

Proo. 9. 14/85

UNIVERSIDAD DE GRANADA  
FACULTAD DE CIENCIAS

TESIS DOCTORAL

**Alteraciones fisiológicas en membranas de  
micorrizas arbusculares**

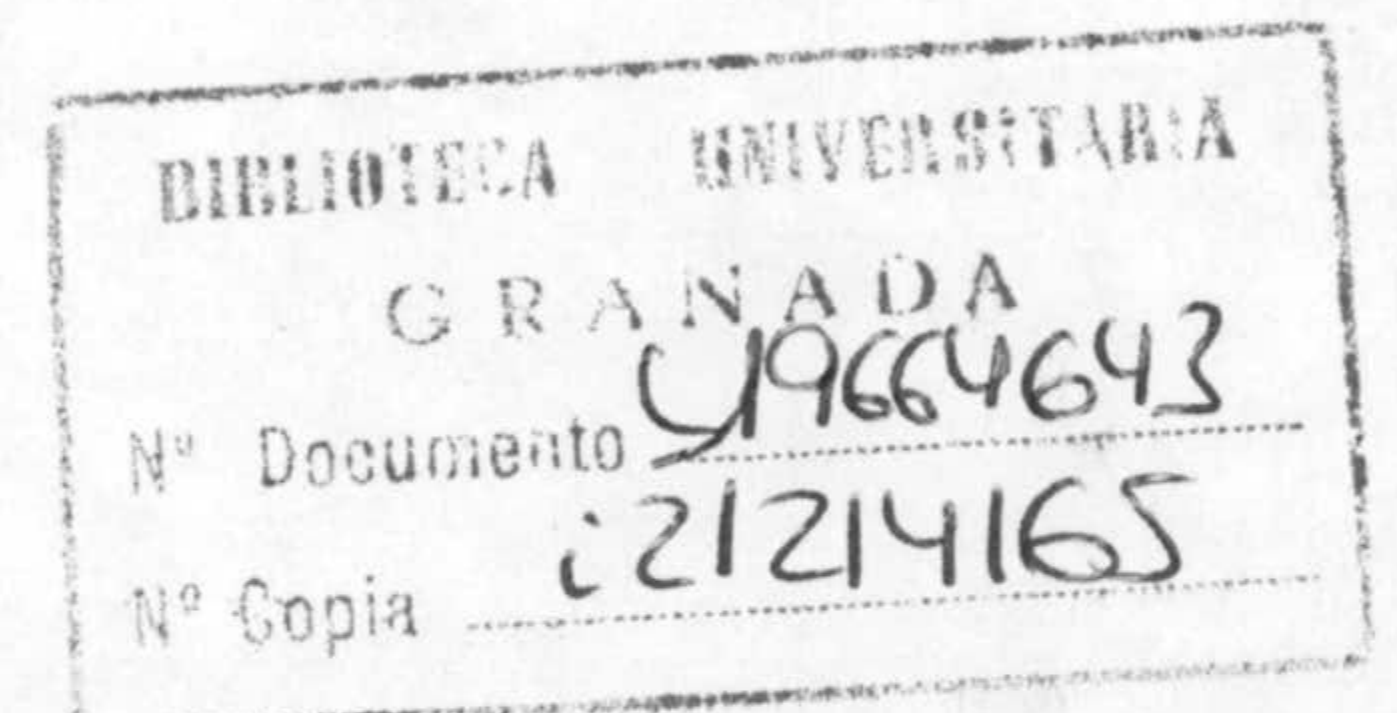
Berta Bago Pastor, 1994

T  
15  
4

UNIVERSIDAD DE GRANADA  
FACULTAD DE CIENCIAS

TESIS DOCTORAL

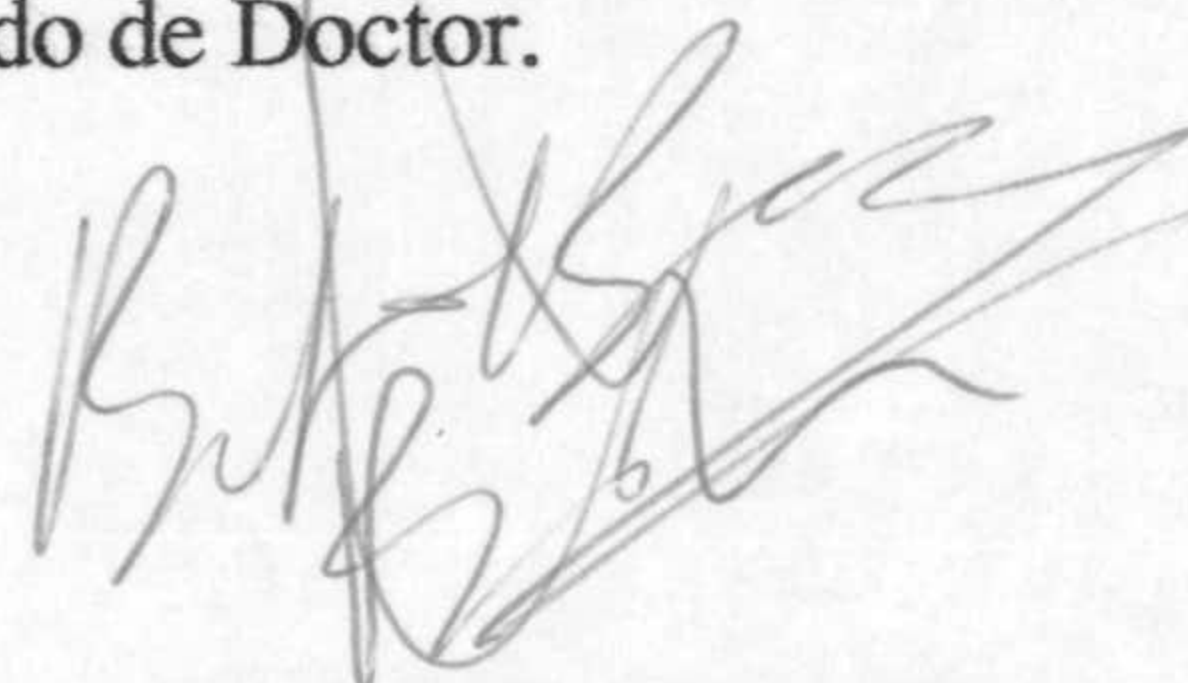
**Alteraciones fisiológicas en membranas de  
micorrizas arbusculares**



Berta Bago Pastor, 1994

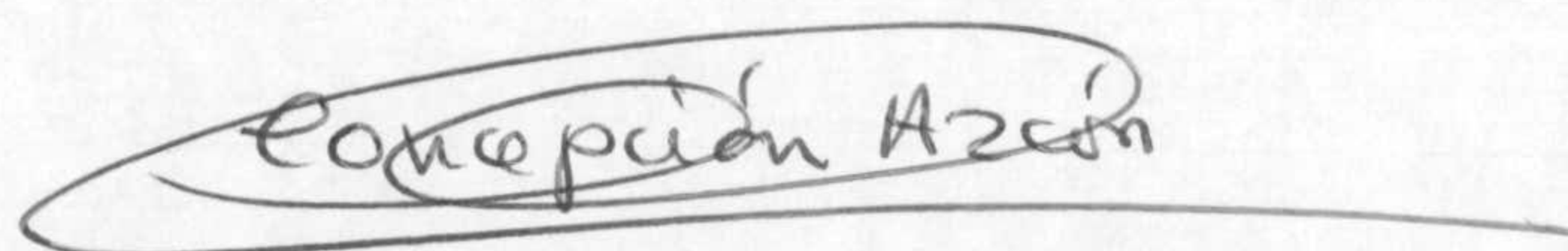
**Alteraciones fisiológicas en membranas  
de micorrizas arbusculares**

Memoria que presenta la Licenciada en Ciencias  
(Sección Biológicas) Berta Bago Pastor, para optar  
al grado de Doctor.



Fdo. Berta Bago Pastor

VºBº  
El Director del Trabajo



Fdo. Concepción Azcón González de Aguilar  
Investigador Científico del CSIC.

UNIVERSIDAD DE GRANADA  
Facultad de Ciencias  
Fecha 26-5-94  
ENTRADA NUM. 805

La presente Memoria ha sido realizada durante los años 1990 a 1994 en el Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos de la Estación Experimental del Zaidín (CSIC), Granada, con la ayuda de una Beca de F.P.I. de la Junta de Andalucía.

En 1992, gracias a una Ayuda complementaria, concedida por la Junta de Andalucía, se realizó una estancia de tres meses (Mayo - Agosto) en el Instituto de Nutrición Vegetal de la Universidad Hohenheim de Stuttgart (Alemania), en donde se aprendieron y pusieron en práctica algunas de las técnicas descritas en esta Memoria.

UNIVERSIDAD DE GRANADA  
16 MAYO 1994  
COMISION DE DOCTORADO

## INDICE

INTRODUCCION	1
Generalidades	1
Tipos de micorrizas	2
Micorrizas arbusculares	4
Reconocimiento entre simbiosites	6
Integración estructural	7
Formación de las MA	7
Citología de la simbiosis	13
Cambios en las células de la planta	13
Cambios en el hongo	15
Formación de las interfases hongo-planta	16
Integración fisiológica y bioquímica	17
El suelo	18
La micorriza	19
Modificaciones morfológicas de las micorrizas	19
Modificaciones fisiológicas de las micorrizas	20
Fisiología del intercambio de nutrientes en las MA	21
Aspectos fisiológicos de la nutrición fosforada en MA	21
Aspectos fisiológicos de la nutrición nitrogenada en MA	24
Fisiología del C en las MA	25
Fisiología de la captación de otros nutrientes en MA	26
Fisiología del agua en MA	27
La interfase arbuscular	27
Las membranas celulares de las MA	28
H <sup>+</sup> -ATPasas asociadas a membrana	30
H <sup>+</sup> -ATPasas de plasmalema en la interfase arbuscular	34
La regulación del pH en MA	35
OBJETIVOS	36
MATERIAL Y METODOS	38
1. Determinaciones preliminares	39
1.1. Medida del grado de dependencia del girasol a la micorriza	39
1.1a. Base teórica del método	39
1.1b. Preparación del material	39

Suelo	39
Planta	40
Inóculo de micorrizas	40
1.1c. Procedimiento	40
1.1d. Parámetros determinados	41
1.1e. Análisis estadístico	42
1.2. Estudio de la morfología radical del girasol y la cebolla	42
1.2a. Base teórica del método	42
1.2b. Preparación del material	43
Suelo	43
Planta	43
Inóculo de micorrizas	43
1.2c. Procedimiento	43
1.2d. Parámetros determinados	44
1.2e. Análisis estadístico	45
2. Estudios sobre el metabolismo protónico y las membranas de la MA	45
2.1. Medida de la extrusión de H <sup>+</sup> en raíces enteras	45
2.1a. Base teórica del método	45
2.1b. Preparación del material	45
Suelo	45
Planta	45
Inóculo de micorrizas	46
2.1c. Procedimiento	46
Obtención del material vegetal	46
Medida de la extrusión de H <sup>+</sup>	46
2.1d. Parámetros determinados	46
2.2. Medida <i>in vitro</i> de la actividad H <sup>+</sup> -ATPásica asociada a membranas en MA	49
A) Extracción de microsomas enriquecidos en H <sup>+</sup> -ATPasas de plasmalema	50
A.2.2a. Base teórica del método	50
A.2.2b. Preparación del material	50
A.2.2c. Procedimiento	51
B) Cuantificación de proteínas en la suspensión de membranas	53
C) Cuantificación de la actividad H <sup>+</sup> -ATPásica asociada a membrana	54
C.2.2a. Base teórica del método	54

C.2.2b. Puesta a punto del método para extractos de cebolla	54
C.2.2c Procedimiento	55
C.2.2d. Parámetros determinados	56
2.3. Caracterización lipídica de las membranas celulares de raíces y micorrizas arbusculares de girasol y cebolla	57
2.3a. Base teórica del método	57
2.3b. Preparación del material	58
2.3c. Procedimiento	58
Extracción de lípidos totales de membrana	58
Obtención de ácidos grasos de membrana a partir de sus lípidos totales	60
2.3d. Parámetros determinados	60
2.4. Medidas <i>in vivo</i> del pH rizosférico y micorrizosférico, bajo el aporte de distintas formas iónicas de N	62
2.4a. Base teórica del método	62
Determinación preliminar: estudio de la inocuidad de la púrpura de bromocresol para los hongos formadores de MA	62
Preparación del material	63
Procedimiento	63
Parámetros determinados	64
Análisis estadístico	64
2.4b. Preparación del material	64
Suelo	64
Planta	65
Inóculo de micorrizas	65
2.4c. Procedimiento	65
Lecturas del pH <i>in vivo</i>	66
2.5. Estudio de los posibles cambios de pH promovidos por las hifas de los hongos arbusculares cultivados <i>in vitro</i> bajo distintas formas iónicas de N	66
2.5a. Base teórica del método	66
2.5b. Preparación del material	67
Obtención de esporas	67
Preparación de los medios de cultivo	67
2.5c. Procedimiento	68
2.5d. Parámetros determinados	68
2.5e. Análisis estadístico	68

RESULTADOS	69
1. Determinaciones preliminares	69
1.1. Medida del grado de dependencia del girasol de la micorriza	69
1.2. Estudio de la morfología radical del girasol y de la cebolla	73
2. Estudios sobre el metabolismo protónico y las membranas de las MA	76
2.1. Medida de la extrusión de H <sup>+</sup> en raíces enteras	76
2.2. Medidas <i>in vitro</i> de la actividad H <sup>+</sup> -ATPásica asociada a membranas en MA	77
2.2a. Estudios sobre girasol	77
2.2b. Estudios sobre cebolla	85
2.3. Caracterización lipídica de las membranas de raíces y micorrizas arbusculares de girasol y cebolla	97
2.3a. Estudios sobre girasol	97
2.3b. Estudios sobre cebolla	100
2.4. Medida <i>in vivo</i> del pH rizosférico y micorrizosférico bajo el aporte de distintas formas iónicas de N	102
2.4a. Determinación preliminar: Estudio de la inocuidad de la púrpura de bromocresol para los hongos formadores de MA	102
2.4b. Medida <i>in vivo</i> del pH rizosférico y micorrizosférico	103
2.5. Estudio de los posibles cambios de pH promovidos por las hifas de los hongo arbusculares cultivados <i>in vitro</i> bajo distintas formas iónicas de N	106
DISCUSION	108
CONCLUSIONES	125
BIBLIOGRAFIA	127



## Tabla de abreviaturas.

ATP	.....	Adenosín trifosfato.
BSA	.....	Albúmina bovina.
BTP	.....	Bis-Tris-Propano.
C	.....	Plantas control, testigo.
DTT	.....	Ditiotreitol
EGTA	.....	Etilenglicol aminoetil éter.
g.p.h.	.....	Gramo de peso húmedo.
HES	.....	Híbrido enano simple (variedad de girasol)
L.R.E.	.....	Longitud de raíz específica.
M	.....	Plantas micorrizadas.
MA	.....	Micorrizas arbusculares.
MES	.....	Acido morfolino etanosulfónico.
$\Delta N_3^-$	.....	Actividad $H^+$ - ATPásica sensible a azida.
$\Delta NO_3^-$	.....	Actividad $H^+$ - ATPásica sensible a nitrato.
PMSF	.....	Fenilmetilsulfonil-fluoruro.
p.p.m.	.....	Partes por millón.
$\Delta Va$	.....	Actividad $H^+$ - ATPásica sensible a vanadato, e insensible a nitrato y azida.

*INTRODUCCION*

## INTRODUCCION

### Generalidades:

El término "micorriza" (del griego "mikos", hongo, y "rhiza", raíz) fue utilizado por vez primera por Frank a finales del siglo pasado (Frank, 1885) para hacer referencia a determinadas asociaciones existentes entre ciertos hongos del suelo y raíces de plantas (en ese caso concreto, de la familia Fagaceae). Aunque, desde el principio del presente siglo se ha descrito la existencia de relaciones entre hifas fúngicas y sistemas radicales de plantas superiores (Bonfante-Fasolo, 1984), no fué hasta los años 50 cuando se comenzó a poner de manifiesto la importancia real y el significado de estas asociaciones, así como su presencia en la práctica totalidad de los sistemas suelo-planta. En efecto, en la inmensa mayoría de los hábitats naturales (Barea y Azcón-Aguilar, 1983), incluso en las condiciones mas diversas y adversas (Mosse *et al.*, 1981; Hayman, 1982a), aproximadamente un 97% de las plantas superiores están micorrizadas (Harley y Smith, 1983), es decir, sus raíces se encuentran modificadas fisiológicamente por la presencia de hongos específicos del suelo, con los que establecen asociaciones simbióticas mutualísticas en las que ambos organismos se encuentran integrados de tal manera que dan lugar a una nueva entidad. Según ésto, en la mayoría de los casos se puede decir que el órgano de captación de nutrientes de la planta es la "micorriza", y no la "raíz" propiamente dicha (Harley y Smith, 1983).

Aunque la primera descripción data de poco mas de un siglo, hoy se sabe que las micorrizas han estado ligadas al desarrollo vegetal desde el inicio de la colonización de la superficie terrestre por las plantas. Esto es lo que parece deducirse del estudio tanto de los registros fósiles vegetales mas antiguos que se conocen, en los cuales se han encontrado estructuras fúngicas similares a las de las actuales micorrizas (Nicholson, 1975; Malloch *et al.*, 1980; Stubblefield *et al.*, 1987), como de los estudios filogenéticos realizados sobre ADN ribosómico procedente de hongos formadores de micorrizas (Simon *et al.*, 1992; 1993). Hoy en día se acepta que la colonización de los hábitats terrestres, a partir de los acuáticos, por parte los de sistemas vegetales, se llevó a cabo mediante la asociación de un alga, como sistema fotosintético autótrofo, con un hongo encargado de la captación de agua y nutrientes minerales, fenómenos que, obviamente, estaban muy dificultados en el nuevo medio. A partir de aquella primitiva asociación, los vegetales terrestres han ido evolucionando conjuntamente con los hongos micorrícicos, manteniendo esa estrategia de captación e intercambio mutuo de nutrientes (Harley y Smith, 1983). Posiblemente se deba a esta co-evolución el que en la actualidad se puedan encontrar especies vegetales cuyo desarrollo apropiado, e incluso en algunos casos, supervivencia, estén condicionados a la formación de micorrizas (Barea *et al.*, 1984). Esta

situación, sin embargo, es aún mas crítica en el caso de los hongos implicados en la simbiosis, puesto que, como se verá mas adelante, la mayoría de ellos no son capaces de crecer en ausencia de la planta hospedadora (Hepper, 1984; Marx y Cordell, 1989; Azcón-Aguilar *et al.*, 1990).

#### Tipos de micorrizas:

Atendiendo a las características morfológicas de la simbiosis, así como a los taxones a los que pertenecen las plantas y los hongos implicados, se pueden distinguir siete tipos de asociaciones micorrícicas (Harley y Smith, 1983), tal como se muestra en la Tabla I.

Las ectomicorrizas o micorrizas ectotróficas, deben su nombre a que la colonización que el hongo lleva a cabo en la raíz es de carácter exclusivamente intercelular, dando lugar a una profusa red de hifas que se desarrolla entre las células corticales, denominada red de Hartig (Harley y Smith, 1983). Es también característico de este tipo de simbiosis la formación de un "manto" de micelio externo que envuelve elementos del sistema radical y que parece actuar, a la vez de proporcionándoles un nicho ecológico favorable, protegiéndoles del posible ataque de patógenos (Marx, 1973). La mayoría de los hongos formadores de ectomicorrizas pertenecen a los Asco- y Basidiomicetos, y mas raramente a los Zigomicetos (Barea, 1990), y se calcula que existen unas 5000 especies fúngicas capaces de desarrollar esta simbiosis. Por su parte, se han contabilizado unas 2000 especies vegetales, tanto Angiospermas como Gimnospermas, capaces de asociarse con estos hongos (Marx y Shafer, 1989), la mayoría de ellas de elevado interés forestal. En conjunto, se estima que de un 3 a un 5% del total de las especies de plantas terrestres forman ectomicorrizas (Meyer, 1973).

Las micorrizas arbusculares (MA), encuadradas dentro de las endomicorrizas o micorrizas endotróficas, llamadas así por colonizar intracelularmente la raíz, son las mas ampliamente distribuidas en la naturaleza. Aproximadamente entre el 90 y el 95% de las especies vegetales terrestres las forman (Kendrick y Berch, 1985; Trappe, 1986), sobre todo Angiospermas, la mayoría de ellas de alto interés económico, aunque también algunas Gimnospermas, Pteridofitas y Briofitas (Barea *et al.*, 1991; Walker, 1992). El hecho de que la práctica totalidad de las especies vegetales formen MA, contrasta con que sólo unas 150 especies de hongos las originan (Morton, 1988), todos ellos pertenecientes al grupo de los Zigomicetos. En estas micorrizas la colonización de la raíz por las hifas del hongo es tanto inter- como intracelular, y se caracteriza porque en las células mas internas del córtex, las hifas del hongo, mediante divisiones dicotómicas sucesivas, dan lugar a unas formaciones características denominadas arbúsculos. A nivel de estas estructuras parece producirse el intercambio de nutrientes entre el hongo y la planta. En este tipo de micorrizas no se forma manto, pero, simultáneamente a la colonización interna de la raíz, el hongo comienza a desarrollar un micelio

Tabla 1. Principales características de los distintos tipos de micorrizas. (Indicaciones entre paréntesis, corresponden a casos poco habituales). (Tomado de Harley, 1983).

	<u>Arbusculares</u>	<u>Ectomicorrizas</u>	<u>Ectendomicorrizas</u>	<u>Arbutoides</u>	<u>Monotropoides</u>	<u>Ericoides</u>	<u>Orquidoides</u>
Hongo septado	-	+	+	+	+	+	+
aseptado	+	(+)	-	-	-	-	-
Hifas intracelulares	+	-	+	+	+	+	+
Manto	-	+	+ o -	+	+	-	-
Red de Hartig	-	+	+	+	+	-	-
"Ovillos"	+	-	+	+	-	+	+
Haustorio dicótomo	+	-	-	-	-	-	-
no dicótomo	-	-	-	-	+	-	+ o -
Vesículas	+ o -	-	-	-	-	-	-
Aclorófilas	-(o+)	-	-	-(o+)	+	-	+
Taxón fúngico	Fico-	Basidio- Asco- Fico-	Basidio- Asco-?	Basidio-	Basidio-	Asco- (Basidio-)	Basidio-
Taxón vegetal	Brio- Pterido- Gimno- Angio-	Gimno- Angio-	Gimno- Angio-	Ericales	Monotropaceae	Ericales	Orquidaceae

externo alrededor de la misma, cuya extensión va a depender de la planta y del hongo implicados, así como del tipo de suelo y de determinados factores ambientales en los que se desarrolla la simbiosis.

Las ectendomicorrizas son un grupo muy poco estudiado que parece reunir características tanto de ecto- como de endomicorrizas, puesto que presentan hifas tanto inter- como intracelulares, y en algunas ocasiones, también manto, aunque poco desarrollado. No se tiene certeza sobre los hongos que las forman, aunque se apunta hacia algunos Discomicetos como posibles responsables (Yang y Korf, 1985a y b; Piché *et al.*, 1986; Alvarez, 1991). Las plantas implicadas pueden ser tanto Angiospermas como Gimnospermas, aunque la asociación se produce, fundamentalmente, en sus estadios juveniles.

Las micorrizas arbutoides y monotropoides podrían incluirse, por sus características morfológicas, dentro de las ectendomicorrizas, pero en este caso la asociación se mantiene cuando la planta es adulta. Se encuentran restringidas a géneros o familias muy concretas de plantas hospedadoras (géneros *Arbutus* y *Arctostaphylos*, y familia Monotropaceae, respectivamente) y los hongos implicados son Basidiomicetos.

Las micorrizas ericoides y orquidoides se incluirían, de acuerdo también a sus caracteres morfológicos, dentro de las endomicorrizas, puesto que colonizan intracelularmente las células de la epidermis y del córtex de la raíz. También se encuentran muy restringidas en la naturaleza, ya que las plantas que forman este tipo de simbiosis, son únicamente las pertenecientes a las familias Ericaceae y Orchidiaceae, respectivamente. Los hongos que las forman son Asco- y Basidiomicetos.

En cualquier caso, todos los tipos de micorrizas descritos presentan características comunes, como son la no colonización de las raíces suberizadas de la planta (Calvet, 1990), así como la limitación de la zona de colonización al córtex radical. En efecto, las hifas fúngicas no penetran en la endodermis ni, consecuentemente, en el cilindro vascular, lo que indica el elevado control que la planta ejerce sobre la asociación (Barea *et al.*, 1991) y diferencia este tipo de simbiosis de las provocadas por patógenos.

### **Micorrizas Arbusculares:**

Las micorrizas arbusculares son el grupo más importante dentro de las simbiosis micorrícicas, tanto a nivel cuantitativo (afectan, como hemos visto, al 95% de las plantas vasculares), como cualitativo, ya que entre las plantas que las forman se encuentran la práctica totalidad de las especies de interés agronómico e industrial, plantas ornamentales, cultivos mediterráneos típicos, especies de interés forestal, etc. (Hayman, 1982b; Linderman, 1988). Solo algunas familias, entre ellas las Chenopodiaceae, Cruciferae, Fumariaceae, Urticaceae y

Poligonaceae, poseen especies que habitualmente no forman este tipo de simbiosis (Trappe, 1986). Sin embargo, desde sus primeras descripciones a principios del presente siglo (Gallaud, 1905), hasta que su estudio fue retomado por Mosse en los años 50, se extiende una etapa en la que fueron prácticamente olvidadas. Esto probablemente se debió a distintas circunstancias. En primer lugar, la presencia de la simbiosis no origina cambios morfológicos notorios en la raíz a nivel macroscópico, como ocurre con las ectomicorrizas (Gerdemann, 1971), por lo que pasan desapercibidas fácilmente, salvo que se les apliquen técnicas específicas de tinción y posterior observación microscópica. En segundo lugar, el hecho de que los hongos responsables de su formación no crezcan en los medios de cultivo habituales, ha condicionado que durante mucho tiempo pasaran inadvertidos a los microbiólogos, a pesar de ser unos de los habitantes más comunes de los suelos. En la actualidad, sin embargo, se ha acumulado una gran cantidad de información acerca de esta simbiosis, especialmente en lo que a sus efectos sobre el crecimiento de la planta se refiere. Los procesos fisiológicos y bioquímicos responsables de tales efectos, son, en cambio, mucho menos conocidos.

Durante la formación de la micorriza arbuscular, tienen lugar una serie de interacciones hongo-raíz que dan lugar a la integración de ambos organismos en un "supraorganismo" común. Aunque se tiene muy poca información a este respecto, el establecimiento de la simbiosis debe de ser el resultado de un continuo "diálogo" molecular entre los organismos implicados, mediante el intercambio de señales de reconocimiento y aceptación. Evidentemente, el resultado de este "diálogo" va a depender, en último extremo, de los genomas de la planta y el hongo participantes en la simbiosis.

La integración de los simbiosis se produce a varios niveles:

a) A **nivel estructural**, puesto que el hongo coloniza los tejidos de la corteza de la raíz -dando lugar a lo que se conoce como "micelio interno"-, modifica las células con las que entra en contacto, especialmente si forma arbusculos en ellas, y desarrolla además, un conjunto de hifas extrarradicales que se extienden por el suelo y van a ser las encargadas de la captación de nutrientes. Estas hifas constituyen el "micelio externo". La fisonomía de una micorriza difiere, por tanto, sensiblemente de la de la raíz, aunque las diferencias no se observen a simple vista.

b) A **nivel fisiológico y bioquímico** la integración se manifiesta fundamentalmente porque la micorrización induce cambios en la captación de nutrientes por las raíces. Estos cambios se observan tanto a nivel de los tejidos y procesos bioquímicos implicados en la captación, como en la eficacia de la misma. La aparición de una serie de interfases entre el hongo y la planta, que, como generalmente se acepta, van a ser las zonas de intercambio de nutrientes entre ambos simbiosis, con las modificaciones metabólicas y enzimáticas que esto conlleva, son un buen ejemplo del elevado grado de integración fisiológica de esta simbiosis.

Vamos ahora a revisar mas detenidamente cada uno de los niveles de interacción - reconocimiento, integración estructural y funcionamiento común- para profundizar en los procesos característicos que dan lugar al establecimiento y operatividad de la simbiosis.

#### Reconocimiento entre simbiosites.

Como se acaba de indicar, existe muy poca información al respecto, aunque no hay duda de que entre la planta y el hongo debe de establecerse un intercambio de señales de reconocimiento, que conduzca finalmente a la estrecha asociación de ambos simbiosites.

Por analogía a lo que ocurre en la simbiosis *Rhizobium* - leguminosa, se piensa que los fenil propanoides juegan un papel importante en la formación de la micorriza (Tsai y Phillips, 1991; Azcón-Aguilar y Barea, 1994). Estos compuestos, producidos por la planta, son importantes señales de transcripción, capaces de inducir la expresión de los genes de la nodulación en *Rhizobium* y *Bradirhizobium* (Palomares y Coronado, 1992).

En relación a las MA, se ha puesto de manifiesto que los flavonoides son capaces de estimular la germinación de las esporas de los hongos formadores de MA, su desarrollo *in vitro* y la producción de células auxiliares (Gianinazzi-Pearson *et al.*, 1989; Nair *et al.*, 1991; Tsai y Phillips, 1991, Bécard *et al.*, 1992; Kape *et al.*, 1992), así como de incrementar la colonización de las raíces de la planta hospedadora por el hongo (Nair *et al.*, 1991). Con respecto a los isoflavonoides, algunos de ellos estimulan también la colonización radical (Siqueira *et al.*, 1991), aunque otros inhiben el desarrollo del hongo arbuscular (Tsai y Phillips, 1991; Bécard *et al.*, 1992). Existe, por lo tanto, la creencia generalizada de que algunos de estos compuestos pueden actuar como señales de reconocimiento en los primeros estadios del establecimiento de la simbiosis (Gianinazzi-Pearson *et al.*, 1989).

Este paralelismo entre ambas simbiosis mutualísticas, *Rhizobium* - leguminosa y MA, parece estar avalado por los primeros estudios genéticos llevados a cabo sobre el tema. De hecho, Duc y colaboradores (1989) obtuvieron mutantes de guisante no formadores de MA (*myc*<sup>-</sup>) y observaron que la expresión del caracter *myc*<sup>-</sup> estaba asociada con la del caracter *nod*<sup>-</sup> (incapaces de nodular). Estos resultados sugieren la existencia de algún mecanismo de control genético, ejercido por la planta hospedadora, común a ambas simbiosis. Esta aparente conexión en el proceso de formación de ambas simbiosis ha sido confirmada posteriormente en mutantes *nod*<sup>-</sup> de alfalfa (Bradbury *et al.*, 1993).

Probablemente la simbiosis induzca cambios específicos en la expresión de los genes y en la síntesis de proteínas en ambos organismos, al igual que ocurre en otras interacciones microorganismo-planta. De hecho, se ha detectado la existencia de proteínas específicas, denominadas micorrícinas, en plantas micorrizadas (Dumas *et al.*, 1992), aunque en la mayoría de los casos se desconoce su función.



### Integración estructural.

#### Formación de las MA:

En el suelo existen dos tipos de estructuras fúngicas que pueden iniciar la formación de una MA. Por un lado, las esporas de resistencia producidas por estos hongos, capaces de soportar condiciones muy adversas, por lo que son las principales responsables de la supervivencia de los hongos formadores de MA en el suelo (Hayman, 1982a; Daniels, 1984). Por otro lado, están las hifas procedentes de una raíz previamente micorrizada, ya se encuentre ésta formando parte de una planta viva, o bien se trate de fragmentos de raíces preexistentes (Hayman, 1982a; Daniels, 1984). Este último tipo de inóculo es más eficaz que las esporas en la colonización de un nuevo sistema radical, en el sentido de que la formación de la micorriza ocurre más rápidamente, aunque también es más "efímero", puesto que no tiene tanta protección y es menos resistente ante eventuales condiciones adversas. No obstante, se ha comprobado que las raíces micorrizadas, o más correctamente, las micorrizas, pueden mantener su capacidad infectiva después de permanecer en suelo seco durante periodos de tiempo de hasta seis meses (Tommerup y Abbot, 1981). Recientemente se ha estimado que el tamaño mínimo de fragmento de raíz micorrizada capaz de originar una colonización arbuscular es de 63  $\mu\text{m}$ , lo que corresponde aproximadamente al tamaño de una vesícula (Sylvia y Hubbell, 1986). Esto hizo pensar que serían estas estructuras, las vesículas, las responsables principales de su capacidad infectiva.

No se tiene certeza de que otras estructuras fúngicas que permanecen en el suelo, como fragmentos de hifas o esporas secundarias, sean capaces de iniciar nuevas colonizaciones (Warner y Mosse, 1980; Hayman, 1982; St. John *et al.*, 1983), aunque en algunos casos se ha puesto de manifiesto la capacidad del micelio, separado de la espora madre, de mantenerse vivo e infectivo (Vidal, 1991), siempre que el suelo y sus agregados permanezcan inalterados y no se rompa su estructura (Jasper *et al.*, 1989a y b).

Las condiciones físicas del suelo, en especial humedad y temperatura, parecen ser los factores fundamentales que desencadenan la germinación de las esporas (Siqueira *et al.*, 1985). Se sabe, en efecto, que éstas no requieren para germinar ningún tipo de nutriente, ni la presencia de una planta hospedadora, si bien se ha observado que el proceso de germinación puede, en ocasiones, ser estimulado por la presencia de exudados radicales y de determinados microorganismos del suelo (Graham, 1982; Azcón-Aguilar *et al.*, 1986a y b; Mayo *et al.*, 1986; Azcón, 1987; Azcón-Aguilar *et al.*, 1988), o inhibido por exudados radicales de plantas no hospedadoras (El-Atrach *et al.*, 1989). Esto indica que las esporas cuentan con el material genético y bioquímico necesario para llevar a cabo la germinación (Bagyaraj, 1984; Siqueira,

1985; Siqueira, 1987). No se conocen bien los mecanismos intrínsecos que rigen la germinación de las esporas, aunque se ha sugerido que se podría desencadenar como consecuencia de los cambios biofísicos originados a nivel de la membrana de la espora tras la entrada de agua durante el proceso de imbibición (Siqueira, 1987). A partir de este momento, tendría lugar una serie de procesos de síntesis de ARNs y proteínas, así como la activación de enzimas específicos (Hepper, 1979; Beilby y Kidby, 1982; Siqueira, 1987), que darían como resultado la aparición del tubo de germinación.

A partir del tubo de germinación, el hongo va a desarrollar un conjunto de hifas que colonizan el suelo de alrededor de la espora de manera radial (Sanders y Sheikh, 1983). Estas hifas cuentan con una cierta capacidad metabólica, y en ellas se ha puesto de manifiesto la existencia de determinados sistemas enzimáticos, como los implicados en la asimilación del nitrato (Ho y Trappe, 1975; Sundaresan *et al.*, 1988), en el ciclo de Krebs (McDonald y Lewis, 1978), así como cierta capacidad ATPásica (Lei *et al.*, 1991). Aunque se acepta, en general, que las hifas se desarrollan a expensas de las reservas lipídicas de la espora madre, y que dependen de su unión a ella para su desarrollo masivo (Barea *et al.*, 1991), se ha visto que estas hifas pueden mantener un cierto crecimiento autónomo, una vez que han sido separadas de la espora, lo que significaría una cierta capacidad de desarrollo saprofito por parte del micelio de estos hongos (Hepper, 1983; Jasper *et al.*, 1989a y b; Bago, 1990).

Las hifas procedentes de la espora, denominadas "exploradoras", se desarrollan en el suelo de forma errática, y no experimentan ningún tipo de atracción preferencial hacia las raíces de plantas hospedadoras. Cuando, de manera fortuita, alguna de ellas llega a la rizosfera de una planta susceptible de formar micorrizas, sufre una estimulación que la induce a ramificarse de forma masiva (Powel, 1976; Barea, 1986; Bécard y Fortin, 1988; Glenn *et al.*, 1988; Bécard *et al.*, 1988).

Si las hifas "exploradoras" no consiguen acceder a la rizosfera de alguna planta susceptible de ser colonizada, al poco tiempo entran en una fase de degeneración: el citoplasma se retrae hacia la espora, y la hifa, al quedar vacía, se tabica y colapsa, entrando la espora, de nuevo, en fase de dormancia. No obstante, cuando las condiciones del medio sean favorables de nuevo, esa misma espora puede volver a germinar, y a emitir un nuevo micelio "explorador", y así sucesivamente hasta que encuentre una raíz que pueda colonizar con éxito, o degenerar definitivamente (Koske, 1981; Bago, 1990). Esta capacidad de llevar a cabo germinaciones sucesivas cuando las condiciones ambientales son favorables, es considerada como una estrategia del hongo para perpetuarse, puesto que la retracción del citoplasma supone un ahorro energético y de componentes vitales. Esta capacidad para germinar sucesivamente permite al hongo tener mas opciones para establecer la simbiosis con una planta susceptible, y poder así completar su ciclo de vida (Burggraaf y Beringer, 1989).

Se desconoce la razón por la que, en un momento dado, cesa el desarrollo de las hifas y comienza la retracción del citoplasma. En ese momento, las reservas lipídicas de la espora no se ha agotado todavía (Koske, 1981), por lo que el hongo debe de necesitar de algún compuesto específico para mantener y continuar su desarrollo. Este compuesto solo lo obtiene tras la colonización de la planta, la cual induce la diferenciación del hongo y su crecimiento masivo. Burggraaf y Beringer (1989), a partir de estudios *in vitro*, atribuyeron el cese del desarrollo del micelio a una incapacidad del hongo para sintetizar ADN, y, consecuentemente, para la replicación nuclear. Sin embargo, existen evidencias indirectas en sentido contrario (Hepper, 1979; Gianinazzi-Pearson y Smith, 1993), por lo que se desconoce todavía la causa de la incapacidad del hongo para desarrollarse independientemente.

Sea cual fuere la razón de esta biotrofia obligada, los compuestos o señales que desencadenan la diferenciación y el crecimiento masivo de los hongos arbusculares deben de ser comunes a la mayor parte de las especies vegetales terrestres, debido a la ausencia de especificidad de la simbiosis, y a la capacidad de la mayoría de las plantas de establecer la asociación con cualquier hongo formador de MA.

Cuando las hifas "exploradoras" consiguen acceder a la rizosfera de una planta hospedadora, pasan a denominarse hifas "colonizadoras". Aquí su crecimiento se ve notablemente estimulado por los exudados radicales existentes en la zona (Barea, 1986; Elias y Safir, 1987; Glenn *et al.*, 1988; Bécard y Piché, 1989) y, probablemente también, por la actividad de los microorganismos rizosféricos allí presentes (Azcón-Aguilar y Barea, 1985; Barea, 1986; Azcón, 1987). Si las hifas provienen de una espora, se origina, mediante la ramificación sucesiva de la hifa colonizadora, una estructura de pre-infección en forma de abanico (Mosse y Hepper, 1975; Powell, 1976; Glenn *et al.*, 1988). Esta estructura, sin embargo, no se forma cuando las hifas proceden de una raíz ya micorrizada (Powell, 1976). Se especula con que ésto pueda deberse a la necesidad de las hifas procedentes de las esporas de una captación de nutrientes que active el micelio, y lo fortalezca para la posterior colonización de la planta. En el caso de las hifas procedentes de otra micorriza, ya tendrían estos nutrientes y no necesitarían captarlos, es decir, estarían "activadas" (Barea *et al.*, 1991). En cualquier caso, la formación de esta estructura de pre-colonización es el primer signo de reconocimiento de la planta hospedadora por parte del hongo arbuscular, aún en ausencia de contacto físico (Barea *et al.*, 1991). El desarrollo de las hifas ya no es errático, sino que ahora son atraídas hacia la rizoplana debido, al menos parcialmente, a compuestos volátiles (Koske, 1982; Bécard *et al.*, 1988; Glenn *et al.*, 1988)

La siguiente etapa en la colonización del sistema radical sería el contacto de una hifa con la superficie de alguna raíz, y la posterior penetración en su interior. En general, se acepta que los sitios mas habituales de penetración coinciden con los lugares mas activos de la raíz. Concretamente, se ha observado que la mayor frecuencia de puntos de entrada se produce entre

0.5 y 1.5 cm del meristemo apical (Harley y Smith, 1983), en donde es más rápido el crecimiento de la raíz (Bécard y Fortin, 1988). Ello podría ser debido a que la hifa experimenta una mayor atracción hacia esas zonas, puesto que en ellas la exudación radical es más abundante. Sin embargo, se han descrito también inicios de colonización en otras zonas del sistema radical (Buwalda *et al.*, 1984; Hepper, 1985; Smith *et al.*, 1986; Smith y Gianinazzi-Pearson, 1988), aunque nunca en zonas dañadas o a través de heridas (Hayman, 1983), lo que indica que la raíz debe encontrarse en buenas condiciones fisiológicas para ser colonizada.

En algunas ocasiones, las hifas "colonizadoras" avanzan paralelamente a la raíz algunos milímetros antes de iniciar un punto de entrada (Gianinazzi-Pearson, 1984). Cuando finalmente una hifa entra en contacto con la superficie de la raíz, se ensancha, y da lugar a un apresorio, siendo éste el segundo signo claro de reconocimiento entre el hongo y la raíz (Bonfante-Fasolo, 1984). La penetración puede ocurrir a través de la pared de una célula epidérmica, es decir, intracelularmente, entre dos células epidérmicas (intercelularmente), o bien, a través de un pelo radical (Bonfante-Fasolo, 1984).

Los mecanismos de penetración del hongo en la raíz parecen ser una suma de procesos mecánicos, por la presión ejercida por la hifa (Harley y Smith, 1983), y enzimáticos, mediante la producción de enzimas pectinolíticos y celulolíticos por parte del hongo. Estos enzimas se producen en pequeñas cantidades, por lo que no llegan a producir la degradación total de las paredes celulares de la raíz, pero sí la desorganización de sus componentes (García-Romera, 1990; García-Romera *et al.*, 1990, 1991; García-Garrido, 1991; García-Garrido *et al.*, 1992). Esto concuerda con el hecho de que las paredes celulares tratadas con niveles bajos de enzimas líticos, no llegan a perder su estructura, pero incrementan mucho su "porosidad" (Baron-Epel *et al.*, 1988). Podría pensarse, por lo tanto, que la hifa del hongo debilitaría primero la estructura de la pared vegetal al contactar con ella, para ejercer luego una presión mecánica que le permitiera introducirse en el interior de la célula. Se ha descrito también que esta presión favorece la exudación por parte del hospedador, lo que a su vez fortalecería al hongo (Harley y Smith, 1983). Durante su penetración a través de la pared, la hifa sufre un estrechamiento del que se recupera una vez dentro de la célula (Bonfante-Fasolo, 1984). Esto parece confirmar que el hongo induce el "menor daño posible" en su entrada a la raíz y da una idea de la buena coordinación existente entre ambos simbiosis desde los estadios más tempranos de la colonización.

La proporción de pectina o celulosa en la pared, parece jugar también un papel importante con respecto al modo de entrada del hongo en la raíz. Así, se ha puesto de manifiesto que si la composición de la pared tiene una mayor cantidad de pectina, compuesto que le confiere cierta flexibilidad, la entrada del hongo se produce a través de una célula epidérmica, es decir, intracelularmente; sin embargo, si la proporción de celulosa es más

elevada, en general el hongo opta por la penetración intercelular, o a través de un pelo radical, en donde el grosor de la pared es menor (Bonfante-Fasolo y Perotto, 1992).

Una vez superada la barrera de la pared celular, la hifa se encuentra con el plasmalema de la célula hospedadora. En la formación de micorrizas es característico que el hongo nunca penetra el plasmalema. La hifa de penetración induce la invaginación del plasmalema de la célula hospedadora, de manera que queda envuelta completamente por él, como si de un dedo en un guante se tratara. Entre la pared fúngica y el plasmalema de la célula vegetal se va a mantener siempre una matriz con material fibrilar (Kinden y Brown, 1975; Dexheimer *et al.*, 1979; Bonfante-Fasolo, 1984), que se hace continua con la pared de la célula no afectada por el hongo (Grippiolo, 1981). Este material estaría formado por fibrillas de polisacáridos dispersas, que la célula vegetal produce como precursores de la pared celular, pero cuya polimerización estaría impedida por el hongo (Dexheimer *et al.*, 1979; 1986).

El mecanismo de penetración de la pared celular e invaginación del plasmalema se va repitiendo con el paso de las hifas de una célula a otra, excepto si la colonización ocurre intercelularmente, en cuyo caso la hifa sólo actúa sobre la lámina media, abriéndose paso entre ella.

Cuando la hifa del hongo llega a las células más externas del parénquima cortical, puede producir en el interior de esas células unas circunvoluciones no ramificadas, denominadas "ovillos" (Bonfante-Fasolo, 1984). A partir de aquí, la hifa de penetración continua avanzando hasta alcanzar la zona media del córtex, en donde se va a producir la extensión rápida de la colonización, puesto que la hifa se ramifica y, a través de los espacios intercelulares, comienza a recorrer longitudinalmente la raíz, agrupada en paquetes de 2 a 4 (Barea *et al.*, 1991). En aquellos casos, mucho menos frecuentes, en los que las células del córtex de la raíz no dejan entre ellas canales intercelulares, la colonización transcurre, mucho más lentamente, mediante el paso de las hifas del hongo de célula a célula (Kinden y Brown, 1975; Jaquelinet-Jeanmougin, 1986; Brundrett y Kendrick, 1990).

Además de recorrer longitudinalmente la raíz en el córtex medio, las hifas penetran también en el córtex interno, y allí continúan desarrollándose longitudinalmente, aunque a la vez se ramifican lateralmente para penetrar en las células, en donde se dividen profusa y dicotómicamente, dando lugar a la estructura más característica y compleja de esta simbiosis: el arbusculo.

El arbusculo recibe ese nombre porque su estructura recuerda a la de un pequeño árbol con tronco y ramificaciones. Llega a ocupar hasta un 35% del volumen de la célula que lo alberga (Alexander *et al.*, 1988). Todas las ramificaciones que presenta, incluso las más finas, se encuentran rodeadas de la membrana plasmática de la célula hospedadora, lo que ha de suponer un incremento espectacular en la superficie de membrana de ambos simbiosis a ese nivel. Se calcula que la relación área/volumen del protoplasto de una célula colonizada por un

arbúsculo puede llegar a incrementarse en más de 10 veces (Alexander *et al.*, 1988). Esto lleva consigo un gran aumento en la superficie de contacto entre el hongo y la planta (Cox y Tinker, 1976; Toth y Miller, 1984; Alexander *et al.*, 1988), e implica la formación extensiva de interfases entre ambos (Smith y Smith, 1990). Aunque a lo largo de toda la colonización de la raíz por el hongo se establecen interfases hongo-planta, las originadas a nivel del arbúsculo son mas especializadas, en el sentido de que en ellas las paredes celulares de ambos simbioses quedan reducidas a un mínimo (Bonfante-Fasolo, 1984; Smith y Gianinazzi-Pearson, 1988; Smith y Smith, 1990). Es por todo esto por lo que el arbúsculo se considera como la máxima expresión de esta simbiosis (Bonfante-Fasolo, 1984), y el lugar mas adecuado para que ocurra el intercambio de nutrientes entre la planta y el hongo (Marx *et al.*, 1982).

Los arbúsculos presentan un ciclo de formación y degeneración continua en la raíz. Tienen en una vida media de entre 4 y 10 días (Cox y Tinker, 1976), aunque se han descrito casos de una vida mucho mas prolongada en ciertos tipos de simbiosis arbusculares (Brundrett y Kendrick, 1990). Cuando dejan de ser funcionales, el citoplasma del hongo se retrae y sus ramificaciones se colapsan, observándose al microscopio electrónico como estructuras desorganizadas (Scannerini y Bonfante-Fasolo, 1983; Bonfante-Fasolo, 1984).

Los restos del arbúsculo degenerado acaban por desaparecer, y la célula que lo albergaba vuelve a su situación inicial, siendo susceptible de albergar otros nuevos (Harley y Smith, 1983). En un principio se sugirió que el aporte de los nutrientes captados por el hongo a la planta tendrían lugar mediante la degeneración del arbúsculo y posterior asimilación por las células de los nutrientes contenidos en su interior (Lewis, 1973; Scannerini, 1975; Kinden y Brown, 1975; Scannerini *et al.* 1975; Strullu y Gourret, 1980). Hoy en día se sabe que los nutrientes transferidos por este mecanismo pueden justificar tan sólo un 1% del total de nutrientes aportados por el hongo a la planta (Cox y Tinker, 1976; Smith, 1980; Scannerini y Bonfante-Fasolo, 1983), por lo que la transferencia de nutrientes del hongo a la planta debe de ocurrir a través de las membranas intactas del hongo, cuando éste permanece aún activo..

Además de los arbúsculos, las hifas del hongo pueden originar en su colonización del córtex unas estructuras globosas, de alto contenido lipídico, y con función de almacenamiento de reservas, denominadas vesículas (Bonfante-Fasolo, 1984). Estas formaciones, junto con los arbúsculos, daban nombre, hasta hace poco tiempo, al tipo de micorrizas objeto de este estudio (micorrizas "vesículo-arbusculares" en vez de "arbusculares", como ahora se denominan). Este cambio, propuesto muy recientemente, se debe a que dos de los seis géneros de hongos que forman este tipo de simbiosis nunca forman vesículas.

Las vesículas no son efímeras como los arbúsculos, sino que desde que aparecen van madurando y parece ser que, en algunas ocasiones, pueden llegar a convertirse en esporas del hongo. La transformación de estas vesículas en esporas podría estar ligada a situaciones de estrés para la micorriza, o a la muerte inminente de la planta.

Al conjunto de la colonización originada a partir de un único punto de entrada del hongo en la raíz se le denomina "unidad de colonización" (Wilson, 1984a y b). Esta puede alcanzar entre 0.5 y 1 cm de longitud de la raíz. Tras el establecimiento de los primeros arbusculos, las hifas externas del hongo se fortalecen y ramifican intensamente, originando el denominado "micelio externo", que coloniza el suelo de alrededor del sistema radical. Este micelio presenta dos tipos de hifas. Las primeras son de pared gruesa y mas duraderas, y sobre ellas se van a originar unas vesículas externas que, al madurar, se transformarán en nuevas esporas de resistencia. A las segundas, de pared mas fina, y mucho mas efímeras que las anteriores, se les atribuye el papel de captar de nutrientes a partir del suelo (Barea *et al.*, 1991). El micelio externo constituye, por lo tanto, una red tridimensional de hifas cuya extensión varía dependiendo de los organismos integrantes de la simbiosis (Smith y Gianinazzi-Pearson, 1988), pero que puede llegar a colonizar zonas de suelo situadas entre 12 y 20 cm de distancia de la superficie de la raíz (Barea *et al.*, 1991). Se ha calculado que una raíz bien micorrizada puede llegar a formar hasta 14 metros de hifas por centímetro de raíz, aunque lo mas frecuente es la formación de, aproximadamente 1 metro de hifas por centímetro cuadrado de raíz (Abbot y Robson, 1985; Smith y Gianinazzi-Pearson, 1988).

Algunas de las hifas del micelio externo recorren longitudinalmente la superficie de la raíz, originando a su paso nuevos puntos de entrada. Estos puntos de entrada secundarios pueden formarse a distintos niveles del sistema radical, incluso en zonas mas maduras del mismo, y originan, a su vez, nuevas unidades de colonización. Consecuentemente, la presencia del hongo en la raíz se va generalizando, y a medida que el sistema radical crece, se produce la colonización de las nuevas raices producidas, mientras que el hongo va madurando en las zonas mas viejas, donde comienzan a predominar las vesículas con respecto a los arbusculos.

Como se ha indicado anteriormente, se acepta que la vigorización del hongo para dar origen al micelio externo y a los puntos de entrada secundarios provendría de la llegada de compuestos carbonados desde la planta, tras la formación y puesta en funcionamiento de los arbusculos (Sanders y Sheikh, 1983). Sin embargo, en algunos casos se ha descrito un fortalecimiento del micelio externo cuando aún no se habían formado los arbusculos (Hepper, 1981), lo que podría suponer que ya a nivel de las circunvoluciones u ovillos existe cierto intercambio de nutrientes entre ambos simbioses.

#### Citología de la simbiosis:

##### *Cambios en las células de la planta.*

Como ya se ha comentado, el establecimiento de la simbiosis no origina en las raices cambios apreciables a nivel macroscópico. Sin embargo, sí que se producen modificaciones a

nivel microscópico o citológico, que van a depender del tipo de célula implicada (Bonfante-Fasolo, 1984; 1987; 1988).

Las células epidérmicas colonizadas, sufren modificaciones a nivel de su pared y membrana plasmática, pero no en su citoplasma u orgánulos. Como en todas las células penetradas por el hongo, la pared sufre una somera digestión y una desorganización parcial, sumamente localizada, lo que propicia la entrada de la hifa, que es rodeada por la membrana plasmática en todo su recorrido, aumentando, consecuentemente, la superficie de ésta, pero sin sufrir, al parecer, ningún otro tipo de alteración.

Las células del córtex externo con "ovillos" en su interior, presentan también esa disrupción localizada en su pared, y un mayor incremento en la superficie de la membrana, al tener que rodear la circunvolución completa. En estas células, la vacuola permanece central, sin disminuir su tamaño, pero el núcleo y los orgánulos (mitocondrias, retículo endoplásmico, etc.) se disponen lateralmente, asociados, en cierta medida, con las hifas del hongo.

En el córtex medio no suele haber colonización intracelular, al ser ésta la zona de expansión de la unidad de colonización, en la que las hifas se extienden fundamentalmente de manera intercelular. Por lo tanto, son afectadas tan sólo en cuanto a la digestión parcial de sus láminas medias y en un incremento en los espacios intercelulares.

Las células radicales que sufren las modificaciones más notorias son las del córtex interno, al ser colonizadas por arbuscúlos (Bonfante-Fasolo, 1984; 1987; 1988). Además de la disrupción parcial de la pared, en ellas el plasmalema incrementa su superficie de modo espectacular -entre 6 y 12 veces- (Alexander *et al.*, 1988), así como el volumen citoplasmático -entre 3 y 20 veces- (Cox y Tinker, 1976; Toth y Miller, 1984). La vacuola se fragmenta en muchas vacuolas pequeñas, con lo que el tonoplasto incrementa su superficie más de 2.2 veces (Cox y Tinker, 1976), y los gránulos de almidón desaparecen (Nemec, 1981). Asimismo, el núcleo aumenta de tamaño, aunque esto no parece deberse a la endoreduplicación del ADN (Berta *et al.*, 1990; Blair *et al.* 1988), sino a un desenrollamiento de su estructura, lo que sugiere la existencia de una mayor tasa de transcripción (Bonfante-Fasolo y Perotto, 1992). El aparato de Golgi se presenta hiperactivo, y aumenta el número de mitocondrias y otros orgánulos. Todos estos cambios, que recuerdan las etapas juveniles de las células vegetales (Gianinazzi y Gianinazzi-Pearson, 1989), indican que estas células se encuentran metabólicamente activadas, lo que concuerda con que sean ellas las primeras receptoras de los nutrientes que el hongo cede a la planta, así como los lugares de máxima integración hongo-planta.

La colonización de la raíz por las hifas del hongo no continúa más allá del parénquima cortical, es decir, nunca penetra la endodermis, y, consecuentemente, nunca alcanza el cilindro vascular (Bonfante-Fasolo, 1984). Esto podría justificarse por la existencia de una barrera física, la banda de Caspary, a la que la baja producción de enzimas líticos por parte del hongo



sería incapaz de afectar. Este es un hecho importante, puesto que marca una diferencia notable con respecto a hongos patógenos, y refleja el control estricto que la planta ejerce sobre la distribución del hongo dentro de la raíz.

#### *Cambios en el hongo.*

Los cambios mas notables se producen a nivel de las paredes de las hifas, que varían según la zona de raíz en que se encuentren, aunque también se pueden observar ciertos cambios a nivel de los componentes citoplasmáticos.

Las ramificaciones mas finas del micelio externo presentan una pared muy delgada (2-7  $\mu\text{m}$ ), probablemente para favorecer la captación de nutrientes, función que llevan a cabo. Cuando se avanza desde ellas hacia las hifas externas mas estables, sobre las que se forman las esporas, se observa un incremento en el grosor de la pared, que pasa a tener ahora unos 20 a 30  $\mu\text{m}$  de espesor. El componente fundamental de esta pared es la quitina, con organización fibrilar y estructura definida. El citoplasma en las hifas del micelio externo es muy vacuolado, con un retículo endoplásmico que presenta gran cantidad de ribosomas, y muchos núcleos, mitocondrias y otros orgánulos (Bonfante-Fasolo, 1984).

Ya en el interior de la raíz, las hifas intercelulares presentan una pared muy similar a la de las hifas mas permanentes del micelio externo. Se ha observado, sin embargo, que en estas hifas la pared se encuentra envuelta en un material de carácter glucídico, lo que podría ser un mecanismo de protección por parte del hongo, puesto que de esta manera ocultaría y preservaría la quitina del ataque de quitinasas producidas por la planta como respuesta a la penetración fúngica (Spanu *et al.*, 1989). Esto parece indicar que la estrategia que el hongo sigue, no consiste en inhibir los mecanismos defensivos de la planta, sino en evitar su disparo (Bonfante-Fasolo y Perotto, 1992). Asimismo, la presencia de este material impermeabiliza las hifas, impidiendo que el intercambio de nutrientes tenga lugar a un nivel que no pueda ser controlado por el hongo. En el citoplasma se encuentran, al igual que en el micelio externo, gran cantidad de grandes vacuolas y pequeños núcleos. Aparecen además gránulos de polifosfato y numerosas gotitas de lípidos y glucógeno. Se han observado asimismo, unas estructuras cuya función se desconoce, que se han denominado "orgánulos semejantes a bacterias" (Bonfante-Fasolo, 1984). Las paredes de las hifas no disminuyen de grosor ni pierden esa envuelta glucídica a nivel de las circunvoluciones u "ovillos".

A nivel de los arbusculos, la pared fúngica va disminuyendo en grosor y grado de organización, a medida que se avanza hacia sus ramificaciones mas finas: En éstas, llega a tener tan sólo de 30 a 50 nm de espesor y su organización ahora es amorfa, en lugar de fibrilar. No se detectan ya indicios de la matriz glucídica, ni tampoco de quitina, aunque sí la presencia de su precursor, la N-acetilglucosamina (Bonfante-Fasolo *et al.*, 1986, 1988; Glenn *et al.*, 1988), lo que podría indicar que la planta está ejerciendo, en ausencia de la envuelta protectora, un

control sobre su polimerización, facilitando así que el intercambio de nutrientes tenga lugar a ese nivel (Bonfante-Fasolo, 1987; Bonfante-Fasolo y Scannerini, 1992). En cuanto al citoplasma, su estructura es bastante similar al de las hifas intercelulares, aunque presenta vacuolas mas pequeñas, gran cantidad de cuerpos polivesiculares y una distribución regular de los núcleos (Bonfante-Fasolo *et al.*, 1987). A nivel de las ramificaciones mas finas de los arbusculos, dejan de observarse además los gránulos de polifosfato.

#### *Formación de interfases hongo-planta.*

El hecho de que en ningún momento de la colonización de la raíz por el hongo se produzca la perforación de la membrana plasmática de las células vegetales, va a propiciar el desarrollo de una serie de interfases hongo-planta, que pueden ser consideradas como el máximo exponente de la asociación simbiótica (Bonfante-Fasolo y Scannerini, 1992). En efecto, uno de los prerequisites para que se lleve a cabo la transferencia de nutrientes entre los simbioses, objetivo final de la micorriza, consiste en la formación de interfases en las que las barreras que separan a los dos organismos quedan reducidas a un mínimo (Smith y Smith, 1990). En consecuencia, todas las estructuras que van a constituirse en parte integrante de las interfases, se van a modificar, de manera que se cree una zona de integración máxima, tanto a nivel estructural, lo que se revisa ahora brevemente, como fisiológico y bioquímico, como se verá mas adelante.

Se puede considerar que se forman dos tipos de interfases de distintas características a lo largo de la colonización por MA: las no arbusculares y las arbusculares.

Las primeras se originan a nivel de la colonización intercelular e intracelular no arbuscular ("ovillos" y paso de las hifas de una célula a otra) de las hifas. Se caracterizan porque las paredes celulares de ambos simbioses aún forman parte de ellas, en gran medida. Alrededor de las hifas del hongo, se deposita un material que se hace continuo con las paredes de las células colonizadas, y que parece provenir de su degradación parcial, así como de restos de las láminas medias que han sido atravesadas por las hifas (Cox y Sanders, 1974; Dexheimer *et al.*, 1979; Bonfante-Fasolo y Perotto, 1992). Este material, aunque desorganizado en parte, tiene un grosor considerable (Bonfante-Fasolo y Scannerini, 1992). Por su parte, las hifas del hongo conservan a estos niveles una gruesa pared (20-30 $\mu$ m), quitinosa, e impermeabilizada con glucanos, como se vió anteriormente. En cuanto a las membranas, no presentan, al parecer, grandes modificaciones en este tipo de interfases.

Hay que decir, por último, que, al contrario de lo que sucede en invasiones por patógenos, así como en mutantes *myc<sup>-</sup>*, las interfases intercelulares no presentan depósitos de callosa ni compuestos fenólicos, producidos por la planta como respuesta defensiva, lo que constituye una nueva prueba del reconocimiento entre los simbioses (Maffey *et al.*, 1986; Smith y Smith, 1990; Bonfante-Fasolo y Perotto, 1992).

En las interfases arbusculares, son menores los vestigios de paredes celulares. Por parte de la planta, aún aparece el material desorganizado de la pared, que ahora es mucho más fino y laxo que en las interfases no arbusculares (Dexheimer *et al.* 1979; Bonfante-Fasolo y Scannerini, 1992). La pared del hongo por su parte, como ya se ha dicho, se reduce al máximo, por lo que las interfases arbusculares son en realidad unos sistemas "membrana-apoplasto-membrana" que funcionan como un todo, y que, por ello, se consideran las zonas mejor adaptadas para llevar a cabo la transferencia e intercambio de nutrientes (Bonfante-Fasolo y Scannerini, 1992). En cuanto a las membranas, a nivel del arbusculo es donde se produce su mayor proliferación. La zona de membrana que rodea las hifas arbusculares, por analogía a la membrana peribacteroidea de la simbiosis *Rhizobium* - leguminosa y a la perihaustral de infecciones por patógenos, se ha dado en llamar "membrana periarbuscular" (Smith y Smith, 1990). La membrana periarbuscular presenta algunos cambios tanto a nivel biofísico como bioquímico; sin embargo, el resto de la membrana de la célula que engloba al arbusculo ("membrana periférica") no parece resultar tan afectada. Por ello se considera que las membranas de las células vegetales con arbusculos están organizadas en dos "dominios" (Smith y Smith, 1990). Más adelante se verá el por qué y las implicaciones a que esto da lugar. No se ha podido establecer, sin embargo, la existencia de estos dos dominios diferenciales en la membrana del hongo (Smith y Smith, 1990).

Al contrario de lo que ocurre en algunas membranas perihaustrales, y de mutantes *myc<sup>-</sup>* (Gay y Woods, 1987; Bonfante-Fasolo y Scannerini, 1992), que se engrosan como respuesta al hongo invasor, la periarbuscular no presenta estos engrosamientos, lo que supone otra muestra del nivel de compatibilidad funcional que se alcanza entre ambos simbioses (Smith y Smith, 1990).

### Integración fisiológica y bioquímica.

Se puede decir que "todas las micorrizas se reducen a un complejo sistema, formado por células pertenecientes a dos organismos eucariotas distintos, que interactúan y se comunican entre sí para mantener un intercambio bidireccional de nutrientes duradero" (Bonfante-Fasolo y Scannerini, 1992). Por lo tanto, el establecimiento de esta simbiosis en la que ambos organismos salen beneficiados, está enfocada hacia la consecución de un sistema fisiológico de eficacia óptima en la captación, translocación e intercambio de nutrientes.

La captación de nutrientes por una micorriza viene determinada por las características de los dos sistemas que van a interactuar para ello: el suelo y la propia micorriza (Chapin, 1980; Clarkson, 1985).

### El suelo:

Para que un nutriente mineral pueda ser captado por una planta, en primer lugar ha de encontrarse en forma asimilable, y en segundo lugar, accesible al sistema radical. Esta accesibilidad del nutriente depende, fundamentalmente, de tres factores: 1) la concentración del nutriente en el suelo; 2) la capacidad tamponadora del suelo para dicho nutriente y 3) la movilidad del nutriente en cuestión en la solución edáfica (Gianinazzi-Pearson y Azcón-Aguilar, 1991). Así, en suelos con alto contenido en Fe o Al (suelos ácidos) o Ca (suelos calcáreos), la captación de elementos esenciales como el P puede encontrarse muy dificultada por la formación, con estos elementos, de fosfatos insolubles, que son químicamente inaccesibles para la raíz. Por otra parte, la captación de nutrientes que difunden lentamente en el suelo por el sistema radical, va a depender más de la velocidad con la que el nutriente llega a la superficie de la raíz, que de la propia capacidad captadora de ésta (Tinker, 1980; Tinker y Gildon, 1983). Si el ritmo de captación por la raíz es superior a la velocidad con la que el nutriente se desplaza hasta ella, se originará una zona de deficiencia del nutriente en la rizosfera. Esto ocurre con frecuencia en el caso de iones muy poco móviles, como el fosfato y el amonio, que pasan a ser casi físicamente inaccesibles para la raíz, por la formación, alrededor suyo, de esta zona de depleción. Obviamente, todos estos problemas se ven más acentuados en suelos pobres, en los que la concentración de nutrientes es ya baja de por sí.

La formación de la micorriza supone, primordialmente, una alternativa importante para la superación de la inaccesibilidad física en la captación de nutrientes. En efecto, el desarrollo del micelio externo permite, como ya se ha indicado, que la planta pueda explorar y explotar un mayor volumen de suelo, y sobrepasar, simultáneamente, la zona de agotamiento originada en torno a la raíz. Además, se ha sugerido que la micorriza podría contribuir en la superación de la inaccesibilidad química, lo que implica que sería capaz de utilizar fuentes de nutrientes - especialmente de P (Murdoch *et al.*, 1967; Pairunam *et al.*, 1980; Cabala-Rosand y Wild, 1982) y de N (Azcón-Aguilar *et al.*, 1993)- consideradas, en principio, difícilmente asimilables por la raíz. Probablemente ésto no se deba tanto a una acción directa de la micorriza sobre esas fuentes poco disponibles, sino que, mas bien, se lleve a cabo por medio de procesos indirectos (Powell, 1975; Azcón-Aguilar *et al.*, 1986; Gianinazzi-Pearson y Gianinazzi, 1989), tales como la exudación de ácidos orgánicos, cambios en el pH de la rizosfera, o bien por el incremento en la producción de CO<sub>2</sub> -consecuencia de la mayor tasa respiratoria de la micorriza- que ejercerían un efecto de "lavado" del suelo, favoreciendo la solubilización de las fuentes poco solubles y aumentando así la fracción de nutrientes del suelo asimilables por la micorriza.

### La micorriza:

Las MA son sistemas especializados en la captación de nutrientes, mucho más eficaces que las raíces por sí mismas. Este incremento en la eficacia de captación va a estar determinado por las modificaciones que, tanto a nivel morfológico como fisiológico, sufre la raíz cuando es colonizada por un hongo arbuscular. A continuación se revisa, brevemente, el significado de tales modificaciones.

#### *Modificaciones morfológicas de las micorrizas.*

A pesar de que la formación de la MA no origina en la raíz cambios tan notorios como los que se originan en otras simbiosis (el manto en ectomicorrizas o los nódulos en la simbiosis *Rhizobium* - leguminosa), sí que produce ciertas alteraciones, en ocasiones sutiles, en la arquitectura radical (Fitter, 1985; Hetrick *et al.*, 1988). Estas alteraciones pueden deberse bien a la intervención directa del hongo en los procesos morfológicos de la raíz, o bien a su incidencia en ellos de manera indirecta, puesto que la planta micorrizada se halla mejor nutrida, y va a presentar, por ello, un cambio en sus prioridades y estrategias nutricionales. En cualquier caso, el que se produzca un mayor o menor nivel de alteración morfológica dependerá, finalmente, del grado de dependencia de cada planta de la micorriza (Hetrick, 1991), es decir, de la mayor o menor necesidad de la planta de formar micorrizas para alcanzar su desarrollo óptimo.

Entre las causas de las alteraciones en la arquitectura radical que se producen como consecuencia de la formación de la micorriza, encontramos una alteración en la duración de las mitosis de las células apicales, cuyas metafases se hacen más largas, con lo que el ritmo de división celular se hace más lento. Se especula sobre si éste es un efecto directo o bien indirecto, de carácter nutricional (Berta *et al.*, 1991; Bonfante-Fasolo y Perotto, 1992). Asimismo se ha descrito un incremento en la micorriza en el número de raíces secundarias de carácter adventicio, es decir, con elevada tasa de recambio (Bonfante-Fasolo y Perotto, 1992), así como un aumento en el grosor de las raíces micorrizadas (Hetrick, 1991). Todos estos cambios se deben, probablemente, a la adaptación de la planta a su nuevo status nutricional. A todo ello se une la reducción, ampliamente descrita (Mosse y Hayman, 1971; Hayman y Mosse, 1971, 1972; Crush, 1974; Hunt *et al.*, 1975; Sanders *et al.*, 1977; Fitter, 1982; Baas y Lambers, 1988), de la proporción raíz/parte aérea, así como la disminución de la longitud de raíz específica, como se ha apuntado recientemente (Hetrick, 1991).

Por último hay que citar que el tipo de raíz que presenta una planta parece tener una influencia notable en su grado de dependencia de la micorriza. Así, las plantas con raíz magnoloide (gruesa y con escaso número de ramificaciones) han mostrado ser, generalmente más dependientes de la micorriza que las de tipo graminoide (finas y muy ramificadas) (Bundrett, 1991). También se ha descrito la existencia de una relación inversa entre la cantidad

y longitud de los pelos radicales, y el grado de dependencia (Itoh y Barber, 1983; Hetrick, 1991). El desarrollo del micelio externo en la micorriza, que supliría, en su caso, la carencia de raíces secundarias y de pelos radicales, podría justificar, en cierta medida, el por qué de estos hechos.

#### *Modificaciones fisiológicas de las micorrizas:*

Con la formación de la MA se va a producir una serie de modificaciones en los procesos de captación de nutrientes minerales por la planta. Por medio de la micorriza, la planta se alimenta a través del hongo (micotrofia), pero además, el hongo resulta también beneficiado de la simbiosis (mutualismo), de forma que el movimiento de nutrientes se lleva a cabo de forma bidireccional (Smith y Smith, 1990; Gianinazzi-Pearson y Smith, 1993).

Una vez consideradas las bases estructurales de la simbiosis, nos centraremos ahora en sus bases fisiológicas y bioquímicas.

Una de las modificaciones fisiológicas más relevantes en la micorriza es el cambio en la localización de las zonas implicadas en la captación de nutrientes con respecto a las raíces no micorrizadas. Mientras que las células epidérmicas son las únicas encargadas de la captación de nutrientes en una raíz, en la micorriza se pueden distinguir dos zonas de captación: la primera está constituida por las hifas más finas del micelio externo del hongo, que, junto con las células epidérmicas de la raíz -que probablemente no pierden su función, pero que ahora la comparten-, constituyen la nueva, y amplificada, superficie captadora de la micorriza. En estas zonas, la captación es, obviamente, unidireccional, ya que los nutrientes son absorbidos, por mecanismos activos, desde el suelo hacia el interior de la micorriza. La segunda zona se localiza en el córtex radical, y más concretamente en las interfases arbusculares hongo-planta. Resulta curioso observar cómo, al igual que en otros tipos de simbiosis -*Rhizobium* - leguminosa (Torrey, 1988), infecciones haustoriales por patógenos (Wetherbee *et al.*, 1985)- las células corticales de la raíz son siempre las seleccionadas para que se lleve a cabo en ellas la transferencia de nutrientes (Gianinazzi y Gianinazzi-Pearson, 1989).

En la zona de la interfase arbuscular, la "captación" vendría dada, en realidad, por un intercambio bidireccional de nutrientes: P, N y K entre otros, que son liberados por el hongo y captados por la planta, mientras que el C procedente de la fotosíntesis, es liberado por la planta y captado por el hongo. A continuación profundizaremos en los procesos de captación, translocación e intercambio ("recaptación" por parte de la planta) de los nutrientes con mayor relevancia para la micorriza.

### Fisiología del intercambio de nutrientes en las MA.

#### Aspectos fisiológicos de la nutrición fosforada en MA:

A través de los estudios fisiológicos que se han llevado a cabo sobre las MA, se ha puesto siempre de manifiesto la actuación preferente de la micorriza sobre la captación y el aporte de P a la planta (Gianinazzi-Pearson y Azcón-Aguilar, 1991). El que este elemento sea esencial para los sistemas biológicos (Westheimer, 1987), y, sin embargo, habitualmente se encuentre en el suelo en concentraciones muy bajas (del orden de  $10^{-5}$  a  $10^{-6}$  M), justifica el interés por conocer los mecanismos que presenta la micorriza para ser más efectiva que las raíces no micorrizadas en su captación. Esta efectividad se pone de manifiesto especialmente cuando el suelo es muy deficiente en P, mientras que se hace menos notable conforme su fertilidad se va incrementando (Gianinazzi-Pearson y Azcón-Aguilar, 1991).

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 ya mencionado aumento en la superficie de captación, como consecuencia de la formación del micelio externo del hongo (Sanders y Tinker, 1973; Cooper y Tinker, 1978). Según Cress y colaboradores (1979), a esto habría que añadir un incremento en la afinidad de las micorrizas por el P, puesto que en ellas se han descrito valores mas bajos de la constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ) para la absorción de fosfato que los obtenidos en raíces sin micorrizar.

Habitualmente, el transporte de nutrientes en la micorriza se divide, para su estudio, en tres etapas: la captación del nutriente por el micelio externo del hongo; su translocación a lo largo de las hifas hasta el córtex interno de la raíz; y por último, su liberación a la interfase arbuscular y recaptación por las células corticales (Figura 1).

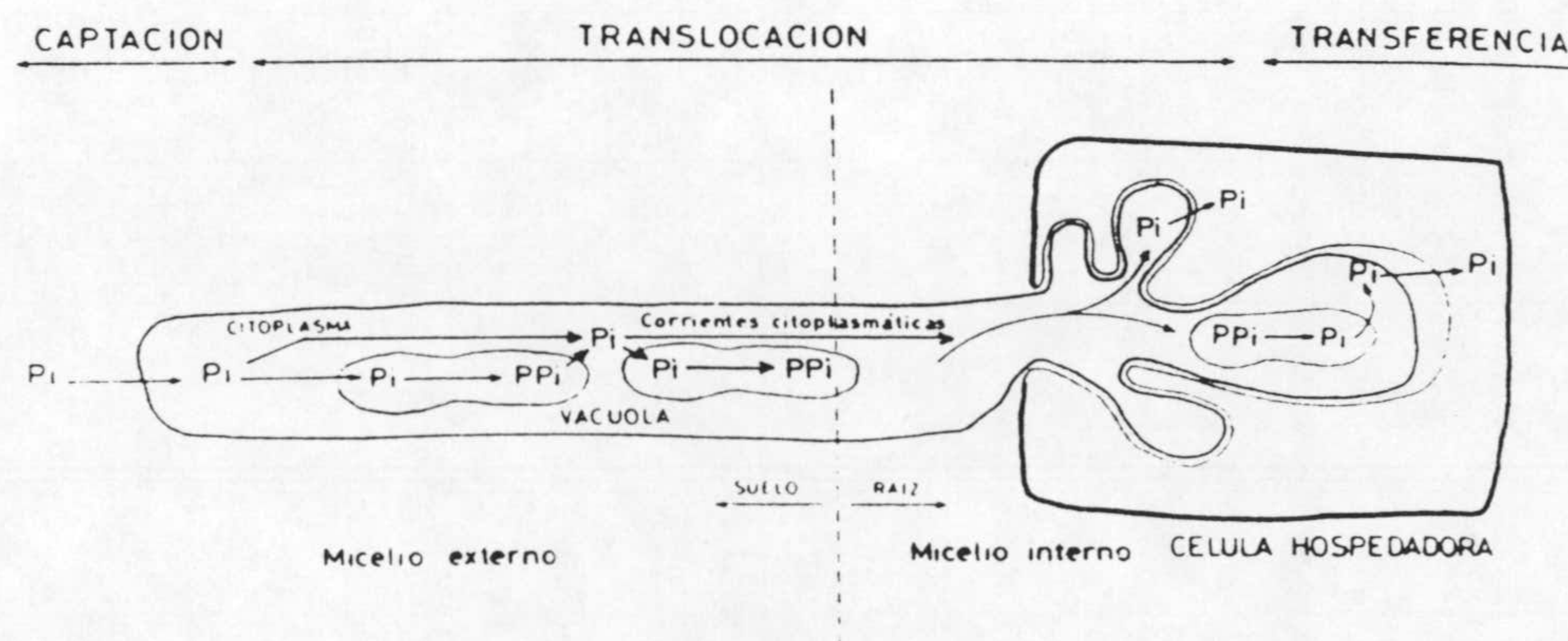


Figura 1. La captación, translocación y transferencia de Pi por la micorriza arbuscular. (Tomado de Gianinazzi-Pearson y Azcón-Aguilar, 1991.)

La captación del P soluble por las hifas externas del hongo arbuscular se ha puesto de manifiesto en diversas ocasiones (Hattingh *et al.*, 1973; Pearson y Tinker, 1975; Rhodes y Gerdemann, 1975; Jungk y Claassen, 1989; Li *et al.*, 1991a y b; Jakobsen *et al.*, 1992). Lagran diferencia de concentración de P entre el suelo y las hifas del hongo -del orden de 1 a 1000- (Gianinazzi-Pearson y Gianinazzi, 1986), apunta hacia la necesidad de que la captación se lleve a cabo mediante procesos activos. Puesto que la absorción activa de nutrientes es dependiente de la H<sup>+</sup>-ATPasa asociada a membrana (Poole, 1978; Marré, 1979; Serrano, 1985), es muy probable que, como pasa en otros organismos (Beever y Burns, 1980; Clarkson, 1985; Smith y Smith, 1986), este enzima se encuentre implicado en en la captación activa de P por el micelio externo, y más aún cuando su presencia se ha detectado en las hifas de determinados hongos arbusculares cultivados *in vitro* (Lei *et al.*, 1991).

Recientemente (Li *et al.*, 1991a y b) se ha descrito la formación, debido a las las hifas captadoras del hongo, de zonas de depleción de P, así como cambios en el pH del suelo que se ve afectado por ellas. Esto sugiere que los mecanismos de absorción de P utilizados por las hifas, son muy similares a los empleados por la raíz, y que, al igual que ocurre con ésta, debe de existir también una zona de influencia de las hifas en el suelo, que por similitud se podría denominar "hifosfera" (Li *et al.*, 1991), o, de forma mas global, "micorrizosfera" (Oswall y Ferchau, 1968; Linderman, 1988b).

La tasa estimada de entrada de P por el micelio externo oscila entre 2 a 8 x 10<sup>-15</sup> mol cm<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup> (Tinker, 1975; Li *et al.* 1991a y b). Quedan, de todos modos, muchos puntos oscuros que aclarar con respecto a la captación de P por las hifas, especialmente a nivel de los procesos bioquímicos implicados.

Una vez que las hifas externas han captado el P del suelo, éste es translocado a lo largo del micelio del hongo, salvando en ocasiones distancias de más de 11cm (Li *et al.*, 1991), para ser, finalmente, transferido a las células corticales de la raíz. El fosfato es un compuesto osmótica y eléctricamente activo, por lo que, si no fuese neutralizado en el citoplasma del hongo, podría ocasionarle graves transtornos metabólicos. Estudios a nivel ultraestructural indican que la mayor parte del P se transporta en forma de gránulos de poli P -osmóticamente inactivos-, localizados fundamentalmente en el interior de las vacuolas fúngicas (Cox *et al.*, 1975, 1980; Strullu *et al.*, 1981), mientras que sólo una pequeña parte viajaría como Pi por el citoplasma. La presencia en las hifas de los enzimas implicados en la formación y degradación de estos gránulos de poli P (Capaccio y Callow, 1982), así como la de una fosfatasa alcalina asociada a vacuola (Gianinazzi-Pearson y Gianinazzi, 1978; Gianinazzi *et al.*, 1979), garantizan la maquinaria bioquímica necesaria para la translocación del P. También se han descrito incrementos, en plantas micorrizadas, en la concentración de aminoácidos básicos del tipo de la arginina y la citrulina (Cooper, 1984; Smith y Gianinazzi-Pearson, 1988) y cationes como el



$\text{Ca}^{2+}$  (White y Brown, 1979; Strullu *et al.*, 1981; Ashford *et al.*, 1986), cuya posible función sería la neutralización del exceso de carga negativa de los iones  $\text{PO}_4\text{H}^{2-}$  en el hongo.

El transporte de P parece producirse mediante corrientes citoplasmáticas rápidas (Cox *et al.*, 1980; Gianinazzi-Pearson y Azcón-Aguilar, 1991), canalizadas, tal vez, por algún tipo de citoesqueleto fúngico (Raudaskoski, 1992) que dan lugar a velocidades de flujo de P, a través de las hifas, relativamente elevadas (Pearson y Tinker, 1975; Cooper y Tinker, 1978, 1981). La translocación se encuentra además favorecida por el gradiente de concentración de P existente a lo largo del micelio (Tinker, 1975; Harley y Smith, 1983), debido al drenaje que la planta lleva a cabo a nivel de los arbusculos. El incremento de la transpiración en plantas micorrizadas podría estar también implicada en este proceso.

Tras su llegada a las hifas arbusculares, los gránulos de poli P desaparecen de las vacuolas (Cox *et al.*, 1975; Strullu *et al.*, 1981; Gianinazzi-Pearson y Gianinazzi, 1989), probablemente por su degradación mediante una polifosfatasa, cuya actividad sólo se localiza en el micelio interno del hongo (Capaccio y Callow, 1982), o bien mediante una polifosfato quinasa. El Pi libre es "liberado" a la interfase hongo/planta por un mecanismo supuestamente pasivo. Sin embargo, no son habituales en los sistemas celulares flujos tan elevados (Cox y Tinker, 1976) de salida de P hacia el exterior de la célula (Smith y Smith, 1990), lo que hace sospechar que la planta hospedadora induce algún tipo de modificación en las membranas arbusculares fúngicas, bien a nivel físico, incrementando su permeabilidad (Gianinazzi-Pearson y Azcón-Aguilar, 1991) o bioquímico, mediante algún tipo de transporte facilitado. También se ha sugerido que la liberación de P podría estar acoplada, de alguna manera, a la captación de productos carbonados, liberados por la planta a la interfase (Harley y Smith, 1983). En cualquier caso, este proceso de transferencia de P desde el hongo hacia la planta es aún totalmente desconocido, y sólo se pueden aventurar hipótesis sobre él (Bonfante-Fasolo y Scannerini, 1992).

El P liberado por el hongo a la interfase arbuscular, es "recaptado" por las células corticales de la planta mediante un mecanismo activo, en el que muy probablemente estén implicadas  $\text{H}^+$ -ATPasas asociadas a la membrana periarbuscular, cuya presencia se ha puesto de manifiesto en diferentes estudios ultraestructurales (Marx *et al.*, 1982; Gianinazzi-Pearson *et al.*, 1991), aunque nunca bioquímicos o genéticos. El esquema propuesto hasta la fecha sobre el proceso de intercambio tanto de P como de otros nutrientes a nivel de la interfase arbuscular se muestra en la Figura 2.

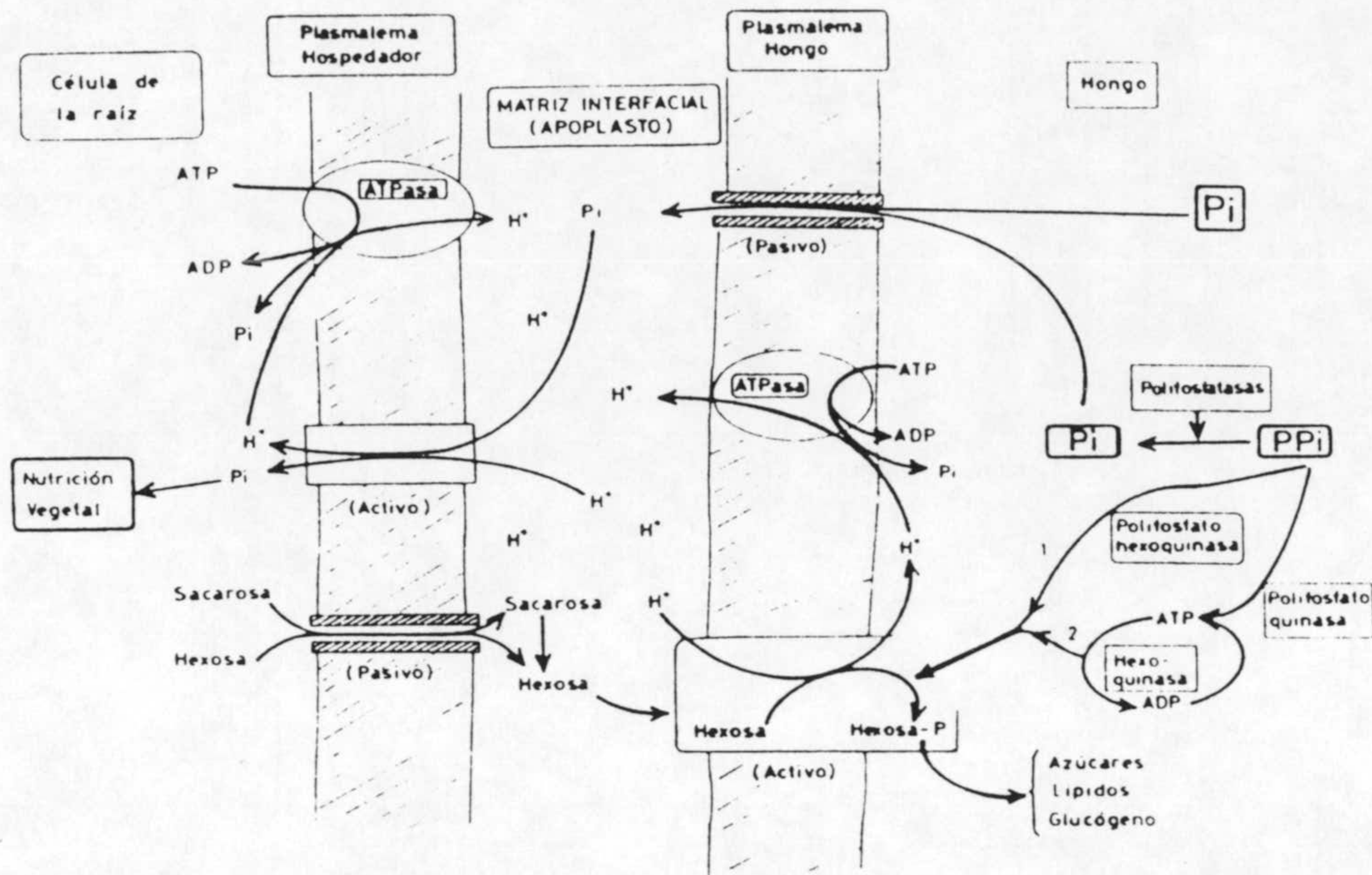


Figura 2. Esquema de la interfase hongo-planta a nivel arbuscular, propuesto por Clarkson (1985), y modificado por J.M. Barea. (Tomado de Gianinazzi-Pearson y Azcón-Aguilar, 1991).

#### Aspectos fisiológicos de la nutrición nitrogenada en MA:

El N puede ser tomado por la planta bien a través de la fijación simbiótica del  $N_2$  atmosférico, si es que presenta esa capacidad, o bien, más comúnmente, a través de la captación directa a partir del suelo mediante su sistema radical. Las plantas micorrizadas parecen ser más competitivas que las que no lo están en ambos procesos, como se ha ido poniendo de manifiesto a lo largo de diferentes estudios (Harley y Smith, 1983).

En el caso de la fijación simbiótica del  $N_2$ , las micorrizas ejercen un efecto positivo de carácter fundamentalmente nutricional (Barea *et al.*, 1987). El incremento en el aporte de elementos imprescindibles para la fijación, especialmente de P -la fijación requiere un elevado consumo de ATP- (Gianinazzi-Pearson y Azcón-Aguilar, 1991), así como de Fe y de Mo -cofactores importantes en el proceso- (Munns y Mosse, 1980; Harris *et al.*, 1985; Rai, 1988), ha mostrado ser suficiente para explicar la mejora experimentada por las plantas micorrizadas con respecto a las que no lo están. De cualquier forma, no debe descartarse la existencia de algún otro tipo de efecto de la micorriza sobre la fijación, ya sea de carácter fisiológico -cambio en el balance hormonal (Barea y Azcón-Aguilar, 1982)- o genético -posible relación, ya comentada, entre los genes nod y myc.

Con respecto a la captación directa de N del suelo, existen en la actualidad evidencias bastante claras sobre la capacidad de la micorriza de incrementar la captación de  $NH_4^+$  (Ames *et al.*, 1983, 1984; Barea *et al.*, 1987; Johansen *et al.*, 1992; George *et al.*, 1992). Bajo esta forma iónica, muy inmóvil, se encuentra habitualmente la mayor parte del N en suelos

ligeramente ácidos (Harley y Smith, 1983). Probablemente, el aumento de la captación se deba al mayor volumen de suelo que es capaz de explorar la micorriza. Así, se ha puesto de manifiesto la capacidad de las hifas del hongo de captar, translocar y ceder a la planta el  $\text{NH}_4^+$  procedente de zonas difícilmente accesibles para la raíz, produciendo, al igual que ocurría con el P, el agotamiento de este nutriente en la hifosfera (Johansen *et al.*, 1992; George *et al.*, 1992). Asimismo, se ha detectado un incremento en la actividad del enzima glutamina-sintetasa en la micorriza, que no puede ser atribuido, exclusivamente, a un efecto nutricional (Smith *et al.*, 1985). Esta misma actividad enzimática se ha puesto de manifiesto en el micelio interno del hongo aislado de la raíz (Smith *et al.*, 1985), por lo que la asimilación del amonio captado comenzaría en el propio hongo.

Existen, sin embargo, mas dudas sobre la capacidad de la micorriza para incrementar la captación de  $\text{NO}_3^-$ . Al ser éste un ión muy móvil, resulta mucho mas accesible para la planta, por lo que, teóricamente, la micorriza sería menos crucial en su captación. El aumento detectado en la actividad de la nitrato reductasa en plantas micorrizadas puede ser atribuído casi exclusivamente a un efecto nutricional, por los elevados requerimientos de P que presenta este enzima (Smith *et al.*, 1985). Esta actividad enzimática, junto con otras implicadas en la asimilación del nitrato, no se consiguió detectar en las hifas del hongo (Oliver *et al.*, 1983), aunque sí en las esporas de algunas especies (Ho y Trappe, 1975). En cualquier caso, algunos autores han descrito un incremento en la captación de este nutriente, mediante la actividad del micelio externo de la micorriza, en condiciones de estrés hídrico (Tobar *et al.*, 1993), o a partir de fuentes físicamente inaccesibles para la raíz, pero no para la micorriza (George *et al.*, 1992). En cualquier caso, se necesitan mas evidencias para confirmar estos hechos, así como determinar su significado en condiciones naturales.

#### Fisiología del C en las MA:

Como contrapartida a su efecto en la mejora del estado nutritivo de la planta, y según el carácter mutualístico de esta asociación, el hongo se beneficia del establecimiento de la simbiosis mediante la utilización de productos carbonados procedentes de la fotosíntesis (Cooper, 1984). Generalmente se ha considerado que la transferencia de los productos carbonados entre la planta y el hongo tendría lugar a nivel de las interfases arbusculares, estando acoplada, de alguna manera, a la transferencia de otros nutrientes en sentido contrario, es decir, desde el hongo a la planta (Harley y Smith, 1983). En estudios recientes, sin embargo, se han sugerido las interfases no arbusculares como los lugares exclusivos para intercambio de C (Gianinazzi-Pearson *et al.*, 1991), lo que parece poco probable si atendemos a

las dificultades físicas para la transferencia de nutrientes que se dan a ese nivel (ver *Formación de interfases hongo-planta*, y mas adelante).

El mecanismo por el que las células vegetales liberan productos carbonados a la interfase es supuestamente pasivo (Gianinazzi-Pearson y Azcón-Aguilar, 1991), lo que, al igual que ocurría con la cesión de P por el hongo, resulta poco habitual para el comportamiento normal de una célula. Probablemente exista algún tipo de modificación en la permeabilidad de la membrana vegetal y/o la presencia de algún "portador" específico que justifique la liberación de estos compuestos tan esenciales. Observaciones tales como la desaparición de los gránulos de almidón de las células que contienen arbusculos, o el aumento de la actividad invertasa de la raíz (Dehne, 1986), sugieren una actuación específica del hongo sobre el metabolismo carbonado de la célula vegetal, que ayudaría a mantener un gradiente de concentración favorable, y facilitaría el flujo de estos nutrientes hacia la interfase. Los mecanismos de los que se valdría el hongo para ello son aún desconocidos.

Se ha sugerido también que el hongo podría asimilar como fuente de C los polisacáridos fibrilares que se acumulan en la interfase (Dexheimer *et al.*, 1979; Harley y Smith, 1983; Dexheimer *et al.*, 1986), y que en algunos casos podrían actuar al mismo tiempo como mensajeros químicos o señales de comunicación entre los simbioses (McNeil *et al.*, 1984; Gianinazzi y Gianinazzi-Pearson 1989).

Una vez en la interfase, los productos carbonados han de ser captados por el hongo. Se ha postulado que esta captación se llevaría a cabo mediante procesos activos, en los que probablemente se encontrarían implicadas  $H^+$ -ATPasas de membrana (Gianinazzi-Pearson y Azcón-Aguilar, 1991). Ya en el citoplasma, los esqueletos carbonados son inmediatamente transformados en compuestos típicamente fúngicos, como glucógeno y lípidos (Cooper, 1984), que se transportan hasta las hifas mas externas del micelio. Esta translocación tiene lugar, probablemente, mediante corrientes citoplasmáticas, y está favorecida por un gradiente de concentración favorable entre el micelio interno, y el externo, que se desarrolla en el suelo. Tal vez se encuentre, asimismo, acoplada al flujo, en dirección opuesta, de nutrientes que finalmente el hongo cederá a la planta. Esta rápida translocación de los productos carbonados permite que se mantenga su gradiente de concentración a nivel de la interfase, favorable al hongo, lo que probablemente facilite la exudación de las células vegetales, así como la captación por parte de las hifas (Gianinazzi-Pearson y Azcón-Aguilar, 1991).

#### Fisiología de la captación de otros nutrientes en MA:

Hemos visto que, por sus características, la micorriza resulta mas competitiva que la raíz en la absorción de nutrientes, y muy especialmente de aquellos cuya captación se ve dificultada por un motivo u otro. Además de P y  $NH_4^+$ , otros nutrientes como K, Zn y Cu son poco

móviles en la solución del suelo. Se han descrito incrementos en la captación y asimilación de Zn (Swaminathan y Verma, 1979; Tinker y Gildon, 1983; Kothari *et al.*, 1991) y Cu (Gildon y Tinker, 1983; Li *et al.*, 1991c), independientes de la mejora en la nutrición fosforada de la planta. Otros estudios han puesto de manifiesto la capacidad de las hifas del hongo arbuscular para captar sulfato (Cooper y Tinker, 1978; Tinker y Gildon, 1983), aunque debido a la movilidad de este ión en el suelo, se duda de que éste represente una ventaja significativa para las plantas micorrizadas.

También se han descrito incrementos en la captación de bromuro, cloruro y, en general, en la suma total de aniones (Buwalda *et al.*, 1983), lo que podría interpretarse en función de la regulación interna del pH, que en las plantas micorrizadas se llevaría a cabo de forma distinta que en las que no lo están, más que como una mejora nutritiva (Gianinazzi-Pearson y Azcón-Aguilar, 1991). En este mismo sentido se entenderían los incrementos en la captación de Ca (Rhodes y Gerdemann, 1978), para neutralizar la carga del polifosfato fúngico.

#### Fisiología del agua en MA:

Con respecto a la fisiología del agua, se ha descrito en numerosas ocasiones una mayor resistencia de las plantas micorrizadas al estrés hídrico (Augé *et al.*, 1987; Graham *et al.*, 1987; Hetrick *et al.*, 1987; Zajicek *et al.*, 1987; Bethlenfalvay *et al.*, 1988; Peña *et al.*, 1988; Sánchez-Díaz *et al.*, 1990). Sin embargo, las razones de esta mayor resistencia son aún muy debatidas. Mientras que algunos datos indican que se debe a un efecto de carácter puramente nutricional (Cooper, 1984) -la baja movilidad de los nutrientes lentos, se hace aún más limitante en suelos con poca agua (Azcón *et al.*, 1988)-, otros apuntan hacia una resistencia adicional, debida, exclusivamente, a la formación de la simbiosis (Hardie y Leyton, 1981), si bien se desconocen los mecanismos implicados. Aunque el micelio externo del hongo puede acceder a posibles micro-acuíferos, donde la raíz no es capaz de llegar por sí misma, los flujos del transporte de agua por las hifas hacia la raíz medidos hasta el momento, no justifican la mayor resistencia de la planta a la sequía (Allen, 1982; Safir, 1985; George *et al.*, 1992), salvo en algunas excepciones (Faber *et al.*, 1991). Tal vez el incremento en la resistencia al estrés hídrico se deba a cambios fisiológicos de la micorriza -como la alteración del balance hormonal de la planta-, pero, en cualquier caso, se necesitan más datos para clarificar este aspecto fundamental de la fisiología de las plantas micorrizadas.

#### La interfase arbuscular.

Aunque las MA están consideradas como simbiosis endotróficas, puesto que en ellas se produce una colonización intracelular del hospedador, la ausencia de penetración por parte del

hongo de la membrana plasmática de la célula va a condicionar que el hongo permanezca siempre en el exterior del protoplasto, en un "compartimento apoplástico" limitado por membranas. A nivel de las ramificaciones más finas del arbusculo, donde ambos organismos se acoplan, quedando separados casi exclusivamente por dos bicapas lipídicas, la integración hongo-planta alcanza su máxima expresión (Smith y Smith, 1990). Esta zona constituye la denominada interfase arbuscular.

Como se viene indicando en este estudio, es coherente suponer que el intercambio de nutrientes tenga lugar en esta interfase, en donde las barreras físicas entre ambos simbioses son mínimas, y que esos procesos de intercambio originen toda una serie de alteraciones, tanto físicas como bioquímicas, en sus membranas celulares (Smith y Smith, 1990). La necesidad que tienen estas zonas de una especial regulación y equilibrio químico, las convierte en objetivos prioritarios de estudio, para facilitar así la comprensión del funcionamiento de la micorriza arbuscular (Bonfante-Fasolo y Scannerini, 1992).

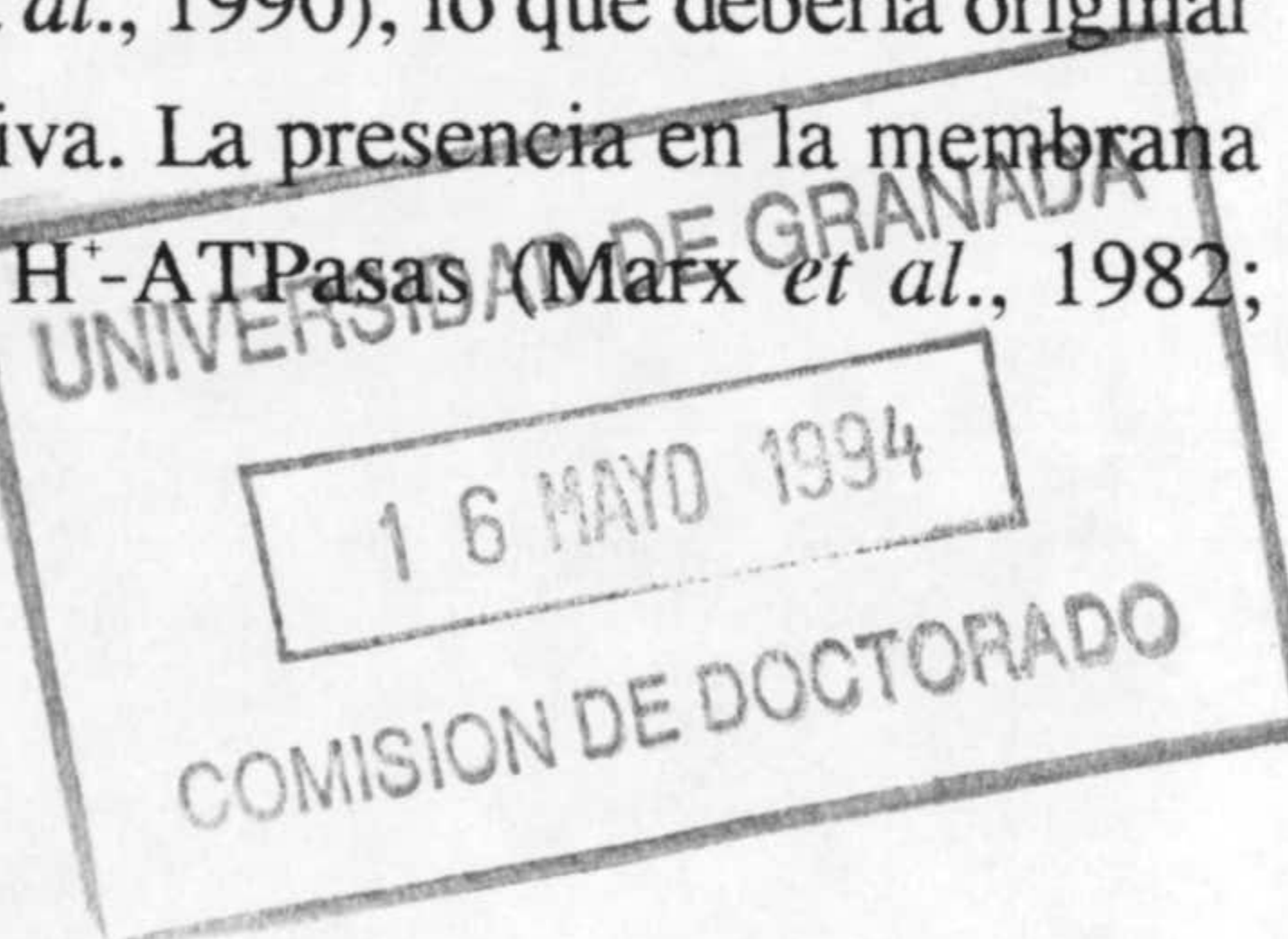
#### Las membranas celulares de las MA:

La formación de la micorriza arbuscular origina un incremento generalizado de todo tipo de membranas celulares, y, especialmente, de plasmalema (Alexander *et al.*, 1988). Este incremento se localiza, casi en su totalidad, a nivel de las células del córtex interno ocupadas por arbusculos (Bonfante-Fasolo y Scannerini, 1992). El elevado "turnover" que presentan las membranas (Steer, 1988) facilitará, posiblemente, la realización de todas las modificaciones necesarias para su adaptación a la nueva condición simbiótica (Smith y Smith, 1990). Revisaremos ahora, brevemente, la escasa información que se tiene hasta la fecha con respecto a estas alteraciones.

Una de las alteraciones observadas a nivel de las membranas de la MA consiste en cambios en el potencial eléctrico de sus plasmalemas, y, como consecuencia, en su permeabilidad.

En algunas invasiones por hongos patógenos está bien establecido un incremento en la permeabilidad de la membrana perihastorial, inducida, entre otros factores, por la despolarización que sobre ella provoca la infección (Katou *et al.*, 1982; Pelissier *et al.*, 1986). Este hecho, unido a la ausencia en dichas membranas de  $H^+$ -ATPasas (Gay y Woods, 1987; Mayer, 1989), hace que la célula vegetal pierda totalmente el control sobre el flujo de nutrientes, que se producirá unidireccionalmente hacia el hongo.

En el caso de las MA, por el contrario, algunos estudios han puesto de manifiesto una hiperpolarización de la membrana plasmática (Scannerini *et al.*, 1990), lo que debería originar una membrana menos permeable y, por lo tanto, más selectiva. La presencia en la membrana periarbuscular, y en menor medida, en la arbuscular, de  $H^+$ -ATPasas (Marx *et al.*, 1982;



Gianinazzi-Pearson *et al.*, 1991) apunta hacia un control estricto por parte de ambos simbioses sobre el flujo de nutrientes a través de la membrana, que, en este caso, es selectivo y bidireccional.

A semejanza de lo que ocurre en otras asociaciones simbióticas, como es el caso de la simbiosis *Rhizobium* -leguminosa, en donde se ha puesto de manifiesto, a nivel de su membrana peribacteroidea, la presencia de un marcador típico de la membrana vacuolar (Day *et al.*, 1989), se ha sugerido un enriquecimiento de la membrana plasmática del hospedador en componentes de otras membranas celulares, tales como el tonoplasto (Bonfante-Fasolo y Scannerini, 1992). Hemos de recordar que, a nivel del arbusculo se produce una hiperactivación de los orgánulos con actividad secretora, que resultan ser a su vez los principales proveedores para el crecimiento de la membrana plasmática, así como un fuerte incremento en el número de vacuolas de reducido tamaño, cuyas membranas, al fusionarse con el plasmalema, podrían paliar, en cierta medida, el esfuerzo de la célula por rodear hasta las ramificaciones arbusculares más finas. La formación de estas "membranas mixtas" podría originar modificaciones en la regulación del flujo de nutrientes, que conviene tener en cuenta.

Con respecto a los estudios sobre la composición lipídica de la micorriza, estos han estado tradicionalmente enfocados hacia la gran cantidad de lípidos de reserva que poseen los hongos arbusculares. Nada se sabe, sin embargo, acerca de la composición de las membranas de la simbiosis, puesto que los pocos análisis del contenido lipídico realizados, se efectuaron sobre homogenados de raíz y micorriza respectivamente. Sólo mediante estimaciones indirectas podríamos tener cierta idea de los cambios producidos por el proceso de colonización a nivel de membranas.

Con respecto a los fosfolípidos, componente lipídico mayoritario en membranas, se han obtenido incrementos substanciales en su número en homogenados de micorrizas con respecto a los de raíz (Cooper y Losel, 1978; Nagy *et al.*, 1980). El hongo aporta aquí algunos de sus rasgos diferenciales, y éstos se ven reflejados en la aparición en los análisis de algunos ácidos grasos de origen específicamente fúngico, que no aparecen en las raíces control (Nagy *et al.*, 1980; Nordby *et al.*, 1981; Pacovsky y Fuller, 1988; Pacovsky, 1989). En cualquier caso, hay que ser muy cauto a la hora de relacionar estas diferencias con las que se podrían obtener a nivel de las membranas de la micorriza con respecto a la raíz. De hecho, los autores atribuyen principalmente estos cambios al aumento, tras la simbiosis, de la cantidad de lípidos de reserva en las hifas del hongo.

En cuanto a la composición en esteroides, se han obtenido, también partiendo de homogenados, incrementos significativos en micorrizas con respecto a raíces (Ho, 1977; Bielby y Kidby, 1980a y b; Nagy *et al.*, 1980; Nordby *et al.*, 1981; Schmitz *et al.*, 1991; Frey *et al.*, 1992). Estos compuestos se encuentran estrechamente relacionados con fenómenos de

permeabilidad en membranas, por lo que sería interesante que estos resultados fuesen, finalmente, un reflejo de la composición de la membrana.

En cualquier caso, sólo mediante estudios efectuados sobre aislados de membranas se permitirá tener una idea más real sobre los fenómenos que tienen lugar a este nivel tras la colonización fúngica y el establecimiento de la simbiosis.

En estudios pioneros sobre expresión génica en micorrizas, se ha constatado una modificación de su patrón de polipéptidos con respecto al de raíces sin micorrizar. Así, diferentes autores han puesto de manifiesto la desaparición de algunos polipéptidos específicos (García-Garrido *et al.*, 1993), y la aparición de otros nuevos (Pacovsky, 1989; Dumas *et al.*, 1990; Wyss *et al.*, 1990; Dumas *et al.*, 1992; García-Garrido *et al.*, 1993). Algunos de estos polipéptidos parecen estar asociados a membrana, por lo que podrían hallarse implicados en el proceso de transporte de nutrientes (Wyss *et al.*, 1990).

Asimismo, mediante estudios ultraestructurales se ha puesto de manifiesto la presencia de dos enzimas de membrana ligados a estructuras producidas como consecuencia de la colonización. El primero de ellos, la fosfatasa neutra, se ha localizado a nivel de la membrana periarbuscular, en arbusculos tanto vivos, como en vías de degeneración (Jeanmarie *et al.*, 1985). Este enzima, que generalmente se asocia a estadios celulares juveniles, y puede considerarse como un marcador de indiferenciación celular, interviene en la síntesis y deposición de material de la pared vegetal, y su incremento en actividad podría estar relacionado con la imposibilidad por parte de la célula hospedadora de establecer una pared celular que encapsule al arbusculo, y, al mismo tiempo, con un consumo por el hongo de parte de este material como fuente de carbohidratos (Gianinazzi-Pearson y Gianinazzi, 1988; Gianinazzi, 1991).

El segundo enzima, cuya presencia en las membranas simbióticas se ha puesto de manifiesto mediante técnicas citoquímicas, es la  $H^+$ -ATPasa de plasmalema (Marx *et al.*, 1982; Gianinazzi-Pearson *et al.*, 1991). La importancia de este enzima con respecto a todos los procesos de intercambio de nutrientes, le hacen merecedor de un estudio más pormenorizado.

#### $H^+$ -ATPasas asociadas a membrana:

Las  $H^+$ -ATPasas están recibiendo ultimamente gran atención por parte de los fisiólogos y bioquímicos vegetales, al ser consideradas como las principales responsables de procesos celulares tan vitales como la absorción de nutrientes a nivel celular, regulación del pH citoplasmático (Poole, 1978; Marré, 1979; Serrano, 1985, 1989), regulación de la turgencia y volumen celular (Zeiger, 1983), regulación del crecimiento en extensión de la célula (Rayle y Cleland, 1970, 1977; Hager *et al.*, 1971), ruptura de la dormancia en semillas (Marré, 1979), carga de nutrientes inorgánicos a través del xilema de la raíz (Lüttge y Higinbotham, 1979),



carga de nutrientes orgánicos en el floema (Baker, 1978), etc. Nos ocuparemos aquí, fundamentalmente de sus implicaciones en la captación de nutrientes a nivel celular y la simultánea regulación del pH que ello requiere.

La postulación de la hipótesis quimiosmótica de Mitchell (Mitchell, 1961, 1977), despertó un gran interés hacia las denominadas "bombas de protones", al ser consideradas éstas como las principales responsables de los procesos de transporte iónico a través de la membrana. Existen diferentes tipos de bombas protónicas, dependiendo de su estructura molecular, funcionamiento y localización (Slayman, 1985a). En este estudio centraremos nuestra atención en las implicadas en el transporte a través de membrana en plantas superiores y hongos.

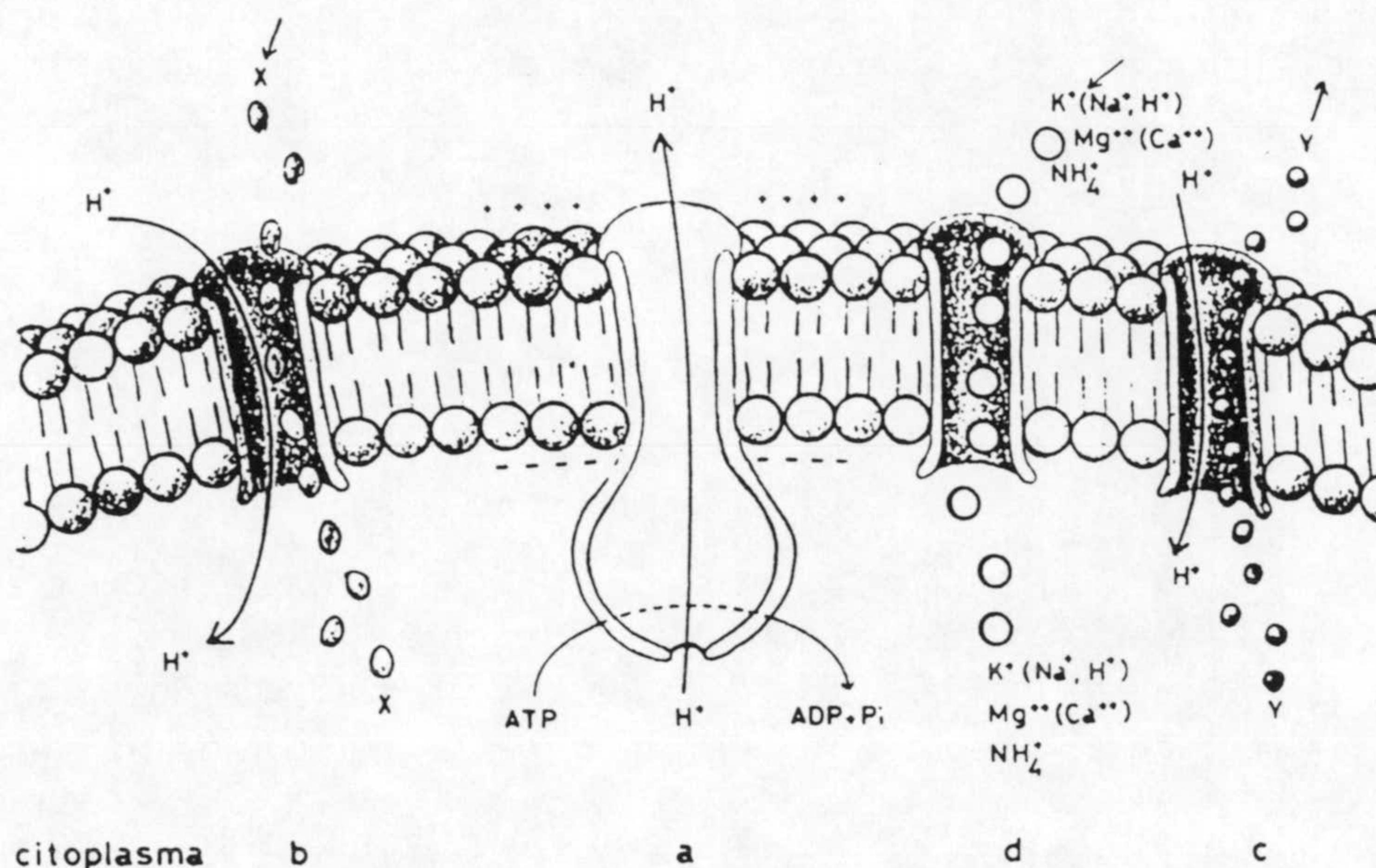


Figura 3. Sistemas de transporte a través de membrana en células vegetales. (a) Bomba electrogénica primaria ( $H^+$ -ATPasa). (b) Entrada activa secundaria (simporte). (c) Salida activa secundaria (antiporte). (d) Flujo pasivo de iones (uniporte). (Tomado de Serrano y Villalba, 1993).

El transporte iónico celular, tanto en vegetales superiores como en hongos, se ha asociado a la actividad de  $H^+$ -ATPasas de membrana (Reinhold y Kaplan, 1984; Sze, 1985; Serrano y Villalba, 1993), de modo que no existen evidencias sobre la existencia de transporte asociado a protones en su ausencia (Lütge y Clarkson, 1985, 1987). Dentro de este grupo de enzimas, las ligadas a plasmalema tienen una especial relevancia a nivel de la captación de nutrientes, al ser las que se encuentran en contacto más directo con el medio externo. Así, en las raíces, las  $H^+$ -ATPasas de plasmalema son especialmente abundantes a nivel de las células externas de la epidermis, incluidos los pelos radicales, así como a nivel de las células de la endodermis y periciclo (Parets-Soler *et al.*, 1990; Serrano y Villalba, 1993). Se confirma, de

esta manera, la hipótesis de un doble bombeo activo en el proceso de absorción de nutrientes: 1) captación activa a nivel de la epidermis, y 2) transporte activo de los nutrientes al torrente xilemático (Burgos, 1993).

Los primeros pasos hacia la caracterización bioquímica de la  $H^+$ -ATPasa de plasmalema se llevaron a cabo por Hodges y colaboradores en 1972. Estudios posteriores pusieron de manifiesto la gran similitud existente entre estas enzimas en hongos y vegetales superiores (Serrano, 1983; Sze, 1985). En la actualidad se sabe que este tipo de ATPasa presenta una única subunidad catalítica (Slayman, 1985b), que es transmembranaria (Tabla II), y a la que en ocasiones se une otra subunidad accesoria, de función desconocida (Serrano y Villalba, 1993). Su pH óptimo de actuación está próximo a la neutralidad y son inhibidas, entre otros compuestos, por el vanadato. Son enzimas irreversibles y su estequiometría está entre 0.8 y  $1H^+/ATP$  (Serrano, 1985; Brauer *et al.*, 1989; Briskin, 1990).

Estas enzimas actúan, estrictamente, liberando energía mediante la lisis del ATP (bombas electrogénicas), proceso que se encuentra necesariamente acoplado a un flujo de protones hacia el exterior de la célula (Serrano y Villalba, 1993) (Figura 3). Mediante la utilización de esa energía liberada, se propicia el paso de solutos a través de la membrana por un transporte activo, denominado primario (Figura 3a).

La extrusión de  $H^+$  propicia, además, la existencia del denominado transporte activo secundario. La reincorporación de los protones al citoplasma celular promueve a su vez la entrada acoplada de aniones (simporte) (Figura 3b) o de cationes (antiporte) (Figura 3c). Además de todo esto, la actividad de la  $H^+$ -ATPasa origina una diferencia de potencial de membrana, que puede promover el paso de nutrientes con carga positiva hacia el interior de la célula (Figura 3d), así como un gradiente de pH que se crea por la extrusión protónica, y que va a determinar el paso y la distribución de solutos a ambos lados de la membrana.

Además de la  $H^+$ -ATPasa de plasmalema, existen en la célula otras bombas protónicas que son ATPasas de membrana, como las ligadas al tonoplasto y a la membrana mitocondrial, cuyas principales características se muestran en la Tabla 2. La  $H^+$ -ATPasa de tonoplasto desarrolla un importante papel en el mantenimiento del equilibrio interno de la célula, retirando o aportando solutos a partir del compartimento vacuolar; en cuanto a la  $H^+$ -ATPasa mitocondrial, constituye un enzima clave dentro de la cadena respiratoria celular. Estos dos enzimas han dificultado, a menudo, los estudios sobre la  $H^+$ -ATPasa de plasmalema, al "contaminar" con su presencia los extractos celulares obtenidos cuando se pretendía aislar (Smith y Smith, 1990). Sólo con la utilización de inhibidores más o menos específicos (Ferrol, 1991; Burgos, 1993), y con las técnicas de purificación de membrana plasmática (Serrano y Villalba, 1993), se está consiguiendo superar este problema.

Muy poco se conoce con respecto a la regulación de la  $H^+$ -ATPasa de plasmalema. Se sabe que factores externos, tanto físicos (luz, temperatura, heridas), como químicos (pH del

Tabla 2. Principales enzimas que hidrolizan ATP en los homogenados de plantas superiores (tomado, con modificaciones, de Ferrol, 1991).

Enzima	Familia enzimática	Posición en membrana	pH óptimo	Sustrato	Cofactor	Activadores	Inhibidores	Ref*
H <sup>+</sup> -ATPasa de plasmalema	E-P	Una subunidad transmembrana.	6-7	ATP>NTP	Mg <sup>2+</sup>	H <sup>+</sup>	DCCD, DES, Eritrosina B, Vanadato (50μM)	(1)
ATPasas mitocondrial y tilacoidal	F0-F1	F0, transmembrana; F1, cara citoplásmica	8-9	ATP>GTP	Mg <sup>2+</sup> >Ca <sup>2+</sup>	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> HSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Oligomicina, Azida (1mM), NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (50mM), DCCD	(2)
ATPasa vacuolar	F0-F1	F0, transmembrana; F1, cara citoplásmica	7-8	ATP>GTP	Mg <sup>2+</sup> >Ca <sup>2+</sup>	Cl <sup>-</sup>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (20mM), DCCD, DES, N-etilmaleimida, Eritrosina B	(3)

Referencias\*: (1) Dupont *et al.*, (1981); Perlin y Spanswick, (1981); Harada *et al.*, (1990); Serrano y Villalba, (1993).  
 (2) Churchill y Sze, (1983); Bennett y Spanswick, (1984); Dupont y Zabala, (1985).  
 (3) Pendersen, (1975); Nguyen *et al.*, (1987); Larson *et al.*, (1989); Larson y Jagenford, (1989); Minkov y Strotman, (1989).

medio, hormonas) la afectan (Serrano, 1989a y b). En concreto, algunas hormonas vegetales y, especialmente las auxinas, promueven su actividad mediante cambios en la expresión génica (Hager *et al.*, 1991; Serrano y Villalba, 1993). Asimismo, una toxina de origen fúngico, la fusicoccina, ha demostrado ser más eficaz aún, en la activación de la  $H^+$ -ATPasa de plasmalema, que la propia auxina (Serrano, 1989b), aunque en este caso el mecanismo de acción no tenga relación con procesos génicos (Hager *et al.*, 1991). Se han localizado receptores de la membrana vegetal que se unen específicamente a esta toxina, aunque la razón de su presencia es, todavía, desconocida.

Menos aún se conocen los mecanismos celulares internos de regulación de esta  $H^+$ -ATPasa. Se ha sugerido que, tanto el pH citoplásmico como la concentración celular de glucosa, mediante la activación sucesiva del AMPc y de proteínas kinasas, podrían ser algunos de los factores responsables de su activación (Serrano, 1989b).

#### *$H^+$ -ATPasas de plasmalema en las interfase arbuscular:*

La presencia de la  $H^+$ -ATPasa de plasmalema se ha puesto de manifiesto en la interfase arbuscular de las MA mediante estudios ultraestructurales (Marx *et al.*, 1982; Gianinazzi-Pearson *et al.*, 1991). En ellos se observa una redistribución de estas enzimas en las membranas de las células del córtex interno que contienen arbusculos, con respecto a las de las células no colonizadas, en las que la actividad ATPásica se reparte, de manera más o menos homogénea, a lo largo de todo el plasmalema. Como anteriormente se había indicado, aparecen dos "dominios" en la membrana de la célula cortical colonizada por un arbusculo (Smith y Smith, 1990): el primero corresponde a la membrana periférica, y a la que rodea al tronco arbuscular, donde esta actividad ATPásica es prácticamente nula. El segundo "dominio" corresponde a la membrana periarbuscular, donde se observa un notable incremento en los puntos de actividad, que se localizan ahora especialmente entorno a las ramas arbusculares más finas. En las membranas vegetales de interfases no arbusculares, la actividad ATPásica es prácticamente nula.

Con respecto a las membranas del hongo, los resultados no son tan claros. Mientras que Marx y colaboradores (1982) observaron actividad a nivel de las membranas de hifas arbusculares, tanto maduras como jóvenes, Gianinazzi-Pearson y colaboradores (1991) encontraron a ese nivel una actividad variable, y en ocasiones escasa, mientras que a lo largo de las membranas fúngicas de las interfases no arbusculares, la actividad era considerable. En ambos estudios, la actividad ATPásica desaparecía cuando el arbusculo entraba en fase de degeneración.

### La regulación del pH en MA.

La formación de la micorriza arbuscular promueve considerables alteraciones fisiológicas en la planta. El intercambio bidireccional de nutrientes, base sobre la que se asienta la permanencia de la simbiosis (Smith y Smith, 1990), ha de estar perfectamente controlado para ser beneficioso, y puede afectar al mantenimiento del pH interno de la célula colonizada por un arbusculo. De hecho, se ha postulado que la regulación del pH a nivel celular y tisular difiere substancialmente en plantas micorrizadas (Gianinazzi-Pearson y Azcón-Aguilar, 1991).

Esta distinta regulación del pH interno de la planta puede conducir a cambios en los modelos de exudación de la micorriza frente a la raíz, y, consecuentemente, a cambios en el pH de su rizosfera, o más concretamente, de la micorrizosfera. Adicionalmente, la aparición de nuevas zonas de captación de nutrientes (micelio externo), que se unirían a las células epidérmicas, podrían inducir cambios más profundos en el pH del suelo que los descritos hasta ahora para raíces no micorrizadas (Marschner y Römheld, 1983; Marschner *et al.*, 1986).

Los conocimientos actuales sobre el pH micorrizosférico son prácticamente nulos. Estudios recientes (Li *et al.*, 1991a y b) confieren a las hifas del micelio externo cierta capacidad de alteración del pH del suelo (hifosfera), por lo que se piensa que los mecanismos de regulación del medio interno de las hifas son similares a los de la raíz. El estudio de estos procesos podría ser clave para la mejor comprensión de la nueva regulación que exige el establecimiento de la simbiosis micorrízica, así como de las posibilidades que ésta tiene de alterar la disponibilidad de nutrientes en el suelo.

**OBJETIVOS**

## OBJETIVOS

A la vista de los antecedentes bibliográficos sobre el tema, recogidos en la Introducción de esta Memoria, se deduce que para comprender el funcionamiento de las micorrizas arbusculares, es fundamental conocer la organización de las interfases hongo-planta. Asimismo se deduce que, de estas interfases, las membranas son los componentes primordiales, cuya alteración va a condicionar, en gran medida, la fisiología de la simbiosis.

Por todo ello se propuso un desarrollo experimental con el siguiente **objetivo general**:

**Estudio de las alteraciones bioquímicas y fisiológicas de las membranas celulares en micorrizas arbusculares (MA).**

Para lograr dicho objetivo general, se propusieron unos "objetivos parciales", cuyo plantamiento requiere unos estudios previos que se podrían catalogar como "objetivos preliminares" del presente trabajo.

Los **objetivos preliminares** son los siguientes:

- 1.- Determinar el grado de dependencia de las micorrizas arbusculares del girasol (*Helianthus annuus* L. var. híbrido enano simple), dado que ya se conocía el de la otra planta modelo, la cebolla (*Allium cepa* L. var. babosa).
- 2.- Estudio de las alteraciones morfológicas inducidas en el sistema radical de girasol y cebolla como consecuencia de la formación de MA.

Los **objetivos parciales** son los siguientes:

- 1.- Estudio de las alteraciones en la composición de las membranas, y, especialmente, del plasmalema en MA de girasol y cebolla.

- 2.- Estudio de la actividad  $H^+$ -ATPásica de plasmalema en MA de girasol y cebolla.
- 3.- Estudio de la capacidad de extrusión de  $H^+$  por parte de raíces y micorrizas de girasol y cebolla.
- 4.- Estudio de los cambios inducidos en el pH de la rizosfera como consecuencia de la formación de micorrizas por plantas de cebolla.



**MATERIAL  
Y  
METODOS**

## MATERIAL Y METODOS

Los estudios que se van a describir a continuación, se llevaron a cabo en dos especies vegetales que presentan diferencias notables tanto en su estructura radical como en sus estrategias nutricionales, con el fin de estudiar los efectos diferenciales que la formación de la micorriza origina en ellas. La primera de estas especies es la cebolla (*Allium cepa* L. var. babosa), que ha sido, y sigue siendo, una de las especies más utilizadas en estudios sobre micorrizas, y cuyo carácter micotrófico está ampliamente reconocido, por lo que se podría considerar como una "planta de referencia simbiótica". La segunda es el girasol (*Helianthus annuus*, L. var. híbrido enano simple, HES), de elevado interés agronómico en nuestra Comunidad Autónoma, y cuya caracterización bioquímica, dentro del campo objeto de nuestro estudio, está bastante avanzada gracias al grupo de Bioquímica de Lípidos que dirige el Prof. Dr. Juan Pedro Donaire, de la Estación Experimental del Zaidín (CSIC, Granada), por lo que se podría considerar como una "planta de referencia bioquímica". El grado de dependencia de esta planta de las micorrizas se desconocía, por lo que fue necesario comenzar este estudio con su determinación.

El hongo MA utilizado en todos los ensayos, excepto en los concernientes al cultivo *in vitro* de esporas, por razones que se explican más adelante, fue *Glomus fasciculatum* (Taxter sensu Ger.) Ger. y Trappe. Se utilizó en forma de inóculo bruto (suelo que contiene segmentos de raíz micorrizada, micelio externo y esporas), dada su alta capacidad infectiva y la considerable cantidad de micelio externo a la que da lugar (Abbot y Robson, 1985).

Las metodologías empleadas para el estudio de la extrusión de  $H^+$  por raíces (o micorrizas) aisladas, el estudio de la actividad ATPásica en vesículas de membranas procedentes tanto de raíces como de micorrizas, así como la caracterización lipídica de dichas membranas, se adquirieron gracias a la colaboración con el grupo de investigación de Bioquímica de Lípidos de la Estación Experimental del Zaidín. La metodología correspondiente al estudio de los cambios en el pH rizosférico *in vivo* se adquirió gracias a la colaboración con el grupo de investigación del Instituto de Nutrición Vegetal de la Universidad Hohenheim de Stuttgart (Alemania) que dirige el Prof. Dr. Dr. h.c. Horst Marschner.

## 1.- Determinaciones preliminares.

### 1.1- Medida del grado de dependencia del girasol de la micorriza.

#### 1.1a.- Base teórica del método:

Las micorrizas mejoran el status nutricional de las plantas, fundamentalmente a través del incremento en su capacidad captadora y asimiladora del P del suelo. Sin embargo, la necesidad que tiene una planta de micorrizarse para alcanzar un desarrollo óptimo, varía dependiendo de sus características intrínsecas. Surge así el concepto de "grado de dependencia relativa de una planta a la micorriza" (Barea *et al.*, 1983), cuyo estudio resulta imprescindible para descifrar y predecir las alteraciones que la formación de la micorriza va a inducir en una planta determinada, y en una situación concreta.

Los ensayos para determinar la dependencia de una planta a la formación de micorrizas se llevan a cabo mediante la comparación de plantas micorrizadas con controles sin micorrizar, a diferentes niveles de P en el suelo, y evaluando la respuesta que se produce en el desarrollo de las plantas y en su asimilación de éste y otros nutrientes (Barea *et al.*, 1983; Azcón-Aguilar *et al.*, 1993). Para estudiar la contribución de la micorriza en la captación y asimilación de otros nutrientes, como por ejemplo el N, se compara el contenido y concentración de N en plantas micorrizadas, frente a controles no micorrizados pero crecidos a un nivel de P tal que induzca efectos similares a la micorriza en el desarrollo de las plantas. Para distinguir la fuente de origen del N captado, se puede utilizar como marcador el N<sup>15</sup> (Azcón-Aguilar *et al.*, 1993).

Mientras que la elevada dependencia de la cebolla a la formación de MA está bien establecida (Azcón-Aguilar *et al.*, 1993), el girasol ha sido mucho menos estudiado en este sentido. Koide (1985a y b) observó depresiones transitorias en el crecimiento del girasol planta, que, sin embargo, desaparecían con el tiempo. Para profundizar en estos estudios, y con el fin de caracterizar la variedad de girasol que se iba a emplear posteriormente, se diseñó un ensayo para establecer su grado de dependencia de la micorriza.

#### 1.1b.- Preparación del material:

##### *Suelo:*

Se utilizó "suelo Zaidín" (Tabla 3), mezclado en una proporción 1:1 (v/v) con arena de cuarzo, para evitar que se compactara.

pH (H <sub>2</sub> O) .....	8.09	Nitrógeno total (%) .....	0.25
Arcilla (%) .....	21.53	Nitrato (mg N/Kg suelo) .....	1.50
Limo (%) .....	24.35	Fósforo disponible (p.p.m.) .....	31.87
Arena (%) .....	54.13	Potasio (mgK/Kg suelo) .....	332.00
Materia orgánica (%) .....	1.81		

La esterilización de este suelo se lleva a cabo mediante un proceso de tinalización, que consiste en someterlo una hora, durante tres días consecutivos, a una temperatura de 100°C, en un autoclave a vapor fluente. De este modo, el suelo queda estéril y libre de todo tipo de posibles propágulos de micorriza que pudiera contener.

El suelo experimental se dividió en cuatro lotes iguales, a cada uno de los cuales se le adiciona, respectivamente, 0, 125, 250 y 375 mg de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> por kg de suelo. Una vez homogenizada la mezcla, el suelo se dejó reposar durante unas tres semanas, para que su contenido en nutrientes se equilibrara, ántes de su empleo definitivo.

#### *Planta:*

Las semillas de girasol se esterilizaron en una solución agua : lejía comercial (1 : 1), en la que se mantuvieron, en agitación, durante 10 minutos, tras lo cual se lavaron tres veces consecutivas con abundante agua fresca, durante 5, 10 y 15 minutos respectivamente, en continua agitación. Posteriormente, las semillas se mantuvieron en imbibición durante 1 ó 2 horas, tras lo que se depositaron en sus respectivas macetas.

#### *Inóculo de micorrizas:*

A cada maceta del tratamiento "micorrizado", M, se le adicionó un 5% de inóculo bruto de *G. fasciculatum* en el primer ensayo, y un 1% de inóculo bruto del mismo hongo, en el segundo. En el caso del tratamiento "control", (C) se adicionó un porcentaje similar del mismo sustrato del inóculo, previamente esterilizado. Asimismo, se preparó un filtrado del inóculo, que se adicionó a razón de 5 ml por maceta, en un intento de equiparar las poblaciones microbianas en todos los tratamientos.

#### 1.1c.- Procedimiento:

El suelo se repartió en macetas de 2 kg de capacidad. En cada maceta se colocaron tres semillas de girasol, de las que, una vez germinadas, se dejó solamente una, entresacándose las

restantes. Las macetas permanecieron en régimen de invernadero, (18-25°C, 16 h de luz), y se regaron con agua destilada, manteniendo el suelo a una humedad constante, próxima a la capacidad de campo del mismo.

Una semana después de montado el ensayo, se adicionó a cada maceta 50 mg de N como  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  por kg de suelo, con un 1% de exceso atómico en  $\text{N}^{15}$ .

Con respecto al resto de los nutrientes, se adicionaron mediante la aplicación, cada dos semanas, de 20 ml de la solución nutritiva Long Ashton (Hewitt, 1952) sin P ni N (Tabla 4).

Tabla 4. Solución nutritiva Long Ashton (-P, -N).		
Compuesto	Solución madre (g/l)	Para 1 litro (ml)
$\text{K}_2\text{SO}_4$	30.03	10.0
$\text{CaCl}_2$	47.50	20.0
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	18.40	20.0
EDTA-Fe	2.50	10.0
$\text{MnSO}_4$	2.23	1.0
$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	2.40	0.1
$\text{ZnSO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	2.90	0.1
$\text{H}_3\text{BO}_3$	18.60	0.1
$\text{NaNH}_4\text{MoO}_4$	0.35	0.1
$\text{H}_2\text{O}$	-	938.6

Las plantas se mantuvieron creciendo durante 7 semanas, tras lo que se cosecharon, separando raíz, tallo, hojas y flor, para efectuarles las determinaciones correspondientes.

#### 1.1d- Parámetros determinados:

A las 3, 5 y 7 semanas del inicio del ensayo, se realizaron medidas de la altura y número de hojas de todas las plantas, y, siguiendo la metodología propuesta por Takami y colaboradores (1981) se llevó a cabo el cálculo de la superficie foliar para girasol, a partir de la medida de los ejes mayor (E) y menor (e) de una de las hojas del par más desarrollado en cada una de las lecturas realizadas, que correspondían con el 2º, 3º y 4º par, respectivamente. La superficie foliar se determina aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{Superficie foliar} = E \times e \times 0.73$$

En el momento de ser cosechadas, a cada planta se le determinó de nuevo su altura y el número de hojas, así como el peso fresco de hojas, flor, tallo y raíz. Tras esto, con ayuda de un analizador de imagen (Dias Root Length Program, Delta-T Devices, LTD.), se determinó la superficie foliar total de cada planta. El material vegetal se llevó a secar a una estufa a 70°C durante 24h.

Una vez seco, se procedió a la molienda del material vegetal mediante un molino de martillos móviles (Culatti, DFH 48), y las muestras se almacenaron en bolsitas individuales de plástico, en sitio seco y oscuro. Mas tarde se realizaron análisis del contenido mineral en P y N de hojas, tallo, flor y raíz por separado, así como análisis foliar de micronutrientes (Fe, Cu, Mn y Zn) previa digestión húmeda bajo presión, en microondas, usando HNO<sub>3</sub> (Lachica *et al.*, 1973).

La colonización micorrícica se determinó en muestras representativas, de pesos conocidos, de cada uno de los sistemas radicales (C y M). Estas muestras se sometieron al proceso de tinción propuesto por Philips y Hayman (1970). Este consiste en una digestión parcial de las paredes y cubiertas celulares de la raíz, con una solución de KOH al 10% (1 hora a 90°C), seguida de una neutralización mediante una solución 0.1 N de HCl (3-4 minutos a T<sup>a</sup> ambiente), que además actúa como mordiente para la siguiente etapa del proceso, la tinción propiamente dicha. Esta se realiza a 90°C durante 10 minutos en una solución de azul tripán al 0.05% en ácido láctico. Una vez teñidas, las raíces se conservan en ácido láctico puro.

Para su cuantificación, se utilizó el método de Giovannetti y Mosse (1980), mediante el cual, el porcentaje de micorrización se estima a través del recuento del número de intersecciones de la raíz, colonizada o no, con una retícula (en este caso de 2 mm de lado).

#### 1.1e.- Análisis estadístico:

Para los datos de desarrollo en el tiempo de la superficie foliar, se determinó el intervalo de confianza de la media para un nivel de significación del 5%. Todos los demás datos de peso fresco y seco obtenidos, se sometieron a un ANOVA de dos vías, aplicándoseles a continuación el Test de Duncan para un nivel de significación del 5%.

#### 1.2.- Estudio de la morfología radical del girasol y de la cebolla.

##### 1.2a.- Base teórica del método:

La micorrización puede influir en la arquitectura radical, ya sea directamente por la presencia del hongo, o bien de manera indirecta, a través del mejor status nutricional de la

planta micorrizada (Hetrick, 1991). La modificación de la morfología de la raíz está, además, directamente relacionada con el grado de dependencia de la planta a la micorriza (Hetrick, 1991), y su conocimiento podría ser fundamental en relación con estudios celulares referidos a nivel de raíz entera. Por todo ésto, se consideró apropiado hacer un estudio sobre los posibles cambios que podrían tener lugar en la arquitectura de la raíz de girasol y cebolla tras su micorrización.

#### 1.2b.- Preparación del material:

##### *Suelo:*

Se empleó como sustrato una mezcla estéril de suelo "Zaidín" : arena (1 : 1). Las características del suelo y la preparación de la mezcla, se recogen en el apartado 1.1b.

##### *Planta:*

Se utilizan plantas de girasol y cebolla. Las semillas se esterilizaron por el método ya descrito en el apartado 1.1b. Sin embargo, las de cebolla se mantuvieron únicamente 5 minutos en contacto con la solución de hipoclorito sódico.

##### *Inóculo de micorrizas:*

A la mitad de las macetas se les adicionó un 1% (en el ensayo con girasol) ó 10% (en el ensayo con cebolla) de inóculo bruto de *G. fasciculatum* (tratamiento "micorrizado", M), mientras que a la otra mitad (tratamiento "control", C) se le añadió la misma proporción del sustrato del inóculo, estéril. Así mismo, se adicionan 5 ml del filtrado del inóculo a cada maceta para tratar de equilibrar las poblaciones microbianas de ambos tratamientos.

#### 1.2c.- Procedimiento:

En este caso se utilizaron como recipientes, bolsas de plástico negras (10.5 x 40 cm), con una capacidad de unos 2.1 kg de suelo, con objeto de que, por su mayor profundidad, permitieran un mejor desarrollo de la raíz, respetando al máximo su morfología. En cada bolsa se colocaron 3 (si se trataba del girasol) ó 10 (si era cebolla) semillas, para dejar, tras la germinación, sólo una. Las plantas permanecieron en el invernadero (18-25°C, 16 h de luz), y se mantuvieron en condiciones óptimas de humedad.

La fertilización se llevó a cabo mediante la adición, cada dos semanas, de 20 ml/bolsa de la solución nutritiva Long Ashton (Hewitt, 1952), carente de P (Tabla 5).

Tabla 5. Solución nutritiva Long Ashton (-P).		
Compuesto	Solución madre (g/l)	Para 1 litro (ml)
KNO <sub>3</sub>	30.30	10.0
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	70.80	20.0
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	18.40	20.0
EDTA-Fe	2.50	10.0
MnSO <sub>4</sub>	2.23	1.0
CuSO <sub>4</sub> x 5 H <sub>2</sub> O	2.40	0.1
ZnSO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	2.90	0.1
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	18.60	0.1
NaNH <sub>4</sub> MoO <sub>4</sub>	0.35	0.1
H <sub>2</sub> O	-	938.6

El girasol permaneció creciendo un total de 4 semanas, mientras que la cebollase mantuvo hasta 35 días, por ser ésta una planta de crecimiento mas lento.

#### 1.2d.- Parámetros determinados:

Tras ser cosechadas, se determinó la altura, los pesos frescos de raíces y micorrizas (separando, en el caso del girasol, raíz principal y secundarias) y la parte aérea de cada planta. A continuación, y con ayuda del analizador de imagen, se procedió a determinar la longitud de la raíz, para lo que éstas se cortaron en segmentos de, aproximadamente, 0.5 cm. Tras ello, se tomaron muestras de todas las raíces para proceder a la cuantificación de la micorrización, y el resto se llevó a secar a una estufa a 70°C durante 24 h, tras lo que se determinó el peso seco de la raíz principal y secundarias.

Posteriormente, se procedió al cálculo de la longitud de raíz específica (L.R.E.) (Hetrick, 1991), mediante la siguiente fórmula:

$$\text{L.R.E.} = \frac{\text{longitud de raíz}}{\text{biomasa de raíz}}$$

El porcentaje de raíz colonizada por el hongo se calculó como se indica en el apartado 1.1d.



### 1.2e.- Análisis estadístico:

A los datos de peso húmedo, longitud de raíz y L.R.E. se les determinó el intervalo de confianza de la media para un nivel de significación del 5%.

## 2.- Estudios sobre el metabolismo protónico y las membranas de las MA.

### 2.1.- Medida de la extrusión de H<sup>+</sup> en raíces enteras.

#### 2.1a.- Base teórica del método:

Como ya se ha comentado en la Introducción, los flujos de protones juegan un papel fundamental en los procesos nutritivos celulares. Asimismo, se acepta, en general, que la extrusión de H<sup>+</sup> de un órgano, tejido o célula es un indicador válido de su metabolismo celular. Por ello, resultaría de gran interés observar las modificaciones, si las hubiese, que sobre la extrusión de H<sup>+</sup> se producirían en raíces micorrizadas, en comparación con las que no lo están.

La metodología empleada en el estudio de la extrusión de H<sup>+</sup> por raíces enteras de girasol y cebolla, se basa en la medida directa de la cantidad de iones oxhidrilo (OH<sup>-</sup>) que son necesarios para neutralizar los H<sup>+</sup> extruidos por la actividad del sistema radical, a un pH prefijado (Rodríguez, 1988; Roldán, 1988; Ferrol, 1991; Burgos, 1993).

#### 2.1b.- Preparación del material:

##### *Suelo:*

Las plantas empleadas para estos ensayos se crecieron en una mezcla de suelo "Zaidín" : arena de cuarzo (1: 9 v/v), de modo que el sustrato resultante fuese muy pobre, para favorecer así el funcionamiento óptimo de la micorriza, y, al mismo tiempo, para que la separación de la raíz del suelo fuese lo menos traumática posible, evitando así que las heridas radicales elevaran, artificialmente, la extrusión de protones (Serrano, 1989b). La esterilización del sustrato se llevó a cabo por el método habitual, descrito en el apartado 1.1b.

##### *Planta:*

Con anterioridad a la realización de estos ensayos, se llevaron a cabo numerosas pruebas preliminares en las que se comprobó la idoneidad de nuestras variedades de planta, especialmente en el caso de la cebolla (la variedad de girasol empleada había sido ya utilizada en

estudios de este tipo; ver Roldán, 1988). Tanto girasol como cebolla dieron muestras de presentar unos niveles de extrusión de  $H^+$  aceptables dentro de los 18 a 20 primeros días de cultivo, aunque, a lo largo de este tiempo, el nivel de la extrusión iba decayendo en intensidad, para acabar haciéndose prácticamente inapreciable a partir de los 25 días de cultivo. Por ello se decidió limitar los tiempos de lectura hasta un máximo de 20 días.

Las semillas se esterilizaron tal y como se describe en el apartado 1.1b.

#### *Inóculo de micorrizas:*

Para el tratamiento "micorrizadas", (M) se aplicó un 5% de inóculo bruto de *G. fasciculatum* /maceta. En las macetas C "control" (C) se añadió igual proporción del mismo sustrato que el inóculo bruto, previamente esterilizado. En todos los casos se añaden 5 ml/maceta del filtrado del inóculo, para equiparar la población microbiana.

#### 2.1c.- Procedimiento:

##### *Obtención del material vegetal:*

Al ser éste un ensayo de lecturas a lo largo del tiempo, y requerir, para cada una de ellas, un peso mínimo de raíces por tratamiento, las semillas de girasol y cebolla se dispusieron en sus respectivas bolsas en una cantidad tal, que permitiera obtener, en el momento de su recolección, entre 2.0 y 2.5 g de raíces por lectura y tratamiento. Asimismo, el tamaño de las bolsas varía, dependiendo del número de semillas empleadas en cada ocasión, y de la longitud que presenten las raíces cuando vayan a ser recolectadas (según los tiempos de lectura). Esto se lleva a cabo en un intento de evitar, en lo posible, las deformaciones estructurales y funcionales que pudieran presentar las raíces y las micorrizas como consecuencia de la limitación del espacio para su desarrollo.

Tres veces en semana se aplicaron 10 ml/maceta de la solución nutritiva que se detalla en la Tabla 6.

Esta solución toma como base la solución nutritiva Long Ashton, pero en ella se aporta amonio como única fuente de N, ya que este ión incrementa considerablemente la capacidad extractora de la raíz (Marschner y Römheld, 1983).

Tabla 6. Solución nutritiva Long Ashton modificada para el estudio del metabolismo protónico de raíces

Compuesto	Solución madre (g/l)	Para 1 litro (ml)
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	11.95	4.0
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	26.40	20.0
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	8.70	4.0
CaSO <sub>4</sub>	17.20	20.0
CaCl <sub>2</sub>	22.20	10.0
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	18.40	20.0
EDTA-Fe	2.50	10.0
MnSO <sub>4</sub>	2.23	1.0
CuSO <sub>4</sub> x 5 H <sub>2</sub> O	2.40	0.1
ZnSO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	2.90	0.1
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1 8.60	0.1
NaNH <sub>4</sub> MoO <sub>4</sub>	0.35	0.1
H <sub>2</sub> O	-	939.5

#### Medida de la extrusión de H<sup>+</sup>:

Para llevar a cabo la medida de la extrusión de H<sup>+</sup> bien en raíces (C) o en micorrizas (M) enteras, se utilizó el sistema Metrohm-pH stat, cuyo esquema se representa en la Figura 4.

Este sistema consiste en dos embudos Buchner de doble pared, con una placa porosa de vidrio fritado (nº1), por la que se hace pasar una corriente continua de aire previamente desecado y descarboxatado. En cada embudo se vierten entre 60 y 75 ml del medio de incubación, que consiste en una solución de CaSO<sub>4</sub> (0.2 mM) + K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (2.0 mM), donde se van a colocar las raíces, en suspensión. Este medio de incubación proporciona una respuesta extractora máxima, según estudios previos llevados a cabo por Roldán (1988). La proporción raíces/medio de incubación se mantiene en 1/30 (p/v). El aire que se hace burbujear en la solución ayuda a mantener una elevada concentración de O<sub>2</sub> en el entorno de las raíces, y, al estar descarboxatado, evita el paso del CO<sub>2</sub> a H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, con el consumo de H<sup>+</sup> y el consiguiente error en la medida que ésto podría ocasionar. Los embudos se mantienen a una T constante, ya que, a través de su doble pared, se les hace pasar un flujo continuo de agua a 25°C.

En el medio de incubación se introducen dos pHmetros de lectura continua (Metrohm pH-meter E-632), uno por cada embudo y tratamiento, de manera que los pHs de las

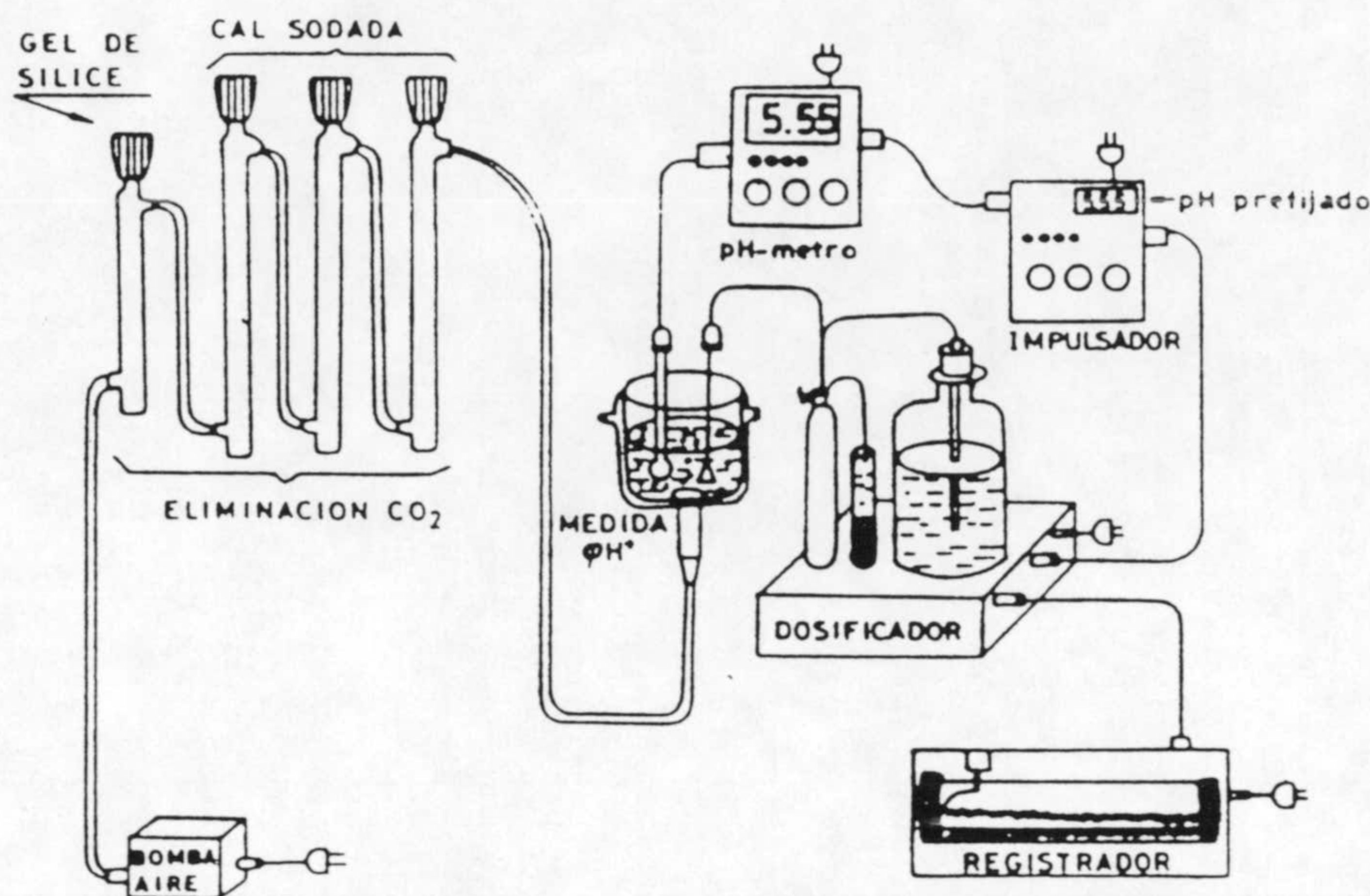


Figura 4. Dispositivo experimental utilizado para la determinación extractora de  $H^+$ . (Esquema cedido por el Dr. J.P. Donaire).

soluciones están controlados en todo momento. Junto con los dos pHmetros, se introducen, respectivamente, dos expendedores del sistema "multidosimat" (mod. 655), que son las terminales de unos reservorios de soluciones de KOH de muy baja molaridad. El sistema se completa con un aparato "impulsomat" (mod. 614), cuya misión consiste en enviar un pulso eléctrico al sistema "multidosimat" cada vez que el pH registrado por los pHmetros sea menor ( $\pm 0.01$  unidades) que un pH previamente prefijado. Mediante ese pulso, los dosificadores comenzarán a aportar KOH al medio de incubación, hasta que su pH incremente de nuevo por encima del límite prefijado. El sistema multidosimat incluye unos registradores en los que se va reflejando la cantidad de la solución de KOH gastada para la restauración del pH. El sistema registra, igualmente, el proceso de dosificación de KOH a lo largo del tiempo.

Se llevaron a cabo unos ensayos preliminares para fijar las condiciones experimentales de trabajo, es decir, pH del medio de incubación al cual las raíces eran capaces de extruir  $H^+$ , concentración de la solución de KOH a emplear, tiempo de lectura y parámetros a determinar. Los resultados de estos ensayos indujeron a fijar el pH de trabajo a 6.0, la duración de cada medida concreta en 9 horas y la concentración de KOH desde 2.5 mM a 0.5 mM, dependiendo de la edad del sistema radical, pues éste perdía actividad a lo largo del tiempo.

La temprana edad de los sistemas radicales en los que se determinó la actividad extractora de  $H^+$  (6 a 20 días), nos ofrecían la oportunidad de efectuar un seguimiento de la misma a lo largo de las diferentes etapas de la formación de la micorriza, y especialmente de sus

estadios iniciales. Para llevar a cabo esto, las plantas se retiraron del sustrato, en el que se habían mantenido creciendo, de la forma menos traumática posible, y, en primer lugar, se mantuvieron durante 30 minutos en una solución de  $\text{CaSO}_4$  0.2 mM, en continua aireación. Este proceso se llevó a cabo porque mediante él es posible la recuperación parcial de la actividad radical, en concreto, en lo que respecta a extrusión de  $\text{H}^+$  y actividad ATPásica.

Una vez cumplido este proceso, las raíces se introdujeron en sus respectivos embudos, con el sistema ya preparado. Los embudos se taparon con papel de parafina, y el pH del sistema se prefijó a 6.0. Por la acción extractora de las raíces, el pH del medio de incubación desciende, por lo que todo el sistema se pondrá en marcha. El ensayo se mantuvo en funcionamiento durante 9 h, ya que, a partir de ese tiempo, los datos obtenidos no resultaban fiables. Al final, el número de  $\mu\text{equivalentes}$  de  $\text{OH}^-$  empleados en la neutralización del pH del medio, son equiparables a los  $\mu\text{equivalentes}$  de  $\text{H}^+$  extruidos por la raíz (Davidian, 1984), por lo que se puede obtener, mediante transformaciones simples, una lectura final de la actividad radical.

#### 2.1d- Parámetros determinados:

Para el análisis de los datos obtenidos, se utilizaron dos parámetros:

**Extrusión de  $\text{H}^+$  durante 1h de  $V_{\text{máx}}$ :** Este parámetro se obtiene considerando los  $\mu\text{moles}$  de KOH consumidos =  $\mu\text{equivalentes}$  de  $\text{H}^+$  extruidos por la raíz exclusivamente durante el espacio de una hora en el que la pendiente de la curva de extrusión a lo largo del tiempo era máxima.

**Extrusión total de  $\text{H}^+$ :** Este parámetro se obtiene tras contabilizar el total de  $\mu\text{moles}$  de KOH consumidos =  $\mu\text{equivalentes}$  de  $\text{H}^+$  extruidos por la raíz desde el tiempo 0 hasta las 9 h del inicio del ensayo, en las que éste se daba por concluido.

Para reducir los errores de procedimiento al máximo, cada ensayo se repitió dos veces al día con raíces de plantas de la misma edad, asignándoles, en cada repetición, un embudo-recipiente distinto. Los pHmetros se calibraron antes de cada uno de los ensayos, y las células de medida se limpiaron, asimismo, antes de cada prueba, manteniéndolas durante 10 minutos en contacto con  $\text{H}_2\text{O}_2$ , y lavándolas a continuación durante 2 h con un flujo constante de agua corriente.

#### 2.2.- Medida *in vitro* de la actividad $\text{H}^+$ -ATPásica asociada a membranas en MA.

Las ATPasas translocadoras de protones asociadas a membrana, y, en concreto, a plasmalema, han sido consideradas como los enzimas responsables de la creación y mantenimiento de la diferencia de potencial y el gradiente iónico transmembrana, necesarios

para los procesos de captación y transferencia de nutrientes (Poole, 1978; Marré, 1979; Serrano, 1985). Por analogía, se piensan que estos mismos enzimas son los responsables de los procesos nutritivos en las MA (Smith y Smith, 1986, 1990). Por ello, se procedió al estudio, mediante métodos bioquímicos, en aislados de membranas celulares, de las posibles alteraciones fisiológicas que se producirían sobre estos enzimas, como consecuencia de la formación de la micorriza. Para ello se aisló, como material de estudio, microsomas de raíces de girasol y cebolla, es decir, la fracción de membranas, especialmente enriquecida en plasmalema, obtenida tras la homogenización y centrifugación de las raíces a una velocidad de 80000 x g (De Michelis y Spanswick, 1986) (ver Figura VIII b). En el caso de la variedad empleada para girasol, estas técnicas ya habían sido puestas a punto, aunque con vistas a la realización de otro tipo de estudios (Roldán, 1988; Ferrol, 1991; Burgos, 1993).

#### A) Extracción de microsomas enriquecidos en $H^+$ -ATPasas de plasmalema.

##### A.2.2a.- Base teórica del método:

Para poder llevar a cabo estos estudios, se aislaron membranas de micorrizas y raíces no micorrizadas siguiendo la técnica de De Michelis y Spanswick (1986). Esta metodología, a pesar de no purificar completamente el plasmalema de las células radicales, permite obtener aislados de membrana, con una elevada actividad  $H^+$ -ATPásica asociada a plasmalema. A su vez, en los extractos se obtiene un bajo, pero estable, nivel de "contaminaciones" por otras membranas, como el tonoplasto o la membrana mitocondrial, cuyas actividades ATPásicas respectivas podrían interferir en la lectura final. Sin embargo, comparativamente, estas contaminaciones no son cuantiosas, y, además, la procedencia de las distintas actividades ATPásicas obtenidas se puede caracterizar bien, gracias a las diferencias en los pHs basales de activación de cada una, así como de la utilización de diferentes inhibidores, como se expondrá mas adelante.

##### A.2.2b.- Preparación del material:

Como material de partida para el aislamiento de las membranas, se emplearon raíces de plantas de girasol y de cebolla, crecidas en idénticas condiciones a las empleadas para la medida de la extrusión de  $H^+$  a nivel de la raíz completa (apartado 2.1b.). Para este tipo de ensayos, el peso mínimo de raíces que se consideró necesario fue de 4g , y los tiempos de lectura se prolongaron hasta 63 días, con lo que ésto se tuvo que tener en cuenta a la hora de planificar el número de plantas necesarias, así como el tipo de macetas a emplear.

## A.2.2c.- Procedimiento:

Una vez obtenidas las raíces, con la precaución de causarles el menor daño posible en su separación del sustrato, se les sometió a un lavado previo, durante 2h, en una solución de  $\text{CaSO}_4$  0.2mM, en condiciones de aireación continua y a temperatura ambiente. Este proceso se lleva a cabo, como ya se ha mencionado, porque con él se recupera la mayor parte de la actividad ATPásica que pudiera haberse perdido durante todo el proceso de obtención del material.

Tras este lavado inicial, se tomó una muestra de cada una de las raíces para proceder a la cuantificación de su colonización arbuscular, por el método ya indicado, y el resto de las raíces se cortaron en fragmentos de 5 a 10 mm y se homogenizaron en un mortero, a 4°C, utilizando el medio de extracción que se detalla en la Tabla 7.

Tabla 7. Medio de homogenización para el aislamiento de microsomas de raíces de girasol y cebolla (Ferrol, 1991).	
Compuesto	Concentración
Glicerol .....	10.0%
BSA .....	0.5%
BTP/Mes, pH 7.6 .....	25 mM
Sacarosa .....	250 mM
DTT .....	2 mM
$\text{MgSO}_4$ .....	2 mM
ATP .....	2 mM
EGTA .....	2 mM
PMSF .....	1 mM

La proporción de peso fresco de raíces : volumen de medio de extracción se mantiene en 1 a 4.

El extracto celular obtenido se filtró a través de una gasa cuádruple, eliminando así el material vegetal mas grosero, y se centrifugó a 13000 x g durante 10 minutos para eliminar la mayor parte de las paredes vegetales y la mayor parte de mitocondrias y cloroplastos.

El sobrenadante que se obtuvo, se filtró de nuevo a través de una gasa doble y se volvió a centrifugar, esta vez a 80000 x g, durante 35 minutos, para eliminar todos los elementos citosólicos celulares. Tras ésto se recogió el sedimento obtenido, en el que quedaron retenidos

los microsomas, y se procedió a su lavado, con el mismo medio de extracción que en el homogenizado, pero adicionando IK (250 mM).

El IK es un agente de lavado fuerte, que elimina gran parte de las proteínas de membrana con alguna subunidad externa a la bicapa lipídica. Las H<sup>+</sup>-ATPasas de plasmalema, de tipo E-P (ver Introducción, Tabla 2) se caracterizan por presentar una única subunidad, que se halla fuertemente anclada a la zona hidrófoba de esta bicapa, por lo que este proceso de lavado, no logra eliminarlas. Sin embargo, las H<sup>+</sup>-ATPasas de las membranas "contaminantes" del extracto, como las del tonoplasto o de las mitocondrias, son del tipo F<sub>0</sub>-F<sub>1</sub>, por lo que presentan una gran "cabeza proteica" (parte F<sub>1</sub> del enzima), externa a la membrana, que sería eliminada por este proceso, impidiendo así su actividad. El lavado elimina, asimismo, la mayoría de las proteínas ancladas en las caras hidrófilas de la membrana, entre las que se encuentran algunas fosfatasas inespecíficas.

El proceso de lavado se llevó a cabo a 4°C durante 10 minutos, y tras él, el extracto se centrifugó de nuevo, a 80000 x g durante 35 minutos.

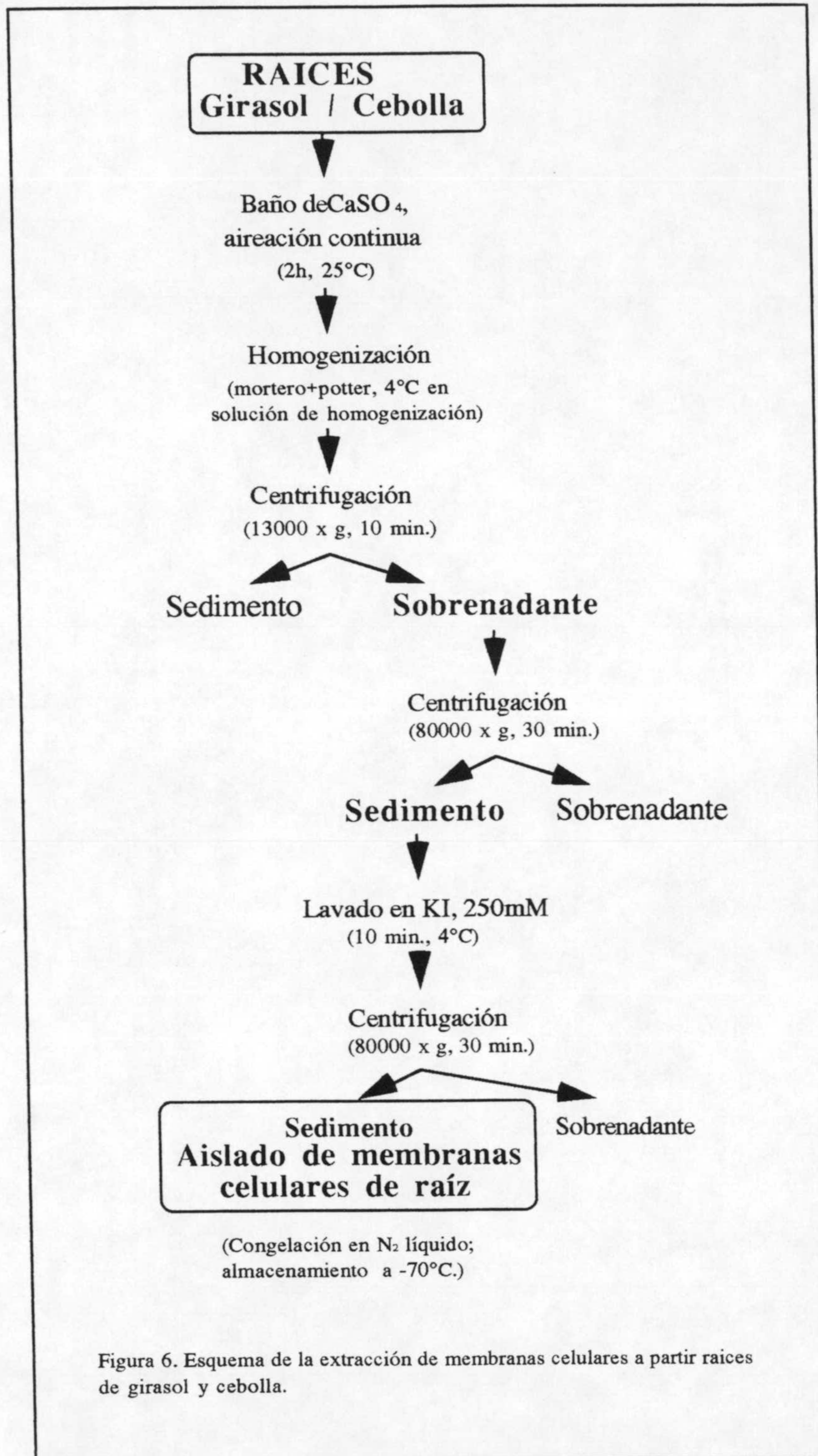
El sedimento obtenido en esta última centrifugación, contiene un condensado de vesículas de microsomas de raíz o micorriza, enriquecido en plasmalema. Este extracto se resuspendió entonces en un medio que permita la conservación de sus propiedades enzimáticas, hasta que éstas puedan ser cuantificadas (Tabla 8). Las muestras así preparadas se distribuyeron en tubos eppendorff de 500 µl, y se congelaron en N<sub>2</sub> líquido, conservándose luego a -70°C para su utilización posterior.

Tabla 8. Medio de conservación para el aislamiento de microsomas de raíces de girasol y cebolla (Ferrol, 1991).

Compuesto	Concentración
Glicerol .....	10.00%
Sacarosa .....	0.25%
BTP/Mes, pH 7.0 .....	2.0 mM
DTT .....	1.0 mM

El proceso de extracción se llevó a cabo simultáneamente en micorrizas y raíces control de la misma edad, procurando invertir, para ello, el menor tiempo posible, con vistas a minimizar las posibles pérdidas en la actividad ATPásica. En la Figura 6 se ofrece una panorámica completa del proceso de extracción.





B) Cuantificación de proteínas en la suspensión de membranas.

Una vez obtenidas las membranas de las raíces de distintas edades (9 a 63 días), se procedió a la cuantificación de las proteínas presentes en dichos extractos. Para ello se siguió

una modificación del método Bradford (1976), que permite una cuantificación mas específica de proteínas de membrana (Gogstad y Krutnes, 1982).

El método consiste en la interpolación de la absorbancia obtenida para cada una de las suspensiones de proteínas problema, en una recta patrón de absorbancias, obtenida a partir de concentraciones conocidas crecientes de una proteína determinada (en este caso, albúmina bovina). El reactivo de color empleado fue el Reactivo Concentrado Dye (Bio-Rad). Las vesículas de membrana se permeabilizaron con Triton X-100 (0.2%) y la absorbancia se midió en un espectrofotómetro (Shimadzu mod. 160), a una longitud de onda de 595 nm.

### C) Cuantificación de la actividad ATPásica asociada a membrana.

#### C.2.2a.- Base teórica del método:

Para llevar a cabo esta determinación, se siguió el método de Hodges y Leonard (1974) con algunas modificaciones (Ferrol, 1991; Burgos, 1993), que se basa en la determinación, mediante colorimetría y espectrofotometría, de la liberación de Pi como consecuencia de la hidrólisis del ATP (Ames, 1966).

#### C.2.2b.- Puesta a punto del método para extractos de cebolla.

Como ya se ha comentado en varias ocasiones, este método de cuantificación de la actividad ATPásica había sido puesto a punto, específicamente para esta variedad de girasol, por el grupo de investigación de Bioquímica de Lípidos, de la Estación Experimental del Zaidín (Roldán, 1988; Ferrol, 1991; Burgos, 1993). Sin embargo, y dadas las variaciones que se había comprobado que eran necesarias incluir en él al utilizarlo sobre extractos celulares de otra procedencia vegetal (Burgos, 1993), se estudiaron las condiciones óptimas para ajustarlo a los extractos de membranas de la variedad de cebolla objeto del presente estudio.

Para ello se realizaron curvas de respuesta del extracto enzimático frente a variaciones de concentración del sustrato (ATP) y variaciones en el pH del medio de incubación. En el primer caso, se realizó una cuantificación de un extracto determinado, siguiendo el protocolo del apartado C.2.2c, pero variando en él las concentraciones de ATP desde 0.01 hasta 5.0 mM. En el segundo caso, siguiendo este mismo protocolo, se hizo un estudio de la respuesta ante una escala de pH comprendida entre 4.5 y 9.0 unidades. Mediante estas dos curvas se calculó la  $V_{m\acute{a}x}$  y la  $K_m$  del enzima  $\pm$  ortovanadato, así como la concentración de ATP y pH óptimos para las posteriores determinaciones.

## C.2.2c.- Procedimiento.

Se toma una alícuota del extracto de membranas que contenga 8  $\mu\text{g}$  de proteína, y se mantiene durante 30 minutos a 30°C en el medio de incubación que se indica en la Tabla 9.

Tabla 9. Medio de incubación empleado para la cuantificación de la actividad ATPásica de extractos de microsomas de girasol y cebolla (Ferrol, 1991).	
Compuesto	Concentración
BTP/HCl (pH según membrana) .....	25.0 mM
KCl .....	100.0 mM
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .....	100.0 $\mu\text{M}$
MgSO <sub>4</sub> girasol .....	3.0 mM
ATP girasol .....	3.0 mM
MgSO <sub>4</sub> cebolla .....	1.5 mM
ATP cebolla .....	1.5 mM

La presencia en el medio de incubación de molibdato, fuerte inhibidor de la actividad fosfatásica, reduce aún más la posibilidad de interferencias no deseadas en las lecturas. El Mg, como cofactor imprescindible de las H<sup>+</sup>-ATPasas, y la presencia del K, potente activador de estos enzimas, vienen a reforzar la focalización del medio de incubación hacia la obtención de resultados fiables (ver Introducción, Tabla 2).

A todo esto se le adiciona un permeabilizante de membranas, la lisofosfatidil colina (LPC) (0.1 mM), para obtener así la actividad ATPásica total, con independencia de la orientación que el enzima haya adoptado en la revesicularización que suele tener lugar en las membranas durante el proceso de extracción. La reacción se detiene mediante la adición, en frío, de 1 ml de reactivo de Ames (10% ácido ascórbico, 0.42% (NH<sub>4</sub>)Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub> y 2% SO<sub>4</sub>H<sub>2</sub>) adicionado de un 5% de SDS. La actividad resultante se midió en el espectrofotómetro, a una longitud de onda de 820 nm. Los resultados obtenidos se expresan en  $\mu\text{moles}$  de Pi/mg proteína x hora mediante la interpolación en una curva patrón de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.

Partiendo de esta base común, se diversificó el estudio en la medida de la actividad H<sup>+</sup>-ATPásica asociada a membrana plasmática, de la H<sup>+</sup>-ATPasa asociada a tonoplasto y de la H<sup>+</sup>-ATPasa asociada a membrana mitocondrial. Esta compartimentación del estudio se hace posible gracias a que se conocen inhibidores específicos de cada una de estas enzimas según su localización. Así, el enzima asociado a tonoplasto es sensible a nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>); el asociado a membrana mitocondrial es sensible a azida (N<sub>3</sub><sup>-</sup>), mientras que el asociado a membrana

plasmática es sensible a vanadato ( $\text{VO}_4^{3-}$ ), e insensible a los dos anteriores (ver Introducción, Tabla 2).

Para medir la actividad de las ATPasas asociadas a membrana plasmática, su cuantificación se realizó a pH 6.5 para girasol y 7.0 para cebolla, en presencia de  $\text{NaN}_3$  (1 mM) y  $\text{KNO}_3$  (100 mM), así como de  $\pm \text{Na}_3\text{VO}_4$  (250  $\mu\text{M}$ ), según la metodología propuesta por Serrano (1990; Ferrol, 1991; Burgos, 1993).

Con respecto a las medidas de la actividad enzimática de las  $\text{H}^+$ -ATPasas asociadas a tonoplasto y membrana mitocondrial, se analizaron ambas a pH 8.5, tanto para los extractos de girasol como para los de cebolla. La reacción, en el caso del tonoplasto, se llevó a cabo en presencia de  $\text{ClK}$  (100 mM), así como de  $\pm \text{KNO}_3$  (100 mM), según la metodología propuesta por O'Neil y colaboradores (1983; Ferrol, 1991; Burgos, 1993). En el caso de la membrana mitocondrial, se llevó a cabo en presencia de  $\text{KNO}_3$  (100 mM), así como de  $\pm \text{NaN}_3$ , según la metodología propuesta por Galtier y colaboradores (1988; Ferrol, 1991; Burgos, 1993).

#### 2.2d- Parámetros determinados.

La actividad  $\text{H}^+$ -ATPásica de plasmalema sensible a vanadato e insensible a nitrato y azida ( $\Delta\text{Va}$ ), se define como:

$$\Delta\text{Va} = \text{Actividad (+KNO}_3\text{+NaN}_3) - \text{Actividad (+KNO}_3\text{+NaN}_3\text{+Na}_3\text{VO}_4)$$

La actividad  $\text{H}^+$ -ATPásica de tonoplasto, sensible a nitrato ( $\Delta\text{NO}_3^-$ ) se define como:

$$\Delta\text{NO}_3^- = \text{Actividad+ClK} - \text{Actividad+NO}_3^-$$

La actividad  $\text{H}^+$ -ATPásica de membrana mitocondrial, sensible a azida, ( $\Delta\text{N}_3^-$ ) se define como:

$$\Delta\text{N}_3^- = \text{Actividad-NaN}_3 - \text{Actividad+NaN}_3$$

Estos tres parámetros se refirieron tanto a los miligramos de proteína de membrana, con lo que obtenemos la **actividad específica del extracto**; como a los gramos de peso fresco de raíz, con lo que obtenemos la **actividad fisiológica del extracto**; o bien a la raíz completa, con lo que obtenemos la **actividad total del extracto**.

### 2.3.- Caracterización lipídica de las membranas celulares de raíces y micorrizas arbusculares de girasol y cebolla.

#### 2.3a.- Base teórica del método.

El método de extracción expuesto en el apartado A 2.2c, está diseñado específicamente para la obtención de membranas celulares vegetales a partir de raíces, para lo que había demostrado sobradamente su eficacia (Roldán, 1988; Ferrol, 1991; Burgos, 1993). Cabía la duda, sin embargo, de saber si esta efectividad se mantendría en la extracción simultánea de las membranas de los dos organismos integrantes de la micorriza arbuscular. La mayor resistencia a la ruptura por procesos mecánicos de las paredes celulares fúngicas, así como la forma cilíndrica de las hifas, y su reducido diámetro (no mayor de 5  $\mu\text{m}$ , según Bonfante-Fasolo, 1984), hacían temer por la posible pérdida de las estructuras del hongo en alguna de las etapas preliminares de la extracción (filtrados, centrifugación a 13000 x g). Para salir de dudas, se consideró la necesidad de encontrar un componente de la membrana fúngica, que actuase como marcador fiable de la presencia o ausencia de ésta en los extractos obtenidos y que, habitualmente, no se encontrara en las membranas vegetales.

En trabajos recientes (Schmitz *et al.*, 1991; Frey *et al.*, 1992; Nylund y Wallander, 1992), algunos autores han tratado de correlacionar ciertos componentes lipídicos que incrementan en la micorriza, fundamentalmente esteroides, cuya cuantificación por métodos bioquímicos resulta relativamente fácil, con el porcentaje de colonización fúngica. La más que probable presencia de estos compuestos en las membranas del hongo sugería la posibilidad de que se considerasen como los marcadores adecuados en este caso. Sin embargo, los resultados contradictorios obtenidos por esos mismos autores en su cuantificación, hicieron desechar esta posibilidad.

Pakovsky y Fuller (1988), en un estudio sobre la composición lipídica de la micorriza *Glycine max-Glomus fasciculatum*, detectaron en ella la aparición de cinco nuevos ácidos grasos que no estaban presentes en la raíz sin micorrizar. Entre ellos, un isómero del ácido palmitoleico, en concreto el ácido hexadecanoico (16:1, 11-cis), constituía entre un 30 a un 50% de los ácidos grasos totales de la micorriza, lo que los autores correlacionaban con el alto contenido en vesículas, portadoras de lípidos de reserva, presentes en la raíz colonizada. En este estudio no se realizaba, sin embargo, ninguna referencia a la posible contribución a la alteración en la composición lipídica de las membranas de la micorriza que podría ocasionar la presencia de las membranas del hongo tras el establecimiento de la simbiosis.

Las diferencias obtenidas por estos autores, y la alta probabilidad de que esos ácidos grasos formasen realmente parte de los fosfolípidos de membrana, animaron a realizar unas

pruebas de aislamiento y análisis cualitativo y cuantitativo de los ácidos grasos totales existentes en los microsomas de raíces y micorrizas, aislados mediante las técnicas ya descritas.

### 2.3b.- Preparación del material.

Los microsomas empleados para estos estudios se obtuvieron mediante la misma extracción que los utilizados en la cuantificación de la actividad ATPásica en el ensayo a largo plazo (apartado 2.2c). En el caso del girasol se extrajeron los lípidos totales de las membranas de raíces y micorrizas de 20, 30, 40, 50 y 63 días, mientras que en el caso de la cebolla sólo se extrajeron los lípidos totales de las membranas de 20, 40 y 60 días, al no quedar suficiente muestra del resto de los microsomas para llevar a cabo este proceso.

### 2.3c.- Procedimiento:

#### *Extracción de lípidos totales de membrana.*

Se siguió el método propuesto por Vorbeck y Martinetti (1965) con algunas modificaciones (Burgos, 1993).

Para ello, se toma una alícuota de cada uno de los extractos de membranas que contenga una cantidad conocida de proteínas (cantidad mínima aconsejada, 1 mg), y se deposita en un "potter" que contiene isopropanol hirviendo, donde se mantiene durante un minuto. Con esto se consigue desnaturalizar las proteínas presentes en el extracto, incluidas las lipasas (Douce, 1964). Tras esto, el "potter" se enfría en hielo, y la muestra se va homogenizando suavemente, mientras se le añade, sucesivamente, 1 ml de isopropanol, 1 + 1 ml de isopropanol: cloroformo (1 : 1), y 1.5 ml de cloroformo. Mediante estos disolventes orgánicos de diferente polaridad, se asegura la recuperación de la mayor parte de los lípidos presentes en los extractos de membrana. La muestra se filtra ahora al vacío mediante un filtro de papel Watman, nº1, para eliminar así los precipitados protéicos, y se lleva a sequedad en rotovapor.

El residuo obtenido se recoge en aproximadamente 3 ml de cloroformo, y se deposita en un tubo de metilación de base semiesférica. Mediante la adición de 0.5 ml de una solución de NaCl al 1% y su posterior agitación, se lleva a cabo un lavado salino de la muestra, con el fin de eliminar de ella los restos no lipídicos que pudiera aún tener. Como consecuencia de este lavado se forman dos fases, de las que la superior, o fase acuosa se desecha con la ayuda de una pipeta Pasteur, mientras que la inferior, u orgánica, que contiene el extracto lipídico, se transfiere a una ampolla, donde se rotoevapora a sequedad.

El residuo obtenido se recoge mediante un volumen conocido (1 ml, máximo) de una solución de benceno: etanol (4:1). La muestra se almacena en pequeños tubos, a -20°C, previa

creación de una atmósfera de N<sub>2</sub> que evite en lo posible la oxidación lipídica. En la Figura 7 se muestra un esquema general de todo este proceso.

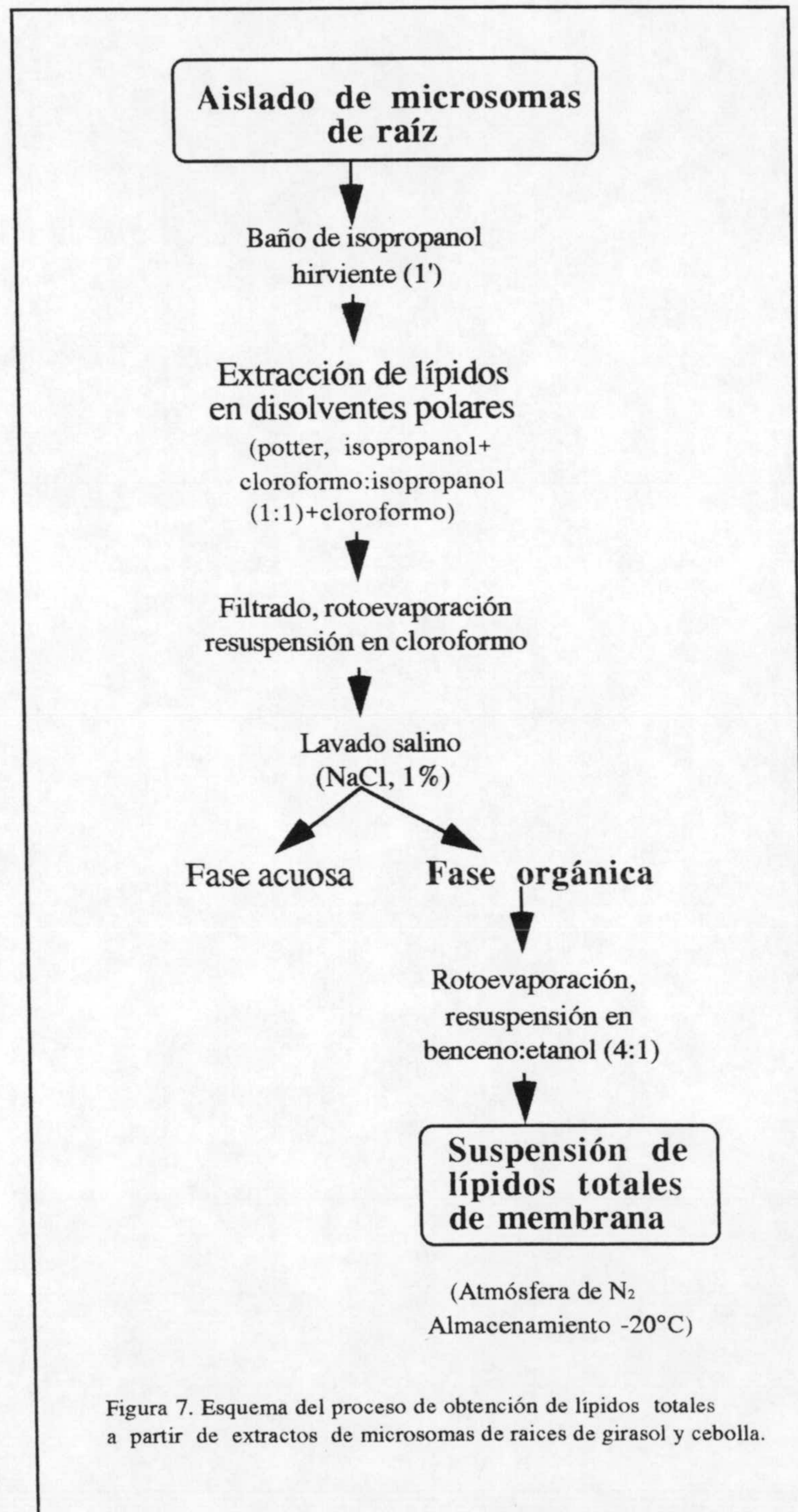


Figura 7. Esquema del proceso de obtención de lípidos totales a partir de extractos de microsomas de raíces de girasol y cebolla.

### *Obtención de los ácidos grasos de membrana a partir de sus lípidos totales.*

El método utilizado fue el propuesto por Metcalfe y colaboradores (1966) modificado por Lechevallier (1966).

Se toma un volumen conocido del extracto lipídico conservado en benceno: etanol (4:1), y se lleva a tubos de metilación de base semiesférica, donde la muestra se evapora, mediante una corriente de  $N_2$ , a sequedad. Se añaden 2 ml de sosa metanólica al 2% por tubo y, tras crear una atmósfera de  $N_2$ , los tubos se cierran herméticamente y se incuban a una temperatura de  $80^\circ C$ , durante 30'. Mediante este proceso, se produce la saponificación de los lípidos susceptibles de ello, con lo que se liberan los ácidos grasos objeto de nuestro estudio.

Una vez que las muestras se encuentran saponificadas, se procede a su metilación, mediante la adición de 2.5 ml de trifluoruro de boro en metanol (14%), y la posterior incubación de los tubos, nuevamente a  $80^\circ C$ , durante 30'. Este proceso se ha de llevar a cabo necesariamente, ya que el cromatógrafo de gases sólo es capaz de detectar los ésteres metilados de los ácidos grasos problema.

Con objeto de recojer los ácidos grasos liberados, se añade a cada tubo 5 ml de pentano y 1 ml de agua destilada. Los tubos se agitan y se centrifugan a baja velocidad (2000 r.p.m.) durante 2-3 minutos. De las dos fases formadas, se toma la superior (fase pentánica) y se lleva a tubos de metilación de base cónica. Ahora se añade a cada muestra 20  $\mu g$  del ácido heptadecanoico (17:0), que no se encuentra presente en las membranas de las plantas ni de este hongo micorrízico, y que actuará como patrón interno en la cuantificación.

Las muestras se desecan mediante el rotavapor primeramente, y finalmente mediante una corriente de  $N_2$ . A cada una se le añade, para finalizar, y con ayuda de una pipeta Pasteur, un pequeño volumen de metanol, que actuará de transportador de las muestras en su cuantificación en el cromatógrafo de gases. Las muestras se conservan a  $4^\circ C$  hasta su análisis. En la Figura 8 se ofrece una panorámica completa de todo este proceso.

#### 2.4c.-Parámetros determinados.

Los ésteres metílicos de los ácidos grasos de membrana obtenidos por estos procesos se separaron, identificaron y cuantificaron mediante cromatografía en fase gaseosa, por medio de una columna semicapilar de vidrio de 30m (Supelco SP-2330), a una temperatura programada entre  $150$  y  $170^\circ C$ , con incrementos de temperatura de  $0.4^\circ C$  por minuto. En cada determinación se inyecta entre 0.1 y 0.3  $\mu l$  de cada muestra.



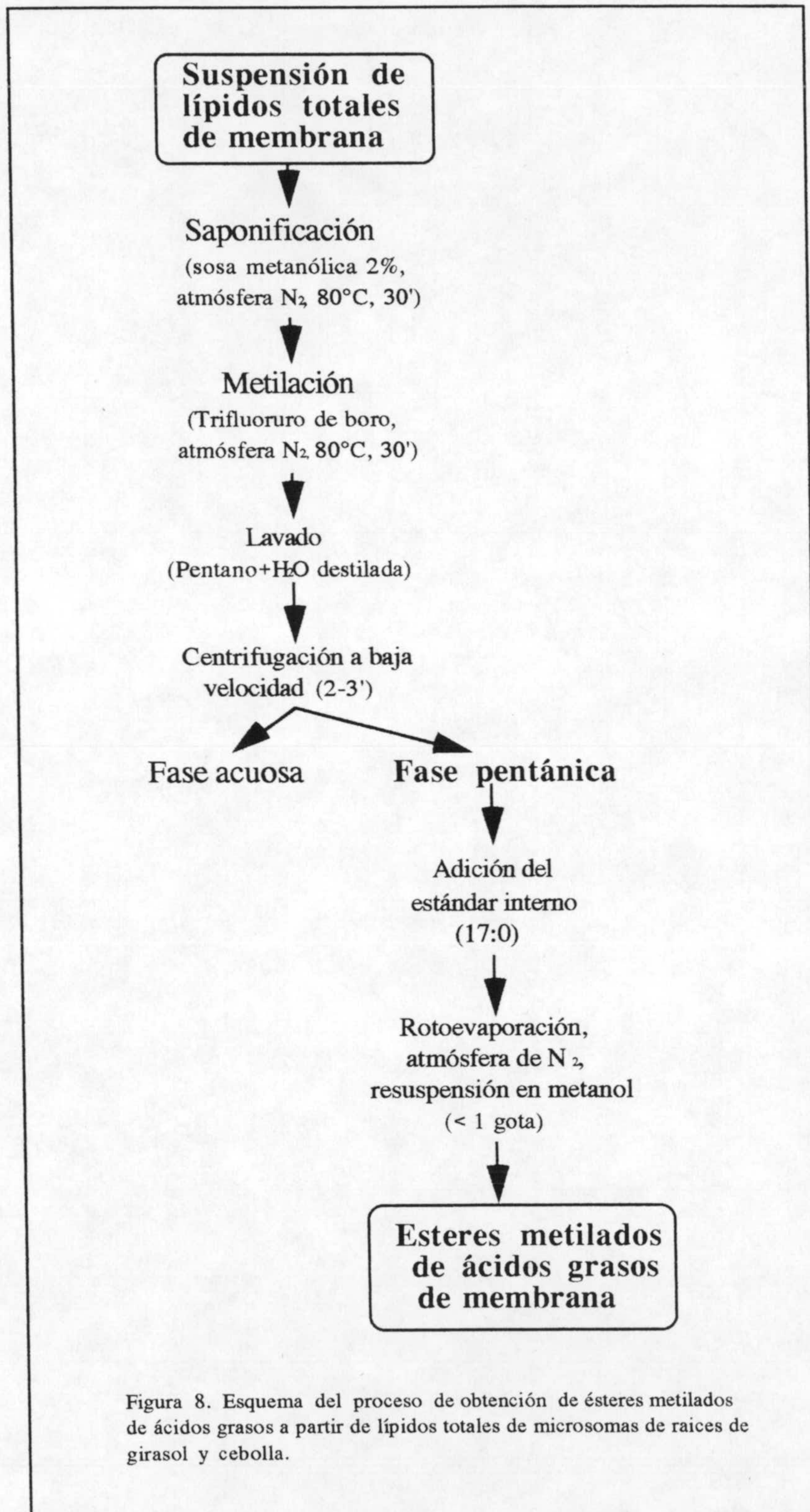


Figura 8. Esquema del proceso de obtención de ésteres metilados de ácidos grasos a partir de lípidos totales de microsomas de raíces de girasol y cebolla.

#### 2.4.- Medidas *in vivo* del pH rizosférico y micorrizosférico bajo el aporte de distintas formas iónicas de N.

##### 2.4a.- Base teórica del método.

Este método está basado en una técnica no destructiva de medida del pH, descrita por Marschner y Römheld (1983), que consiste en la aplicación de un indicador de pH, la púrpura de bromocresol, mediante láminas de agar o agarosa, a una superficie lisa de suelo en la que se está desarrollando el sistema radical de una planta. Los iones y exudados radicales que la planta excreta, así como los que se hallan en la rizosfera como consecuencia de una exudación previa, difunden a través del gel de agar o agarosa+púrpura de bromocresol, y hacen virar el indicador "in situ". Para ello se requiere un suelo con baja capacidad tamponadora, así como un tipo de agar o agarosa que permita la difusión iónica, es decir, que tenga baja electroendósmosis.

Las variaciones en la coloración del gel pueden ser correlacionadas con valores de pH mediante una escala patrón de coloración que, para este indicador, va desde el amarillo brillante (pH=4.5), pasando por el rojo (pH=6.5), hasta llegar a un fucsia-violáceo (pH=8.5) (ver Resultados, Figuras 27 y 28).

Estas técnicas se habían aplicado hasta ahora a raíces sometidas a fertilización diferencial, utilizando, para un mismo elemento nutritivo, diversos tipos de sustratos (P y Fe más o menos accesible) (Marschner *et al.*, 1986; Dinkelaker *et al.*, 1989) y de formas iónicas ( $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ ) (Marschner y Römheld, 1983; Häussling *et al.*, 1984; Marschner *et al.*, 1985), frente a las que se encontraban patrones de exudación diferentes por parte de la planta. Mas recientemente (Gollany y Schumacher, 1993), esta técnica se ha utilizado también en el seguimiento de los cambios del pH rizosférico en cultivo axénico de plantas. Sin embargo, nunca se había aplicado sobre MA, por lo que se desconoce si la presencia del hongo podría producir algún tipo de cambio sobre estos patrones.

En este trabajo, la intención, por tanto, era la de observar los posibles cambios en el pH micorrizosférico, con respecto al rizosférico, en presencia de dos fuentes de N (nitrato y amonio), con las que, habitualmente se obtienen diferentes patrones de pH. Estos resultados se podrían correlacionar después con los posibles cambios en las necesidades reguladoras del pH en raíces colonizadas por hongos arbusculares con respecto a las que no lo están.

*Determinación preliminar: estudio de la inocuidad de la púrpura de bromocresol para los hongos formadores de MA.*

A pesar de que la púrpura de bromocresol ha demostrado no tener influencia sobre el desarrollo de las raíces sobre las que se había aplicado, en los estudios del pH rizosférico

(Marschner, comunicación personal), su caracterización como "tóxico" en los catálogos de productos químicos, levantaba dudas sobre su inocuidad frente a la germinación y el desarrollo de los hongos arbusculares, lo que podría interferir en los experimentos a realizar mediante las técnicas de agar. Por ello se diseñó este sencillo ensayo preliminar, que permitiría despejar esas dudas.

**-Preparación del material:**

**Obtención de esporas:** Para este ensayo se utilizaron esporas de *Glomus mosseae*, hongo arbuscular ampliamente utilizado en estudios *in vitro*, y cuyas esporas presentan menores dificultades de obtención y manipulación que las del endofito hasta ahora empleado, *Glomus fasciculatum*.

Como primer paso, se aislaron esporocarpos de *Glomus mosseae*, mediante el método del tamizado húmedo y decantación (Gerdemann y Nicholson, 1963), por el que una suspensión en agua de suelo-inóculo, enriquecido en esporocarpos, se decanta brevemente y se hace pasar a través de tres tamices (700, 250 y 100  $\mu\text{m}$  de poro). En la segunda fracción (250 $\mu\text{m}$ ) quedan retenidos la mayor parte de los esporocarpos fúngicos, que se seleccionan mediante unas pinzas de punta fina y se disponen en una placa de petri con papel de filtro humedecido. En ellas se mantienen a 4°C durante unas 4 semanas para mejorar su germinación (Hepper y Smith, 1976).

Transcurrido este tiempo, se extraen las esporas por disección de los esporocarpos y se esterilizan en superficie mediante el método de Mosse (1962), en el que las esporas se sumergen durante unos 20 minutos en una solución esterilizante (2% cloramina T, 0.02% estreptomina, y trazas de Tween 80), y posteriormente se someten a lavados sucesivos con agua destilada estéril, durante un tiempo no inferior a 20 minutos. Las esporas, libres así de posibles contaminantes, están listas para ser transferidas a un medio de germinación adecuado.

**Preparación de los medios de cultivo:** Se preparó un medio control (agar-agua), consistente en agar Bacto Difco al 0.8% en agua destilada a un pH de 7.0; y otro, denominado agar-bromocresol, consistente en el mismo medio de agar-agua, al que se le adicionaba un 1% de una solución de este colorante en agua destilada (1%). Para preparar esta dilución, hay que tener en cuenta que el indicador no se disuelve en agua hasta alcanzar un pH=9.0, lo que se consigue mediante la adición paulatina de NaOH 1N. Una vez alcanzado, se lleva a pH 6.0 por medio de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1N y se conserva en un frasco oscuro a temperatura ambiente.

Los medios se esterilizaron en el autoclave a 112°C durante 30 minutos. Tras esto, y ya en condiciones de esterilidad, se comprueba y reajusta el pH, en su caso, para mantenerlo a 7.0, ya que éste es el óptimo para el desarrollo de *Glomus mosseae* (Hepper y Smith, 1976).

**-Procedimiento:**

Los medios se vierten en placas petri de plástico, de 9 cm de diámetro (20 ml/placa), y una vez solidificados, se transfieren a ellos las esporas esterilizadas en superficie con la ayuda

de una pipeta Pasteur (10 esporas/placa). Las placas se sellan con papel de parafina para evitar pérdidas de humedad, y se llevan a incubar a 25°C, en oscuridad.

-Parámetros determinados:

Las esporas se mantuvieron en sus medios durante 6 semanas, realizándose a lo largo de este tiempo cuantificaciones sobre los porcentajes de germinación y desarrollo del micelio. Este último parámetro se evalúa mediante el método de Marsh (1971), según el cual la longitud de una estructura distribuida al azar sobre un sistema de líneas, es proporcional al número de veces que dicha estructura intersecta alguna de estas líneas. En este caso se utiliza una retícula de 2.0 mm de lado, y se cuantifican las intersecciones, tanto horizontales como verticales, de las hifas con ella.

-Análisis estadístico:

A los datos obtenidos mediante la cuantificación del desarrollo del micelio se les determinó el intervalo de confianza de la media, para un nivel de significación del 5%.

Una vez comprobada la inocuidad de este colorante frente a la germinación y desarrollo de los hongos formadores de MA (ver Resultados, apartado 2.4a.), se procedió a continuar con el ensayo previamente planificado.

#### 2.4b.- Preparación del material

*Suelo:*

El suelo utilizado en estos ensayos proviene de la zona de Sierra Nevada, en concreto de las cercanías de la localidad de Güéjar-Sierra (suelo "Güéjar-Mairena"), y se caracteriza especialmente (Tabla 10) por tener una muy baja capacidad tamponadora (escaso contenido en carbonato calcio, según la prueba de efervescencia en  $\text{ClH} : \text{H}_2\text{O}$ , 1: 1).

Tabla 10. Características químicas del suelo Güéjar-Mairena.

pH (H <sub>2</sub> O) .....	6.80
Materia orgánica (%) .....	0.80
Nitrógeno total (%) .....	0.26
Nitrito (mg/Kg suelo) .....	0.22
Fósforo disponible (p.p.m.) .....	14.80

Este suelo se tamizó a 2mm, puesto que, como veremos, había que conseguir con él una superficie lo mas lisa y homogénea posible para que se desarrollaran sobre ella las raíces. Su

elevado contenido en arcillas, que hubiera podido provocar problemas de anaerobiosis y dificultades de circulación de agua en las placas, hizo aconsejable su mezcla, en una proporción de 1:1 (v/v) con arena, también tamizada a 2mm.

*Plantas:*

Se utilizaron plantas de cebolla. Las semillas se esterilizaron por el método descrito en el apartado 1.2b.

*Inóculo de micorrizas:*

La mitad de las plantas se inocularon con el hongo arbuscular *Glomus fasciculatum*. El hongo se aportó como inóculo bruto habitual, mezclado con la totalidad de suelo. En todos los tratamientos se añadió un filtrado del inóculo para tratar de equiparar la población microbiana.

2.4c.- Procedimiento

Las plantas se cultivaron en placas petri de plástico de 13.5 cm de diámetro con una abertura lateral de aproximadamente 5 cm, en las que se disponía la mezcla suelo : arena estéril, de modo que se formase, en la parte superior una superficie lo mas lisa y homogénea posible. Las semillas (5/placa, de las que luego se deja sólo una) se introducen en el suelo a unos dos centímetros por debajo de la abertura lateral. Las placas se cerraron mediante cinta adhesiva y papel de parafina, para evitar en lo posible las pérdidas de humedad y las contaminaciones, y se recubrieron con plástico negro para evitar la incidencia de la luz sobre la raíz, así como la proliferación de algas. Estas placas deben colocarse con cierta inclinación (unos 60°), con la superficie lisa del suelo hacia abajo, de manera que, por su geotropismo positivo, las raíces vayan creciendo entre el suelo y la tapadera, siempre a la vista.

La fertilización del suelo se realizó antes de preparar las placas, añadiéndole las siguientes cantidades de nutrientes:

N como $K_2NO_3/(NH_4)_2SO_4$ .....	50	mg/Kg	suelo.
P como $KH_2PO_4$ .....	20	"	"
Mg como $MgSO_4$ .....	12	"	"

Fe y micronutrientes, a 1/10 de la concentración habitual de la solución nutritiva Long Ashton (Hewitt, 1952) (Tablas 4 y 5).

El aporte de agua se realizó diariamente, por la abertura superior de las placas, de manera que el suelo se mantuvo, aproximadamente, en un 6% de humedad.

Las plantas permanecieron creciendo durante 8 semanas, y las lecturas se realizaron a las 4 y 8 semanas.

*Lecturas del pH in vivo:*

Se utilizaron geles de agarosa, ya que este compuesto proporciona una lectura más nítida sobre el suelo que el agar.

La solución de agarosa se prepara en agua destilada (0.8%), y se disuelve llevándola a ebullición, con agitación continua. Cuando la agarosa se ha disuelto completamente, se le añade un 1% de la solución de púrpura de bromocresol, preparada como se indicó previamente (apartado 2.4a, A), aunque ajustada a pH 6.0. La preparación se agita y se vierte en moldes de cristal, de manera que se obtenga una capa homogénea del gel, de unos 3 mm de espesor. Una vez solidificado, las placas-maceta se abren y el gel se dispone en la superficie del suelo donde crecen las raíces, procurando que se produzca un total contacto entre ellos.

Los colores derivados de los cambios de pH tardan aproximadamente 5-10 minutos en empezar a manifestarse, y pueden leerse hasta una media hora después del contacto.

2.5- Estudio de los posibles cambios de pH promovidos por las hifas del hongo formador de MA *Glomus mosseae* cultivado *in vitro* bajo distintas formas iónicas de N.

2.5a.- Base teórica del método.

Según los trabajos llevados a cabo por el grupo del Profesor Marschner, las raíces de las plantas modifican el pH de la rizosfera mediante su actividad captadora de nutrientes. Estos cambios de pH, puestos de manifiesto con la técnica de los geles de agar o agarosa+púrpura de bromocresol (Marschner y Römheld, 1983; Häussling *et al.*, 1985; Marschner *et al.*, 1986; Dinkelaker *et al.*, 1989), se atribuyen, al menos parcialmente, a la necesidad del mantenimiento de un equilibrio iónico en el interior de la raíz, y dependen de la forma iónica del nutriente a captar. Así, se ha descrito, en general, una acidificación de la rizosfera como consecuencia del aporte de N bajo la forma de  $\text{NH}_4^+$ , mientras que si este nutriente se aporta como  $\text{NO}_3^-$ , se observa una alcalinización del entorno radical (Marschner y Römheld, 1983; Marschner *et al.*, 1989). En cualquier caso, esto va a depender del tipo de planta y de su entorno nutritivo (Marschner *et al.*, 1989).

Por otra parte se ha descrito también la capacidad *in vivo* de las hifas externas de la micorriza de producir cambios en el pH hifosférico como consecuencia de su actividad, lo que ha sido atribuido a un tipo de regulación de su pH similar al de la raíz (Li *et al.*, 1991a y b). La detección de la presencia de los enzimas necesarios para el metabolismo nitrogenado en la espora e hifas del hongo (Ho y Trappe, 1975; Smith *et al.*, 1985; Sundaresan *et al.*, 1988), sugerían la posibilidad de que estos cambios se dieran también *in vitro*, por lo que se decidió preparar este sencillo ensayo.

## 2.5b.- Preparación del material.

### *Obtención de esporas:*

Para este ensayo se utilizaron esporas del hongo formador de MA *Glomus mosseae*, que se obtuvieron por el método descrito en las determinaciones preliminares del apartado 2.4 de este Material y Métodos.

### *Preparación de los medios de cultivo:*

En esta ocasión se prepararon siete medios de cultivo diferentes, que se detallan a continuación:

#### Medio de germinación de las esporas:

**Agar-agua:** Este medio, cuya preparación ya se ha descrito, se empleó para la germinación de todas las esporas que iban a ser empleadas en este ensayo, al estar descritos ciertos niveles de inhibición de la germinación *in vitro* de esporas de hongos arbusculares en medios de cultivo nitrogenados (Siqueira *et al.*, 1982), especialmente en presencia de  $\text{NO}_3^-$  (Wong y Marschner, 1988).

#### Medios definitivos para el crecimiento del micelio:

**Agar-Bromocresol:** Su preparación se ha descrito también en las determinaciones preliminares. Este medio se utilizó como primer control frente a los medios bromocresol- $\text{NO}_3^-$  y bromocresol- $\text{NH}_4^+$ , que ahora se describen.

**Bromocresol- $\text{NO}_3^-$ :** Resulta de añadir 7mg/l de N como  $\text{KNO}_3$  (Wong y Marschner, 1988) al medio de agar-bromocresol. La solución de  $\text{KNO}_3$  se esteriliza aparte del medio agar-bromocresol, y luego se mezclan, manteniendo las condiciones de esterilidad. El pH se reajusta a 7.0, en su caso.

**Bromocresol- $\text{NH}_4^+$ :** Resulta de añadir 7mg/l de N como  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (Wong y Marschner, 1988) al medio de agar-bromocresol. También la solución de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  se esteriliza aparte y luego se mezcla, ajustándole el pH a 7.0 en esterilidad.

**Agar-Sulfito-Bromocresol:** En diferentes estudios, se ha puesto de manifiesto que los compuestos azufrados (Hepper, 1984b, 1986), y en concreto el sulfito (García-García, 1989; Bago, 1990) ejercen una notable estimulación sobre el desarrollo *in vitro* del micelio de hongos arbusculares. De ahí su inclusión en este ensayo. Este medio (agar-sulfito-bromocresol), que se obtiene añadiendo 10mg S/l como  $\text{KSO}_3$  (García-García, 1989; Bago, 1990) al medio agar-bromocresol, se utilizó como control de los dos siguientes, en los que ya se emplean  $\text{NO}_3^-$  y  $\text{NH}_4^+$ .

**Sulfito-Bromocresol- $\text{NO}_3^-$ :** Se prepara como el medio agar-sulfito bromocresol, pero añadiéndole 7mg/l de N como  $\text{KNO}_3$ . Para la esterilización y ajuste de pH se procede igual que con los medios anteriores.

**Sulfito-Bromocresol-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>**: Se prepara como el medio agar-sulfito bromocresol, pero añadiendo 7mg/l de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Esterilización, y ajuste de pH, igual que en los medios anteriores.

#### 2.5c.- Procedimiento.

El medio de germinación se vierte en placas de petri de 9 cm de diámetro, a razón de 20 ml/placa, y a ellas se transfieren las esporas (diez/placa), al igual que antes, con ayuda de una pipeta Pasteur, en condiciones estériles. Las placas se sellan con papel de parafina y se incuban a 25°C en oscuridad.

Los medios definitivos para el crecimiento del micelio se vierten en placas de petri de 9 cm de diámetro, a razón de 10 ml/placa, para obtener así una capa mas fina y observar mejor los posibles cambios de color, y las esporas se van transfiriendo a ellos conforme van germinando. De cada tratamiento se reservan dos placas, a las que no se transfieren esporas, que se emplen como "controles de color" (pH= 7.0).

#### 2.5d.- Parámetros determinados.

Las esporas permanecen en sus medios definitivos durante cuatro semanas. Transcurrido este tiempo, el micelio desarrollado se cuantifica mediante el método de Marsh (1971), ya descrito.

#### 2.5e.- Análisis estadístico.

A los datos de desarrollo del micelio se les determinó el intervalo de confianza de la media, para un nivel de significación del 5%.



***RESULTADOS***

## RESULTADOS

### 1.- Determinaciones preliminares

#### 1.1- Medida del grado de dependencia del girasol de la micorriza.

Los resultados obtenidos para los estudios de dependencia del girasol a la formación de la micorriza se muestran en la Figura 9 y en las Tablas 11, 12 y 13.

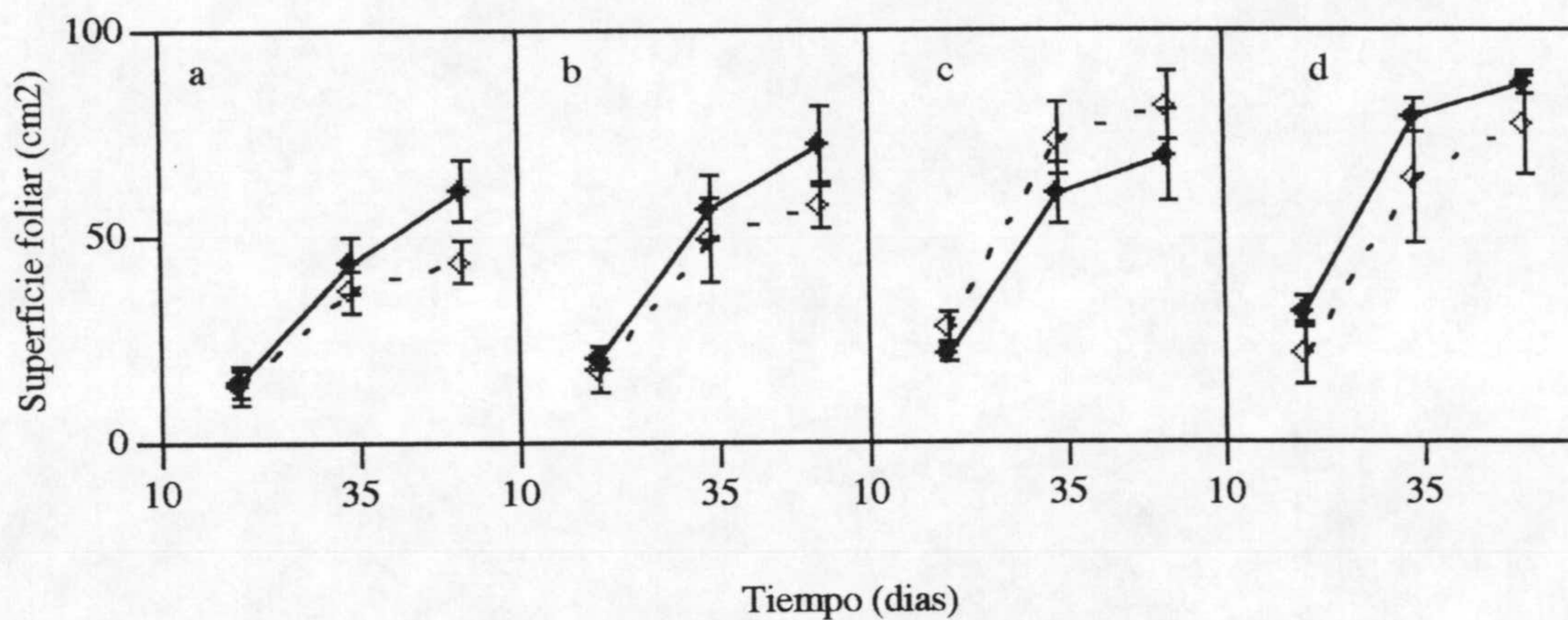


Figura 9. Evolución a lo largo del tiempo de la superficie foliar de plantas de girasol, micorrizadas (símbolos rellenos, línea continua) o no (símbolos huecos, línea de puntos), crecidas bajo el aporte 0 (a), 125 (b), 250 (c) o 375 (d) mg de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  por kg de suelo ( $p < 0.05$ ).

Como puede observarse, los resultados del desarrollo foliar a lo largo del tiempo (Fig. 9) muestran incrementos significativos de la extensión de la hoja en los niveles más bajos de P (0, 125). En el nivel 250 la tendencia se invierte, para volverse a recuperar cuando se adicionan 375 mg de fósforo, aunque estos dos últimos resultados no superan el test estadístico de significación. La superficie foliar se considera como uno de los parámetros más indicativos de la incidencia de la formación de la micorriza en la planta (Koide, 1985a), por lo que estos resultados sugieren, ya de por sí, que existe cierto grado de dependencia del girasol a la micorriza.

Con respecto a los parámetros físicos (Tabla 11), observamos que, en general, podemos agrupar los tratamientos en cuatro niveles distintos.

En el nivel más bajo encontraríamos al Control 0, que queda en todos los casos descolgado como el tratamiento del que se obtiene una menor respuesta. Esto puede indicarnos

Tabla 11. Resultados obtenidos para los distintos parámetros considerados en el estudio de la dependencia del girasol a las micorrizas.

Dosis de P (mg $\text{KH}_2\text{PO}_4$ /Kg suelo)	Peso húmedo (g)							
	Hojas		Tallo		Flor		Raíz	
	Control	Micorriza	Control	Micorriza	Control	Micorriza	Control	Micorriza
0	6.7 a	12.0 b	8.8 a	15.9 b c	2.6 a	5.8 b	8.1 a	11.0 b
125	11.4 b	14.5 c	14.7 b	19.0 c d	6.2 b	5.9 b	12.6 b c	15.5 b c
250	18.4 d	15.1 c	22.4 d	19.7 c	7.5 b	7.8 b	15.6 b c	13.6 b c
375	16.4 c	18.8 d	19.0 c d	25.2 e	7.0 b	9.0 b	14.6 b c	17.1 c
	Superficie foliar (cm <sup>2</sup> )		Superficie foliar / P.f. hojas		% Hidratación hojas		% Colonización radical	
	Control	Micorriza	Control	Micorriza	Control	Micorriza	Control	Micorriza
	0	215.7 a	395.5 b	32.0 a	33.1 a	84.6 a	86.6 b c	—
125	446.7 b	583.7 c	39.3 b	40.3 b	85.5 a b	85.6 b c	—	65.9
250	735.2 d	627.5 c	40.1 b	41.7 b	86.1 b c	86.3 b c	—	48.4
375	655.4 c	776.4 d	40.1 b	41.5 b	86.5 b c	87.2 c	—	31.7

Letras iguales corresponden a diferencias estadísticamente no significativas, según el análisis estadístico de Duncan ( $P < 0.05$ ).

que, aparte de su importante sistema radical, el girasol es una planta con amplios requerimientos nutritivos que, en este caso, no se han satisfecho. Un segundo nivel de crecimiento estaría constituido por los tratamientos M 0 y C 125, cuyo desarrollo es similar. Esto indica que, en su establecimiento, la micorriza ha ayudado a la planta a superar los problemas de desarrollo que se manifestaban, en ausencia de ella, en el nivel 0 de P. Probablemente la contribución de la micorriza en esta planta no se deba tanto a una ampliación de la zona de suelo explorada, puesto que la raíz de girasol está suficientemente desarrollada para no requerir ayuda en este sentido, sino, más bien, a una explotación más eficaz del contenido nutritivo del sustrato.

El tercer nivel de desarrollo estaría constituido por los tratamientos M 125, M 250 y C 375. En éste último (máximo nivel de P, sin micorriza) el girasol sufre una depresión en su crecimiento, lo que concuerda con lo observado, para otras especies vegetales, por diversos autores (Amijee *et al.*, 1989). En el nivel 250 de P, el girasol micorrizado ralentiza su crecimiento, dando una meseta en la curva al P, que, sin embargo, se supera en el tratamiento M 375.

El nivel más elevado en el desarrollo del girasol se obtiene para los tratamientos C 250 y M 375, siendo éste último el que presenta las plantas de porte superior. El que obtengamos

respuesta a la formación de la micorriza en un nivel de adición de P tan alto, confirma que, como está descrito en la bibliografía al respecto (Delgado, 1992), esta planta presenta unos requerimientos nutricionales muy elevados, lo que hace que obtenga beneficio de la formación de la simbiosis, incluso a niveles altos de fertilización.

Con respecto a los porcentajes de colonización radical, éstos se van reduciendo a medida que se incrementa el nivel de P aportado, lo que coincide con lo descrito por algunos autores para ésta (Koide, 1985a) y otras plantas (Amijee, 1989 y referencias en ella). El aprovechamiento que la planta de girasol obtiene de la formación de la micorriza, así como el control de la colonización radical que lleva a cabo, parecen indicar que nos encontramos frente a una planta micótrofa facultativa, lo que se puede confirmar mediante el estudio de su contenido nutritivo, que se muestra en la Tabla 12.

Los resultados mostrados en ella confirman los obtenidos para el desarrollo de la planta. Especial atención merecen los datos de contenido en P de las hojas, en los que se observa claramente la superioridad de las plantas micorrizadas frente a las que no lo están, especialmente a los niveles de fertilidad mas bajos (0, 125), aunque también al nivel superior (375). Esto apunta, de nuevo, a los fuertes requerimientos nutritivos de esta planta, lo que se corrobora por los importantes porcentajes de N que se obtienen en los diversos órganos vegetales.

Así mismo, resultan muy expresivos los resultados obtenidos para la flor: las de las plantas micorrizadas llegan a tener triplicado su contenido en P, mientras que para el N obtienen también unas diferencias apreciables a su favor. En este estadio fisiológico de floración, en el que la planta vuelca todo su metabolismo en la obtención de órganos reproductores lo más competitivos posibles, la formación de la micorriza concede a la planta una ventaja inestimable. El girasol micorrizado parece controlar en todo momento la colonización radical, obteniendo así el máximo rendimiento posible en cada etapa de su desarrollo.

En el caso de las plantas micorrizadas se observa una "meseta" en su curva al fósforo en el nivel 250, siendo superadas en ese punto por las plantas control, que alcanzan aquí su desarrollo máximo. En el nivel 375, sin embargo, mientras que la plantas control sufren una inhibición en su crecimiento, las micorrizadas aún responden a una mayor fertilización fosforada. La concentración de P obtenida para las plantas control no hacía sospechar, en principio, un problema de toxicidad como causa de su depresión en el crecimiento (en el tratamiento M 375 el contenido en P era aún mayor), por lo que los datos parecían apuntar, mas bien, hacia una interacción del P con otro nutriente esencial. De éste modo, al aumentar el nivel de fertilización, la raíz estaría encontrando algún tipo de dificultad en la asimilación de éste nutriente, que la formación de la micorriza, sin embargo, ayudaría a superar. Para comprobar ésto, se realizaron análisis de micronutrientes a nivel foliar, cuyos resultados se muestran en la Tabla 13.

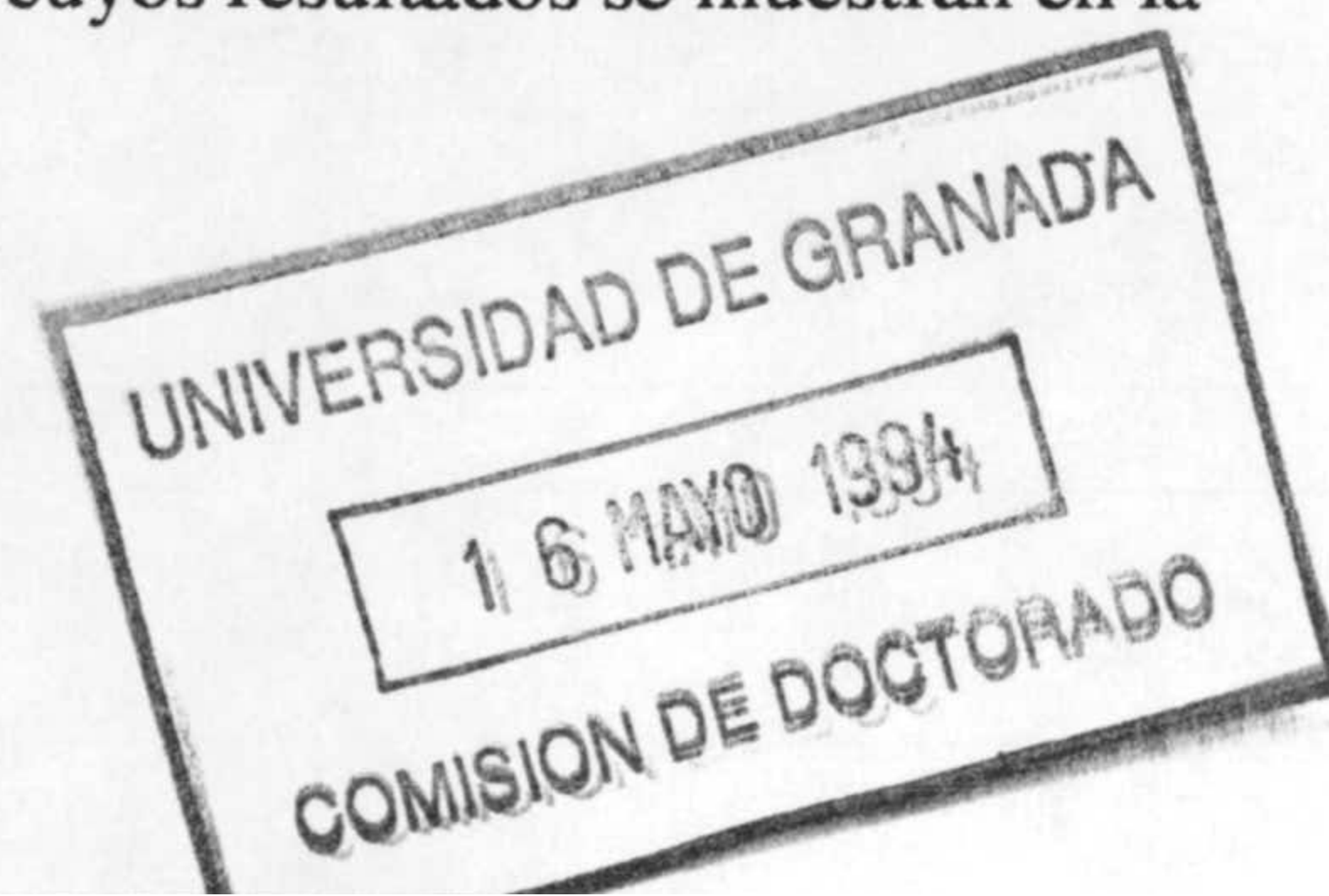


Tabla 12. Resultado de los análisis de macronutrientes obtenidos para plantas de girasol de 7 semanas cultivadas a diferentes niveles de fertilización fosforada.

Dosis de P (mg KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> /Kg suelo)	Fósforo															
	Hojas				Tallo				Flor				Raíz			
	Control		Micorriza		Control		Micorriza		Control		Micorriza		Control		Micorriza	
	Contenido (mg)	%	Contenido (mg)	%	Contenido (mg)	%	Contenido (mg)	%	Contenido (mg)	%	Contenido (mg)	%	Contenido (mg)	%	Contenido (mg)	%
0	1.86	0.186	4.88	0.305	0.57	0.057	2.20	0.116	1.12	0.338	3.74	0.512	0.95	0.132	2.22	0.209
125	3.37	0.198	6.36	0.303	1.45	0.066	3.86	0.133	2.92	0.348	4.37	0.553	1.48	0.118	3.04	0.196
250	8.24	0.317	7.56	0.360	4.62	0.105	3.51	0.121	5.34	0.494	5.54	0.518	2.11	0.125	1.97	0.156
375	7.33	0.333	9.48	0.395	2.59	0.081	4.56	0.144	4.80	0.485	7.21	0.577	2.30	0.160	2.56	0.156
	Nitrógeno															
	Hojas				Tallo				Flor				Raíz			
	Control		Micorriza		Control		Micorriza		Control		Micorriza		Control		Micorriza	
	Contenido (mg)	%	Contenido (mg)	%	Contenido (mg)	%	Contenido (mg)	%	Contenido (mg)	%	Contenido (mg)	%	Contenido (mg)	%	Contenido (mg)	%
0	57.8	5.78	87.4	5.46	19.1	1.91	24.9	1.31	9.3	2.83	21.2	2.90	19.4	2.70	24.8	2.34
125	91.6	5.39	105.6	5.03	23.8	1.08	78.6	2.71	29.7	3.54	22.4	2.83	20.6	1.65	30.1	1.94
250	100.4	3.86	113.4	5.40	37.4	0.85	40.3	1.39	23.7	2.19	30.4	2.84	28.7	1.70	22.8	1.81
375	83.8	3.81	81.8	3.41	39.4	1.23	44.8	1.12	27.2	2.75	38.3	3.06	34.1	2.37	27.1	1.65

Tabla 13. Resultado de los análisis de micronutrientes obtenidos para plantas de girasol de 7 semanas, cultivadas a diferentes niveles de fertilización fosforada

Dosis de P /Kg suelo)	Fe				Cu			
	Control		Micorriza		Control		Micorriza	
	( $\mu\text{g/g}$ )	( $\mu\text{g/planta}$ )	( $\mu\text{g/g}$ )	( $\mu\text{g/planta}$ )	( $\mu\text{g/g}$ )	( $\mu\text{g/planta}$ )	( $\mu\text{g/g}$ )	( $\mu\text{g/planta}$ )
0	111.0	111.0	112.0	179.2	20.9	20.9	28.4	45.4
125	110.0	187.0	98.4	206.6	23.6	40.1	20.9	43.9
250	106.4	289.5	96.8	203.3	17.8	46.3	16.9	35.5
375	122.0	268.4	209.4	502.6	20.6	45.3	17.8	42.7
	Mn				Zn			
	Control		Micorriza		Control		Micorriza	
	( $\mu\text{g/g}$ )	( $\mu\text{g/planta}$ )	( $\mu\text{g/g}$ )	( $\mu\text{g/planta}$ )	( $\mu\text{g/g}$ )	( $\mu\text{g/planta}$ )	( $\mu\text{g/g}$ )	( $\mu\text{g/planta}$ )
0	231.0	231.0	180.0	288.0	82.9	82.9	83.8	134.1
125	217.0	368.9	159.0	333.9	46.4	78.9	41.8	87.8
250	156.0	405.6	176.0	369.6	37.6	97.8	45.1	94.7
375	186.0	409.2	192.0	460.8	34.1	75.0	44.2	106.1

En general, no parecen existir diferencias entre el contenido en Cu y Mn de plantas micorrizadas o no, aunque sí en el de Fe y Zn. Así, para altos niveles de fertilización (375), el contenido en Fe de las plantas micorrizadas es muy superior (+70%, aproximadamente) al obtenido para las plantas control. Con respecto al Zn, su contenido en ambos tratamientos sufre una brusca reducción tras la adición de P al sustrato, lo que está de acuerdo con lo descrito en la bibliografía (Cakmak y Marschner, 1986). Conforme la fertilización se hace mayor, parece observarse una progresiva reducción en el contenido en Zn en las plantas control, mientras que las micorrizadas mantienen un nivel ligeramente superior de este micronutriente. El incremento en el desarrollo a altos niveles de P del girasol micorrizado podría estar mediado, por lo tanto, por un efecto de la micorriza sobre estos dos micronutrientes.

### 1.2- Estudio de la morfología radical del girasol y de la cebolla.

Los resultados obtenidos para los diferentes parámetros analizados en los estudios morfológicos de micorrizas y raíces de girasol, se muestran en la Tabla 14.

Las plantas que se cultivaron en presencia del hongo arbuscular alcanzaron, tras 4 semanas, una media de colonización radical del 48.5%.

Tabla 14. Resultados obtenidos para los diferentes parámetros analizados en los estudios sobre la morfología de la micorriza y raíz de plantas de girasol de 4 semanas.						
	Altura P.A. (cm)	Peso húmedo P.A. (g)	Peso húmedo raíz 1ª (g)	Peso húmedo raíces 2ª (g)	Longitud raíz 1ª (cm)	Longitud raíces 2ª (cm)
Control	10.40 ± 1.40	2.70 ± 0.50	0.33 ± 0.07	2.50 ± 0.50	27.20 ± 3.20	871.10 ± 312.30
Micorriza	12.30 ± 1.70	4.00 ± 0.70	0.40 ± 0.08	4.19 ± 0.90	31.20 ± 4.40	1716.00 ± 559.60
		Longitud 2ª / 1ª	L.R.E. (raíz 1ª)	L.R.E. (raíces 2ª)	L.R.E. (total)	
Control		32.80 ± 12.70	84.20 ± 10.20	337.4 ± 76.60	308.70 ± 69.40	
Micorriza		54.40 ± 12.50	80.80 ± 13.50	402.70 ± 59.30	374.50 ± 54.00	

Los resultados se expresan como la media de los datos obtenidos ± el intervalo de confianza de la misma (n=7; p<0.05).

Como se puede observar, sólo se aprecian diferencias significativas a nivel de los pesos frescos de parte aérea y raíces secundarias. En cuanto a la raíz primaria, ésta presenta, así mismo, un ligero incremento en su peso tras la micorrización, pero que no es, en ningún caso, tan importante como en las raíces secundarias.

Con respecto a la longitud de la raíz, la alta variabilidad de las muestras impiden, en el caso de las secundarias, que las diferencias entre raíces y micorrizas sean significativas, pese a presentar las segundas casi el doble de la longitud de las primeras. En el caso de la raíz primaria, tanto la variabilidad como las diferencias entre tratamientos son mucho menores.

Estos datos de pesos frescos y longitud de raíz, combinados mediante el cálculo del L.R.E. (Hetrick, 1991), dan lugar a unos interesantes resultados: mientras que el L.R.E. de las raíces secundarias de girasol se ve incrementado por su transformación en micorrizas, en el caso de la raíz primaria, ocurre justamente lo contrario. A pesar de que los datos no superen el test estadístico aplicado para que se consideren significativamente diferentes, resulta curioso constatar cómo estos resultados coinciden con los referidos por otros autores que detectan, ante el establecimiento de la simbiosis, un incremento (mayor longitud) en el número de raíces secundarias de carácter casi adventicio (menor grosor) (Berta, 1990; Hetrick, 1991), mientras que las raíces primarias, o canalizadoras de los nutrientes captados, se harían más gruesas para facilitar así el transporte del ahora incrementado flujo de nutrientes (Hetrick, 1991).

Los resultados obtenidos en estos ensayos en plantas de cebolla de 5 semanas se muestran en la Tabla 15. El porcentaje medio de colonización radical alcanzado por las micorrizas tras este tiempo de cultivo fue del 35.9%.

Tabla 15. Resultados obtenidos para los diferentes parámetros analizados en los estudios sobre la morfología de la micorriza y raíz de plantas de cebolla de 5 semanas.					
	Altura P.A. (cm)	Peso húmedo P.A. (mg)	Peso húmedo raíz (mg)	Longitud raíz (cm)	L.R.E.
Control	15.5 ± 1.7	140.0 ± 20.0	120.0 ± 10.0	53.3 ± 9.2	435.7 ± 74.8
Micorriza	14.1 ± 2.3	110.0 ± 30.0	100.0 ± 20.0	46.3 ± 14.7	467.8 ± 106.9

Los resultados se expresan como la media de los datos obtenidos ± el intervalo de confianza de la misma (n=7; p<0.05).

Como puede observarse, tanto los datos de altura, como los de los pesos húmedos de parte aérea y raíz de las plantas micorrizadas, son inferiores a los de las que no lo están, lo que parece apuntar que estas plantas se encontrarían inmersas en una depresión del crecimiento que, en algunos casos (Koide, 1985a), se describen como previas a la influencia positiva de la micorrización. La limitación del tiempo de cultivo a 5 semanas, en un intento de que las posibles diferencias entre tratamientos no pudieran deberse a efectos nutricionales, sino, exclusivamente, a la presencia del hongo, puede ser el responsable de estos resultados. A la vista de ellos, hubiera resultado mas aconsejable que las plantas permanecieran mas tiempos en cultivo, hasta que se hubiera superado esta depresión transitoria.

No obstante, resulta curioso constatar cómo, pese a la desventaja de la micorriza en el resto de los parámetros, en el caso de la razón L.R.E. es este tratamiento el que va por delante, presagiando, tal vez la aparición de diferencias en estadios de mayor madurez de la planta. Como se irá viendo en los siguientes resultados, los 40 días de cultivo parecen resultar clave en la micorrización de la cebolla: muchos de sus parámetros físicos y bioquímicos parecen presentar un punto de inflexión alrededor de este tiempo.



## 2.- Estudios sobre el metabolismo protónico y las membranas de las MA.

### 2.1- Medida de la extrusión de $H^+$ en raíces enteras.

Los resultados mas representativos obtenidos mediante la medida de la extrusión de  $H^+$  de raíces enteras de girasol y cebolla se muestran en las Figuras 10 y 11.

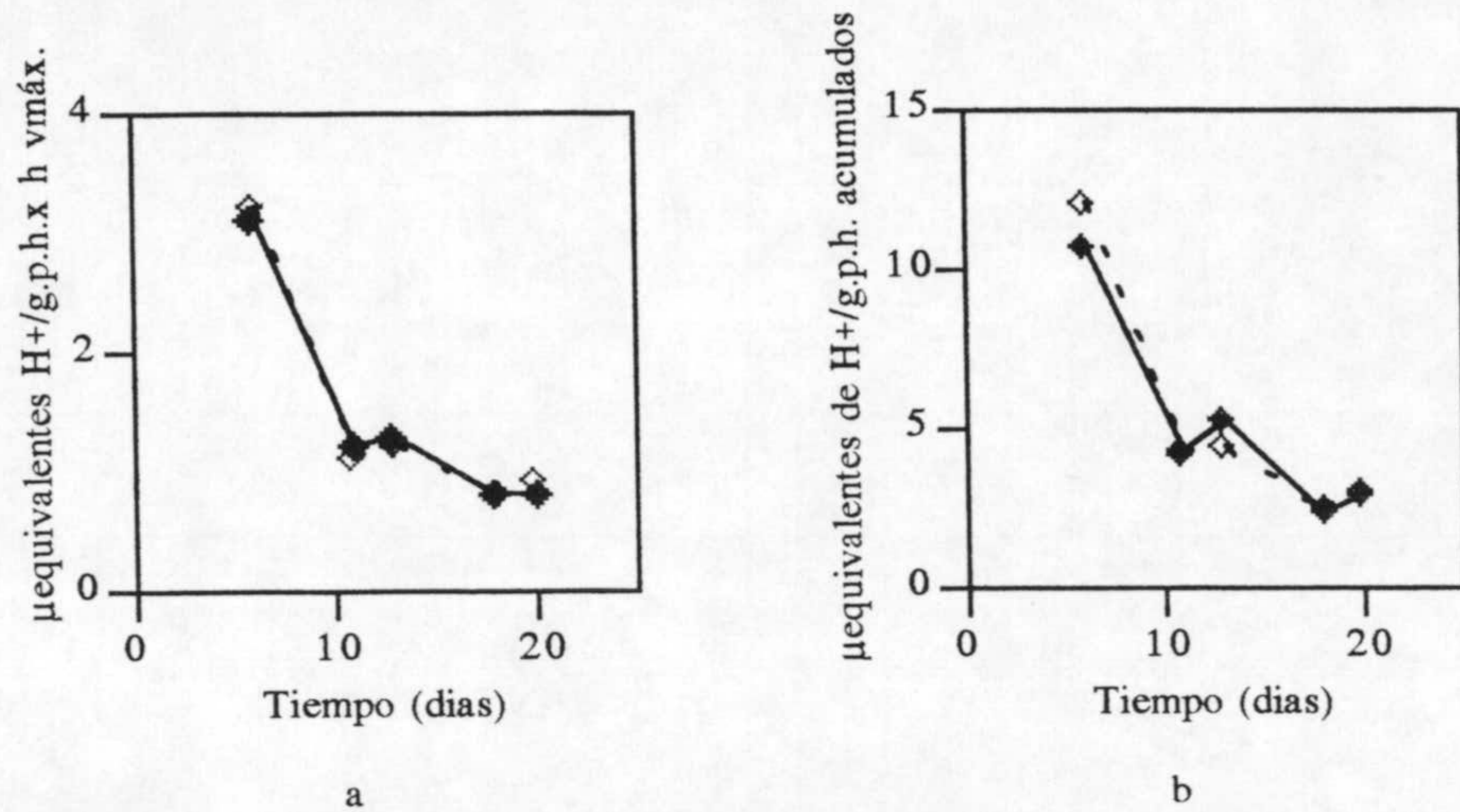


Figura 10. Extrusión de protones durante 1h de velocidad máxima (a) o 9h de extrusión total (b) obtenida a lo largo del tiempo de raíces (símbolos huecos, líneas de puntos) o micorrizas (símbolos reellenos, líneas continuas) de girasol. Cada uno de los puntos representados es la media de dos lecturas.

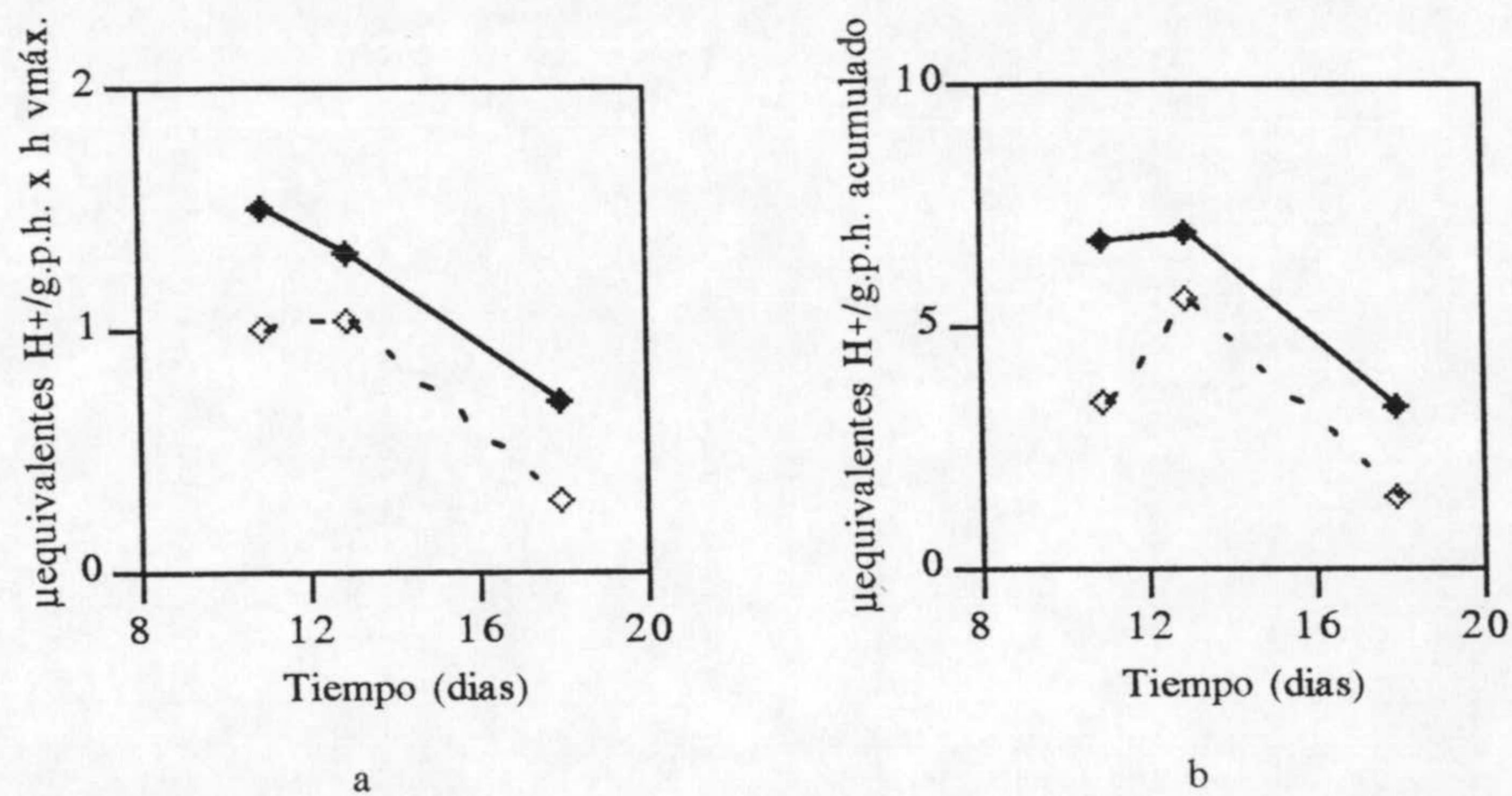


Figura 11. Extrusión de protones durante 1h de velocidad máxima (a) o 9h de extrusión total (b) obtenida a lo largo del tiempo en raíces (símbolos huecos, línea de puntos) o micorrizas (símbolos reellenos, línea continua) de cebolla. Cada uno de los puntos representados es la media de dos lecturas.

Lo primero que se puede observar son las diferencias existentes a nivel del patrón extractor de ambas plantas. Así, en el caso del girasol, se parte de unos niveles de extrusión

elevados, que, sin embargo, van decreciendo rápidamente a lo largo del tiempo. Con respecto a la cebolla, los niveles extractores máximos son menores, aunque también lo es el descenso en actividad a lo largo del ensayo.

Entre tratamientos, como se puede apreciar, no existen diferencias en el caso del girasol, cuyos resultados fueron muy similares en todas las repeticiones que se llevaron a cabo de estos ensayos. Con respecto a la cebolla, sin embargo, la variabilidad entre las distintas lecturas era muy elevada, por lo que las aparentes diferencias reflejadas en las gráficas, no son, en absoluto, significativas.

Probablemente, la obtención de estos resultados negativos sea una combinación de la escasa idoneidad, para nuestro material, en concreto, del método de medida empleado, y, posiblemente también, una ausencia de aparición de diferencias entre raíces y micorrizas en estadios tan tempranos de la colonización. De ser así, ésto último podría corroborarse con los resultados que se obtuvieran en la medida de la actividad ATPásica *in vitro* de raíces y micorrizas, metodología mucho más fina, y cuyos resultados se exponen en el siguiente apartado.

## 2.2- Medida *in vitro* de la actividad H<sup>+</sup>-ATPásica asociada a membranas en MA.

Previamente a la realización de estos estudios, se llevaron a cabo numerosas pruebas en las que se fijaron las condiciones óptimas de trabajo. A partir de ellas, se realizaron dos experimentos a lo largo del tiempo. Al primero de ellos lo denominaremos "ensayo a corto plazo" (7 a 30 días), que se compatibilizó con los estudios realizados sobre la extrusión protónica de raíces enteras, de modo que el material vegetal, en ambos casos, tenía una misma procedencia. El segundo de los experimentos será el que denominaremos "ensayo a largo plazo" (9 a 63 días), que se realizó como consecuencia de que los resultados obtenidos parecían aconsejar una prolongación del tiempo en principio fijado para el estudio.

### 2.2a.- Estudios sobre girasol:

En las Figuras 12 y 13 se representa la evolución de los pesos húmedos de parte aérea (a) y raíz (b), así como el desarrollo de la colonización (c) en las plantas de girasol utilizadas en estos ensayos.

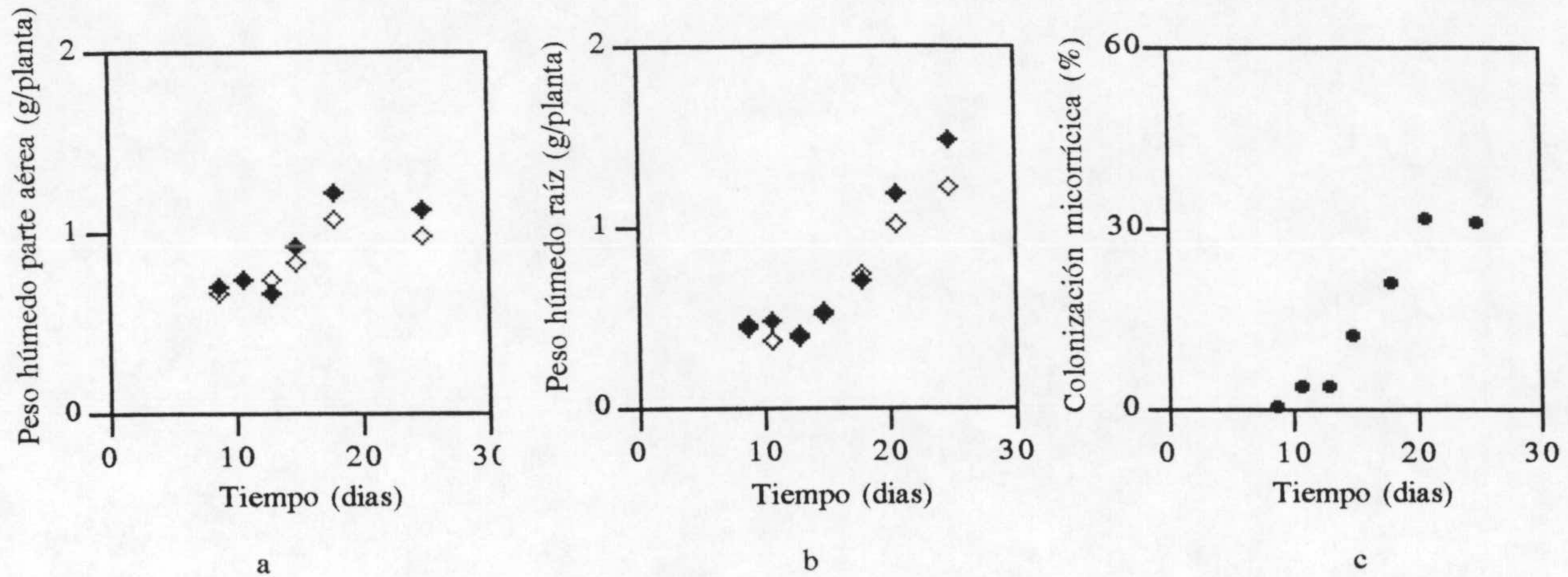


Figura 12. Evolución, a lo largo del tiempo, de los pesos húmedos de la parte aérea (a) y raíz (b), así como del desarrollo de la colonización micorrízica (c) de las plantas de girasol, micorrizadas (símbolos rellenos) o no (símbolos huecos), que fueron empleadas en el estudio, a corto plazo, de la actividad  $H^+$ -ATPásica asociada a microsomas de raíces o micorrizas.

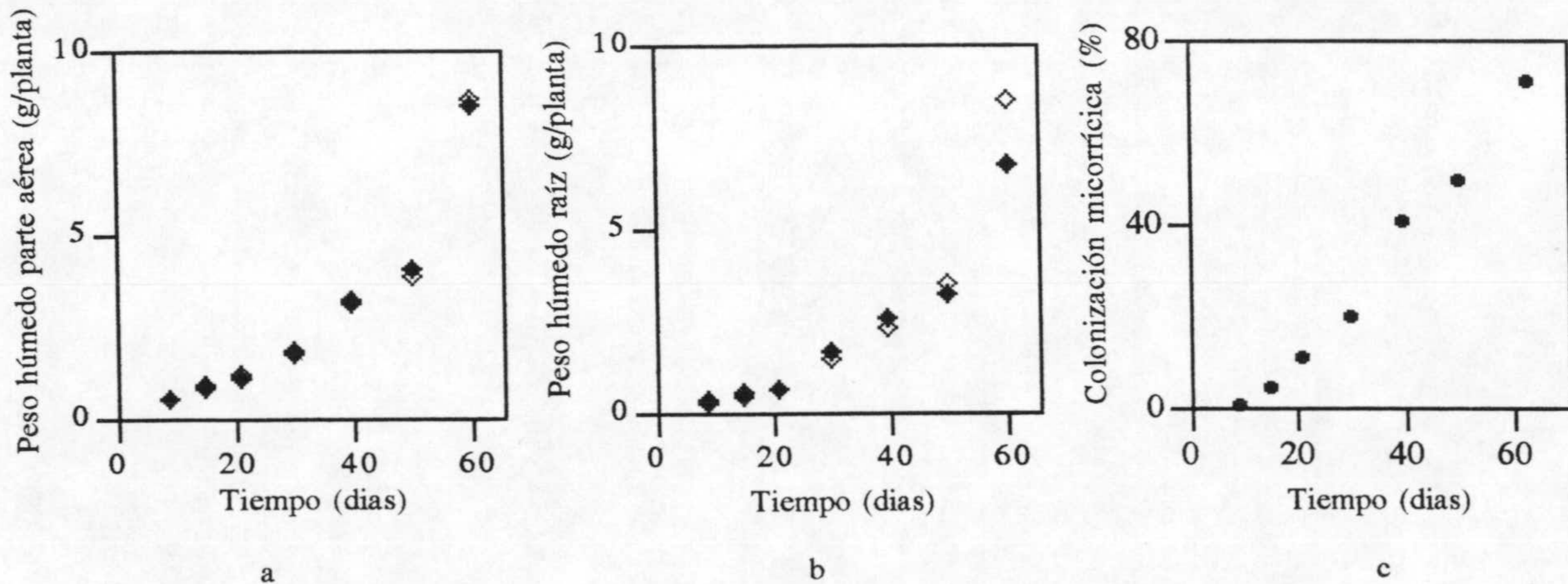


Figura 13. Evolución, a lo largo del tiempo, de los pesos húmedos de la parte aérea (a) y raíz (b), así como del desarrollo de la colonización micorrízica (c) de las plantas de girasol, micorrizadas (símbolos rellenos) o no (símbolos huecos), que fueron empleadas en el estudio, a largo plazo, de la actividad  $H^+$ -ATPásica asociada a microsomas de raíces o micorrizas.

Como puede observarse, la igualdad de pesos de la parte aérea es la tendencia general a lo largo del tiempo, mientras que para la raíz se obtiene a largo plazo, una disminución en el peso de las que se encuentran colonizadas por el hongo arbuscular. Estos resultados, en principio, parecerían estar en contradicción con los obtenidos en las determinaciones preliminares, en los que, y para nivel 0 de P, las plantas micorrizadas presentaban, tras ocho semanas de cultivo, un porte muy superior al de las plantas control. Sin embargo, esto podría ser una consecuencia de la gran densidad de siembra requerida para obtener el peso mínimo de raíces que exigen estas determinaciones, lo que provocaría cierta inhibición en el desarrollo natural de las plantas.

La colonización micorrícica evoluciona satisfactoriamente a lo largo del tiempo en ambos casos, llegándose a alcanzar un porcentaje del 71% de raíz colonizada a los 63 días del inicio del ensayo. El tipo de colonización a lo largo de ambos ensayos, es fundamentalmente arbuscular, con un desarrollo característico en "baterías de arbusculos" (Figura 14), que alrededor de los 50 días empieza a compatibilizarse con la aparición de un porcentaje importante de vesículas. Las raíces de las plantas no inoculadas no presentaron, obviamente, colonización micorrícica.

Las proteínas de membrana presentes en los extractos de microsomas de girasol se muestran en las Tablas 16 y 17, y en la Figura 15.

Tabla 16. Proteínas de membrana (mg/g.p.h.) obtenidas en los microsomas de micorrizas o raíces de girasol , a lo largo del tiempo.		
Tiempo (días)	Control	Micorriza
9	0.33 ± 0.005	0.33 ± 0.004
11	0.33 ± 0.010	0.26 ± 0.003
13	- -	0.28 ± 0.008
15	0.19 ± 0.001	0.23 ± 0.005
18	0.31 ± 0.010	0.25 ± 0.020
21	0.21 ± 0.003	0.25 ± 0.004

Los resultados se expresan como la media de los datos obtenidos ± el error estándar de la misma.

Tabla 17. Proteínas de membrana (mg/g.p.h.) obtenidas en los microsomas de micorrizas o raíces de girasol a lo largo del tiempo.		
Tiempo (días)	Control	Micorriza
9	0.38 ± 0.020	0.33 ± 0.020
15	0.25 ± 0.005	0.23 ± 0.004
21	0.23 ± 0.010	0.22 ± 0.010
30	0.21 ± 0.010	0.21 ± 0.010
40	0.23 ± 0.008	0.24 ± 0.002
50	0.23 ± 0.007	0.23 ± 0.020
63	0.14 ± 0.010	0.15 ± 0.008

Los resultados se expresan como la media de los datos obtenidos ± el error estándar de la misma.

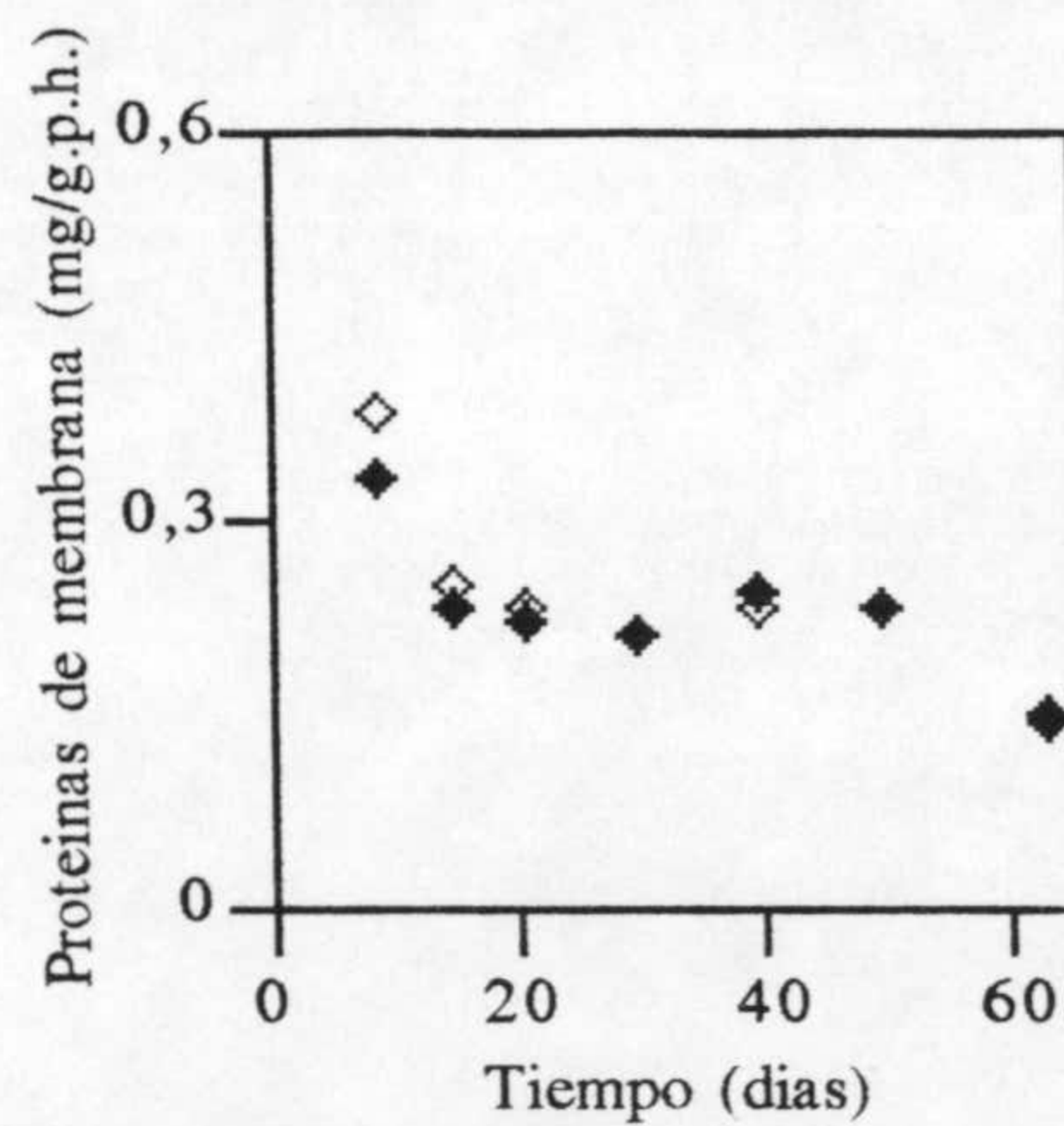


Figura 15. Evolución, a lo largo del tiempo, de número de proteína de membrana obtenidas a partir de los microsomas de micorrizas (símbolos rellenos) o raíces (símbolos huecos) de girasol empleados para la cuantificación de actividad H<sup>+</sup>-ATPásica.

Su número descende con el paso del tiempo, lo que podría ser el reflejo de un efecto de "dilución" de estas proteínas, ocasionado por el rapidísimo crecimiento vegetal (Fig. 13 a y b).

La caída final en su número (63 días) coincide con el inicio de la etapa de floración, con la consiguiente degeneración tisular, en general, y de la raíz, en particular, ya que la planta centra todo su interés en favorecer fundamentalmente al órgano reproductor. Entre tratamientos no parecen existir diferencias apreciables en la cantidad de proteínas a lo largo del tiempo.

El enzima  $H^+$ -ATPasa de plasmalema en esta variedad de girasol, se había caracterizado en un trabajo de investigación previo (Roldán, 1988). Sus condiciones óptimas de funcionamiento se aplicaron, por tanto, directamente, en estos ensayos.

En las Tablas 18 y 19 (págs. siguientes), y en las Figuras 16 y 17 se pueden observar los resultados obtenidos en actividad ATPásica ligada a plasmalema, referidos a miligramos de proteína (actividad específica), gramos de peso húmedo (actividad fisiológica) y sistema radical completo (actividad total) a lo largo del tiempo, así como el porcentaje de actividad ATPásica ligada a plasmalema (sensible a vanadato) obtenido en los extractos de membrana a pH= 6.5.

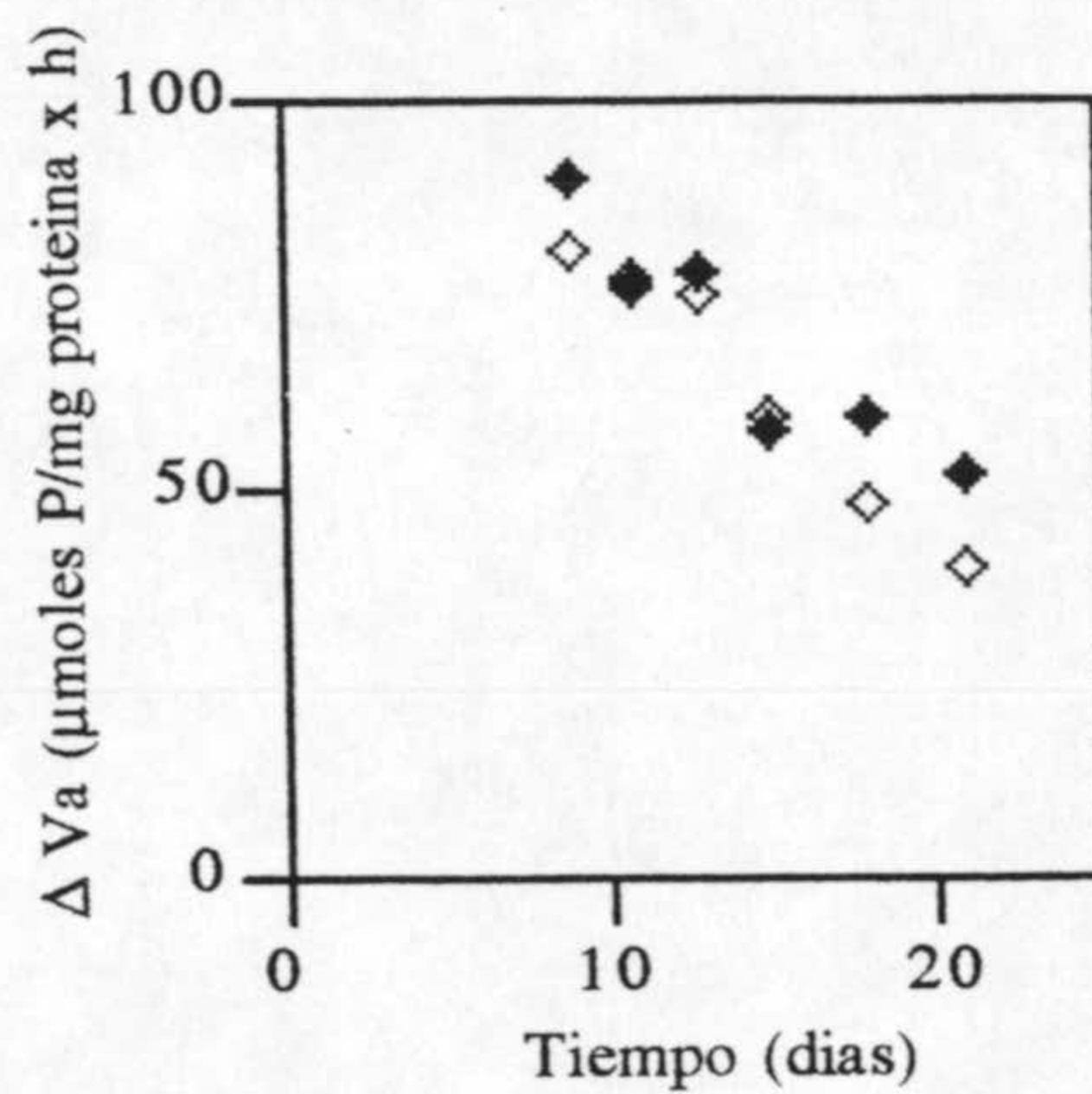


Figura 16. Actividad ATPásica sensible a vanadato obtenida, a lo largo del tiempo, en microsomos de micorrizas (símbolos rellenos) y raíces (símbolos huecos) de girasol (ensayo a corto plazo).

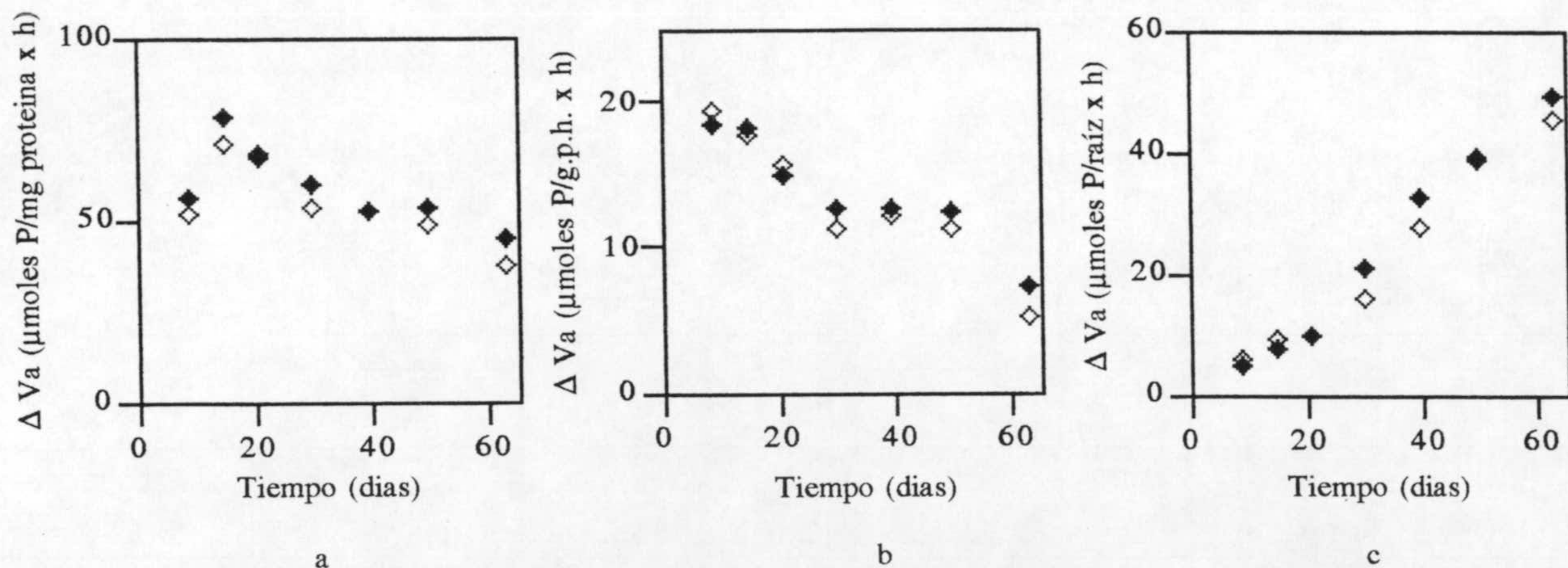


Figura 17. Actividad ATPásica sensible a vanadato, expresada por mg proteína (a), por g.p.h. (b) y por raíz entera (c), obtenida, a lo largo del tiempo, en microsomos de micorrizas (símbolos rellenos) o raíces (símbolos huecos) de girasol (ensayo a largo plazo).

Como puede observarse, entre el 75 y el 80% de la actividad ATPásica de los extractos, medida a pH 6.5 (% Plasmalema), corresponde a  $H^+$ -ATPasas sensibles a vanadato, es decir, asociadas a la membrana citoplasmática, lo que se encuentra dentro de los valores medios

Tabla 18. Actividad ATPásica asociada a plasmalema obtenido a partir de micorrizas o raíces de girasol a lo largo del tiempo (pH = 6.5).

Tiempo (días)	μmoles P/mg proteína x h		μmoles P/g.p.h. x h		μmoles P/raíz completa x h		% Plasmalema	
	Control	Micorriza	Control	Micorriza	Control	Micorriza	Control	Micorriza
9	79.85 ± 1.630	89.33 ± 3.990	26.35 ± 0.540	29.48 ± 1.320	11.53 ± 0.240	13.36 ± 0.600	78.6	77.3
11	76.22 ± 0.440	75.65 ± 2.270	25.15 ± 0.150	19.66 ± 0.590	9.09 ± 0.050	9.24 ± 0.280	84.7	82.6
13	74.34 ± 0.850	77.44 ± 2.540	-	-	-	-	85.3	84.4
15	58.47 ± 0.010	55.52 ± 2.680	11.12 ± 0.002	13.18 ± 0.620	5.88 ± 0.001	6.82 ± 0.320	85.3	85.5
18	47.55 ± 0.830	58.93 ± 1.010	14.74 ± 0.008	14.73 ± 0.250	10.80 ± 0.006	10.34 ± 0.180	85.5	87.1
21	39.78 ± 0.160	51.19 ± 0.350	8.35 ± 0.030	12.80 ± 0.090	8.40 ± 0.030	15.14 ± 0.110	82.7	84.0

Los resultados se expresan como la media de los datos obtenidos ± el error estándar de la misma.

Tabla 19. Actividad ATPásica sensible a vanadato, obtenida en microsomas de micorrizas o raíces de girasol a lo largo del tiempo (pH = 6.5).

Tiempo (días)	μmoles P/mg proteína x h		μmoles P/g.p.h. x h		μmoles P/raíz completa x h		% Plasmalema	
	Control	Micorriza	Control	Micorriza	Control	Micorriza	Control	Micorriza
9	51.10 ± 0.063	55.87 ± 0.650	19.42 ± 0.240	18.44 ± 0.220	6.15 ± 0.080	5.00 ± 0.060	73.5	74.1
15	70.61 ± 3.660	78.70 ± 2.350	17.65 ± 0.920	18.10 ± 0.540	8.96 ± 0.470	7.58 ± 0.230	77.9	80.4
21	68.07 ± 0.820	67.59 ± 2.000	15.66 ± 0.190	14.87 ± 0.440	9.57 ± 0.120	9.68 ± 0.290	76.6	77.4
30	<b>53.41</b> ± 0.640	<b>59.92</b> ± 1.390	11.22 ± 0.130	12.58 ± 0.290	16.21 ± 0.190	20.85 ± 0.480	73.3	77.1
40	52.62 ± 1.710	52.68 ± 1.620	12.10 ± 0.390	12.64 ± 0.390	27.83 ± 0.900	32.60 ± 1.010	72.2	72.0
50	<b>48.69</b> ± 2.340	<b>53.29</b> ± 1.400	11.20 ± 0.540	12.26 ± 0.320	38.73 ± 1.870	39.36 ± 1.030	75.3	78.8
63	<b>37.99</b> ± 3.550	<b>45.35</b> ± 2.950	5.32 ± 0.500	7.26 ± 0.470	45.24 ± 4.250	48.95 ± 3.170	82.8	87.8

Los resultados se expresan como la media de los datos obtenidos ± el error estándar de la misma.

obtenidos siguiendo este método (Roldán, 1988). En principio, no parecen existir diferencias reseñables para este parámetro entre las raíces y las micorrizas.

Los datos de actividad específica muestran (Figs. 16 y 17a) que ésta se halla ligera, pero persistentemente incrementada en favor de las micorrizas a lo largo de, prácticamente, todo el desarrollo de los ensayos. El incremento en esta actividad, unido a la igualdad en el número de proteínas de los extractos de ambos tratamientos a lo largo del tiempo (Fig. 15), parece indicar que, en principio, y en esta variedad de girasol, no es el número, sino la actividad de las ATPasas la que se ve incrementada por el proceso de micorrización.

Si estos datos se expresan como actividad fisiológica (Fig. 17b) y total de la raíz (Fig. 17c), de nuevo se obtiene un persistente incremento en la actividad  $H^+$ -ATPásica de plasmalema en las micorrizas con respecto a las raíces, a lo largo del tiempo, que únicamente puede ser atribuido a un aumento sostenido en su actividad específica. Estos resultados nos sugieren una micorriza hiperactivada frente a la raíz, especialmente tras los primeros 25 - 30 días de crecimiento, lo que coincide con el inicio de la fase exponencial de colonización micorrícica (Figs. 12c y 13c), en la que los arbusculos son mayoritarios, y, por lo tanto, la simbiosis es plenamente funcional.

Con respecto a la actividad ATPásica de tonoplasto y membrana mitocondrial, los resultados obtenidos para ellas, medidos a pH 8.5 se muestran en las tablas 20 a 23.

Lo primero que se debe reseñar sobre estos datos, es que el porcentaje de actividad obtenido con respecto a la actividad ATPásica total del extracto de membranas (% Tonoplasto y M. mitocondrial), es muy inferior al que se obtuvo para plasmalema. Esto puede atribuirse a que, según se observa en la curva de caracterización del pH óptimo en esta variedad de girasol (Roldán, 1988), a pH=8.5 aún permanecen activas una gran cantidad de ATPasas vanadato-sensibles, que no se inhiben por nitrato ni azida, y que, por tanto, podrían estar siendo contabilizadas, ocasionando un "ruido de fondo" muy acusado. Los resultados obtenidos para estas membranas deben ser tenidos en cuenta, por tanto, con cierta relatividad. Al mismo tiempo, la obtención de estos porcentajes se podría considerar como un indicador indirecto de la bondad del método utilizado, puesto que selecciona, principalmente,  $H^+$ -ATPasas de plasmalema, descartando el resto.

En cualquier caso, los resultados obtenidos con respecto al tonoplasto (Tablas 20 y 21) no presentan una tendencia clara. La actividad parece decrecer con el tiempo, para caer finalmente de manera muy acusada, coincidiendo con la etapa de floración. Entre tratamientos no existen diferencias cuya tendencia se mantenga lo suficiente como para resultar significativa, y la relatividad de los datos, expuesta ántes, hace que se deban tomar estos resultados con mucha precaución.



Tabla 20. Actividad ATPásica sensible a nitrato obtenido a partir de microsomas de micorrizas o raíces de girasol a lo largo del tiempo (pH = 8.5).

Tiempo (días)	μmoles P/mg proteína x h		% Tonoplasto	
	Control	Micorriza	Control	Micorriza
9	9.86 ± 1.280	12.78 ± 0.360	18.0	21.2
11	8.73 ± 0.440	9.72 ± 0.600	14.2	16.0
13	7.86 ± 0.920	8.31 ± 0.260	13.6	13.7
15	9.61 ± 0.250	10.53 ± 2.090	19.6	20.5
18	8.25 ± 0.590	9.12 ± 0.060	20.5	15.1
21	7.19 ± 0.400	8.74 ± 0.460	22.4	17.5

Los resultados se expresan como la media de los datos obtenidos ± el error estándar de la misma.

Tabla 21. Actividad ATPásica sensible a nitrato, obtenido a partir de microsomas de micorrizas o raíces de girasol, a lo largo del tiempo (pH = 8.5).

Tiempo (días)	μmoles P/mg proteína x h		% Tonoplasto	
	Control	Micorriza	Control	Micorriza
9	15.06 ± 0.780	14.50 ± 1.010	26.8	24.7
15	14.37 ± 0.830	15.35 ± 0.930	18.9	18.2
21	10.91 ± 1.200	13.34 ± 1.500	14.2	17.5
30	10.83 ± 0.380	8.86 ± 1.060	16.7	13.0
40	13.10 ± 0.270	15.15 ± 0.720	20.9	22.6
50	13.55 ± 3.040	11.94 ± 2.200	23.7	19.7
63	3.50 ± 1.110	5.73 ± 1.230	8.7	12.0

Los resultados se expresan como la media de los datos obtenidos ± el error estándar de a misma.

Tabla 22. Actividad ATPásica sensible a azida obtenida en microsomas de micorrizas o raíces de girasol a lo largo del tiempo (pH = 8.5).

Tiempo (días)	μmoles P/mg proteína x h		% M. mitocondrial	
	Control	Micorriza	Control	Micorriza
9	11.29 ± 1.430	15.85 ± 0.210	20.6	26.3
11	10.05 ± 0.060	12.19 ± 0.340	16.4	20.0
13	8.61 ± 0.580	9.87 ± 0.330	14.8	16.2
15	10.60 ± 0.440	10.48 ± 0.070	21.6	20.4
18	10.01 ± 0.320	10.65 ± 0.570	24.9	17.6
21	10.13 ± 0.110	12.18 ± 0.720	31.5	24.4

Los resultados se expresan como la media de los datos obtenidos ± el error estándar de la misma.

Tabla 23. Actividad ATPásica sensible a azida obtenida a partir de microsomas de micorrizas o raíces de girasol a lo largo del tiempo (pH = 8.5).

Tiempo (días)	μmoles P/mg proteína x h		% M. mitocondrial	
	Control	Micorriza	Control	Micorriza
9	20.54 ± 2.110	21.53 ± 2.240	36.6	36.6
15	20.19 ± 0.830	22.97 ± 1.420	26.5	27.3
21	19.30 ± 1.570	22.58 ± 1.540	25.1	29.7
30	19.85 ± 0.230	21.33 ± 0.330	30.7	31.3
40	22.57 ± 0.650	28.24 ± 0.520	36.1	42.1
50	20.00 ± 4.630	19.21 ± 5.850	35.0	31.2
63	5.45 ± 1.080	6.84 ± 0.180	13.6	14.3

Los resultados se expresan como la media de los datos obtenidos ± el error estándar de la misma.

Algo similar se puede decir en el caso de la membrana mitocondrial (Tablas 22 y 23), aunque, aquí parece existir cierta tendencia, por parte de las micorrizas, a mantener una actividad ligeramente superior con respecto a la de las raíces durante, prácticamente, todo el desarrollo de los ensayos. Los porcentajes de actividad de las ATPasas mitocondriales sobre la actividad total son algo superiores a los obtenidos para tonoplasto, aunque aún siguen siendo bajos, por lo que se deben mantener todas las reservas ante el análisis de estos resultados.

### 2.2b.- Estudios sobre cebolla:

En las Figuras 18 y 19 se representan los pesos húmedos de la parte aérea y raíz de plantas de cebolla, micorrizadas o no, a lo largo del tiempo, así como el porcentaje de

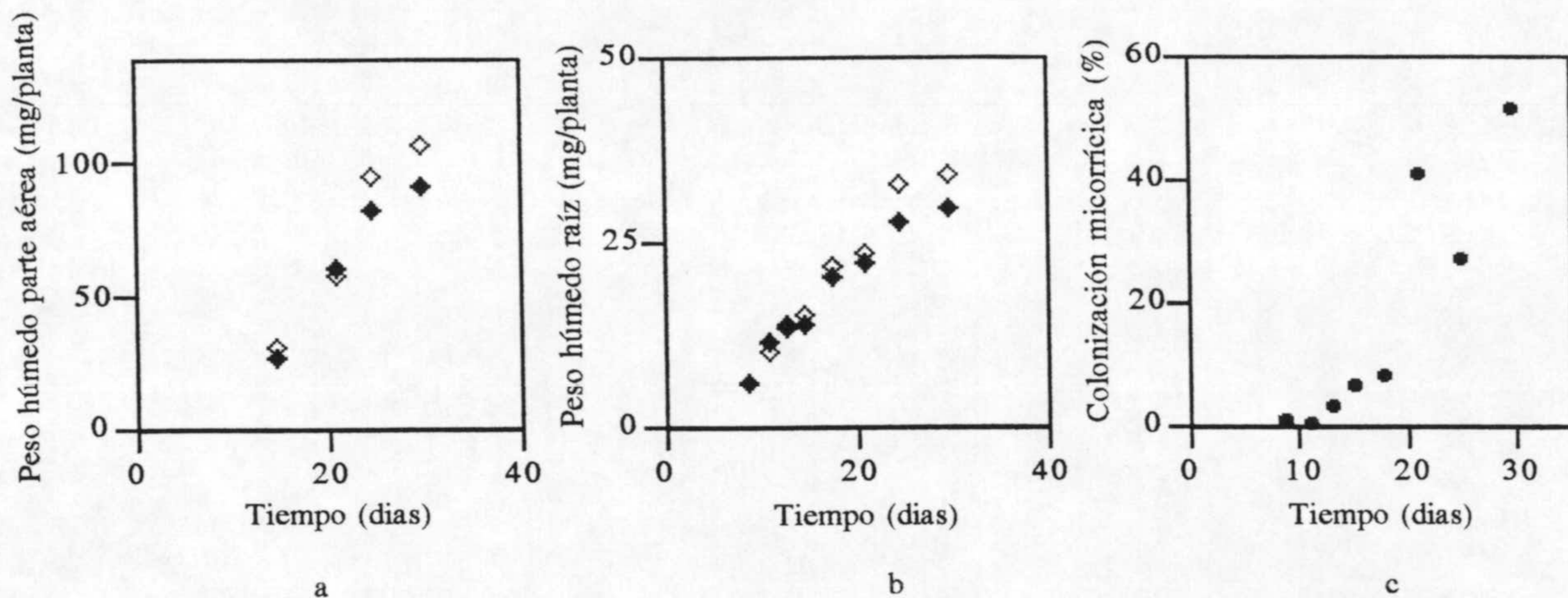


Figura 18. Evolución, a lo largo del tiempo, de los pesos húmedos de la parte aérea (a), raíz (b), así como del desarrollo de la colonización micorrízica (c) de las plantas de cebolla, micorrizadas (símbolos rellenos) o no (símbolos huecos), que fueron empleadas en el estudio, a corto plazo, de la actividad ATPásica asociada a microsomas de raíces o micorrizas.

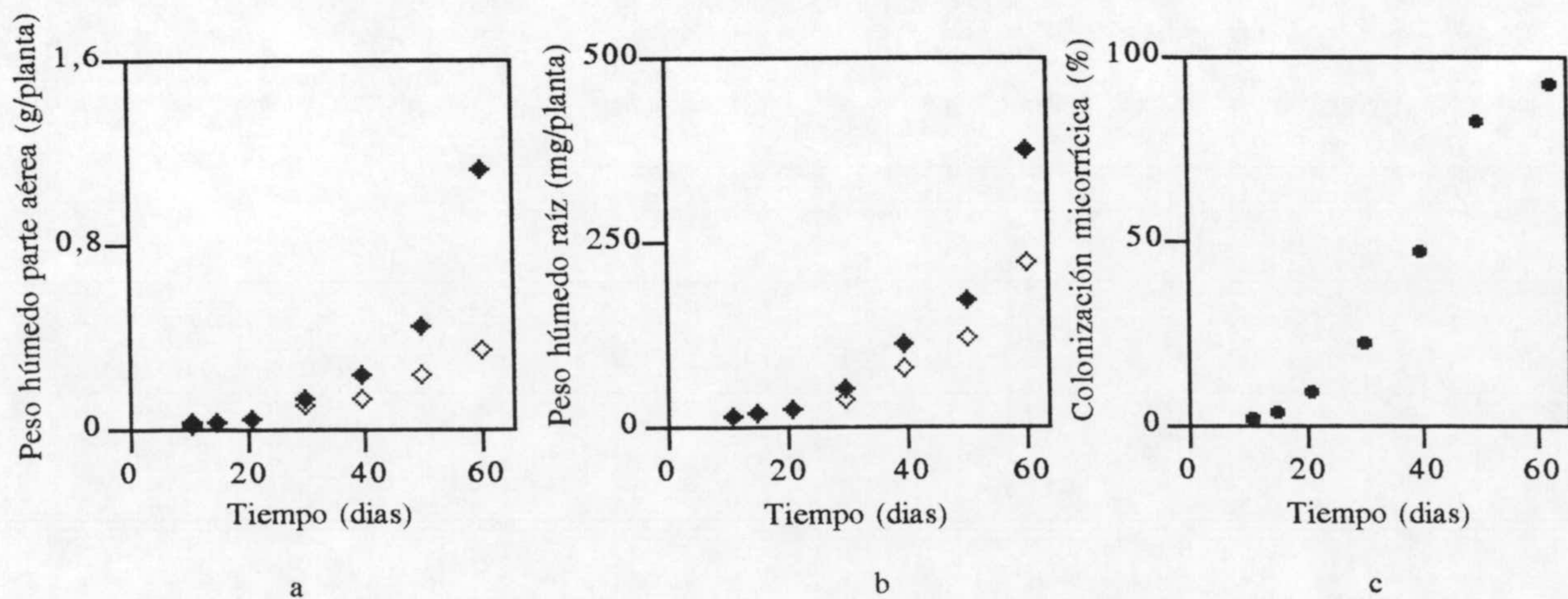


Figura 19. Evolución, a lo largo del tiempo, de los pesos húmedos de la parte aérea (a), raíz (b), así como del desarrollo de la colonización micorrízica (c) de las plantas de cebolla, micorrizadas (símbolos rellenos) o no (símbolos huecos), que fueron empleadas en el estudio, a largo plazo, de la actividad ATPásica asociada a microsomas de raíces o micorrizas.

colonización obtenido para las micorrizas.

Mientras que en el ensayo a corto plazo parece observarse una cierta inhibición sobre el crecimiento de las plantas micorrizadas con respecto a las que no lo están, el ensayo a largo plazo indica que ésta se trataría mas bien de una depresión transitoria, como las descritas en numerosas ocasiones durante las primeras fases de la colonización micorrícica. Tras estas primeras etapas, y, fundamentalmente, a partir de los 40 días del inicio del ensayo, se observa un despegue espectacular de las plantas micorrizadas con respecto a las que no lo están, especialmente con respecto a su parte aérea, cuyo peso casi se triplica.

El porcentaje de colonización radical por parte del hongo describe una curva sigmoideal típica (Fig. 19c), llegándose a alcanzar a los 63 días un porcentaje de ocupación radical superior al 90%. La colonización es de carácter principalmente arbuscular a partir de los 21 días del inicio del ensayo, mientras que el porcentaje de vesículas se hace relativamente importante alrededor de los 50 días. El tipo de colonización arbuscular es diferente del obtenido en el caso del girasol (Figura 14), ya que los arbúsculos se distribuyen de manera mas laxa a lo largo de la raíz, sin aparecer formando esas "baterías" ántes descritas.

Con respecto a la cantidad de proteínas de membrana obtenidas a lo largo del tiempo en ambos ensayos, los resultados se muestran en las Tablas 24 y 25, así como en la Figura 20.

Tabla 24. Proteínas de membrana (mg/g.p.h.) obtenidas en los microsomas de micorrizas o raíces de cebolla a lo largo del tiempo.		
Tiempo (días)	Control	Micorriza
9	0.65 ± 0.006	0.69 ± 0.008
11	0.68 ± 0.002	0.64 ± 0.005
13	0.31 ± 0.004	0.45 ± 0.005
15	0.45 ± 0.010	0.51 ± 0.020
18	0.31 ± 0.006	0.34 ± 0.002
21	0.36 ± 0.005	0.33 ± 0.003
25	0.28 ± 0.006	0.36 ± 0.003
30	0.28 ± 0.005	-

Los resultados se expresan como la media de los datos obtenidos ± el error estándar de la misma.

Tabla 25. Proteínas de membrana (mg/g.p.h.) obtenidas en los microsomas de micorrizas o raíces de cebolla a lo largo del tiempo.

Tiempo (días)	Control	Micorriza
11	0.55 ± 0.009	0.51 ± 0.008
15	-	-
21	0.38 ± 0.020	0.37 ± 0.030
30	0.32 ± 0.020	0.33 ± 0.010
40	0.29 ± 0.009	0.31 ± 0.004
50	0.24 ± 0.020	0.31 ± 0.020
63	0.22 ± 0.020	0.28 ± 0.025

Los resultados se expresan como la media de los datos obtenidos ± el error estándar de la misma.

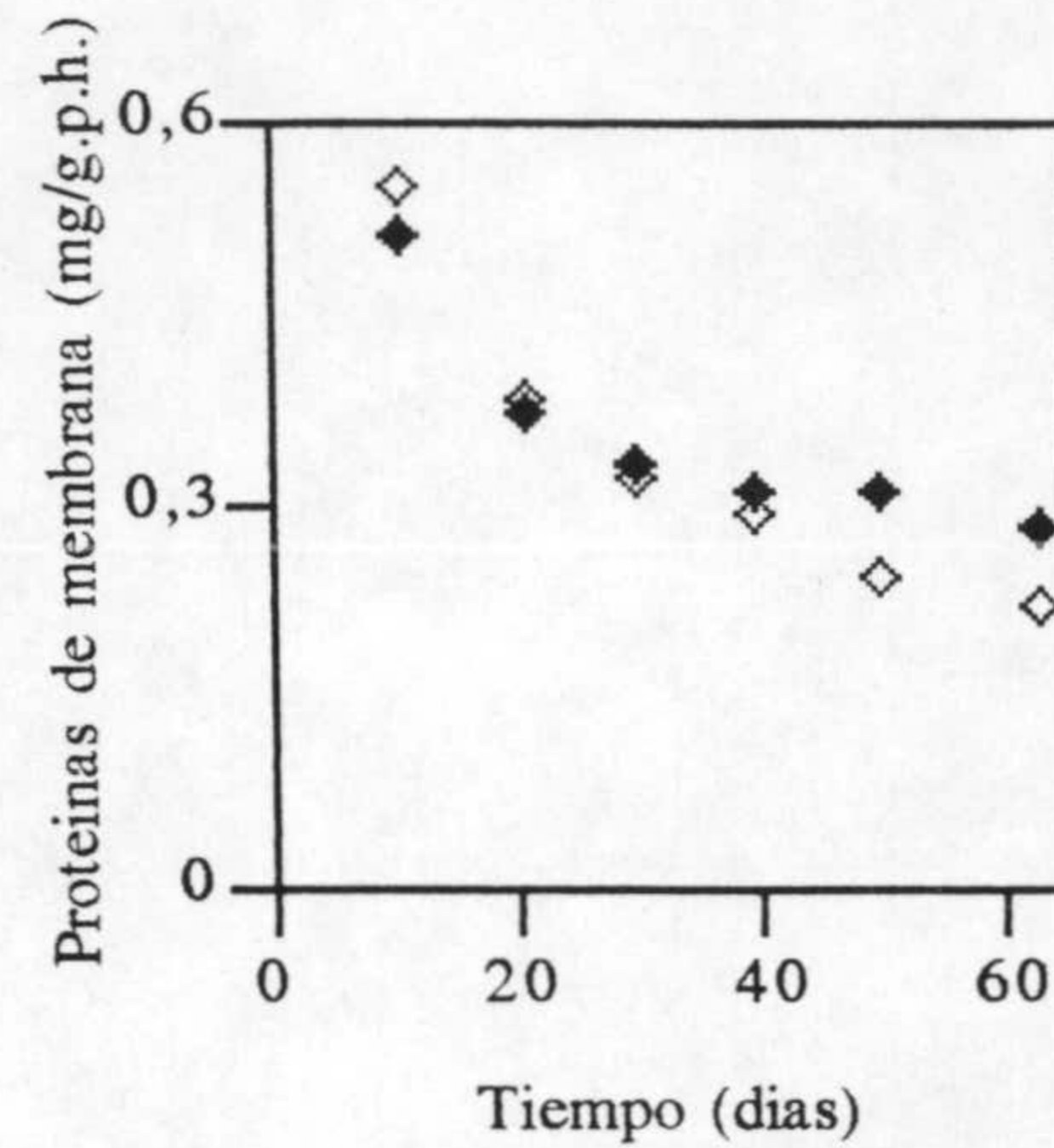


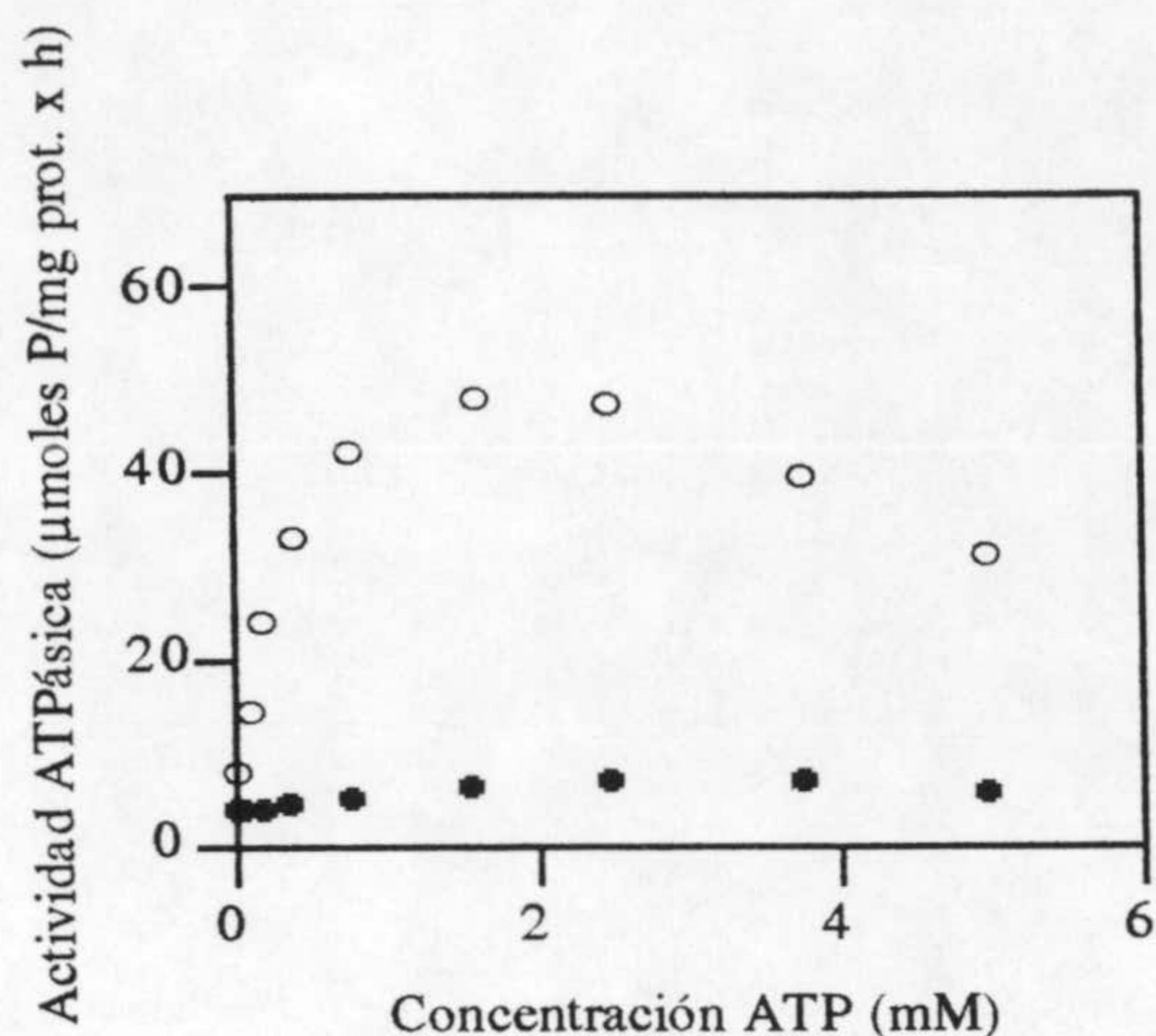
Figura 20. Evolución, a lo largo del tiempo, de número de proteínas de membranas obtenidas a partir de los microsomas de micorrizas (símbolos rellenos) o raíces (símbolos huecos) de cebolla, utilizados para la cuantificación de la actividad ATPásica.

La caída en el número de proteínas de membrana a lo largo del tiempo, se vuelve a hacer patente en el caso de la cebolla, que parte de un nivel inicial superior al del girasol. Esto parece confirmar ese supuesto "efecto de dilución" sugerido anteriormente. Al presentar esta planta un crecimiento mucho más lento que el girasol, no se alcanzó, en el tiempo del ensayo, su etapa de floración, y cabe pensar que su estadio fisiológico pudiera encontrarse retardado con respecto al del girasol a lo largo del tiempo.

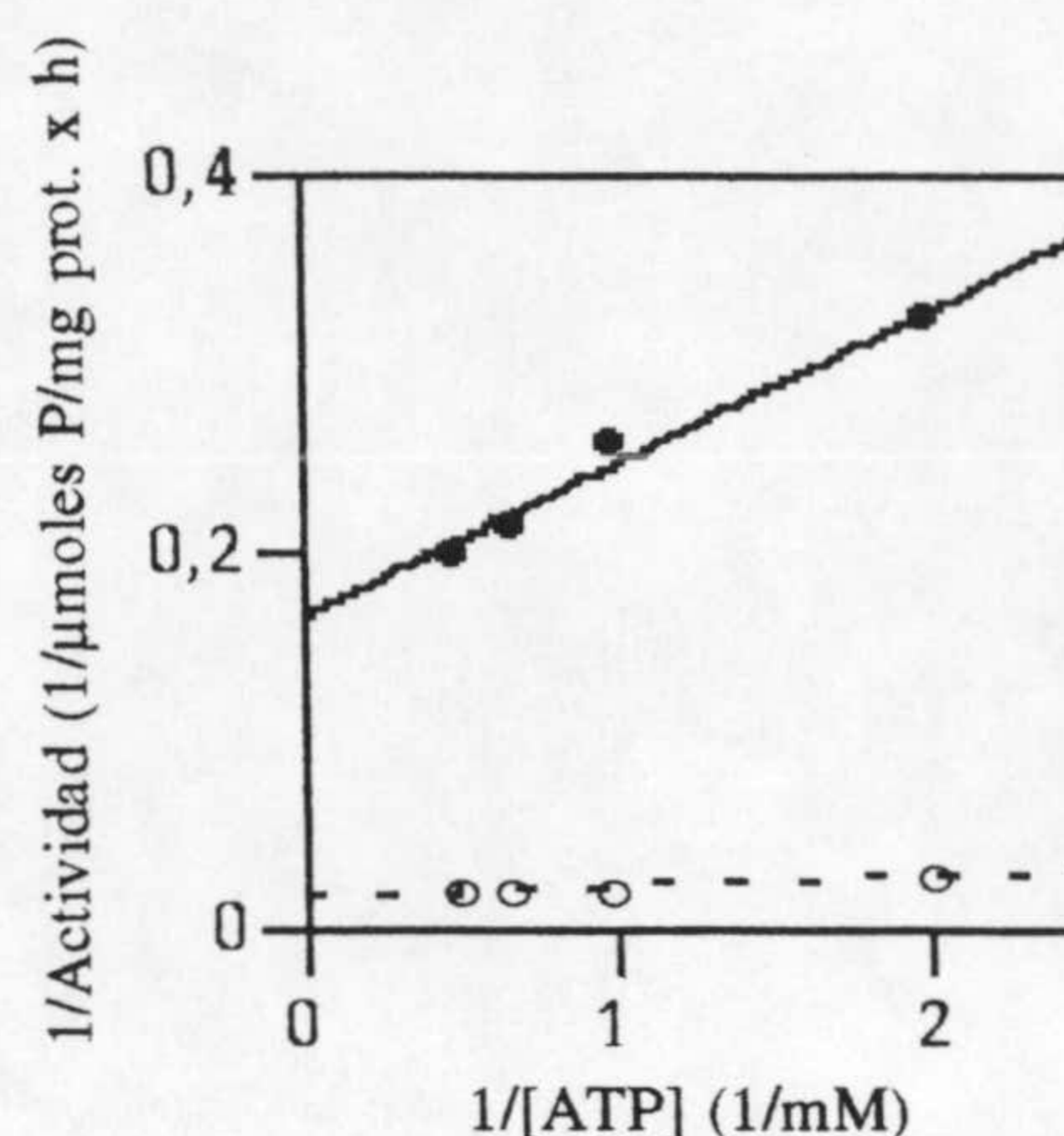
Entre tratamientos, las proteínas de membrana de las micorrizas comienzan a ser, a partir de los 25 a 40 días del inicio del ensayo, muy superiores en número con respecto a las de las raíces control, coincidiendo este hecho en el tiempo con la aparición de diferencias en el peso de las plantas en ambos tratamientos.

Para llevar a cabo las determinaciones enzimáticas en esta planta, se debió caracterizar previamente el enzima  $H^+$ -ATPasa de plasmalema de la variedad de cebolla utilizada. Los resultados de dicha caracterización se muestran en las Figuras 21 y 22.

El valor obtenido para la  $K_m$  de este enzima en ausencia de ortovanadato (Fig. 21 b y c) se encuentra dentro del rango descrito en la bibliografía consultada (Balke y Hodges, 1975; Bennett *et al.*, 1985; Cocucci y Marré, 1984; Roldán, 1988). Partiendo de los resultados obtenidos, se consideró que la concentración óptima de ATP a la que se llevarían a cabo las determinaciones sería de 1.5 mM (Fig. 21 a).



a



b

**Actividad ATPásica en ausencia de ortovanadato:**Recta de regresión:  $V = 0.016 + 0.006 \times [ATP]$ Coeficiente de correlación,  $r = 0.9999$  $K_m = 0.38$  $V_{m\acute{a}x.} = 62.54$ **Actividad ATPásica en presencia de ortovanadato:**Recta de regresión:  $V = 0.165 + 0.081 \times [ATP]$ Coeficiente de correlación,  $r = 0.9745$  $K_m = 0.49$  $V_{m\acute{a}x.} = 6.07$ 

c

Figura 21. Caracterización del enzima de membrana  $H^+$ -ATPasa sensible a vanadato, obtenido a partir de microsomas de raíces de cebolla:

a) Representación de Michaelis-Menten.

b) Representación doble recíproca, o de Lineweaver-Burk.

c) Cálculo de las  $K_m$  y  $V_{m\acute{a}x.}$  del enzima en ausencia y presencia de ortovanadato sódico ( $250\mu M$ ).

La curva de pH para actividad ATPásica vanadato-sensible, a diferencia de la obtenida para girasol, da un pico único, muy destacado, a pH 7.0, mientras que cuando el pH se aleja de este máximo, la actividad decrece rápidamente (Fig. 22a). Por ello, se consideró 7.0 como el pH óptimo para el buen funcionamiento de este enzima en los distintos experimentos.

Las curvas de pH para la actividad ATPásica nitrato-sensible (asociada a tonoplasto) y azida-sensible (asociada a membrana mitocondrial), son mucho menos claras (Fig. 22b y c). Su nivel de actividad es extremadamente bajo a pHs inferiores a 6.0 (Fig. 22c), mientras que para pHs superiores a 8.5 parecen comenzar a aparecer artefactos en las curvas enzimáticas (Fig. 22b), que hacen temer por la integridad física o funcional del enzima. Es por ésto que se consideró el pH 8.5 como el óptimo para realizar estas determinaciones, por presentar el enzima a ese nivel el máximo de actividad con una relativa seguridad (Fig. 22c). Además, este pH era el mismo que se había utilizado en las determinaciones de ATPasas de tonoplasto y membrana mitocondrial en el caso del girasol.

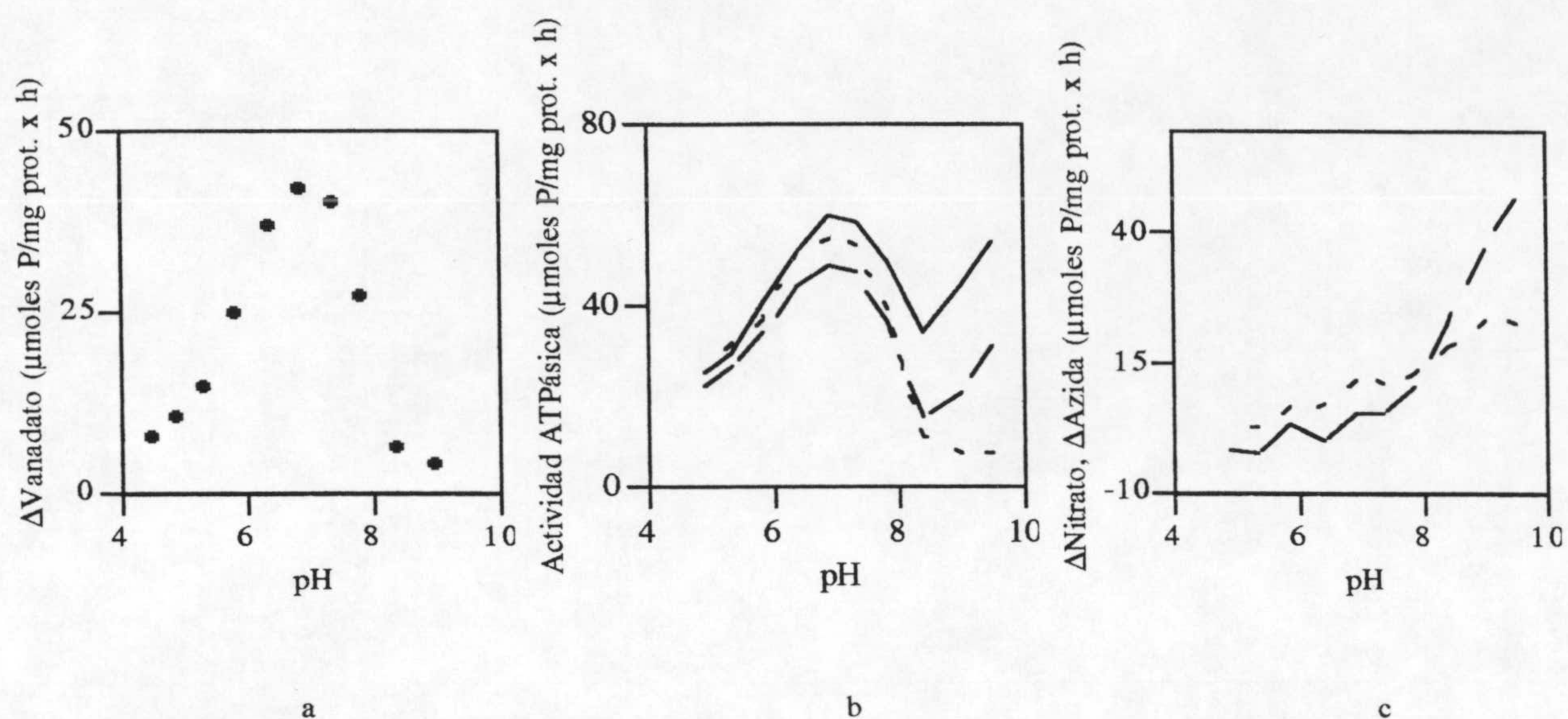


Figura 22. Curvas obtenidas para la determinación de los pH óptimos de actividad de los distintos tipos de H<sup>+</sup>-ATPasas obtenidos en microsomas de raíces de cebolla. a) Curva del pH óptimo para la actividad ATPásica vanadato-sensible. b) Curva de pH para la actividad ATPásica total (línea continua), sensible a nitrato (línea de puntos) y sensible a azida (línea quebrada). c) Curvas de pH óptimo para la actividad ATPásica nitrato sensible (línea de puntos) y azida sensible (línea quebrada).

El bajo nivel de actividad de la ATPasa vanadato-sensible a pH 8.5 hace esperar un menor "ruido de fondo" en las determinaciones posteriores sobre la actividad de las ATPasas nitrato-sensible y azida-sensible, a diferencia de lo ocurrido en el caso del girasol.

Los resultados obtenidos para actividad ATPásica asociada a plasmalema se muestran en las Tablas 26 y 27 (siguientes páginas) y en las Figuras 23 y 24.

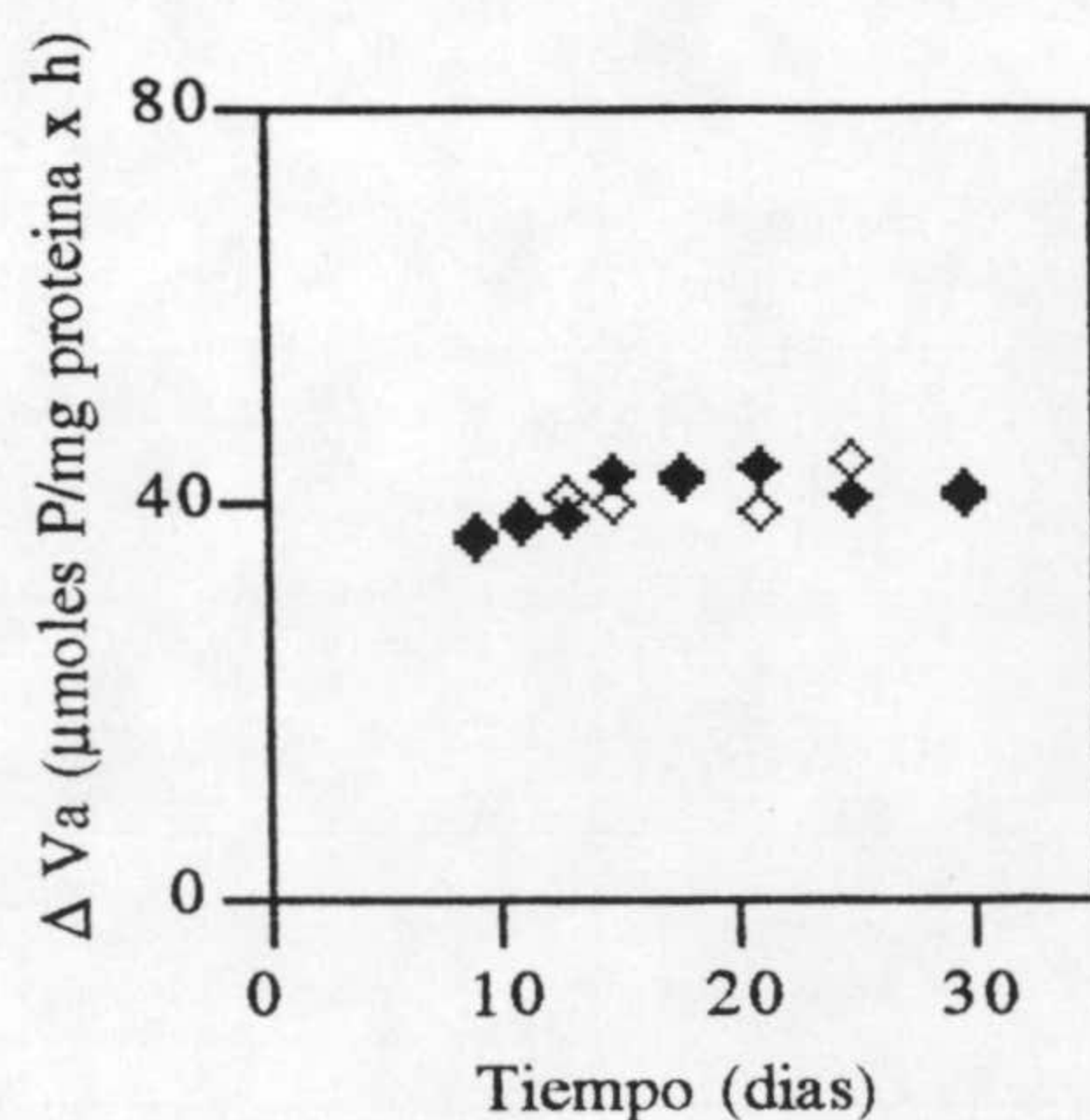


Figura 23. Actividad ATPásica sensible a vanadato obtenida, a lo largo del tiempo en microsomas de micorizas (símbolo: rellenos) y raíces (símbolos huecos) de cebolla (ensayo a corto plazo).

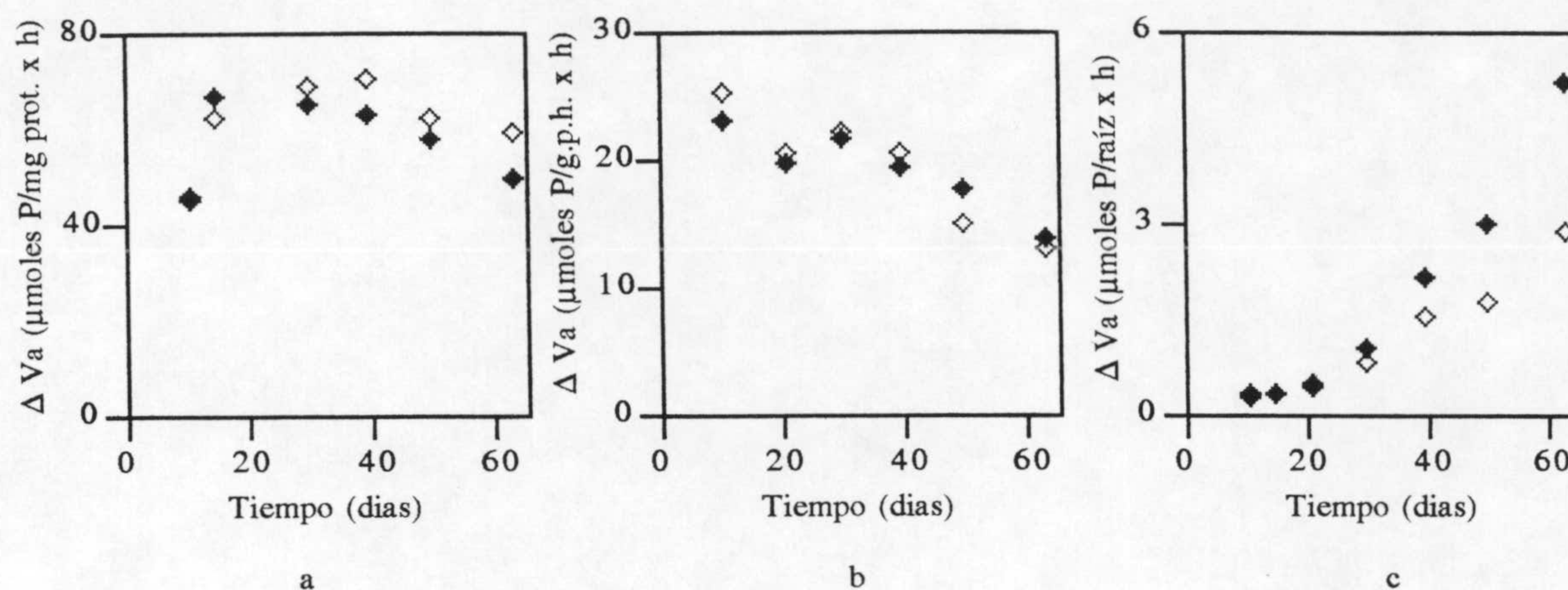


Figura 24. Actividad ATPásica sensible a vanadato, expresada por mg de proteína (a), por g.p.h. (b) y por raíz entera (c), obtenida, a lo largo del tiempo, en microsomas de micorrizas (símbolos rellenos) o raíces (símbolos huecos) de plantas de cebolla (ensayo a largo plazo).

Lo primero que debemos remarcar es que el porcentaje de actividad asociada a plasmalema obtenido, con respecto a la actividad total, es, de nuevo, muy elevado (65 - 70%). Esto puede considerarse como nueva indicación de la bondad del método utilizado para la localización de actividad ATPásica vanadato-sensible, y da cierta solidez a los datos obtenidos.

Con respecto a los datos de actividad específica, la tendencia a lo largo del tiempo es la de descender, si bien este descenso resulta mucho menos acusado que en el caso del girasol. Como puede observarse, entre tratamientos, hasta los 30 días no existen diferencias marcables, o éstas son mínimas. Sin embargo, a partir de este tiempo, la actividad específica de las membranas control supera permanentemente a la de las membranas procedentes de las micorrizas (Fig. 24a). Recordemos que a partir de los 40 días del inicio del ensayo, con la simbiosis plenamente funcional (fase arbuscular de la colonización), comenzaban a aparecer diferencias marcables en las proteínas de membrana a favor de las micorrizas (Fig. 20). Esto podría indicarnos que ese aumento se debería a la aparición en las membranas de proteínas que no son  $H^+$ -ATPasas de plasmalema, por lo que la actividad específica, al venir dada en  $\mu$ moles P/mg de proteína, se encontraría artificialmente disminuida para las micorrizas en nuestros resultados, debido a un efecto de dilución. Así, si los mismos resultados los expresamos como actividad fisiológica (Fig. 24b), empezamos a obtener igualdad en ambos tratamientos, que a partir de los 40 días se convierten en diferencias a favor de las micorrizas. Estas diferencias se hacen muy importantes si los datos se expresan como actividad de la raíz entera (Fig. 24c). Como resultado de todo esto, nos encontramos que la micorriza de cebolla, al igual que ocurría con la del girasol se encuentra hiperactivada como consecuencia de la colonización arbuscular.

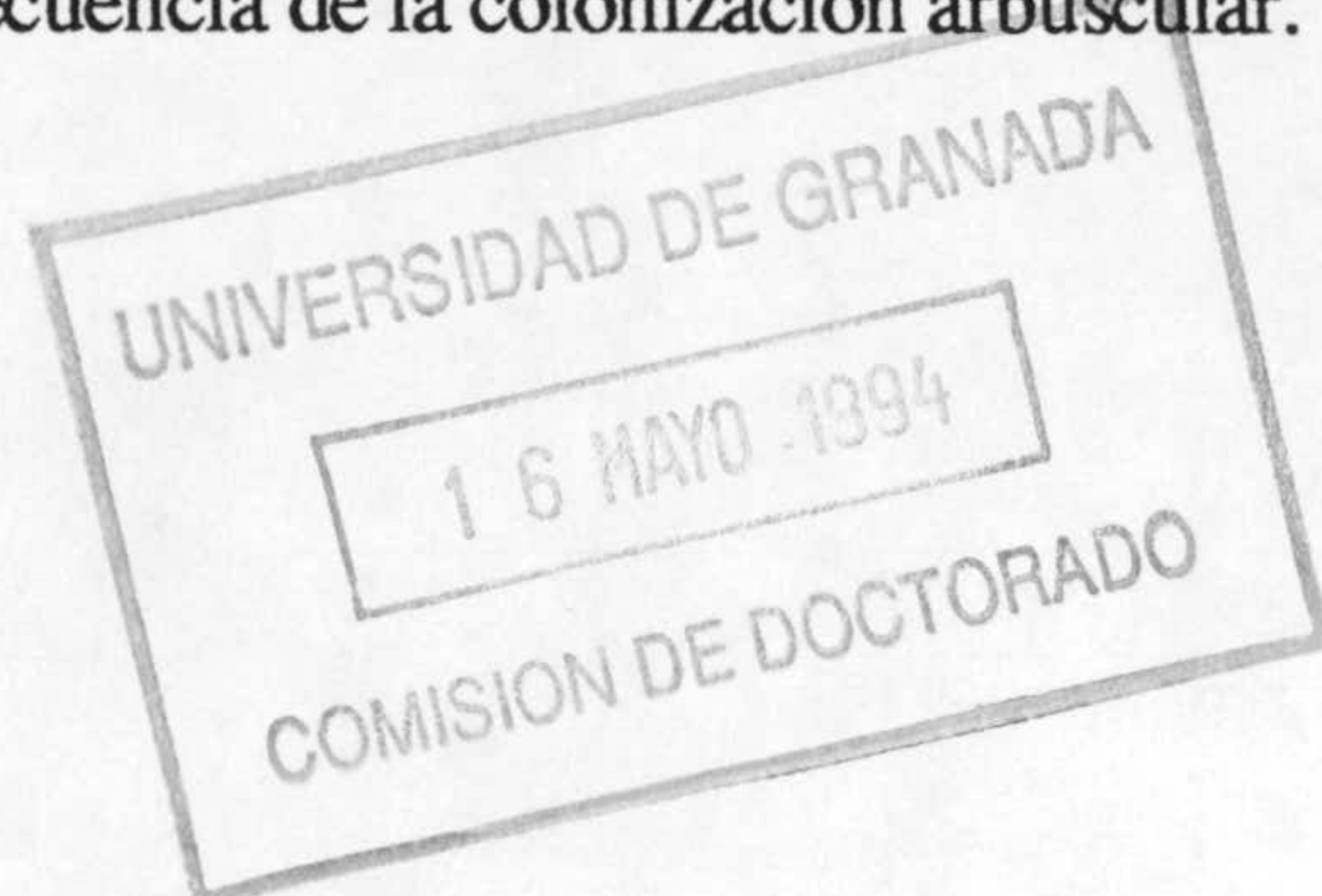


Tabla 26. Actividad ATPásica asociada a plasmalema obtenido a partir de raíces de cebolla, micorrizada o no, a lo largo del tiempo (pH = 7.0).

Tiempo (días)	μmoles P/mg proteína x h		μmoles P/g.p.h. x h		μmoles P/raíz completa x h		% Plasmalema	
	Control	Micorriza	Control	Micorriza	Control	Micorriza	Control	Micorriza
9	35.95 ± 1.000	37.02 ± 0.380	23.37 ± 0.650	25.54 ± 0.260	0.14 ± 0.004	0.15 ± 0.002	64.6	65.0
11	37.29 ± 2.100	38.53 ± 1.890	25.36 ± 1.430	24.66 ± 1.210	0.25 ± 0.003	0.36 ± 0.014	64.0	65.8
13	40.79 ± 0.130	37.27 ± 0.740	12.65 ± 0.040	16.77 ± 0.330	0.18 ± 0.001	0.22 ± 0.004	69.2	62.8
15	39.36 ± 0.550	42.32 ± 0.100	17.71 ± 0.250	21.58 ± 0.050	0.27 ± 0.004	0.30 ± 0.001	69.4	70.0
18	42.81 ± 1.240	42.30 ± 0.680	13.27 ± 0.380	14.38 ± 0.230	0.28 ± 0.008	0.29 ± 0.005	74.3	70.5
21	38.61 ± 0.670	43.43 ± 0.060	13.90 ± 0.240	14.33 ± 0.020	0.33 ± 0.006	0.32 ± 0.000	68.5	73.5
25	44.04 ± 0.250	40.13 ± 0.370	12.33 ± 0.070	14.45 ± 0.130	0.40 ± 0.002	0.40 ± 0.004	75.9	69.7
30	40.22 ± 1.730	41.21 ± 0.810	11.26 ± 0.480	- -	0.39 ± 0.017	- -	71.2	72.6

Los resultados se expresan como la media de los datos obtenidos ± el error estándar de la misma.



Tabla 27. Actividad ATPásica asociada a plasmalema obtenido en membranas de raíces de cebolla, micorrizada o no, a lo largo del tiempo (pH = 7.0).

Tiempo (días)	μmoles P/mg proteína x h		μmoles P/g.p.h. x h		μmoles P/raíz completa x h		% Plasmalema	
	Control	Micorriza	Control	Micorriza	Control	Micorriza	Control	Micorriza
11	45.80 ± 0.710	45.12 ± 0.210	25.19 ± 0.390	23.01 ± 0.110	0.29 ± 0.005	0.27 ± 0.001	70.0	67.4
15	-	-	-	-	-	-	-	-
21	53.95 ± 0.870	53.06 ± 0.610	20.50 ± 0.330	19.63 ± 0.230	0.48 ± 0.008	0.45 ± 0.005	61.2	61.6
30	68.76 ± 3.960	65.15 ± 3.500	22.00 ± 1.270	21.50 ± 1.160	0.80 ± 0.046	1.05 ± 0.057	69.5	67.6
40	70.19 ± 0.820	62.55 ± 0.940	20.36 ± 0.240	19.39 ± 0.290	1.53 ± 0.018	2.12 ± 0.032	67.9	64.2
50	62.16 ± 0.170	57.13 ± 0.470	14.92 ± 0.040	17.71 ± 0.150	1.78 ± 0.005	2.97 ± 0.025	71.1	71.8
63	59.16 ± 3.400	49.61 ± 2.500	13.02 ± 0.750	13.89 ± 0.700	2.86 ± 0.170	5.19 ± 0.260	71.5	66.8

Los resultados se expresan como la media de los datos obtenidos ± el error estándar de la misma.

Con respecto a la actividad de las H<sup>+</sup>-ATPasas asociadas a tonoplasto y membrana mitocondrial, los resultados obtenidos se muestran en las Tablas 28 a 31. En ambos casos, y muy especialmente en el último, la actividad obtenida con respecto a la total es muy superior a la recuperada en el caso del girasol, haciendo buenas las previsiones que así lo indicaban. Esto hace que, en este caso, los datos puedan ser considerados como mas fiables.

Tabla 28. Actividad ATPásica sensible a nitrato, obtenido a partir de microsomas de micorrizas o raíces de cebolla a lo largo del tiempo (pH = 8.5).				
Tiempo (días)	µmoles P/mg proteína x h		% Tonoplasto	
	Control	Micorriza	Control	Micorriza
9	19.86 ± 0.770	20.08 ± 0.400	45.2	45.7
11	21.35 ± 0.350	20.44 ± 1.100	45.1	45.7
13	15.49 ± 0.070	21.83 ± 0.960	48.4	47.3
15	18.26 ± 0.500	17.89 ± 0.560	46.7	46.8
18	15.49 ± 0.350	22.66 ± 1.760	46.8	43.2
21	17.46 ± 0.330	15.44 ± 0.240	45.9	49.0
25	14.82 ± 0.090	19.38 ± 0.430	49.4	48.4
30	17.46 ± 0.130	18.07 ± 0.270	49.4	47.4

Los resultados se expresan como la media de los datos obtenidos ± el error estándar de la misma.

En cuanto a la actividad obtenida para tonoplasto (Tablas 28 y 29), no parecen existir diferencias apreciables hasta los 40 días de crecimiento. A partir de esta fecha (Tabla 29) la actividad específica, pero especialmente las actividades fisiológica y total de los tonoplastos de las micorrizas experimentan un considerable incremento con respecto a las raíces, lo que podría ser un reflejo del aumento del número o actividad de las vacuolas, provocada por la presencia del hongo. Recordemos que el hongo arbuscular transporta los nutrientes que obtiene a partir de la planta compartimentalizándolos (ver Introducción), lo que debería originar un incremento en la cantidad y actividad del tonoplasto de la micorriza, y, mas específicamente de sus ATPasas, como, en efecto, parece que ocurre. Asimismo, la presencia del hongo provoca la conversión de la gran vacuola central de las células vegetales en un mayor número de pequeñas vacuolas, con el cosiguiente incremento en el tonoplasto que esto conlleva.

La aparición de estas diferencias, coincide de nuevo en el tiempo con la fase exponencial de la colonización micorrícica, etapa de máxima funcionalidad de la simbiosis.

Tabla 29. Actividad ATPásica sensible a nitrato obtenida a partir de micorrizas o raíces de cebolla, a lo largo del tiempo (pH = 8.5).

Tiempo (días)	μmoles P/mg proteína x h		μmoles P/g.p.h. x h		μmoles P/raíz x h		% Tonoplasto	
	Control	Micorriza	Control	Micorriza	Control	Micorriza	Control	Micorriza
11	20.35 ± 1.200	21.74 ± 1.150	12.29 ± 0.660	11.09 ± 0.587	0.14 ± 0.008	0.13 ± 0.007	50.8	49.3
15	16.32 ± 0.930	16.54 ± 0.640	-	-	-	-	44.0	45.0
21	24.17 ± 1.130	20.68 ± 1.420	9.20 ± 0.429	7.65 ± 0.525	0.21 ± 0.010	0.18 ± 0.012	44.9	44.7
30	24.13 ± 2.610	22.57 ± 2.110	7.72 ± 0.835	7.45 ± 0.696	0.28 ± 0.030	0.37 ± 0.034	43.7	42.7
40	27.61 ± 1.360	30.64 ± 0.050	8.01 ± 0.394	9.50 ± 0.016	0.60 ± 0.030	1.04 ± 0.001	44.8	47.7
50	23.76 ± 0.440	24.22 ± 0.230	5.70 ± 0.106	7.51 ± 0.071	0.68 ± 0.013	1.26 ± 0.012	44.9	48.9
63	18.60 ± 0.180	22.97 ± 0.580	4.09 ± 0.040	6.43 ± 0.162	0.90 ± 0.009	2.40 ± 0.061	39.2	45.4'

Los resultados se expresan como la media de los datos obtenidos ± el error estándar dela misma.

Tabla 30. Actividad ATPásica sensible a azida obtenida a partir de micorrizas o raíces de cebolla, a lo largo del tiempo (pH = 8.5).

Tiempo (días)	μmoles P/mg proteína x h		% M. mitocondrial	
	Control	Micorriza	Control	Micorriza
9	28.21 ± 0.810	28.99 ± 0.460	77.9	78.5
11	31.31 ± 1.020	29.95 ± 1.670	80.5	79.6
13	20.35 ± 0.070	32.63 ± 1.230	67.8	78.8
15	25.22 ± 0.010	25.20 ± 0.340	73.6	75.0
18	20.57 ± 0.090	29.68 ± 1.020	70.7	74.5
21	24.12 ± 0.010	20.85 ± 0.390	74.8	68.8
25	20.34 ± 0.010	28.26 ± 0.220	69.5	75.2
30	25.12 ± 0.130	26.13 ± 0.440	72.9	76.1

Los resultados se expresan como la media de los datos obtenidos ± el error estándar de la misma.

Algo similar ocurre en el caso de la membrana mitocondrial (Tablas 30 y 31). El porcentaje de actividad obtenida para ella sobre la total es muy bueno, similar al obtenido para el propio plasmalema. Al igual que en el caso del tonoplasto, a partir del día 40 (Tabla 31), la actividad fisiológica y total de la membrana mitocondrial de la micorriza, y en menor grado también la específica, se ve incrementada con respecto a las raíces control, lo que sugiere inmediatamente un incremento en la tasa respiratoria de la micorriza frente a la raíz, como, efectivamente, la bibliografía confirma. La presencia de, no uno, sino dos organismos integrados, viviendo en simbiosis, así como del incremento que este estado produce en el metabolismo de la nueva entidad (micorriza) frente al de la primitiva (raíz), podrían muy bien justificar estas diferencias.

Tabla 31. Actividad ATPásica sensible a azida obtenida a partir de micorrizas o raíces de cebolla, a lo largo del tiempo (pH = 8.5).

Tiempo (días)	μmoles P/mg proteína x h		μmoles P/g.p.h. x h		μmoles P/raíz x h		% M. mitocondrial	
	Control	Micorriza	Control	Micorriza	Control	Micorriza	Control	Micorriza
11	28.98 ± 1.270	32.32 ± 1.410	15.94 ± 0.700	17.78 ± 0.092	0.18 ± 0.008	0.20 ± 0.001	72.4	73.3
15	18.48 ± 0.230	19.39 ± 0.180	-	-	-	-	49.8	52.8
21	35.81 ± 0.720	30.35 ± 1.700	13.61 ± 0.274	11.23 ± 0.629	0.32 ± 0.006	0.26 ± 0.015	66.6	65.6
30	36.23 ± 2.450	35.32 ± 3.440	12.20 ± 0.784	12.62 ± 1.135	0.44 ± 0.029	0.62 ± 0.056	65.7	66.9
40	42.68 ± 3.000	47.08 ± 1.240	12.38 ± 0.870	14.60 ± 0.384	0.93 ± 0.065	1.60 ± 0.042	69.2	73.4
50	36.75 ± 0.440	36.57 ± 0.800	8.82 ± 0.106	11.34 ± 0.248	1.05 ± 0.013	1.90 ± 0.042	69.4	73.8
63	28.09 ± 0.490	38.08 ± 1.640	6.18 ± 0.108	10.66 ± 0.459	1.36 ± 0.024	3.98 ± 0.172	59.2	75.2

Los resultados se expresan como la media de los datos obtenidos ± el error estándar de la misma.

### 2.3- Caracterización lipídica de las membranas de raíces y micorrizas arbusculares de girasol y cebolla.

#### 2.3a.- Estudios sobre girasol.

Los resultados obtenidos para los análisis cuantitativos y cualitativos de lípidos totales de micorrizas y raíces de girasol se muestran en las Tablas 32 y 33. Los cromatogramas obtenidos en este mismo ensayo, en micorrizas o raíces de 63 días, se muestran en la Figura 25 (a y b).

Como puede observarse, a partir de los 40 días de cultivo (Tabla 33), aparece en las micorrizas un nuevo ácido graso, concretamente un isómero del ácido palmitoleico (probablemente, el ácido hexadecanoico, 11-cis), que, sin embargo, no se encuentra entre los ácidos grasos de las raíces sin micorrizar. Este ácido graso es el mismo que Pacovsky y Fuller (1988) encontraban en sus análisis lipídicos realizados sobre homogenados de micorriza, sin que su presencia fuese detectada en los homogenados correspondientes de raíces control, y que estos autores consideraban como un compuesto típicamente fúngico, probablemente con misión de reserva. En nuestros resultados, su porcentaje sobre el total de ácidos grasos de membrana va incrementándose de manera proporcional a la colonización de la raíz por parte del hongo, alcanzando un máximo del 7.9% en la micorriza de 63 días.

Con respecto al total de ácidos grasos de membrana obtenidos en los análisis a lo largo del tiempo (Tabla 32), se observan incrementos de éstos en las micorrizas, con respecto a las raíces control. Estos incrementos aparecen antes, incluso, de la detección del ácido graso 16:1 (11-cis), y se producen tanto por miligramo de proteína, como por gramo de peso húmedo.

	Tiempo (días)									
	20		30		40		50		63	
	Control	Micorriza	Control	Micorriza	Control	Micorriza	Control	Micorriza	Control	Micorriza
$\mu\text{g}$ ác. graso/ mg proteína	783.7	475.8	509.0	616.1	513.1	535.0	552.5	620.3	315.0	367.0
$\mu\text{g}$ ác. graso/ g.p.h.	189.0	106.4	106.9	129.4	118.0	128.4	127.0	142.7	44.1	58.7
Colonización (%)	0.0	8.3	0.0	19.7	0.0	40.2	0.0	49.3	0.0	71.0

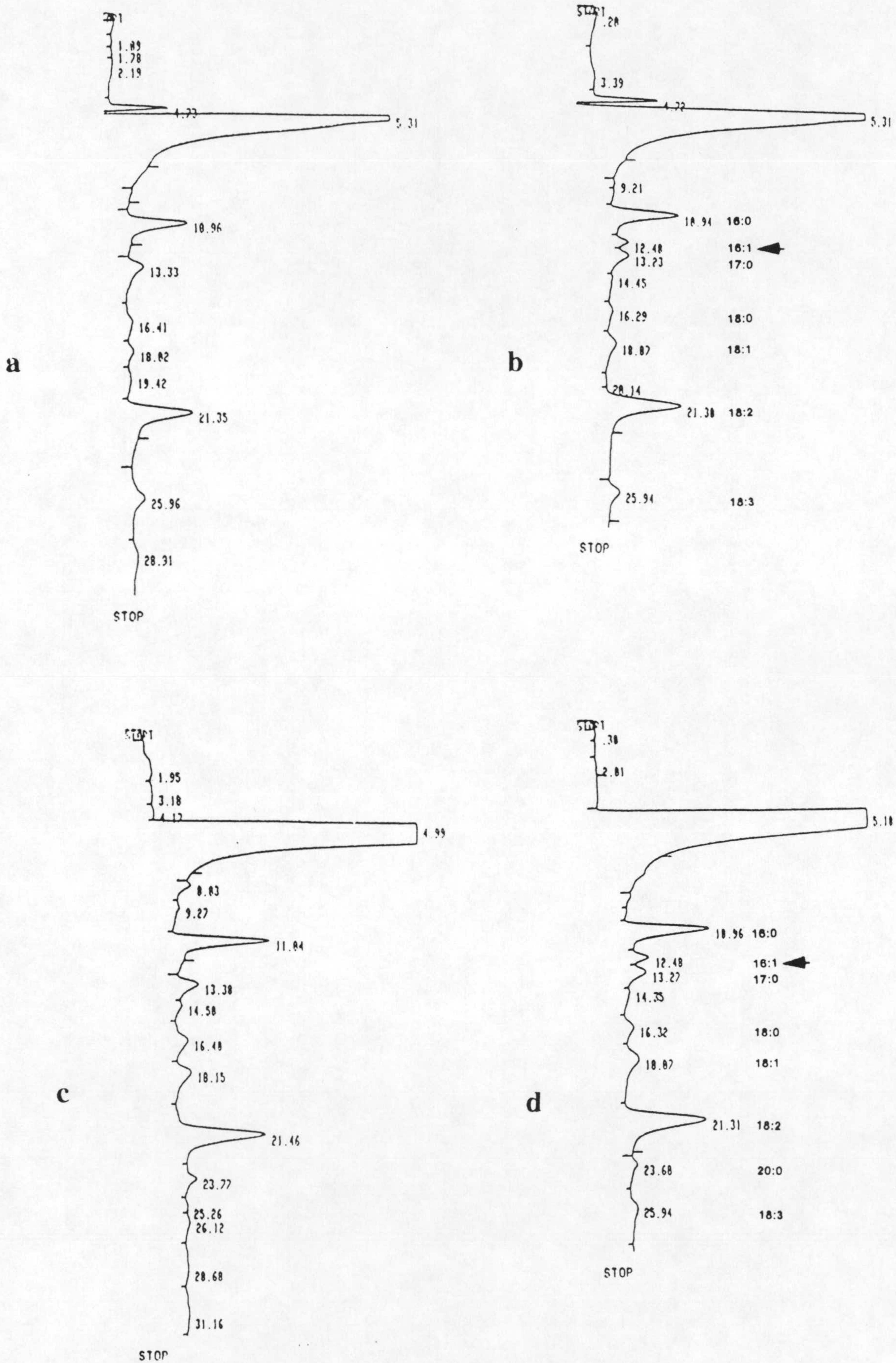


Figura 25. Cromatogramas obtenidos para los aislados de ácidos grasos de plantas de 60 días de girasol (a y b) y cebolla (c y d), micorrizadas (b y d) o no (a y c). El ácido graso 16:1 (11-cis), aparecido como consecuencia de la colonización micorrícica, se destaca con una flecha

Tabla 33. Análisis cualitativo de los ácidos grasos totales de microsomas de micorizas y raíces de girasol .

Acido graso	Tiempo (días)																			
	20				30				40				50				63			
	Control		Micoriza		Control		Micoriza		Control		Micoriza		Control		Micoriza		Control		Micoriza	
	µg a. g/ mg prot.	%sobre total	µg a. g/ mg prot.	%sobre total	µg a. g/ mg prot.	%sobre total	µg a. g/ mg prot.	%sobre total	µg a. g/ mg prot.	%sobre total	µg a. g/ mg prot.	%sobre total	µg a. g/ mg prot.	%sobre total	µg a. g/ mg prot.	%sobre total	µg a. g/ mg prot.	%sobre total	µg a. g/ mg prot.	%sobre total
Palmítico (16:0)	159.3	20.3	160.3	33.7	158.4	31.1	188.8	30.6	144.3	28.1	141.8	26.5	147.5	26.7	149.1	24.0	100.0	31.8	118.0	32.2
(16:1) (11-cis)	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	20.3	3.8	0.0	0.0	37.1	6.0	0.0	0.0	29.0	7.9
Estearico (18:0)	14.9	1.9	28.9	6.1	20.6	4.1	31.5	5.1	32.8	6.4	36.4	6.8	31.7	5.7	29.8	4.8	18.0	5.7	12.0	3.3
Oléico (18:1)	141.5	18.1	44.0	9.3	47.4	9.3	113.2	18.4	47.7	9.3	47.8	8.9	57.5	10.4	54.8	8.8	16.0	5.1	25.0	6.8
Linoléico (18:2)	347.2	44.3	198.2	41.7	226.1	44.4	246.6	40.0	174.7	34.0	184.9	34.6	247.6	44.8	289.0	46.6	141.0	44.8	161.0	43.9
Araquídico (20:0)	69.3	8.8	0.0	0.0	19.6	3.9	0.0	0.0	60.0	11.7	64.3	12.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Linolénico (18:3)	51.5	6.6	44.4	9.3	36.9	7.3	39.0	6.3	53.6	10.5	39.5	7.4	68.2	12.3	60.5	9.8	40.0	12.7	22.0	6.0
Colonización (%)	0.0		8.3		0.0		19.7		0.0		40.2		0.0		49.3		0.0		71.0	



La presencia del ácido hexadecanoico (11-cis) en los extractos lipídicos de los microsomas obtenidos a partir de la micorriza, parece confirmar la participación de las membranas del hongo en ellos, lo que reafirma la idoneidad, para nuestros fines, del método de extracción utilizado (ver Material y Métodos). Estos resultados confirman, asimismo, que los datos de actividad ATPásica que se han mostrado en el apartado anterior, son, en realidad, una mezcla de las actividades enzimáticas de las membranas del hongo y de la planta.

### 2.3b.- Estudios sobre cebolla.

Los resultados de los análisis de los ácidos grasos de membrana de la micorriza o raíz de cebolla, se muestran en las Tablas 34 y 35. Los cromatogramas obtenidos tras 60 días del inicio de este ensayo, se muestran en la Figura 25 (c y d).

Al igual que ocurría en el caso del girasol, en los extractos lipídicos de microsomas de micorriza de cebolla se detecta (Tabla 35) la aparición del ácido hexadecanoico (11-cis), no existiendo evidencias de la presencia de este ácido graso a nivel de las membranas de las raíces control. Esto parece confirmar, de nuevo, la participación de las membranas fúngicas en nuestros aislados microsomales, por lo que, igualmente, se ha de considerar a la actividad ATPásica obtenida para cebolla en el apartado anterior de estos Resultados, como una mezcla de las actividades enzimáticas del hongo y de la planta.

Curiosamente, en el caso de la cebolla, no se detecta la presencia del ácido (16:1, 11-cis) hasta los 60 días del inicio del ensayo. Esto se podría atribuir, en principio, bien a que la cantidad del mismo que está presente en los extractos de 40 días se encontrara por debajo del umbral mínimo de detección, o bien a que su aparición fuera el reflejo de algún estadio fisiológico del hongo en simbiosis, que no habría sido alcanzado aún, en esta ocasión.

	Tabla 34. Análisis cuantitativo de los ácidos grasos totales de microsomas de micorrizas y raíces de cebolla.					
	Tiempo (días)					
	20		40		60	
	Control	Micorriza	Control	Micorriza	Control	Micorriza
$\mu\text{g}$ ác. graso/ mg proteína	231.0	246.0	235.5	444.4	428.8	449.3
$\mu\text{g}$ ác. graso/ g.p.h.	88.0	91.0	54.2	106.7	98.4	132.6
Colonización (%)	0.0	5.7	0.0	47.2	0.0	87.3

Tabla 35. Análisis cualitativo de los ácidos grasos totales de microsomas de micorrizas y raíces de cebolla.

Acido graso	Tiempo (dias)											
	20				40				60			
	Control		Micorriza		Control		Micorriza		Control		Micorriza	
	µg a. g./ mg prot.	%sobre total	µg a. g./ mg prot.	%sobre total	µg a. g./ mg prot.	%sobre total	µg a. g./ mg prot.	%sobre total	µg a. g./ mg prot.	%sobre total	µg a. g./ mg prot.	%sobre total
Palmítico (16:0)	71.0	30.7	94.0	38.2	79.6	33.8	141.8	31.9	108.9	25.4	141.0	31.4
(16:1) (11-cis)	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	36.8	8.2
Esteárico (18:0)	20.0	8.7	8.0	3.3	11.3	4.8	26.2	5.9	37.8	8.8	26.5	5.9
Oleico (18:1)	24.0	10.4	19.0	7.7	23.9	10.2	58.7	13.2	39.8	9.3	51.6	11.5
Linoléico (18:2)	88.0	38.1	111.0	45.1	89.9	38.2	143.5	32.3	156.9	36.6	144.3	32.1
Araquídico (20:0)	19.0	8.2	10.0	4.1	23.2	9.9	58.0	13.1	49.2	11.5	19.1	4.3
Linolénico (18:3)	9.0	3.9	4.0	1.6	7.6	3.2	16.2	3.7	36.2	8.4	30.0	6.7
Colonización (%)		0.0		5.7		0.0		47.2		0.0		87.3

Con respecto a las cantidades totales de ácidos grasos de membrana (Tabla 34), observamos, de nuevo, incrementos a favor de la micorriza, especialmente en lo que se refiere a los datos expresados por gramo de peso húmedo, que se hacen mas importantes a los 40 días del inicio del ensayo, cuando aún no se detecta la presencia del ácido (16:1, 11-cis), lo que concuerda con los resultados obtenidos para girasol.

Todos estos resultados sugieren un, por otra parte esperado, incremento en las membranas de la micorriza frente las raices control, como consecuencia del progresivo establecimiento de la colonización fúngica.

#### 2.4- Medida *in vivo* del pH rizosférico y micorrizosférico, bajo el aporte de distintas formas iónicas de N.

2.4a.- Determinación preliminar: Estudio de la inocuidad de la púrpura de bromocresol los hongos formadores de MA.

Los resultados obtenidos para estos estudios se muestran en la Figura 26a y b.

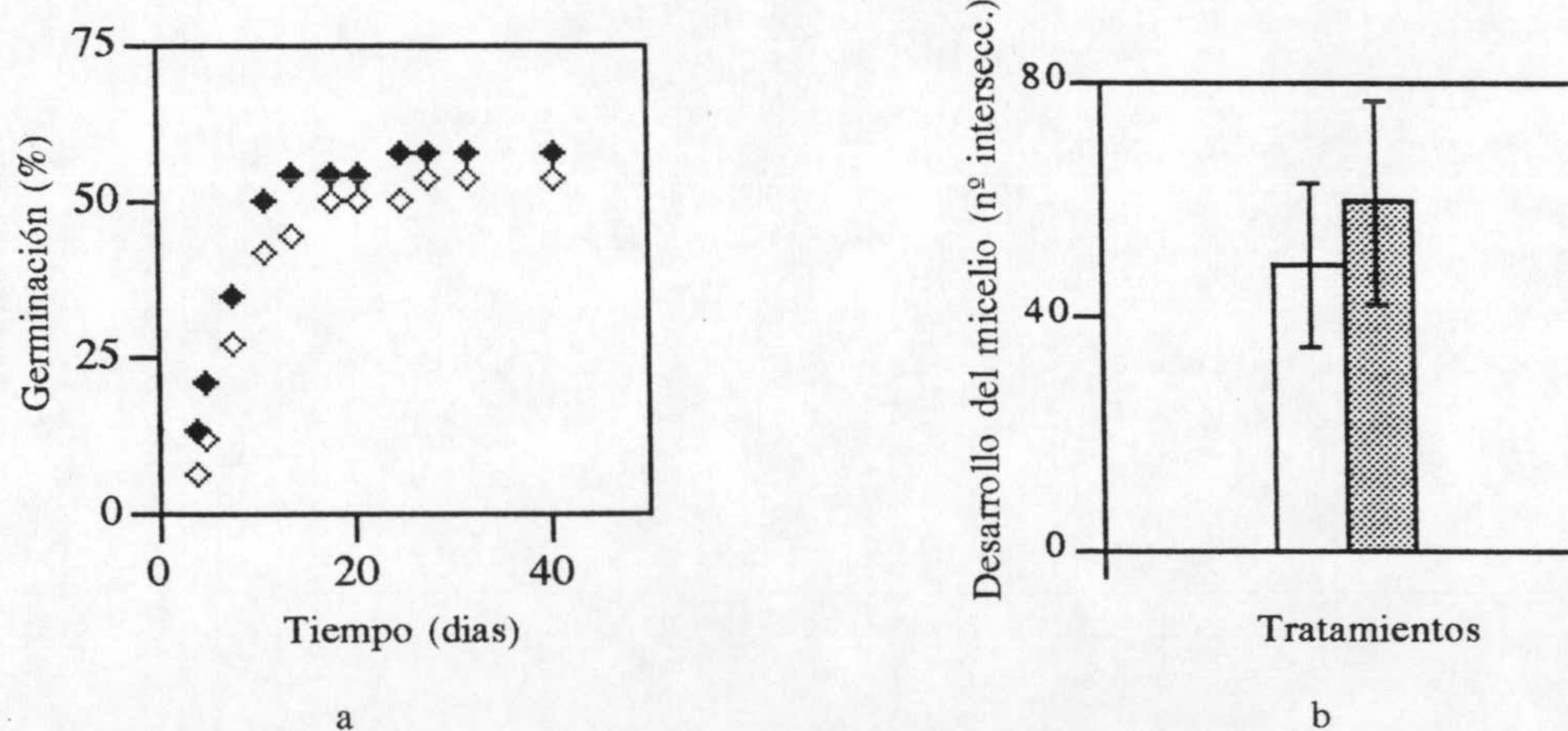


Figura 26. Porcentaje de germinación de esporas a lo largo del tiempo (a) y longitud total del micelio (b) obtenidos tras 6 semanas de cultivo *in vitro* de esporas del hongo arbuscular *Glomus mosseae* en medios de agar-agua adicionados (símbolos rellenos) o no (símbolos huecos) de un 1% de una solución de púrpura de bromocresol. ( $p < 0.05$ ).

Como puede observarse, el colorante no parece influir en los procesos de germinación y desarrollo de los hongos arbusculares, en este caso concreto de *Glomus mosseae*, por lo que

se pudo continuar con el experimento previamente planificado, sin temor a algún efecto indeseable por la aplicación de las láminas de agarosa adicionadas del indicador.

#### 2.4b- Medida *in vivo* del pH rizosférico y micorrizosférico.

Los resultados obtenidos mediante la aplicación de los geles de agarosa a raíces de cebolla, pueden observarse en las fotografías de la Figura 15. Las características particulares del crecimiento de cada una de esas plantas se muestran en la Tabla 36.

	Nitrato		Amonio	
	C	M	C	M
Altura (cm/planta)	7.0	11.0	11.0	9.5
Peso húmedo P.A. (mg/planta)	37.5	100.0	105.0	175.0
Peso húmedo raíz (mg/planta)	90.0	83.3	85.0	210.0
Peso húmedo bulbo (mg/planta)	217.5	100.0	75.0	300.0
Biomasa total (mg/placa)	1380.0	850.0	530.0	1370.0
Colonización (%)	0.0	14.5	0.0	19.2

Con respecto a las plantas a las que se le aportaban nitratos como única fuente de N (Fig. 27), observamos que tras los primeros 30 días de crecimiento (27a) aparecen ciertas zonas violáceas, es decir, zonas de alcalinización. Estos resultados son coherentes con los patrones de exudación descritos en la bibliografía al respecto, que los atribuye a algún tipo de compensación iónica provocada por la captación por la raíz de iones  $\text{NO}_3^-$ . Sin embargo, y según nuestros resultados, estas zonas violáceas son más abundantes en el caso de la micorriza, extendiéndose, en ellas, a lo largo del sistema radical, y concentrándose, fundamentalmente, alrededor de sus zonas más maduras. Por el contrario, en las zonas subapicales, donde el crecimiento radical es máximo, se observan, siempre en el tratamiento con hongo arbuscular, unos claros halos de

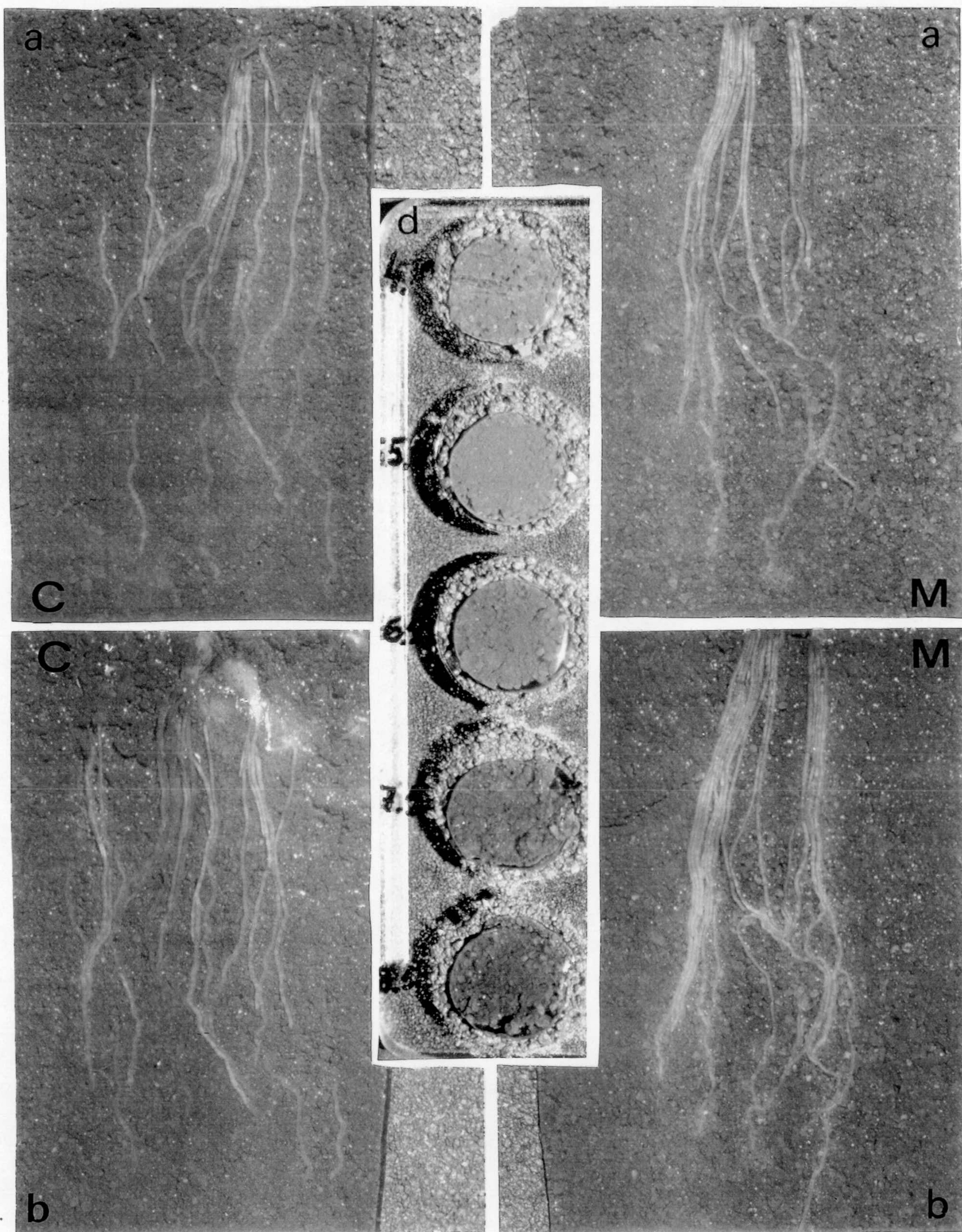


Figura 27. Diferencias en el pH rizosférico (C) y micorrizosférico (M) obtenidas para plantas de cebolla crecidas durante 30 (a) y 60 (b) días, con la adición de  $\text{NO}_3^-$  como única fuente de nitrógeno. Escala de color-pH para el indicador púrpura de bromocresol (d).

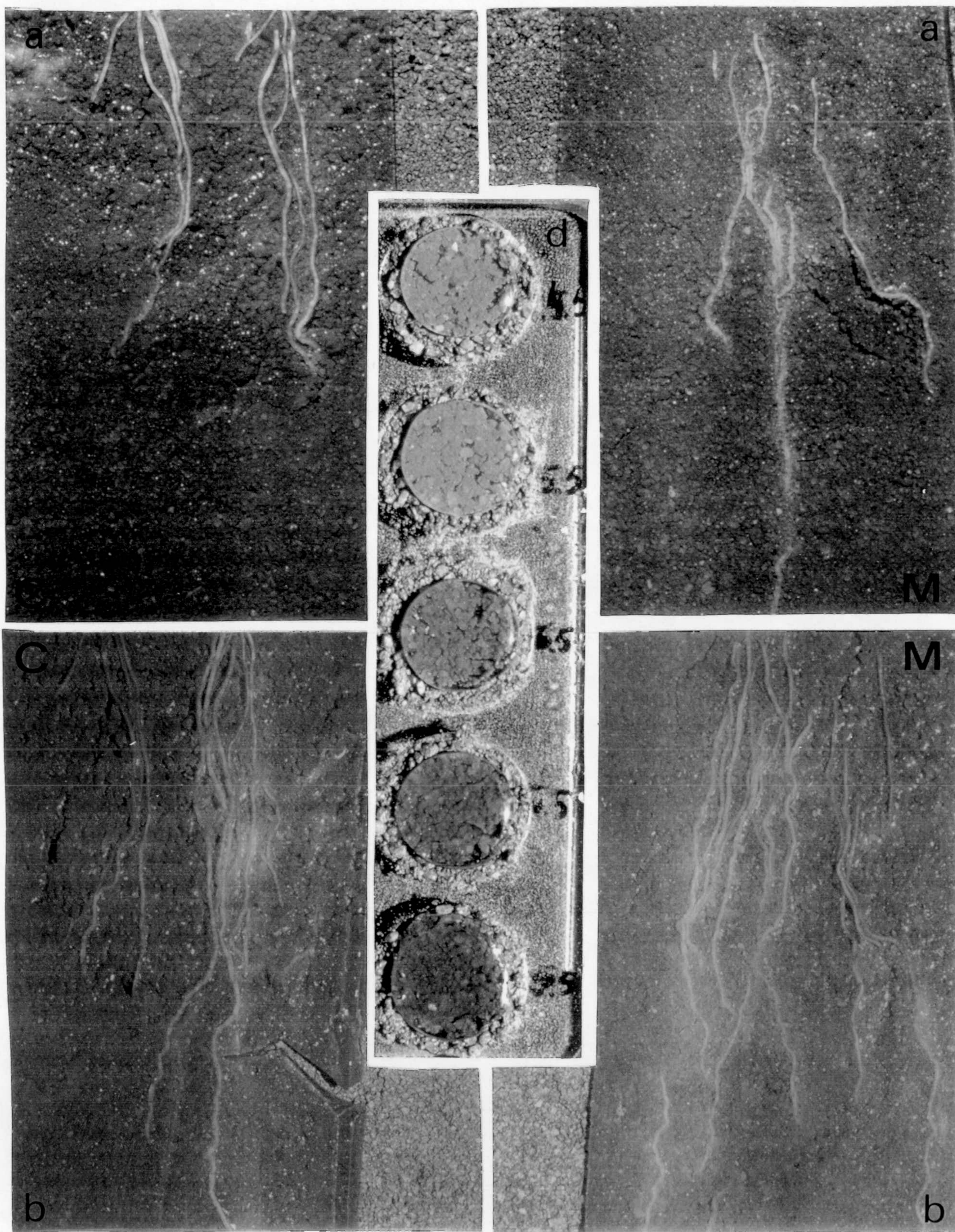


Figura 28. Diferencias en el pH rizosférico (C) y micorrizosférico (M) obtenidas para plantas de cebolla crecidas durante 30 (a) y 60 (b) días, con la adición de  $\text{NH}_4^+$  como única fuente de nitrógeno. Escala de color-pH para el indicador púrpura de bromocresol (d).

acidificación. Estos resultados persistían en las diversas pruebas que se llevaron a cabo aplicando estas técnicas (datos no mostrados).

Sin embargo, los resultados que se obtienen tras 60 días de crecimiento de las plantas en este sistema (b), muy diferentes. Mientras que en las raíces del tratamiento control apenas si aparecen cambios de coloración del gel de agarosa, en la micorriza el sistema radical produce viraje del indicador de pH, apuntando, en este caso, hacia la existencia de una fuerte acidificación a lo largo de, prácticamente, toda la rizosfera. Sólo se conservan algunas franjas violáceas aisladas, que, de nuevo, se localizan en las zonas media y madura de la micorriza.

Con respecto a las plantas en las que se aportaba amonio como única fuente de N, los resultados se muestran en las Figura 28. En ella se puede observar que, tanto tras los primeros 30 días de crecimiento (a), como tras los 60 días (b), existe una mayor acidificación generalizada a lo largo de la micorriza con respecto a la existente en la raíz. En concreto, si comparamos la zona acidificada por la micorriza de 60 días con respecto a su control, observamos una amplificación importante de la primera con respecto a la segunda. Si, como se infiere por la bibliografía al respecto, esta acidificación se produce como consecuencia de la necesidad de mantener el equilibrio iónico y de pH por parte del sistema radical ante la entrada en él de  $\text{NH}_4^+$  (posiblemente por antiporte protónico), habría que decir que este mecanismo parece ser más activo en el caso de la micorriza. Así mismo, la amplitud del halo de acidificación provocado, sugiere que la zona de influencia radical de la micorriza (micorrizosfera) es superior a la producida en el caso de la raíz (rizosfera).

2.5- Estudio de los posibles cambios de pH promovidos por las hifas de los hongos arbusculares cultivados *in vitro* bajo distintas formas iónicas de N.

La cuantificación del desarrollo del micelio en los distintos tratamientos arrojó los resultados que se muestran en la Figura 29.

En ninguno de los tratamientos ensayados se apreció, tras cuidadosa comparación con las placas de control de color que se habían reservado sin esporas, el viraje del indicador en los contornos de las hifas. Esto parece indicar que, o bien no se produjeron alteraciones en los pHs de los medios ensayados, o bien dichas alteraciones no eran lo suficientemente importantes como para ser detectadas mediante esta técnica.

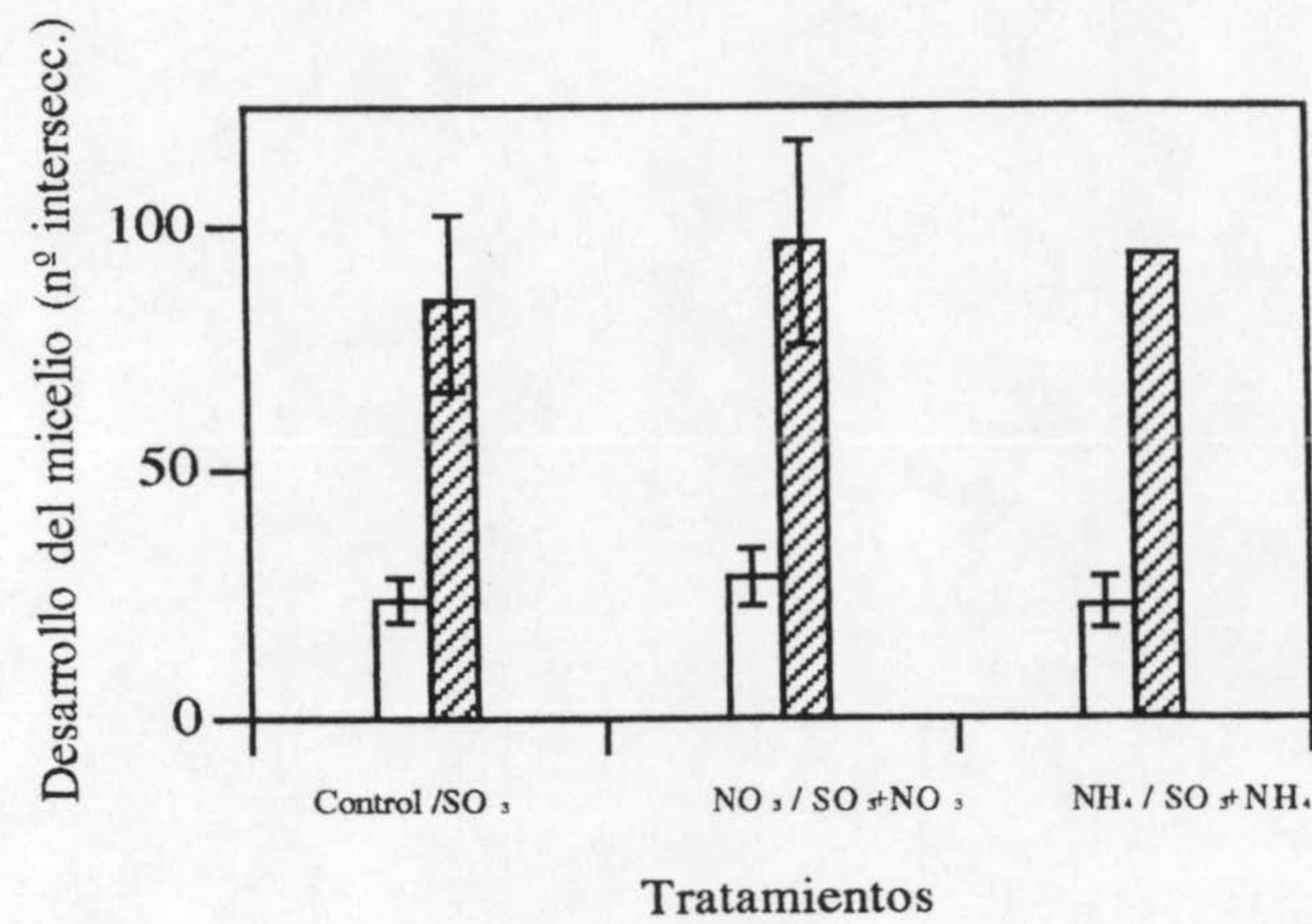


Figura 29. Desarrollo del micelio producido por esporas del hongo arbuscular *Glomus mosseae*, tras 4 semanas de cultivo *in vitro* sin (Control) o con el aporte de 7 mg/l de N (bajo forma de NO<sub>3</sub> o NH<sub>4</sub><sup>+</sup>), en medios adicionados (barras ralladas) o no (barras huecas) de 10 mg S/l como K<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>.

Con respecto a la cuantificación del desarrollo fúngico, la Figura 29 muestra el ya bien establecido incremento miceliar provocado por el sulfito (Hepper 1984b; García-García, 1988; Bago, 1990), que no se ve alterado ni positiva, ni negativamente por la presencia de ninguna de las dos fuentes de N aplicadas. En los tratamientos sin sulfito tampoco se observa ningún tipo de modificación ante la presencia de estos compuestos nitrogenados, por lo que estos resultados no nos permiten concluir nada con respecto a la incorporación o no de estos compuestos por parte del hongo, y la posible alteración del pH hifosférico, como consecuencia de una compensación iónica y eléctrica a que este proceso daría lugar. Probablemente se necesite una mayor masa de micelio para obtener algún tipo de cambio en este sentido.



*DISCUSSION*

## DISCUSION

El conocimiento actual sobre las bases funcionales de las micorrizas arbusculares es mínimo. Este hecho hace que, habitualmente, los estudios sobre el rendimiento y aplicación óptima de esta simbiosis ante situaciones concretas, deban realizarse de manera indirecta. Parámetros vegetativos, tales como el incremento en el peso de la parte aérea, la superficie foliar o incluso los nutrientes minerales de la planta micorrizada frente a una planta testigo sin micorrizar, son, hasta el momento, los métodos clásicos de aproximación al conocimiento de esta simbiosis. Aunque estos parámetros reflejan, indudablemente, todo el conjunto de cambios intrínsecos al proceso, pueden ser también el resultado de numerosas interacciones que enmascaren o diluyan, en ocasiones, los verdaderos efectos de la simbiosis, por lo que ésta estaría siempre sujeta a un cierto grado de variabilidad en su respuesta.

El uso racional de todas las potencialidades que la simbiosis micorrícica presenta en el campo de la agrobiología pasa, necesariamente, por una comprensión en profundidad del diálogo fisiológico, metabólico y genético que durante todo el proceso de micorrización mantienen ambos simbiosiontes.

El intercambio de nutrientes entre hongo y planta es la "piedra angular" de la simbiosis micorrícica. El mantenimiento de la asociación simbiótica ha de llevar consigo el mantenimiento de la asociación nutricional de los integrantes de la simbiosis (Smith y Smith, 1990). Hasta el momento, los estudios fisiológicos que se han llevado a cabo en la micorriza, han permitido postular unos mecanismos de intercambio de nutrientes que, pese a resultar lógicos y coherentes, se encuentran a la espera de su confirmación mediante estudios experimentales (Bonfante-Fasolo y Scannerini, 1992). Desde este punto de vista partimos en los objetivos del trabajo presentado hasta ahora; una vez expuestos los resultados obtenidos, debemos retornar a estos planteamientos iniciales para tratar de dar respuesta a las preguntas allí formuladas.

Para nuestros estudios hemos elegido dos plantas muy diferentes entre sí a todos los niveles.

La cebolla es una planta con una tasa de crecimiento muy lenta, de manera que hasta unos tres meses no alcanza su etapa de madurez y comienza su floración. Es probablemente por esta lenta tasa de crecimiento que no presenta unos requerimientos nutritivos muy elevados. El acúmulo de agua y reservas minerales mediante la formación del bulbo, la hace resistente a condiciones adversas, si bien la estructura de su sistema radical es muy pobre: presenta raíces gruesas, con escasas ramificaciones, y pelos radicales poco desarrollados. Todas estas condiciones la hacen buena candidata a ser una planta muy dependiente de la formación de MA,

como, en efecto, es, y está ampliamente documentado en la bibliografía (Azcón-Aguilar *et al.*, 1993).

La calificación de la cebolla como planta altamente dependiente debería, en principio, llevar asociada cambios en su morfología radical (Hetrick, 1991), que, desgraciadamente, no hemos sido capaces de poner de manifiesto en nuestros estudios. Sin embargo, el inicio de una tendencia hacia el incremento del L.R.E. tras la formación de la simbiosis, propia de plantas dependientes (Hetrick, 1991), así como los fuertes incrementos en los pesos de raíz obtenidos en los diferentes ensayos a largo plazo, parecen indicar que esos cambios en la arquitectura radical se producirían, una vez que la simbiosis llegara a ser realmente funcional.

En el caso del girasol, nos encontramos, por el contrario, frente a una planta de elevada tasa de crecimiento y ciclo de vida moderadamente rápido, que, en la variedad utilizada, aproximadamente a los 40 días de su cultivo entra en fase de floración. Es además una planta que, a pesar de presentar elevada demanda hídrica y nutritiva, puede adaptarse bastante bien a situaciones de sequía y escasez de nutrientes (Delgado, 1992), gracias, fundamentalmente, a su bien desarrollado sistema radical (gran profusión de ramificaciones, raíces secundarias muy finas y largos pelos radicales). Es bien conocido que la eficacia de una planta en la absorción de nutrientes depende, entre otras cosas, de su superficie de captación. Las plantas capaces por sí mismas de absorber nutrientes, especialmente si éstos son inmóviles, suelen ser menos dependientes a la formación de la micorriza (Bundrett, 1991). Por todo ello el girasol no era, en principio, una planta de la que se esperara fuese muy dependiente a la micorriza, ya que, en principio, no necesitaría de esta asociación. En este sentido, Koide (1985a) había descrito incluso, la existencia de depresiones transitorias del crecimiento, como consecuencia de la formación de la micorriza que, no obstante, eran superadas con el tiempo.

Nuestros resultados, tanto a nivel de la medida del grado de dependencia del girasol a la micorriza, como a nivel del estudio de su morfología radical, indican, sin embargo, que nos hallamos frente a una planta que saca provecho de la asociación simbiótica, aún sin depender absolutamente de ella, ésto es, ante una micótrofa facultativa (Hayman, 1983).

Para bajos niveles de fertilización, el girasol se micorriza de manera importante, resultando esta simbiosis altamente beneficiosa para la planta, que supera con creces a las no colonizadas, tanto en su contenido en nutrientes (especialmente, P) como en sus parámetros vegetativos. Conforme se incrementa la fertilización, sin embargo, los beneficios reportados por la asociación se hacen menores, pudiendo llegar a ser, en ocasiones, incluso negativos (nivel 250). Sin embargo, aún en esos casos en los que el coste de la simbiosis se iguala o es superior al beneficio que ésta reporta, la colonización fúngica, se ve limitada, pero no eliminada por completo. El girasol mantiene la micorriza bien sea porque la planta obtenga, incluso en esos casos, algún tipo de beneficio de la asociación, o bien porque el coste de su mantenimiento sea menor que el beneficio que la planta pudiera obtener si, por un cambio en las condiciones

que la rodean, la simbiosis volviese a resultar rentable. A niveles muy altos de fertilización fosforada, nuestros resultados indican que la simbiosis otorga ventaja, de nuevo, a las plantas que la presentan, con respecto a las que no.

Los resultados obtenidos para el máximo nivel de fertilización parecen apuntar hacia la existencia de algún tipo de interacción entre el fósforo, el hierro y el zinc. Es bien conocido el antagonismo P/micronutrientes (tipo Fe, Cu, Mn y Zn) con respecto a su captación por las plantas (Cakmak y Marschner, 1986).. Igualmente, existe un buen número de estudios en los que las micorrizas consiguen superar estas incompatibilidades, proporcionando a la planta un mejor status nutritivo en estos oligoelementos, especialmente en los mas inmóviles (Azcón-Aguilar y Gianinazzi-Pearson, 1991). En nuestro caso, la combinación de un fuerte incremento en la absorción de Fe por parte de la micorriza, junto con la atenuación del descenso, mediado por el P, en el contenido de Zn en la planta colonizada, parecen ser las dos claves del mayor desarrollo vegetativo obtenido en el tratamiento M 375. Con respecto al hierro, se ha descrito en repetidas ocasiones la capacidad de la micorriza de solubilizar fuentes poco accesibles de este nutriente, facilitando así su absorción por la planta (Watteau y Berthelin, 1990; Kothari *et al.*, 1991; Treeby, 1992; Bavaresco y Fogher, 1992). En cuanto al Zn, está ampliamente documentada la influencia positiva de la simbiosis en la captación de este micronutriente (Tinker y Gildon, 1983; Faber *et al.*, 1990; Kothari *et al.*, 1991; Wellings *et al.*, 1991; Sharma y Srivastava, 1991), que es, además muy inmóvil, y cuya deficiencia afecta al balance hormonal de la planta.

En cualquier caso, el girasol debe de mantener continuamente un control estricto sobre esta asociación, de manera que permita, dependiendo de cada situación, la entrada, o no, en funcionamiento de la simbiosis, y la consiguiente adaptación de la planta a su nuevo estatus fisiológico. Se han descrito dos niveles en los que tendría lugar esta regulación: el primero sería un control sobre el establecimiento de la simbiosis, permitiendo, o no, la entrada del hongo. El segundo nivel sobre el que parece actuar la planta consistiría en la regulación de la expansión del hongo en la raíz y, sobre todo, sobre su actividad.

Como consecuencia de la colonización fúngica, la raíz de girasol se transforma en micorriza modificando su arquitectura radical. La longitud de sus raíces secundarias aumenta, pero, al mismo tiempo, disminuye su grosor, es decir, la micorrización les atribuye un carácter mas adventicio, lo que coincide con lo ya descrito en la literatura (Berta, 1990; Hetrick, 1991). Simultáneamente, la raíz principal de esta planta, sufre un proceso de readaptación a su nuevo estatus simbiótico, de manera que su L.R.E. presenta una tendencia a disminuir con respecto a la raíz, es decir, este órgano vegetal se engrosa. Con ello se facilita que el incrementado flujo de nutrientes, consecuencia de una captación mas efectiva por la micorriza, se transporte hacia la parte aérea (Hetrick, 1991).

Podemos decir, por tanto que, pese a ser autosuficiente, el girasol acepta, y es capaz de "autorregular" (Hayman, 1983) la simbiosis micorrícica (Koide, 1985a), se adaptándose rápidamente a su nuevo status nutricional, especialmente a niveles bajos de fertilización, tal vez por su elevada demanda nutritiva. Podemos incluir, por tanto, al girasol, dentro de las plantas que han desarrollado mecanismos específicos de regulación que les permite hacer a la simbiosis funcional sólo cuando obtienen beneficio de ella (Koide y Li, 1990).

La plasticidad de la formación de la micorriza en el caso del girasol contrasta con la rigidez de su formación en la cebolla, planta micótrofa estricta, cuya llegada a la etapa de madurez parece hallarse condicionada por la formación de esta asociación simbiótica. Puesto que la tendencia evolutiva de las plantas parece ser la autosuficiencia, deberíamos considerar al girasol como una planta mas evolucionada que la cebolla, hecho que, de ser cierto, habría de reflejarse a diversos niveles.

Nos enfrentamos, por tanto, en nuestros estudios, a dos plantas con diferentes estrategias nutricionales y simbióticas. Pero, ¿se mantendrán estas diferencias a nivel de los procesos intrínsecos de la simbiosis, y, más concretamente, a nivel de las presuntas alteraciones fisiológicas provocadas por proceso de intercambio de nutrientes? A esta pregunta intentaremos dar respuesta a continuación.

Se considera que una micorriza no comienza a ser funcional hasta que la colonización radical del hongo no llega a la etapa de formación de arbusculos activos (Bonfante-Fasolo, 1984; Gianinazzi-Pearson y Azcón-Aguilar, 1991). Como ya se ha dicho en la Introducción, el arbusculo es la expresión máxima de la integración de los simbioses (Bonfante-Fasolo y Scannerini, 1992) y donde se asume que tienen lugar los procesos de comunicación mas íntima entre hongo y planta a los niveles mas básicos: metabólico y genético. Según se ha visto también, las interfases arbusculares son los sitios con mayor probabilidad para que tenga lugar el intercambio de nutrientes (Cox y Sanders, 1974; Dexheimer, Gianinazzi y Gianinazzi-Pearson, 1979; Marx et al., 1982; Gianinazzi-Pearson y Azcón-Aguilar, 1991), puesto que las condiciones físicas del resto de las interfases que se forman en la micorriza (las de las hifas intercelulares) parecen menos adecuadas, al presentar mayores barreras físicas (paredes gruesas del hongo, recubrimiento de glucanos, etc.). Además, un esfuerzo diferenciador como el realizado por parte del hongo con la formación de sus arbusculos, debe ir encaminado a la utilización de éstos como órganos especializados en el intercambio simbiótico. La interfase arbuscular parece ser, por lo tanto, lugar privilegiado para el estudio de las bases fisiológicas del establecimiento y funcionalidad de la simbiosis micorrícica.

En el presente estudio se han empleado, por vez primera, membranas de la MA como material básico de estudio. El protocolo de extracción utilizado, empleado hasta el momento únicamente para la extracción de membranas de células vegetales en cultivo *in vitro* (Ferrol, 1991) o raíces (Roldán, 1988; Rodríguez, 1988; Burgos, 1993), ha demostrado también su eficacia en el caso de las micorrizas. Las vesículas de membrana del extracto microsomal que se obtienen a partir de ellas son mixtas, ya no sólo porque sean un compendio de diferentes membranas celulares, tales como plasmalema, tonoplasto, membrana mitocondrial, etc., sino porque son, además, membranas procedentes de los dos microorganismos integrantes de la simbiosis, como así lo atestigua la presencia del ácido graso 16:1 (11-cis). Este compuesto, específico, aparentemente, de hongos (Nagy *et al.*, 1980; Nordby *et al.*, 1981), que Pacovsky y Fuller (1988), y, de nuevo, Pacovsky (1989b) pusieron de manifiesto como compuesto típico de la simbiosis en trabajos realizados con homogenados de micorrizas, aparece también en nuestros aislados de membrana, indicándonos que debe ser, igualmente, un constituyente específico de la misma. Puesto que este ácido graso no aparece nunca en los extractos microsomales de las raíces testigo, se le podría considerar como un marcador típico de la membrana del hongo arbuscular.

En principio, es lógico pensar que, mediante el método de extracción empleado, las membranas arbusculares y periarbusculares pasarían fácilmente a formar parte del extracto microsomal obtenido, ya que, en esas zonas, apenas si están cubiertas de pared celular que las proteja o a la que quedar adheridas, por lo que tendrían menor probabilidad ser arrastradas junto con ella y perderse. Así mismo, las membranas de las vesículas, al ser éstas unas formaciones globosas, serían, teóricamente, más fáciles de romper y obtener.

Por el contrario, las estructuras que, a priori, presentarían mayor dificultad de extracción serían las hifas intercelulares. Su estructura cilíndrica, de pequeño diámetro, y la presencia de una pared, bastante gruesa aún, hace temer por su eliminación en la primera centrifugación del proceso (13000 x g). Podríamos asumir, por tanto, que nuestros extractos microsomales de micorrizas estarían enriquecidos en plasmalema de la interfase arbuscular y, en su caso, en membrana vesicular.

En nuestros resultados, el total de ácidos grasos de los extractos microsomales de micorriza se encuentra incrementado con respecto al correspondiente a las raíces control. Esto se puede traducir directamente en un incremento en el total de membranas de unas con respecto a las otras (el 90% del los ácidos grasos totales de membrana forman parte de los fosfolípidos de membrana). Los incrementos no se detectan antes de los 30 días de cultivo, es decir, su aparición coincide con la etapa de máxima formación arbuscular, en la que la síntesis de nueva membrana ha de ser también máxima.

Estos incrementos en la cantidad de membrana, detectados ahora por primera vez mediante evidencias bioquímicas, eran, en cierto modo, esperados (Alexander *et al.*, 1988;

Bonfante-Fasolo y Scannerini, 1992), por cuanto reflejan el progreso de la colonización radical por parte del hongo arbuscular. El aumento en la superficie de membrana no resulta, sin embargo, tan acusado como hacían presumir las estimaciones previas, realizadas por algunos autores (Alexander *et al.*, 1988).

Asumiendo resultados obtenidos por Bielby (1980) para otro hongo arbuscular, *Acaulospora laevis*, en las que el ácido graso 16:1 (11-cis) suponía un 52.5% del total de ácidos grasos de la espora, obtenemos que, en el caso del girasol, el porcentaje total estimado de ácidos grasos de origen fúngico en las membranas de las micorrizas incrementa al mismo tiempo que lo hace el porcentaje de colonización radical: 7.4 a los 40 días (40.2% de colonización); 11.4% a los 50 (49.3%) y 15.0% a los 63 días (71.0%). En el caso de la cebolla sólo podemos manejar un dato estimativo, un 15.6% de ácidos grasos totales de origen fúngico a los 63 días de cultivo, en los que se había cuantificado un 87.3% de colonización mediante la tinción con azul tripán (Philips y Hayman, 1970) y posterior recuento de intersecciones (Giovanetti y Mosse, 1980). Según esto, el ácido hexadecanoico (11-cis) podría ser empleado como un marcador bioquímico adecuado para cuantificar la colonización fúngica de la micorriza a lo largo del tiempo por métodos bioquímicos. Diversos autores han señalado el alto interés que presentaría esta cuantificación por un método en el que se eliminase totalmente el margen, siempre existente, de subjetividad del operador, y que resultase, a la vez, menos laborioso que los empleados actualmente (Schmitz *et al.*, 1991; Frey *et al.*, 1992). Los esfuerzos realizados hasta la fecha en este sentido, sólo han tenido un éxito relativo y variable, por lo que el método propuesto ahora podría significar una buena alternativa.

Los porcentajes de ácidos grasos de origen fúngico obtenidos respecto al total de membranas de la micorriza son, además, consistentes con las estimaciones que se tenían hasta la fecha sobre la biomasa fúngica relativa de la micorriza, que arrojan unos valores de entre un 5 y un 20% del peso total de la misma (Smith y Gianinazzi-Pearson, 1988).

Aunque no hemos de perder de vista que nuestro incremento en la cantidad de membrana no tiene por qué deberse sólo al plasmalema, puesto que los microsomas son, en realidad, un compendio de diversas membranas celulares que se ven también alteradas en el proceso de colonización (ver Introducción), sí cabría esperar que, a lo largo de este proceso, el aumento relativo de plasmalema sea más importante que el del resto (Alexander *et al.* 1988). El incremento en la superficie de esta membrana en las micorrizas con respecto a las raíces ha de ser atribuido, por una parte, al aporte que el hongo hace de la suya, especialmente a nivel arbuscular, y, por otra, al crecimiento que experimenta en la planta, al verse invaginada por la progresión de las hifas. Si continuamos asumiendo los porcentajes obtenidos por Bielby (1980), podríamos realizar una estimación de la parte de ese incremento de membrana que correspondería, respectivamente, al hongo y a la planta. Así obtenemos que, por ejemplo, para la micorriza de girasol de 63 días, de los 14.6 µg de ácidos grasos totales/g.p.h. que están en

exceso con respecto a la raíz control, 8.8  $\mu\text{g}$  (60.3%) corresponderían al hongo, y 5.8  $\mu\text{g}$  (39.7%) a la proliferación de la membrana vegetal. En el caso de la cebolla, para el mismo tiempo (60 días), de los 34.2  $\mu\text{g}$  de ácidos grasos totales/g.p.h. en exceso, 20.7  $\mu\text{g}$  (60.5%) serían de naturaleza fúngica, y los 13.5  $\mu\text{g}$  restantes (39.5%), de origen vegetal. Estos datos no dejan de ser interesantes, puesto que coinciden con lo esperado, es decir, con un mayor esfuerzo proliferador de membranas por parte del micosimbionte. La similitud entre los resultados obtenidos para las micorrizas de girasol y cebolla parecen confirmar la bondad de nuestras estimaciones.

Resulta, asimismo, muy curioso observar cómo, tanto en el caso de la micorriza de girasol como en la de la cebolla, los incrementos obtenidos en membrana son máximos justo en la determinación anterior a la detección de la presencia del hongo (30 días, girasol; 40, cebolla). Este hecho podría deberse a que, en ese tiempo, que coincide con la fase exponencial de proliferación arbuscular, el hongo induzca la formación de elevadas cantidades de membrana vegetal. Muy probablemente, la membrana del hongo estuviera aportando también sus ácidos grasos en esta cuantificación; sin embargo, la no detección del 16:1 (11-cis) en estos estadios, hace que ésto quede en mera especulación.

En un primer momento, podríamos pensar que la no detección de este marcador de membrana fúngica en estos tiempos tempranos fuese debida a una falta de sensibilidad del cromatógrafo empleado. Sin embargo, este argumento parece poco convincente, puesto que ya para entonces contamos con niveles considerables de colonización radical (19.7% en girasol; 47.2% en cebolla), en los que, además, se están detectando cantidades muy pequeñas de otros ácidos grasos. Tal vez, una explicación más razonable consista en que el ácido hexadecanoico (11-cis) sea un metabolito fúngico de aparición tardía, coincidiendo, quizás, con la entrada del hongo en una fase de desarrollo concreta, de madurez. En cualquier caso, esta sugerencia debe ser confirmada mediante estudios en mayor profundidad.

Como se ha comentado en la Introducción, algunos autores han detectado cambios a nivel de los fosfolípidos de la micorriza con respecto a la raíz, en estudios realizados sobre homogenados de estos órganos vegetales. En estos estudios, se obtenía un incremento sustancial en su número (Cooper y Losel, 1978; Nagy *et al.*, 1980), así como diferencias en su calidad: incremento en las cantidades relativas de fosfatidil etanolamina y fosfatidil serina, ausencia de fosfatidil inositol y glucolípidos (Cooper y Losel, 1978; Bielby y Kidby, 1980). Ahora, mediante nuestros resultados, sabemos además que, en concreto, las membranas de la micorriza sufren modificaciones en la composición de sus ácidos grasos con respecto a las de las raíces control. El cambio principal consiste en la ya comentada aparición del nuevo ácido graso 16:1 (11-cis), que no aparece en las membranas de la raíz. Además, este cambio parece ir



acompañado de un incremento paralelo en los niveles de otros ácidos grasos: el palmítico (16:0), que aumenta ligeramente, el oléico (18:1) y el linoléico (18:2).

Resulta curioso observar cómo, aparte del 16:0, que se puede considerar como un precursor del 16:1, son principalmente los ácidos grasos insaturados (16:1, 18:1, 18:2) los que incrementan su cantidad en la micorriza. Este hecho, que ya había sido descrito por otros autores en estudios sobre el contenido total de lípidos en homogenado de raíz y micorriza (Pacovsky y Fuller, 1988; Pacovsky, 1989b), va a adquirir una nueva relevancia a la hora de aplicarlo al estudio de sus membranas.

La insaturación de las cadenas hidrocarbonadas de los ácidos grasos es uno de los factores íntimamente relacionados, y de los que depende, la fluidez de la membrana (Gómez-Fernández y Goñi, 1983). Es bien conocido que los dobles enlaces en posición *cis* (los habituales en la naturaleza) introducen pliegues permanentes en la cadena carbonada de los ácidos grasos, otorgando a los fosfolípidos que los presentan una conformación espacial distorsionada, que les lleva a ocupar una mayor superficie dentro de la bicapa lipídica. En general, podemos decir que el incremento en la insaturación de los ácidos grasos es uno de los factores que influiría en un aumento en la fluidez de la membrana, aunque no el único. Esta es una de las maneras por las que el tipo de ácidos grasos que presenta una membrana podría afectar a su estructura y propiedades (Yeagle, 1987).

El incremento en la fluidez de la membrana tiene gran influencia en numerosos procesos biológicos, entre los que cabe mencionar la adhesión y fusión de nuevas membranas a la ya preexistente, procesos de transporte transmembrana, así como en la alteración de la actividad de enzimas de membrana (Gómez-Fernández y Goñi, 1983). Estos hechos podrían tener unas implicaciones importantes a la hora de integrarlos en el proceso de intercambio de nutrientes hongo-planta a nivel de la interfase arbuscular.

La insaturación de los ácidos grasos de membrana favorece el intercambio de nutrientes transmembrana sin gasto de energía. Así, por ejemplo, el flujo pasivo de compuestos polares, tipo agua, a través de la bicapa lipídica se ve incrementado. También el transporte facilitado, ya sea a través de un transportador específico o a través de canales transmembrana, se ve beneficiado ante un incremento en la fluidez (Yeagle, 1987). Si a todo esto unimos que a nivel de la interfase arbuscular existen fuertes gradientes de concentración transmembrana de P (citoplasma fúngico > interfase) y de compuestos carbonados (citoplasma vegetal > interfase), podríamos encontrar una explicación razonable a la, de otra manera difícilmente justificable, facilitación en la salida, sin gasto de energía, de flujos considerables de P, por parte de las hifas arbusculares del hongo, y C, por parte de las células vegetales, hacia la interfase arbuscular.

La liberación de P por parte del hongo podría estar mediada, entre otros, por un proceso de exocitosis masiva a nivel de las ramas arbusculares más finas, donde se observa, junto con la desaparición de los gránulos de poliP, un gran número de pequeñas vesículas. Esta

exocitosis, facilitada también por la fluidificación de las membranas de la micorriza, cumpliría, así, una doble misión: por una parte, aportar nuevas vesículas de membrana para el crecimiento del arbusculo, y por otra, liberar P, tal vez junto con otros nutrientes y señales, a la interfase.

En cuanto a la salida de C, se ha apuntado hacia la existencia de canales transmembrana que interviniesen en su liberación (Yeagle, 1987). Tanto en el caso del P como en el del C, ambos nutrientes, tras ser liberados a la interfase, son rápidamente retirados de ella por la captación de los respectivos simbiontes. Con ésto se consigue mantener el gradiente de concentración indispensable para el mantenimiento del intercambio nutritivo.

En cualquier caso, este incremento en la fluidez debería de ir acompañado, por la entrada en funcionamiento de algún otro mecanismo de permeabilidad selectiva en las membranas de la interfase arbuscular, que permita mantener un control estricto sobre el flujo de nutrientes.

Las membranas de la micorriza presentan unas proporciones relativas en sus ácidos grasos que son las que le confieren identidad propia. Aunque no se comprende aún hoy del todo el significado de una particular mezcla de lípidos constituyentes de la membrana, se sabe que su mantenimiento es crucial, para la preservación de su actividad (Yeagle, 1987). Al igual que las membranas vegetales o fúngicas por separado, las de la interfase arbuscular son membranas completamente funcionales, aunque modificadas para alcanzar el desarrollo óptimo de los procesos simbióticos.

Con respecto al segundo componente de las membranas, las proteínas, los resultados obtenidos, por el contrario de lo que ocurre con los ácidos grasos, arrojan un comportamiento diferencial importante entre las dos plantas estudiadas. Así, mientras que para girasol el proceso de micorrización no conduce a un incremento en el número de proteínas de membrana a lo largo del tiempo, en el caso de la cebolla, este incremento es patente, sobre todo a partir de los 40 días de cultivo. Esto, en un primer momento, parece apuntar a que, o bien en el caso de la micorriza de cebolla, el aumento en el número de proteínas correría a cargo de la planta, puesto que para el girasol, con el mismo hongo arbuscular, no existe tal incremento; o bien, a que en el caso del girasol, el número de proteínas aportado por la planta disminuiría, puesto que en su mantenimiento constante con respecto al control habría que incluir las proteínas aportadas por las membranas fúngicas. Lo más probable es que ambas explicaciones sean relativamente ciertas, y estén teniendo lugar a la vez.

Como se comentó en la Introducción, diversos autores han puesto de manifiesto toda una serie de cambios a nivel del patrón de polipéptidos en la micorriza, alguno de los cuales podrían hallarse asociados a membrana (Wyss *et al.*, 1990). Otros autores encontraron una redistribución de enzimas asociadas a membranas como la fosfatasa neutra (Jeanmarie *et al.*, 1985) y la H<sup>+</sup>-ATPasa (Marx *et al.*, 1982; Gianinazzi-Pearson *et al.*, 1991). Nuestros

resultados en este campo vienen a corroborar esa serie de alteraciones que el establecimiento de la micorriza induce, aunque, así mismo, apuntan hacia diferentes tipos de respuesta, dependiendo de los organismos integrantes de la simbiosis.

Según esto, si consideramos los cambios que se han producido en las membranas de la micorriza de girasol con respecto a la raíz, encontramos, por una parte, un incremento en la cantidad de sus ácidos grasos (hasta un 33%), y, por otra, el mantenimiento en el número de sus proteínas (incremento máximo, 7%), lo que nos lleva a pensar que la formación de la micorriza origina, en esta planta, unas membranas de alguna manera "diluidas" en proteínas. Sin embargo, en el caso de la cebolla, contaríamos con un incremento en los lípidos de membrana de la micorriza (ascenso de hasta un 35% en el número de ácidos grasos), pero también en proteínas de membrana (hasta un 29%), con lo que las proporciones lípidos/proteínas se mantendrían prácticamente constantes en este caso. El diferente comportamiento de ambas plantas en el mantenimiento de las proporciones de los diversos componentes de sus membranas, parece sugerir una estrategia diferente por parte de ambas en los procesos en los que estas membranas toman parte, entre los que se incluirían el transporte transmembrana y, como consecuencia, el intercambio de nutrientes, especialmente de P.

Nuestro interés en el estudio a nivel de las membranas se ha concentrado en la actividad del enzima  $H^+$ -ATPasa de plasmalema, como indicador fiable de la actividad asimiladora de nutrientes por la raíz. Los resultados obtenidos apuntan de nuevo hacia la sugerida estrategia diferencial de ambas plantas en los procesos que tienen lugar a nivel de membrana por la formación de la micorriza.

En el caso de la micorriza de girasol, la ligera, pero sostenida superioridad en la actividad ATPásica **específica** asociada al plasmalema con respecto a la raíz sugiere, bien un incremento en la actividad de este enzima, mediado por el establecimiento del sistema simbiótico, o bien que, en esas proteínas cuantificadas, la proporción de este enzima fuese mayor que la que presentara el control, es decir, que las membranas de la micorriza se encontrasen enriquecidas en él. Este último supuesto parece difícil de aceptar, puesto que ello supondría que, además de la ya comentada dilución de la membrana de la micorriza de girasol en proteínas, las que no fueran  $H^+$ -ATPasa estarían más diluidas aún, lo que parece, en principio, poco probable.

En el caso de la cebolla, la actividad específica de la  $H^+$ -ATPasa asociada a plasmalema es menor en la micorriza que en la raíz. Esta disminución, cuanto menos sorprendente, podría estar indicándonos que, dentro del incremento importante que la formación de la micorriza induce en el número de proteínas de membrana en esta planta, existiría un incremento proporcionalmente superior de proteínas no-ATPasas de plasmalema con respecto a las que sí lo son, de manera que al referir la actividad de éstas últimas al total de proteínas nos daría un valor diluido, y, por consiguiente, irreal. Esto sólo podría confirmarse mediante la realización de un

análisis cualitativo de las proteínas constituyentes de los microsomas de nuestros extractos de micorriza y raíz, con lo que se aclararían las dudas planteadas.

La actividad fisiológica de las H<sup>+</sup>-ATPasas de plasmalema parece ser, en el caso de la cebolla, un parámetro mucho más fiable. En un gramo de peso húmedo, la actividad fisiológica de la micorriza y la raíz es muy similar; sin embargo, gracias al fuerte incremento radical experimentado por la planta micorrizada, los valores de actividad total de la primera son muy superiores a los de la segunda.

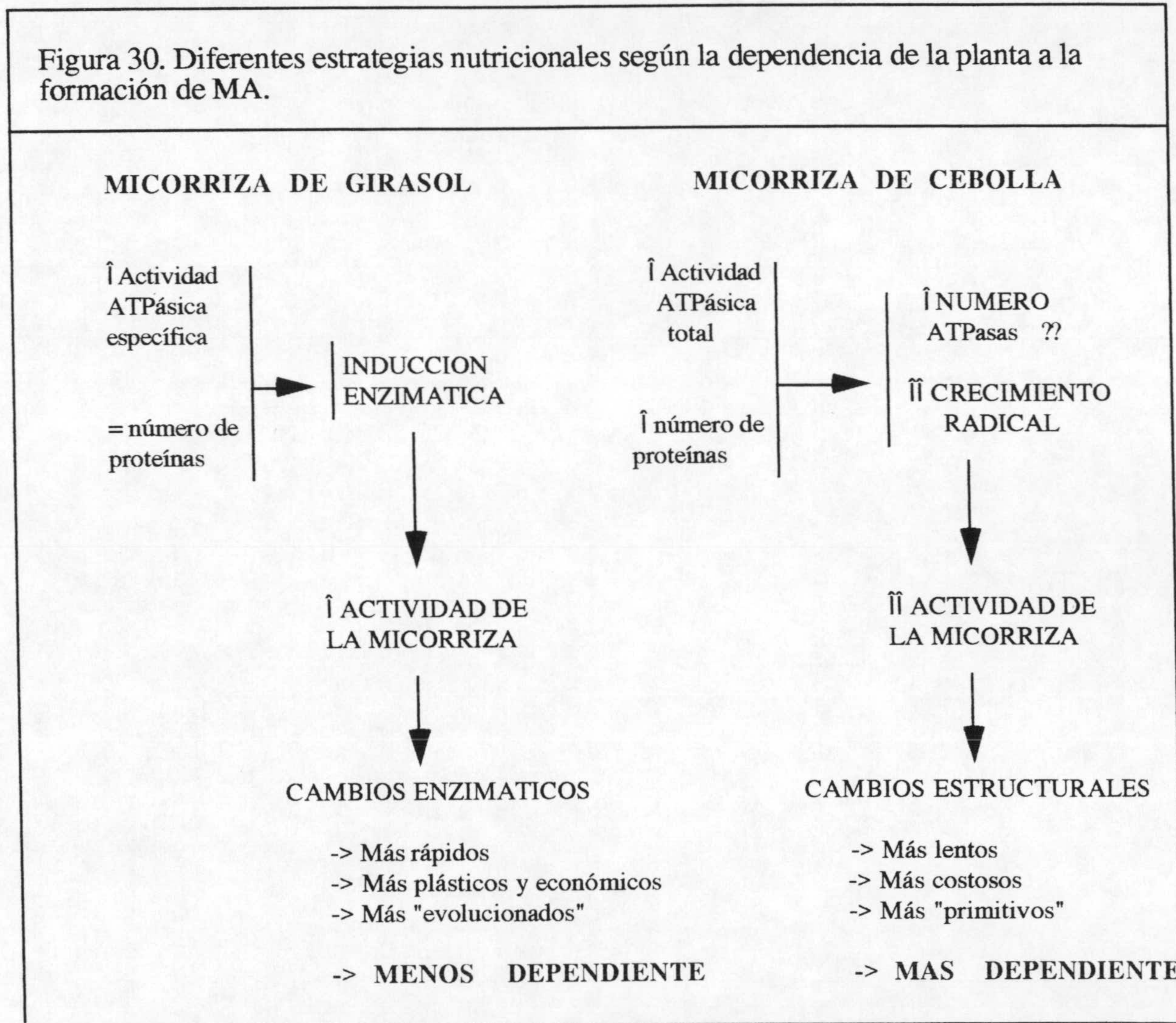
A pesar de que lo deseable para estos ensayos hubiera sido tener plantas del mismo porte, esto no se pudo conseguir en el caso de la cebolla. La fuerte micotrofia, y el elevado grado de dependencia que presenta esta planta a la micorriza, fuerzan a que la formación de ésta conlleve la aparición de diferencias inevitables con respecto a los controles sin micorrizar.

Por otro lado, en el caso del girasol sí se obtuvieron plantas de porte similar para la realización de estos ensayos. Sin embargo, queda la duda de que esto se debiera a una limitación en el desarrollo radical, inherente a la elevada densidad de siembra requerida para llevar a cabo las diversas extracciones de microsomas. Probablemente, en situaciones de menor competencia entre las plantas de un mismo día, se habrían obtenido, también para girasol, diferencias en tamaño a favor de las plantas micorrizadas, como, de hecho, había ocurrido en los ensayos de dependencia y morfología radical. Este hecho no debe de haber tenido influencia para esta planta en los datos de actividad específica y fisiológica, puesto que la colonización radical era muy buena, aunque tal vez sí en los de actividad total, en los que las diferencias entre micorrizas y raíces podrían haber sido superiores.

En cualquier caso, y aunque el porte obtenido para ambos tratamientos hubiese sido similar, el hecho de que la planta micorrizada sea un supra-organismo con respecto a una planta sin micorrizar, hace que, en realidad, ésta última no se pueda considerar nunca como el control óptimo en el estudio de la simbiosis. Decir que una micorriza es igual a una raíz más un hongo arbuscular, es afirmar algo falso, ya que la micorriza es una entidad diferente, pese a que cada uno de los simbiosiontes conserve en ella muchas de sus particularidades. En cualquier caso, la comparación entre micorriza y raíz es el modelo habitualmente empleado en la bibliografía, por lo que, en espera de un sustituto mejor, habrá que seguir empleándolo.

El resultado de lo anteriormente expuesto es que, tanto la micorriza de girasol como la de cebolla presentan, con respecto a sus raíces control, una activación de su proceso captador de nutrientes, representada por el incremento en la actividad H<sup>+</sup>-ATPásica asociada a plasmalema. Sin embargo, cada planta llega a establecer ese incremento mediante estrategias distintas (Figura 30): en el caso del girasol, lo hace manteniendo constante el número de proteínas, pero aumentando su actividad específica; en el de la cebolla, incrementando la cantidad de proteínas y promoviendo el crecimiento radical. En esta última planta, la activación

de la micorriza alcanza un carácter mas generalizado, debido al aumento paralelo que se produce en la actividad ATPásica asociada a tonoplasto y membrana mitocondrial. Estos incrementos sugieren aumentos tanto en la tasa respiratoria como en su actividad vacuolar (ATPasas de tonoplasto y mitocondria) como, de hecho, habían puesto de manifiesto diversos autores.



El aumento de la actividad ATPásica de plasmalema se podría considerar como el método elegido por la micorriza para mantener y reforzar la permeabilidad selectiva en la interfase celular, a la que nos referíamos ántes. Así, en el caso de las células vegetales colonizadas por arbusculos, Gianinazzi-Pearson y colaboradores (1991) observaron, mediante técnicas citoquímicas, una redistribución de las H<sup>+</sup>-ATPasas de plasmalema, que parecían pasar a disponerse, preferentemente en la membrana periarbuscular, apoyando así la hipótesis de la

configuración de dos "dominios" celulares de la membrana periarbuscular (Smith y Smith, 1990). Teniendo en cuenta nuestros resultados, el incremento que estas enzimas propiciarían en la extrusión de protones hacia la interfase arbuscular, daría lugar a una hiperpolarización de la membrana periarbuscular, es decir, a que la diferencia entre ambas caras de ésta se hiciese más negativa (Figura 31). Esta hiperpolarización, que ha sido también detectada por otros autores mediante medidas directas con microelectrodos (Scannerini *et al.*, 1990), convierte a esta membrana en una barrera "impermeable" a los iones, por lo que éstos tendrán que acudir a mecanismos de transporte activos, controlados, por lo tanto, por la H<sup>+</sup>-ATPasa, para su paso a través de ella. Este sería, probablemente, el caso de la captación por la célula vegetal del P liberado a la interfase por las hifas fúngicas. Sin embargo, el transporte de las moléculas sin carga no se vería afectado, en principio, por esta "impermeabilización". Así, los compuestos de carbono exudados por la célula vegetal saldrían al exterior sin dificultad, de forma pasiva, aprovechando que el incremento en la fluidez de la membrana periarbuscular y el gradiente favorable citoplasma/interfase estimularía el funcionamiento del transporte facilitado.

En el caso de la membrana del hongo, los mismos autores de antes (Gianinazzi-Pearson *et al.*, 1991) encontraron una considerable menor presencia de H<sup>+</sup>-ATPasas de plasmalema a nivel arbuscular. Según lo ya planteado, esto significaría que esa membrana no presentaría el mismo carácter de "impermeabilidad" al paso de iones que en el caso de la periarbuscular, lo que, junto al aumento en su fluidez y el gradiente favorable citoplasma/interfase, podría favorecer la salida de P a la interfase, además de por exocitosis, por algún otro mecanismo facilitado (Figura 31). Una vez en la interfase, el P sería recaptado activamente por la célula vegetal, con lo que se mantendría el gradiente de concentración favorable.

Con respecto a la captación de los compuestos de C por parte del hongo, el incremento en la fluidez de la membrana, junto con el gradiente interfase/citoplasma fúngico, mantenido por la inmediata conversión de dichos compuestos en lípidos y glucógeno una vez en el interior de las hifas (Figura 31), sería suficiente para explicar su paso al interior del hongo mediante un transporte facilitado. Por tanto, no sería imprescindible la entrada en funcionamiento de un transporte activo, lo que explicaría la menor presencia de H<sup>+</sup>-ATPasas en la membrana arbuscular, aunque las existentes en su plasmalema, podrían acelerar este transporte (Yeagle, 1987).

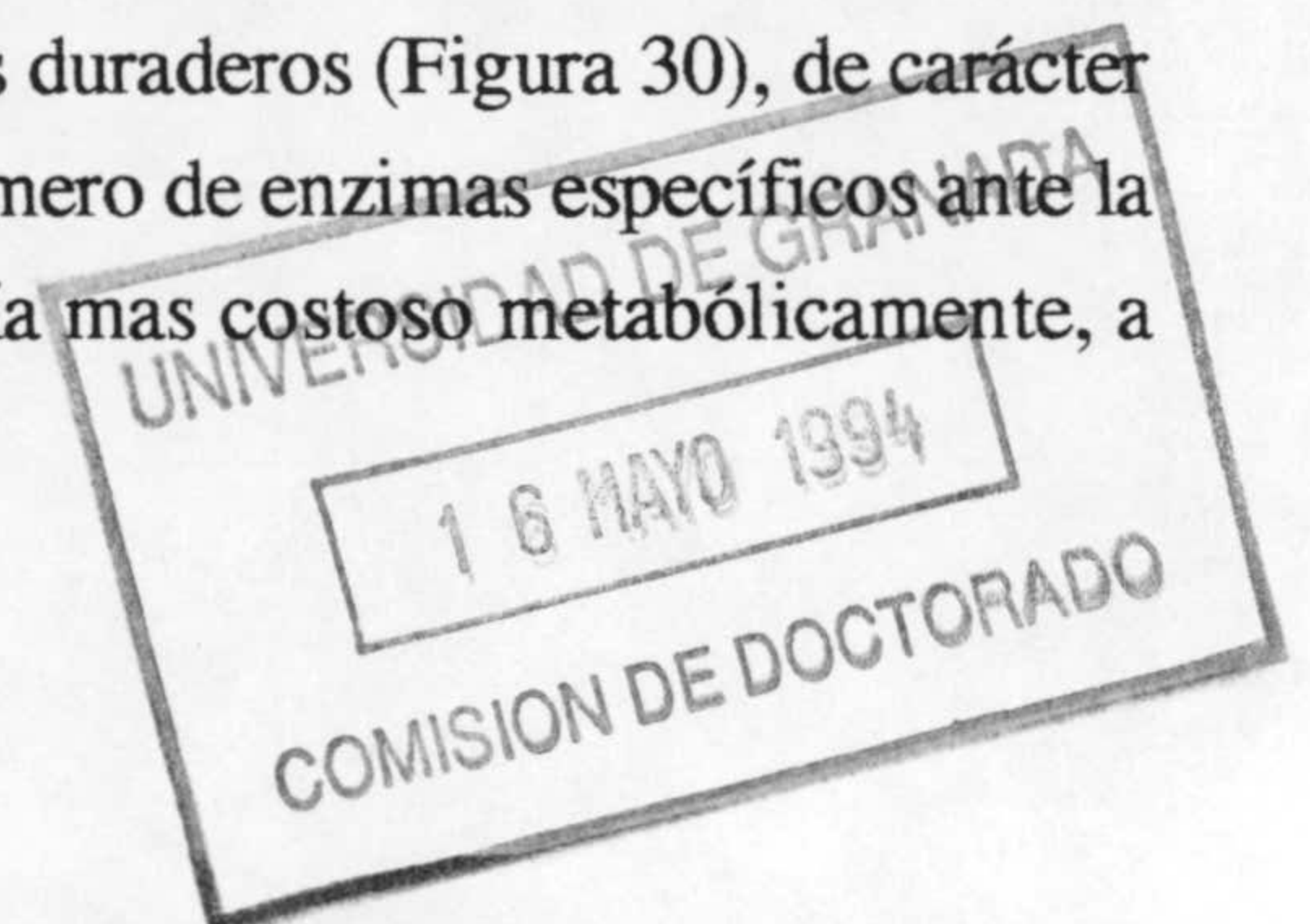
La menor eficacia del mecanismo captador de nutrientes carbonados por parte del hongo (facilitado) con respecto al transporte activo empleado por la planta para la captación de P, estaría, en parte, contrarrestada por el aumento en la superficie de membrana que supone la formación del arbusculo. El esfuerzo diferenciador y metabólico que la formación de éste supone para el hongo, se vería compensada así con el incremento en captación que le reporta. Según todo esto, sigue resultando más coherente aceptar que la captación de compuestos de C

por el hongo tiene lugar a nivel arbuscular, en contra de lo sugerido por algunos autores (Gianinazzi-Pearson *et al.*, 1991).

El control ejercido por ambos simbioses sobre el intercambio de nutrientes, les diferencia definitivamente de las asociaciones parasíticas, en las que uno de los componentes pierde su capacidad en beneficio del otro. Algunos autores han descrito la fluidificación de la membrana+la pérdida de su actividad ATPásica (=pérdida del control sobre la permeabilidad) como el mecanismo base del establecimiento del fenómeno parasítico (Gay y Woods, 1987). En el caso del establecimiento de la micorriza, también se incrementa, en cierta medida, la permeabilidad transmembrana, pero sin que ninguno de los dos simbioses llegue a perder nunca el control sobre el flujo de nutrientes. Esto va a permitir el establecimiento de un intercambio **bidireccional** de los mismos, lo que se puede considerar como la característica mas relevante de una simbiosis mutualista (Smith y Smith, 1990; Gianinazzi-Pearson y Azcón-Aguilar, 1991; Bonfante-Fasolo y Scannerini, 1992; Gianinazzi-Pearson y Smith, 1993).

La sensibilidad que requieren todos estos mecanismos de control de la simbiosis, nos da idea de la profundidad que debe alcanzar esta integración entre los componentes de la misma. El diálogo molecular entre ambos ha de ser constante, aunque los mecanismos de que se valen para ello son, aún hoy, desconocidos. Se ha sugerido para ello, el intercambio de señales químicas que actúasen como mensajeros entre ambos. Así, por ejemplo, se conoce que ciertas hormonas estimulan el desarrollo y efectos de la micorrización (Azcón *et al.*, 1978), específicamente a nivel de la formación de arbusculos (Gunze y Hanney, 1980). Por otra parte, se ha puesto de manifiesto que ciertos hongos arbusculares tienen la capacidad de exudar sustancias con actividad auxínica, giberelínica y citoquinínica cuando son cultivados *in vitro* (Barea y Azcón-Aguilar, 1982). Algunos estudios (Hager *et al.*, 1991) señalan precisamente a las auxinas como activadoras, tanto de la exocitosis celular, mecanismo supuestamente empleado por las células para la proliferación de sus membranas (Lodish y Rothman, 1979; Yeagle, 1987), como de la H<sup>+</sup>-ATPasa de plasmalema. El mecanismo de actuación del que se valdría esta hormona, consistiría en una alteración en la actividad de la maquinaria genética de las células afectadas (Hager *et al.*, 1991).

Según estamos viendo, parece existir una elevada correlación entre el grado de dependencia de una planta a la formación de la micorriza, y su estrategia en la captación de nutrientes. Este carácter de dependencia es intrínseco a cada planta, de manera que se halla inscrito en su información genética. Así, una planta micótrofa obligada (caso de la cebolla), tras ser micorrizada, tendería a llevar a cabo cambios fisiológicos duraderos (Figura 30), de carácter mas bien estructural, como podría ser el incremento en el número de enzimas específicos ante la formación de la micorriza. A pesar de que este cambio sería mas costoso metabólicamente, a



largo plazo le resultaría rentable, puesto que, por su elevada dependencia esta planta no puede renunciar a su nuevo status micorrícico durante el resto de su ciclo de vida. Sin embargo, en el caso de plantas cuya asociación al hongo arbuscular no fuese tan necesaria para su subsistencia, es decir, las micótrofas facultativas (caso del girasol), la activación mediada por el establecimiento de la micorriza, sería también mas plástica, con cambios que fuesen menos costosos y mas fácilmente reversibles que la creación de nuevos enzimas, como sería el caso, por ejemplo, de una inducción enzimática (Figura 30).

En cualquier caso, aún queda mucho por estudiar en este campo de la comunicación entre los simbioses. Los estudios que se están iniciando ahora en el campo de la genética y la biología molecular de la micorriza serán, con toda probabilidad, piezas clave para la total comprensión del equilibrio estable, pero a la vez dinámico, que se establece entre sus componentes.

La transformación de la raíz en micorriza lleva asociada cambios en la regulación del pH de ésta última. La activación que tiene lugar en las  $H^+$ -ATPasas, ha de condicionar, necesariamente, el incremento en la extrusión de protones por parte de las células afectadas (Serrano y Villalba, 1993), con la consiguiente acidificación del medio en el que ésta se produzca. Las zonas mas afectadas por esta acidificación deben coincidir con las encargadas del transporte e intercambio de nutrientes transmembrana, ésto es, las interfases arbusculares y la micorrizosfera.

Con respecto a las primeras, como han sugerido algunos autores, el espacio apoplástico situado entre las membranas de ambos simbioses, ha de ser ácido (Smith y Smith, 1990). Esta acidificación se ve controlada por la reincorporación de  $H^+$ , utilizados para la captación de nutrientes en procesos de simporte o antiporte. Además de este transporte activo secundario, han de existir toda una serie de mecanismos para el mantenimiento de la diferencia de potencial transmembrana, así como del pH citoplásmico, del que depende la actividad de numerosos enzimas, entre ellos, la  $H^+$ -ATPasa de plasmalema. Entre estos mecanismos de regulación cabría destacar los flujos de  $K^+$ , la rápida conversión de los iones captados en moléculas osmótica y eléctricamente inactivas, la excreción de ácidos orgánicos, etc. (Smith y Smith, 1990). El control del "microambiente ácido" en que se convierte la interfase arbuscular debe, en fin, encontrarse fuertemente mediatizado por los nutrientes que se intercambien los simbioses, y por su diálogo molecular. Los mecanismos utilizados para ello han de ser objeto de un estudio mas profundo.

Con respecto a la micorrizosfera, los resultados que hemos obtenido mediante el empleo de las técnicas de geles de agarosa+púrpura de bromocresol, muestran unos fuertes halos de acidificación del suelo adyacente a la micorriza madura (plantas de 60 días). Es bien conocido



que algunas plantas utilizan la acidificación de su rizosfera como estrategia captadora de nutrientes poco móviles, mediante lo que consiguen su movilización, de otro modo difícil. Plantas como el lupino (*Lupinus albus* L.) promueven modificaciones morfológicas especializadas en sus raíces (las llamadas "raíces proteoides"), cuya misión consiste en la creación de un pH ácido en el suelo, probablemente mediante la excreción de ácidos orgánicos (Marschner *et al.*, 1986; Dinkelaker *et al.*, 1989), que favorece la movilización de fuentes, especialmente de P, y otros nutrientes inmóviles, de otro modo difícilmente accesibles.

Podemos pensar que algo similar está ocurriendo en el caso de la micorriza. La acidificación de la micorrizosfera, bien sea mediante un incremento en los flujos de  $H^+$ , mediados, a su vez, por la activación de las  $H^+$ -ATPasas, o por la exudación de algún tipo de ácidos orgánicos, o por ambos mecanismos a la vez, puede resultar una de las estrategias empleadas por la micorriza frente a la raíz para resultar más competitiva a la hora de movilizar y captar nutrientes del suelo. En este proceso de acidificación estarían implicadas todas las nuevas superficies captadoras de nutrientes en la micorriza, es decir, las células vegetales epidérmicas y el micelio externo emitido por el hongo. Este último colaboraría, con mucha probabilidad, en la creación de la micorrizosfera ácida, como, de hecho, han obtenido ya algunos autores (Li *et al.*, 1991a y b), probablemente por la activación de  $H^+$ -ATPasas que, al igual que ocurría con las de la membrana periarbuscular, estarían implicadas en la captación de iones del suelo, como el fosfato o el amonio. El que los resultados de nuestros estudios sobre la visualización directa de la acidificación de la hifosfera *in vitro* por el micelio emitido por esporas de *Glomus mosseae* fuesen negativos (no acidificación, o no detección de la misma) no descarta la actividad fúngica en este sentido, ya que, al igual que raíz y micorriza son dos entidades diferentes, con más razón lo son el hongo, creciendo en cultivo axénico, o en simbiosis.

Con respecto a los cambios en el pH según de la fuente de N aplicada, en estudios llevados a cabo sobre plantas no micorrizadas mediante este tipo de técnicas, diversos autores obtenían una acidificación de la rizosfera cuando la fuente de N se aplicaba en forma de  $NH_4^+$ , y una alcalinización importante de la misma cuando se hacía en forma de  $NO_3^-$  (Marschner y Römheld, 1983; Marschner *et al.*, 1986). Estos comportamientos eran atribuidos a la necesidad del mantenimiento de un balance iónico por parte de la raíz, de manera que la entrada de un catión, como el amonio, originaría una salida simultánea de protones (simporte), que contrarrestaran el desequilibrio iónico originado. Por el mismo sistema, la captación de aniones (como el nitrato), iría acompañada de una salida de protones (antiporte) para mantener el equilibrio iónico radical.

En nuestros estudios, mediante la aplicación de estas técnicas por primera vez a plantas micorrizadas, se obtiene que la alteración provocada en el suelo afectado por la micorriza, es siempre más intensa que en el caso de la raíz. Con respecto al aporte de amonio, ya a las cuatro semanas de cultivo, la micorriza presenta un halo de acidificación intenso que no aparece en la

raíz sin colonizar, diferencias que se hacen mas intensas y extensas tras 8 semanas de cultivo. Estos resultados nos vendrían a decir que la micorriza está captando ese amonio del suelo mas eficazmente que la raíz, y, por lo tanto, la necesidad de extrusión de  $H^+$  para mantener el balance iónico en ella, sería mayor.

Con respecto a los resultados obtenidos para plantas, micorrizadas o no, cuyo aporte de N en el suelo se hacía a través del ión  $NO_3^-$ , tras cuatro semanas de cultivo se apreciaron incrementos en el número y la extensión de zonas de alcalinización micorrizosférica con respecto a las producidas por la raíz, lo que indicaría una inequívoca mayor eficiencia en la captación de este ión por parte de la micorriza.

Mientras que el incremento en la capacidad captadora de  $NH_4^+$  por la micorriza frente a la raíz ha sido sobradamente establecido (Ames *et al.*, 1983, 1984; Barea *et al.*, 1987; Johansen *et al.*, 1992; George *et al.*, 1992), lo que parece lógico desde el punto de vista de que éste es un ión muy poco móvil en la solución del suelo, en el caso de los estudios realizados con  $NO_3^-$ , los resultados obtenidos por diversos autores han sido mucho mas variables. En principio, parece difícil de comprender que la eficacia de la micorriza varíe con respecto a la de la raíz en el caso de un ión de alta movilidad, frente al que la planta tendría, teóricamente, pocas dificultades de captación. Sin embargo, no hay que olvidar que la superficie captadora de la micorriza supera con mucho a la de la raíz, por lo que la tasa de entrada del ión tendría que estar en ella, lógicamente, incrementada, y, por consiguiente, también lo estaría la necesidad de balance iónico.

En las pruebas a largo plazo (8 semanas), sin embargo, la incrementada alcalinización micorrizosférica se transformaba en los ya comentados halos de acidificación en las micorrizas, sin que éstos aparecieran a nivel de las raíces control. La estrategia del establecimiento de una micorrizosfera ácida que facilitase la captación de otros iones del suelo, como P, podría ser la explicación de esta "inversión" del pH. El incremento en la extrusión de protones o ácidos orgánicos provocado por la micorriza, podría estar enmascarando, de algún modo, la compensación iónica producida por la captación del nitrato.

En nuestros estudios, por tanto, parece constatarse un incremento en las capacidades de captación de nutrientes, por parte de la micorriza mediante distintas estrategias que incluyen alteraciones morfológicas y estructurales, fisiológicas y bioquímicas y, muy probablemente, genéticas. La necesidad del conocimiento mas profundo de todas ellas y, particularmente de las últimas hacen que se abra un amplio campo en el estudio de las micorrizas arbusculares, tal vez la simbiosis mas generalizada de nuestro mundo, y, paradójicamente, una de las menos conocidas.

**CONCLUSIONES**

## CONCLUSIONES

- 1.- El girasol es una planta micótrofa facultativa, capaz de regular, tanto estructural, como bioquímicamente, su estado simbiótico o la operatividad de su micorriza.
- 2.- La colonización por el hongo micorrícico modifica la morfología radical del girasol, adaptándola a los cambios en sus propiedades relacionados con la captación y transporte de nutrientes, provocados por su estado simbiótico.
- 3.- Se ha detectado, por métodos bioquímicos, un incremento en los componentes de las membranas de la micorriza con respecto a los de la raíz, lo que puede traducirse en un incremento en la superficie total de membrana.
- 4.- Al micorrizarse una raíz, sus membranas experimentan modificaciones cualitativas en los ácidos grasos, tales como un cierto incremento en el nivel de insaturación, lo que podría estar relacionado con alteraciones en la fluidez de la membrana, así como en su permeabilidad.
- 5.- El ácido graso 16:1 (11-cis) es un componente específico de las membranas de la micorriza. Su contenido es directamente proporcional al nivel de colonización fúngica, por lo que este compuesto puede considerarse un indicador bioquímico fiable del grado de micorrización de una planta, así como del nivel de integración existente entre ambos simbioses.
- 6.- Tanto la micorriza de girasol, como la de cebolla, presentan una mayor actividad  $H^+$ -ATPásica asociada a plasmalema que las raíces correspondientes. El incremento en la actividad de este enzima puede ser una de las bases bioquímicas que justifiquen el intercambio bidireccional de nutrientes entre los simbioses, así como la mayor efectividad que presentan las micorrizas en la captación de nutrientes minerales a partir del suelo.
- 7.- Se confirma que la micorriza es un sistema mas activo que la raíz propiamente dicha, que además de explorar un volumen mayor de suelo, es capaz de provocar cambios substanciales en el pH del mismo como consecuencia de su actividad.
- 8.- El grado de dependencia de una planta a la micorriza parece reflejarse en el carácter de los cambios que se producen en su raíz tras la colonización por el hongo arbuscular. Las plantas muy dependientes tenderían a realizar cambios de tipo estructural, energéticamente mas costosos, pero también mas duraderos. Las plantas micótrofas facultativas, sin excluir la

inducción de cambios de tipo estructural, tenderían, fundamentalmente, hacia cambios de carácter bioquímico, metabólicamente menos costosos, mas plásticos, y, en definitiva, mas evolucionados.

**BIBLIOGRAFIA**

## BIBLIOGRAFIA

Abbot, L.K. y Robson, A.D. (1985). "Formation of external hyphae in soil by four species of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi". *New Phytol.*, 99: 245-255.

Alexander, T., Meier, R., Toth, R. y Weber, H.C. (1988). "Dynamics of arbuscule development and degeneration in mycorrhizas of *Triticum aestivum* L. and *Avena sativa* L. with reference to *Zea mays* L.". *New Phytol.*, 110: 363-370.

Allen, M.F. (1982). "Influence of vesicular-arbuscular mycorrhizae on water movement through *Bouteloua gracilis* (H.B.K.) Lag ex Steud". *New Phytol.*, 93: 227-236.

Alvarez, I.F. (1991). "Ecología, fisiología e implicaciones prácticas de las ectomicorrizas". En: Fijación y Movilización Biológica de Nutrientes. II. Fijación de Nitrógeno y Micorrizas. Eds. López-Gorgé, J., Olivares, J. y Barea, J.M.; pp. 247-259. CSIC. Madrid.

Ames, B.N. (1966). "Assay of inorganic phosphate, total phosphatases". *Meth. Enzymol.*, 8: 115-118.

Ames, R.N., Porter, L., St. John, T.V. y Red, C.P.P. (1984). "Nitrogen sources and "A" values for vesicular-arbuscular and non-mycorrhizal sorghum grown at three rates of  $^{15}\text{N}$  ammonium sulfate". *New Phytol.*, 95: 381-396.

Ames, R.N., Reid, C.P.P., Porter, L. y Cambardella, C. (1983). "Hyphal uptake and transport of nitrogen from two  $^{15}\text{N}$ -labelled sources by *Glomus mosseae*, a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus". *New Phytol.* 95: 381-396.

Amijee, F., Tinker, P.B. y Stribley, D.P. (1989). "The development of endomycorrhizal root systems. VII. A detailed study of effects of soil phosphorus on colonization". *New Phytol.*, 111: 435-446.

Ashford, A.E., Peterson, R.L., Dwarte, D. y Chilvers, G.A. (1986). "Polyphosphate granules in eucalpt mycorrhizas: determination by energy dispersive X-ray microanalysis". *Can. J. Bot.* 64: 677-687.

Augé, R.M., Schekel, K.A. y Wample, R.L. (1987). "Leaf water and carbohydrate status of VA mycorrhizal rose exposed to drought stress". *Plant and Soil*, 99: 291-302.

Azcón, R. (1987). "Germination and hyphal growth of *Glomus mosseae* in vitro: Effects of rhizosphere bacteria and cell-free culture media". *Soil Biol. Biochem.*, 19: 417-419.

Azcón, R., Azcón-Aguilar, C. y Barea, J.M. (1978). "Effects of plants hormones present in bacterial cultures on the formation and responses to VA endomycorrhizas". *New Phytol.*, 80: 359-364.

Azcón, R., El-Atrach, F. y Barea, J.M. (1988). "Influence of mycorrhiza vs. soluble phosphate on growth, nodulation and N<sub>2</sub> fixation from two <sup>15</sup>N-labelled sources by *Glomus mosseae*, a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus". *New Phytol.*, 97: 381-396.

Azcón-Aguilar, C. y Barea, J.M. (1985). "Effect of soil microorganisms on formation of vesicular-arbuscular mycorrhizas". *Trans. Br. Mycol. Soc.*, 84: 536-537.

Azcón-Aguilar, C. y Barea, J.M. (1994). "Saprophytic growth of arbuscular mycorrhizal fungi". En prensa.

Azcón-Aguilar, C., Díaz-Rodríguez, R.M. y Barea, J.M. (1986a). "Effect of soil microorganisms on spore germination and growth of the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*". *Tran. Br. Myc. Soc.*, 91: 337-340.

Azcón-Aguilar, C., Díaz-Rodríguez, R.M. y Barea, J.M. (1988). "Effect of free-living fungi on the germination of *Glomus mosseae* on soil extract". En: *Mycorrhizae: Physiology and Genetics*. Eds. Gianinazzi-Pearson, V. y Gianinazzi, S. pp. 515-519. INRA, Paris.

Azcón-Aguilar, C., García-García, F. y Barea, J.M. (1991). "Germinación y crecimiento axénico de los hongos formadores de micorrizas vesículo-arbusculares". En: *Fijación y Movilización Biológica de Nutrientes. II. Fijación de Nitrógeno y Micorrizas*. Eds. López-Gorgé, J., Olivares, J. y Barea, J.M.; pp. 129-147. CSIC. Madrid.

Azcón-Aguilar, C., Gianinazzi-Pearson, V., Fardeau, J.C. y Gianinazzi, S. (1986b). "Effect of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi and phosphate-solubilizing



bacteria on growth and nutrition of soybean in a neutral-calcareous soil amended with  $^{32}\text{P}$ ,  $^{45}\text{Ca}$  tricalcium phosphate". *Plant Soil*, 96: 3-15.

Azcón-Aguilar, C., Alba, C., Montilla, M. y Barea, J.M. (1993). "Isotopic ( $^{15}\text{N}$ ) evidence of the use of less available N forms by VA mycorrhizas". *Symbiosis*, 15: 39-48.

Azcón-Aguilar, C., Encina, C.L., Azcón, R. y Barea, J.M. (1994). "Effect of arbuscular mycorrhiza on growth and development of *Annona cherimola* micropropagated plants". *Agric. Sci. Finl.* (en prensa).

Baas, R. y Lambers, H. (1988). "Effects of vesicular-arbuscular mycorrhizal infection and phosphate on *Plantago major* ssp. *pleiosperma* in relation to the internal phosphate concentration". *Physiol. Plant.* 74: 701-707.

Bago, B. (1990). "Efecto de distintos compuestos azufrados sobre el crecimiento independiente del hongo formador de micorrizas VA *Glomus mosseae*". Memoria de Licenciatura. Universidad de Granada.

Bagyaraj, D.J. (1984). "Biological interactions with VA mycorrhizal fungi". En: VA Mycorrhiza. Ed. C.L. Powell y D.J. Bagyaraj; pp. 35-46. CRC Press, Boca Raton, Florida.

Baker, D.A. (1978). "Proton cotransport of organic solutes by plants". *New Phytol.*, 81: 485-497.

Balke, N. E. y Hodges, T.K. (1975). "Plasma membrane adenosine triphosphatase of oat roots. Activation and inhibition by Mg and ATP". *Plant Physiol.*, 55: 83-86.

Barea, J.M. (1986). "Importance of hormones and root exudates in mycorrhizal phenomena". En: *Mycorrhizae: Physiology and Genetics*. Eds. Gianinazzi-Pearson, V. y Gianinazzi, S. pp. 177-187. INRA, Paris.

Barea, J.M. (1990). "Micorrizas vesículo-arbusculares". En: *Microbiología*. Eds. Casadesus, J. y Ruiz-Berraquero, F. Universidad de Sevilla.

Barea, J. M. y Azcón-Aguilar, C. (1982). "Production of plant growth-regulating substances by the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*". *Appl. Environ. Microbiol.*, 43: 810-813.

- Barea, J. M. y Azcón-Aguilar, C. (1983). "Mycorrhizas and their significance in nodulating nitrogen-fixing plants". En *Advances in Agronomy*. Ed. N.C. Brandy; pp. 1-54. Academic Press. New York.
- Barea, J.M., Azcón-Aguilar, C. y Azcón, R. (1983). "Efecto de la interacción de fertilizantes solubles de P y micorrizas sobre la nodulación, micorrización, crecimiento y nutrición de la alfalfa (*Medicago sativa*, L.)". *Ciencia del Suelo*, 1: 39-43.
- Barea, J.M., Azcón-Aguilar, C. y Azcón, R. (1987). "Vesicular-arbuscular mycorrhizae improve both symbiotic N<sub>2</sub> fixation and N-uptake from soil as assessed with a <sup>15</sup>N technique under field conditions". *New Phytol.*, 106: 717-725.
- Barea, J.M., Azcón-Aguilar, C y Roldán-Fajardo, B. (1984). "Avances recientes en el estudio de las micorrizas VA. I. Formación, funcionamiento y efectos en nutrición vegetal". *Anal. Edafol. Agrobiol.*, 43: 659-677.
- Barea, J.M., Azcón-Aguilar, C., Ocampo, J.A. y Azcón, R. (1991). "Morfología, anatomía y citología de las micorrizas vesículo-arbusculares". En: *Fijación y Movilización Biológica de Nutrientes*. Vol. II. pp. 149-173. CSIC, Madrid.
- Baron-Epel, O., Gharyal, P.R. y Schinalter, M. (1988). "Pectins as mediators of porosity in soybean cells". *Planta*, 175: 389-395.
- Bavaresco, L. y Fogher, C. (1992). "Effect of root infection with *Pseudomonas fluorescens* and *Glomus mosseae* in improving Fe-efficiency of grapevine ungrafted rootstocks". *Vitis*, 31: 163-168.
- Bécard, G. y Fortin, J.A. (1988). "Early events of vesicular-arbuscular mycorrhizal formation on Rit-DNA transformed roots". *New Phytol.*, 108: 211-218.
- Bécard, G., Piché, Y., y Fortin, J.A. (1988). "Some aspects of the biotrophy of VAM fungi". *Abstracts of the 2nd European Symposium on Mycorrhizae*, p. 11. Praga.
- Bécard, G., Douds, D. D. and Pfeffer, P. E. (1992). Extensive in vitro hyphal growth of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in the presence of CO<sub>2</sub> and flavonols. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 821-825.

Beever, R.E. y Burns, D.J.W. (1980). "Phosphorous uptake, storage and utilization by fungi". *Adv. Bot. Res.*, 8: 128-219

Beilby, J.P. (1980). "Fatty acid and sterol composition of ungerminated spores of the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Acaulospora laevis*". *Lipids*, 15: 949-952.

Beilby, J.P. y Kidby, D.K. (1980a). "Sterol composition of ungerminated spores of the vesicular-arbuscular micorrhizal fungus *Glomus caledonius*". *Lipids*, 15:375-378.

Beilby, J.P. y Kidby, D.K. (1980b). "Biochemistry of ungerminated and germinated spores of the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus caledonius* : changes in neutral and polar lipids". *J. Lipids Res.* 21: 739.

Beilby, J.P. y Kidby, K.D. (1982). "The early synthesis of RNA, protein, and some associated metabolic events in germinating vesicular-arbuscular mycorrhizal fungal spores of *Glomus caledonium*". *Can. J. Microbiol.*, 28: 623-628.

Bennett, A.B. y Spanswick, R.M. (1984). " $H^+$ -ATPase activity from storage tissue of *Beta vulgaris*". *Plant Physiol.*, 74: 545-548.

Bennett, A. B., O'Neil, S.D., Eilman, M. y Spanswick, R.M. (1985). " $H^+$ -ATPase from storage tissue of *Beta vulgaris* L. III. Modulation of ATPase activity by reaction substrates and products". *Plant Physiol.* 78: 495-499.

Berta, G., Sgorbatti, S., Soler, V., Fusconi, A., Trotta, A., Citterio, A., Bottone, M.G., Sparvoli, E., Scannerini, S. (1990). "Chromatin structure variations in host nuclei of VA mycorrhiza". *New Phytol.*, 114: 199-205.

Berta, G., Tagliasacchi, A.M., Fusconi, A., Gerlero, D. Trotta, A. y Scannerini, S. (1991). "The mitotic cycle in root apical meristems of *Allium porrum* L. is controlled by the endomycorrhizal fungus *Glomus* sp. strain E<sub>3</sub>". *Protoplasma*, 161: 12.

Bethlenfalvay, G.J., Brown, M.S., Ames, R.N. y Thomas, R.S. (1988). "Effects on drought on host and endophyte development in mycorrhizal soybeans in relation to water use and phosphorous uptake". *Physiol. Plant.*, 72: 565-571.

- Blair, D.A., Peterson, R.L. y Bowley, S.R. (1988). "Nuclear DNA content in root cells of *Lotus* and *Trifolium* colonized by the VAM fungus, *Glomus versiforme*". *New Phytol.* 109: 167-170.
- Bonfante-Fasolo, P. (1984). "Anatomy and morphology of VA Mycorrhizae". En: VA Mycorrhiza. Ed. C.Ll. Powell y D.J. Bagyaraj; pp. 35-46. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Bonfante-Fasolo, P. (1987). "Vesicular-Arbuscular Mycorrhizae: Fungus-plant interactions at the cellular level". *Symbiosis*, 3: 249-268.
- Bonfante-Fasolo, P. (1988). "The role of the cell wall as a signal in mycorrhizal associations". En: Cell to Cell Signals in Plant, Animal and Microbial Symbiosis. Eds. Scanerini, S., Smith, D.C., Bonfante-Fasolo, P. y Gianinazzi-Pearson, V. pp. 219-235. Springer-Verlag, Berlin.
- Bonfante-Fasolo, P. y Perotto, S. (1992). "Plants and endomycorrhizal fungi: the cellular and molecular basis of their interaction". En: Molecular Signals in Plant-Microbe Communications. Eds. Desh Pal S. Verma. pp. 445-470. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Bonfante-Fasolo, P. y Scanerini, S. (1992). "The cellular basis of plant-fungus interchanges in mycorrhizal associations". En: Mycorrhizal Functioning. Ed. Allen, M.T. pp. 65-101. Chapman y Hall, Nueva York-Londres.
- Bonfante-Fasolo, P., Berta, G. y Fusconi, A. (1987). "Distribution of nuclei in a VAM fungus during its symbiotic phase". *Trans. Br. Mycol. Soc.*, 88: 263-266.
- Bradbury, S.M., Peterson, R.L. y Bowley, S.R. (1993). "Further evidence for a correlation between nodulation genotypes in alfalfa (*Medicago sativa* L.) and mycorrhiza formation". *New Phytol.*, 124: 665-673.
- Bradford, M.M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantification of micrograms of protein, utilizing the principle of protein-dye binding". *Anal. Biochem.*, 72:248-254.

- Brauer, D., Tu, S.I., Shu, A.F. y Thomas, C. (1989). "Kinetic analysis of proton transport by vanadate sensitive ATPase from maize root microsomes". *Plant Physiol.*, 89: 464-471.
- Briskin, D.P. (1990). "The plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase of higher plant cells: role in potassium ion transport". *Physiol. Plant.*, 69: 159-163.
- Brundrett, M. (1991). "Mycorrhizas in natural ecosystems". *Adv. Ecol. Res.*, 21: 171-313.
- Brundrett, M. y Kendrick, B. (1990). "The roots and mycorrhizas of herbaceous woodland plants. I. Quantitative aspects of morphology". *New Phytol.*, 114: 457-468.
- Burggraaf, A.J.P. y Beringer, J.E. (1989). "Absence of DNA synthesis in vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi during in vitro development". *New Phytol.*, 111: 25-33.
- Burgos, P.A. (1993). "Estudio comparativo del enzima H<sup>+</sup>-ATPasa, composición lipídica y fluidez en plasmalema y tonoplasto de raíces de girasol y jojoba: efecto del NaCl". Tesis Doctoral. Universidad de Granada.
- Buwalda, J.G., Stribley, D.P. y Tinker, P.B. (1983). "Increased uptake of bromide and chloride by plants infected with vesicular-arbuscular mycorrhizas". *New Phytol.* 93: 217-225.
- Buwalda, J.G., Stribley, D.P. y Tinker, P.B. (1984). "The development of endomycorrhizal root systems. V. The detailed pattern of infection and the control of development of infection level by host in young leek plants". *New Phytol.*, 96: 411-427.
- Cabala-Rosand, P. y Wild, A. (1982). "Direct use of low grade phosphate rock from Brazil as fertilizer. II. Effects on mycorrhizal inoculation and nitrogen source". *Plant and Soil*, 65: 363-373.
- Cakmak, I. y Marschner, H. (1986). "Mechanism of phosphorous-induced zinc deficiency in cotton. I. Zinc deficiency-enhanced uptake rate of phosphorous". *Physiol. Plant.*, 68: 483-490.

- Calvet, C. (1990). "Micorrizas vesículo-arbusculares en cultivos intensivos sobre sustratos orgánicos: interacciones con hongos saprofitos y patógenos de la rizosfera". Tesis Doctoral. Universidad de Granada.
- Capaccio, L.C.M. y Callow, J.A. (1982). "The enzymes of poliphosphate metabolism in vesicular-arbuscular mycorrhizas". *New Phytol.*, 91: 81-91.
- Chapin, F.S. (1980). "The mineral nutrition of wild plants". *Ann. Rev. Ecol. Syst.*, 11: 233-260.
- Churchill, K.A. y Sze, H. (1983). "Anion-sensitive, H<sup>+</sup>-pumping ATPase in membrane vesicles from oat roots". *Plant Physiol.*, 71: 610-617.
- Clarkson, D.T. (1985). "Factors affecting mineral nutrient acquisition by plants". *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 36: 77-115.
- Cocucci, M. C. y Marré, E. (1984). "Lysophosphatidilcholine-activated, vanadate-inhibited, Mg-ATPase from radish microsomes". *Biochem. Biophys. acta*, 771: 42-52.
- Cooper, K.M. (1984). "Physiology of VA mycorrhizal associations". En: *VA Mycorrhiza*. Ed. C.Ll. Powell y D.J. Bagyaraj; pp. 155-203. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Cooper, K.M. y Losel, D.M. (1978). "Lipid physiology of vesicular-arbuscular mycorrhiza. I. Composition of lipids in roots of onion, clover and ryegrass infected with *Glomus mosseae*". *New Phytol.* 80: 143.
- Cooper, K.M. y Tinker, P.B. (1978). "Translocation and transfer of nutrients in vesicular-arbuscular mycorrhizas. II. Uptake and translocation of phosphorous, zinc and sulphur". *New Phytol.* 81:43-52.
- Cooper, K.M. y Tinker, P.B. (1981). "Translocation and transfer of nutrients in vesicular-arbuscular mycorrhizas. IV. Effect of environmental variables on movement of phosphorous". *New Phytol.* 81: 237-239.
- Cox, G. y Sanders, F.E. (1974). "Ultrastructure of the host-fungus interface in a vesicular-arbuscular mycorrhiza". *New Phytol.*, 73: 901-912.

Cox, G. y Tinker, P.B. (1976). "Translocation and transfer of nutrients in vesicular-arbuscular mycorrhizas. I. The arbuscule and phosphorous transfer: a quantitative ultrastructural study". *New Phytol.*, 77: 371-378.

Cox, G., Sanders, F.E., Tinker, P.B. y Wild, J.A. (1975). "Ultrastructural evidence related to host- endophyte transfer in a vesicular-arbuscular mycorrhiza". En: *Endomycorrhizas*. Eds. Sanders, F.E., Mosse, B., y Tinker, P.B. pp. 297-312. Academic Press, Londres.

Cox, G., Morán, F.J., Sanders, F.E., Nockolds, C. y Tinker, P.B. (1980). "Translocation and transfer of nutrients in vesicular-arbuscular mycorrhizas. III. Polyphosphate granules and phosphorous translocation". *New Phytol.* 84: 649-659.

Cress, W.A., Throneberry, G.O. y Lindsey, D.L. (1979). "Kinetics of phosphorous absorption by mycorrhizal and non-mycorrhizal tomato roots". *Plant Physiol.* 64: 484-487.

Crush, J.R. (1974). "Plant growth responses to vesicular-arbuscular mycorrhizae. VII. Growth and nodulation of some herbage legumes". *New Phytol.* 73: 743.

Daniels, B.A. (1984). "Ecology of VA mycorrhizal fungi". En: *VA Mycorrhiza*. Ed. C.Ll. Powell y D.J. Bagyaraj; pp. 35-46. CRC Press, Boca Raton, Florida.

Davidian, J.C., Soler, A. y Grignon, C. (1984). "Development of H<sup>+</sup> extrusion by barley roots after their excision". *Physiol. Vég.*, 22: 163-170.

Day, D.A., Price, G.D. y Udvardi, M.K. (1989). "The membrane interface of the *Bradyrhizobium japonicum-Glicine max* symbiosis: peribacteroid units from soybeans nodules". *Aust. J. Plant Physiol.*, 16: 69-84.

Dehne, H.W. (1986). "Influence of VA mycorrhizae on host plant physiology". En: *Physiological and Genetical Aspects of Mycorrhizae*. Eds. Gianinazzi-Pearson, V. y Gianinazzi, S. pp. 431-435. INRA, Paris.

Delgado, I.C. (1992). "Distribución de nutrientes minerales en plantas de girasol (*Helianthus annuus* L.) sometidas a estrés salino". Tesis Doctoral. Universidad de Granada.

- De Michelis, M.I. y Spanswick, R.M. (1986). "H<sup>+</sup>-pumping driven by the vanadate-sensitive ATPase in membrane vesicles from corn roots". *Plant Physiol.*, 81: 542-547.
- Dexheimer, J., Gianinazzi, S. y Gianinazzi-Pearson, V. (1979). "Ultrastructural cytochemistry of the host-fungus interface in the endomycorrhizal association *Glomus mosseae/Allium cepa*". *Z. Pflanzenphysiol.*, 92: 191-206.
- Dexheimer, J., Kreutz-Jeanmarie, C., Gérard, M.J. Gianinazzi-Pearson, V. y Gianinazzi, S. (1986). "Approche cellulaire du fonctionnement des endomycorhizes à vesicules et arbuscules: les plasmalemmes de l'interface". En: *Mycorrhizae: Physiology and Genetics*. Eds. Gianinazzi-Pearson, V. y Gianinazzi, S. pp. 277-283. INRA, Paris.
- Dinkelaker, B., Römheld, V. y Marschner, H. (1989). "Citric acid excretion and precipitation of calcium citrate in the rhizosphere of white lupin (*Lupinus albus* L.). *Plant, Cell and Env.*, 12: 285-292.
- Douce, R. (1964). "Identification et dosage de quelques glicerolipides dans des suches normales et tumorales de scorsonère cultivées *in vitro*". *C.R. Acad. Sci. Paris*, 259: 3066-3068.
- Duc, G., Trouvelot, A., Gianinazzi-Pearson, V. y Gianinazzi, S. (1989). "First report of non- mycorrhizal plant mutants (myc<sup>-</sup>) obtained in pea (*Pisum sativum* L.) and fababeam (*Vicia faba* L.)". *Plant Sci. (Shannon)*, 60: 215-222.
- Dumas, E., Tahiri-Alaoui, A., Gianinazzi, S. y Gianinazzi-Pearson, V. (1990). "Observations on modifications in gene expression with VA endomycorrhiza development in tobacco: qualitative and quantitative changes in protein profiles". En: *Endocytobiology IV*. Eds. Nardon, P., Gianinazzi-Pearson, V., Grenier, A.M., Margulis, L. y Smith, D.C. pp. 153-157. INRA, Paris.
- Dumas-Gaudot, E., Furlan, V., Grenier, J. y Asselin, A. (1992). "New acidic chitinase isomorphs induced in tobacco roots by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi". *Mycorrhiza*, 1: 133-136.
- Dupont, F.M. y Zabala, M.G. (1985). "Preparation of membrane-vesicles enriched in ATP-dependent transport from suspension cultures of tomato cells". *Plant Physiol.*, 77: 69-73.



- Dupont, F.M., Burke, L.L. y Spanswick, R.M. (1981). "Characterization of a partially purified adenosine triphosphatase from a corn root plasma membrane fraction". *Plant Physiol.*, 67: 59-63.
- El-Atrach, F., Vierheilig, H. y Ocampo, J.A. (1989). "Influence of non-host plants on vesicular-arbuscular mycorrhizal infection of host plants and on spore germination". *Soil Biol. Biochem.*, 21: 161-163.
- Elias, K.S. y Safir, G.R. (1987). "Hyphal elongation of *Glomus fasciculatum* in response to root exudates". *Appl. Env. Microbiol.*, 53: 1928-1933.
- Faber, B., Zasoski, R.J., Burau, R.G. y Uriu, K. (1990). "Zinc uptake by corn as affected by vesicular-arbuscular mycorrhizae". *Plant and Soil*, 129: 121-130.
- Faber, B., Zasoski, R.J., Munns, D.N. y Shakel, K. (1991). "A method for measuring hyphal nutrient and water uptake in mycorrhizal plants". *Can. J. Bot.*, 69: 87-94.
- Ferrol, N. (1991). "Regulación por el boro del transporte de H<sup>+</sup> en suspensiones celulares y en membranas de girasol (*Helianthus annuus*, L.). Tesis Doctoral. Universidad de Granada.
- Fitter, A.H. (1982). "Morphometric analysis of root systems: Application of the technique and influence of soil fertility on root system development in two herbaceous species" *Plant Cell Envir.*, 5: 313- 322.
- Fitter, A.H. (1985). "Functional significance of root morphology and root system architecture". En: *Ecological Interactions in Soil*. Eds. Fitter, A.H., Atkinson, D., Read, D.J. y Usher, M.B. pp. 87-106. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Frank, A.B. (1885). "Über die auf Wurzelsymbiose beruhende Ernährung gewisser Baume durch unterirdische Pilze". *Ber. Dtch. Bot. Ges.*, 3: 128.
- Frey, B., Buser, H.-R. y Schüepp, H. (1992). "Identification of ergosterol in vesicular-arbuscular mycorrhizae". *Biol. Fertil. Soils*, 13: 229-234.
- Gallaud, I. (1905). "Etude sur les mycorhizes endotrophes". *Rev. Gen. Bot.*, 17: 5.

Galtier, N., Belver, A., Gibrat, R., Grouzis, J.P., Rigaud, J. y Grignon, C. (1988). "Preparation of corn root plasmalemma with low Mg-ATPase latency and high electrogenic H<sup>+</sup>-pumping activity after partitioning". *Plant Physiol.*, 87: 491-497.

García-García, F. (1989). "Estudio de la nutrición azufrada del hongo formador de micorrizas VA *Glomus mosseae*". Memoria de Licenciatura. Universidad de Granada.

García-Garrido, J.M. (1991). "Estudio de factores bioquímicos responsables de la infección por parte de hongos formadores de micorrizas VA: enzimas celulolíticos". Tesis Doctoral. Universidad de Granada.

García-Garrido, J.M., García-Romera, I. y Ocampo, J.A. (1992). "Cellulase production by the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* (Nicol. y Gerd.) Gerd. y Trappe". *New Phytol.*, 121:221-226.

García-Garrido, J.M., Toro, N. y Ocampo, J.A. (1993). "Presence of specific polypeptides in onion roots colonized by *Glomus mosseae*". *Mycorrhiza*, 2: 175-177.

García-Romera, I. (1990). "Producción de pectinasas por hongos formadores de Micorrizas Vesículo-Arbusculares". Tesis Doctoral. Universidad de Granada.

García-Romera, I., García-Garrido, J.M., Martínez-Molina, E. y Ocampo, J.A. (1990). "Possible influence of hydrolitic enzymes on vesicular-arbuscular mycorrhizal infection of alfalfa". *Soil Biol. Biochem.*, 22: 149-152.

García-Romera, I., García-Garrido, J.M. y Ocampo, J.A. (1991). "Pectolytic enzymes in the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*". *FEMS Microbiology Letters*. 78: 343-346.

Gay, J.L. y Woods, A.M. (1987). "Induced modifications in the plasma membranes of infected cells". En: *Fungal infection of plants*. Eds. Pegg, G.F. y Ayres, P.G. pp. 79-91. University Press, Cambridge.

George, E., Häussler, K., Vetterlein, D., Gorgus, E. y Marschner, H. (1992). "Water and nutrient translocation by hyphae of *Glomus mosseae*". *Can. J. Bot.*, 60: 2130-2137.

- Gerdemann, J.W. (1971). "Fungi that form the vesicular-arbuscular type of endomycorrhizae". En: Mycorrhizae. Ed. Hacskeylo, E. pp. 9-18. USDA Publ. No.1189. Washington D.C.
- Gerdemann, J.W. y Nicholson, J.H., (1963). "Spores of mycorrhizal Endogone species extracted from soil by wet-sieving and decanting". Trans. Br. Mycol. Soc., 46:235-244.
- Gianinazzi, S. (1991). "Vesicular-arbuscular (endo-) mycorrhizas: cellular, biochemical and genetic aspects". Agric., Ecosys. Env., 35: 105-119.
- Gianinazzi, S. y Gianinazzi-Pearson, V. (1989). "Cellular interactions in vesicular-arbuscular (VA) endomycorrhizae. The host's point of view". Endocytobiology, IV: 83-90.
- Gianinazzi, S., Gianinazzi-Pearson, V. y Dexheimer, J. (1979). "Enzymatic studies on the metabolism of vesicular-arbuscular mycorrhiza. III. Ultrastructural localization of acid and alkaline phosphatase in onions roots infected by *Glomus mosseae* (Nicol. Gerd.)". New Phytol. 82: 127-132.
- Gianinazzi-Pearson, V. (1984). "Host-fungus specificity in mycorrhizae". En: Genes Involved in Plant-Microbe Interactions. Eds. Verma, D.P.S. y John, T.H. pp. 225-253. Springer-Verlag, Viena.
- Gianinazzi-Pearson, V. y Azcón-Aguilar, C. (1991). "Fisiología de las micorrizas vesículo-arbusculares". En: Fijación y Movilización Biológica de Nutrientes. Vol. II. pp. 175-202. CSIC, Madrid.
- Gianinazzi-Pearson, V. y Gianinazzi, S. (1978). "Enzymatic studies on the metabolism of vesicular-arbuscular mycorrhiza. II. Soluble alkaline phosphatase specific to mycorrhizal infection of onion roots". Physiol. Plant Pathol., 12: 45-53.
- Gianinazzi-Pearson, V. y Gianinazzi, S. (1988). "Morphological integration and functional compatibility between symbionts in vesicular-arbuscular mycorrhizal association". En: Cell to Cell Signals in Plant, Animal and Microbial Symbiosis. Eds. Scanerini, S., Smith, D.C., Bonfante-Fasolo, P. y Gianinazzi-Pearson, V. NATO ASI, Serie H, Cell Biology, 17:73-84.

- Gianinazzi-Pearson, V. y Gianinazzi, S. (1989). "Phosphorous metabolism in mycorrhizae". En: Nitrogen, Phosphorous and sulphur utilization by fungi. Eds, Boddy, L., Marchant, R. y Read, D.J. pp. 227-241. Cambridge University Press, Cambridge.
- Gianinazzi-Pearson, V. y Smith, S.E. (1993). "Physiology of mycorrhizal mycelia". En: Advances in Plant Pathology, volumen 9: Mycorrhiza Synthesis. Eds. Ingram, D.S., Williams, P.H. y Tommerup, I.C. pp. 55-82. Academic Press, Londres.
- Gianinazzi-Pearson, V., Branzanti, B. and Gianinazzi, S. (1989). "*In vitro* enhancement of spore germination and early hyphal growth of a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus by host root exudates and plant flavonoids". Symbiosis. 7: 243-255.
- Gianinazzi-Pearson, V., Smith, S.E., Gianinazzi, S. y Smith, F.A. (1991). "Enzymatic studies on the metabolism of vesicular-arbuscular mycorrhizas. V. Is H<sup>+</sup>-ATPase a component of ATP-hydrolysing enzyme activities in plant-fungus interfaces?". New Phytol., 117: 61-74.
- Gildon, A. y Tinker, P.B. (1983). "Interaction of vesicular-arbuscular mycorrhizal infections and heavy metals in plants. II. The effects of infection on uptake of copper". New Phytol., 95: 263-268.
- Giovanetti, M. y Mosse, B. (1980). "An evaluation of techniques for measuring vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in roots". New Phytol., 84: 489-500.
- Glenn, M.G., Chew, F.S. y Williams, P.H. (1988). "Influence of glucosinolate content of *Brassica* (Cruciferae) roots on growth of vesicular-arbuscular mycorrhiza fungi". New Phytol., 110: 217-225.
- Gogstad, G.O. y Krutnes, M.G. (1982). "Measurement of protein in cell suspension using the coomassie brilliant blue dye binding assay". Anal. Biochem., 126: 355-359.
- Gollany, H.T. y Schumacher, T.E. (1993). "Combined use of colorimetric and microelectrode methods for evaluating rhizospheric pH". Plant and Soil, 154: 151-159.
- Gómez-Fernández, J.C. y Goñi, F.M. (1983). "La fluidez de las membranas celulares". Investigación y Ciencia.

- Graham, J.H. (1982). "Effect of the citrus root exudates on germination of clamidospores of the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus epigaeum*". *Mycologia*, 74: 831-835.
- Graham, J.H., Syvertsen, J.P. y Smith, M.L. (1987). "Water relations of mycorrhizal and phosphorous-fertilized non-mycorrhizal *Citrus* under drought stress". *New Phytol.*, 105: 411-419.
- Grippiolo, R. (1981). "Il processo di un fungo vesicolo-arbuscolare. I Osservazioni ultrastrutturali sulla penetrazione del fungo da cellula nella radice". *Allionia*, 24: 49.
- Gunze, C.M.B. y Hennessy, C.M.R. (1980). "Effect of host-applied auxin on development of endomycorrhiza in cowpea". *Trans. Br. Mycol. Soc.*, 74: 247-251.
- Hager, A., Menzel, H. y Kraus, A. (1971). "Versuh und hypotese zur primawirkung der auxins beim strockungswachstum". *Planta*, 100: 47-75.
- Hager, A., Debus, G., Edel, H.-G., Stransky, H. y Serrano, R. (1991). "Auxin induces exocitosis and the rapid synthesis of a high turnover pool of plasma-membrane H<sup>+</sup>-ATPase". *Planta*, 185: 527-537.
- Harada, H., Wakiuchi, N., Oji, Y. y Shiga, H. (1990). "Properties of vanadate-sensitive ATPase of the plasma membrane vesicles from rice roots". *Soil Sci. Plant Nutr.*, 36: 545-553.
- Hardie, K. y Leyton, L. (1981). "The influence of vesicular-arbuscular mycorrhiza on growth and water relations of red clover. I. In phosphate deficient soil". *New Phytol.*, 89: 599-608.
- Harley, J. L. y Smith, S.E. (1983). "Mycorrhizal Symbiosis". Academic Press, London.
- Harris, D., Pakovsky, R.S. y Paul, E.A. (1985). "Carbon economy of soybean-*Rhizobium-Glomus* associations". *New Phytol.* 101: 427-440.
- Hattingh, M.J, Gray, L.E. y Gerdemann, J.W. (1973). "Uptake and translocation of <sup>32</sup>P-labeled phosphate to onion roots by endomycorrhizal fungi". *Soil Sci.* 116, 383-387.

Häussling, M., Leisen, E., Marschner, H. y Römheld, V. (1985). "An improved method for non-destructive measurements of the pH at the root-soil interface (rhizosphere)". J. Plant Physiol., 117: 371-375.

Hayman, D.S. (1982a). "Influence of soils and fertility on activity and survival of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi". Phytopathol., 72: 1119-1125.

Hayman, D.S. (1982b). "Practical aspects of vesicular-arbuscular mycorrhiza". En: Advances in Agricultural Microbiology. Ed. Subba Rao, N.S. pp.73-325. IBH Publ., New Delhi.

Hayman, D.S. (1983). "The physiology of vesicular-arbuscular endomycorrhizal symbiosis". Can. J. Bot., 61: 944-963.

Hayman, D.S. y Mosse, B. (1971). "Plant growth responses to vesicular-arbuscular mycorrhiza. I. Growth of Endogone-inoculated plants in phosphate-deficient soils". New Phytol. 70: 19.

Hayman, D.S. y Mosse, B. (1972). "Plant growth responses to vesicular-arbuscular mycorrhiza. III. Increased uptake of labile P form from soil". New Phytol. 71: 41.

Hepper, C.M. (1979). "Germination and growth of *Glomus caledonium* spores: The effects of inhibitors and nutrients". Soil Biol. Biochem. 11: 269-277.

Hepper, C.M. (1981). "Techniques for studying infection of plants by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi under axenic conditions". New Phytol., 88: 641-647.

Hepper, C.M. (1983). "Limited independent growth of a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *in vitro*". New Phytol., 93: 537-542.

Hepper, C.M. (1984a). "Isolation and culture of VA mycorrhizal fungi". En: VA Mycorrhiza. Ed. C.Ll. Powell y D.J. Bagyaraj; pp.95-112. CRC Press, Boca Raton, Florida.

Hepper, C.M. (1984b). "Inorganic sulphur nutrition of the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus caledonium*". Soil Biol. Biochem., 16: 669-671.

Hepper, C.M. (1985). "Influence of age of roots on the pattern of vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in leek and clover". *New Phytol.*, 101: 685-693.

Hepper, C.M., (1986). "Growth of hyphae of *Glomus* spores in the presence of sulphur-containing compounds". En: *Physiological and Genetical Aspects of Mycorrhizae*. Eds. Gianinazzi-Pearson, V. y Gianinazzi, S. pp. 177-187. INRA, Paris.

Hepper, C.M. y O'Shera, J. (1984). "Vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in lettuce (*Lactuca sativa*) in relation to calcium supply". *New Phytol.*, 110: 207-215.

Hepper, C.M. y Smith, G.A. (1976). "Observations on the germination of Endogone spores". *Trans. Br. Mycol. Soc.*, 66: 189-194.

Hetrick, B.A.D. (1991). "Mycorrhizas and root architecture". *Experientia*, 41: 355-362.

Hetrick, B.A.D., Gerchefske, D. y Thompson, W. (1987). "Effect of drought stress on grown response in corn, sudan grass, and big bluestem to *Glomus etunicatum*". *New Phytol.*, 105: 302-310.

Hetrick, B.A.D., Leslie, J.F., Wilson, G.W.T. y Kitt, D.G. (1988). "Physical and topological assessment of mycorrhizal fungus on root architecture of big bluestem". *New Phytol.*, 110: 85-96.

Hewitt, E.J. (1952). "Sand and water culture methods used in the study of plant nutrition". *Tech. Commun. n° 22*, 547 pp. Commonw. Agric. Bur. Farnham Royal. Commonwealth Agricultural Bureau, Bucks. Gran Bretaña.

Ho, I. (1977). "Phytosterols in root systems of mycorrhizal and nonmycorrhizal *Zea mays* L.". *Lloydia*, 40: 476.

Ho, I. y Trappe, J.M. (1975). "Nitrate reducing capacity of two vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi". *Mycologia*, 67: 886-888.

Hodges, T.K., y Leonard, R.T. (1974). "Purification of a plasma membrane bound ATPase from plants roots". *Meth. Enzymol.*, 32: 392-406.

Hodges, T.K., Leonard, R.T., Bracker, C.E. y Keenan, T.W. (1972). "Purification of an ion-stimulated ATPase from plant roots: association with plasma membranes". Proc. Nat. Acad. Sci., USA, 69: 3307-3311.

Hunt, R., Stribley, D.P., and Read, D.J. (1975). "Root/shoot equilibria in cranberry (*Vaccinium macrocarpum* Ait.)". Ann. Bot., 39: 807-810.

Itoh, S. y Barber, S.A. (1983). "Phosphorous uptake by six plant species as related to root hairs". Agron. J., 75: 457.

Jakobsen, I., Abbot, L.K. y Robson, A.D. (1992). "External hyphae of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Trifolium subterraneum* L. II. Hyphal transport of  $^{32}\text{P}$  over defined distances". New Phytol. 120, 509-516.

Jaquelinet-Jeanmougin, S. (1986). "Les endomycorhizes de *Gentiana lutea* L.: Détermination des champignons symbiotes; aspects physiologiques et ultrastructuraux de ces associations". Tesis Doctoral, Universidad de Dijon, Francia.

Jasper, D.A., Abbot, L.K. y Robson, A.D. (1989a). "Soil disturbance reduces The infectivity of external hyphae of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi". New Phytol. 112: 93-99.

Jasper, D.A., Abbot, L.K. y Robson, A.D. (1989b). "Hyphae of a vesicular-arbuscular fungus maintain infectivity in dry soil, except when soil is disturbed". New Phytol. 112: 101-107.

Jeanmarie, C., Dexheimer, J., Marx, C., Gianinazzi, S. y Gianinazzi-Pearson, V. (1985). "Effect of vesicular-arbuscular mycorrhizal infection on the distribution of neutral phosphatase activities in root cortical cells". J. Plant Physiol., 119: 285-293.

Johansen, A., Jakobsen, I. y Jensen, E.S. (1992). "Hyphal transport of  $^{15}\text{N}$ -labelled nitrogen by a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus and its effect on depletion of inorganic soil N". New Phytol. 122: 281-288.

Jungk, A. y Claassen, N. (1989). "Availability in soil and acquisition by plants as the basis for phosphorous and potassium supply to plants". Pflanzenernähr. Bodenkd., 152: 151-157.



- Kape, R., Wex, K., Parniske, M., Görge, E., Wetzell, A. y Werner, D. (1992). "Legume root metabolites and VA-mycorrhiza development". *J. Plant Physiol.*, 144: 54-60.
- Katou, K., Tomiyama, K. y Okamoto, H. (1982). "Effects of hyphal wall components of *Phytophthora infestans* on membrane potential of potato tuber cells". *Physiol. Plant Pathol.*, 21: 311-317.
- Kendrick, B. y Berch, S. (1985). "Mycorrhizae: applications in agriculture and forestry". En: *Comprehensive Biotechnology*. Vol. 4. Ed. Robinson, C.W. pp. 109-152. Pergamon Press, Oxford.
- Kinden, D.A. y Brown, M.F. (1975). "Electron microscopy of vesicular-arbuscular mycorrhizae of yellow poplar. I. Characterization of endophytic structures by scanning electron microscopy". *Can. J. Microbiol.* 21: 989-993.
- Koide, R. (1985a). "The nature of growth depressions in sunflower caused by vesicular-arbuscular mycorrhizal infection". *New Phytol.*, 99: 449-462.
- Koide, R. (1985b). "The effect of VA mycorrhizal infection and phosphorous status on sunflower hydraulic and stomatal properties". *J. Exp. Bot.*, 36: 1087-1098.
- Koide, R. y Li, M. (1990). "On host regulation of the vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis". *New Phytol.*, 114: 59-74.
- Koske, R.E. (1981). "Multiple germination by spores of *Gigaspora gigantea*". *Trans. Br. Mycol. Soc.*, 76: 328-330.
- Koske, R.E. (1982). "Evidence for a volatile attractant from plants roots affecting germ tubes of a VA mycorrhizal fungus". *Trans. Br. Mycol. Soc.*, 79: 305-310.
- Kothari, S.K., Marschner, H. y Römhild, V. (1991). "Contribution of the VA mycorrhizal hyphae in acquisition of phosphorous and zinc by maize grown in a calcareous soil". *Plant and Soil*, 131: 177-185.

- Lachica, M., Aguilar, A. y Yáñez, J. (1973). "Análisis foliar. Métodos analíticos utilizados en la Estación Experimental del Zaidín". *Anal. Edafol. Agrobiol.*, 32: 1033-1047.
- Larson, M.E. y Jagenford, A.T. (1989). "Sulphite stimulation of chloroplast coupling factor ATPase". *Biochem. Biophys. Acta*, 973: 67-77.
- Larson, M.E., Umbach, A. y Jagenford, A.T. (1989). "Sulphite-stimulated release of [<sup>3</sup>H] ADP bound to chloroplast thylakoid ATPase". *Biochem. Biophys. Acta*, 973: 78-85.
- Lechevallier, D. (1966). "Les lipides des Lemnacées: Analyses des acides gras des lipides des frondes de *Spirodela polyrrhiza*." *C.R. Acad. Sci. Paris*, 263: 1489-1852.
- Lei, J., Bécard, G., Catford, J.G. y Piché, Y. (1991). "Root factors stimulate <sup>32</sup>P uptake and plasmalemma ATPase activity in vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Gigaspora margarita*". *New Phytol.*, 118: 289-294.
- Lewis, D.H. (1973). "Concepts in fungal nutrition and the origins of biotrophy". *Biological Reviews*, 48: 261-278.
- Li, X., George, E. y Marschner, H. (1991a). "Extension of the phosphorous depletion zone in VA-mycorrhizal white clover in a calcareous soil". *Plant and Soil*, 136: 41-48.
- Li, X., George, E. y Marschner, H. (1991b). "Phosphorous depletion and pH decrease at the root-soil and hyphae-soil interfaces of VA mycorrhizal white clover fertilized with ammonium". *New Phytol.*, 119: 397-404.
- Li, X., Marschner, H. y George, E. (1991c). "Acquisition of phosphorous and copper by VA-mycorrhizal hyphae and root-to-shoot transport in white clover". *Plant and Soil*, 136: 49-57.
- Linderman, R.G. (1988). "VA (Vesicular-Arbuscular) mycorrhizal symbiosis". *ISI Atlas of Science: Animals and Plants*, 1: 183-188.
- Linderman, R.G. (1988b). "Mycorrhizal interaction with the rhizosphere microflora. The mycorrhizosphere effect". *Phytopathology* 78: 366-371.

- Lodish, H.F. y Rothman, J.F. (1979). "La formación de membranas celulares". Investigación y Ciencia, Marzo-79. pp. 20-37.
- Lüttge, U. y Clarkson, D.T. (1985). "Mineral nutrition: plasmalemma and tonoplast redox activity". Prog. Bot., 47: 73-86.
- Lüttge, U. y Clarkson, D.T. (1987). "Mineral nutrition: anions". Prog. Bot., 49: 68-85.
- Lüttge, U. y Higinbotham, N. (1979). "Transport in Plants". Springer-Verlag, Berlín.
- Maffey, M., Codignola, A., Spanu, P., Scannerini, S. y Bonfante-Fasolo, P. (1986). "Constituenti fenolici in pareti cellulari di radici in piante axeniche e micorrizate". Giorn. Bot. It., 120: (supl. 2), 22pp.
- Malloch, D.W., Pirozynski, K.A. y Raven, P.H. (1980). "Ecological and evolutionary significance of mycorrhizal symbiosis in vascular plants". En: Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 77:2113-2118.
- Marré, E. (1979). "Integration of solute transport in cereals". En: Recent Advances in the Biochemistry of Cereals. Eds. Laidman, D.L. y Wyn Jones, R.G. pp. 3-25. Academic Press, Nueva York.
- Marschner, H. y Römheld, V. (1983). "In vivo measurement of root-induced pH changes at the soil-root interface: effect of plant species and nitrogen source". Z. Pflanzenphysiol. Bd., 111: 241-251.
- Marschner, H., Römheld, V., Horst, W.J. y Martin, P. (1986). "Root-induced changes in the rhizosphere: importance for the mineral nutrition of plants". Pflanzenernaehr. Bodenk., 149: 441-456.
- Marsh, B.A.B. (1971). "Measurement of length in random arrangement of lines" J. Appl. Ecol., 8: 265.
- Marx, D.H. (1973). "Mycorrhizae and feeder root diseases". En: Ectomycorrhizae: Their Ecology and Physiology. Eds. Marks, G.C. y Kozlowsky. pp. 351-382. Academic Press, New York.

Marx, D.H. y Cordell, C.E. (1989). "The use of specific ectomycorrhizas to improve artificial forestation practices". En: The Biotechnology of Fungi for Improving Plant Growth. Eds. Whipps, J.M. y Lumsden, R.D.; pp. 1-25. British Mycological Society, Cambridge University Press. Cambridge.

Marx, D.H. y Shafer, S.R. (1989). "Fungal and bacterial symbiosis as potential biological markers of effect of atmospheric deposition on forest health". En: Proc. National Research Council Workshop on Markers of Air Pollution Effects In Forests. Wilacres Retreat, N. C. April 25-27, 1988. pp. 217-232. NCR, Washington D.C.

Marx, C., Dexheimer, J., Gianinazzi-Pearson, V. y Gianinazzi, S. (1982). "Enzymatic studies on the metabolism of vesicular-arbuscular mycorrhiza. IV. Ultracytoenzymological evidence (ATPase) for active transfer processes in the host-arbuscular interface". New Phytol., 90: 37-43.

Mayer, A.M. (1989). "Plant-fungal interactions: a plant physiologist's viewpoint". Phytochemistry, 28: 311-317.

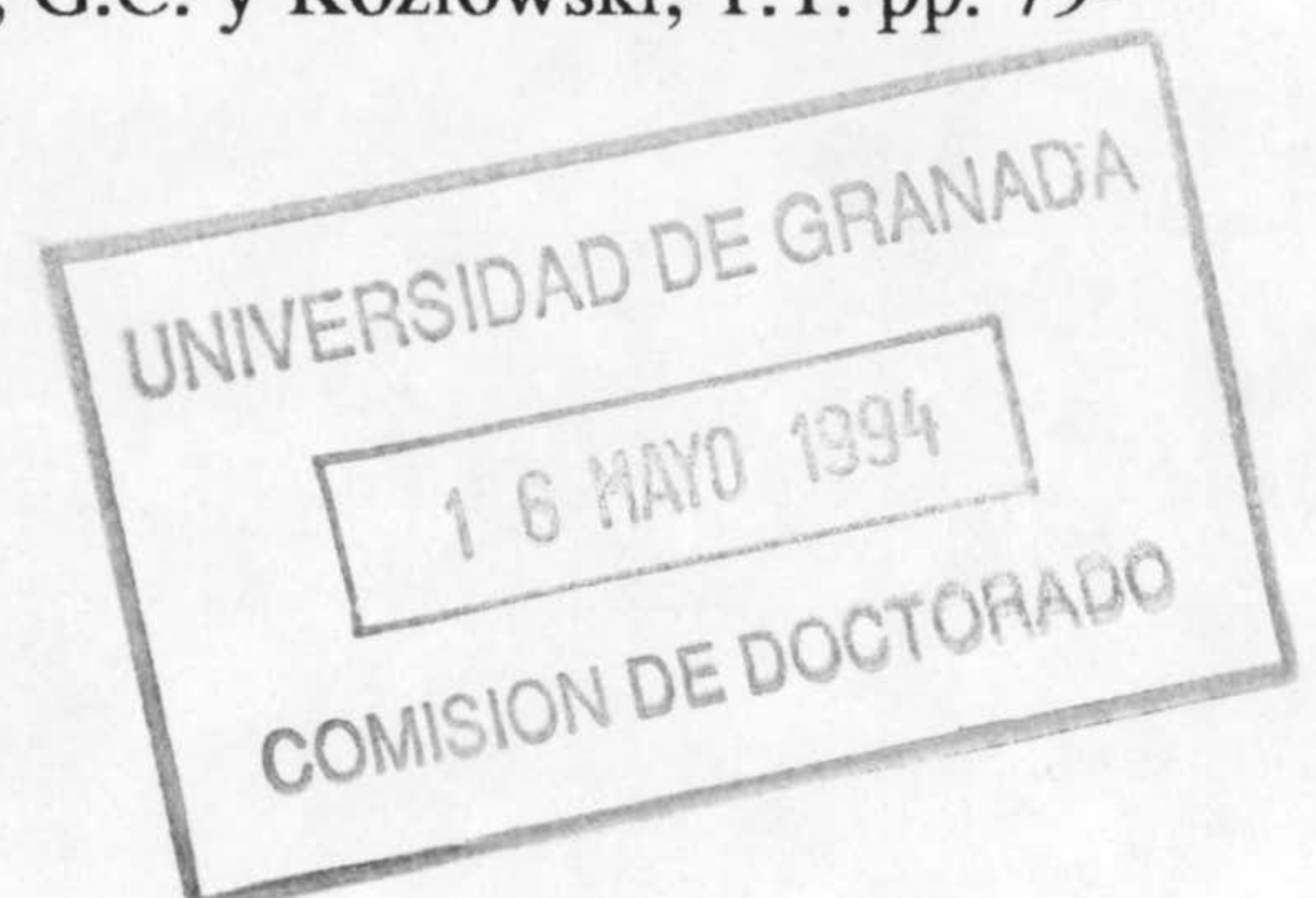
Mayo, K., Davis, R.E. y Motta, J. (1986). "Estimulation of germination of spores of *Glomus versiforme* by spore-associated bacteria". Mycologia, 78: 426-431.

McDonald, R.M. y Lewis, M. (1978). "The occurrence of some acid-phosphatases and dehydrogenases in the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*". New Phytol., 80: 135-141.

McNeil, M., Darville, A.G., Fry, S.C. y Albersheim, P. (1984). "Structure and function of primary cell wall of plants". Ann. Rev. Biochem., 53: 625- 663.

Metcalf, L.D., Schmitz, A.A. y Pelka, J.R. (1966). "Rapid preparation of fatty acid esters from lipids for gas chromatographic analysis". Anal. Chem., 38: 514-515.

Meyer, F.H. (1973). "Distribution of ectomycorrhizae in native and man-made forest". En: Ectomycorrhizae: their ecology and physiology. Eds. Marks, G.C. y Kozlowski, T.T. pp. 79-105. Academic Press, New York.



Mincov, I.B y Strotmann, H. (1989). "The effect of azide on regulation of the chloroplast H<sup>+</sup>-ATPase by ADP and phosphate". *Biochem. Biophys. Acta*, 973: 7-12.

Mitchell, P. (1961). "Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemiosmotic type of mechanism". *Nature*, 191: 144-148.

Mitchell, P. (1977). "Vectorial chemosmotic processes". *Ann. Rev. Biochem.*, 46: 996.

Morandi, D. y Le Quere, J. L. (1991). "Influence of nitrogen on accumulation of isosojagol (a newly detected coumestan in soybean) and associated isoflavonoids in roots and nodules of mycorrhizal and non-mycorrhizal soybean". *New Phytol.* 117: 75-79.

Morton, J.B. (1988). "Taxonomy of VA mycorrhizal fungi: Classification nomenclature and identification". *Mycotaxon*, 32: 267-324.

Mosse, B., (1962). "The establishment of vesicular-arbuscular mycorrhiza under aseptic conditions". *J. Gen. Microbiol.*, 27: 509-520.

Mosse, B. y Hayman, D.S. (1971). "Plant growth responses to vesicular-arbuscular mycorrhiza. II. In unsterilised field soils". *New Phytol.* 70: 29-34.

Mosse, B. y Hepper, C.M. (1975). "Vesicular-arbuscular mycorrhizal infections in root organ cultures". *Physiol. Plant Pathol.*, 5: 215-223.

Mosse, B., Stribley, D.P., y Le Tacon, F. (1981). "Ecology of mycorrhizae and mycorrhizal fungi". *Adv. Microbiol. Ecol.*, 5: 137-210.

Munns, D.N. y Mosse, B. (1980). "Mineral nutrition of legume crops". En: *Advances in Legume Science*. Eds. Summerfield, R.J. y Bunting, A.H. pp. 115-125. Londres.

Murdoch, C.L., Jackobs, J.A. y Gerdemann, J.W. (1967). "Utilization of phosphorous sources of different availability by mycorrhizal and non-mycorrhizal maize". *Plant and Soil*, 27: 329-334.

Nagy, S., Nordby, H.E. y Nemeč, S. (1980). "Composition of lipids in roots of six citrus cultivars infected with the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus, *Glomus mosseae*". *New Phytol.* 85: 377-384.

- Nair, M. G., Safir, G. R. y Siqueira, J. O. 1991. "Isolation and identification of vesicular-arbuscular mycorrhiza-stimulatory compounds from clover (*Trifolium repens*) roots". Appl. Environ. Microbiol. 57: 434-439.
- Nemec, S. (1981). "Histochemical characteristic of *Glomus etunicatum* infection of *Citrus limon* fibrous roots". Can. J. Bot., 59: 609-614.
- Nguyen, T.D., Miquel, M., Dubacq, J.P. y Siegenthaler, P.A. (1987). "Localization and some properties of a  $Mg^{2+}$ -dependent ATPase in the inner membrane of pea chloroplasts envelopes". Plant Sci., 50: 57-63.
- Nicolson, T.H. (1975). "Evolution of vesicular-arbuscular mycorrhizas". En: Endomycorrhizas. Eds. Sanders, F.E., Mosse, B. y Tinker, P.B. pp. 25-34. Academic Press, London.
- Nordby, H.E., Nemec, S. y Nagy, S. (1981). "Fatty acids and sterols associated with citrus root mycorrhizae". J. Agric. Food Chem., 29: 396-401.
- Oliver, A.J., Smith, S.E., Nicholas, D.J.D. y Wallace, W. (1983). "Activity of nitrate reductase in *Trifolium subterraneum*: Effects of mycorrhizal infection and phosphate nutrition". New Phytol. 94: 63-79.
- O'Neil, S.D., Bennett, A.B. y Spanswick, R.M. (1983). "Characterization of a  $NO_3^-$  sensitive  $H^+$ -ATPase from corn roots". Plant Physiol., 72: 837-846.
- Oswald, E.T. y Ferchau, H.A. (1968). "Bacterial associations of coniferous mycorrhizae". Plant and Soil, 28: 187-192.
- Pacovsky, R.S. (1989a). "Carbohydrate, protein and amino-acid status of *Glycine-Glomus-Bradyrhizobium* symbioses". Physiol. Plant., 75: 346.
- Pacovsky, R.S. (1989b). "Metabolic differences in *Zea-Glomus-Azospirillum* symbioses". Soil Biol. Biochem., 21: 953-960.
- Pacovsky, R.S. y Fuller, G. (1988). "Mineral and lipid composition of the *Glycine-Glomus-Bradirrhizobium* symbioses". Physiol. Plant., 72: 733-746.

- Pairunam, A.K., Robson, A.D. y Abbot, L.K. (1980). "The effectiveness of vesicular-arbuscular mycorrhizas in increasing growth and phosphorous uptake of subterranean clover from phosphorous sources of different solubilities". *New Phytol.* 84: 327-338.
- Palomares, A.J. y Coronado, C. (1992). "Simbiosis *Rhizobium* -leguminosa: El proceso de nodulación". En: *Interacción Planta-Microorganismo: Biología del Nitrógeno*. Eds. González López y Lluch. Editorial Rueda. Madrid.
- Parets-Soler, A., Pardo, J.M. y Serrano, R. (1990). "Immunocytolocalization of plasmamembrane H<sup>+</sup>-ATPase". *Plant Physiol.*, 93: 1654-1658.
- Patrick, J.W. (1989). "Solute efflux to the apoplast at plant/microorganism interfaces". *Austr. J. Plant Physiol.*, 16: 53-67.
- Pearson, V. y Tinker, P.B. (1975). "Measurement of the phosphorous fluxes in the external hyphae of endomycorrhizas". En: *Endomycorrhizas*. Eds. Sanders, F.E., Mosse, B. y Tinker, P.B. pp. 25-34. Academic Press, London.
- Pelissier, B., Thibaud, J.B., Grignon, C. y Esquerre-Tugaye, M.T. (1986). "Cell surfaces in plant-organisms interactions. VII. Elicitor preparations from two fungal pathogens depolarize plant membranes". *Plant Sci.*, 46, 103-109.
- Pendersen, P.L. (1975). "Mitochondrial adenosine triphosphatase". *Bioenergetics*, 6: 243.
- Peña, J.I., Sánchez-Díaz, M., Aguirreolea, J. y Becana, M. (1988). "Increased stress tolerance of nodule activity in the *Medicago-Rhizobium-Glomus* symbiosis under drought". *J. Plant Physiol.*, 133: 79-83.
- Perlin, D.S. y Spanswick, R.M. (1981). "Characterization of ATPase activity associated with corn leaf plasma membranes". *Plant Physiol.*, 68: 521-526.
- Phillips, J.M. y Hayman, D.S. (1970). "Improved procedures for clearing root and staining parasitic and vesicular-arbuscular fungi for rapid assessment of infection". *Trans. Br. Mycol. Soc.*, 55: 158-161.

- Piché, Y., Ackerley, C.A. y Peterson, R.L. (1986). "Structural characteristics of ectendomycorrhizas synthesized between roots of *Pinus resinosa* and E-strain fungus *Wilcoxina mikolae* var. *mikolae*". *New Phytol.*, 104: 447-452.
- Poole, R.J. (1978). "Energy coupling for membrane transport". *Plant Physiol.*, 29: 437-460.
- Powell, C.Ll. (1975). "Plant-growth responses to vesicular-arbuscular mycorrhizae. VIII. Uptake of P by onion and clover infected by different Endogone spore types in <sup>32</sup>P-labelled soil". *New Phytol.* 75: 563-566.
- Powell, C.Ll. (1976). "Development of mycorrhizal infections from Endogone spores and infected root segments". *Trans. Br. Mycol. Soc.*, 66: 439-445.
- Rai, R. (1988). "Interaction response of *Glomus-albidus* and *Cicer-Rhizobium* strains on iron uptake and symbiotic N<sub>2</sub> fixation in calcareous soil". *J. Plant Nutrit.*, 11: 863-869.
- Raudaskoski, M. (1992). "Cell and molecular biology of the cytoskeleton in filamentous fungi". COST Action 8.10. Torino.
- Rayle, D.L. y Cleland, R. (1970). "Enhancement of wall loosening and elongation by acid solution". *Plant Physiol.*, 81: 126-129.
- Rayle, D.L. y Cleland, R. (1977). "Control of plant cell enlargement by hydrogen ion". *Curr. Top. Dev. Biol.*, 11: 187-214.
- Reinhold, L. y Kaplan, A. (1984). "Membrane transport of sugar and aminoacids". *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 35: 45-82.
- Rhodes, L.H. y Gerdemann, J.W. (1975). "Phosphate uptake zones of mycorrhizal and non-mycorrhizal onions". *New Phyto.*, 75: 444-461.
- Rhodes, L.H. y Gerdemann, J.W. (1978). "Translocation of calcium and phosphate by external hyphae of vesicular-arbuscular mycorrhizae". *Soil Sci.* 126: 125-126.
- Rodríguez, M.P. (1988). "Regulación y cambios metabólicos durante la germinación del polen de olivo (*Olea europaea* L.)" Tesis Doctoral. Universidad de Granada.



- Roldán, M. (1988). "Estudio de los mecanismos de acción del boro a nivel de membranas de raíces de plántulas de girasol (*Helianthus annuus* L.)" Tesis Doctoral. Universidad de Granada.
- Sánchez-Díaz, M., Pardo, M., Antolín, M., Peña, J. y Aguirreolea, J. (1990). "Effect of water stress on photosynthetic activity in the *Medicago-Rhizobium-Glomus* symbiosis". *Plant Sci.*, 71: 215-221.
- Safir, G.R. (1985). "Water relations and drought tolerance of vesicular-arbuscular mycorrhizal plants". IAEA TECDOC-338, pp. 127-132.
- Sanders, F.E. y Sheikh, N.A. (1983). "The development of vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in plant root systems". *Plant Soil*: 71, 223-246.
- Sanders, F.E. y Tinker, P.B. (1973). "Phosphate inflow into mycorrhizal roots". *Pestic. Sci.* 4: 385-395.
- Sanders, F.E., Tinker, P.B., Black, R.L.B. y Palmerley, S.M. "The development of infection and growth promoting effects with four endomycorrhizal root systems. I. Spread species of vesicular-arbuscular endophytes". *New Phytol.* 78: 263-273.
- Scannerini, S. (1975). "Le ultrastrutture delle micorrize". *G. Bot. Ital.*, 109.
- Scannerini, S. y Bonfante-Fasolo, P. (1983). "Comparative ultrastructural analysis of mycorrhizal associations". *Can. J. Bot.*, 61: 917-943.
- Scannerini, S., Bonfante-Fasolo, P. y Fontana, A. (1975). "An ultra-structural model for the host-symbiont interaction in endotrophic mycorrhizae of *Ornithogalum umbellatum* L." En: *Endomycorrhizas*. Eds. Sanders, F.E., Mosse, B. y Tinker, P.B. pp. 313-324. Academic Press, London.
- Scannerini, S., Fieschi, M., Alloatti, G., Sacco, S. y Berta, G. (1990). "Cell potential hyperpolarization in *Allium porrum*+*Glomus* sp. strain E<sub>3</sub> VA mycorrhizae". VIII NACOM, Jackson, Wyoming.

Schmitz, O., Danneberg, G., Hundeshagen, A., Klingner, A. y Bothe, H. (1991). "Quantification of vesicular arbuscular mycorrhiza by biochemical parameters". *J. Plant Physiol.*, 139: 106-114.

Serrano, R. (1985). "Plasma Membrane ATPase of Plants and Fungi". CRC Press, Boca Raton, Florida.

Serrano, R. (1989). "Structure and function of plasma-membrane ATPase". *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 40: 61-94.

Serrano, R. (1990). "Plasma membrane ATPase". En: *The Plasma Membrane*. Eds. C. Larsson y I.M. Møller. pp.127-153. Springer-Verlag, Berlin.

Serrano, R. y Villalba, J.M. (1993). "Bomba de protones de la membrana vegetal". *Investigación y Ciencia*, Enero 1993. pp.62-69.

Sharma, A.K. y Srivastava, P.C. (1991). "Effect of vesicular-arbuscular mycorrhizae and zinc application on dry matter and zinc uptake of greengram (*Vigna radiata* L. Wilczek)". *Biol. Fertil. Soils*, 11: 52-56.

Simon, L., Lalonde, M., y Bruns, T.D. (1992). "Specific amplification of 18S fungal ribosomal genes from vesicular-arbuscular endomycorrhizal fungi colonizing roots". *Appl. Env. Microbiol.*, 58: 291-295.

Simon, L., Bousquet, J., Levesque, R.C. y Lalonde, M. (1993). "Origin and diversification of endomycorrhizal fungi and coincidence with vascular land plants". *Nature*, 363: 67-69.

Siqueira, J.O. (1987). "Cultura axénica e monoxénica dos fungos micorrízicos vesículo-arbusculares". II Reunião Brasileira sobre Micorrizas. pp. 44-70. São Paulo.

Siqueira, J.O., Hubbell, D.H. y Schenck, N.C. (1982). "Spore germination and germ tube growth of a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *in vitro*". *Mycologia*, 74: 952-959.

- Siqueira, J. O., Safir, G. R. y Nair, M. G. (1991). "Stimulation of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation and growth of white clover by flavonoid compounds". *New Phytol.* 118 : 87-93.
- Siqueira, J.O., Sylvia, D.M., Gibson, J. y Hubbel, D.H. (1985). "Spores, germination and germ tubes of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi". *Can. J. Microbiol.*, 31: 965-972.
- Slayman, C.L. (1985a). "Proton chemistry and the ubiquity of proton pumps". *Bioscience*, 35: 16-17.
- Slayman, C.L. (1985b). "Plasma membrane proton pumps in plant and fungi". *Bioscience*, 35: 34-37.
- Smith, S.E. (1980). "Mycorrhizas of autotrophic higher plants". *Biological Reviews*, 55: 475-510.
- Smith, S.E. y Gianinazzi-Pearson, V. (1988). "Physiological interactions between symbionts in vesicular-arbuscular mycorrhizal plants". *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 39: 221-244.
- Smith, S.E. y Smith, F.A. (1986). "Movements across membranes: physiology and biochemistry". En: *Physiological and Genetical Aspects of Mycorrhizae*. Eds. Gianinazzi-Pearson, V. y Gianinazzi, S. pp. 75-84. INRA, Paris.
- Smith, S.E. y Smith, F.A. (1990). "Structure and function of the interfaces in biotrophic symbioses as they relate to nutrient transport". *New Phytol.*, 114: 1-38.
- Smith, S.E., Tester, M. y Walker, N.A. (1986). "The development of mycorrhizal root systems in *Trifolium subterraneum* L.: Growth of the roots and the uniformity of spatial distribution of mycorrhizal infection units in young plants". *New Phytol.*, 103: 117-131.
- Smith, S.E., St. John, B.J., Smith, F.A., Nicholas, D.J.D. (1985). "Activity of glutamine synthase and glutamate dehydrogenase in *Trifolium subterraneum* L. and *Allium cepa* L.: effects of mycorrhizal infection and phosphate nutrition". *New Phytol.* 99: 211-227.

- Spanu, P., Boller, T., Ludwig, A., Wiemken, A., Faccio, A. y Bonfante-Fasolo, P. (1989). "Chitinase in roots of mycorrhizal *Allium porrum*: regulation and localization". *Planta*, 177: 447-455.
- Steer, M.W. (1988). "Plasmamembrane turnover in plant cells". *J. Exp. Bot.*, 39: 987-996.
- St. John, T.V., Hays, R.I. y Reid, C.P.P. (1983). "Influence of a volatile compound on formation of vesicular-arbuscular mycorrhizas". *Tran. Br. Myc. Soc.*, 81: 153-154.
- Strullu, D.G. y Gourret, J.P. (1980). "Données ultrastructurales sur l'integration cellulaire de quelques parasites ou symbiotes des plantes. II. Champignons mycorrhiziens". *Bull. Soc. Bot. Fra. Actual Bot.*, 127: 97.
- Strullu, D.G., Gourret, J.P., Garrec, J.P. y Fourcy, A. (1981). "Ultrastructure and electron-probe microanalysis of the metachromatic vacuolar granules occurring in *Taxus* mycorrhizas". *New Phytol.*, 87: 537-545.
- Stubblefield, S.P., Taylor, T.N. y Trappe, J.M. (1987). "Vesicular-arbuscular mycorrhizae from the triassic of antarctica". *Amer. J. Bot.*, 74: 1904-1911.
- Sundaresan, P., Ubalthouse-Raja, N., Gunasekaran, P. y Lakshmanan, M. (1988). "Studies on nitrate reduction by VAM fungal spores". *Current Science*, 57: 84-85.
- Swaminathan, K. y Verma, B.C. (1979). "Responses of three crop species to vesicular-arbuscular mycorrhizal infection on zinc-deficient Indian soils". *New Phytol.*, 82: 481-487.
- Sylvia, D.M. y Hubbell, D. (1986). "Growth and sporulation of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in aeroponic and membrane systems". *Symbiosis*, 1: 259-267.
- Sze, H. (1985). "H<sup>+</sup>-translocating ATPase: advances using membrane vesicles". *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 36: 175-208.
- Takami, S., Turner, N.C. y Rawson, H. (1981). "Leaf expansion of four sunflower (*Helianthus annuus* L.) cultivar in relation to water deficits. I. Pattern during plant development". *Plant, Cell and Env.*, 4: 399-407.

- Tinker, P.B. (1975).** "Soil chemistry of phosphorous and mycorrhizal effects on plant growth". En: Endomycorrhizas. Eds. Sanders, F.E., Mosse, B., y Tinker, P.B. pp. 353-371. Academic Press, Londres.
- Tinker, P.B. (1980).** "The role of rhizosphere microorganisms in phosphorous uptake by plants". En: The Role of Phosphorous in Agriculture. Eds. Kwasaneh, F. y Sample, E. pp.617-654. American Society of Agronomy, Madison.
- Tinker, P.B. y Gildon, A. (1983).** "Mycorrhizal fungi and ion uptake". En: Metals and micronutrients. Uptake and utilization by plants. Eds. Robb, D.A. y Pierpoint, W.S. pp. 21-32. Accademic Press, Londres.
- Tobar, R., Azcón, R. y Barea, J.M. (1993).** "Improved nitrogen uptake and transport from <sup>15</sup>N-labelled nitrate by external hyphae of arbuscular mycorrhiza in a water-stressed soil". New Phytol., en prensa.
- Tommerup, I.C. y Abbott, L.K. (1981).** "Prolonged survival and viability of VA-mycorrhizal hyphae after root death". Soil Biol. Biochem., 13: 431-433.
- Torrey, G. (1988).** "Cellular interactions between host and endosymbiont in dinitrogen-fixing root nodules of woody plants". En: Cell to Cell Signals in Plant, Animal and Microbial Symbiosis. Eds. Scanerini, S., Smith, D.C., Bonfante-Fasolo, P. y Gianinazzi-Pearson, V. pp. 1-25. Springer-Verlag, Berlin.
- Toth, R. y Miller, R.M. (1984).** "Dynamics of arbuscule development and degeneration in a *Zea mays* mycorrhiza". Am. J. Bot., 71: 449-460.
- Trappe, J.M. (1986).** "Phylogenetic and ecologic aspects of mycotrophy in angiosperms from an evolutionary standpoint". En: Ecophysiology of VA Mycorrhizal Plants. Ed. Safir, G.R. pp. 5-25. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Treeby, M.T. (1992).** "The role of mycorrhizal fungi and non-mycorrhizal microorganisms in iron nutrition of citrus". Soil Biol. Biochem., 24: 857-864.
- Tsai, S. M. y Phillips, D. A. 1991.** "Flavonoids released naturally from alfalfa promote development of symbiotic *Glomus* spores *in vitro*". Appl. Environ. Microbiol., 57: 1485-1488.

- Vidal, M.T. (1991). "Contribución al estudio de los factores que influyen el crecimiento in vitro de hongos de las micorrizas VA y su establecimiento en plantas micropropagadas". Tesis Doctoral. Universidad de Granada.
- Vorbeck, M.L. y Martinetti, G.V. (1965). "Separation of glycosyl diglycerides from phosphatides using silicic acid column chromatography". J. Lipid Res., 6: 3-6.
- Walker, C. (1992). "Systematics and taxonomy of the arbuscular endomycorrhizal fungi (Glomales): a possible way forward". Agronomie, 12 : 887-897.
- Warner, A. y Mosse, B. (1980). "Independent spread of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in soil". Trans. Br. Mycol. Soc., 74: 407-410.
- Watteau, F. y Berthelin, J. (1990). "Iron solubilization by mycorrhizal fungi producing siderophores". Symbiosis, 9: 59-67.
- Wellings, N.P., Wearing, A.H. y Thompson, J.P. (1991). "Vesicular-arbuscular mycorrhizae (VAM) improve phosphorous and zinc nutrition and growth of pigeonpea in a vertisol". Aust. J. Agric. Res., 42: 835-845.
- Westheimer, F.H. (1987). "Why nature chose phosphates". Science, 235: 1173-1178.
- Wetherbee, R., Hinch, J.M., Bonig, I. y Clarke, A.E. (1985). "Response of *Zea mays* roots to infection with *Phytophthora cinnamomi*. II. The cortex and stele". Protoplasma, 126: 188-197.
- White, J.A. y Brown, M.F. (1979). "Ultrastructure and X-ray analysis of phosphorous granules in a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus". Can. J. Bot. 57: 2812-2818.
- Wilson, J.M. (1984a). "Comparative development and interaction between vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi". New Phytol., 97: 413-426.
- Wilson, J.M. (1984b). "Competition for infection between vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi". New Phytol., 97: 427-435.

- Wong, J.Y. y Marschner, H. (1988). "Effect of nitrogen supply on germination and hyphal growth of *Glomus mosseae in vitro* and the rhizosphere of soybean". *Angew. Botanik*, 62: 160-181.
- Wyss, P., Mellor, R.B. y Wiemken, A. (1990). "Vesicular-arbuscular mycorrhizas of wild type soybean and non-nodulating mutants with *Glomus mosseae* contain symbiosis specific polypeptides (mycorrhizins) immunologically cross-reactive with nodulins". *Planta*, 182: 22.
- Yang, C.S. y Korf, R.P. (1985a). "*Ascorrhizoctoria* Gen. Nov. and *Complexipes* Emend., two genera for anamorphs of species assigned to *Tricharina* (Discomycetes)". *Mycotaxon*, 23: 457-481.
- Yang, C.S. y Korf, R.P. (1985b). "A monograph of the genus *Tricharina* and a new segregate genus, *Wilcoxina* (Pezizales)". *Mycotaxon*, 24: 467-531.
- Yeagle, P. (1987). "The membrane of cells". Eds. Harcourt, Brace, Jovanovich. Academic Press Inc., Orlando.
- Zajicek, J.M., Hetrick, B.A.D. y Albrecht, M.L. (1987). "Influence of drought stress and mycorrhizae on growth of two native forbs". *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 112: 454-459.
- Zeiger, E. (1983). "The biology of stomatal cells". *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 34: 441-475.