

PRODUCCION DE ENDOGLUCANASAS POR *Glomus mosseae* Y SU POSIBLE IMPLICACION EN LA COLONIZACION DE RAICES DE CEBOLLA

J. M. García-Garrido, I. García-Romera y J. A. Ocampo

*Estación Experimental del Zaidín,
Prof. Albareda, 1. 18008-Granada.*

RESUMEN

Se ha estudiado la producción de enzimas endoglucanasas durante el proceso de penetración y desarrollo del hongo productor de micorrizas vesículo-arbusculares (VA), *Glomus mosseae*, en raíces de plantas de cebolla (*Allium cepa*). Los extractos de raíces de plantas micorrizadas mostraron mayor actividad endoglucanasa que los de plantas no micorrizadas. La actividad endoglucanasa se incrementó, en plantas colonizadas, al comienzo de la etapa logarítmica de desarrollo del hongo en el interior de la raíz, y posteriormente disminuyó. Los extractos procedentes del micelio externo de *G. mosseae* mostraron actividad endoglucanasa. Una de las actividades endoglucanasas que se detectaron en las raíces de plantas micorrizadas se puede atribuir al hongo VA ya que la actividad endoglucanasa detectada en el micelio externo de *G. mosseae* tiene la misma movilidad electroforética que una de las actividades endoglucanasas detectada en los extractos de raíces micorrizadas. Sin embargo, algunas de las actividades endoglucanasas de plantas micorrizadas mostraron una movilidad electroforética diferente tanto a las observadas en el micelio externo como a las observadas en las plantas no micorrizadas.

Los resultados obtenidos sugieren que las endoglucanasas pueden estar implicadas en los procesos de colonización de las raíces de cebolla por *G. mosseae*.

Palabras clave: *Allium cepa*. Celulasas. Endoglucanasas. *Glomus mosseae*. Hongos micorrízicos. Micorrizas VA.

SUMMARY

ENDOGLUCANASE PRODUCTION BY *Glomus mosseae* AND ITS POSSIBLE INVOLVEMENT IN THE COLONIZATION OF ONION ROOTS

We studied the production of endoglucanase (EC 3.2.1.4) enzymes during the process of penetration and development of the vesicular-arbuscular (VA) mycorrhizal fungi *Glomus mosseae* in onion roots (*Allium cepa*). Mycorrhizal plants displayed higher endoglucanase activity than nonmycorrhizal plants. Endoglucanase activity in VA colonized plants increased at the beginning of the logarithmic stage of fungal development and afterwards this activity declined. The extracts from external mycelium of *G. mosseae* had endoglucanase activity. One of the endoglucanase electrophoretic bands detected in VA colonized plant root extracts can be attributed to the VA fungus, since the endoglucanase protein found in the external mycelium of *G. mosseae* and one observed

El presente trabajo se ha realizado con la ayuda económica recibida de la CICYT (Proyecto n.º PB 87-0435-C03-01).

in mycorrhizal root extracts showed the same electrophoretic mobility. However, some of the endoglucanase activities from root extracts of mycorrhizal plants had different electrophoretic mobilities than those observed in both the external mycelium and non-mycorrhizal plant root extracts.

These results suggest that endoglucanases may be involved in the colonization process of onion root by *G. mosseae*.

Key words: *Allium cepa*. Cellulases. Endoglucanases. *Glomus mosseae*. Mycorrhizal fungi. VA mycorrhizas.

INTRODUCCION

La asociación MVA tiene gran importancia en los procesos de nutrición y crecimiento vegetal, constituyendo parte relevante de muchos ecosistemas vegetales naturales. Así mismo, juega un papel importante en la nutrición de especies vegetales de interés agrícola y ganadero (Powell y Bagyaraj, 1984).

El establecimiento de una simbiosis VA eficiente supone la expresión de una serie de caracteres por parte del hongo y de la planta, que condicionan la compatibilidad de la asociación. A nivel estructural supone, primero, el establecimiento y desarrollo de estructuras fúngicas dentro de la raíz hospedadora, necesarias para los procesos de intercambio de nutrientes, y segundo, la adaptación de las células vegetales colonizadas a la situación simbiótica, de tal forma que se originan estructuras morfológicas y funcionalmente compatibles. Por tanto, los factores que condicionan la penetración y desarrollo del hongo VA en la raíz hospedadora van a ser decisivos para que se dé una simbiosis más efectiva (Anderson, 1988).

Tras la penetración, el endofito VA se desarrolla en la corteza radical vegetal (Harley y Smith, 1983). A lo largo de este desarrollo, la pared

celular de la hifa colonizadora sufre una serie de modificaciones estructurales que conducen a su simplificación y pérdida de la estructura laminar, sobre todo en las zonas de intercambio de nutrientes (arbusculos) (Bonfante-Fasolo *et al.*, 1990). De igual forma, el tejido vegetal colonizado se modifica, dilatándose los espacios intercelulares, estrechándose y desapareciendo parcialmente la lámina media, y apareciendo una matriz interfacial osmiófila de material fibroso que rodea a la hifa colonizadora. Esta matriz se hace más patente alrededor de las hifas intracelulares del hongo, las cuales provocan la desorganización de la pared celular vegetal de aquellas células que coloniza, en las que, y siempre sin penetrar su plasmalema, suele formar la estructura arbuscular (Bonfante-Fasolo, 1984).

En el proceso de penetración y desarrollo fúngico en el interior de la raíz deben intervenir enzimas que degraden los componentes estructurales de la pared celular vegetal, tales como celulasas, hemicelulasas y pectinasas, al igual que ocurre en los procesos de penetración y desarrollo de bacterias y hongos fitopatógenos y de microorganismos mutualistas que se asocian con la raíz vegetal

(Collmer y Keen, 1986; Coughlan y Ljungdahl, 1988; Morales *et al.*, 1984). Se ha comprobado la producción de pectinasas por hongos formadores de micorrizas VA (García-Romera *et al.*, 1991). Sin embargo, debido a la imposibilidad de cultivo y manipulación del hongo VA en ausencia de la planta (Harley y Smith, 1983), sólo existen evidencias indirectas que asocian los procesos de penetración y desarrollo con la actuación de los enzimas hidrolíticos (Jeanmougin *et al.*, 1987).

La celulosa es uno de los compo-

nentes principales de la pared celular vegetal, a la cual dota de rigidez (Albersheim, 1976), por lo que las celulasas, especialmente endoglucanasas (Coughlan y Ljungdahl, 1988), deben de estar implicadas en los fenómenos de penetración y desarrollo de los hongos VA en la raíz de la planta.

El objetivo de este trabajo es determinar la posible participación de endoglucanasas en los procesos de colonización de raíces de cebolla por *G. mosseae*.

MATERIAL Y METODOS

Los experimentos se llevaron a cabo utilizando plantas de cebolla (*Allium cepa* var. Babosa). Las plantas se cultivaron en macetas de 300 mL de capacidad en un suelo tipo pardo-rojizo, pH 7.6, procedente de la Provincia de Granada (García-Romera y Ocampo, 1988). El suelo se esterilizó a vapor fluente y se mezcló con arena de cuarzo, previamente esterilizada, en la proporción 1:1 (v:v). Las semillas se sembraron en arena húmeda y, después de dos semanas, las plántulas se transplantaron a las macetas y se cultivaron en invernadero bajo condiciones controladas de luz, temperatura y humedad ($400 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 400-700 nm; 16-8 h luz-oscuridad; 25-19 °C día-noche y 60-70% de humedad relativa). Las plantas se regaron por capilaridad y se aplicó semanalmente 10 mL de solución nutritiva (Hewitt, 1952); a las plantas micorrizadas se les aplicó la solución nutritiva sin fosfato. El inóculo VA consistió en 5 g de suelo proveniente de macetas

de maíz que contenía esporas, micelio y fragmentos de raíz colonizados con *Glomus mosseae*. A los controles no inoculados se les añadió un filtrado del suelo utilizado como inóculo. El filtrado se realizó utilizando papel de filtro Whatman n.º 1 que permite el paso de los microorganismos comunes del suelo pero evita el paso de los propagulos de *G. mosseae*. Las plantas se cosecharon después de 15, 30, 50 y 80 días de cultivo. El sistema radical se lavó y enjuagó tres veces con agua destilada estéril. Las raíces provenientes de cada una de las cinco repeticiones utilizadas se dividió en dos grupos para determinar i) el porcentaje de longitud de raíz micorrizada y ii) la actividad endoglucanasa.

El micelio externo se aisló a partir de raíces de cebolla de 8 semanas colonizadas con *G. mosseae*. Las raíces se lavaron y enjuagaron con agua destilada estéril, y el micelio externo se recogió, bajo lupa binocular, con pinzas.

Medida del porcentaje de micorrización

Las raíces (2 g de peso fresco) se clarificaron y tiñieron (Phillips y Hayman, 1970) y el porcentaje de longitud de raíz colonizada se determinó mediante la técnica de intersección de líneas en placa cuadrículada (Giovanetti y Mosse, 1980).

Preparación de extractos para las determinaciones enzimáticas

Las raíces (20 g de peso fresco) se congelaron en nitrógeno líquido y se pulverizaron en mortero de porcelana. El polvo resultante se homogeneizó en 40 mL de tampón Tris-HCl 0.1 M (pH 7) que llevaba incorporado 13 g de polivinil-pirolidona (PVPP), $MgCl_2$ 10 mM, $NaHCO_3$ 10 mM, β -mercaptoetanol 10 mM, fluoruro de fenilmetilsulfonil 0.15 mM (PMSF) y Tritón X-100 al 0.3%. A todas las soluciones se le añadió azida de sodio (0.03%). El líquido resultante se filtró a través de varias capas de gasa, se centrifugó durante 15 min a 20,000 xg, y el precipitado resultante se resuspendió y lavó, mediante centrifugación, con el mismo tampón, tres veces. Al sobrenadante se añadió sulfato amónico hasta el 80% de saturación. La solución se mantuvo en agitación durante 5 h a 4 °C y se centrifugó de nuevo como se describió anteriormente. Se eliminó el sobrenadante y el sedimento se disolvió en un volumen pequeño de la misma solución de extracción y se dializó frente a varios cientos de volúmenes de la misma solución extractante diluida en la proporción 1:9 (v/v), durante 16 h a 4 °C. Las muestras se mantuvieron congeladas hasta el momento de su uso.

El micelio externo se pulverizó en mortero con nitrógeno líquido. El polvo resultante se suspendió (30 mg mL⁻¹) en la misma solución extractante que se utilizó para las raíces. La suspensión se sonicó 5 veces durante 1 min a 80 W y se centrifugó a 20000 xg durante 15 min. El precipitado se resuspendió, sonicó y lavó con el mismo tampón tres veces. Los sobrenadantes se concentraron mediante ultrafiltración utilizando membranas PM-10 (AMICON) y se utilizaron como extracto enzimático crudo.

Ensayos enzimáticos

La actividad endoglucanasa (EC 3.2.2.4) procedente de los extractos de micelio externo de *G. mosseae* se detectó mediante el método de placas de agar (García-Romera *et al.*, 1990). Las muestras se incubaron en agar (1%) con 0.1% de carboximetilcelulosa (CMC) durante 16 h a 30 °C. Los halos de actividad enzimática se revelaron añadiendo rojo Congo (0.1%) a las placas, incubando durante 15 min, y lavándolas con NaCl 1 M.

La medida de actividad endoglucanasa se llevó a cabo mediante el método de viscosimetría utilizando como sustrato CMC de alta viscosidad. La reducción de viscosidad se determinó mediante viscosímetros Cannon-Fenske (5354/2) a 37 °C. La mezcla de reacción consistió en 5 mL de sustrato enzimático (0.5%) disuelto en tampón ac. cítrico fosfato 50 mM (pH 5) y 1 mL de enzima. Una unidad enzimática se refiere a la actividad relativa por mg de proteína. La actividad relativa viene definida como la inversa del tiempo, en minutos, necesario para la pérdida del

50% de viscosidad $\times 1000$ (Bate-man, 1963).

Como controles para todos los ensayos enzimáticos se utilizaron extractos enzimáticos autoclavados y tampones. A todas las mezclas de reacción se les añadió azida de sodio hasta alcanzar la concentración del 0.03%.

Electroforesis en geles de poliacrilamida

El método seguido se basó en el descrito para la determinación de pectinasas (Cruickshank y Wade, 1980). Se utilizó una electroforesis no desnaturalizante en geles de poliacrilamida con un gradiente líneal del 4 al 12%, mezclada con 0.1% de CMC, en tampón 0.05 M Tris-0.1 M glicocola (pH 8.8). Se emplearon geles con una dimensión de $160 \times 180 \times 1.5$ mm. El desarrollo de la electroforesis se llevó a cabo en una cubeta vertical (LKB 2001) utilizando como sistema de electrodos el tampón que se utilizó en el gel. A

cada pocillo del gel se aplicó un volumen de muestra de $75 \mu\text{L}$. Las muestras, con una concentración de proteínas de 2 mg mL^{-1} , contenían el 10% de glicerol y $5 \mu\text{L}$ $100 \mu\text{L}$ de muestra de una solución de azul de bromofenol al 0.25%, que sirvió con indicador del frente de la electroforesis. Los geles se sometieron a una pre-electroforesis durante 30 min a 10 mA gel^{-1} y la electroforesis se llevó a cabo a 4°C y una corriente constante de 20 mA por gel durante 7 h. Los geles se incubaron en 100 mL de tampón ac. cítrico-fosfato (pH 5) a 37°C durante 15 h, transcurrido este tiempo los geles se sometieron a tinción con una solución al 0.1% de rojo Congo durante 30 min. Posteriormente se lavaron los geles con $\text{NaCl } 1 \text{ M}$ hasta que las bandas de actividad fueron visibles.

Las proteínas se determinaron por el método de Lowry *et al.* (1951) utilizando como patrón albumina de suero bovina (SIGMA).

RESULTADOS

Los extractos de micelio externo de *G. mosseae* produjeron halos de hidrólisis en placas de agar-CMC (resultados no presentados).

La colonización de cebolla por *G. mosseae* siguió una curva sigmoidal típica en la que hubo un máximo desarrollo fúngico en la raíz a partir de los 15 días y una estabilización a partir de los 50 días (Fig. 1).

La actividad endoglucanasa de raíces de plantas de cebolla no colonizadas se mantuvo hasta los 30 días para disminuir posteriormente. En plantas de cebolla colonizadas la acti-

vidad endoglucanasa se incrementó significativamente a los 30 días para después disminuir hasta alcanzar unos niveles similares al de plantas no colonizadas (Fig. 1).

La figura 2 muestra la distribución de bandas de actividad endoglucanasa de extractos de raíz de plantas de cebolla, no colonizadas y colonizadas por *G. mosseae*, cosechadas a distintos tiempos de cultivo y, por tanto, de desarrollo de la colonización. Como puede observarse, en plantas con la misma edad el número de bandas con actividad endoglu-

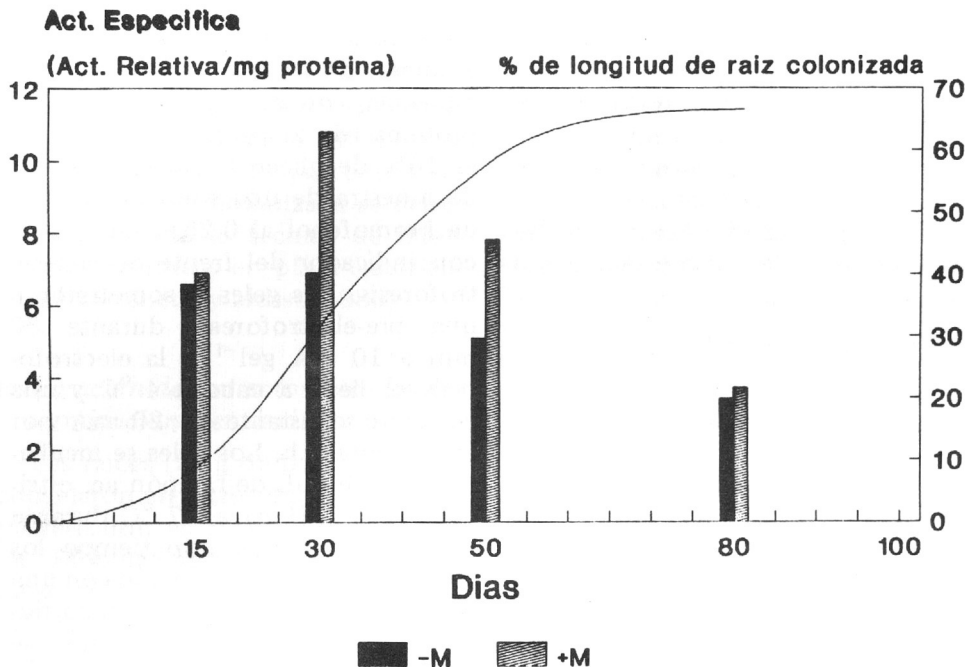


FIG. 1.—Evolución del porcentaje de longitud de raíz colonizada y actividad endoglucanasa en raíces de plantas de cebolla, colonizadas (+ M) o no (- M) por *Glomus mosseae*. Cada valor es la media de 5 medidas. La barra vertical representa el error estándar de la media.

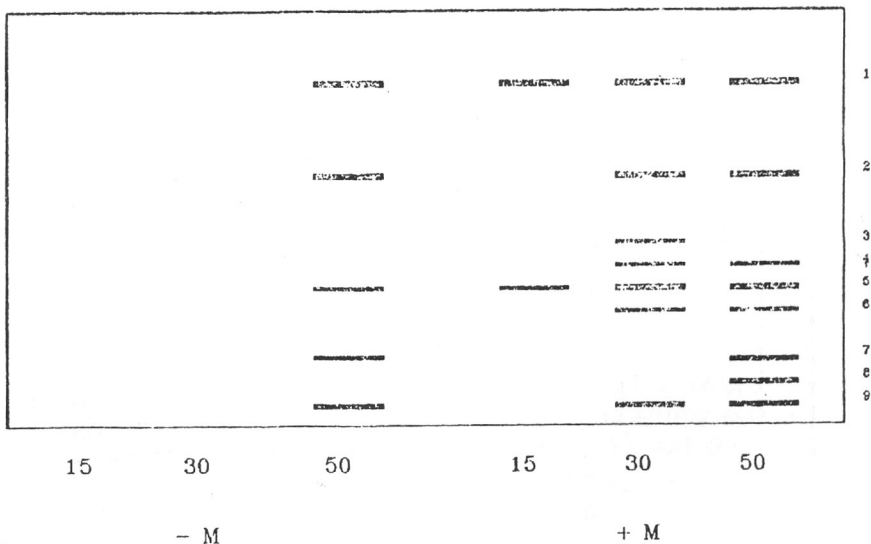


FIG. 2.—Bandas de actividad endoglucanasa en gel de poliacrilamida en gradiente del 4 al 12% de extractos de raíz de plantas de cebolla, colonizadas (+ M) o no (- M) por *Glomus mosseae* y cosechadas a diferentes tiempos de cultivo (15, 30 y 50 días). A cada pocillo del gel se aplicó 0,75 mg de proteína.

canasa fue mayor en las plantas colonizadas que en no colonizadas. Se puede apreciar la existencia de bandas de actividad comunes en plantas colonizadas y no colonizadas (Bandas 1, 2, 5, 7 y 9) pero estas bandas aparecen antes en las plantas colonizadas. También aparecieron bandas de actividad endoglucanasa (Bandas 3, 4, 6 y 8) exclusivas de plantas colonizadas (Fig. 2).

Según resultados descritos anteriormente durante la fase logarítmica de desarrollo del hongo VA en la raíz es cuando las diferencias en actividad entre plantas colonizadas y no colonizadas es máxima. Por ello

se realizó un análisis electroforético de actividad celulásica de extractos de raíz de cebolla no colonizadas y colonizadas en un 65% de longitud de raíz y una edad de 50 días, incrementando además el tiempo de incubación del gel con el fin de aumentar la resolución de zonas de poca actividad (Fig. 3). Se observó como el patrón de distribución de actividad en el gel en plantas colonizadas fue diferente al ofrecido por extractos de plantas controles crecidas en las mismas condiciones. Una de estas bandas diferentes (Banda 8) presentó la misma movilidad electroforética que la

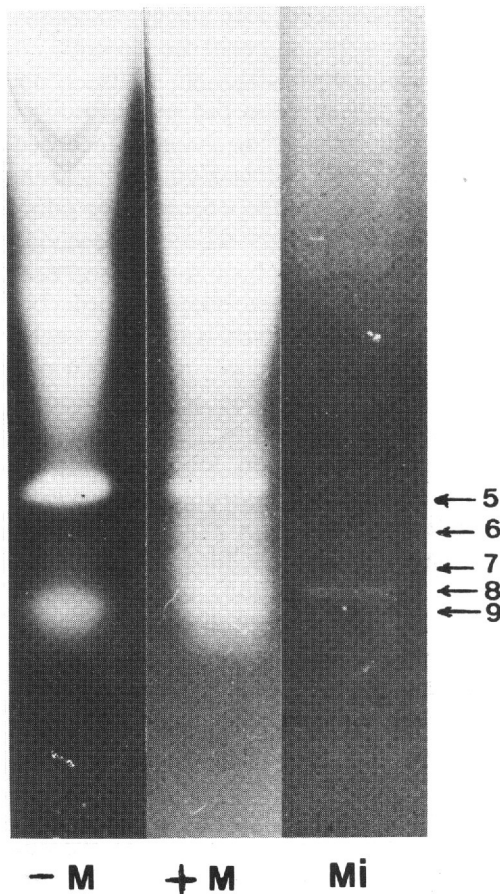


FIG. 3.—Bandas de actividad endoglucanasa en gel de poliacrilamida en gradiente del 4 al 12% de extractos de raíz de plantas de cebolla, colonizadas (+M) o no (-M) por *Glomus mosseae* y de micelio externo de dicho hongo (Mi). A cada pocillo del gel se aplicó 0.75 mg de proteína.

aparecida en extracto de micelio externo de *G. mosseae*, otras (Bandas 5, 7 y 9) resultaron ser similares a ambas plantas y otras diferen-

tes tanto a la aparecida en el micelio como a las de plantas controles no colonizadas (Banda 6).

DISCUSION

En nuestros experimentos hemos puesto de manifiesto que los extractos de micelio externo de *G. mosseae* poseen actividad endoglucanasa. Esta actividad también se ha observado en ciertos hongos ericoides y ectomicorrízicos (Giltrap y Lewis, 1982), pero que no se había podido detectar en las estructuras fúngicas de los hongos VA (Anderson, 1988).

Examinando el desarrollo de actividad celulásica en extractos de raíz de plantas colonizadas y no colonizadas por hongos VA pudimos observar que existe una mayor actividad en plantas colonizadas respecto a no colonizadas, y que el máximo de actividad coincide con la etapa de expansión del hongo en la raíz (fase logarítmica). Se sabe que el desarrollo del hongo en el interior de la raíz sigue un modelo general común en todo tipo de asociación de micorrizas VA, en el que la etapa logarítmica de crecimiento del hongo se caracteriza por un desarrollo masivo de arbusculos, principalmente, y puntos de entrada (Hayman, 1983). El desarrollo de arbusculos supone la penetración de la hifa en la pared celular vegetal y en consecuencia la desorganización estructural de dicha pared (Bonfante-Fasolo, 1984), acompañada de la formación de una matriz interfacial con componentes fibrilares procedentes del hospedador (Dexheimer, *et al.*, 1979). Este hecho viene apoyado por la presen-

cia, en los hongos VA, de actividades hidrolíticas (endoglucanasas) de polímeros de pared celular vegetal (García-Romera *et al.*, 1990). Se ha sugerido la posibilidad de que estos componentes fuesen utilizados por el hongo como fuente adicional de carbono necesaria para el desarrollo del hongo VA en el interior de la raíz (Schwab, *et al.*, 1991).

Por otro lado, esta actividad hidrolítica puede ser causante de que en la fase arbuscular, y sobre todo en las ramas finas del arbusculo, el material fibrilar de la interfase sea mínimo (Bonfante-Fasolo, 1984), pudiendo el hongo degradar los componentes de la pared celular vegetal y los precursores de pared segregados por la célula hospedadora. De hecho encontramos que una actividad endoglucanasa presente en micelio de *G. mosseae* se corresponde electroforéticamente con una de las encontradas en los extractos de raíz de plantas colonizadas con este endofito VA. Esta idea no está en desacuerdo con la hipótesis de Harley y Smith (1983) que proponen que la hifa arbuscular posee la capacidad de inhibir la polimerización de los componentes de pared segregados por la célula hospedadora.

La penetración y desorganización del material de pared de la célula hospedadora por el hongo VA debe de ser un proceso controlado y regulado. La regulación de este proceso

de penetración podría hacerse a dos niveles: uno mediado por la inhibición de la actividad endoglucanasa debido a la alta concentración de carbohidratos en la zona de interacción (Gianinazzi-Pearson, 1984), lo cual supondría una regulación relacionada con la nutrición. El otro, no excluyente del anterior, podría ser el que la planta controle la desorganización de su pared celular causada por la inducción o producción de actividad endoglucanasa del hongo, al igual que ocurre en el proceso de elongación celular. De hecho, las plantas colonizadas mostraron mayor actividad endoglucanasa propia que las plantas no colonizadas.

Algunas de las actividades enzimáticas de plantas colonizadas son inducidas por la presencia del hongo VA en edades más tempranas de la planta, por lo que la planta colonizada, al tener mayor actividad endoglucanasa propia, contribuiría en mayor grado a la degradación de su pared permitiendo el desarrollo del hongo VA en el interior de la raíz.

Sin embargo, en etapas más avanzadas del desarrollo de la simbiosis (a partir de 50 días en nuestras condiciones experimentales), el incremento de actividad endoglucanasa de plantas colonizadas disminuyó para hacerse similar al de plantas no colonizadas. Con lo que, de esta forma, se hace patente el efecto regulador ejercido por la planta sobre las actividades endoglucanasas inducidas o producidas por el hongo VA. No obstante, encontramos una actividad celulásica en los extractos de micelio que correspondía electroforéticamente con una de las encontradas en los extractos de raíz de plantas colonizadas. Este hecho nos indicaba la posible importancia de esta actividad en los procesos de colonización de la raíz por los hongos VA. Los resultados obtenidos en nuestro trabajo indican, por tanto, la posibilidad de que la producción de endoglucanasas por los hongos VA juegen un papel importante en los procesos de colonización de la raíz por los hongos formadores de micorrizas VA.

CONCLUSIONES

Las esporas y micelio externo del hongo formador de micorrizas VA *G. mosseae*, poseen actividad endoglucanasa.

Durante la evolución de la simbiosis VA hay una fase de máxima producción de actividad endoglucanasa, que coincide con la etapa de crecimiento logarítmico del hongo en la raíz.

La raíz colonizada por *G. mosseae*

muestra la aparición de actividad endoglucanasa en estudios de crecimiento anteriores al de la raíz no colonizada.

Los extractos de micelio externo de *G. mosseae* poseen una banda de actividad endoglucanasa con la misma movilidad electroforética que una de las detectadas en extractos de raíz colonizada, ausente en raíz no colonizada.

BIBLIOGRAFIA

- ALBERSHEIM, P., 1976. The primary cell wall. In: Plant Biochemistry. J. Bonner y J. E. Varner, (Eds.). 225-274, Academic Press, New York.
- ANDERSON, A. J., 1988. Mycorrhizae-host specificity and recognition. Am. Phytopathol Soc., 78: 375-378.
- BATEMAN, D. F., 1963. Pectolytic activities of culture filtrates of *Rhizoctonia solani* and extract of *Rhizoctonia*-infected tissues of bean. Phytopathol., 53: 197-204.
- BONFANTE-FASOLO, P., 1984. Anatomy and morphology of VA mycorrhizae. In: VA Mycorrhiza. Eds. C. LL. Powell y D. J. Bagyaraj, 5-33. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- BONFANTE-FASOLO, P., VIAN, B., PEROTTO, S., FACCIO, A. and KNOX, J. P., 1990. Cellulose and pectin localization in roots of mycorrhizal *Allium porrum*: labeling continuity between host cell and interfacial material. Planta, 180: 537-547.
- COLLMER, A. and KEEN, N. T., 1986. The role of pectic enzymes in plant pathogenesis. Ann. Rev. Phytopathol., 24: 383-409.
- COUGHLAN, M. P. and LJUNGDAHL, L. G., 1988. Comparative biochemistry of fungal and bacterial cellulolytic enzymes system. In: Biochemistry and genetics of cellulose degradation, FEMS symposium n.º 43. Eds. J. P. Aubert, P. Beguin y J. Millet. Academic Press, London.
- CRUICKSHANK, R. H. and WADE, G. C., 1980. Detection of pectin enzymes in pectin-acrilamide gels. Anal. Biochem., 107: 177-181.
- DEXHEIMER, J., GIANINAZZI, S. and GIANINAZZI-PEARSON, V., 1979. Ultrastructural cytochemistry of the host-fungus interface in the endomycorrhizal association *Glomus mosseae/Allium cepa* Z. Pflanzenphysiol., 92: 191-206.
- GARCIA-ROMERA, I., GARCIA-GARRIDO, J. M., MARTINEZ-MOLINA, E. and OCAMPO, J. A., 1990. Possible influence of hydrolytic enzymes on vesicular-arbuscular mycorrhizal infection of alfalfa. Soil Biol. Biochem., 22: 149-152.
- GARCIA-ROMERA, I., GARCIA-GARRIDO, J. M. and OCAMPO, J. A., 1991. Pectolytic enzymes in the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. FEMS Microbiology Letters., 78: 343-346.
- GARCIA-ROMERA, I. and OCAMPO, J. A., 1988. Effect of the herbicide MCPA on VA mycorrhizal infection and growth of *Pisum sativum*. Z. Pflanzener. Boden., 151: 225-228.
- GIANINAZZI-PEARSON, V., 1984. Host-fungus specificity, recognition and compatibility in mycorrhizae. In: Genes involved in microbe-plant interactions. D. P. S. Verma y Th. Hohn. (Eds.). 225-253. Springer-Verlag, New York.
- GILTRAP, N. J. and LEWIS, D. H., 1982. Catabolite repression of the synthesis of pectin-degrading enzymes by *Suillus luteus* S. F. Gray and *Hebeloma oculatum* bruchet. New Phytol., 90: 485-493.
- GIOVANNETTI, M. and MOSSE, B., 1980. An evaluation of techniques for measuring vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in roots. New Phytol., 84: 489-500.
- HARLEY, J. L. and SMITH, S. E., 1983. Mycorrhizal Symbiosis. Academic Press, London, New York.
- HAYMAN, D. S., 1983. The physiology of vesicular-arbuscular endomycorrhizal symbiosis. Can. J. Bot., 61: 944-963.
- HEWITT, E. J., 1952. Sand and water culture methods used in the study of plant nutrition. Tech. Comm. Farham. Roy. Bucks. Comm. Agric. Bur., 22.
- JEANMOUGIN, J., GIANINAZZI-PEARSON, V. and GIANINAZZI, S., 1987. Endomy-

corrhizas in the *Gentianaciae*. I. Ultrastructural aspects of symbiont and relationships in *Gentiana lutea*. *Symbiosis*, 3: 269-286.

- LOWRY, O. H., ROSERBROUGH, N. J., FARR, A. L. and RANDALL, R. J., 1951. Protein measurement with the Folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193: 267-275.
- MORALES, V. M., MARTINEZ-MOLINA, E. and HUBBELL, D. H., 1984. Cellulase production by *Rhizobium*. *Plant and Soil*, 80: 407-415.
- PHILLIPS, J. M. and HAYMAN, D. S., 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, 55: 158-161.
- POWELL, C. LL. and BAGYARAJ, D. J., 1984. VA mycorrhizas. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- SCHWAB, S., MENGE, J. A. and TINKER, P. B., 1991. Regulation of nutrient transfer between host and fungus in vesicular-arbuscular mycorrhizas. *New. Phytol.*, 117: 387-398.

Recibido: 20-2-92.
Aceptado: 12-5-92.