



Inducción de respuestas de defensa
en la interacción planta-microorganismos
(micorrizas arbusculares y Rhizobium)

Blanca de la Noval y E. Pérez

2004

Redacción y edición: María Mariana Pérez Jorge
Diseño y maquetación: Yamila Isabel Díaz Bravo

SOBRE LA PRESENTE EDICIÓN:

© Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA), 2004

© Blanca de la Noval Pons

ISBN: 959-7023-21-0

Ediciones INCA-2004

Gaveta postal 1, San José de las Lajas,

La Habana, Cuba, CP 32 700

***e-mail:* revista@inca.edu.cu**

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
INDUCCIÓN DE RESPUESTAS DE DEFENSA	3
Procesos de reconocimiento	4
Modificaciones de la pared celular	5
Reacción hipersensible	6
RESPUESTAS DE DEFENSA INDUCIDA EN LAS MA	9
Flavonoides (fitoalexinas)	10
Acumulación de proteínas relacionadas con patogenicidad	12
Inducción génica en células que contienen arbuscúlos	16
Supresión de las repuestas de defensa	18
Hormonas relacionadas con defensa en las MA	20
<i>Etileno</i>	20
<i>Acido jasmónico</i>	22
<i>Sistemina</i>	24
<i>Actividad biológica</i>	25
<i>Modelos de acción</i>	26
COMPARACIÓN ENTRE SIMBIOSIS MICORRÍZICA Y RHIZOBIUM- LEGUMINOSA	29
Intercambio de señales entre simbioses	29
<i>Micorrizas arbusculares</i>	29
<i>Rhizobium</i>	29
<i>Mecanismos de colonización</i>	30
<i>¿Las señales de los HMA y los factores Nod de Rhizobium activan vías de transducción de señales comunes?</i>	35
REFERENCIAS	38

INTRODUCCIÓN

Las micorrizas constituyen la simbiosis más extendida sobre el planeta, tanto por el número de hospederos que colonizan, como por su distribución, la cual se establece entre el 90 % de las plantas terrestres y como mínimo 6 000 especies de hongos, correspondientes a Sigo-Asco y Basidiomycotina (1); entre ellos las Micorrizas arbusculares (MA) y las Ectomicorrizas (EM) constituyen los grupos más numerosos (2).

Durante el desarrollo de la simbiosis micorrízica arbuscular, tienen lugar cambios anatómicos y citológicos en la raíz; sin embargo, la expresión morfológica no se detecta a simple vista; quizás por ello la simbiosis ha sido ignorada en estudios sobre la fisiología de la planta, cuando realmente forma parte de ella y el micotrofismo es para el vegetal la forma habitual de adquisición de nutrientes minerales.

Al parecer, en el establecimiento de la simbiosis actúan señales, que controlan las modificaciones fisiológicas y anatómicas entre ambos simbiontes. Se ha sugerido que en cada una de las diferentes fases se requieren señales apropiadas, las cuales son producidas por un miembro y reconocidas por el otro (3); estas señales son intercambiables entre el hongo y la planta en la rizósfera, y poseen la capacidad de difundirse, actuando así sobre los procesos de germinación, extensión del tubo germinativo y la dirección del crecimiento hifal (4).

Durante su crecimiento las raíces producen una amplia variedad de compuestos orgánicos solubles en agua y compuestos volátiles que pueden ser asimilados directamente por los organismos rizosféricos. Estos compuestos pueden servir como quimioatrayentes, fuentes nutritivas o como elicitores de mecanismos de defensa durante la micorrización, en la fase de pre-colonización. Es posible que en las MA los fragmentos de la pared celular del hongo, tales como los oligómeros de quitina, puedan ser reconocidos como elicitores por la planta, similar a lo que ocurre en las infecciones patogénicas (2, 5).

Los elicitores han sido definidos como compuestos de bajo peso molecular que poseen alta afinidad por sitios de la pared celular y de la membrana de la célula huésped, los cuales pueden actuar como receptores, produciendo la activación de las cascadas de transducción de señales en el huésped (6). Estos pueden ser específicos para una interacción huésped-patógeno específica determinada por el genotipo de avirulencia del patógeno y de resistencia del huésped; mientras que los elicitores no específicos son frecuentemente dados por todo el genotipo del patógeno (7).

Los compuestos que elicitan las respuestas de defensa primaria en planta pueden ser de naturaleza diversa, siendo, fundamentalmente, del grupo de los oligosacáridos. Estos son carbohidratos complejos, producidos por la degradación de pared celular de diverso origen, que son capaces de modular el crecimiento y

desarrollo de las plantas a bajas concentraciones. También se ha encontrado que son capaces de inducir respuestas de defensa ante el ataque por patógenos, las que incluyen: la acumulación de fitoalexinas, inhibidores de proteinasas, lignina, peroxidasas, lipoxigenasas (LOX) y β -1,3-glucanasas. De igual forma, se piensa participen como señales en las interacciones planta-microorganismos.

Según su estructura y función, los oligosacáridos que han podido ser purificados y caracterizados han sido divididos en seis grupos fundamentales, existiendo otros que por su complejidad no han podido ser purificados, entre los que se encuentran los oligosacáridos lipo-oligosacáridicos sintetizados por bacterias simbiotes de plantas, de naturaleza muy heterogénea (8) (Tabla I).

Tabla I. Grupos de oligosacáridos (8)

Oligosacáridos fúngicos	Oligosacáridos vegetales
1. Hepta β -Glucósido	1. Xiloglucano
2. Glicopéptido	2. Oligogalacturónido
3. Oligoquitina	
4. Oligoquitosana	

Durante el establecimiento de la simbiosis MA se producen diferentes fases (3), en las cuales ocurren eventos que conllevan a la inducción de mecanismos de defensa en la planta huésped. Debido a la similitud encontrada entre los primeros estadios del establecimiento del hongo micorrízico arbuscular (HMA) y las interacciones planta-patógenos, se ha utilizado esta última como patrón de comparación al estudiar la interacción que se establece entre los HMA y su planta huésped.

El presente trabajo tiene como objetivo dar una visión general de los mecanismos de defensa en planta y las similitudes que se han encontrado entre las micorrizas arbusculares y *Rhizobium* en el establecimiento de la simbiosis de estos con las plantas.

INDUCCIÓN DE RESPUESTAS DE DEFENSA

Tanto las plantas como los animales se encuentran continuamente expuestas al ataque por patógenos, ante los cuales tienen que activar diferentes respuestas, que puedan conllevar a producir la resistencia ante el agente causal o a desatarse la enfermedad, ya sea por una respuesta insuficiente o porque el patógeno es capaz de burlar los mecanismos de defensa.

Cuando un patógeno coloniza sucesivamente a una planta huésped causándole la enfermedad, se dice que el agente en cuestión es virulento y el huésped es susceptible a este, siendo la interacción entre ellos compatible. Por el contrario, cuando la planta es capaz de responder por la rápida activación de una batería de respuestas de defensa efectivas, evitando que se produzca la enfermedad, se dice entonces que el patógeno es avirulento, el huésped resistente y la interacción es incompatible. A pesar de la diversidad de agentes patógenos potenciales, con los cuales entran en contacto las plantas durante su ciclo de vida, la resistencia aparece como una regla y la susceptibilidad (enfermedad) como una excepción (7, 9).

En las respuestas de resistencia que desarrolla la planta ante el ataque de los patógenos potenciales, se pueden distinguir dos tipos: la resistencia no-hospedero y la huésped específica raza/cultivar. Esta última ha sido la más estudiada y se define para la combinación planta-patógeno, donde ciertos cultivares del hospedero pueden ser colonizados por razas particulares del patógeno. Teniendo en cuenta un análisis genético, esta se encuentra frecuentemente definida por la participación directa o indirecta de productos de genes de resistencia (R) y productos del correspondiente gen de avirulencia (Avr) (7, 9), mientras que la resistencia no hospedera ocurre cuando la mayoría o casi todos los biotipos conocidos de una especie de planta dada son resistentes a la mayoría o a todos los biotipos de determinado patógeno. Esta no se basa en la interacción R/Avr sino en la participación de múltiples factores de resistencia (10).

Se conoce que la resistencia ante un patógeno determinado se produce por la participación de diversos mecanismos, los que pueden involucrar componentes de barreras constitutivas o componentes de defensa inducible. Sin embargo, los mecanismos de percepción y los procesos bioquímicos inducidos en ambos tipos de resistencia son muy similares (7).

Entre los mecanismos constitutivos encontramos la formación de una cutícula cerosa o reservorios de compuestos antimicrobianos, estratégicamente situados, cuya función es prevenir la colonización de los tejidos (11, 12, 13). Además de estos mecanismos constitutivos también se produce la activación de la defensa celular que previene la colonización de los tejidos, una vez que las barreras estructurales han sido atravesadas, las cuales son consideradas mecanismos de defensa inducidos por la invasión del patógeno y requieren de la participación

directa del metabolismo del huésped (9, 14), pudiendo producirse en la mayoría de los órganos de la planta (15, 16).

La enfermedad ocurre entonces cuando el microorganismo potencialmente parasítico burla la defensa constitutiva y además elude la elicitación de la respuesta inducida en el tejido infectado o inhibe la inducción de estas respuestas mediante la secreción de toxinas metabólicas u otros factores necrotizantes (11, 17).

Las respuestas de defensa inducidas son un rasgo característico de las interacciones incompatibles asociadas con la resistencia a enfermedades, de las cuales Hutcheson (12) identifica tres clases de respuestas en relación con el tejido involucrado que difieren de las señales participantes: respuestas primarias, secundarias y sistémica adquirida.

La respuesta primaria es localizada en la célula con la cual entra en contacto el patógeno, o agente invasor, la cual involucra el reconocimiento de la molécula señal específica, siendo crítica la presentación y el despliegue de esta molécula por el patógeno. Frecuentemente, como consecuencia de esta respuesta ocurre la muerte celular programada (PCD). Durante la respuesta primaria se produce, además, la liberación de moléculas señales difusibles, conocidas como elicitors (6, 18), que son los responsables de la inducción de la respuesta secundaria en las células adyacentes, alrededor del sitio de infección. Como tercera clase de respuesta encontramos la sistémica adquirida (SAR), la cual es producida por la participación de hormonas que son acumuladas en el sitio de infección o adyacentes a este y son trasladadas a toda la planta, produciendo resistencia en zonas lejanas al sitio de contacto con el patógeno (19, 20).

Procesos de reconocimiento

Durante la secuencia de procesos que ocurren ante la presencia de un patógeno, el contacto constituye el evento más importante, dado por el reconocimiento por el huésped, donde se activan las respuestas de defensa inducida. Muchos microorganismos biotróficos de plantas no son invasivos, permaneciendo externos a la membrana plasmática e inclusive, en muchos casos, la pared celular permanece intacta. Los modelos tradicionales que tratan de explicar la interacción planta-microorganismo postulan que el evento de reconocimiento gen-específico podría ocurrir en el exterior de la célula, en un proceso que involucra moléculas receptoras, probablemente localizadas en la membrana plasmática y moléculas elicitoras difusibles, capaces de atravesar la pared (21, 22).

A pesar de ello, las células vegetales poseen una gran variedad de sistemas de vigilancia localizada en compartimentos celulares, que pueden detectar varias señales generadas por el patógeno, pudiendo detectar estímulos extracelulares, a nivel de citoplasma o de núcleo (12).

Recientemente han sido identificadas diferentes proteínas que inducen respuestas de defensa en planta, las que pueden ser de origen vegetal o

fúngico (23). En algunas interacciones estas proteínas tienen una función virulenta necesaria para la patogenicidad, considerando que durante las reacciones incompatibles, estas mismas proteínas son reconocidas por el sistema de vigilancia celular para iniciar una respuesta de defensa. Crítico para este proceso es la presentación y el despliegue de estas proteínas por el patógeno, las que pueden ser liberadas en el compartimento celular correcto del huésped, donde ocurre el evento de reconocimiento (24, 25).

Hutcheson (12) realiza una excelente revisión en relación con la participación de proteínas de origen fúngico, como elicitores de respuestas de defensa en plantas, en la cual plantea un modelo de elicitación de la respuesta de defensa activa en plantas, según el cual las plantas poseen proteínas centinelas, las que al unirse a una proteína señal elicitan una respuesta. Para los patógenos que interactúan periféricamente con las células hospederas tales como *C. fulvum*, *R. secalis*, patógenos vasculares como *F. oxysporum* y *X. oryzae* o nemátodos, el proceso de reconocimiento que induce las respuestas de defensa pueden esperarse que ocurra en el apoplasto; para ello las proteínas centinelas necesitan detectar al patógeno extracelularmente. Sin embargo, para los patógenos que forman una interacción más íntima con la célula huésped como virus, la mayoría de las bacterias y los hongos formadores de haustorio, el proceso de reconocimiento es intracelularmente.

El hongo, al hacer contacto con la planta, expresa un mecanismo de reconocimiento mediante el ensanchamiento apical de la hifa, para formar el apresorio, a partir del cual se origina la hifa de penetración, que coloniza la epidermis y al parénquima cortical de la raíz (26). Se plantea que el apresorio constituye la primera señal de reconocimiento entre la planta y el hongo (3). Sin embargo, en el caso específico de esta interacción no ha sido identificada aún la naturaleza de los compuestos que podría participar como receptores.

Modificaciones de la pared celular

Ante el ataque por los patógenos, las plantas son capaces de activar una serie de respuestas inducibles, para tratar de atenuar o evitar su diseminación, siendo una de ellas el reforzamiento de la pared celular, constituyendo una barrera física resistente a las enzimas hidrolíticas provenientes del invasor. En este proceso se ha observado que ocurre la deposición de lignina, calosa y glicoproteínas ricas en hidroxiprolina (HRGP), las que pueden ser inducidas por elicitores derivados de la pared celular fúngica (27).

Se postula que la liberación de proteínas estructurales de forma insoluble provenientes de la pared celular es catalizada por la enzima peroxidasa, en la presencia de H_2O_2 , el que además, induce la formación de polímeros de lignina vía actividad peroxidasa (28).

Las peroxidasas catalizan la polimerización oxidativa de los fenilpropanoides produciendo la liberación de lignina, la que se encuentra involucrada en el

entrecruzamiento de las proteínas de la pared celular, durante la penetración fúngica (29), cuya actividad puede verse afectada por la concentración de P e isoflavonoides (30). Su regulación ocurre a nivel transcripcional y post-transcripcional, donde se ha observado mayor acumulación en plantas micorrizadas que en los controles no micorrizados (29).

El incremento de la lignificación unido al entrecruzamiento de las proteínas estructurales que ocurre ante el ataque por patógenos, causan el reforzamiento de las paredes haciéndolas resistentes ante el ataque por las enzimas hidrolíticas de origen microbiano (31). Mediante este mecanismo se limita la diseminación del patógeno en el tejido vegetal, restringiéndolo a la célula huésped, en la cual se induce la muerte celular hipersensitiva (7).

En células de soya y frijol, se ha observado que debido al tratamiento con elicitores se produce la inmovilización de proteínas estructurales de la pared celular (31, 32), las cuales fueron identificadas como glicoproteínas ricas en prolina e hidroxiprolina (HRGP) (33).

En plantas micorrizadas se presenta la acumulación de HRGP asociadas con la simbiosis (34), las que poseen una expresión diferencial en las MA (35). Estas se localizan en la interfase entre las células vegetales y las fúngicas, mientras que en el tejido no colonizado, solo se localizan en la pared celular (36). Se ha observado que raíces de frijol colonizadas con *Glomus sp.* muestran mayor nivel de mRNA de HRGP, que los controles no micorrizados (37), lo cual nos sugiere la participación de los HMA en la inducción de modificaciones de la pared como respuesta de defensa primaria.

Diversos autores indican que las plantas micorrizadas expresan incrementos en el nivel de resistencia al ataque por patógenos, siendo la primera respuesta que se induce, las modificaciones de la pared, para limitar la penetración del agente invasor (38, 39, 40).

Reacción hipersensible

A medida que va ocurriendo la colonización de la planta huésped por el HMA, se produce una secuencia de eventos relacionados con la inducción de respuestas de defensa primaria, entre los que se observa la ocurrencia de fenómenos característicos de la respuesta hipersensible (HR).

Se ha observado que en las relaciones incompatibles planta-patógeno ocurre la acumulación de fitoalexinas en el sitio de infección durante la HR, fenómeno que no se observa durante el establecimiento de la simbiosis MA. Sin embargo, se ha encontrado que en estadios tempranos de la colonización ocurre la acumulación transiente de fitoalexinas, la que en algunos casos puede ser inducida también en estadios tardíos (29).

Luego del reconocimiento en muchas de las interacciones planta-microorganismo, como consecuencia de la respuesta primaria ocurre la inducción de la muerte celular programada (PCD) o hipersensitiva, como también se le

conoce. Esta se produce con el objetivo de limitar la diseminación del mismo en el tejido vegetal, al aislarlo de las fuentes nutricionales (41), donde la célula muerta interrumpe el flujo de nutrientes. Otro mecanismo mediante el cual limita la diseminación del patógeno puede ser por abolir procesos metabólicos necesarios para la supervivencia del patógeno (tales como la traslocación para la replicación viral) o porque las nucleasas activadas durante este proceso pueden degradar el genoma viral.

En el caso de las bacterias y patógenos facultativos, los cuales no necesitan la célula viva para sobrevivir y desarrollar la colonización, la PCD no es un factor limitante. Sin embargo, se ha observado que a pesar de ello, se produce una reducción del crecimiento y la multiplicación una vez que la PCD se ha iniciado, lo cual indica que también otros mecanismos de defensa pueden haber sido inducidos conjuntamente (12). Esta respuesta no es contradictoria, si tenemos en cuenta que existen eventos comunes a la PCD y a la cascada de señales que inducen mecanismos de defensa, como los procesos que conllevan a la despolarización de la membrana y la activación de las vías oxidativas.

Cuando se produce el reconocimiento del patógeno por la célula vegetal, se inducen una serie de respuestas rápidas a nivel de membrana que incluyen peroxidación lipídica, salida de K^+ y entrada de Ca^{2+} , procesos que ocurren en la primera hora posterior al contacto (42), con la consecuente despolarización de la membrana. Asociada a esta interacción se ha observado la ocurrencia de un proceso que conlleva a la activación de las vías oxidativas con la formación de especies activas de oxígeno (AOS), como el peróxido de hidrógeno (43).

A medida que este proceso está ocurriendo, se observa una rápida necrosis confluyente, como respuesta de resistencia del tejido vegetal ante la presencia del patógeno, la cual no es más que la manifestación macroscópica de la PCD y que es conocida como Respuesta Hipersensible. Esta se define como la muerte rápida y localizada de células en el sitio de invasión del patógeno (44), siendo la responsable de la limitación del crecimiento del patógeno (45). Entre sus características comunes podemos encontrar la deposición de lignina, la formación de polifenoles y la producción de compuestos antimicrobianos de bajo peso molecular (46), luego de la cual ocurre el fortalecimiento de la pared celular, con la deposición de HRGP (16, 17).

Flor (47), estudiando las bases genéticas de la resistencia a enfermedades mediada por HR en la interacción del lino y el hongo patógeno *Melampsora lini*, demostró que esta es la consecuencia de la interacción de pares de genes del patógeno y del hospedero, lo cual constituyó la base teórica para la hipótesis de que la interacción planta-patógeno está dada por una interacción gen-por-gen y para el clonaje molecular de los genes de avirulencia (avr) del patógeno y su correspondiente gen R en planta.

Colateralmente a la ocurrencia de la PCD, se produce la expresión de genes de resistencia en los tejidos adyacentes, como los del metabolismo de los fenilpropanoides, proteínas relacionadas con patogénesis (PR) como β -1,3-glucanasa y quitinasa, así como los relacionados con la acumulación de HRGP (12).

Por su importancia en la inducción de respuestas de defensa durante el establecimiento de la simbiosis MA, estos temas serán tratados en los acápites siguientes.

RESPUESTAS DE DEFENSA INDUCIDA EN LAS MA

Se conoce que durante el establecimiento y desarrollo de la simbiosis MA, ocurre la inducción de respuestas de defensa en la planta huésped, las que generalmente, se producen de forma transiente y en menor nivel que la inducida por las interacciones planta-patógeno y frecuentemente son suprimidas en los estadios posteriores de la interacción. Este patrón de expresión sugiere la participación de compuestos que pueden actuar como elicitores, en los primeros estadios de la formación de las micorrizas.

La quitina es el mayor componente de la pared de los hongos MA, la cual no solamente posee un papel estructural, sino que también actúa como molécula señal (48). Se ha observado que tanto el polímero como sus oligómeros estimulan el establecimiento de los MA (5, 49).

Un elicitador común a los hongos lo constituyen los glucanos y los oligómeros de N-glucosamina derivados de su pared celular así como péptidos de bajo peso molecular, mientras que los oligómeros pépticos liberados por la hidrólisis de la pectina de la pared vegetal poseen también actividad elicitora (40).

En 1993, Giovannetti informó la primera evidencia de moléculas señales generadas por plantas micorrizadas, utilizando membranas semipermeables que separaban al hongo de la planta. Este autor encontró que las señales eran moléculas difusibles exudadas por el huésped, cuyo peso molecular es menor a 500 Da, las cuales no fueron caracterizadas (48).

Los hongos endomicorrízico-arbusculares poseen capacidad saprofítica generada por la liberación de enzimas líticas al medio, cuyo papel en la colonización debe ser aún determinado, especialmente en el caso de las endo- y exo-poligalacturonasas (50). Estas enzimas han sido consideradas como determinantes de patogenicidad (51), ya que juegan un papel importante durante la infección por patógenos, al permitir que el hongo colonice al hospedero para obtener nutrientes producidos por la degradación de los sustratos pépticos complejos (3). Por otra parte, en *G. mosseae* se ha demostrado la producción de pequeñas cantidades de enzimas hidrolíticas capaces de degradar la pared celular, tales como pectinasas y celulasas (52).

Luego de la penetración en la raíz se produce el desarrollo intrarradical del hongo, el que se caracteriza por la formación de hifas inter- e intracelulares penetrando a las células corticales. Estas últimas pueden ser no ramificadas (ovillos) o con ramificación dicotómica (arbusculos), y constituyen el punto de intercambio entre los simbiosiontes. Durante el desarrollo en las células corticales previa a la formación de los arbusculos, el hongo invagina la membrana de la célula vegetal, la que subsecuentemente lo envuelve, creándose así un nuevo compartimiento donde se deposita material de una elevada complejidad molecular, denominado espacio apoplástico o interfase arbuscular. En ella se produce el

contacto directo entre el hongo y la planta, ocurriendo la transferencia bidireccional de nutrientes, elemento esencial en la funcionalidad de la simbiosis (3, 53, 54).

Las características de la interacción micorrízica indican que al menos tres clases diferentes de genes de la planta pueden estar involucrados en el proceso: la primera incluye genes relacionados con la génesis de nuevos componentes de las células radicales colonizadas por hifas intracelulares y arbusculos; la segunda pudiera incluir genes involucrados en las funciones metabólicas de las micorrizas y la tercera genes asociados con algunos mecanismos de defensa de la planta (3). En apoyo a esta respuesta, se ha encontrado que durante la interacción simbiótica entre plantas de frijol y *G. mosseae* se producen cambios en la expresión de genes relacionados con respuestas de defensa, como quitinasa, β -1,3-glucanasas y fenilalanina amonio liasa (PAL), las cuales difieren al ser comparados con las plantas control, las que contrastan con el incremento transiente de los transcritos de la CHS en fases tardías de la micorrización (55).

A diferencia de la aparente supresión de las respuestas de defensa en las células radicales, a través del contacto y la penetración, se ha encontrado que la expresión de genes asociados con la resistencia solo se presenta en las células que contienen arbusculos, como lo demuestra la acumulación de mRNAs de PAL y CHS en raíces de alfalfa colonizadas por *Glomus versiforme* (56). Otros autores (57) hallaron de forma similar en la misma especie de planta, colonizada por *G. intraradices*, la inducción de expresión transiente de ambas enzimas. Estos resultados sugieren la posible participación de los flavonoides en las cascadas de señales, inducidas por las MA.

Flavonoides (fitoalexinas)

A bajas concentraciones los compuestos fenólicos constituyen señales moleculares, las que a altas concentraciones pueden actuar como compuestos alelopáticos o antimicrobianos (fitoalexinas), lo que sugiere que en muchos simbiontes asociados con las plantas autotróficas son utilizados como defensa del huésped (58). De los compuestos fenólicos, los flavonoides constituyen los más importantes, pues son considerados como casi una molécula señal universal, en las simbiosis mutualistas, aunque su papel en la simbiosis MA no está claro aún (59).

Los flavonoides son productos de vías ramificadas originadas a partir de la vía central de los fenilpropanoides y de la vía del acetato-malonato, donde la chalcona sintasa (CHS) es la primera enzima específica de la biosíntesis de los flavonoides. Esta cataliza la condensación de tres moléculas de malonil CoA con una de 4 Cumaroil CoA, para producir 2',4,4',6'-tetrahidroxi chalcona, mediante la participación, adicional de la chalcona reductasa (CHR). La CHR contiene un motivo zipper de leucina, el cual puede estar involucrado en la interacción física con la CHS. Se ha demostrado que en células elicidadas se produce la activación de la transcripción coordinada de la CHS y la CHR. Otra enzima participante es la chalcona isomerasa

(CHI), la que convierte el 2',4',4'-trihidroxi chalcona producido por la interacción de la CHS y la CHR, en 4,7-dihidroxi flavonona, precursor de la síntesis de isoflavonoides antimicrobianos, como las fitoalexinas. Es posible que exista una asociación física entre estas enzimas, donde el 2',4,4',6'-tetrahidroxi chalcona constituye un canal entre la CHS y CHR, existiendo además, interacción proteína-proteína entre ellas y la CHI (59). En el suelo los compuestos fenólicos son derivados de varios procesos biológicos y ambientales, tales como la degradación e inmovilización.

En raíces de frijol colonizadas por *G. intraradices* se ha encontrado en estadios tardíos, que el nivel de mRNA de CHI fue suprimido en comparación con los controles no micorrizados a bajos y altos niveles de P, mientras que los niveles de mRNA de CHS fueron comparables. Sin embargo, en raíces de soya colonizadas por aislados altamente infectivos de *G. intraradices*, mostraron una inducción transiente en la acumulación de mRNA de CHS, seguida por su supresión; mientras que con aislados menos infectivos no se observaron diferencias. Ello sugiere la existencia de mecanismos específicos que controlan la supresión de ciertos genes relacionados con defensa en las MA (29).

Por otra parte, en raíces de alfalfa colonizadas por *G. intraradices* se informa la inducción transiente de enzimas como la fenilalanina amonio liasa (PAL) y la CHI, así como la acumulación de mRNA de ambas enzimas (57, 60), los que también han sido observados en raíces de alfalfa colonizadas por *G. versiforme*, en estadios tempranos de la simbiosis. De forma interesante, se ha observado que la acumulación de mRNA de CHS se ve limitada en las células que contienen arbusculos (56, 61).

De forma general, se han encontrado resultados variables del efecto de los flavonoides e isoflavonoides sobre los procesos de pre-colonización y colonización de los HMA, estudiando procesos como la germinación, el crecimiento y la ramificación hifal, colonización intraradical y formación de vesículas (62, 63, 64). Algunos autores (65) proponen que en el desarrollo *in vitro* con plantas transformadas, los flavonoides no son necesariamente las señales moleculares que estimulan el crecimiento hifal, siendo otros los metabolitos que la producen.

Muchos de los fenoles que se han estudiado en la simbiosis MA, dependen de la actividad peroxidasa, enzima que cataliza la oxidación de importantes compuestos fenólicos de la pared celular. Otros (66) encontraron elevados niveles de esta enzima en plantas micorrizadas. Estos resultados sugieren que los hongos micorrizógenos inician una reacción de defensa, la cual disminuye con el avance del establecimiento de la simbiosis.

Además de los efectos observados sobre las fases tempranas de precolonización, tales como germinación y crecimiento hifal, los flavonoides se han encontrado involucrados en otros procesos como la diferenciación hifal, durante la precolonización y/o colonización radical. Tsai y Phillips (67) encontraron que luego

de la aplicación quercetina y 4',7-dihidroxi-flavona se indujo la producción de ramificaciones hifales en *G. etunicatum* creciendo cultivo *in vitro*.

Se ha sugerido que la 4',7-dihidroxi-flavona juega un papel importante durante el desarrollo de la fase intraradical del hongo. Este resultado sugiere la participación de este flavonoide en la formación de estructuras altamente ramificadas, como los arbusculos. Otros flavonoides han sido presentados participando en procesos de diferenciación hifal, que dan origen a estructuras como vesículas y células auxiliares en diferentes especies de HMA, los que son recogidos en la revisión realizada por Vierhelig (68).

En esta revisión se presentan, además, los resultados de diferentes autores que tratan de dilucidar la presencia de receptores para estos compuestos en los HMA. Ellos han encontrado que los flavonoides tiene la capacidad de unirse a receptores de estrógenos, exhibiendo cierta función esteroidea en mamíferos, pero menos activa que los estrógenos, por lo que emplean antiestrógenos para buscar la existencia de receptores en estos hongos. Estos compuestos bloquean la transformación del receptor a su forma activa y por ende la activación de genes. Para ello utilizaron EM-652 y EM-170 específicos a biochanina A y quercetina, respectivamente, empleando estos compuestos sobre *G. intraradice* y *G. Margarita*, y compararon su efecto con biochanina A y quercetina; se encontró que existen sitios de unión diferentes a estos flavonoides en los dos hongos estudiados, los cuales no se encuentran presentes en ambos, existiendo cierta especificidad compuesto fenólico-hongo MA (60).

El hecho de que en las células que contienen arbusculos no se produzca lignificación, sugiere que los compuestos fenólicos que son sintetizados en la raíz micorrizada, jueguen otro papel. En ellas se ha presentado la expresión de la enzima isoflavona reductasa en alfalfa, enzima requerida para la síntesis de fitoalexinas (60) y la síntesis de isoflavonoides en monocotiledóneas y dicotiledóneas (40). Los compuestos que constituyen fitoalexinas se encuentran implicados en la restricción del crecimiento fúngico en la respuesta hipersensible (56). Por otra parte, los compuestos fenólicos pueden inactivar enzimas fúngicas y si ellos son polimerizados pueden actuar como barreras fúngicas para la penetración.

Se ha encontrado que, de forma general, los compuestos fenólicos regulan positiva y negativamente la expresión de genes involucrados en las asociaciones planta-microorganismos, mientras que la PAL puede estar modulando la producción de ácido salicílico, el cual actúa como regulador de la expresión de ciertos genes de defensa (40).

Acumulación de proteínas relacionadas con patogenicidad

Durante el proceso de establecimiento de la simbiosis micorrízica arbuscular, las plantas experimentan cambios en la expresión de genes relacionados con respuestas de defensa, como las proteínas relacionadas con patogenicidad (PR), entre las que encontramos las β -1,3-glucanasas y quitinasa (55).

Las β -1,3-glucanasas son enzimas que hidrolizan los enlaces β -o-glicosídicos de las cadenas poliméricas de β -1,3-glucano, la que se produce por la acción sinérgica de exo y endo-glucanasas (69). En muchos casos, se ha encontrado que participa todo un sistema de β -1,3-glucanasas y no una sola enzima (70), conformado por numerosas isoformas (71).

Estas enzimas exhiben una actividad constitutiva en muchos tejidos de plantas (26, 72), aunque también puede ser inducida durante infecciones patógenas, siendo un elemento importante del sistema de defensa contra patógenos fúngicos, al producir el debilitamiento de sus paredes. Son además, consideradas agentes de virulencia, ya que se han visto involucradas en la degradación de polisacáridos de los tejidos vasculares del huésped durante el ataque del patógeno

Por otra parte, se sugiere que estas enzimas pueden también participar en la diferenciación celular (71). Lambais y Mehdy (73) informan la expresión de genes específicos de β -1,3-glucanasas en tejido vascular, inducidos por el establecimiento de hongos MA.

Otras enzimas líticas importantes inducidas por el ataque de patógenos lo son las quitinasas, las cuales producen la hidrólisis de la quitina liberando oligos de diferentes tamaños, las que también son inducidas por elicitores bióticos (74).

Se ha encontrado, además, que muchos tejidos de plantas exhiben una actividad constitutiva de esta enzima (26, 72), lo cual podría explicarse por los resultados de Bisseling (75), quien informa que estas enzimas podrían participar en los procesos de desarrollo y diferenciación de las raíces en una etapa muy temprana de desarrollo.

Gracias a su capacidad de hidrolizar quitina, las quitinasas pueden degradar parcialmente la pared fúngica y por ende inhibir el crecimiento de hongos patógenos (74). Por esta razón, pueden jugar un papel importante en la regulación del establecimiento de la simbiosis MA, al inhibir la colonización radical (29). Sin embargo, la expresión constitutiva de isoformas básicas en tabaco transgénico no inhibieron la colonización micorrízica (74).

De forma general, se ha observado que el patrón de expresión de las quitinasas en varios cultivos durante el desarrollo de las MA es muy similar al observado para las peroxidasas, con una inducción transiente, seguida por la supresión de la actividad (29, 76).

Varios autores informan la inducción de la actividad quitinasas relacionada con etapas tempranas del establecimiento de la colonización micorrízica (26, 57, 66). En *Medicago truncatula* se observó que la acumulación de mRNA de genes de quitinasa ácida clase III se produjo en estadios tardíos de la micorrización, la cual no se encontró en las raíces no micorrizadas, o en aquellas colonizadas por *Rhizobium*, como tampoco en las raíces de las mutantes myc, ni en las inoculadas con hongos patógenos (2).

En relación con el estudio de los patrones de expresión de esta enzima, se han obtenido resultados muy variados. Algunos autores (74) encontraron que la expresión de quitinasas básicas en plantas de tabaco colonizadas con *G. intraradices* se reducía como respuesta al establecimiento de la simbiosis. Sin embargo, otros autores informan que existe una fuerte correlación entre la expresión de isoformas de quitinasas ácidas y el establecimiento de la micorrización arbuscular en plantas de perejil (77).

Lambais y Medhy (78), estudiando la localización de mRNA de un homólogo de quitinasa, CHT476 y quitinasas (PR4), encontraron que estos se expresaban preferencialmente en el cilindro vascular tanto en plantas micorrizadas como en no micorrizadas. De igual forma, se corroboró que en las plantas micorrizadas la PR4 fue inducida en las células que contenían arbuscúlos y/o en la vecindad inmediata lo cual ha sido observado también en raíces de frijol colonizadas por *G. intraradices* (29). Otros (79) plantean que es posible que la expresión parcial de isoformas de quitinasa en diferentes partes de la raíz puede facilitar el control del crecimiento fúngico, evitando la activación de genes de defensa.

A pesar de que el papel indirecto de las isoformas de quitinasas relacionadas con la micorrización en la señalización de las plantas no ha sido dilucidado aún, los datos argumentan a favor de que tengan una acción directa sobre la formación y degradación de los arbuscúlos (76).

Bonfante-Fasolo (80), estudiando el papel de la pared celular en diferentes asociaciones micorrízicas, encuentra que la organización macromolecular de la quitina en la pared de las diferentes estructuras fúngicas se va modificando. La transformación ocurre, dentro de la organización fibrilar, de helicoidal en la espora a paralela en las hifas, que finalmente pasa a una organización amorfa en los arbuscúlos, con apenas 50 nm de grosor. Mediante el empleo de técnicas de localización ultraestructural basada en la afinidad molecular del oro y la quitina, se observó que la accesibilidad de la quitina decrece cuando esta se encuentra en organización helicoidal, a diferencia de la paralela y amorfa.

Este resultado sugiere el papel de esta enzima en el desarrollo de la simbiosis, ya que al irse simplificando la estructura de la pared, a medida que el HMA avanza de una estructura inter-radical a intra-radical, se facilita el intercambio entre los simbiosites. En los arbuscúlos, la quitina se mantiene en estado cristalino, muy sensible a la acción de las quitinasas (76).

Noval (26) encontró la expresión constitutiva e inducida, por *G. clarum*, de β -1,3-glucanasas y quitinasas en raíz y en hojas de tomate (*Lycopersicon esculentum*), la que se observó desde estadios tempranos de la colonización (seis y ocho días), dependiendo de la edad de la planta, donde los niveles de actividad fueron mucho mayores en raíz que en hojas. Este autor, mediante la separación por enfoque isoeléctrico (IEF), encontró la expresión de al menos 13 isoformas en el

rango de pH 3.8-9.5, de las cuales 12 lo hicieron de forma constitutiva y una inducida por sistemina.

En contraste con estos resultados, algunos autores (81) informaron la inducción de solo dos isoformas de β -1,3-glucanasas, una ácida y otra neutra, las cuales fueron inducidas por *Glomus mosseae* y *G. intraradices* en raíces de tomate (*L. esculentum*) a las cuatro y seis semanas de ser inoculadas, así como una isoforma adicional ácida y otra neutra, las cuales se expresaron en forma constitutiva. Estos autores mediante análisis tipo "Southern blot" llegaron a la conclusión de que la familia de las β -1,3-glucanasas en tomate es relativamente pequeña y consta solamente de unos pocos genes, los cuales codifican para las formas ácidas o básicas.

Esta aparente discrepancia podría ser explicada tomando como base otras investigaciones (82), quienes, al estudiar la actividad de β -1,3-glucanasas inducidas por diferentes hongos MA en poro y cebolla, encontraron que esta actividad dependía de la especie del hongo participante. Similares resultados fueron obtenidos por otros (81), quienes plantearon que existe una respuesta específica en ciertas interacciones hongo MA/planta, donde el hongo es el responsable de la especificidad.

Harrison y Dixon (56), estudiando la actividad de β -1,3-glucanasas y quitinasas en raíces de alfalfa colonizadas por *Glomus versiforme*, encontraron que, curiosamente, estas enzimas solo fueron localizadas en células que contenían arbusculos (40).

La función de esta enzima en el control de la simbiosis MA, sigue siendo desconocida, sugiriéndose un posible papel en la degradación de la pared fúngica y, de forma alternativa, de la pared de la planta, para facilitar la penetración del hongo (78).

En la pared de los miembros de la familia de las Glomaceae y Acaulosporaceae se ha detectado el sustrato de estas hidrolasas, los β -1,3-glucanos (36, 83), lo cual sugiere la posibilidad de que las β -1,3-glucanasas puedan estar involucradas en la degradación parcial de la pared celular de los HMA. De igual forma, podrían participar en la degradación parcial de la pared vegetal, facilitando la penetración (29).

Otro polímero susceptible a ser hidrolizado por esta enzima es la calosa, la cual es un polímero de β -1,3-glucanos que se acumula en niveles elevados en las interacciones incompatibles planta-patógeno, pero que no se observa en la simbiosis MA, excepto durante la penetración de *G. mosseae* en mutantes *myc⁻* (29).

De forma general, se plantea que, al parecer, existe una co-regulación de las actividades β -1,3-glucanasa y quitinasa bajo diferentes condiciones de estrés, las que son suprimidas durante algunos estadios del desarrollo de la micorrización (84). Lambais y Mehdy (85), estudiando la actividad β -1,3-glucanasa en soya, no

encontraron diferencias entre plantas colonizadas por *G. intraradices* y no colonizadas, en períodos de cuatro-seis semanas, mientras que la actividad de quitinasas mostró un incremento en 1.9 veces en relación con las no colonizadas, la que aumentó en el tiempo (cuatro-ocho semanas), con niveles de 400-500 nmol GlcNac mg⁻¹ proteína, de actividad total, la cual incluye endo y exoquitinasas.

Se ha encontrado que en plantas transformadas de tabaco, las cuales expresaban quitinasa y glucanasa, su efecto estaba regulado por la colonización del simbiote micorrízico, así como la expresión de proteínas antifúngicas, denominadas defensinas (48, 59).

Diversos autores han estudiado la influencia de las especies de HMA sobre la expresión de diferentes actividades enzimáticas, como β -1,3-glucanasas y quitinasas (81, 85), quienes coinciden en la posibilidad de que exista una regulación de estas enzimas por el hongo en la simbiosis MA; sin embargo, poco se ha explorado la influencia que pudiera tener el genotipo de la planta sobre dicha regulación.

Inducción génica en células que contiene arbusculos

Como se ha referido en los acápites anteriores, durante el desarrollo de la simbiosis MA se produce la inducción de respuestas de defensa diversa en la planta huésped, cuya expresión, en muchos casos, se localiza en las células que contienen arbusculos, como lo demostró la acumulación de mRNAs de PAL y CHS en raíces de alfalfa colonizadas por *Glomus versiforme* (61) y la expresión transiente de ambas enzimas inducidas por *G. intraradices* (29, 40, 57).

Se postula que el incremento en la transcripción de genes relacionados con defensa en las células que contienen arbusculos, puede ser debido a la alteración del flujo de azúcares. En ellas se ha observado la acumulación de transcritos de genes relacionados con el catabolismo de la sacarosa, la invertasa vacuolar y la sacarosa sintasa, localizada en citosol, cuya expresión se induce de forma coordinada, regulada *upstream*, con la transcripción de genes de defensa, solamente en estas células (40).

Se han propuesto al menos tres mecanismos para tratar de explicar la interacción que existe entre la expresión de genes de defensa regulados por azúcares y la activación de respuesta sistémica en plantas micorrizadas (86), los que se basan en la actividad hexoquinasa y el sistema de transporte de glucosa y sacarosa. Varios autores (87) sugieren que uno de los genes involucrados en la vía sensible a hexoquinasa es también regulada, pero de forma inversa por el etileno, lo cual implica la posibilidad de que la respuesta a etileno en las MA puede ser un factor significativo.

A pesar de que en plantas micorrizadas se ha informado bajo nivel de etileno, este podría sensibilizar el sistema para responder con la activación de genes por el nivel de azúcar. Es posible que en las células con arbusculos, el flujo de sacarosa, glucosa y fructosa en las vías secretoras sea elevado, debido a la alta demanda

energética que existe en ellas (40), si se tiene en cuenta que durante el desarrollo de los arbusculos ocurren una serie de alteraciones citológicas. En ellos se produce el incremento de la actividad ATPasa H^+ (88), el incremento en el número de organelos, como mitocondrias y retículo endoplasmático, el aumento del diámetro del núcleo, el que toma una posición central (3), el aumento de la respiración y de actividades enzimáticas como la fosfatasa alcalina vacuolar (26) y la fragmentación vacuolar (3). Además, se producen cambios en la expresión génica, la activación de respuestas de defensa y modificaciones del ciclo celular (48).

Los azúcares tales como sacarosa, glucosa y fructosa tienen una función esencial en el metabolismo, participando en la respiración y en la síntesis de carbohidratos; sin embargo, también se han visto relacionados con la señalización en las plantas, donde pueden tener función de hormonas, alterando la expresión génica, dado por la interacción entre la molécula de azúcar y las proteínas sensoras de azúcares (89). Otros autores (87), mediante el empleo de mutantes de *Arabidopsis*, encontraron una interacción estrecha entre las vías de señalización de la glucosa y el etileno con una regulación *downstream*.

Es posible que el transporte de azúcares hacia las células con arbusculos sea suplido por la activación del metabolismo vegetal. Harrison (90) informa el incremento de la transcripción de genes relacionados con el transporte de hexosas en células que contenían arbusculos.

Diversos autores han estudiado las modificaciones en membrana debido a la MA, los que informan la expresión de genes relacionados con isoenzimas de ATPasa H^+ en la membrana vegetal (88), dos transportadores de fosfato (91) y un transportador de azúcar (90), lo cual evidenció que en la MA se induce la regulación de genes involucrados en los procesos de transporte en membrana.

Algunos autores (92) encontraron que en la membrana plasmática de raíces micorrizadas de tomate se produce la inducción de dos modificaciones en la síntesis de proteínas: la regulación *down* de algunos polipéptidos constitutivos y la síntesis de nuevos polipéptidos con regulación *up*, los cuales pudieran ser endomicorrizinas (polipéptidos específicos a micorrizas) o polipéptidos de origen fúngico. Haciendo un análisis de uno de los nuevos polipéptidos (spot2), se encontró que su secuencia amino terminal mostraba un 75 % de identidad con la secuencia de este extremo de la subunidad de una ATPasa H^+ vacuolar de 65 kDa de varias plantas. Este resultado fue corroborado mediante "Western blot", usando anticuerpos preparados contra esta subunidad aislada de remolacha (93).

La ATPasa H^+ participa directamente en el transporte de iones a ambos lados de la membrana plasmática, manteniendo su polaridad, siendo uno de los compuestos metabólicos que influyen directamente en la despolarización de la membrana, que ocurre en la colonización por HMA y por patógenos. En la simbiosis MA se observa que en la interface arbuscular se producen

modificaciones en la localización y activación de esta enzima, que se localizan en la membrana del hongo y en la de la planta (30, 54).

Fieschi (30) informa diferencias en el potencial de membrana de células corticales de *Allium porrum* colonizadas con *Glomus sp.*, que produce la hiperpolarización de forma permanente, aun en estadios tardíos de la colonización. Ellos sugieren que es posible que participe una señal generada por el hongo, la que pueda actuar a larga distancia.

Sin embargo, los cambios que ocurren durante la transcripción de genes de defensa en las células con arbusculos no son tan drásticos como en la respuesta hipersensible donde se activa la PCD (94). Se informa, además, que estas células son insensibles a ser atacadas por patógenos, lo cual podría estar dado por las modificaciones que sufren como el reforzamiento de la pared celular (40).

Supresión de las respuestas de defensa

Estudiando las respuestas de defensa generadas durante el establecimiento de la simbiosis MA, se ha observado que éstas son generalmente en menor nivel que la inducida por las interacciones planta-patógeno, las que son frecuentemente suprimidas en los estadios posteriores de la interacción, razón por la cual se sugiere la participación de elicitores en los primeros estadios de la formación de las micorrizas. Tratando de explicar este fenómeno, Salzer y Boller (2) postulan que esto se debe a la acción de compuestos supresores producidos por el hongo micorrízico, que previenen el reconocimiento del evocador. Para ello, plantean una hipótesis que propone que los oligómeros de quitina son inactivados por la acción de quitinasas extracelulares, liberadas por la planta, tal como ocurre en la interacción *Rhizobium*-leguminosa durante la inactivación de los factores Nod, los cuales están constituidos por oligoquitinas (Figura 1).

En relación con esta hipótesis, Salzer y Boller (2) proponen un modelo especulativo de los mecanismos de supresión inducidos por las MA. De acuerdo con este modelo, durante los primeros estadios de la formación de las micorrizas (panel A), se produce la expresión constitutiva de quitinasas en la planta, las cuales degradan parcialmente a los elicitores fúngicos derivados de la quitina. Estas tienen baja actividad biológica y, por lo tanto, solo producen una respuesta de defensa atenuada. En estadios tardíos, (panel B), se produce la acumulación de quitinasas específicas inducidas exclusivamente por la micorrización. Estas inactivan completamente a los oligoquitosacáridos al hidrolizarlos hasta monómeros de N-Acetil glucosamina, lo que elimina las respuestas defensivas rápidas que dan lugar a la síntesis de proteínas PR. Además, se sugiere que si las auxinas son sintetizadas por el hongo, también regulan negativamente la expresión génica de proteínas PR a nivel basal.

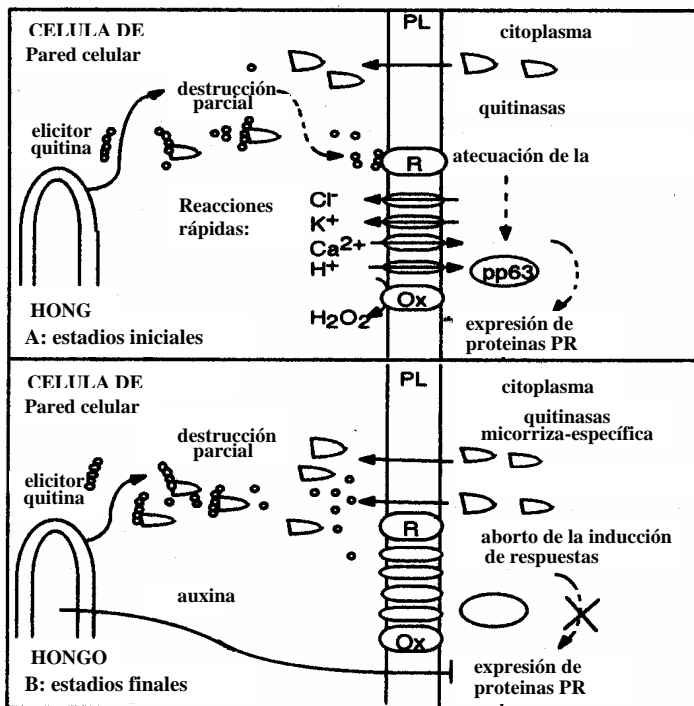


Figura 1. Modelo especulativo de los mecanismos de supresión inducidos por las MA

Se ha observado que durante la colonización de HMA en raíces de tabaco, se produce la inducción de unas isoformas de quitinasa, mientras que otras son suprimidas (57, 84), lo cual indica que el mecanismo(s) o vía(s) por el cual los genes son suprimidos es muy específico (95).

La acción postulada de auxinas fúngicas coincide con la segunda hipótesis, la cual asume la participación de fitohormonas en la supresión de las respuestas de defensa. Esta se postuló en base a la capacidad probada de muchas ectomicorrizas (EM) y MA de sintetizar hormonas de plantas (96).

En las raíces micorrizadas se presenta que los niveles de auxina, citoquininas, ácido abscísico y etileno son alterados, donde el balance de fitohormonas puede modular la expresión de los genes relacionados con defensa. Se ha observado que la activación de quitinasa y β -1,3-glucanasa y la acumulación de mRNA respectivos son suprimidos en tejidos de tabaco, tratados con diferentes combinaciones de auxinas y citoquininas, siendo independiente de la concentración de etileno (97, 98). Por otra parte, en caupí (*cowpeas*) se observó que el número de arbusculos frecuentemente

disminuye cuando se remueve el ápice de la planta hospedera, pero se incrementa cuando se aplica AIA (99).

Además de este efecto, las citoquininas pueden también regular la expresión pos-transcripcional de las quitinasas, alterando la estabilidad de los mRNA (100). Mediante el empleo de ELISA indirecto (anticuerpo con reacción cruzada con zeatina y dihidro-zeatina), se encontró que los niveles de esta hormona en las plantas micorrizadas no difirieron con el control no micorrizado, nterac en los estadios tardíos (110 días después de la inoculación), en los cuales se observó un incremento (101).

Tomando en cuenta que la inducción de genes de defensa en la simbiosis MA ocurre localmente y que solamente ha sido observada *in situ*, Lambais (29) propone otras dos hipótesis que tratan de explicar la atenuación de estas respuestas. La primera sugiere la degradación de la molécula elicitora por el hongo micorrizógeno, mientras que la segunda postula que la transducción de señales es bloqueada luego del reconocimiento de la molécula evocadora. Se conoce que en las reacciones incompatibles planta-patógenos, se produce la formación de especies activas de oxígeno (AOS) como el H_2O_2 , el que ha sido implicado como segundo mensajero en las vías de transducción de señales, conducentes a la activación de genes de defensa y a las reacciones hipersensibles (HR). Sin embargo, en las MA no se ha observado este tipo de reacción, lo cual sugiere que la degradación del H_2O_2 puede constituir un mecanismo eficiente en la atenuación de las respuestas de defensa de la planta, lo que está de acuerdo con informes que detectan la inducción de la actividad de catalasa en los primeros estadios del establecimiento de la simbiosis (29). Hammond-Kosack y Jones (16) y Knoogge (17), estudiando dos genes vinculados con el catabolismo del peróxido de hidrógeno, encontraron la acumulación de mensajeros de catalasa pero no de peroxidasa en células de frijol que contenían arbusculos (40).

Hormonas relacionadas con defensa en las MA

Teniendo en cuenta los resultados citados con anterioridad, la participación de hormonas como componentes reguladores constituye un elemento de gran importancia durante el establecimiento de la simbiosis MA. De forma similar a como ocurre en las interacciones planta-patógenos, las hormonas de plantas pueden participar como señales, ya sean primarias o como mensajeros secundarios, en la interacción con los HMA, teniendo al parecer, un papel relevante el etileno, el ácido jasmónico y el ácido salicílico, a los que recientemente podría unírseles la hormona polipeptídica denominada sistemina.

Etileno. El etileno es una fitohormona gaseosa que juega un importante papel en los procesos de desarrollo y crecimiento vegetal, los que incluyen la elongación celular, germinación, senescencia, floración y maduración de los frutos (7).

Esta hormona es sintetizada a través de la vía del ciclo de Yang, a partir del S-adenosil metionina (Ado Met) por la acción secuencial de dos enzimas: la aminociclopropano-1-ácido carboxílico sintasa (ACS ó ACC sintasa) y la

aminociclopropano-1-ácido carboxílico oxidasa (ACO ó ACC oxidasa) (102). La ACC sintasa posee una tasa limitada para la síntesis del etileno; sin embargo, su actividad y/o síntesis es rápidamente estimulada en condiciones de estrés ambiental, la que incluye infecciones microbianas (7).

Se ha postulado que la producción de etileno es de las primeras respuestas que se activan en plantas ante el ataque por patógenos, donde la aplicación exógena de etileno induce algunos genes de PR, entre las que se encuentran las β -1,3-glucanasas y las quitinasas y genes que codifican para enzimas de la vía de los fenilpropanoides, como la PAL y CHS.

Los estudios tratando de dilucidar el papel del etileno en la expresión de PR han resultado contradictorios. Diversos autores (103) encontraron que aun al aplicar un inhibidor de la síntesis del etileno (aminoetoxivinil glicina) en vainas de guisantes, se inducían glucanasas y quitinasas, por lo que se creyó que esta fitohormona era más bien un síntoma y no una señal en las respuestas de defensa. Sin embargo, otros (104), inhibiendo su acción mediante el uso de norbodioeno, bloquearon la acumulación de osmotina, proteína básica PR-5, en plántulas de tabaco, frente a elicitores fúngicos, mientras que otros resultados sugieren que esta hormona no es requerida para la inducción de SAR (7).

Estudios de genes PR demuestran que múltiples vías de señales hormonales cooperan para dar una respuesta de SAR completa. En *Arabidopsis* dos cascadas paralelas siguen el evento de HR primaria, con la activación de PR. Una que requiere la participación del ácido salicílico (SA), pero componentes de la vía de señales del etileno; mientras que la otra conduce a la misma respuesta, pero requiere la participación de las vías de señales de etileno. Se ha observado que el etileno en estas vías se encuentra modulado por jasmónico, aunque no se ha podido establecer la interacción entre estas dos cascadas (105).

Diversos autores han trabajado dilucidando la vía de transducción de señales inducida por etileno, donde se ha caracterizado el receptor ETR1 (*ethylene resistant*), posterior al cual se produce una cascada en la que participa los genes CTR1 (*constitutive triple response*) y EIN2 (*ethylene insensitive*). Se plantea que es posible que la activación de EIN2 por CTR1 ocurra a través de una cascada de MAP cinasa, la cual podría activar, vía EIN3, la transcripción de los genes que responden a etileno, mediante la participación de proteínas que se unen a ERE (*ethylene responsive elements*). Las proteínas ERE han sido identificadas en tabaco y *Arabidopsis* y se unen a regiones del promotor de los genes PR inducibles por etileno que codifican para quitinasa y β -1,3-glucanasa.

Como se observa, ETR1 constituye el elemento crucial en la cascada de señales que conduce a la activación de genes PR, luego de la percepción del etileno. Este receptor es miembro de una familia de genes constituida por 5 miembros ETR1, ERS1, ETR2, EIN4 Y ERS2, a la cual se le han sumado dos miembros nuevos LeETR4 y LeETR5 (106).

El etileno es una hormona poco estudiada en la simbiosis micorrízica arbuscular; sin embargo, se conoce que participa en la inducción de β -1,3-glucanasas y quitinasas en plantas en la interacción planta-patógeno. En plantas micorrizadas se ha encontrado la inducción de la producción de etileno en maíz, por la afectación del metabolismo fenólico, existiendo una regulación *down* por el crecimiento fúngico. Varios autores (107), estudiando la producción de etileno y su influencia sobre la actividad quitinasa y β -1,3-glucanasas en tomate colonizado por *G. mosseae*, encontraron que, a pesar de no existir diferencias en el contenido de la hormona en las plantas inoculadas en relación con el control, la micorrización disminuye la actividad quitinasa, lo cual sugiere la participación de otro mecanismo en la regulación de esta enzima. De forma general, niveles bajos de etileno (0.01-0.1 ppm) son capaces de estimular la germinación de las esporas y el crecimiento hifal de HMA, mientras que niveles elevados (1 ppm) inhiben drásticamente el crecimiento hifal (106).

Contradictoriamente, Besner y Koide, (108), estudiando la producción de etileno en plantas micorrizadas, encuentran que la colonización por *G. intraradice* produjo una significativa disminución en el contenido de esta hormona, la que al parecer, ocurrió de forma sistémica, pues estos autores realizan la determinación en flores, estudiando su relación con el proceso de senescencia de este órgano. Sin embargo, McArthur y Knowles estudiando este fenómeno en papa, encuentran que estuvo confinado a las raíces colonizada, quienes además demostraron que sustancias solubles en agua derivadas de la raíz micorrizada disminuían la actividad de ACC oxidasa, a diferencia de las raíces no colonizadas, donde no se produce esta reducción (108).

Los resultados obtenidos por Besner y Koide, (108) llevaron a estos autores a plantearse que al parecer el efecto de las MA sobre la fisiología del etileno es principalmente sobre su producción y no sobre la sensibilidad a esta hormona.

Ácido jasmónico. Otra hormona que participa en la inducción de respuestas de defensa en las interacciones planta-microorganismo, lo constituye el ácido jasmónico, el cual se encuentra, además, estrechamente relacionado con la inducción de etileno.

El ácido jasmónico (JA) y su éster metilado (metil jasmonato, MeJA) son producidos a partir del ácido linolénico, mediante la ruta del ácido octodecanoico, los que se han encontrado relacionados con una variedad de procesos fisiológicos, que incluyen la germinación de las semillas, el crecimiento radical, la formación de tubérculos, la senescencia de las hojas y la apertura estomática (8). Recientemente se ha encontrado involucrado, tanto el JA como el MeJA, en respuestas de defensa de las plantas, inducidas por ataque de patógenos o ante un daño mecánico, los que además, pueden ser inducidos en tejidos no dañados o en plantas vecinas, debido al carácter volátil de ambos, siendo el MeJA más volátil

que el JA. Sin embargo, este último puede ser también transportado por el floema (109).

Las respuestas de defensa más estudiadas, inducidas por esta hormona, están en la acumulación de inhibidores de proteasas tipo I y II (110, 111). Varios autores (112) informan la expresión de genes del inhibidor de proteasa tipo II (*pin2*), en plantas de papa y tomate, las cuales fueron inducidas por ácido abscísico (ABA), sistemina y JA. Estos autores observan que la acumulación de JA se encuentra localizada *downstream* a la acción de ABA, mientras que la sistemina se localiza como uno de los pasos iniciales, en la transducción de señales que regula la respuesta ante el daño, con la acumulación de inhibidores de proteasa.

Teniendo en cuenta estos resultados, Ryan (113) plantea que el JA actúa como mensajero secundario en la respuesta sistémica, luego de ocurrir el daño local. Sin embargo, se ha encontrado que el MeJA es capaz de inducir la expresión de genes de sistemina (114) de forma constitutiva. Este es un factor importante que puede explicar la inducción de respuesta de defensa, mediada por la síntesis de sistemina como evento primario en las hojas distales o en plantas vecinas, considerando la volatilidad del MeJA. Otro factor a tenerse en cuenta en la inducción de defensa de forma sistémica es la movilidad de la sistemina, la cual es transportada por el floema (115), por lo que produce un efecto cooperativo, debido a que esta hormona es capaz de activar la ruta del ácido octodecanoico y de esta forma la producción del jasmónico (116). Por tanto, en la inducción de esta respuesta participan ambas hormonas, actuando como una reacción en cadena que amplifica el fenómeno, llevándolo a tejidos distales y plantas vecinas.

Otro efecto relacionado con el JA es la acumulación de las proteínas antimicrobianas tioninas en hojas de cebada y de *Arabidopsis*. Estos son péptidos de bajo peso molecular, ricos en cisteína, que han sido originalmente descubiertos en cebada y que poseen efecto antimicrobiano al alterar la permeabilidad de las membranas. Esta proteína es almacenada en vacuola, la que se libera al producirse su ruptura en la necrosis inducida por patógenos o en la muerte celular hipersensible (7).

Por otra parte, se observa que el JA es capaz de inducir la acumulación de la proteína antifúngica osmotina en plántulas de tabaco y de proteínas inactivadoras del ribosoma en cebada, así como la inducción de diferentes enzimas involucradas en la biosíntesis de fitoalexinas, tales como la PAL y CHS. Se ha encontrado, también, la acumulación de mRNA de leucina aminopeptidasa (*LapA*) inducida por sistemina, MeJA, ácido abscísico (ABA) y etileno, en tomate. En esta solanacea la acumulación de transcritos y productos de *LapA*, así como el incremento de su actividad, se produce de forma local y sistémica como respuesta al daño, a la invasión por patógenos y ante el ataque de insectos, razón por la cual se sugiere que esta enzima puede jugar un papel importante en la respuesta de

defensa en este cultivo. De forma contraria, se presentan casos donde el JA exógeno no induce protección en determinado sistema planta-patógeno (117).

Otra respuesta de defensa donde se ha visto involucrado el JA es la acumulación de proteínas PR, pero se sugiere que en este caso, esta hormona requiere de la participación de otro compuesto que también es inducido por la presencia del patógeno, resultando en la inducción cooperativa de los genes PR luego del ataque por el patógeno. Sin embargo, se informa además, que el incremento de los niveles de citoquininas y jasmónico puede tener un efecto represivo sobre genes de PR (118, 119).

El papel del JA durante la micorrización no ha sido esclarecido aún, aunque se explica que la aplicación de esta hormona en hojas promueve la colonización por HMA y el desarrollo de los arbusculos (119, 120).

Mediante el uso de plantas mutantes se ha tratado de dilucidar la vía de transducción de señales que se induce por JA y se ha encontrado la participación del gen COI1 (*coronatine insensitive*), el cual se presume participa en la percepción de esta hormona. El gen COI1 recientemente ha sido clonado y secuenciado, el que consta de 16 repetidos de leucina (LRRs) y un motivo F-box, los que son blancos de proteínas reguladoras (121).

Los LRR son secuencias cortas que se encuentran involucradas en la interacción proteína-proteína, las cuales usualmente se encuentran en tandem, con un rango de 1 a 30 repetidos. El largo de la secuencia que se repite es frecuentemente de residuos de 24 aminoácidos, aunque pueden variar. El análisis de su estructura tridimensional revela que los LRR están conformados por láminas β simples y α hélice, las cuales se orientan en paralelo sobre un eje común (121).

Se conoce que los motivos F-box poseen función reguladora que reponen las proteínas represoras, al remodelarlas por ubiquitinas. Además, regulan otras rutas de señales hormonales en plantas y en otras eucariotas (7).

Sistemina. La sistemina es una hormona polipeptídica de 18 aminoácidos, involucrada en la expresión de genes de defensa en plantas de tomate y otras especies de Solanaceae, la cual se genera como respuesta al ataque por herbívoros y daño mecánico (122).

Este polipéptido se aisló a partir de hojas de plantas de tomate gracias a su capacidad de inducir la acumulación de inhibidores de proteinasas, los cuales se sugiere que interfieren con los procesos de digestión de insectos fitopatógenos. Sin embargo, investigaciones posteriores revelaron que la actividad inductora se extiende a la expresión, de por lo menos 19 proteínas, entre las que se inducen endo- y exo-proteasas, proteínas que participan en las vías de transducción de señales y otras proteínas de las cuales se desconoce aun su función en la defensa de las plantas (115).

Se encuentra codificada por un gen nuclear de 4.2 kb con 11 exones y 10 intrones, que generan un mRNA maduro de 920 pb (23, 123).

Todo indica que la sistemina se produce a partir de un precursor de 200 aminoácidos, llamado prosistemina, por hidrólisis proteolítica catalizada por enzimas aún no identificadas (123). Dicha hidrólisis es inducida por el daño mecánico o por el ataque de insectos, el cual libera al polipéptido de 18 aminoácidos.

La sistemina solo ha sido detectada en especies Solanaceae, cuya estructura no varía mucho entre las especies donde se ha identificado. En todas las secuencias identificadas se encuentran dos motivos Pro-Pro que son parte del palíndromo XXQXBPPXBBXPPBXQXX, donde la B es Lys o Arg la Pro en posición 13 y treonina en posición 17 son importantes para su función biológica (23, 122).

Actividad biológica. Varios estudios para determinar la interacción estructura-actividad se han realizado mediante ensayos de sustitución de cada aminoácido, uno a uno, por Ala. La mayoría de las sustituciones produjeron solo una disminución moderada de la actividad biológica. Sin embargo, la sustitución en la posición 13 de la Pro resultó en una disminución importante, mientras que en Thr 17 produjo la inactivación total.

Empleando análogos sintéticos de la sistemina, se encontró que la eliminación progresiva de los aminoácidos a partir del extremo N-terminal produjo la disminución gradual de la actividad biológica. A partir de este comportamiento se planteó que es necesario el polipéptido completo para la máxima actividad. Aún más, cuando se sustituyó la Asp 18 la actividad se anuló totalmente (124). Esto indica que el extremo C-terminal es imprescindible para la actividad biológica, mientras que la región N-terminal pueda ser importante para la interacción con el receptor (123).

Toumadje y Johnson (125), utilizando la técnica de Dicroísmo Circular en regulador acuoso, confirmaron que los cuatro residuos de Pro de la sistemina se encuentran presentes internamente como dos pares, su función se desconoce. Sin embargo, como se ha mencionado la Pro 13 juega un papel importante, ya que su sustitución por Ala decrece severamente la actividad biológica. Por otra parte, cuando el reemplazo secuencial de las Pro 6, 7 y 12 por Ala solo tiene un efecto moderado sobre la actividad biológica. Esto indica que los motivos Pro-Pro como tales pueden no ser importantes sobre la función de la sistemina.

Las plantas de tomate transformadas que expresan constitutivamente la prosistemina en niveles elevados, se comportan como si se encontraran permanentemente en un estado de daño. Schaller (115) plantea que la sobreexpresión de la prosistemina, en estas plantas, es suficiente para generar señales móviles capaces de inducir la expresión de genes de defensa en ausencia de daño mecánico. A su vez, algunos autores (123) encontraron que la transformación en tomate con el gen de la prosistemina en dirección antisentido, regulado por el promotor 35S del Virus del Mosaico de la Coliflor, produjeron

plantas severamente comprometidas en la respuesta de defensa ante el daño y los insectos.

Después de la liberación de la sistemina, mediante la hidrólisis proteolítica y su posterior traslocación por el floema, se produce una respuesta sistémica. La sistemina actúa como una señal primaria en tejidos remotos al sitio dañado (115). Una vez reconocida por las células blanco, la sistemina produce la activación de una cascada de señales que conlleva a la alteración del transporte iónico (126), al incremento en la actividad de MAP cinasas (127) y de Fosfolipasas tipo A2 (128). También se induce la calmodulina (129) y se incrementa transientemente la concentración del Ca^{2+} intracelular (130).

Modelos de acción. Farmer y Ryan (114) proponen un modelo en el cual el primer evento constituye la liberación de ácido linoleico de la membrana del cloroplasto y su conversión en ácido jasmónico (AJ) por la vía de los ácidos octadecanoicos, con la subsiguiente activación de genes de defensa (116, 131).

Schaller (115) plantea diferentes evidencias que apoyan la hipótesis que involucra a la vía del ácido octadecanoico en la cascada de respuestas mediadas por la sistemina y por el daño mecánico: (I) Se produce una inducción transiente y rápida de lipoxigenasas y de la óxido de aleno sintasa, enzimas involucradas en el metabolismo de las oxilipinas; (II) se produce una transiente acumulación de AJ en hojas de tomate; (III) se incrementan los niveles de ácido linoléico, los cuales son más que suficientes para suplir la biosíntesis de AJ; (IV) la aplicación de inhibidores de la vía del ácido octadecanoico, como el dietilditiocarbamato y el ácido salicílico, suprimen la expresión transiente de AJ y la expresión de genes de defensa y (V) la inducción de proteínas de defensa como respuesta al daño o a la sistemina es severamente reducida en mutantes de tomate (*def 1*) cuya lesión causa una deficiencia en la biosíntesis de las oxilipinas.

Scheer y Ryan (116), utilizando ^{125}I -Tyr2,Ala15-Sistemina y preparaciones de membranas microsomales de cultivo celular de tomate (*Lycopersicon peruvianum*), lograron caracterizar el receptor para este polipéptido. Las evidencias señalan que el receptor es una proteína membranal de 160 kDa, la cual no es abundante ya que su número ha sido estimado en 3000/célula. Sin embargo, se encontró que este número se incrementa luego del tratamiento del cultivo celular con Metil Jasmonato, lo que se propone ocurre por síntesis *de novo* del receptor.

Schaller (115) propone un modelo de acción de la sistemina, en el cual se incluye como ruta central la ruta del ácido octadecanoico propuesto por Farmer y Ryan (114).

En este modelo se propone que al ser percibido el péptido por el receptor SR-160, se produce un incremento en la concentración del Ca^{2+} citosólico libre, debido a la apertura de canales membranales y a la liberación de Ca^{2+} intracelular no libre. El Ca^{2+} es capaz de estimular la actividad de una proteína cinasa no

identificada (PK), resultando en la inhibición de la ATPasa-H⁺ membranal concomitante causando la despolarización de la *membrana y la alcalinización del medio (Figura 2).

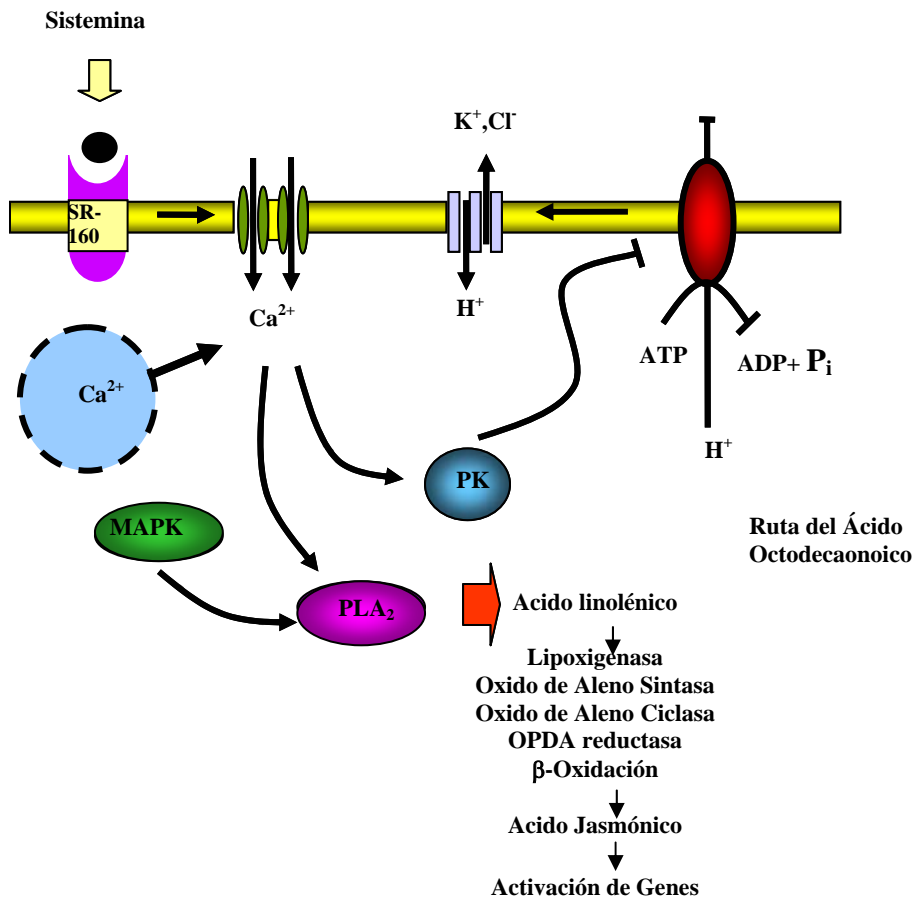


Figura 2. Modelo de acción de la sistemina (115)

Por otra parte, la fosfolipasa A2 (PLA2) citosólica es activada por el Ca^{2+} y por un evento de fosforilación catalizado por la MAP cinasa específica. Una vez activada la fosfolipasa A2, este migra hacia la membrana e inicia la hidrólisis de los fosfolípidos y la liberación de ácido linolénico del cual se producirá el ácido jasmónico y la activación de genes.

Noval (26), estudiando la influencia de la sistemina sobre la inducción de respuestas de defensa en plantas micorrizadas con MA, informa que esta hormona indujo un incremento transitorio de la actividad β -1,3-glucanasas en estadios tempranos, el que fue rápidamente atenuado, aunque observó un segundo pico de inducción posterior a la atenuación. Con la combinación sistemina-hongo MA, se encontró un efecto sinérgico sobre la actividad de esta enzima, el que fue corroborado por el Isoelectroenfoco (IEF) con una banda intensa de pI 4.0. Mediante el IEF se detectó una banda adicional neutra de pI 6.2, la cual solo fue inducida donde se aplicó la sistemina y que no fue modificada por la colonización MA. En relación con la actividad quitinasa, este autor encontró nuevamente que se produce un efecto sinérgico entre la sistemina y *G. clarum*, lo cual podría sugerir la participación de esta hormona polipeptídica en la vía de transducción de señales inducida por la interacción planta-hongo MA, al menos en Solanaceas.

COMPARACIÓN ENTRE SIMBIOSIS MICORRÍZICA Y *RHIZOBIUM-LEGUMINOSA*

La especificidad de muchas interacciones planta-microorganismo implica algunos mecanismos de reconocimiento, uno de los cuales es el intercambio de moléculas señales entre el hospedero y el hospedante. Tales moléculas pueden tener efecto tanto positivo como negativo sobre la interacción planta-microorganismo.

La interacción específica célula-célula involucra el reconocimiento específico de una célula o una señal molecular o ambas por otra célula. El reconocimiento de un microorganismo por la superficie o un componente del hospedero induce respuestas fisiológicas que son necesarias para la interacción. De forma opuesta, el reconocimiento del hospedero induce la expresión de genes necesarios para defenderse o ayudar a la interacción.

En la mayoría de las interacciones hospedante-patógeno, hay evidencias de una relación gen-gen entre ambos. De esta forma, por cada gen del hospedero que gobierna para la resistencia hay un gen correspondiente en el patógeno que codifica para la avirulencia del hospedero.

Intercambio de señales entre simbiosis

Micorrizas arbusculares. La germinación de las esporas así como el crecimiento hifal y la ramificación de esta son estimuladas por moléculas señales sintetizadas y secretadas por la raíz. Las moléculas producidas por la raíz son en su mayoría flavonoides, varios de los cuales sirven como moléculas señales en la simbiosis *Rhizobium-leguminosa* (como atrayentes e inductores de los genes *nod* (modulación), los cuales son responsables de la síntesis de los factores Nod.

Con el objetivo de demostrar que la planta genera las moléculas señales, varios autores (132) usaron una membrana para separar la planta hospedera del hongo y encontraron que aun cuando el hongo estaba físicamente aislado de su hospedero, la diferenciación hifal tenía lugar como se evidenciaba por una extensiva ramificación. Esto indicaba que: (i) la señal difusible emanaba del hospedero (los no hospederos no elicitaban la misma respuesta), y (ii) el contacto célula-célula no es requerido para la respuesta de ramificación. Esto demostró que el contacto célula-célula era requerido solo para la formación del apresorio.

Nagashi y Douds (133) demostraron que el apresorio se podía formar sobre células aisladas o sobre fragmentos de pared de células hospederas, no así de las no hospederas, lo que sugiere que la formación del apresorio es independiente de los exudados radicales o los contenidos citoplasmáticos.

Rhizobium. La simbiosis entre las plantas leguminosas y *Rhizobium*, en condiciones de disponibilidad de nitrógeno limitantes, permiten el desarrollo de un nuevo órgano, los nódulos fijadores de nitrógeno que se encuentran en el sistema radical de este tipo de plantas. Dentro del nódulo, la forma indiferenciada de

Rhizobium, los bacteroides, fijan nitrógeno molecular que es empleado por la planta hospedera (134).

De forma abreviada, la interacción simbiótica comienza cuando la bacteria coloniza la superficie radical e induce rizamiento de los pelos radicales, lo cual es seguido de invaginación de la pared celular y la formación de un cordón de infección que crece dentro del pelo radical. Este cordón de infección avanza por las capas de células externas hasta alcanzar el primordio, el cual se inicia por la reactivación de células diferenciadas de la corteza radical por división. Dentro del cordón de infección, los rhizobia pueden multiplicarse pero permanecen confinados por la pared celular de la planta. El primordio se desarrolla a nódulo y las bacterias son liberadas del cordón de infección por endocitosis y se diferencian a bacteroides, rodeándose por la membrana peribacteroide. La aproximación de *Rhizobium* a la raíz de las plantas hospederas compatibles responde a compuestos derivados de esta última (generalmente flavonoides) que estimulan la expresión de los genes *nod* en el *Rhizobium*. La inducción de estos genes permite la producción y secreción de señales de retorno, los factores de nodulación Nod. (134).

Los factores Nod son derivados de oligoquitinas, en los cuales los residuos de N-acetil en el azúcar reductor son reemplazados por cadenas de ácidos grasos (135).

Una propiedad intrínseca de la interacción *Rhizobium*-leguminosa es su especificidad. En la mayoría de los casos la especificidad está controlada a varios niveles, pero la síntesis y estructura de los factores Nod a menudo juegan el papel principal.

Mecanismos de colonización. Los flavonoides secretados por el hospedero activan la forma constitutiva Nod D, que induce la expresión de los otros genes *nod*.

La biosíntesis de la estructura básica de los factores Nod está catalizada por las proteínas bacterianas Nod A, Nod B y Nod C. Se ha comprobado que Nod C es una N-acetil glucosaminil transferasa que cataliza la síntesis de los oligómeros de quitina y controla la longitud de estos esqueletos carbonados. La unidad no reductora terminal de glucosamina es desacetilada por Nod B y subsecuentemente sustituida con una cadena acilo por Nod A. Otras proteínas Nod, las cuales pueden ser específicas para ciertas especies de *Rhizobium*, modifican un residuo de azúcar terminal o determinan la naturaleza de la cadena acilo. Estas modificaciones definen la actividad biológica y la especificidad del hospedero de los factores Nod (135). Como ejemplo, la mayor diferencia entre los factores Nod producidos por *Sinorhizobium meliloti* (previamente llamado *Rhizobium meliloti*) y *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae*, es la presencia del grupo sulfato en el extremo reductor del azúcar del factor de *S. meliloti* y la estructura de la cadena acilo (136) (Figura 3).

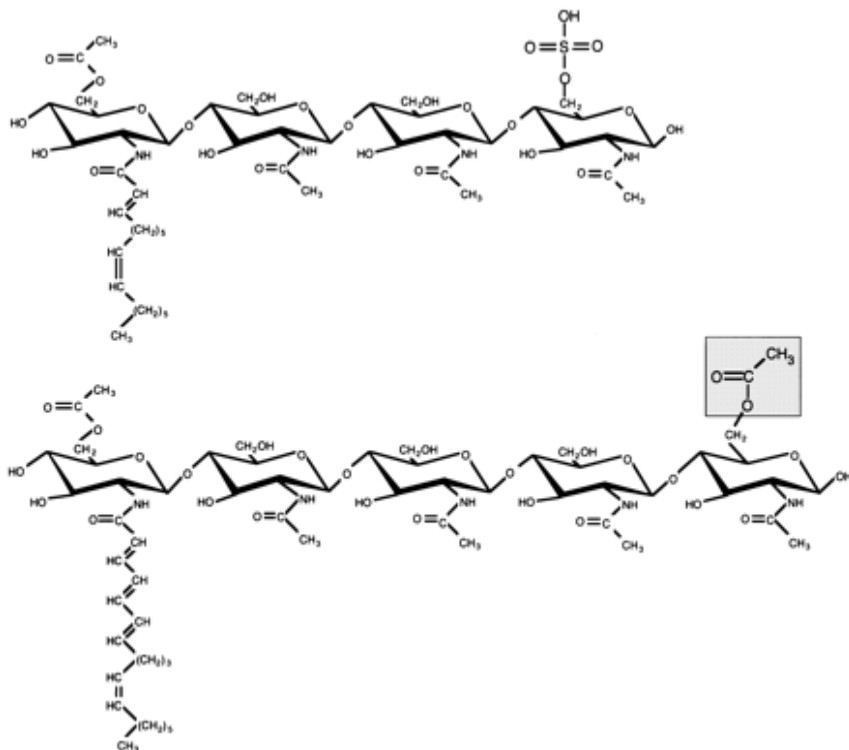


Figura 3. Comparación entre los factores Nod de *Sinorhizobium meliloti* y *Rhizobium leguminosarum* bv *viciae* (176). Nótese que la diferencia principal radica en la presencia del grupo sulfato en el extremo reductor del azúcar del factor de *S. meliloti* y la cadena acilo

Uno de los retos de investigación en el estudio de la simbiosis *Rhizobium-leguminosa* es detectar el mecanismo por el cual la señal de los factores Nod es percibida y activada una cascada de transducción de señales en la planta hospedera. Dado que las respuestas se inducen a muy bajas concentraciones (del orden de 10^{-9} a 10^{-12} M) y se requieren estructuras precisas de los factores Nod, estos deben ser percibidos por receptores específicos. El sitio de alta afinidad para los factores Nod de *Sinorhizobium meliloti*, NFSB2, se ha identificado en la fracción enriquecida de la membrana plasmática de una suspensión de células de *Medicago* (137) y en un nucleótido de lectina fosfohidrolasa aislado de la raíz de la leguminosa *Dolichos biflorus* también se ha informado un sitio de unión para los factores Nod (138). Sin embargo, no se ha establecido si alguno de estos

componentes de los sitios de unión de los factores Nod juega algún papel en los procesos de señalización (136).

Después de la percepción de los factores Nod, ocurren numerosas respuestas en los pelos radicales de la raíz (139). Segundos después de la adición de factores Nod, se observa flujo de iones: Ca^{2+} , H^+ , Cl^- , y K^+ (140, 141, 142), junto a la despolarización de la membrana (141, 143, 144, 145). Minutos después de la adición de estos factores se aprecian cambios en la concentración del Ca^{2+} citoplasmático que pueden ser transientes o tipo plato (142, 146, 147), lo que sugiere una evidencia para el Ca^{2+} como segundo mensajero para los factores Nod (140). Los factores Nod inducen cambios en el citoesqueleto actínico así como en los pelos radicales y puede que asociado con ciertos cambios en los niveles de este ión estén la inhibición y subsecuente reiniciación del crecimiento de los pelos radicales (134, 148, 149).

La expresión génica es inducida por los factores Nod en diferentes capas de células con diferentes patrones de expresión temporal. Por ejemplo, los genes de nodulinas tempranas *ENOD11*, *ENOD12* y *rip1* se inducen en la epidermis en las dos primeras horas después de la adición de estos factores, mientras que *ENOD20* y *ENOD40* se inducen más tarde en el cortex (150, 151, 152, 153, 154). Los cambios en la expresión génica inducidos por los genes Nod están correlacionados temporalmente con los cambios celulares y en el desarrollo de la planta; por ejemplo, los factores Nod disparan la reorganización del esqueleto microtubular e inducen divisiones celulares, primero en el periciclo radical y luego en el cortex (155) estos eventos están correlacionados con la inducción de *ENOD40* en el periciclo radical y la subsecuente inducción de varios genes de nodulinas (ej, *ENOD20*, *rip1*, y *ENOD40*) en el primordio nodular naciente (156, 157, 158).

La inducción de los nódulos en la planta está determinada por las condiciones fisiológicas y las fitohormonas. En el caso de altas concentraciones de nitrógeno combinado, por ejemplo, con nitrato y amonio, las plantas no necesitan fijar nitrógeno y la formación del nódulo es suprimida. En condiciones limítrofes de nitrógeno, la alfalfa es capaz de desarrollar nódulos espontáneos en ausencia de *Rhizobium* y estos nódulos se cree que están involucrados como órganos modificados para el almacenamiento de carbono (159).

El etileno afecta la nodulación negativamente. Se ha demostrado que el precursor de la síntesis de etileno (Acido 1-amino ciclo propano carboxílico) suprime el desarrollo de los nódulos en plantas tipo salvaje, mientras que en plantas mutantes tipo *sickle* el desarrollo de los nódulos permanece confinado a zonas susceptibles de la raíz, como en las plantas salvajes, lo que sugiere que el etileno juega un papel en el control autorregulatorio enmarcando las zonas de infección. Por otra parte la autorregulación global que inhibe la subsecuente nodulación en lugares diferentes a la zona radical inicialmente nodulada depende del genotipo apical (160).

Esto sugiere que el desarrollo nodular está controlado por factores negativos y positivos. Además de estos controles negativos, otro factor negativo importante para la nodulación parece trabajar vía reacciones de defensa que la planta levanta contra microorganismos invasores, incluido *Rhizobium*.

Los rhizobios con defectos en la producción de polisacáridos de superficie elicitán respuestas de defensa en sus plantas hospederas que parecen inhibir la invasión bacteriana (161). Cepas de *Rhizobium* mutantes que tiene bloqueada la síntesis de factores Nod pueden provocar la acumulación de ácido salicílico en raíz (162). Las reacciones de defensa se han correlacionado con la imposibilidad de infección durante la invasión por cepas de *Rhizobium* tipo salvaje.

Formas de bajo peso molecular (LMW) de dos exopolisacáridos (EPS) diferentes complementan de forma parcial los mutantes incapaces de producir EPS para la nodulación en alfalfa, sugiriendo que estos compuestos pueden actuar como señales moleculares durante la invasión por *Rhizobium* (163).

Se ha demostrado que los EPS pueden ser sustituidos por polisacáridos capsulares (KPS) por complementación genética (164). En aparente contradicción con esto, los KPS inducen una rápida pero transiente expresión de genes relacionados con defensa en hojas, aunque no se ha observado reacción de defensa típica (165). Este aparente conflicto se soluciona si se tiene en cuenta que la función señalizadora de los polisacáridos LMW está en suprimir las reacciones de defensa. Evidencias recientes sugieren que los LPS y los succinoglicanos-LMW son capaces de suprimir reacciones de defensa provocados por elicitores derivados de *Rhizobium* desconocidos en el hospedero de forma específica (166).

Las respuestas morfológicas que ocurren en las células corticales y epiteliales cuando la raíz comienza a ser colonizada por *Rhizobium* y HMA, respectivamente, parecen a primera vista involucrar procesos no relacionados. Sin embargo, estudios genéticos y moleculares han demostrado que los procesos de infección son muy similares. Se han identificado varios genes que se inducen durante ambas interacciones simbióticas, por ejemplo: los genes de nodulinas tempranas *ENOD2*, *ENOD40* (167), *ENOD5*, *ENOD12* (135), el gen de la leghemoglobina *VFLb29* (168) y el gen que codifica para una aquaporina *NOD26* (169).

Sin embargo, la evidencia más convincente de que los procesos de colonización empleados por ambos simbiosis involucran etapas comunes, proviene de estudios con leguminosas mutantes que han perdido la capacidad de formar nódulos. Una gran proporción de mutantes resistentes a la nodulación eran también completamente resistentes a la micorrización, mientras que no se afectaba su interacción con patógenos del suelo (170, 171). En guisantes se han identificado cuatro genes que son esenciales para las primeras etapas de ambas asociaciones. Mutantes de tres de estos genes, *sym8*, *sym9* y *sym19*, se han estudiado en detalle a nivel citológico. Estos mutantes son incapaces de formar un cordón de infección (172) y aunque aún se puede formar el apresorio sobre estos mutantes Nod-/Myc-

fueron incapaces de desarrollar crecimiento hifal intercelular (170). Esto demuestra que la colonización por *Rhizobium* y HMA involucra mecanismos comunes. La Tabla II presenta una comparación entre la simbiosis micorrízica y la nodular.

Tabla II. Comparación entre simbiosis nodular y micorrízica

Aspectos a comparar	Nódulo	AM
Función	Fijación de nitrógeno	Principalmente toma de fosfatos
Especificidad	Variable, baja (NGR234), a alta (<i>R. meliloti</i> , <i>R. leguminosarum</i> , etc). Restringida a legumbres	Muy baja, con el 80 % de las angiospermas. Excepciones: Chenopodiaceae, Brassicaceae, Juncaceae, Cyperaceae, etc)
Respuesta a flavonoides	Parece universal; inducción de genes <i>nod</i> , quimiotaxis y otras funciones	No parece ser universal pero los flavonoides están involucrados en la germinación y el crecimiento hifal
Respuestas citológicas del hospedero	Deformación de los pelos radicales; división de las células corticales a generar nódulos	Proliferación de la membrana plasmática alrededor del arbusculo; ausencia de división celular o elongación
Respuestas citológicas del simbionte	Junto con el hospedero, formación del cordón de infección; diferenciación a bacteroides	Formación del apresorio; proliferación hifal; diferenciación a arbusculos
Expresión de genes relacionados con la simbiosis	Se expresan en ambos hospedero y simbionte	Se expresan en ambos hospedero y simbionte

Dada la notable similitud que se aprecia entre estos dos tipos de simbiosis planta-microorganismo, incluida la supresión de respuestas de defensa en la interacción *Rhizobium*-leguminosa, algunos investigadores han propuesto que la nodulación por *Rhizobium* evolucionó de la simbiosis micorrízica. La evidencia más completa para este planteamiento radica en el hecho que las leguminosas que son Nod⁻ (o sea, no nodulantes) son frecuentemente Myc⁻ (no micorrízicas) (173). Además, los factores Nod, la señal molecular de la simbiosis nodular, es un oligómero sustituido de N-acetil-D-glucosamina, una clase de moléculas que son más típicas de paredes celulares de hongo que de superficies de bacterias gram negativa (136).

Otros puntos de similitud son: (i) los factores Nod estimulan la formación de micorrizas en soya tanto nodulante como no nodulante (49) y (ii) los genes de nodulación tempranos *MsENOD2* y *MsENOD40* han sido detectados en alfalfa micorrizadas (167). Este último hecho sugiere que las vías de transducción de señales en ambas simbiosis están conservadas. Además, en leguminosas micorrizadas se expresan genes similares a aquellos que codifican nodulinas tardías tales como leghemoglobina y nodulina 26 (168).

Sin embargo, Varios autores (167), mediante técnicas de PCR e hibridación, no pudieron detectar, en ADN aislado de HMA, ningún gen homólogo de *nodC*, un gen de nodulación de *Rhizobium* que tiene similitud de secuencias al gen de quitina sintasa de levaduras. Es por ello que numerosas plantas no leguminosas colonizadas por hongos micorrízicos son Myc+ pero siempre Nod-.

Así también se ha demostrado que las nodulinas tempranas *PsENOD5* y *PsENOD12A* se inducen en guisantes micorrizados por *Gigaspora margarita* en estados tempranos de la formación AM así como por factores Nod de *Rhizobium*, la expresión de estos genes parece ser específica de interacciones simbióticas (135).

La función de estos genes durante la formación de micorrizas no está clara. La secuencia nucleotídica de estos genes indica que podrían codificar proteínas de pared. Dado que la nueva pared celular se deposita alrededor de la hifa intracelular, *PsENOD5* y *PsENOD12A* podrían ser partes de este nuevo material celular (135).

Estos investigadores demostraron, además, que la vía de transducción de señales activada por los hongos micorrizógenos comparte al menos una etapa común con la vía de activación de los factores Nod y que la simple mutación de un gen (*sym8*) es causante de los fenotipos Myc- Nod-.

¿Las señales de los HMA y los factores Nod de *Rhizobium* activan vías de transducción de señales comunes?. La disponibilidad de genes marcadores que se activan durante ambas interacciones simbióticas, así como de mutantes incapaces de asociarse con ambos simbiontes ha permitido el estudio de genes involucrados en mecanismos comunes para la colonización de estos.

ENOD12. Es el marcador genético mejor estudiado para la inducción de respuesta por factores Nod. Este gen es inducido en las células involucradas con la simbiosis o preparadas para la interacción con *Rhizobium* (153, 174). Utilizando el método de inoculación puntual se demostró que en la interacción AM también se activaba *ENOD12* cuando el hongo infecta la raíz (135). Dado que la proteína secretada puede ser componente de la pared celular, esta podría formar parte de la matriz secretada por el hospedero para rodear al microsimbionte.

El estudio con plantas transgénicas de *Medicago* que tienen el gen de *ENOD12* anterior al de β -glucuronidasa ha demostrado que la inducción de *ENOD12* por factores Nod puede ser mimetizada por mastoparan, un compuesto que activa proteína G (175). Además, estudios con antagonistas de fosfolipasa C (PLC)

sugieren que el inositol fosfato es segundo mensajero de esta vía. Se desconoce si la vía del inositol fosfato juega algún papel en la inducción de *ENOD12* por HMA. Sin embargo, *ENOD12* no se induce ni por factores Nod ni por micorrizas en la epidermis radical de plantas *sym8* mutantes. Por lo tanto, es probable que la cascada de transducción de señales que permiten la expresión de *ENOD12* y que se activan por factores Nod y micorrizas tienen, al menos, SYM8 en común (176).

ENOD40. Al igual que *ENOD12*, el gen de la nodulina temprana *ENOD40* también es activado tanto por *Rhizobium* como por hongos AM (167). En la interacción con *Rhizobium* este gen se expresa primero en las células pericíclicas opuestas al protoxilema a pocas horas de la aplicación de los factores Nod y marcadamente antes de que la primera división ocurra en la corteza radical (173). Mas tarde, cuando se inducen las divisiones celulares, *ENOD40* también se expresa en las células en división (177, 178). Sorprendentemente, la expresión en el periciclo opuesto a los polos xilemáticos es complementario a los patrones de expresión del ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) sintasa, el gen que codifica la enzima que cataliza la última etapa en la biosíntesis de etileno. Dado que el etileno es un inhibidor de la división de las células corticales, la expresión localizada de ACC sintasa contribuye al establecimiento del primordio nodular (179). La sobreexpresión de *ENOD40* así como la introducción de un constructo para su expresión induce la división celular en la corteza interna de la raíz (156). De aquí que la inducción local de expresión de *ENOD40* en la región del periciclo opuesta a los polos floemáticos pudiera proveer información de posición adicional para la formación del nódulo (176).

ENOD 40 ha sido aislado de varias leguminosas así como de otras especies. Todos los genes *ENOD 40* contienen dos regiones altamente conservadas.

Como *ENOD40* puede ser inducido por HMA permanece bajo estudio. Dado que el gen puede ser activado por citoquininas (180) y que está demostrado que estos producen citoquininas, se ha postulado que esta hormona induce *ENOD40* en la interacción con HMA (167). Así también se ha propuesto que los factores Nod provocan un incremento en los niveles de citoquininas en los tejidos radicales (181) y esto podría explicar por qué *ENOD40* puede ser inducida por ambos microsimbiontes (167). Sin embargo, parece probable que además de citoquinina alguna otra molécula relacionada con la cascada de señales para la activación del gen podría ser común a ambos. Los factores Nod no pueden inducir *ENOD40* en alfalfa mutante Nod/Myc⁻ MN NN1008, mientras que la citoquinina si lo induce (176, 182). Lo que sugiere que MN NN1008 está mutado en un gen que es activo *upstream* de citoquinina. Además, no se observa el pico de calcio que se induce en los primeros minutos después de la aplicación de factores Nod (183). Esto sugiere que el gen mutado está probablemente involucrado en las primeras etapas de la cascada de activación de señales.

Como parte de un estudio para evaluar analogías a nivel molecular entre estas dos interacciones planta-microorganismo, varios autores (184) se enfocaron sobre los genes de *Medicago trunculata* que codifican proteínas ricas en prolinas de la pared, que se expresan en los estadios tempranos de la nodulación. El gen **MtENOD11** se transcribe durante los procesos de preinfección e infección de la nodulación en raíces y nódulos radicales. Ellos demostraron que este gen también se expresa durante la colonización radical por hongos endomicorrízicos en las células de la corteza interna que contienen arbusculos de reciente formación. Observaron que este gen no se activaba durante la colonización radical por el hongo no simbiótico *Rhizoctonia*. El análisis de plantas transgénicas de *Medicago* spp que expresan pMtENOD11-gusA reveló que este gen también se transcribe en una variedad de células especializadas no simbióticas de la raíz, brotes y semillas en desarrollo que necesitan de una alta actividad de secreción e intercambio de metabolitos o sujetos a modificaciones reguladas en la forma de la célula. El hecho de que este gen solo se active en este tipo de células y en el caso de MA en las células que contienen arbusculos de reciente formación, parece indicar que el gen solo se activa en los casos de interacciones simbióticas como un mecanismo para sustentar la demanda de metabolitos para el intercambio de los simbioses.

Otros autores (136), usando mutantes de *Medicago trunculata*, analizaron el control genético de la transducción de los factores Nod. Mutantes en cuatro genes (*DMI1*, *DMI2*, *DMI3*, y *NSP*) fueron pleiotrópicamente afectados en su respuesta a los factores Nod, lo que indicó que estos genes se requieren para la activación de la transducción de señales de los factores Nod que permite las respuestas simbióticas tales como deformaciones de los pelos radicales, expresión de los genes de nodulinas y división de las células corticales. El análisis de los mutantes también proveyó evidencias de que los factores Nod tienen un efecto dual sobre el crecimiento de los pelos radicales: inhibición del crecimiento endógeno de la planta y elicitación del crecimiento dependiente de los factores Nod de la bacteria. Los mutantes de *dmi1*, *dmi2*, y *dmi3* resultaron también incapaces de asociarse con hongos micorrízicos, indicando que al menos hay tres etapas comunes a la nodulación y la micorrización con HMA y que la vía de transducción de señales de ambos simbioses comparte etapas comunes.

Se han estudiado dos loci en guisantes y uno de *Lotus japonicus* con importante función en la percepción de los factores Nod: *SYM8* de guisantes, que está involucrado en el control de expresión génica de *PsENOD5* y *PsENOD12A* en respuesta a los factores Nod (135); *SYM2^A* también de guisantes, el cual está involucrado en el reconocimiento específico de los factores Nod, permitiendo el avance de la infección, pero no la deformación de los pelos radicales o expresión de *PsENOD12* (185); y *NIN* de *L. japonicus*, que no se conoce como funciona, ya que no interviene ni en la percepción ni en el control de los factores Nod involucrados en la deformación o el rizamiento de los pelos radicales (186).

REFERENCIAS

1. Smith, S. E. y Read, D. J. Mycorrhizal symbiosis. 2nd. edn London, Academic Press. 1997.
2. Salzer, P. y Boller, T. Elicitor induced reactions in mycorrhizae and their supresión. In: *Arbuscular Mycorrhizas: Physiology and Function*. (eds) Kapulnik, Y. y Douds, Jr. D. D. Kluwer Academic Publishers. 2000. p. 1-10.
3. Bonfante, P. y Perotto, S. 1995. Strategies of arbuscular mycorrhizal fungi when infecting host plants. *New Phytol.*, vol. 130, p. 3-21.
4. Koide, R. T. y Schreiner, R. P. 1992. Regulation of the VAM symbiosis. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.*, vol. 43, p. 557-581.
5. Noval, B. M. de la; Cabrera, G.; Hernández, M. I. y Morales, D. Aplicación de MVA y productos biológicamente activos en vitroplantas de plátano en la fase post in vitro. In: *Memorias del III BIOFERTRO'95. Reunión Latinoamericana de Rhizobiología*. La Habana, Dic/1994.
6. Boller, T. Chemoperception of microbial signals in plant cells. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 1995, vol. 46, p. 189-214.
7. Penninckx, I. Analysis of the signal transduction pathway leading to pathogen-induced activation of a plant defensin gene in *Arabidopsis thaliana*. Dissertationes de Agricultura. Oktober. 1998, p. 1-46.
8. Creelman, R. A. y Mullet, J. E. Biosynthesis and action of jasmonate in plants. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 1997, vol. 48, p. 355-381.
9. Keent, N. T. The molecular biology of disease resistance. *Plant Mol. Biol.*, 1992, vol. 19, 109-122.
10. Agrios, G. N. Plant Pathology. Fourth edition. Academic Press. San Diego. C. A. 1997.
11. Jackson, A. O. y Taylor, C. B. Plant-microbe interactions: life and death at the interface. *Plant Cell.*, 1996, vol. 8, p. 1651-1668.
12. Hutcheson, S. N. Current Concepts of active defense in plants. *Ann. Rev. Phytopathol.*, 1998, vol. 36, p. 59-90.
13. Osborne, A. E. Preformed antimicrobial compounds and plant defense against fungal attack. *Plant Cell.*, 1996, vol. 8, p. 1821-1831.
14. Keent, N. T.; Ersek, T.; Long, M.; Bruegger, B. y Holliday, M. Inhibition of the hyper-sensitive reaction of soybean leaves to incompatible *Pseudomonas* spp. By blasticidin S., streptomycin or elevated temperature. *Physiol Plant Pathol.*, 1981, vol. 18, p. 325-357.
15. Baker, B.; Zambryski, P.; Staskawicz, B. y Dinesh-Kumar, S. P. Signaling in plant-microbe interactions. *Science*, 1997, vol. 276, p. 726-733.
16. Hammond-Kosack, K. E. y Jones, J. D. G. Resistance gene-dependent plant defense responses. *Plant Cell*. 1996, vol. 8, p. 1773-1791.

17. Knoogge, W. Fungal infection of plants. *Plant Cell*, 1996, vol. 8, p. 1711-1722.
18. Hahn, M. G. Microbial elicitors and their receptors. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 1996, vol. 34, p. 387-412.
19. Durner, J.; Shah, J. y Klessig, D. F. Salicylic acid and disease resistance in plants. *Trends Plant Sci.*, 1997, 2, p. 266-274.
20. Sticher, L.; Mauch-Mani, B. y Métraux, J. P. Systemic acquired resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 1997, vol. 35, p. 235-270.
21. Gabriel, D. W. y Rolfe, B. G. Working models of specific recognition in plant-microbe interactions. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 1990, vol. 28, p. 365-391.
22. Keent, N. T. y Holliday, M. J. Recognition of bacterial pathogens by plants. In: *Phytopathogenic Prokaryotes*. Mounts M. S., Lacy G. H. (eds) New York: Academic. 1982, vol. 2, p. 179-221.
23. Pearce, G.; Strydom, D.; Johnson, A. y Ryan, C. A. A polypeptide from tomato leaves induces wound-inducible proteinase inhibitor proteins. *Science*, 1991, vol. 253, p. 895-898.
24. Leister, R. T.; Ausubel, F. M. y Katagiri, F. Molecular recognition of pathogen attack occurs inside of plant cells in plant disease resistance specified by the *Arabidopsis* genes RPS2 and RPM1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1996, vol. 93, p. 3459-3464.
25. Van den Ackerveken, G.; Marois, E. y Bonas, U. Recognition of the bacterial avirulence protein AvrBs3 occurs inside the host plant cell. *Cell.*, 1996, vol. 87, p. 1307-1316.
26. Noval, B. M. de la. Influencia de la sistemina sobre la actividad β -1,3-glucanasa y quitinasa en plántulas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) micorrizadas. Tesis para optar por el grado de Maestro en Ciencias. Centro de Investigaciones y de Estudios Avanzados (CINVESTAV-IPN), Unidad de Irapuato. México. 2000.
27. Templeton, M. D.; Dixon, R. A.; Lamb, C. J. y Lawton, M. A. Hydroxyproline-rich glycoprotein transcripts exhibit different spatial patterns of accumulation in compatible and incompatible interactions between *Phaseolus vulgaris* and *Colletotricum lindemuthianum*. *Plant Physiol.*, 1991, vol. 94, p. 1265-1269.
28. Bolwell, G. P.; Butt, V. S.; Davies, D. R. y Zimmerlin, A. The origin of the oxidative burst in plants. *Free. Radic. Res.*, 1995, vol. 23, p. 517-532.
29. Lambais, M. R. Regulation of plant defense-related genes in arbuscular mycorrhizae. In: *Current Advances in Mycorrhizae Research*. Section II: Mycorrhizal fungi and plants defense. (eds) Podilla and Douds, APS Press USA, 2000. p. 45-60.

30. Fieschi, M.; Alloatti, G.; Sacco, S. y Berta, G. Membrane potential hiperpolarización in vesicular arbuscular mycorrhizae of *Allium porrum* L: a non-nutritional long-distance effect of the fungus. *Protoplasma*, 1992, vol. 168, p. 136-140.
31. Brisson, L. F.; Tenhaken, R. y Lamb, C. Function of oxidative cross-linking of cell wall structural proteins in plants disease. *Plant. Cell.*, 1995, vol. 6, p. 1703-1712.
32. Bradley, D. J.; Kjelbom, P. y Lamb, C. J. Elicitor-and wound-induced oxidative cross-linking of a proline-rich plant cell wall protein: a novel rapid defense response. *Cell.*, 1992, vol. 70, p. 21-23.
33. Wojtaszek, P. Oxidative burst: A early plant response to pathogen infection. *Biochem. J.*, 1997, vol. 322, p. 681-692.
34. Bent, A. F. Plant disease resistance genes: Function meets structure. *Plant Cell*, 1996, vol. 8, p. 1757-1771.
35. Showalter, A. M. Structure and function of plant cell wall proteins. *Plant Cell*, 1993, vol. 5, p. 9-23.
36. Balestrini, R.; Romera, C.; Puigdomenech, P. y Bonfante, P. Location of a cell-wall Hydroxyproline-rich glycoprotein, cellulase and β -1,3-glucan in apical and differentiated regions of maize mycorrhizal roots. *Planta*, 1994, vol. 195, p. 201-209.
37. Franken, P. y Gnädinger, F. Analysis of parsley arbuscular endomycorrhiza: infection development and mRNA levels of defense-related genes. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 1994, vol. 7, p. 612-620.
38. Cordier, C.; Pozo, M. J.; Barea, J. M.; Gianinazzi, S. y Gianinazzi-Pearson, V. Cell defense responses association with localized and systemic resistance to *Phytophthora parasitica* induced in tomato by an arbuscular mycorrhizal fungus. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 1998, vol. 11, p. 1017-1028.
39. Trolla, A.; Varese, G. C.; Gnavi, E.; Fusconi, A.; Sampo, S. y Berta, G. Interaction between the soilborne root pathogen *Phytophthora nicotianae* var. *parasitica* and the arbuscular mycorrhizal fungus. *Glomus mosseae* in tomato plants. *Plant Soil*, 1996, vol. 185, p. 199-209.
40. Blee, K. A. y Anderson, A. J. Defense responses in plants to arbuscular mycorrhizal fungi. In: *Current Advances in Mycorrhizae Research*. Section II: Mycorrhizal fungi and plants defense. (eds) Podilla and Douds, APS Press USA, 2000, p. 27-44.
41. Goodman, R. N. y Novacky, A. J. The hypersensitive reaction of plants to pathogens a resistance phenomenon. St. Paul, MN: APS Press, 1994.
42. Chandra, S. y Low, P. S. Measurement of Ca^{2+} fluxes during the oxidative burst in aequorin-transformed tobacco cell. *J. Biol. Chem.*, 1997, vol. 272, p. 8274-8280.

43. Baker, C. J. y Orlandi, E. W. Active oxygen in plant pathogenesis. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 1995, vol. 33, p. 299-321.
44. Doke, N. Involvement of superoxide anion generation in hypersensitive response of potato tuber tissues to infection with an incompatible race of *Phytophthora infestans*. *Physiol. Plant Pathol.*, 1983, vol. 23, p. 345-347.
45. Staskawicz, B. J.; Ausubel, F. M.; Baker, B. J.; Ellis, J. G. y Jones, J. D. G. Molecular genetics of plant disease resistance. *Science*. 1995, vol. 268, p. 661-667.
46. Bonas, U.; Stall, R. E. y Straskawicz, B. Genetic and structural characterization of the avirulence gene *avrBs3* from *Xanthomona campestris* pv. *Vesicatoria*. *Mol. Gen. Genet.*, 1989, vol. 218, p. 127-136.
47. Flor, H. H. Current status of the gene-for-gene concept. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 1971, vol. 9, p. 275.
48. Bonfante, P. y Perotto, S. Outside and inside the roots: cell-cell interactions among arbuscular mycorrhizal fungi, bacteria and host plants. En: *Current Advances in Mycorrhizae Research*. Section V: Ultrastructural changes during mycorrhizal symbiosis. (eds) Podilla and Douds, APS Press USA, 2000, p. 141-156.
49. Xie, Z. P.; Staehelin, C.; Vierheilig, H.; Wiemken, A.; Jabbouri, S.; Broughton, W. J.; Vogeli-lange, R. y Boller, T. Rhizobial nodulation factors stimulate mycorrhizal colonization of nodulating and non-nodulating soybeans. *Plant Physiol.*, 1995, vol. 108, p. 1519-1525.
50. Peretto, R.; Bittini, V.; Favaron, F.; Alghisi, P. y Bonfante, P. Polygalacturonase activity and location in arbuscular mycorrhizal roots of *A. porrum* L. *Mycorrhiza*, 1995, vol. 5, p. 157-163.
51. Hahn, M. G.; Bucheli, P.; Cervone, F.; Doares, S. H.; O'Neill, R. A.; Darvill, A. y Albersheim, P. The role of cell wall constituents in plant pathogen interactions. En: *Plant-Microbe Interactions*. Nester E., Kosuge, T. Eds. New York: McGraw Hill, 1989, vol. 131-181.
52. García-Garrido, J. M.; García-Romero, J. y Ocampo, J. A. Cellulase productio by the vesicular arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *New Phytol.*, 1992, vol. 121, p. 221-226.
53. Bago, B.; Azcón-Aguilar, C.; Goulet, A. y Piché, Y. Branched absorbing structures (BAS): a feature of the extraradical mycelium of symbiotic arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol.*, 1998, vol. 139, p. 375-388.
54. Smith, S. E. y Smith, F. A. Structure and function of the interfaces in biotrophic symbiosis as they relate to nutrient transport. *New Phytol.*, 1990, vol. 114, p. 1-38.
55. Mohr, U.; Lange, J.; Boller, T.; Wiemken, A. y Vögeli-Lange, R. Plant defence genes are induced in the pathogenic interaction between bean roots and *Fusarium solani*, but not in the symbiotic interaction with the

- arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *New Phytol.*, 1998, vol. 138, p. 589-598.
56. Harrison, M. J. y Dixon, R. A. Spatial pattern of expression of flavonoid/Isoflavonoid pathway genes during the interaction between roots of *Medicago truncatula* and the mycorrhizal fungus *Glomus versiforme*. *Plant J.*, 1994, vol. 6, p. 9-20.
 57. Volpin, H.; Elkind, Y.; Okon, Y. y Kapulnik, Y. A vesicular arbuscular mycorrhizal fungus (*G. intraradix*) induces a defense response in alfalfa roots. *Plant Physiol.*, 1994, vol. 104, p. 683-689.
 58. Dixon, R. A. y Harrison, M. J. Activation, structure and organization of genes involved in microbial defense in plants. *Advances in Genetics*, 1990, vol. 28, p. 65-234.
 59. Vierhelig, H.; Bago, B.; Albrecht, C.; Poulin, M. J. y Piché, Y. Flavonoids and arbuscular-mycorrhizal fungi: Flavonoids in the living system. (eds) Manthey and Buslig. Plenum Press. N. Y. 1998. p. 9-33.
 60. Volpin, H.; Phillips, D. A.; Okon, Y. y Kapulnik, Y. Suppression of an Isoflavonoid phytoalexin defense response in mycorrhizal alfalfa roots. *Plant Physiol.*, 1995, vol. 108, p. 1449-1454.
 61. Harrison, M. J. y Dixon, R. A. Isoflavonoid accumulation of expression of defense gene transcripts during the establishment of vesicular-arbuscular mycorrhizal associations in roots of *Medicago truncatula*. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 1993, vol. 6, p. 643-654.
 62. Balaji, B.; Poulin, M. J.; Vierhelig, H. y Piché Y.. Responses of an arbuscular mycorrhizal fungus, *Gigaspora margarita*, to exudates and volatiles from the R, T-DNA-transformed roots of nonmycorrhizal and mycorrhizal mutants of *Pisum sativum* L. Sparkle. *Experimental Mycology*, 1995, vol. 19, p. 275-283.
 63. Becárd, G.; Douds, D. D. y Pfeffer, P. Extensive in vitro hyphal growth of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in the presence of CO₂ and flavonols. *Appl. Environ Microbiol.*, 1992, vol. 58, p. 821-825.
 64. Morandi, D.; Brazoti, B. y Gianinazi-Pearson, V. Gianinazzi-Pearson. Effect of the plant flavonoids on in vitro behavior of an AMF. *Agronomie*, 1992, vol. 12, p. 811-816.
 65. Becárd, G.; Taylor, L. P.; Douds, D. D.; Pfeffer, P. y Doner, I. W. Flavonoids are not necessary plant signal compounds in arbuscular mycorrhizal symbioses. *Mol. Plant Microbe Interact.*, 1995, vol. 8, p. 252-258.
 66. Spanu, P.; Boller, T.; Ludwiwg, A.; Wiemken, A.; Faccio, A. y Bonfante-Fasolo, P. Chitinase in mycorrhizal *Allium porrum*: regulation and localization. *Planta*, 1989, vol. 177, p. 447-455.

67. Tsai, S. M. y Phillips, D. A. Flavonoids released natural from alfalfa promote development of symbiotic *Glomus* spores in vitro. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1991, vol. 57, p. 1485-1488.
68. Vierheilig, H.; Alt-Hug, M.; Engel-Streitwalf, R.; Mäder, P. y Wiemken, A. Studies on the attract ional effect of root exudates on hyphal growth of an arbuscular mycorrhizal fungus in a soil compartment-membrane system. *Plant Soil*. 1998, vol. 203, p. 137-144.
69. Pitson, S. M.; Servior, R. J. y McDougall, B. M. Noncellulolytic fungal β -glucanases: their physiology and regulation. *Enzyme Microb. Technol.*, 1993, vol. 15, p. 178-192.
70. Simmons, C. R. The physiology and molecular biology of plants 1,3- β -glucanases end 1,3; 1,4 β -D-glucanases. *Crit. Rev. Plant Sci.*, 1994, vol. 13, p. 325-387.
71. Vázquez-Garcidueñas, S.; Leal-Morales, C. y Herrera-Estrella, A. Analysis of β -1,3-glucanolytic system of biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1998, vol. 64, p. 1442-1446.
72. Collinger, D. B.; Kragh, K. M.; Mikkelsen, L. D.; Nielsen, K. K.; Rasmussen, U. y Vad, K. Plant chitinases. *Plant J.*, 1993, vol. 3, p. 31-40.
73. Lambais, M. R. y Mehdy, M. C. Spatial distribution of chitinases and β -1,3-glucanases transcripts in bean mycorrhizal roots under low and high phosphate conditions. *New Phyto.*, 1998, vol. 140, p. 33-42.
74. David, R.; Itzhaki, H.; Ginzberg, I.; Gafni, Y.; Galili, G. y Kapulnik, Y. Suppression of tobacco basic chitinase gene expression in response to colonization by the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *Mol. Plat-Microbe. Interact.*, 1998, vol. 11, p. 489-497.
75. Bisseling, T. The role of plant peptides in intercellular signaling. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 1999, vol. 2, p. 365-368.
76. Dumas-Gaudot, E.; Gollotte, A.; Cordier, C.; Gianinazzi, S. y Gianinazzi-Pearson, V. Modulation of host host defence systems. In. *Arbuscular Mycorrhizas: Physiology and Function*. (eds) Kapulnik Y. y Douds Jr. D.D. Kluwer Academic Publishers. 2000. p. 173-200.
77. Dumas-Gaudot, E.; Asselin, A.; Gianinazzi-Pearson, V.; Gollotte, A. y Gianinazzi, S. Chitinase isoforms in roots of various pea genotypes infected with arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Sci.*, 1994, vol. 99, p. 27-37.
78. Lambais, M. R. y Mehdy, M. C. Differential expression of-defense related genes in arbuscular mycorrhiza. *Can. J. Bot.*, 1995, 73 (Suppl 1), p. S533-S540.
79. Staehelin, C.; Granado, J.; Müller, J.; Wiemken, A.; Mellor, R. B.; Flix, C.; Regenass, M.; Broughton, W. J. y Boller, T. Perception of *Rhizobium* nodulation factors by tomato cells and inactivation by root chitinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994, vol. 91, p. 2196-2200.

80. Bonfante-Fasolo, P. The role of the cell wall as a signal in mycorrhizal associations. En: Cell to cell signals in plant, animal and microbial symbiosis. (eds) Scannerini S. et al. Springer-Verlag. Berlin Heidelberg. 1988, p. 219-235.
81. Pozo, M. J.; Azcón-Aguilar, C.; Dumas-Gaudot, E. y Barea, J. M. β -1,3-Glucanase activities in tomato roots inoculated with arbuscular mycorrhizal fungi and/or *Phytophthora parasitica* and their possible involvement in bioprotection. *Plant Sci.*, 1999, vol. 141, p. 149-157.
82. Dumas-Gaudot, E.; Grenler, J.; Furlan, V. y Asselin, A. Chitinase, chitosanase and β -1,3 glucanase activities in *Allium* and *Pisum* roots colonized by *Glomus* species. *Plant Sci.*, 1992, vol. 84, p. 17-24.
83. Gianinazzi-Pearson, V.; Lemoine, M. C.; Arnould, C.; Gollotte, A. y Morton, J. B. Localization of β (1-3) glucans in spore and hyphal walls of fungi in the Glomales. *Mycologia*, 1994, vol. 86, p. 478-485.
84. Lambais, M. R. y Mehdy, M. C. Suppression of endochitinase, β -1,3-glucanase, chalcona isomerasa expression in bean vesicular-arbuscular mycorrhizal roots under different soil phosphate conditions. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 1993, vol. 6, p. 75-83.
85. Lambais, M. R.; Mehdy, M. C. Soybean roots infected by *Glomus intraradices* strains differing in infectivity exhibit differential chitinase and β -1,3-glucanase expression. *New Phytol.*, 1996, vol. 134, p. 531-538.
86. Smeekens, S. y Rook, F. Sugar sensing and sugar-mediated signal transduction in plants. *Plant Physiol.*, 1997, vol. 115, p. 7-13.
87. Zhou, L.; Jang, J.; Jones, T. L. y Sheen, J. Glucose and ethylene signal transduction crosstalk revealed by an *Arabidopsis* glucose-insensitive mutant. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998, vol. 95, p. 10294-10299.
88. Murphy, P. J.; Langridge, P. y Smith, S. E. Cloning plant genes differentially expressed during colonization of roots of *Hordeum vulgare* by the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *New Phytol.*, 1997, vol. 135, p. 292-301.
89. Smeekens, S. Sugar-induced signal transduction in plant. *Annu. Rev. Plant Physiol Plant Mol. Biol.*, 2000, vol. 51, p. 49-81.
90. Harrison, M. J. A sugar transporter from *Medicago truncatula*: Altered expression pattern in roots during vesicular-arbuscular (VA) mycorrhizal associations. *Plant J.*, 1996, vol. 9, p. 491-503.
91. Liu, H.; Trieu, T. A.; Blaylock, A. L. y Harrison, M. J. Cloning and characterization of two phosphate transporters from *Medicago truncatula* roots regulation in response to phosphate and to colonization by arbuscular mycorrhizal (AM) fungi. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 1998, vol. 1, p. 14-22.

92. Benabdellah, K.; Azcón-Aguilar, C. y Ferrol, N. Soluble and membrane symbiosis-related polypeptides associated with the development of arbuscular mycorrhizas in tomato (*Lycopersicon esculentum*). *New Phytol.*, 1998, vol. 140, p. 135-143.
93. Benabdellah, K.; Azcón-Aguilar, C. y Ferrol, N. Alternations in the plasma membrane polypeptide pattern of tomato roots (*Lycopersicon esculentum*) during the development of arbuscular mycorrhiza. *J. Exp. Bot.*, 2000, vol. 51, p. 747-754.
94. Dangl, J. L.; Dietrich, R. A. y Richberg, M. H. Death don't have no mercy: cell death programs in plant-microbe interactions. *Plant Cell*, 1996, vol. 8, p. 1793-1807.
95. Shaul, O.; David, R.; Sinvani, G.; Ginzberg, I.; Ganon, D.; Winer, S.; Ben-Dor, B.; Badani, H.; Ovdad, N. y Kapulnik, Y. Plant defence responses during arbuscular mycorrhiza symbiosis. En: *Current Advances in Mycorrhizae Research*. Section II: Mycorrhizal fungi and plant defense. (eds) Podilla and Douds, APS Press USA, 2000, p. 61-68.
96. Gongala, N. Regulation of mycorrhizal infection by hormonal factors produced by hosts and fungi. *Experientia*, 1991, vol. 47, p. 331-340.
97. Felix, G. y Meins, Jr. F. Developmental and hormonal regulation of β -1,3-glucanase in tobacco. *Planta*, 1986, vol. 167, p. 206-211.
98. Felix, G. y Meins, Jr. F. Ethylene regulation of β -1,3-glucanase in tobacco. *Planta*, 1987, vol. 172, p. 386-392.
99. Gunze, C. M. B. y Henness, C. M. R. Effect of host-applied auxin on development of endomycorrhiza in cowpeas. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, 1980, vol. 74, p. 247-251.
100. Graham, L. S. y Sticklen, M. B. Plant chitinase. *Can. J. Bot.*, 1994, vol. 72, p. 1057-1083.
101. Danneberg, G.; Latus, C.; Zimme, W.; Hundeshagen, R.; Schreider-Poetsl, H. y Bothe, H. Influence of vesicular-arbuscular mycorrhiza on phytohormone balances in maize (*Zea mays* L.). *J. Plant. Physiol.*, 1993, vol. 141, p. 33-39.
102. O'Donell, P. J.; Calvert, C.; Atzorn, R.; Wasternack, C.; Leyser, H. M. O. y Bowles, D. J. Ethylene as a signal mediating the wound response of tomato plants. *Science*, 1996, vol. 274, p. 1914-1917.
103. Mauch, F.; Hadwiger, L. A. y Boller, T. Ethylene symptom, root signal for the induction of chitinase and β -1,3-glucanase in pea pods by pathogens and elicitor. *Plant Physiol.*, 1984, vol. 76, p. 607-611.
104. Chang, P. F. L.; Cheah, K. T.; Narasimka, M. L.; Hasegawa, P. M. y Bressan, R. A. Osmotin gene expression is controlled by elicitor synergism. *Plant Physiol.*, 1995, vol. 95, p. 620-626.

105. Johnson, P. R. y Ecker, J. R. The ethylene gas signal transduction pathway: a molecular perspective. 1998, *Annu. Rev. Genet.*, vol. 32, p. 227-254.
106. Ludwig-Müller, J. Hormonal balance in plants during colonization by mycorrhizal fungi. In. *Arbuscular Mycorrhizas: Physiology and Function*. (eds) Kapulnik Y. y Douds Jr. D.D. Kluwer Academic Publishers. 2000. p. 263-285
107. Vierhelig, H.; Alt, M.; Mohr, U.; Boller, T. y Wiemken, A. Ethylene biosynthesis and activities of chitinase and β -1,3-glucanase in the roots of host and non-host plants of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi after inoculation with *Glomus mosseae*. *J. Plant Physiol.*, 1994, vol. 143, p. 337-343.
108. Besner, Y. L. y Koide, R. T. Effect of mycorrhizal colonization and phosphorus on ethylene production by Snapdragon (*Antirrhinum majus* L) flowers. *Mycorrhiza*. 1999, vol. 9, p. 161-166.
109. Enyedi, A. J.; Yalpani, N.; Silverman, P. y Raskin, I. Signal molecules in systemic plant resistance to pathogens and pest. *Cell*, 1992, vol. 70, p. 879-886.
110. Farmer, E. E. y Ryan, C. A. Interplant communication: airborne methyl jasmonate induces synthesis of proteinase inhibitors in plant leaves. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1990, vol. 87, p. 7713-7716.
111. Doares, S. H.; Naváez-Vázquez, J.; Conconi, A. y Ryan, C. A. Salicylic acid inhibits synthesis of proteinase inhibitors in tomato leaves induced by systemin and jasmonic acid. *Plant Physiol.*, 1995, vol. 108, p. 1741-1746.
112. Peñas-Cortés, H.; Fisahn, J. y Willmitzer, L. Signals involved in wound-induced proteinase inhibitors II gene expression in tomato and potato plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1995, vol. 92, p. 4106-4113.
113. Ryan, C. A. The search for the proteinase inhibitor-inducing factor, PIIF. *Plant mol. Biol.*, 1992, vol. 19, p. 123-133.
114. Farmer, E. E. y Ryan, C. A. Octadecanoid precursors of jasmonic acid activate the synthesis of wound-inducible proteinase inhibitors. *Plant Cell.*, 1992, vol. 4, p. 129-134.
115. Schaller, A. Oligopeptide signalling and the action of systemin. *Plant Mol. Biol.*, 1999, vol. 40, p. 763-769.
116. Scheer, J. M. y Ryan, C. A. A 160-kD systemin receptor on the surface of *Lycopersicon peruvianum* suspension culture cells. *Plant Cell*, 1999, vol. 11, p. 1525-1535
117. Chao, W. S.; Gu, Y-Q.; Paulot, V.; Bray, E. A. y Walling, L. L. Leucine aminopeptidase RNAs, proteins, and activities increase in response to water deficit, salinity, and the wound signals systemin, methyl jasmonate, and abscisic acid. *Plant Physiol.*, 1999, vol. 120, p. 979-992.

118. Gianinazzi-Pearson, V.; Tahiri-Alaoui, A.; Antoniw, J. F.; Gianinazzi, S. y Dumas, E. Weak expression of the pathogenesis related PR-b1 gene and localization of related protein during symbiotic endomycorrhizal interactions in tobacco roots. *Endocyt. Cell. Res.*, 1992, vol. 8, p. 177-185.
119. Reguar, M. y Gogala, N.. Effects of jasmonic acid and zeatin ribosido on mycorrhizal leek (*Allium porrum*). In: *Second International Conference on Mycorrhizal*. Uppsala, Sweden, July 5-10. 1998. Editen by: U. Ahonen-Jonnarth, E. Danell, P. Fransson, O. Káren, B. Lindahl, I. Rangel and R. Finlay. SLU Service/repro Uppsala, 1998, p. 144.
120. Pugin, A.; Frachisse, J. M.; Tavernier, E.; Bligny, R.; Gout, E.; Douce, R. y Guern, J. Early events induced by the elicitor cryptogein in tobacco cells: involvement of plasma membrane NADPH oxidase and activation of glycolysis and the pentose phosphate pathway. *Plant Cell.*, 1997, vol. 9, p. 2077-2091.
121. Creelman, R. A. Jasmonate perception: characterization of COI1 mutants provides the first clues. *Trends Plant Sci.*, 1998, vol. 3, p. 367-368.
122. Ryan, C. A. y Pearce, G. Systemin, a polypeptide signal for plant defensive genes. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.*, 1998, vol. 14, p. 1-17.
123. McGurl, B. y Ryan, C. A. The organization of prosystemin gene. *Plant. Mol. Biol.*, 1992, vol. 20, p. 405-409.
124. Pearce, G.; Johnson, A. y Ryan, C. A. Structure-activity of deleted and substituted systemin, an eighteen amino acid polypeptide inducer of plant defensive genes. *J. Biol. Chem.*, 1993, vol. 268, p. 212-216.
125. Toumadje, A. y Johnson, W. C. Jr. Systemin has the characteristics of a poly (L-proline) II type helix. *J. Am. Chem. Soc.*, 1995, vol. 117, p. 7023-7024.
126. Schaller, A. y Oecking, C. Modulation of plasma membrane H⁺-ATPase activity differentially activates wound and pathogen defense responses in tomato plants. *Plant Cell*, 1999, vol. 11, p. 263-272.
127. Stratmann, J. W. y Ryan, C. A. Myelin basic protein kinase activity in tomato leaves is induced systemically by wounding and increases in response to systemin and oligosaccharide elicitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997, vol. 94, p. 11085-11089.
128. Narváez-Vázquez, J.; Florin-Chistensen, J. y Ryan, C. A. Positional specificity of a phospholipase A activity induced by wounding, systemin, and oligosaccharide elicitors in tomato leaves. *Plant Cell*, 1999, vol. 11, p. 2249-2260.
129. Bergey, D. y Ryan, C. A. Wound-and systemin-inducible calmodulin gene expression in tomato leaves. *Plant Mol. Biol.*, 1999, vol. 40, p. 815-823.
130. Moyen, C.; Hammond-Kosack, K. E.; Jones, J.; Knight, M. R. y Johannes, E. Systemin triggers an increase of cytoplasmic calcium in tomato mesophyll

- cells: Ca^{2+} mobilization from intra- and extracellular compartments. *Plant Cell Environ.*, 1998, vol. 21, p. 1101-1112.
131. Conconi, A.; Miquel, M. y Ryan, C. A. Changes in the intracellular lipid composition and free fatty acids of tomato leaves in response to wounding. *Plant Physiol.*, 1996, vol. 111, p. 797-803.
 132. Giovannetti, M.; Avio, L.; Sbrana, C. y Citernes, A. S. Factors affecting appressorium development in the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* (Nicol. & Gerd.). *New Phytol.*, 1993, vol. 123, p. 115-122.
 133. Nagahashi, G. y Douds, D. D. Appressorium formation by AM fungi on isolated cell walls of carrot roots. *New Phytol.*, 1997, vol. 136, p. 299-304.
 134. Schultze, M. y Kondorosi, A. Regulation of symbiotic root nodule development. *Annu. Rev. Genet.*, 1998, vol. 32, p. 33-57.
 135. Albrecht, C.; Geurts, R.; Lapeyrie, F. y Bisseling, T. Endo- mycorrhizae and rhizobial Nod factors both require SYM8 to induce the expression of the early nodulin genes *PsENOD5* and *PsENOD12A*. *Plant J.*, 1998, vol. 15, p. 605-614.
 136. Catoira, R.; Galera, C. de Billy, F.; Varma Penmetsa, R.; Journet, E. P.; Maillet, F.; Rosenberg, C.; Cook, D.; Gough C. y Dénarié, J. Four Genes of *Medicago truncatula* Controlling Components of a Nod Factor Transduction Pathway *Plant Cell*, 2000, vol. 12, p. 1647-1666
 137. Gressent, F.; Drouillard, S.; Mantegazza, N.; Samain, E.; Geremia, R. A.; Canut, H.; Niebel, A.; Driguez, H.; Ranjeva, R.; Cullimore, J. y Bono, J. J. Ligand specificity of a high-affinity binding site for lipochitoooligosaccharidic Nod factors in *Medicago* cell suspension cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1999, vol. 96, p. 4704-4709.
 138. Etzler, M. E.; Kalsi, G.; Ewing, N. N.; Roberts, N. J.; Day, R. B. y Murphy, J. B. A nod factor binding lectin with apyrase activity from legume roots. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1999, vol. 96, p. 5856-5861
 139. Downie, J. A. y Walker, S. A. Plant responses to nodulation factors. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 1999, vol. 2, p. 483-489.
 140. Felle, H. H.; Kondorosi, E.; Kondorosi, A. y Schultze, M. Rapid alkalinization in alfalfa root hairs in response to rhizobial lipochitoooligosaccharide signals. *Plant J.*, 1996, vol. 10, p. 295-301.
 141. Felle, H. H.; Kondorosi, E.; Kondorosi, A. y Schultze, M. The role of ion fluxes in Nod factor signaling in *Medicago sativa*. *Plant J.*, 1998, vol. 13, p. 455-464.
 142. Felle, H. H.; Kondorosi, E.; Kondorosi, A. y Schultze, M. Nod factors modulate the concentration of cytosolic free calcium differently in growing and non-growing root hairs of *Medicago sativa* L. *Planta*, 1999, vol. 209, p. 207-212

143. Ehrhardt, D. W.; Atkinson, E. M. y Long, S. R. Depolarization of alfalfa root hair membrane potential by *Rhizobium meliloti* Nod factors. *Science*, 1992, vol. 256, p. 998-1000.
144. Felle, H. H.; Kondorosi, E.; Kondorosi, A. y Schultze, M. Nod signal-induced plasma membrane potential changes in alfalfa root hairs are differentially sensitive to structural modifications of the lipochitoooligosaccharide. *Plant J.*, 1995, vol. 7, p. 939-947.
145. Kurkdjian, A. Role of the differentiation of root epidermal cells in Nod factor (from *Rhizobium meliloti*)-induced root hair depolarization of *Medicago sativa*. *Plant Physiol.*, 1995, vol. 107, p. 783-790.
146. Cárdenas, L.; Feijó, J. A.; Kunkel, J. G.; Sánchez, F.; Holdaway-Clarke, T.; Hepler, P. K. y Quinto, C. *Rhizobium* nod factors induce increases in intracellular free calcium and extracellular calcium influxes in bean root hairs. *Plant J.*, 1999, vol. 19, p. 347-352.
147. Gehring, C. A.; Irving, H. R.; Kabbara, A. A.; Parish, R. W.; Boukli, N. M. y Broughton, W. J. Rapid, plateau-like increases in intracellular free calcium are associated with Nod-factor-induced root-hair deformation. *Mol. Plant Microbe Interact.*, 1997, vol. 10, p. 791-802.
148. Cárdenas, L.; Vidali, L.; Domínguez, J.; Pérez, H. y Sánchez, F. rearrangement of actin microfilament in plant root hairs responding to *Rhizobium etli* nodulation signals. *Plant Physiol.*, 1998, vol. 119, p. 71-877.
149. Miller, D. D.; Ruijter, N. C. A. de; Bisseling, T. y Emons, A. M. C. The role of actin in root hair morphogenesis: Studies with lipochitoooligosaccharide as a growth stimulator and cytochalasin as an actin perturbing drug. *Plant J.*, 1999, vol. 17, p. 141-154.
150. Asad, S.; Fang, Y. W.; Wycoff, K. L. y Hirsch, A. M. Isolation and characterization of cDNA and genomic clones of *MsENOD40*: Transcripts are detected in meristematic cells of alfalfa. *Protoplasma*, 1994, vol. 183, p. 10-23.
151. Crespi, M. D.; Jurkevitch, E.; Poirer, M.; d'Aubenton-Carafa, Y.; Petrovics, G.; Kondorosi, E. y Kondorosi, A. *enod40*, a gene expressed during nodule organogenesis, codes for a non-translatable RNA involved in plant growth. *EMBO J.*, 1994, vol. 13, p. 5099-5112.
152. Cook, D.; Dreyer, D.; Bonnet, D.; Howell, M.; Nony, E. y Vandenbosch, K. Transient induction of a peroxidase gene in *Medicago truncatula* precedes infection by *Rhizobium meliloti*. *Plant Cell*, 1995, vol. 7, p. 43-55.
153. Journet, E. P.; Pichon, M.; Dedieu, A.; Billy, F. de, Truchet, G. y Barker, D. G. *Rhizobium meliloti* Nod factors elicit cell-specific transcription of the *ENOD12* gene in transgenic alfalfa. *Plant J.*, 1994, 6, p. 241-249.

154. Vernoud, V.; Journet, E. P. y Barker, D. *MtENOD20*, a Nod-factor-inducible molecular marker for root cortical cell activation. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 1999, vol. 12, p. 604-614.
155. Timmers, A. C.; Auriac, M. C. y Truchet, G. Refined analysis of early symbiotic steps of the *Rhizobium*-*Medicago* interaction in relationship with microtubular cytoskeleton rearrangements. *Development*, 1999, vol. 12, p. 3617-3628.
156. Charon, C.; Johansson, C.; Kondorosi, E.; Kondorosi, A. y Crespi, M. *Enod40* induces dedifferentiation and division of root cortical cells in legumes. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 1997, vol. 94, p. 8901-8906.
157. Charon, C.; Sousa, C.; Crespi, M. y Kondorosi, A. Alteration of *enod40* expression modifies *Medicago truncatula* root nodule development induced by *Sinorhizobium meliloti*. *Plant Cell*, 1999, vol. 11, p. 1953-1966.
158. Peng, H. M.; Dreyer, D. A.; Vandenbosch, K. A. y Cook, D. Gene structure and differential regulation of the *Rhizobium*-induced peroxidase gene *rip1*. *Plant Physiol.*, 1996, vol. 112, p. 1437-1446.
159. Hirsch, A. M. y LaRue, T. A. Is the legume nodule a modified root or stem or an organ sui generis? *Crit. Rev. Plant. Sci.*, 1997, vol. 16, p. 361-92.
160. Sheng, C. y Harper, J. E. Shoot versus root signal involvement in nodulation and vegetative growth in wild-type and hypernodulating soybean genotypes. *Plant Physiol.*, 1997, vol. 113, p. 825-31.
161. Kennenbergh, E. L.; Reuhs, B. L.; Forsberg, L. S. y Carlson, R. W. Lypolisaccharides and k-antigens: their structure, biosynthesis and functions. En: *The Rhizobiaceae*. Spanik H. P.; Kondorosi, A.; Hooykaas P. J. J. (eds). 1998. Dordrecht: Kluwer, 1998, vol. 147, p. 119-54.
162. Martínez-Albarca, F.; Herrera-Cervera, J. A.; Bueno, P.; Sanjuán, J.; Bisseling, T. y Olivares, J. Auxin transport inhibition precedes root nodule formation in white clover roots and is regulated by flavonoids and derivatives of chitin oligosaccharides *Plant J.*, 1998, vol. 14, p. 23-34.
163. González, J. E.; Reuhs, B. L. y Walter, G. C. Low molecular weight EPS II of *Rhizobium meliloti* allows nodule invasion in *Medicago sativa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996, vol. 93, p. 8636-8641.
164. Petrovics, G.; Putnoky, P.; Reuhs, B.; Kim, J. y Thorp, T. A. The presence of a novel type of surface polysaccharide in *Rhizobium meliloti* requires a new fatty acid synthase-like gene cluster involved in symbiotic nodule development. *Mol. Microbiol.*, 1993, vol. 8, p. 1083-1094.
165. Becquert Kozak, I. De; Reuhs, B. L.; Buffard, D.; Breda, C. y Kim, J. S. Role of the K-antigen subgroup of capsular polysaccharides in the early recognition process between *Rhizobium meliloti* and alfalfa leaves. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 1997, vol. 10, p. 114-123.

166. Niehaus, K.; Albus, U.; Baier, R.; Schiene, K.; Schröder, S. y Pühler, A. Symbiotic suppression of the *Medicago sativa* plant defense system by *Rhizobium meliloti* oligosaccharides. *Biological Nitrogen Fixation for the 21st century*. Dordrecht: Kluwer. 1998. p. 225-226.
167. Van Rhijn, P.; Fang, Y.; Galili, S.; Shaul, O.; Atzmon, N.; Winer, S.; Esheld, Y.; Lum, M.; Li, V. T.; Fujishige, N.; Kapulnik, Y. y Hirsch, A. M. Expression of early nodulin genes in alfalfa mycorrhizae indicates that signal transduction pathways used in forming arbuscular mycorrhizae and *Rhizobium*-induced nodules may be conserved. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997, vol. 94, p. 5467-5472.
168. Frühling, M.; Roussel, H.; Gianinazzi-Pearson, V.; Puhler, A. y Perlick, A. M. The *Vicia faba* leghemoglobin gene *VfLb29* is induced in root nodules and in roots colonized by the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus fasciculatum*. *Mol. Plant Microbe Interact.*, 1997, vol. 10, p. 124-131.
169. Wyss, P.; Mellor, R. B. y Wiemken, A. Vesicular-arbuscular mycorrhizas of wild-type soybean and non-nodulating mutants with *Glomus mossae* contain symbiosis-specific polypeptides (mycorrhizins), immunologically cross-reactive with nodulins. *Planta*, 1990, vol. 182, p. 22-26.
170. Gianinazzi-Pearson, V. Plant cell responses to arbuscular mycorrhizal fungi: getting to the roots of the symbiosis. *Plant Cell*, 1996, vol. 8, p. 1871-1883.
171. Harrison, M. J. The arbuscular mycorrhizal symbiosis: an underground association. *Trends Plant Sci.*, 1997, vol. 2, p. 54-60.
172. LaRue, T. A. y Weeden, N. F. The symbiosis genes of the host. In: *Proceedings of the 1st European Nitrogen Fixation Conference*. Kiss, G.B. and Endre, G (eds). Officina Press, Szeged, Hungary. 1994. p. 147-151.
173. Hirsch, A. M. y Kapulnik, Y. Signal transduction pathways in mycorrhizal associations: Comparison with the *Rhizobium*-Legume symbiosis. *Fungal Gen. Biol.*, 1998, vol. 23, p. 205-212.
174. Scheres, B.; Van Engelen, F.; Van der Knaap, E.; Van de Wiel, C.; Van Kammen, A. y Bisseling, T. Sequential induction of nodulin gene expression in the developing pea nodule. *Plant Cell.*, 1990, vol. 2, p. 687-700.
175. Pingret, J. L.; Journet, E. P. y Barker, D. G. *Rhizobium* Nod factor signaling: evidence for a G protein-mediated transduction mechanism. *Plant Cell*, 1998, vol. 10, p. 659-671.
176. Albrecht, C.; Geurts, R. y Bisseling, T. Legume nodulation and mycorrhizae formation; two extremes in host specificity meet. *EMBO J.*, 1999, vol. 18, p. 281-288.

177. Kouchi, H. y Hata, S. Isolation and characterization of novel nodulin cDNAs representing genes expressed at early stages of soybean nodule development. *Mol. Gen. Genet.*, 1993, vol. 238, p. 106-119.
178. Yang, W. C.; Katinakis, P.; Hendriks, P.; Smolders, A.; Vries, F. de; Spee, J.; Van Kammen, A.; Bisseling, T. y Franssen, H. Characterization of *GmENOD40*, a gene showing novel patterns of cell-specific expression during soybean nodule development. *Plant J.*, 1993, vol. 3, p. 573-585.
179. Heidstra, R.; Yang, W. C.; Yalcin, Y.; Peck, S.; Emons, A. M.; Van Kammen, A. y Bisseling, T. Ethylene provides positional information on cortical cell division but is not involved in Nod factor-induced root hair tip growth in *Rhizobium*-legume interaction. *Development*, 1997, vol. 124, p. 1781-1787.
180. Minami, E.; Kouchi, H.; Cohn, J. R.; Ogawa, T. y Stacey, G. Expression of the early nodulin, *ENOD40*, in soybean roots in response to various lipochitin signal molecules. *Plant J.*, 1996, vol. 10, p. 23-32.
181. Cooper, J. B. y Long, S. R. Morphogenetic rescue of *Rhizobium meliloti* nodulation mutant by trans-zeatin secretion. *Plant Cell*, 1994, vol. 6, p. 215-225.
182. Bradbury, S. M.; Peterson, R. L. y Bowley, S. R. Interaction between three alfalfa nodulation genotypes and two *Glomus* species. *New Phytol.*, 1991, vol. 119, p. 115-120.
183. Ehrhardt, D. W.; Wais, R. y Long, S. R. Calcium spiking in plant root hairs responding to *Rhizobium* nodulation signals. *Cell*, 1996, vol. 85, p. 673-681.
184. Journet, E. P.; El-Gachtouli, N.; Vernoud, V.; Billy, F. de, Pichon, M.; Dedieu, A.; Arnould, C.; Morandi, D.; Barker, D. G. y Gianinazzi-Pearson, V. Medicago truncatula ENOD11: a novel RPRP-encoding early nodulin gene expressed during mycorrhization in arbuscule-containing cells. *Mol Plant Microbe Interact.*, 2001, vol. 14, p. 737-748.
185. Geurts, R.; Heidstra, R.; Hadri, A. E.; Downie, J. A.; Franssen, H.; Van Kammen, A. y Bisseling, T. Sym2 of *Pisum sativum* is involved in a Nodulation factor perception mechanism that controls the infection process in the epidermis. *Plant Physiol.*, 1997, vol. 115, p. 351-359.
186. Schauser, L.; Roussis, A.; Stiller, J. y Stougaard, J. A plant regulator controlling development of symbiotic root nodules. *Nature*, 1999, vol. 402, p. 191-195.

Las micorrizas arbusculares (MA) constituyen una de las simbiosis de más amplia distribución, en la cual se produce una relación muy estrecha entre el hongo y la raíz de la planta hospedera. Esta relación planta-hongo, a pesar de ser una simbiosis de gran beneficio para los participantes, en sus estadios iniciales se produce un desarrollo parasítico transitorio, a favor de ocurrir la penetración y el establecimiento del hongo en la raíz, durante el cual se activan mecanismos de defensa diversos en la planta huésped. Entre las respuestas de defensa inducida se observan el reforzamiento de las paredes celulares, la acumulación de proteínas relacionadas con patogénesis (PR) y modificación de los niveles hormonales. Por su importancia para el proceso de establecimiento de la fase simbiótica y para la protección de la planta ante el ataque por patógenos, abordamos el tema en esta revisión, donde exponemos conceptos generales acerca de la activación de respuestas de defensa en planta y se hace énfasis en los resultados que se han presentado en las MA. Por otra parte, se realiza una comparación entre la simbiosis MA y la interacción *Rhizobium*-leguminosa en relación con mecanismos comunes.

ISBN 959-7023-28-8



9 7 8 9 5 9 7 1 0 2 3 2 8 9