusculares muestran poca o ninguna especificidad a la hora de colonizar las raíces de las plantas hospedadoras; los factores que determinan la presencia de la colonización parecen depender del genotipo de la planta hospedadora (Koide y Schreiner, 1992). Evidencia de este fenómeno la demuestra la existencia de especies de plantas no hospedadoras (Giovannetti y Sbrana, 1998) y de plantas mutantes *Myc*⁻ incapaces de formar una simbiosis micorrízica (Gollote *et al.*, 1993).

La penetración y el crecimiento de los hongos MA en la raíz implica una serie compleja de procesos bioquímicos y citológicos así como, modificaciones intracelulares, que indican que el hongo debe ser claramente reconocido por la planta hospedadora (Bonfante, 2001). Los mecanismos que controlan el desarrollo del hongo MA han sido poco estudiados, sin embargo, se sugiere que, como en interacciones patógeno-planta, la supresión e inducción de mecanismos asociados a la defensa de la planta juegan un papel clave en los procesos de colonización y en la compatibilidad con la planta hospedadora.

La clave para entender el fenómeno de compatibilidad en la simbiosis MA conlleva el estudio de los mecanismos de reconocimiento y las moléculas implicadas en las primeras etapas de la interacción MA. En este sentido, la formación del apresorio es una de las primeras señales morfológicas de reconocimiento entre la planta y el hongo. Algunos autores sugieren que las reacciones de defensa de la planta ocurren solo después de la formación del apresorio cuando el hongo cambia su estado saprofitico a infectivo (Giovannetti *et al.*, 1994).

Debido a que la mayoría de los hongos MA mostraron poca o nula especificidad, no se pensó en la inducción de respuestas de defensa por la planta hospedadora. Sin embargo, el estudio de algunos marcadores de resistencia de la planta en las interacciones compatibles hongo MA-raíces, se ha descrito la activación temprana de ciertos genes de defensa de la planta (Gianinazzi-Pearson *et al.*, 1996). El hecho de que la planta hospedadora pueda producir una respuesta débil de defensa frente a la invasión del hongo, indicaría que se trata de un mecanismo natural para controlar el número y/o localización de los puntos de infección. Además, se han descrito algunos fenómenos de supresión de las respuestas de defensa en raíces micorrizadas (Volpin *et al.*, 1995; David *et al.*, 1998). Si esta supresión es sistémica o restringida al área infectada o si los productos de los genes de plantas relacionados con la simbiosis suprimen los genes de defensa directamente o mediante la activación de supresores derivados de hongos esta aún por aclarar. Actualmente, no se conoce cómo la inducción/supresión de los mecanismos asociados con la resistencia de la planta puedan participar en el fenómeno de compatibilidad entre las raíces de la planta y el hongo arbuscular.

Un mecanismo posible para atenuar la respuesta de la defensa de la planta en la simbiosis MA, puede ser la degradación de las moléculas inductoras de defensa exógenas producidas por los hongos MA y/o la prevención de la liberación de moléculas endógenas a partir de la pared celular de las plantas por los hongos MA. Teóricamente, los enzimas hidrolíticos regulan ambos procesos ya que las hidrolasas de las plantas pueden degradar los inductores fúngicos mientras que los enzimas fúngicos pueden hidrolizar los componentes liberados a partir de la pared celular de la planta. Se postula un modelo hipotético de regulación de la simbiosis MA por las hidrolasas. Durante el desarrollo de la colonización, se expresan regularmente quitinasas, quitosanasas y β -1,3-glucanasas

(hidrolasas potenciales de las moléculas inductoras fúngicas) de tal modo que apuntan hacia un papel central de estas enzimas en la formación de la micorriza (Dumas-Gaudot *et al.*, 1992; Dassi *et al.*, 1996; Pozo *et al.*, 1998; Salzer *et al.*, 2000). Además, se ha observado la inducción de una respuesta de defensiva de la planta por un inductor liberado a partir de un extracto del micelio extraradical de *G. intraradices* (Lambais, 2000). También se han descrito diferencias en la inducción de la respuesta de la planta frente a los extractos de compuestos fúngicos tanto intra como extraradicales. Sin embargo, el factor o los factores responsables de la atenuación de la actividad de los inductores de defensa no han sido identificados, aunque los datos sugieren que este efecto no está relacionado con la actividad quitinasa en la raíz. Por otro lado, otros autores sugieren un mecanismo similar para la degradación de las moléculas inductoras y la atenuación de la defensa de la planta en la simbiosis AM que implica la regulación diferenciada de las quitinasas por la planta hospedadora (Salzer y Boller, 2000; Salzer *et al.*, 2000). Estos autores propusieron que las quitinasas de la planta expresadas constitutivamente, en las primeras etapas, y las isoformas específicas de quitinasa en las fases posteriores del desarrollo de la micorriza, eran las enzimas responsables de la degradación de los inductores (Salzer y Boller, 2000).

Un mecanismo a considerar para la regulación de la defensa puede ser la prevención de la formación de moléculas inductoras endógenas. Si es así, la producción de inductores endógenos derivados de la degradación de la pared celular no parece ser un mecanismo eficaz para la inducción de la respuesta de la defensa de la planta. La evidencia que apoya esta hipótesis es que los hongos arbusculares producen muy poca cantidad de enzimas degradativos de la pared celular de las plantas (García-Romera *et al.*, 1991a; García-Garrido *et al.*, 1992a). Además, estas enzimas producidas por raíces micorrizadas mostraron similares características electroforéticas y bioquímicas que los enzimas

producidos por raíces de plantas no micorrizadas (García-Garrido *et al.*, 1996; García-Romera *et al.*, 1997; García-Garrido *et al.*, 2000). Esto sugiere que el papel de los enzimas fúngicos se limita selectiva y específicamente a romper los componentes de la pared celular de la planta para la penetración del hongo, pero no a la participación inespecífica y no coordinada del proceso de degradación de la pared celular de la planta, que podría producir inductores endógenos.

Por otro lado, en la colonización intracelular de los hongos arbusculares se forma una interfase nueva entre el hongo y la célula vegetal compuesta por membranas de ambos componentes y separadas por material apoplástico que contiene moléculas de celulosa, pectina, xiloglucano, y HRGP que no están estructuradas (Bonfante, 2001). La actividad lítica de la planta y/o de enzimas fúngicos sobre estas moléculas podría generar oligo-fragmentos que actuarían como inductores de una respuesta de defensa localizada de la planta a nivel arbuscular.

f) Interacciones de las micorrizas arbusculares con microorganismos rizosféricos

Los organismos en la naturaleza no existen como entes aislados, sino que forman parte de comunidades interactivas; de hecho, la diversidad natural existente en los distintos ecosistemas puede ser crucial para el mantenimiento de la productividad y estabilidad de los mismos (Kennedy y Smith, 1995). Las interacciones microbio-microbio son claves en el desarrollo y función de la rizosfera. Así, las poblaciones de microorganismos pueden actuar entre sí de manera sinérgica, neutra o antagónica (Stoztky, 1972).

Teniendo en cuenta que la mayoría de las plantas de interés agronómico, pascícola y forestal, están micorrizadas, y dada la universalidad de esta simbiosis, es lógico pensar que

siempre van a haber interacciones en las que estén involucrados los hongos de la micorriza. Muchos estudios ponen de manifiesto que los hongos formadores de micorrizas arbusculares pueden alterar la microbiota del suelo (Ames *et al.*, 1984; Meyer y Linderman, 1986b; Cecilia y Bagyaraj, 1987; Linderman, 1992; Christensen y Jakobsen, 1993; Andrade *et al.*, 1997; 1998a; 1998b), ya sea por estimular o bien por reducir el número total de microorganismos o de un determinado grupo de ellos. La principal razón que justifica los cambios cuantitativos y/o cualitativos en las poblaciones rizosféricas es la modificación de los exudados radicales como consecuencia de la micorrización, dando lugar a la formación de la llamada micorrizosfera (Linderman, 1992). Del mismo modo, los microorganismos del suelo pueden favorecer (Ames, 1989; Azcón *et al.*, 1990; Staley *et al.*, 1992; Vejsadova *et al.*, 1993; Balota *et al.*, 1995; Ratti y Janardhanan, 1996; Balota *et al.*, 1997; Bashan y Holguin, 1997) o bien antagonizar (Azcón *et al.*, 1990; Dhillon, 1992; Germida y Walley, 1996) el desarrollo y función de la micorriza, actuando sobre la formación de puntos de entrada, sobre las raíces de la planta hospedadora, o sobre el desarrollo y efecto de la simbiosis.

La estimulación de la formación y función de las MA puede ser consecuencia de la actividad microbiana en la rizosfera mediante la alteración de la disponibilidad de nutrientes para la planta, debido a reacciones bioquímicas. Al mismo tiempo los microorganismos producen sustancias biológicamente activas reguladoras del crecimiento vegetal como vitaminas, enzimas, aminoácidos, hormonas vegetales y otros compuestos orgánicos (Lynch, 1990; Glick, 1995; Bashan y Holguin, 1997). Entre estas sustancias existen compuestos que incrementan la permeabilidad celular, que mediante distensión de las paredes celulares pueden incrementar el nivel de exudación radical, lo cual podría estimular al hongo MA en la rizosfera y facilitar la colonización de la raíz.

2.4. Hongos saprobios

Las comunidades de hongos saprobios en la gran mayoría de los suelos con cobertura vegetal, aportan la mayor biomasa microbiana al suelo. En determinados ambientes, la extensa red de micelio que explora grandes volúmenes de suelo, puede llegar a valores de varios cientos de metros por cada gramo de suelo (Elmholt y Kjoller, 1987). Esta extensa red de micelio en el suelo tiene un papel preponderante en la mineralización del carbono y nitrógeno orgánico. También promueve la agregación de partículas, mejorando la estructura del suelo, lo que favorece una mejor aireación del mismo que beneficia el crecimiento vegetal (Lynch y Bragg, 1985).

Los hongos saprobios tienen la capacidad de utilizar una gran variedad de fuentes carbonadas, desde azúcares simples, como hexosas o pentosas, hasta moléculas más difíciles de degradar como ácidos orgánicos, disacáridos, pectina, celulosa y lignina, que es particularmente resistente a la degradación bacteriana. El nitrógeno que utilizan proviene mayormente del amonio o nitrato, aunque también pueden utilizar proteínas, ácidos nucleicos u otros compuestos nitrogenados.

Los suelos son generalmente un medio pobre para el crecimiento de hongos saprobios debido a las muy bajas concentraciones de sustratos aprovechables. Las condiciones del medio se tornan más adversas debido al antagonismo con otros microorganismos del suelo. Muchas especies de hongos saprobios son oligotróficas en estas condiciones y desarrollan hifas muy delgadas que utilizan las distintas fuentes de carbono orgánico de baja concentración, presentes en la solución del suelo (Wainwright, 1993).

La distribución de los hongos saprobios en el suelo no es homogénea; existen numerosos factores que condicionan el crecimiento y establecimiento de las distintas

comunidades fúngicas. El número de propágulos fúngicos, así como la diversidad de especies decrece marcadamente a mayores profundidades del suelo. Cambios en las condiciones físico-químicas del suelo a medida que aumenta la profundidad determinan esta disminución de las poblaciones fúngicas. Por otra parte, los hongos saprobios del suelo siguen en forma paralela la distribución de la materia orgánica, la cual disminuye drásticamente en los horizontes minerales de mayor profundidad. Por otro lado, existen también variaciones estacionales de las comunidades fúngicas del suelo y la diferente cobertura vegetal de cada ecosistema determina también la composición de las poblaciones fúngicas del suelo (Bissett y Parkinson, 1979; Christensen, 1981).

Trichoderma y *Gliocladium* son géneros de hongos saprobios que se encuentran frecuentemente en los suelos y que han mostrado gran capacidad como agentes de control biológico frente a otros hongos causantes de enfermedades en raíces, dando como resultado una mejora del crecimiento vegetal (Datnoff *et al.*, 1995). Numerosas especies de *Trichoderma* han resultado ser eficientes antagonistas frente a una amplia variedad de patógenos vegetales presentes en el suelo, entre los que podemos incluir *Verticillium* spp. (Calvet *et al.*, 1992) y los hongos de la marchitez (Trillas-Gay *et al.*, 1986), entre otros.

La inhibición de la colonización o del ataque por hongos patógenos puede ser ejercida bien de forma directa, lo que implica la interacción entre los dos hongos mediante micoparasitismo (Goldman *et al.*, 1994; Jeffries, 1995), o por producción de compuestos antimicrobianos (Howell *et al.*, 1993), o bien puede ser ejercida de forma indirecta mediante la inducción de mecanismos de defensa en la planta (Wyss *et al.*, 1992; Jeffries, 1995).

La creciente utilización de hongos saprobios como biocontroladores de distintos patógenos radicales, ha desencadenado el interés sobre el efecto que puedan tener estos

hongos sobre la micorrizosfera (Calvet *et al.*, 1992; García-Romera *et al.*, 1998; Fracchia *et al.*, 1998; Fillion *et al.*, 1999; Fracchia *et al.*, 2000). Conociendo el efecto de estas cepas sobre el desarrollo de la simbiosis de micorrizas arbusculares podremos manipular las poblaciones de microorganismos a favor de un mayor crecimiento vegetal.

2.5 *Rhizobium*

Las bacterias de la familia Rhizobiaceae (*Rhizobium*, *Bradirhizobium*, *Azorhizobium* y *Sinorhizobium*) se caracterizan por su capacidad de establecer simbiosis mutualistas fijadoras de nitrógeno con plantas leguminosas suministrando a la planta una fuente de nitrógeno exclusiva, el dinitrógeno atmosférico, fijado de forma estable e incorporado a la planta como aminoácidos o proteínas.

En el caso de las bacterias del genero *Rhizobium*, la simbiosis esta marcada por la producción en las raíces de las leguminosas de nódulos, considerados como verdaderos órganos fijadores de nitrógeno ya que ahí donde tiene lugar la fijación simbiótica de nitrógeno. La importancia de esta simbiosis no solo reside en la cantidad de nitrógeno fijado que aportan a la biosfera sino también en la importancia agronómica de las leguminosas, que constituyen una de las principales fuentes de proteínas para la alimentación humana y animal.

Antes de su colonización por *Rhizobium*, los pelos radicales de la raíz de la planta huésped se ramifican y se elongan, las moléculas de tipo flavonoide exudadas por la planta inducen la expresión de los genes de nodulación (nod) y la subsiguiente síntesis de señales o factores nod, se trata de compuestos de tipo lipoquito-oligosacáridos que inducen en la raíz la formación de meristemas cuyo crecimiento organizado dará lugar al nódulo (Mylona

et al., 1995). Estos exudados radicales promueven además en *Rhizobium* la producción de polisacáridos de naturaleza diversa que se acumulan en la superficie de la bacteria. La adhesión de la bacteria a la raíz parece estar mediada por alguno de estos compuestos superficiales (Dazzo y Truchet, 1983; Díaz *et al.*, 1989). A través de los canales de infección, las bacterias acceden hacia el interior del nódulo, donde se quedan rodeadas por células vegetales, en cuyo interior las bacterias pierden la movilidad y se diferencian en bacteroides que es donde se utilizan los compuestos fotosintetizados por la planta como fuente de energía para llevar a cabo la reducción del dinitrógeno atmosférico a amonio utilizado por la planta para su metabolismo (Whitehead y Day, 1997).

La cantidad de N que un sistema simbiótico puede fijar va a depender de múltiples factores tales como el genotipo de los simbioses, condiciones ambientales, tratamientos químicos, fisicoquímicos y biológicos, prácticas agronómicas, etc. Un factor muy importante a este respecto es la disponibilidad de P, cuya deficiencia limita el potencial de fijación biológica de Nitrógeno, tanto a nivel de formación de nódulos como a nivel de fijación de N₂ en sentido estricto (Giller y Cadisch, 1995). Se sabe que cuando la concentración de P en la planta no llega al 0,2 % con respecto al peso seco de ésta, la nodulación y la actividad nitrogenasa se disminuyen drásticamente, e incluso no se forman nódulos cuando la concentración de P cae por debajo de 0,15 % (Mosse *et al.*, 1976).

Un factor limitante de gran interés es el efecto negativo de dosis moderadas o altas de N combinado, que, no sólo puede inhibir el establecimiento de la simbiosis, sino también su rendimiento, impidiendo la nodulación, o bien en el caso de que esta llegara a producirse, la fijación (Streeter, 1988). Otros factores que pueden limitar la potencialidad de la simbiosis son: la acidez del suelo (pH), salinidad, contenido en materia orgánica etc (Lluch y Ocaña, 1997).

Las bacterias fijadoras de nitrógeno son de suma importancia ya que son capaces de incorporar a la biosfera prácticamente la misma cantidad de N que pasa a la atmósfera por desnitrificación y este aporte de N al suelo es superior al suministrado por los fertilizantes nitrogenados y la fijación química natural.

3. Pared celular

La pared celular es el rasgo más característico de las células vegetales. Es posible identificar distintos tipos de células en vegetales superiores por la estructura de sus paredes, poniendo de manifiesto la estrecha relación que existe entre estructura de la pared y función de la célula a la que esa pared pertenece.

La función mejor conocida de la pared celular es la de proporcionar un recinto protector a la célula, determinando el tamaño y la forma de la misma, sin embargo, la pared hace algo más que proporcionar resistencia y forma. Así, controla el crecimiento celular en gran parte, por un relajamiento selectivo de ciertas áreas de la misma. Esta pérdida de rigidez está sometida a un control estricto y, salvo que la presión ejercida por las células vecinas sea demasiado grande, permite la expansión de la célula en una o más dimensiones, sin pérdida de la integridad estructural de la pared. Por otra parte, representa una barrera contra la entrada en el citoplasma de organismos potencialmente patógenos. Así, cuando las paredes celulares de las plantas se ven expuestas al ataque por microorganismos, hay una interacción considerable entre moléculas de origen microbiano y vegetal. Estas interacciones moleculares determinan el éxito o fracaso de la invasión de la planta por el microorganismo. Por último, las paredes celulares son también una fuente de moléculas con

actividad biológica (oligosacarinas), implicadas en el control de los mecanismos de defensa, morfogénesis y crecimiento inducido por auxinas.

3.1. Composición química

La pared celular primaria es una estructura rígida pero dinámica compuesta de cantidades similares (alrededor de un 30% de cada uno) de celulosa, hemicelulosas y sustancias pécticas. Además de los polisacáridos, las paredes celulares contienen un 10% de glicoproteínas (enzimas y glicoproteínas ricas en hidroxiprolina) y una pequeña proporción de compuestos fenólicos (Bonfante, 1988; Brummell *et al.*, 1994). La pared celular está formada por un entramado de microfibrillas cristalinas de celulosa embebido en una masa amorfa de material péctico y hemicelulósico. En los últimos estadios de desarrollo las paredes pueden presentar también grandes cantidades de lignina. En los órganos aéreos las paredes celulares suelen encontrarse recubiertas de ceras, cutina y suberina.

3.1.1. Celulosa

La celulosa es el polisacárido de pared celular más abundante y mejor conocido. Químicamente la celulosa está formada por cadenas lineales de unidades de glucosa enlazadas mediante uniones β 1-4, estas cadenas aparecen como agregados fibrilares cristalinos que le confieren a la pared la mayor parte de su enorme resistencia. Las fibrillas de celulosa se unen mediante puentes de hidrógeno de al menos 36 cadenas y

posteriormente se asocian fuertemente con las hemicelulosas de la pared (Fisher y Bennett, 1991).

3.1.2 Pectinas

Las pectinas y los polisacáridos relacionados proporcionan un material protector a las células de la planta. El término pectina abarca un grupo complejo de polisacáridos, algunos de los cuales pueden constituir dominios estructurales de moléculas grandes y complejas. La fracción clásica de la pectina contiene 23% de ácido galacturónico. Anteriormente se pensaba que la pectina estaba formada de residuos de ácido galacturónico enlazados mediante uniones α -D-1,4, sin embargo actualmente, todas las evidencias sugieren que otros azúcares pueden estar unidos covalentemente a la columna del ácido poligalacturónico y/o incluso formar parte de la cadena principal (Dey y Harborne, 1995; Reid, 1995).

3.1.3. Hemicelulosas

Las hemicelulosas son una parte importante de todas las paredes celulares de las plantas, cerca del 25% del peso seco total de las especies anuales y hasta un 40% en especies arbóreas. Las hemicelulosas la forman cadenas de azúcares sin organización fibrilar que están unidas a las microfibrillas de la celulosa mediante enlaces débiles de hidrógeno. En las paredes celulares primarias de dicotiledóneas, las hemicelulosas

principales son los xiloglucanos y arabinosilanos; mientras que en monocotilédneas son los arabinosilanos y glucanos β -(1-3,1-4) (Fry, 1989).

El xiloglucano es un polisacárido estructural compuesto por glucosas unidas mediante enlaces β (1,4) de las cuales casi el 75% de ellas llevan unidos residuos de xilas. Se ha propuesto que las moléculas de xiloglucano pueden unirse por puentes de hidrógeno simultáneamente a dos o más microfibrillas de celulosa y actuar tejiendo microfibrillas adyacentes, jugando un papel arquitectural en la pared celular. Recientemente se ha confirmado que el enzima xiloglucano endotransglucosidasa (XET) cataliza la relajación reversible de la pared celular (Fry, 1989; Hayashi, 1989). Además de su papel estructural los oligosacáridos producidos tras la actuación de enzimas hidrolíticos en las cadenas de xiloglucano pueden actuar como moléculas señal.

3.2. Enzimas degradativos de la pared celular

3.2.1. Celulasas

La degradación enzimática de la celulosa es un proceso complicado debido a la naturaleza del sustrato, ya que, en forma nativa la celulosa está compuesta por largas cadenas cristalinas unidas por puentes de hidrógeno. Estas fibras están cubiertas por una matriz de hemicelulosa y lignina lo que reduce su accesibilidad a los enzimas celulolíticos. Los microorganismos que degradan la celulosa poseen un sistema enzimático con una variedad de enzimas, diferentes en cuanto a especificidad y modo de acción, los cuales actúan de manera sinérgica en la hidrólisis de celulosa.

Introducción

Las celulasas son un conjunto de β (1-4) glucanasas, entre las que destacan las endoglucanasas y exoglucanasas. Las endoglucanasas se caracterizan por la ruptura al azar de enlaces β -glucosídicos liberando glucosa, celobiosa y fracciones polisacáridicas de gran peso molecular, mientras que la actividad exoglucanasas o β -1,4-celobiohidrolasa se caracteriza por la liberación sucesiva de unidades de celobiosa a partir del extremo no reductor de la cadena de celulosa (Varma, 1999). Los enzimas β -glucosídasa y celobiohidrolasa forman parte también del complejo de celulasas de algunos microorganismos.

Debido a la naturaleza cristalina, la celulosa nativa se degrada muy lentamente. Los patólogos vegetales han pensado tradicionalmente que las celulasas no son particularmente importantes en la patogénesis ya que la degradación de la celulosa, si ocurre, es generalmente en etapas tardías de la infección. Sin embargo, se ha observado que cuando se inactivan los genes que codifican las endoglucanasas en las bacterias fitopatógenas *Pseudomonas solanacearum* y *Xanthomonas campestris* pv. *compestris*, la virulencia de las mismas decrece (Walton, 1994).

Los extractos de esporas y de micelio externo de hongos arbusculares han mostrado actividad endo y exoglucanasa (García-Garrido *et al.*, 1992a). La presencia de estos enzimas hidrolíticos en esporas y micelio externo puede ser una indicación de los tipos de enzimas que este hongo es capaz de producir en relación con la colonización de la raíz. Las actividades endo y exoglucanasa incrementaban en plantas colonizadas por *G. mosseae* durante el periodo logarítmico de desarrollo del hongo (García-Garrido *et al.*, 1992b). No se encontró relación entre el número de vesículas y las actividades hidrolíticas, aunque la

máxima actividad hidrolítica coincidió con el incremento de formación de puntos de entrada y desarrollo de los arbusculos (García-Garrido *et al.*, 1992b).

Se ha detectado actividad endoglucanasa en las raíces no colonizadas durante su crecimiento y desarrollo (Fry, 1995). Algunas bandas electroforéticas de la actividad endoglucanasa detectadas en plantas micorrizadas tuvieron la misma movilidad electroforética que las encontradas en plantas no micorrizadas; sin embargo, algunas de estas bandas estaban presentes en las primeras etapas del crecimiento vegetal en las plantas micorrizadas y no en plantas no micorrizadas (García-Garrido *et al.*, 1992a). La presencia de bandas diferentes observadas en raíces micorrizadas de las observadas en raíces no micorrizadas o micelio externo sugiere que el hongo puede inducir alguna actividad celulásica en la planta. Estos resultados indican que las endoglucanasas producidas tanto en la planta como en el hongo pueden estar implicadas en el proceso de degradación y movilización de la pared celular hospedadora durante la colonización de la raíz por hongos arbusculares como se ha sugerido para otras asociaciones simbióticas. Alguna de las actividades endoglucanasas se pueden atribuir a la fase presimbiotica de los hongos puesto que al menos una de las actividades endoglucanasas encontradas en el micelio externo y en los extractos de raíces micorrizadas muestran la misma movilidad electroforética (García-Romera *et al.*, 1991b 1997). Mediante estudios de caracterización bioquímica se ha purificado una endoglucanasa con un peso molecular de 27 KD a partir de raíces de cebolla (*Allium cepa*) colonizadas por *G. mosseae* (García-Garrido *et al.*, 1996).

3.2.2. Pectinasas

El término pectinasa engloba a un grupo de enzimas depolimerasas que catalizan la hidrólisis de los enlaces glucosídicos α 1-4 de las moléculas de ácido galacturónico en las cadenas pécticas. Dentro de este grupo, los enzimas que prefieren pectato sódico como sustrato se les denomina poligalacturonasas (PG), y los que degradan el sustrato altamente esterificado (pectina) polimetilgalacturonasas (PMG). El prefijo endo o exo se aplica a los enzimas que rompen la cadena polisacáridica de forma indiscriminada o por el extremo reductor respectivamente (endo-PG, endo-PMG, exo-PG, exo-PMG). Los enzimas pectolíticos que rompen los enlaces glucosídicos mediante β -eliminación, se denominan pectato y pectín liasa (PAL, PL) según que utilicen tanto si degradan pectato sódico o pectina como sustrato. Este grupo de enzimas pectolíticos incluye también pectín esterasa (PE) que cataliza la de-esterificación de la pectina.

Se ha descrito degradación de pectina por micelio de hongos ericoides aislados de *Calluna vulgaris* (Perotto *et al.*, 1993; Cairney y Burke, 1996). Una amplia gama de los hongos ericoides de diversas regiones geográficas son capaces de crecer durante su vida saprotrófica utilizando la pectina como única fuente de carbono.

Los intentos de demostrar la existencia de pectinasas en plantas micorrizadas no resultaron eficaces (Anderson, 1988). Sin embargo, ensayos de represión catabólica llevados a cabo por García-Romera y colaboradores (García-Romera *et al.*, 1996) mostraron que los enzimas pectolíticos pueden estar implicados en el proceso de colonización de las raíces por hongos arbusculares. Las esporas y el micelio externo de *G. mosseae* poseen todos los enzimas tanto pécticos como pectinolíticos estudiados (pectín

esterasa [PE], pectín liasa [PL], pectato liasa [PNL], poligalacturonasa [PG] y polimetilgalacturonasa [PMG]) (García-Romera *et al.*, 1991a). En el estudio de la producción de enzimas hidrolíticos durante el proceso de penetración y desarrollo de *G. mosseae* en las raíces de plantas (García-Romera *et al.*, 1991b) se observó que la actividad (PE) fué siempre mayor durante el proceso de colonización en las plantas inoculadas con el hongo arbuscular que en los correspondientes controles. Se piensa que la actividad PE facilita la acción de otros enzimas pécticos (Stutzenberger, 1992). Las actividades PMG y PNL fueron mayores durante la fase logarítmica de desarrollo del hongo en plantas micorrizadas que en los controles no micorrizados. Este aumento de actividad se puede atribuir al incremento de las estructuras fúngicas que se producen durante la fase logarítmica de la colonización radical. Sin embargo, las actividades PG y PL en plantas micorrizadas fueron similares a los controles durante todo el proceso de colonización (García-Romera *et al.*, 1991b). La ausencia de actividad en estos enzimas degradativos no es sin embargo prueba concluyente de que estos no participen en el proceso de colonización. Estos resultados pueden indicar que PG y PL están implicados durante otras etapas del desarrollo (formación del apesorio, etc.) a la vista de la presencia de estos enzimas en los extractos de esporas y micelio externo de los hongos arbusculares (García-Romera *et al.*, 1991a).

La presencia simultanea de poligalacturonasas producidas por el hongo y de moléculas de pectina secretadas por las plantas en la matriz interfacial nos sugiere que el hongo puede utilizar la pectina como fuente de nutrición (Dexheimer *et al.*, 1979; Peretto *et al.*, 1995).

3.2.3 Hemicelulasas

La pared celular de plantas contiene glucanasas y glicosidasas que hidrolizan las cadenas de xiloglucano en los correspondientes monosacáridos. La endo- β -1,4-glucanasa es responsable de la primera etapa de degradación de xiloglucano que se hidroliza en fragmentos de gran peso molecular, la actividad exo- β -1,4-glucanasa posteriormente libera fracciones de bajo peso molecular a partir de los extremos de la cadena de polisacáridos (Fry, 1995). Se ha detectado producción de hemicelulasas no solo en microorganismos parásitos sino también en mutualistas tales como algunas especies del genero *Rhizobium* (Jiménez-Zurdo *et al.*, 1996) y hongos MA (García-Romera *et al.*, 1990).

Las actividades endoxiloglucanasas en plantas fueron más altas al inicio de la colonización y en la fase logarítmica de desarrollo del hongo arbuscular (Rejón-Palomares *et al.*, 1996b). Este hecho podría explicarse por el aumento de estructuras fúngicas durante la fase logarítmica de la colonización radical que implicaría la penetración de la pared celular de estas (Schubert y Wyss, 1995). La evolución de las actividades endoxiloglucanasas en plantas fue paralela a la actividad en el micelio externo, sin embargo, se ha observado que algunas bandas de actividad xiloglucanasa de raíces no micorrizadas no estaban presentes en raíces micorrizadas; esto puede sugerir una inhibición cualitativa por el hongo de algunas actividades de plantas. De hecho se ha observado que el hongo MA inhibe la síntesis de algunas proteínas de plantas (García-Garrido *et al.*, 1993; Dumas-Gaudot *et al.*, 1994).



MATERIAL Y METODOS

MATERIALES Y METODOS

1. Características del suelo empleado

Como soporte para el crecimiento de las plantas se utilizó suelo procedente de la finca experimental de la EEZ, CSIC, Granada. Se trata de un suelo franco que presenta las siguientes características: pH, 8.1; arena, 35,8%; arcilla, 20,5%; limo, 43,6%; materia orgánica, 1,8%; nitrógeno, 0,3 mg/Kg; fósforo, 6.2 mg/Kg; potasio, 132 mg/Kg. Este suelo se tamizó (4 mm) y se mezcló con arena de cuarzo en proporción 2:3 (v:v). Esta mezcla, se esterilizó a vapor fluente (100°C), una hora durante 3 días consecutivos con objeto de eliminar los propágulos de micorrizas. El suelo se reinoculó con un filtrado (Whatman® n°1) de una suspensión acuosa de suelo natural o del inóculo de la micorriza empleado, que contenía la microbiota normal, a excepción de los propágulos de la MA.

2. Plantas y condiciones de cultivo

2.1. Plantas

Se utilizaron las siguientes plantas en función del tipo de ensayo: soja verde (*Glycine max*, variedad Merrill), guisante (*Pisum sativum*, variedad Lincoln), lechuga (*Lactuca sativa*, variedad Romana), alfalfa (*Medicago sativa*, variedad Aragón), trébol (*Trifolium repens*, variedad Enano huia), judía (*Phaseolus vulgaris*, variedad Contender) y garbanzo (*Cicer arietinum*, variedad Chamad).

2.1.1. Esterilización de las semillas

En todos los casos las semillas se esterilizaron durante 15 min en lejía comercial al 50%, tras lo cual se lavaron varias veces con H₂O destilada estéril. Pasado este tiempo las semillas se sumergieron en agua oxigenada (H₂O₂) al 7% durante 15 min y se lavaron varias veces con agua destilada estéril. Finalmente se dejaron en imbibición en agua estéril un tiempo variable en función del tipo de semillas, 30 min en el caso de lechuga, alfalfa y trébol y 2 h para el resto de las semillas.

2.1.2. Germinación y condiciones de crecimiento

Una vez esterilizadas e imbibidas, las semillas se transfirieron a placas de Petri con papel de filtro estéril, que se mantuvieron a 28°C y en oscuridad, antes de ser utilizadas en los distintos ensayos de invernadero. Una vez germinadas se depositaron en semilleros con mezcla suelo-arena-turba-vermiculita (1:1:1:1 v:v).

Tras la germinación y cultivo durante varias semanas en el semillero, las plántulas se trasplantaron a las macetas (300 ml de capacidad), siendo para ello cuidadosamente seleccionadas en base a un desarrollo homogéneo de la parte aérea y radical. El sistema de cultivo mantenido inalterable a lo largo de los ensayos, se realizó bajo condiciones controladas de luz, temperatura y humedad (400 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, 400-700 nm; 16/8 h luz/oscuridad; 25-19°C y 50% humedad relativa). Las plantas se regaron por capilaridad para no alterar las propiedades físicas del suelo.

Semanalmente las plantas se fertilizaron con 15 ml de la solución nutritiva propuesta por Long Asthon (Hewitt, 1952) cuya composición es la siguiente:

	solución madre (g/l)	ml/l solución
KNO ₃	30,3	10
Ca(NO ₃) ₂	70,8	20
MgSO ₄ ·7H ₂ O	18,4	20
Fe(II)-EDTA	2,5	10
MnSO ₄ ·7H ₂ O	2,23	1
CuSO ₄ ·5H ₂ O	2,4	0,1
ZnSO ₄ ·2H ₂ O	2,9	0,1
H ₃ BO ₃	18,6	0,1
(NH ₄) ₆ Mo ₂₄ ·4H ₂ O	0,35	0,1
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	20,8	10
Agua	—	hasta 1 L

El pH se ajustó a 7 con una solución NaOH al 10%. La concentración de nitrógeno y fósforo se modificó según el experimento y tratamientos utilizados.

3. Inoculantes microbianos empleados

3.1. Referencias y características

Se utilizaron tres tipos de inoculantes, hongos saprobios, bacterias del género *Rhizobium* y hongos MA, cuya procedencia y características se exponen en las Tablas 1-

3.

Tabla 1. Tipos y características de los hongos saprobios utilizados

Espece/cepa	Características	Referencia
<i>T. viride</i>	Aislado de suelo de Buenos Aires	Rifai, 1969
<i>P. farinosus</i>	Aislado de esporocarpos	Holm y Gray, BAFC Cult N° F8846
<i>W. inflatus</i>	Aislado de esporocarpos	Hennebert, BAFC Cult N° F8992
<i>P. ostreatus</i>	Aislado madera de chopo (Granada)	Domsch <i>et al.</i> , 1980
<i>F. oxysporum</i> 126	Aislado de suelo de Buenos Aires	Schlecht, BAFC Cult N° 126
<i>F. graminearum</i> 122	Aislado de suelo de Buenos Aires	Schawave, BAFC Cult N° 122
<i>Fusarium</i> sp	Aislado de esporocarpos	Domsch <i>et al.</i> , 1980
<i>F. oxysporum</i> 738	Aislado de suelo de Buenos Aires	Schlecht, BAFC Cult N° 738
<i>F. oxysporum</i> 93	Aislado de suelo de Buenos Aires	Schlecht, BAFC Cult N° 93
<i>F. stilboide</i>	Aislado de suelo de Buenos Aires	Wollenw, BAFC Cult N° 2169
<i>F. equiseti</i>	Aislado de suelo de Buenos Aires	(Corda) Sacc., BAFC Cult N° 91
<i>C. globosum</i>	Aislado de suelo de Buenos Aires	Domsch <i>et al.</i> , 1980
<i>G. roseum</i>	Aislado de esporocarpos	Bain, BAFC Cult N° F8845
<i>A. niger</i>	Aislado de suelo de Buenos Aires	Raper and Fennell, 1965
<i>P. chrysogenum</i>	Aislado de suelo de Buenos Aires	Domsch <i>et al.</i> , 1980

Los hongos saprobios utilizados en los distintos ensayos se aislaron a partir de muestras de suelos rizosféricos de distintas hospedadoras o cultivos, de los alrededores de la ciudad de Buenos Aires y a partir de esporocarpos. El aislamiento de los hongos saprobios se realizó mediante lavados de muestras según el método descrito por Widden y Bisset (1972). La técnica consistió en lavados de suelo o esporocarpos en un aparato que contenía varios tubos de metacrilato divididos en 3 secciones mediante filtros sucesivos de malla metálica y luz decreciente de superior a inferior. Las muestras se

colocaron en el compartimento superior de cada tubo. Los tubos acrílicos se llenaron de agua estéril, haciéndose burbujear intensamente las muestras con aire durante 3 minutos. Al cabo de este tiempo, los tubos se vaciaron y se completaron nuevamente con agua estéril. Estos lavados se repitieron 5 veces, cantidad necesaria para eliminar completamente la contaminación superficial, según una curva de lavado realizada previamente. Se lavaron 4 muestras por cada muestreo.

Tras el último lavado, las partículas retenidas en los diferentes filtros una vez secas, se transfirieron en forma estéril a placas de Petri con medio de cultivo MEA y antibióticos. Las placas de Petri se incubaron a 28°C durante varios días y los hongos que crecieron se repicaron estérilmente a tubos de ensayo con medio MEA en pico de flauta conservándolos a 4°C hasta su utilización.

La totalidad de las cepas aisladas se determinaron a nivel de género o especie según el caso, con la ayuda de las claves pertinentes (Rifai, 1969; Booth, 1971; Ellis, 1971; Carmichael *et al.*, 1980; Von Arx, 1981) y se seleccionaron: *Trichoderma viride*, *Paecilomyces farinosus*, *Wardomyces inflatus*, *Pleurotus ostreatus*, *Fusarium oxysporum* 126, *F. graminearum*, B54, *F. oxysporum* 738, *F. oxysporum* 93, *F. stilboide*, *F. equiseti*, *Chaetonium globosum*, *Gliocadium roseum*, *Aspergillus niger* y *Penicillium chrysogenum*.

Tabla 2. Tipos y características de las bacterias utilizadas

Especie/cepa	Características	Referencia
<i>S. meliloti</i> GR4	Hospedador alfalfa	Casadesús and Olivares, 1979
<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viceae</i> RLv13	Hospedador guisante	Dpt. Microbiología (EEZ)
<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> 2152	Hospedador trébol	Dpt. Microbiología (EEZ)
<i>R. tropici</i> CIAT899	Hospedador judía	Martínez-Romero <i>et al.</i> , 1991
<i>M. mediterraneum</i> USDA3392 ^T	Hospedador garbanzo	Nour <i>et al.</i> , 1995

Tabla 3. Tipos y características de los hongos micorrízicos utilizados

Especie/cepa	Características	Referencia
<i>G. mosseae</i>	(Nicol. and Gerd.) Gerdemann and Trappe (BEG 12)	Rothamsted Experimental Station (UK)
<i>G. mosseae</i>	(Nicol. and Gerd.) Gerdemann and Trappe (BEG 12)	University of Kiel (Germany)
<i>G. fasciculatum</i>	(Thax. Sensus Gerd.) Gerd. And Trappe (BEG 58)	Dijon (INRA)
<i>G. clarum</i>	Nicol. and Schenk	Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC)
<i>G. intraradices</i>	Schenk and Smith	Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC)
<i>G. deserticola</i>	Trappe, Bloss and Menge	Instituto de Investigaciones Agrobiológicas de Galicia (CSIC)

3.2. Medios y condiciones de cultivo

El cultivo de hongos saprobios y de *Rhizobium* se llevó a cabo en distintos medios esterilizados en autoclave a 120°C durante 20 min. Componentes como las vitaminas, elementos traza y antibióticos previamente esterilizados por filtración se añadieron al medio de cultivo después de su esterilización. Los hongos saprobios se inocularon en placas de Petri con medio MEA más estreptomycin (5 µg/l), y se

incubaron a 28°C durante una semana, con el fin de asegurar una buena esporulación. Las distintas cepas de *Rhizobium* y *Xanthobacter* se cultivaron en los medios TY y YEB respectivamente durante 24 h a 28°C hasta alcanzar su fase logarítmica de crecimiento.

Medio MEA	
Extracto de Malta	2 g
Peptona	2 g
Glucosa	20 g
Agar	15 g
Agua destilada	1000 ml

Medio TY	
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,9 g
Triptona	5 g
Extracto de levadura	3 g
Agar	15 g
Agua destilada	1000 ml

Medio YEB (pH 7,2)	
Caldo nutritivo	16 g
Sacarosa	5 g
Extracto de levadura	1 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,49 g
Agua destilada	1000 ml

3.3. Obtención y cuantificación de inoculantes

3.3.1. Hongos saprobios

Se cultivaron en medio de cultivo MEA con antibióticos al 1% (v:v) en placas de Petri, durante 7 días a 28°C. Al cabo de este tiempo de crecimiento se procedió a la cosecha de las esporas, que se realizó en condiciones de esterilidad, agregando agua destilada a las placas Petri y poniendo en suspensión los conidios con la ayuda de un rastrillo de vidrio. La suspensión obtenida se filtró luego a través de una tela de nylon, con el objeto de retener los restos de micelio.

La densidad de esporas por ml de agua se determinó con la ayuda de un hemisistómetro ó Cámara de Neubauer, ajustándose a la densidad deseada para la inoculación mediante diluciones con agua destilada estéril, de manera tal que 1 ml de la suspensión contuviera el total de esporas a inocular. Para la inoculación con *Pleurotus ostreatus* que no formaba esporas, se utilizaron cuadrados de 1 cm³ de medio sólido con el hongo cultivado en placa de Petri con medio MEA durante 1 semana.

3.3.2. Bacterias

Las distintas cepas de *Rhizobium* y la bacteria *Xantobacter flavus* se cultivaron en el medio correspondiente descrito anteriormente, durante 24 horas a 28°C hasta alcanzar su fase logarítmica de crecimiento. Una vez obtenida la suspensión de células, se centrifugó a 5.000 xg durante 10 min, se eliminó el sobrenadante y las células se lavaron varias veces con agua destilada estéril. La D.O. de la suspensión bacteriana se determinó a 600 nm en un espectrofotómetro.

3.4. Inoculación de microorganismos

3.4.1. Inoculación de hongos saprobios

La suspensión (1 ml) de conidios de los hongos saprobios descrita anteriormente se añadió en una concentración de 1×10^6 directamente debajo de las raíces de las plántulas recién transplantadas. Para el caso de *P. ostreatus*, 3 trozos de medio donde había crecido el hongo se pusieron directamente debajo de las raíces de las plántulas.

3.4.2. Inoculación de bacterias

El inóculo (2 ml) del cultivo bacteriano se aplicó de una manera homogénea directamente a las plántulas en una densidad óptica comprendida entre 0,6 y 0,9.

3.4.3. Inoculación de micorrizas

Las plantas se inocularon con 10 g de los diferentes inóculos de suelo descritos anteriormente que son una mezcla de esporas, micelio y fragmentos de raíces colonizadas con los endofitos. Todos los inóculos presentaron características similares (25-35 esporas/g y 60-75% de infección). Estos inóculos se aplicaron sobre una capa del suelo-arena estéril mezclándose con ella. En la superficie se depositaron las semillas esterilizadas y pregerminadas donde crecieron las plantas en condiciones controladas.

4. Determinaciones generales

4.1. Tinción de raíces

La extensión del sistema radical que presentaba colonización por hongos arbusculares se evaluó en una alícuota de fragmentos de raíz mediante el método desarrollado por Phillips y Hayman (1970). Para ello, tras la digestión parcial de las paredes y cubiertas celulares de la raíz con una solución de KOH al 10% durante 30 min a 90°C, y neutralización con HCL 0,1N durante 3 min en frío, las raíces se tiñeron con una solución de Azul tripan al 0,05% en ácido láctico durante 10 min a 90°C. El Azul tripan es un colorante con afinidad por la quitina (componente mayoritario de la pared fúngica), por lo que tras la tinción, las estructuras del hongo micorrízico se observan claramente en el interior de la raíz. Las raíces teñidas se conservaron en ácido láctico para su posterior evaluación.

4.2. Cuantificación del porcentaje de longitud de raíz colonizada

La cuantificación de la colonización micorrízica se realizó usando la técnica descrita por Giovannetti y Mosse (1980). Para ello, fragmentos de las raíces teñidas se extienden al azar sobre una placa dividida en cuadrículas. Mediante el examen microscópico, se determina el número de intersecciones de los trozos de raíces con las líneas de las cuadrículas contando tanto las intersecciones micorrizadas como las que no presentan micorrización. El porcentaje de intersecciones con raíces micorrizadas, con respecto al total de intersecciones contabilizadas, da una estimación del porcentaje de longitud de raíz que esta colonizada.

4.3. Recuento de nódulos

El número de nódulos en cada raíz se determinó mediante recuento visual.

5. Estudios bioquímicos

5.1. Obtención y preparación de muestras enzimáticas

5.1.1. Método de obtención de extractos de raíz

Para el estudio de las distintas actividades enzimáticas se congelaron las raíces de las distintas plantas (lavadas en agua fría para evitar pérdida de actividad enzimática) en nitrógeno líquido, y se molieron en un mortero de porcelana hasta conseguir un polvo fino. Una vez pulverizada la muestra se añadió polivinil polipirrolidona (PVPP) en proporción 0,15 g/g material vegetal, para evitar que los fenoles inhiban la actividad enzimática y 0,15 mM de fenilmetilsulfonil fluor (PMSF), para inhibir proteasas. El polvo resultante se homogeneizó en el tampón de extracción en proporción 1:3 (peso raíz:volumen).

Tampón de extracción	
Tris HCl pH 7.0	0,1 M
Mg Cl ₂	10 mM
NaHCO ₃	10 mM
β- mercaptoetanol	10 mM
Tritón X-100	0,3% (v:v)
Azida de Na	0,03% (p:v)

La suspensión obtenida se filtró a través de una gasa y se centrifugó a 3.000 xg durante 5 min a 4°C. El sobrenadante se volvió a centrifugar a 20.000 xg durante 20 min a 4°C, tomándose de nuevo el sobrenadante que se dializó frente a 2 l de una dilución 1/10 de la solución extractante durante 4 h a 4°C. El extracto resultante se almacenó a -20°C hasta su posterior utilización.

5.1.2. Método de obtención de extractos de micelio externo de hongos micorrízicos

El micelio externo se aisló mediante un lavado enérgico con agua destilada de raíces micorrizadas de plantas de 30 días de crecimiento. El agua recogida tras el lavado se pasó por un tamiz de 50 µm de luz de malla y el micelio extraradical retenido se recogió bajo la lupa binocular con pinzas ultrafinas, se congeló con nitrógeno líquido y se molió hasta la obtención de un polvo fino en un mortero de porcelana. A la muestra resultante se le añadió PVPP, PMSF y tampón de extracción tal y como se describe anteriormente en la proporción de un ml de solución extractante por 30 mg peso fresco de micelio.

La suspensión obtenida se sonicó 5 veces a 80 W utilizando pulsos de 1 min de duración con intervalos de 30 seg. Tras la sonicación se centrifugó a 20.000 xg durante 20 min y se recogió el sobrenadante. El precipitado se disolvió de nuevo en la misma solución de extracción y se sometió a un nuevo proceso de sonicación. Tras varios lavados y recogida por centrifugación, el volumen de sobrenadante final resultante se dializó frente a 1 l de una dilución 1/10 de la solución extractante durante 4 h a 4°C. El extracto enzimático dializado se conservó en pequeñas alícuotas a -20°C hasta su utilización.

5.1.3. Método de obtención de extractos enzimáticos de hongos saprobios

Las actividades hidrolíticas en hongos saprobios se evaluaron tanto en extractos enzimáticos intracelulares como extracelulares. Para la obtención de muestras enzimáticas extracelulares los hongos saprobios se cultivaron en matraces Erlenmeyer de 150 ml de capacidad con 50 ml de medio de crecimiento A durante 14 días en agitación (2 xg) a 28°C.

Medio de crecimiento de hongos saprobios (S)	
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5 g
KH ₂ PO ₄	0,5 g
K ₂ HPO ₄	0,6 g
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,4 mg
MnCl ₂ .4H ₂ O	0,09 mg
H ₃ BO ₃	0,07 mg
Na ₂ MoO ₄	0,02 mg
FeCl ₃	1 mg
ZnCl ₂	0,0035 mg
Biotina	5 µg
Tiamina	0,1 mg
CaCl ₂	0,11 g
Celulosa microcristalina (Avicel)	10 g
Asparagina	4 g
Agua destilada	1000 ml

Estos cultivos de hongos saprobios se centrifugaron a 10.000 xg durante 5 min y los sobrenadantes se guardaron a -20°C hasta su utilización como muestras enzimáticas extracelulares.

Para la obtención de muestras enzimáticas intracelulares una vez crecidos los hongos tal y como se describe anteriormente, se añadió a los cultivos Tritón X-100 al 0,3% y NaHCO₃ 10 mM. El cultivo se homogeneizó utilizando un "Sorvall omnimixer" durante 3 min en un baño de hielo. El homogenado se centrifugó a 1.000 xg durante 20 min y el sobrenadante resultante se conservó a -20°C para su posterior utilización como muestras enzimáticas intracelulares.

5.1.4. Método de obtención de extractos enzimáticos bacterianos

Las distintas bacterias cultivadas en placa Petri en los medios correspondientes durante 5 días se recogieron con solución salina estéril (KH₂PO₄ 10 mM pH 8 y NaCl 145 mM) y a continuación se centrifugaron a 5.000 xg durante 15 min a 4°C. El residuo de células se resuspendió en el medio descrito por Bergensen (1961) y modificado posteriormente (BINOS). La suspensión así obtenida se utilizó como inóculo de forma que la población bacteriana inicial resultara de 10⁷ cel/ml.

Medio BINOS	
K ₂ HPO ₄	0,23 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,10 g
Glutamato sódico	1,10 g
Inositol	5 g
Solución de elementos traza	1 ml
Solución de vitaminas	1 ml
Agua destilada	1000 ml

Las soluciones de elementos traza y vitaminas se prepararon según la composición del medio Bergensen original (Bergensen, 1961). El medio se tamponó siempre a pH 6,9-7,0 con solución de KH₂PO₄ 1M y se esterilizó en autoclave a 120°C durante 20 min, previamente a su uso. La solución de vitaminas se añadió al medio de cultivo estéril y frío después de ser esterilizada por filtración a través de un filtro de 0,22 μ .

El cultivo de cada cepa se llevó a cabo en matraces Erlenmeyer de 250 ml de capacidad con 75 ml de medio BINOS, a 30°C y en agitación a 2 xg. Los cultivos se interrumpieron en la fase estacionaria temprana de crecimiento cuando la población bacteriana fue del 10⁹ cel/ml, aproximadamente.

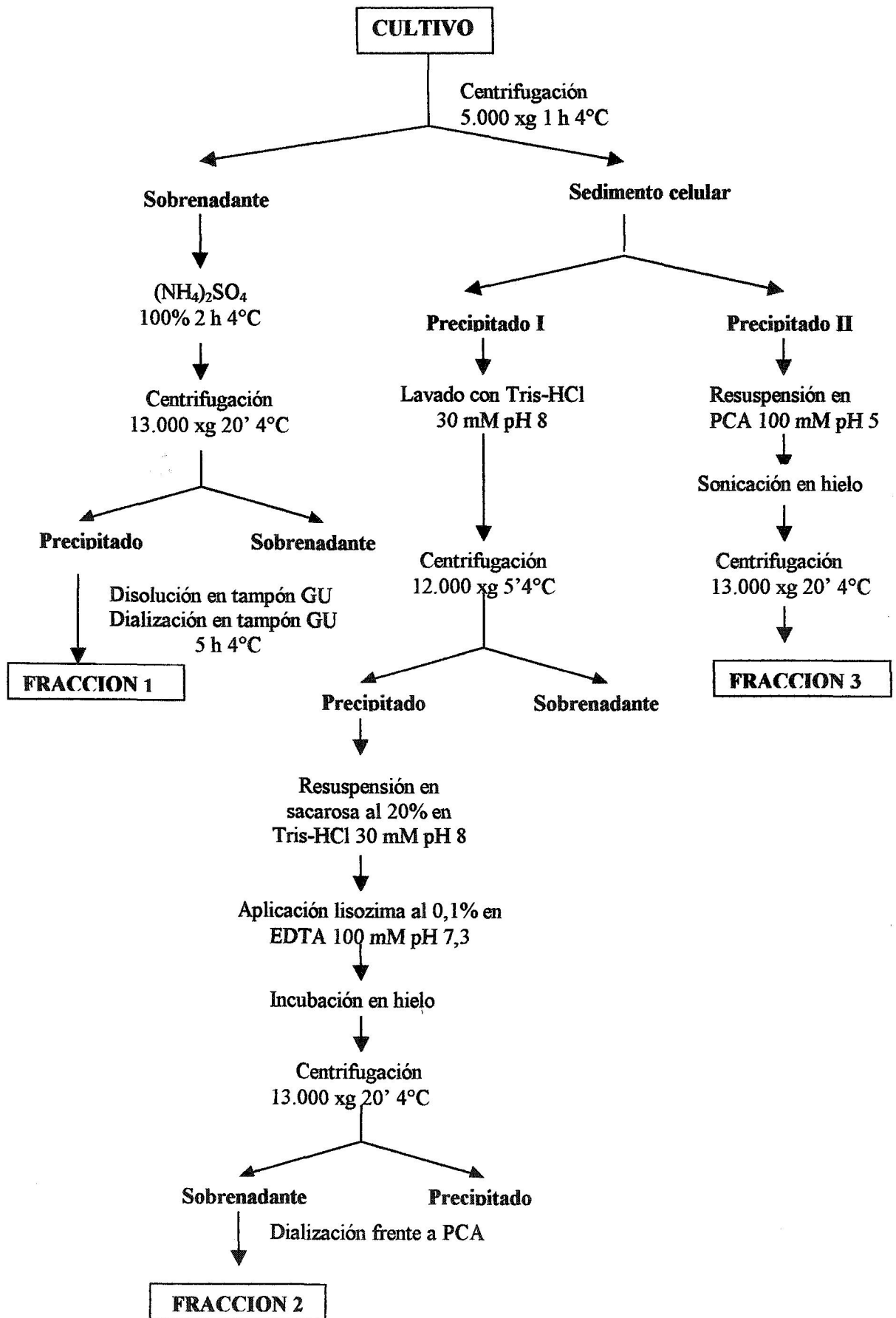
Para la obtención de muestras enzimáticas extracelulares, los cultivos bacterianos se centrifugaron a 5.000 xg durante 1 h a 4°C. Los precipitados celulares se conservaron para ser sometidos a tratamientos específicos para la obtención de otras fracciones enzimáticas que se describirán posteriormente y a los sobrenadantes se les

añadió $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ hasta un 100% de saturación, y en constante agitación durante 4 h a 4°C.

Las proteínas precipitadas se centrifugaron a 13.000 xg durante 20 min, se resuspendieron en 1 ml de tampón glicina-urea (GU, glicina 1%, urea 1M, K_2HPO_4 200 mM, ácido cítrico 100 mM, pH 7,4; Morales *et al.*, 1984) y se dializaron durante 4 h a 4°C frente al mismo tampón cambiándolo periódicamente cada hora. La fracción enzimática resultante se denominó Fracción 1 (Fig.1).

Para la obtención de las muestras enzimáticas intracelulares los precipitados celulares obtenidos anteriormente se lavaron con tampón Tris-HCl 30 mM pH 8,1, centrifugándose a continuación a 13.000 xg durante 20 min a 4°C. Posteriormente, se resuspendieron en 1,5 ml de una solución de sacarosa al 20% (p/v) y lisozima al 0,1% (p/v) en EDTA 0,1 M pH 7,3, incubándose en baño de hielo durante 40 min. Transcurrido este tiempo se centrifugó la mezcla a 13.000 xg y 4°C durante 20 min. El sobrenadante se dializó frente al tampón fosfato-citrato (PCA, K_2HPO_4 100 mM, ácido cítrico 100 mM pH 5), obteniéndose así la fracción de proteínas asociada a la cubierta celular o contenidas en el espacio periplásmico (Ito *et al.*, 1977), que se denominó Fracción 2 (Fig.1).

Alternativamente, los precipitados celulares se resuspendieron en 1,5 ml del tampón PCA 100 mM. A continuación las células se sonicaron a 55 W en 5 pulsos de 1 min, con intervalos de 30 segundos, manteniendo constantemente en hielo la solución bacteriana, que se centrifugó finalmente a 13.000 xg durante 20 min. El sobrenadante resultante se denominó Fracción 3 (Fig. 1).



5.2. Sustratos utilizados y preparación de los mismos

Para la detección de los distintos enzimas hidrolíticos de la pared celular, objetivo fundamental de este trabajo de investigación, se utilizaron como sustratos para su evaluación compuestos solubles derivados de los polisacáridos que mayoritariamente constituyen dicha pared. Los sustratos utilizados fueron:

- Carboximetil celulosa sódica, CMC (Viscosidad alta, Sigma). Compuesto soluble derivado de la celulosa que se usó para la valoración de la actividad β -1,4- glucanásica.
- Pectina (Sigma). Derivado soluble de la pectina procedente de cítricos que se utilizó para la valoración de la actividad polimetigalacturonasa.
- Poligalacturonato sódico (Sigma). Derivado soluble del ácido poligalacturónico que se usó para la valoración de la actividad poligalacturonasa.
- Xiloglucano. Se obtuvo a partir de semillas de capuchina trepadora (*Tropaelum majus*) mediante una modificación del método de extracción descrito por McDougall y Fry (1989).

Cien semillas de *Tropaelum majus* rehidratadas durante 18 h se homogeneizaron utilizando una "Sorval omnimixer" con 25 ml de H₂O destilada. Al homogenado resultante se le añadió 450 ml de una solución de NaOH 2 M y NaBH₄ 0,05% y se mantuvo al baño María durante 1 h con agitación ocasional. Esta mezcla obtenida se centrifugó a 2.000 xg durante 10 min y el sobrenadante resultante se mezcló con 990 ml de ácido acético:etanol 1:10 (v:v) y se mantuvo durante 30 min para permitir la precipitación del xiloglucano crudo. A este precipitado disuelto en 300 ml de H₂O destilada se le adicionó 100 ml de una solución B de Fhelings [NaK(COO)₂(CHOH)₂ 1,6 M y KOH 4,45 M] y se mantuvo en agitación a 40°C durante 30 min. Tras enfriarse este homogenado se le añadió 100 ml de la solución A de Fehlings (CuSO₄ 0,47 M) y se

centrifugó a 2.000 xg durante 10 min. El precipitado resultante se disolvió en 300 ml de ácido acético:agua 1:4 (v:v) y el xiloglucano no acomplejado se dejó precipitar durante 12 h añadiendo 600 ml de etanol. El xiloglucano resultante se disolvió en 200 ml de H₂O y se le añadió EDTA 6,7 mM en agitación durante 1 h. El homogenado resultante se volvió a centrifugar a 2.000 xg durante 10 min, tomándose de nuevo el sobrenadante resultante para mezclarlo con 200 ml de etanol y mantenerlo en agitación durante 15 min a 4°C. Tras la centrifugación a 2.000 xg durante 10 min del xiloglucano resultante y su lavado repetidas veces con etanol al 50%, este se liofilizó y se conservó hasta su posterior utilización.

Todos estos sustratos se disolvieron en tampón PCA 50 mM pH 5 hasta las concentraciones adecuadas para llevar a cabo los ensayos. Todas las disoluciones se conservaron a 4°C durante periodos de tiempo nunca superior a 4 semanas.

5.3. Detección de actividades hidrolíticas

5.3.1. Condiciones electroforéticas

Los perfiles de isoenzimas de xiloglucanasa se analizaron mediante electroforesis en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) de los diferentes extractos enzimáticos. Las electroforesis se llevaron a cabo en geles de poliacrilamida de 0,75 mm de espesor, en cubeta MiniProtean II (Bio-Rad) siguiendo un método modificado de Cruickshank y Wade (1980). Se utilizaron geles al 6% de separación y al 4% de empaquetamiento cuya composición se especifica a continuación:

	Gel separación (vol/ml) (6% acrilamida)	Gel de empaquetamiento (vol/ml) (4% acrilamida)
Acrid-bis ⁽¹⁾	2,5	1
Tris-HCl 1 M pH 8,8	4,68	---
H ₂ O	5,32	7,75
Tris-HCl 1 M pH 6,8	---	1,25
Sustrato enzimático	12 mg	---
SDS (20%)	63 x 10 ⁻³	50 x 10 ⁻³
Persulfato amónico (APS)	40 x 10 ⁻³	100 x 10 ⁻³
TEMED	10 x 10 ⁻³	10 x 10 ⁻³

(1) Disolución de acrilamida/bisacrilamida: 29,1 g de acrilamida y 0,8 g de bisacrilamida en 100 ml de agua destilada.

El tampón de electroforesis fue Tris-Glicina pH 8,3 (Tris 25 mM; Glicina 0,2 M; SDS 1,7 mM).

A cada pocillo del gel se aplicó un volumen de 25 µl de muestra. Las muestras se mezclaron, antes de su aplicación a los pocillos con el tampón de muestra en la relación 4:1 (v:v) y se dejaron a 37°C durante 5 min. La composición del tampón de muestra fue la siguiente:

	Vol (ml)
H ₂ O	4,8 ml
Tris-HCl 1 M pH 6,8	0,62 ml
Glicerol	0,5 ml
SDS	0,2 g
Azul bromofenol	0,01 g
DTT (dithiothreitol)	0,154 g

Las electroforesis se llevaron a cabo a un voltaje constante de 20 mA/gel, durante 2 h. Todo el proceso de electroforesis se realizó a 4°C, para así prevenir la alteración de los enzimas.

5.3.2. Visualización de bandas de actividad hidrolíticas en geles

Después de la incubación de los geles en tampón cítrico-fosfato 50 mM pH 5 a 37°C durante 12 h, los geles se sometieron a un proceso de tinción para visualizar las bandas de actividad xiloglucanásica separadas electroforéticamente. Este proceso se fundamenta en la capacidad del colorante Rojo Congo de unirse a polisacáridos que contienen enlaces β 1-4, de tal manera que se pueden visualizar las zonas de hidrólisis de estos enlaces por la no aparición del color.

En el proceso de tinción los geles se sumergieron en una solución al 0,1 % (p:v) de Rojo Congo durante 20 min en agitación. Posteriormente los geles se lavaron varias veces con NaCl 1M y se mantuvieron durante 2 min en KOH al 10 % (p:v) hasta observar la aparición de las bandas de actividad como zonas incoloras sobre el fondo rojo del gel. Finalmente los geles se mantuvieron en agua 2 a 3 horas cambiándola periódicamente cada 30 min, y para obtener un mayor resalte de dichas zonas, los geles se sumergieron en una solución de ClH 0,1 N, con lo que el colorante cambia de color apareciendo las zonas de actividad sobre un fondo azul.

5.4. Cuantificación de las actividades hidrolíticas

Para la determinación de las distintas actividades enzimáticas endohidrolíticas se utilizó de forma general la técnica de viscosimetría descrita por Bateman en 1963 y

modificada posteriormente por Rejón-Palomares (1996b). Las actividades hidrolíticas de tipo exo se cuantificaron mediante la valoración de los grupos reductores formados tras la hidrólisis del sustrato correspondiente. El procedimiento seguido se fundamentó en el método descrito por Waffenschmidt y Jaenicke (1987).

5.4.1. Viscosimetría

Para la determinación de actividad enzimática de tipo endohidrolasa se utilizó la técnica de viscosimetría utilizando como sustrato xiloglucano, CMC (carboximetilcelulosa de alta viscosidad), pectina y poligalacturónico sódico para detección de endoxiloglucanasas, endoglucanasas, endopolimetilgalacturonasas y endopoligalacturonasas respectivamente. El fundamento de la técnica es la valoración de la pérdida de viscosidad de la mezcla de reacción como consecuencia de la acción hidrolítica de los enzimas en las partes internas de las cadenas, los cuales causan una depolimerización y por tanto pérdida de viscosidad.

La mezcla de reacción consistió en 1 ml de disolución de sustrato al 0,5% en tampón PCA 50 mM pH 5 y 0,2 ml del extracto enzimático. Las reacciones enzimáticas se llevaron a cabo a 37°C en jeringas de 1 ml contabilizando la pérdida de viscosidad a tiempo 0 y 30 minutos. Aproximadamente 0,5 ml de la mezcla de reacción se absorbió en una jeringa de 1 ml y se contabilizó el tiempo que tardaba el menisco en bajar de la marca 0,70 ml hasta la de 0,20 ml.

La actividad se calculó en función del porcentaje de disminución de la viscosidad de la disolución de sustrato respecto al tiempo. Esta actividad se expresó en unidades de actividad específica, definida como actividad relativa (A.R)/mg de proteína

a los 30 minutos de reacción. El cálculo de la actividad relativa se realizó en función de las siguientes relaciones matemáticas y de la medida de T_0 y T_x .

$$A.R. = 1/T_{50} \times 1000$$

$$T_{50} = 50 \times T_x \times \%X$$

$$\%X = \frac{T_0 - T_x}{T_0} \times 100$$

donde:

T_0 = Viscosidad de la mezcla de reacción a tiempo 0.

T_x = Viscosidad de la mezcla de reacción a tiempo X (en nuestro caso 30 minutos)

T_{50} = Tiempo necesario para alcanzar una pérdida de viscosidad de la mezcla de reacción a un tiempo X de reacción.

$\%X$ = Pérdida de viscosidad de la mezcla de reacción a un tiempo X de reacción.

5.4.2. Valoración de grupos reductores

La medida de actividad exohidrolasa se realizó según describe Waffenschmidt y Jaenicke (1987). El fundamento de la técnica es la medida de P-nitrofenol liberado como consecuencia de la acción enzimática exo- sobre sustratos de tipo p-nitrofenol β -D-glucósidos. La mezcla de reacción consistió en 400 μ l de la disolución de sustrato correspondiente para cada una de las actividades enzimáticas al 0,5% y 400 μ l del extracto enzimático, tamponándose a pH 5 con 800 μ l de tampón PCA 200 mM. Después de mezclar muy bien los reactivos se tomó una alícuota de 800 μ l que se congeló a -80°C y se consideró como muestra representativa del tiempo cero de reacción. El resto se incubó a 40°C en baño termostático durante 30 min antes de congelarlo también a la misma temperatura. Los grupos reductores generados se valoraron con un reactivo formado por la mezcla de volúmenes iguales de dos

